

Neurologische Klinik und Poliklinik der  
Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Hemmer)



**Signalwege und Metabolismus des Endocannabinoids Anandamid im  
Gehirn des Menschen:  
Expression des Cannabinoid-1-Rezeptors sowie der Enzyme  
NAPE-PLD und FAAH**

*Felix Johannes Franz Bonke*

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

*Doktors der Medizin*

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. A. Berthele  
2. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth

Die Dissertation wurde am 29.06.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.09.2007 angenommen.

1	Einleitung .....	1
1.1	Cannabinoid-Rezeptoren .....	2
1.1.1	Cannabinoid-1-Rezeptoren (CB <sub>1</sub> ) .....	2
1.1.2	Cannabinoid 2-Rezeptoren (CB <sub>2</sub> ).....	5
1.1.3	Weitere mögliche Cannabinoid-Rezeptoren.....	6
1.2	Endogene Cannabinoide .....	6
1.2.1	Anandamid (N-Arachidonylethanolamin).....	6
1.2.2	2-Arachidonylglycerol .....	9
1.2.3	Weitere Endocannabinoide.....	10
1.3	Physiologie des Endocannabinoidsystems .....	10
1.3.1	Elektrophysiologische Prozesse an der Synapse .....	10
1.3.2	Effekte in vivo .....	13
1.4	Therapeutische Aspekte.....	14
2	Aufgabenstellung .....	16
3	Methoden.....	17
3.1	Gewinnung und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials .....	17
3.1.1	Gewinnung des Gehirngewebes .....	17
3.1.2	Anfertigung von Gefrierschnitten .....	17
3.2	Revers transkribierte Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) .....	18
3.2.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	18
3.2.2	Reverse Transkription (RT).....	18
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	19
3.2.4	Gelelektrophorese .....	20
3.3	In situ Hybridisierung .....	20
3.3.1	Radioaktive Markierung der Oligonukleotide.....	21
3.3.2	Fixierung der Gewebeschnitte.....	22
3.3.3	Semiquantitative Film-Autoradiografie.....	23
3.3.4	Semiquantitative Emulsions-Autoradiographie .....	23
3.3.5	Auswahlkriterien für Oligonukleotidsonden und Primer .....	24
3.4	Immunhistochemie.....	25
3.4.1	Fixierung der Gewebeschnitte.....	25
3.4.2	Ablauf der Immunhistochemie.....	25
3.4.3	Auswertung der Immunhistochemie .....	26
4	Ergebnisse .....	27
4.1	RT-PCR .....	27
4.2	In situ Hybridisierung .....	28

4.2.1	mRNA-Expression des Enzyms NAPE-PLD.....	28
4.2.2	mRNA-Expression des Cannabinoid 1-Rezeptors (CB <sub>1</sub> ) .....	34
4.2.3	mRNA-Expression des Enzyms FAAH.....	40
4.3	Immunhistochemie mit N-terminalen CB <sub>1</sub> -Rezeptor-Antikörpern.....	47
5	Diskussion.....	52
5.1	Splice-Varianten des CB <sub>1</sub> -Rezeptors im menschlichen Gehirn .....	52
5.2	Signalwege von Anandamid: Funktion und Expression von NAPE-PLD, CB <sub>1</sub> und FAAH ...	52
5.2.1	Neocortex.....	53
5.2.2	Hippocampale Formation .....	56
5.2.3	Amygdala.....	59
5.2.4	Thalamus.....	60
5.2.5	Hypothalamus und angrenzende Strukturen.....	62
5.2.6	Basalganglien .....	64
5.2.7	Cerebellum.....	67
5.2.8	Hirnstamm .....	69
5.2.9	Weißer Substanz .....	69
5.3	Spezies-Differenzen .....	70
5.4	Pathophysiologische und therapeutische Implikationen.....	72
5.4.1	Bewegungsstörungen .....	72
5.4.2	Morbus Alzheimer .....	74
5.4.3	Epilepsie .....	74
5.4.4	Stoffwechselstörungen.....	75
5.4.5	Schmerz und Entzündung .....	76
5.4.6	Sonstige Erkrankungen .....	76
6	Zusammenfassung .....	78
7	Anhang .....	I
7.1	Chemikalien und Reagenzien.....	I
7.1.1	Anfertigen der Gefrierschnitte / Histologie.....	I
7.1.2	In situ Hybridisierung .....	I
7.1.3	RT-PCR .....	II
7.1.4	Oligonukleotide und Primer .....	II
7.1.5	Immunhistochemie.....	III
7.2	Literaturverzeichnis .....	IV

*Verwendete Abkürzungen:*

ACC	anteriorer cingulärer Cortex
AD	Alzheimer's disease
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	copy-Desoxyribonucleic Acid
cpm	counts per minute
DGL	Diacylglycerol Lipase
DSE	depolarization induced suppression of excitation
DSI	depolarization induced suppression of inhibition
ECS	Endocannabinoidsystem
FAAH	Fatty acid amide hydrolase
g	Gramm
HD	Huntington's disease
IHC	Immunhistochemie
ISH	in situ Hybridisierung
l	Liter
LTD	long-term depression
LTP	long-term potentiation
MGL	Monoacylglycerol Lipase
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
Min.	Minute(n)
NAPE-PLD	N-Acyl-Phosphatidyl-Ethanolamin Phospholipase D
PD	Parkinson's disease
PFC	präfrontaler Cortex
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLC	Phospholipase C
PMC	Prämotorischer Cortex
Sek.	Sekunde(n)

Abkürzungen anatomischer Strukturen sind in den Legenden der entsprechenden Abbildungen erläutert.

Die anatomische Terminologie und Schreibweise entspricht den Nomina anatomica.

## 1 Einleitung

„Nimmst du es im Übermaß, wird es dich Teufel sehen lassen, und nimmst du es über längere Zeit, dann macht es dich reden mit Geistern und erhellt deinen Körper.“

Schon die erste schriftlich niedergelegte Beschreibung der psychotropen Wirkung von *Cannabis sativa* lässt anklingen, wie schwierig es über all die Jahrhunderte stets gewesen ist, sich das enorme therapeutische Potenzial der Hanfpflanze nutzbar zu machen. Oben erwähntes Zitat entstammt dem *Pen-ts'ao ching*, dem ältesten erhaltenen Arzneimittelbuch der Menschheitsgeschichte, das im ersten Jahrhundert nach Christus im China der Han-Dynastie entstand (Li, 1978). Das *Pen-ts'ao ching* ist die Zusammenstellung uralter naturheilkundlicher Traditionen, die sich bis in die Zeit um 2700 v. Chr. zurückverfolgen lassen. Tatsächlich aber konnten die ersten Zeugnisse menschlicher Nutzung von Cannabis bereits in archäologischen Funden aus dem Jahr 4000 v. Chr. nachgewiesen werden (Li und Lin, 1974).

Jene gleichfalls in China gemachten Funde sind beispielhaft für die ursprüngliche Verbreitung von Cannabis sativa. Denn während der ersten Jahrtausende war die Pflanze nur im asiatischen Raum ein Begriff. Dort fand sie unter anderem Verwendung als Analgetikum, Hypnotikum, Antikonvulsivum oder zur Therapie von rheumatischen und intestinalen Erkrankungen (Touw, 1981). Auch von rituellem Cannabis-Gebrauch wird berichtet.

In die westliche Medizin hielt Cannabis erst Mitte des 19. Jahrhunderts Einzug. Maßgebend hierfür waren vor allem die Arbeiten des irischen Arztes O'Shaughnessy und des französischen Psychiaters Moreau, die erstmals Experimente zur pharmazeutischen Anwendung der Pflanze durchführten (Mikuriya, 1969; Moreau, 1845; O'Shaughnessy, 1843). Bis ins frühe 20. Jahrhundert hinein galt Cannabis dann als großer Hoffnungsträger für die Behandlung zahlreicher neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen und wurde vornehmlich als Sedativum, Hypnotikum und Analgetikum angewandt. Auch seine orexigene Wirkung stieß neben den vielfältigen anderen pharmakologischen Effekten auf medizinisches Interesse.

In den folgenden Jahrzehnten vollzog sich dann der langsame Abstieg der Arznei in die Belanglosigkeit. Dies hatte mehrere Gründe. Zum einen war es nicht möglich gewesen, den Effekten der Pflanze einen konkreten Wirkstoff zuzuordnen und diesen zu isolieren, so dass man auf Tinkturen und Extrakte angewiesen war, die erhebliche Unterschiede in ihrer Wirksamkeit besaßen und große Schwierigkeiten bei der Steuerung und Dosierung bereiteten. Zum anderen konnten Substanzen wie Opiate oder Barbiturate in ihrer Anwendung optimiert werden, so dass Cannabis bei vielen Indikationen nahezu obsolet wurde (Zuardi, 2006).

Den Todesstoß versetzte der Hanfpflanze dann die Verschärfung der Gesetzgebung. Vor allem in den USA war damit der Gebrauch von Cannabis legal kaum noch möglich. Erst in den sechziger Jahren gewann die Pflanze wieder an Bedeutung: In gesellschaftlicher Hinsicht durch den aufkommenden hedonistischen Massenkonsum unter den Jugend- und Studentenbewegungen und von wissenschaftlicher Seite durch die Isolierung und Charakterisierung der aktiven Komponente, des Tetrahydrocannabinols (Gaoni und Mechoulam, 1964; Mechoulam und Gaoni, 1967).

Das Interesse der Forscher war damit neu entfacht, jedoch sollte es noch einmal ein gutes Vierteljahrhundert dauern, bis der nächste bedeutende Fortschritt erzielt werden konnte; ein Fund, der sich möglicherweise als entscheidender Wendepunkt in der Jahrtausende alten Geschichte von Cannabis sativa und seiner Verwendung als Pharmakon herausstellen könnte: Die Entdeckung des Cannabinoid-1- Rezeptors (Matsuda et al., 1990).

## ***1.1 Cannabinoid-Rezeptoren***

### ***1.1.1 Cannabinoid-1-Rezeptoren (CB<sub>1</sub>)***

Nachdem sich Ende der 80er Jahre die Hinweise auf das Vorhandensein eines spezifischen Rezeptors verdichtet (Devane et al., 1988) und abweichende Hypothesen (Hillard et al., 1985) sich als nicht haltbar herausgestellt hatten, gelang es im Jahre 1990 der Forschungsgruppe um Lisa Matsuda, einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor zu klonen, der durch cannabinoidege Aktivierung hemmend auf die Adenylat-Cyclase wirkt (Matsuda et al., 1990). Diese Erkenntnis führte in den folgenden Jahren zu einem sprunghaften Anstieg der Veröffentlichungen. Mit großem Eifer bemühte man sich nun um ein tieferes Verständnis des endogenen Cannabinoidsystems, das sich schon bald als komplexer Mikrokosmos mit nicht zu unterschätzender Bedeutung für den Gesamtorganismus entpuppen sollte.

#### ***1.1.1.1 Molekularbiologische Eigenschaften***

Ein Jahr nach Matsuda, die den Rezeptor aus der cDNA von Ratten geklont hatte, vollzogen Gérard und Mitarbeiter dies für den Menschen nach (Gerard et al., 1991). Es zeigte sich, dass beide Rezeptoren eine 97-prozentige Übereinstimmung auf Ebene der Aminosäuren aufweisen und fast identische Eigenschaften in Bezug auf die Bindungsaffinität der Liganden besitzen (Felder et al., 1992).

Molekularbiologisch gehören die CB<sub>1</sub>-Rezeptoren der Rhodopsin-Subfamilie unter den G-Protein gekoppelten Rezeptoren an. Sie verfügen über sieben transmembranäre Domänen (s. Abb. 1.1), die clusterförmig angeordnet sind und nach Ligandenkontakt die auf zytoplasmatischer Seite angelagerten inhibitorischen G-Proteine aktivieren (Mukhopadhyay und Howlett, 2001). Bedeutendste Konsequenz daraus ist die Hemmung der Adenylatcyclase und die damit verbundene Senkung des intrazellulären Cyclo-AMP-Spiegels (Howlett und Fleming, 1984). Daneben hat man jedoch auch eine Vielzahl anderer zellulärer Prozesse entschlüsselt, die durch CB<sub>1</sub>-Aktivierung getriggert werden, wie die

Phosphorylierung der MAP-Kinase (Bouaboula et al., 1995) oder die Konformationsänderung von Ionenkanälen (Caulfield und Brown, 1992; Mackie et al., 1995).

Für den CB<sub>1</sub>-Rezeptor sind in den codierenden Genabschnitten bislang zwei Splicevarianten (hCB1a und hCB1b) beschrieben (Ryberg et al., 2005; Shire et al., 1995), die ein ähnliches Verteilungsmuster über die Gewebe aufweisen wie CB<sub>1</sub>, jedoch in deutlich geringerem Maße exprimiert werden. Im Vergleich zum klassischen Rezeptor besitzen sie veränderte Bindungseigenschaften, vor allem in Bezug auf endogene Cannabinoide. Ihre physiologische Aufgabe ist derzeit noch unklar, man vermutet, dass sie Einfluss auf das Suchtverhalten von Cannabis-Konsumenten nehmen könnten.

Auch die nicht codierenden Genabschnitte unterliegen einer gewissen Variabilität und können verschiedenen Subgruppen zugeordnet werden (Zhang et al., 2004).

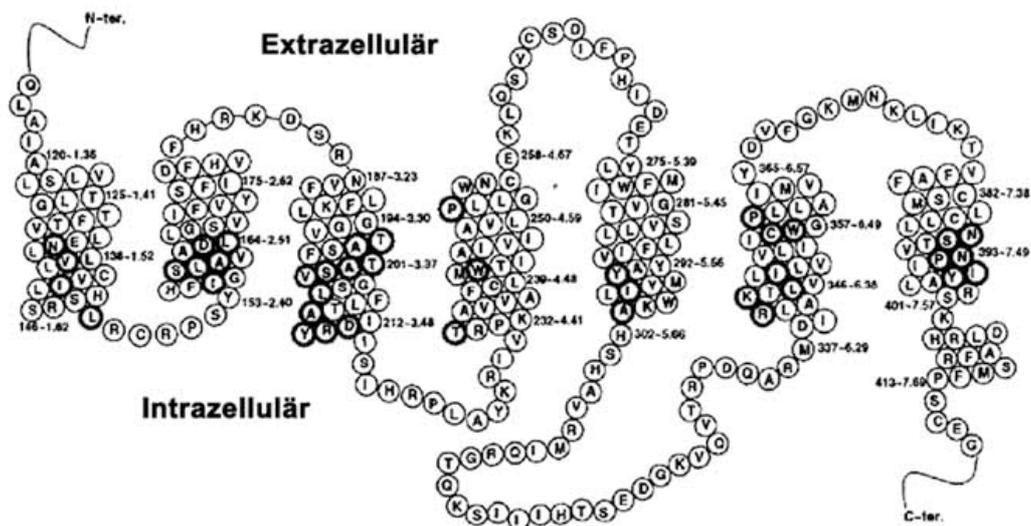


Abb. 1.1: Modell des CB<sub>1</sub>-Rezeptors nach Bramblett et al. (1995)

### 1.1.1.2 Verteilung des Rezeptors

Unmittelbar nach der Klonierung des Rezeptors galten die Hauptbemühungen der Eruiierung seiner Expressionsorte. Aufgrund der beobachteten Effekte der Cannabinoide und der hohen CB<sub>1</sub>-Konzentration im Gehirn (Gerard et al., 1991) stand dabei fast ausschließlich das zentrale Nervensystem im Vordergrund; erst mit der Zeit kristallisierte sich dann auch eine gewisse Präsenz des Rezeptors in peripheren Geweben wie dem Gastrointestinaltrakt und dem Herz-Kreislauf-System heraus (Ryberg et al., 2005).

Den Anfang machten autoradiografische Studien, die sich des radioaktiv markierten CB<sub>1</sub>-Agonisten <sup>3</sup>H-CP55,940 bedienten. Große Beachtung fand dabei vor allem die Arbeit Herkenhams aus dem Jahre 1991, der an der Ratte in einer Vielzahl von Hirnregionen die Rezeptordichte maß und quantitativ gegenüberstellte. Augenscheinlich war zunächst einmal das fast ubiquitäre Vorkommen der Rezeptor-

ren und ihre besonders hohe Konzentration im Kleinhirn sowie in einigen Kernen der Basalganglien wie dem Globus pallidus und der Pars reticulata der Substantia nigra. Auch im Hippocampus konnte eine hohe Präsenz von CB<sub>1</sub> festgestellt werden. Hier waren es der Gyrus dentatus und die CA3-Region, in denen die höchsten Messwerte erzielt wurden. Etwas moderater, aber dennoch deutlich exponiert stellte sich das Signal in der Großhirnrinde dar. Besonders das Cingulum und der frontale Cortex stachen hier heraus. Weiterhin ergab sich im Corpus amygdaloideum eine mäßige Expressionsrate. Eher schwach hingegen nahm sich die Rezeptordichte in Thalamus und Hypothalamus aus, um dann im Hirnstamm die geringste Ausprägung zu finden. Man nimmt deswegen auch an, dass diese weitgehende Abwesenheit der CB<sub>1</sub>-Rezeptoren von den lebenswichtigen medullären Kerngebieten die Erklärung dafür bietet, warum Cannabis-Konsum mit Todesfolge nahezu unbekannt ist (Herkenham et al., 1991).

Einige Jahre später konnten Glass et al. (1997) mit der gleichen Methode nachweisen, dass die Erkenntnisse, die Herkenham an der Ratte gewonnen hatte, im Wesentlichen auch für den Menschen galten. Die wenigen humanspezifischen Besonderheiten fanden sich vor allem im Bereich der neokortikalen Laminae.

Parallel zu den beschriebenen Versuchsreihen wurden auch andere methodische Ansätze verfolgt. Während autoradiografische Darstellungen eher grob in der Auflösung waren und wenig über die Feinstruktur des Gewebes aussagten, begab man sich mit der In-situ-Hybridisierung (ISH) auf die zelluläre Ebene.

So stellte sich bald heraus, dass lediglich Neurone CB<sub>1</sub>-Rezeptor-mRNA ausbildeten. Glia-Zellen schienen frei von Hybridisierungssignal zu sein (Mailleux und Vanderhaeghen, 1992; Matsuda et al., 1993; Westlake et al., 1994).

Während in vielen Hirnregionen weitreichende Kongruenz bestand mit dem Verteilungsmuster aus den Autoradiografien, ergaben sich an einigen Orten doch bemerkenswerte Diskrepanzen. Beispielsweise konnte im Globus pallidus, wo die autoradiografische Rezeptordichte eine der höchsten im ganzen Gehirn ist, in Relation deutlich weniger mRNA nachgewiesen werden, als dies zu erwarten gewesen wäre. Auch im rezeptorreichen Stratum moleculare des Kleinhirns war bei der In-situ-Hybridisierung kaum Signal zu verzeichnen, wohingegen für die Körnerzellschicht die umgekehrte Konstellation zutraf (Matsuda et al., 1993).

Diese Befunde legten schon bald den Verdacht nahe, dass der Cannabinoid-1-Rezeptor vornehmlich präsynaptisch an den Enden der Axone angesiedelt war, und dass Projektionsneurone eine bedeutende Rolle im Endocannabinoid-System spielten.

Um dieser Vermutung nachzugehen, empfahlen sich vor allem immunhistochemische Methoden. In Versuchen mit C-terminalen (Egertova und Elphick, 2000; Eggan und Lewis, 2006) und N-terminalen (Pettit et al., 1998; Tsou et al., 1998a) CB<sub>1</sub>-Antikörpern konnte zunächst aufgezeigt werden, dass die makroskopische Verteilung des Rezeptorproteins im Wesentlichen den Ergebnissen der Autoradiogra-

fien entspricht. Unter dem Elektronenmikroskop bemühte man sich dann um Klarheit über die subzelluläre Lokalisation und konnte nachweisen, dass CB<sub>1</sub>-Rezeptoren tatsächlich an der Präsynapse exprimiert sind und an Zellsomata und Dendriten nicht oder nur in vernachlässigbar geringer Zahl ausgebildet (Eggan und Lewis, 2006; Katona et al., 1999).

Weiterhin war man bestrebt, jene Zellen, die den Rezeptor exprimieren, zytologisch und histochemisch genauer zu definieren. Für den Neokortex zeigte sich, dass nahezu alle CB<sub>1</sub>-positiven Zellen Gamma-Aminobuttersäure (GABA) als Neurotransmitter benutzten und gleichzeitig Cholezystokinin (CCK) produzierten (Marsicano und Lutz, 1999). Die Parvalbumin bildende Untergruppe der GABAergen Neurone hingegen exprimierte kein CB<sub>1</sub>. Auch in anderen kortikalen Gebieten wie dem Hippocampus (Hajos et al., 2000; Katona et al., 2000; Katona et al., 1999) oder der Amygdala (Katona et al., 2001) konnte ein ähnliches Muster beobachtet werden.

Umstritten war lange Zeit das Vorhandensein von CB<sub>1</sub>-Rezeptoren in exzitatorischen Effektorneuronen wie den Pyramidenzellen. Nach Jahren der Uneinigkeit scheint jetzt allerdings der Nachweis erbracht, dass CB<sub>1</sub> auch an den Synapsen glutamaterger Zellen ausgebildet wird und dort die Transmitterausschüttung beeinflusst (Domenici et al., 2006; Kawamura et al., 2006; Takahashi und Castillo, 2006).

### ***1.1.2 Cannabinoid 2-Rezeptoren (CB<sub>2</sub>)***

Im Jahre 1993 konnten Munro et. al. dem als zentral geltenden CB<sub>1</sub>-Rezeptor ein peripheres Pendant entgegensetzen. Es gelang, aus lymphatischem Gewebe einen weiteren G-Protein gekoppelten Rezeptor zu klonen, dessen Liganden ebenfalls Cannabinoide waren, und der so den Namen Cannabinoid 2-Rezeptor (CB<sub>2</sub>) erhielt. CB<sub>2</sub> besaß wie auch CB<sub>1</sub> sieben transmembranäre Domänen; in der Aminosäurestruktur jedoch stimmten beide Rezeptoren lediglich zu 44% überein (Munro et al., 1993).

Hinsichtlich der Lokalisation schien sich CB<sub>2</sub> ausschließlich auf Gewebe zu beschränken, die mit dem Immunsystem assoziiert waren. Man fand den Rezeptor bzw. seine mRNA unter anderem in Milz, Tonsillen und Thymus, aber auch auf verschiedenen Leukozytenpopulationen (Galiegue et al., 1995; Lynn und Herkenham, 1994). Im ZNS konnte er anfangs trotz intensiver Bemühungen nicht aufgespürt werden (Griffin et al., 1999). Doch ebenso wie der CB<sub>1</sub>-Rezeptor auch in der Peripherie ausgebildet wird, ergeben sich in letzter Zeit immer konkretere Hinweise auf eine Präsenz von CB<sub>2</sub> im ZNS. Neueste Untersuchungen detektieren den Rezeptor gar an zentralen Neuronen wie den Purkinje-Zellen oder NSE-positiven Nervenzellen im Hippocampus (Gong et al., 2006).

Diese Erkenntnisse werden in Zukunft wohl die Schwierigkeit mit sich bringen, jene Effekte, die CB<sub>2</sub> bei der Modulation der Immunantwort vermittelt (Klein et al., 1998) oder CB<sub>1</sub> an den zentralnervösen Synapsen, von den Einflüssen des jeweils anderen Rezeptors sauber abzugrenzen.

### 1.1.3 Weitere mögliche Cannabinoid-Rezeptoren

Neben CB<sub>1</sub> und CB<sub>2</sub> existieren offenbar noch andere Bindungsstellen für Cannabinoide im Gehirn. So konnte in Experimenten mit CB<sub>1</sub><sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen beobachtet werden, dass es im Agonist stimulierten [<sup>35</sup>S]GTPγS-Binding an den Membranen verschiedener Hirnregionen zu einer signifikanten Restaktivierung der G-Proteine kam – trotz Abwesenheit des Rezeptors (Breivogel et al., 2001; Di Marzo et al., 2000; Monory et al., 2002). Allerdings galt dies nur für den synthetischen Agonisten WIN55212-2 und den endogenen Liganden Anandamid (siehe unten). Andere Endocannabinoide oder verwandte Verbindungen zeitigten keinen Effekt. Diese Charakteristika treffen auf keinen bislang bekannten Rezeptor zu.

Als weiterer Wirkungsort der Endocannabinoide ist der Vanilloid-Rezeptor-Subtyp 1 (VR1 oder TRPV1) im Gespräch. Dieser hauptsächlich an peripheren Nervenendigungen vorkommende unselektive Kationenkanal wird klassischerweise durch das Alkaloid Capsaicin stimuliert und ist in die Entstehung von Schmerzreaktionen involviert. Darüber hinaus bietet er aber auch eine Bindungsstelle für Anandamid und einige seiner Analoga (Howlett et al., 2002). Die genauen physiologischen Implikationen dieses Befundes sind noch weitgehend ungeklärt, doch da TRPV1 auch im Gehirn breit vertreten (Mezey et al., 2000) und dort in hohem Maße mit CB<sub>1</sub> koexprimiert ist (Cristino et al., 2006), darf seine Bedeutung für die cannabinoiderge Transmission keinesfalls unterschätzt werden.

### 1.2 Endogene Cannabinoide

Zu Recht ging man nach der Entdeckung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors davon aus, dass es im Körper endogene Liganden gibt, die ihn aktivieren (Abb. 1.2). 1992 konnte mit N-Arachidonyl ethanolamin (AEA) die erste dieser Substanzen isoliert werden (Devane et al., 1992).

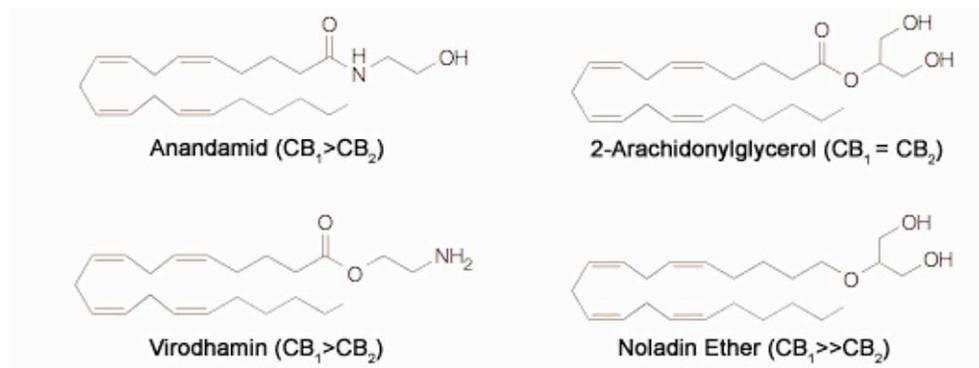


Abb.1.2: Endocannabinoide und ihre Rezeptorpräferenz

#### 1.2.1 Anandamid (N-Arachidonyl ethanolamin)

Abgeleitet von dem Sanskrit-Wort Ananda, welches Glückseligkeit bedeutet, erhielt das AEA von seinen Entdeckern den prägnanten Namen Anandamid. Anandamid ist ein hochlipophiles Derivat der Arachidonsäure aus der Gruppe der N-Acyl-Ethanolamine, das in zahlreichen Geweben nachgewiesen

werden konnte. Die höchste Konzentration im Körper ergab sich für das Gehirn und innerhalb dessen für den Hippocampus (Bisogno et al., 1999; Felder et al., 1996; Sugiura et al., 2002).

Hinsichtlich der Wirksamkeit zeigt Anandamid eine klare Präferenz für den CB<sub>1</sub>-Rezeptor, an den es als partieller Agonist mit mäßiger bis guter Affinität bindet (K<sub>i</sub>=61 nM). Deutlich schwächer ausgeprägt ist seine Fähigkeit zur Stimulation von CB<sub>2</sub> (K<sub>i</sub>=1930 nM) (Thakur et al., 2005). Daneben ist es in der Lage TRPV1 zu aktivieren und wird als Ligand für bislang unentdeckte Rezeptoren gehandelt (1.1.3)

#### **1.2.1.1 Biosynthese von Anandamid**

Anders als dies bei anderen Neurotransmittern der Fall ist, erfolgt bei Anandamid keine Speicherung in synaptischen Vesikeln. Vielmehr deutet alles darauf hin, dass es lediglich bei Bedarf produziert wird (Di Marzo und Deutsch, 1998). Der Mechanismus, der hinter dieser so genannten „on-demand“-Bereitstellung steht, ist vermutlich eine Aktivierung der AEA synthetisierenden Enzyme durch Kalzium-Influx und über Signalkaskaden anderer metabotroper Rezeptoren (Brenowitz und Regehr, 2003; Ohno-Shosaku et al., 2003).

Als Hauptsyntheseweg für Anandamid hat sich in mehreren Studien die enzymatische Hydrolyse von N-Acylphosphatidylethanolamin (NAPE) herauskristallisiert (Bisogno et al., 1999; Morishita et al., 2005). Ausgangspunkt dafür ist Phosphatidylethanolamin, das durch eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Acyltransferase in NAPE umgewandelt wird (Abb. 1.3). Den entscheidenden letzten Schritt vollzieht dann das Enzym NAPE-PLD, eine seit vielen Jahren bekannte Phospholipase, deren Klonierung allerdings erst in jüngerer Vergangenheit gelang (Okamoto et al., 2004).

NAPE-PLD gehört zur Familie der Zink-Metallohydrolasen mit β-Lactamase-Faltung und ist weder strukturell noch funktionell mit anderen bekannten Phospholipasen vergleichbar. Neben Anandamid synthetisiert sie außerdem noch einige weitere N-Acylethanolamine, die keine Affinität zu Cannabinoid-Rezeptoren besitzen und deren genaue physiologische Funktion noch unklar ist.

Über die Speziesgrenzen (Maus, Ratte, Mensch) zeigt NAPE-PLD mit 89% ein hohes Maß an Übereinstimmung in Bezug auf die Aminosäuresequenz (Okamoto et al., 2004). Ihre Verteilung im Gehirn wurde kürzlich an der Ratte mittels Immunoblot und PCR untersucht und scheint sehr gut mit jener von CB<sub>1</sub> zu korrelieren, denn die höchsten Konzentrationen des Enzyms ließen sich – ähnlich wie beim Rezeptor – in Basalganglien, Hippocampus und Cortex bestimmen (Morishita et al., 2005).

#### **1.2.1.2 Inaktivierung von Anandamid**

Nach Ausschüttung und Wiederaufnahme (s.u.) kommt es zur hydrolytischen Spaltung von Anandamid durch die Fatty acid amide hydrolase (FAAH) in Arachidonsäure und Ethanolamin (Abb. 3). Auch andere N-Acylethanolamine, Oleamid und sogar 2-Arachidonylglycerol – neben Anandamid das bedeutsamste Endocannabinoid – sind mögliche Substrate der FAAH (Deutsch et al., 2002).

Das Enzym wurde im Jahre 1996 erstmals isoliert und geklont. Hinsichtlich der Proteinstruktur ist die menschliche FAAH jener der Nagetiere zu etwa 80% homolog (Cravatt et al., 1996). Sie ist gebunden an intrazelluläre Membranen vornehmlich des mikrosomalen Kompartiments und findet sich fast ausschließlich im Bereich von Somata und Dendriten (Desarnaud et al., 1995; Egertova et al., 2003). Die Verteilung der FAAH im ZNS von Menschen und Nagetieren ist vor allem von immunhistochemischer Seite gut dokumentiert (Egertova et al., 2003; Romero et al., 2002; Tsou et al., 1998a). Dabei konnte FAAH insbesondere jenen Regionen zugeordnet werden, die auch eine hohe Expression von CB<sub>1</sub> aufwiesen. Vor allem in Cerebellum, Hippocampus und Neocortex war FAAH am deutlichsten präsent. Weitere Analysen ergaben, dass das Enzym vor allem von jenen Neuronen ausgebildet wurde, die postsynaptisch zu CB<sub>1</sub>-positiven Neuronen lagen (Egertova et al., 2003). Auch in vivo konnte die Bedeutung von FAAH für den Abbau von Anandamid demonstriert werden. FAAH-Knockout-Mäuse zeigten in einer Studie nach Zuführung von AEA zum Teil heftige Reaktionen wie Hypomotilität, Analgesie oder Hypothermie, die eindeutig der Anreicherung von Anandamid aufgrund fehlender Metabolisierung geschuldet waren (Cravatt et al., 2001).

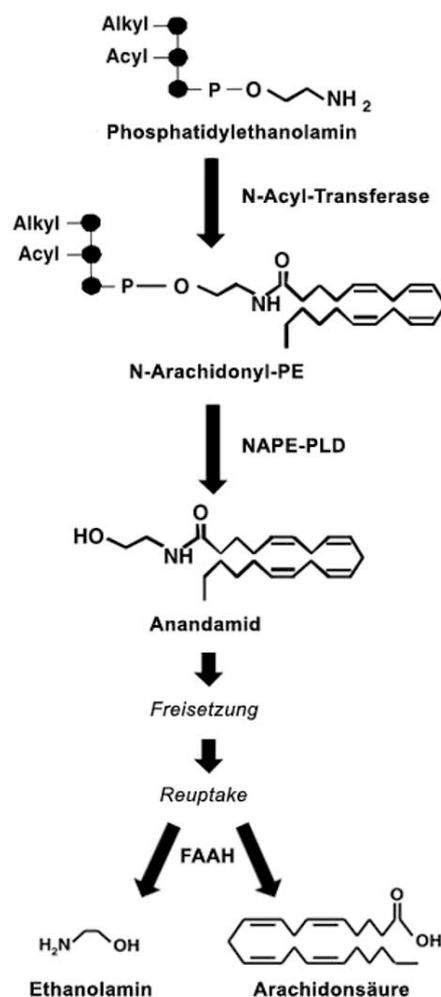


Abb. 1.3: Synthese- und Abbauweg von Anandamid (modifiziert nach Freund et al., 2003)

### **1.2.1.3 Transport**

Dass Anandamid in die Zelle aufgenommen wird, um dort durch die FAAH inaktiviert zu werden, ist unbestritten. Heftig diskutiert wird jedoch der Mechanismus, wie dies geschieht.

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass ein Transporterprotein für den Reuptake von AEA verantwortlich ist (Hillard und Jarrahan, 2000). Wichtigstes Argument dafür war, dass der Einstrom einer Sättigungskinetik folgte. Eben dieses Argument geriet jedoch ins Wanken, als man in einigen Versuchen gegenteilige Beobachtungen machte und alte Methoden zu hinterfragen begann. So kam die Theorie auf, dass die Aufnahme von Anandamid alleine über erleichterte Diffusion erfolgt und durch den Gradienten bestimmt wird, den die FAAH durch die Hydrolyse von AEA erzeugt (Glaser et al., 2003).

Die Gegenpartei jedoch sammelte beharrlich immer neue Indizien für ihre Theorie und insistierte auf einem Transporter (Ligresti et al., 2004), während andere Forschungsgruppen alternative Konzepte ins Spiel brachten wie das der Endozytose (McFarland und Barker, 2004).

Aufgrund der möglichen selektiven Inhibierbarkeit eines Transportproteins (Beltramo et al., 1997) wäre dieser natürlich von besonderem Interesse hinsichtlich der Entwicklung von Pharmakotherapeutika, und es bleibt zu hoffen, dass die Natur des AEA-Transportes in absehbarer Zeit aufgeklärt werden kann.

### **1.2.2 2-Arachidonylglycerol**

Mit dem 2-Arachidonylglycerol (2-AG) konnte 1995 eine Substanz als Endocannabinoid identifiziert werden, die schon seit langen als Zwischenprodukt im Phosphoglycerid-Stoffwechsel bekannt war (Mechoulam et al., 1995). 2-AG bindet mit deutlich geringerer Affinität an CB<sub>1</sub> als Anandamid (K<sub>i</sub>=472nM) und ist ein ähnlich schwacher Agonist an CB<sub>2</sub> (K<sub>i</sub>=1400nM). Im Gehirn ist seine Konzentration etwa um das 170-fache höher als die von AEA (Thakur et al., 2005), wobei die Genauigkeit dieser Messungen wegen eines möglichen post-mortem-Konzentrationsanstiegs umstritten ist.

Analog zu Anandamid ist es präsent in allen Hirnregionen, in denen eine hohe Dichte von CB<sub>1</sub>-Rezeptoren beschrieben worden ist wie dem Hippocampus, dem Cerebellum oder dem Cortex (Bisogno et al., 1999). Seine Synthese erfolgt ausgehend von Phosphatidylinositol über zwei mögliche enzymatische Wege. Zum einen die Hydrolyse zu Diacylglycerol durch eine Phospholipase C und die anschließende Umwandlung zu 2-AG mit Hilfe der Diacylglycerol-Lipase. Zum anderen vermittelt durch Phospholipase A<sub>1</sub> und Lyso-Phospholipase C mit dem Zwischenprodukt eines Lysophospholipids (Freund et al., 2003).

Für die Spaltung von 2-AG scheint das Enzym Monoacylglycerollipase (MAGL) verantwortlich zu sein, obwohl auch die FAAH für eine Inaktivierung sorgen kann. Versuche an FAAH Knockout-Mäusen deuten jedoch auf eine dominante Rolle von MAGL hin (Lichtman et al., 2002), die sich von der FAAH unter anderem dadurch unterscheidet, dass sie an der Präsynapse aktiv ist (Dinh et al., 2002).

Es ist also anzunehmen, dass 2-AG in Bezug auf Synthese und Abbau weitgehend unabhängig von Anandamid ist.

### ***1.2.3 Weitere Endocannabinoide***

Wenig bekannt ist bislang über die beiden anderen Verbindungen, die neben Anandamid und 2-AG als Endocannabinoide im Gespräch sind. Noladinether wurde erstmals im Jahre 2001 isoliert und bindet selektiv und mit guter Affinität ( $K_i=21,2\text{nM}$ ) an  $\text{CB}_1$  (Hanus et al., 2001). Virodhamin hingegen verhält sich in vivo am  $\text{CB}_1$ -Rezeptor antagonistisch gegenüber Anandamid, scheint aber an  $\text{CB}_2$  ein vollständiger Agonist zu sein (Porter et al., 2002)

Insgesamt ist der Stellenwert, den diese beiden Substanzen im Endocannabinoidsystem einnehmen, aufgrund der dünnen Faktenlage bislang noch schwer einzuschätzen

## ***1.3 Physiologie des Endocannabinoidsystems***

Seit der Entdeckung des Endocannabinoidsystems (ECS) hat man in beachtlich kurzer Zeit ziemlich weit reichende Einblicke in seine Wirkungsweise bekommen. Doch trotz teilweise spektakulärer Einzelerkenntnisse besonders auf dem Gebiet der synaptischen Signaltransduktion konnte bisher noch kein überzeugendes Gesamtkonzept präsentiert werden, das die physiologische Einbindung des ECS in die neuronalen Kommunikationswege hinreichend beschreibt.

Deswegen sei an dieser Stelle vor allem ein Überblick über die wichtigsten Einzelerkenntnisse und die damit verbundenen Hypothesen geboten.

### ***1.3.1 Elektrophysiologische Prozesse an der Synapse***

#### ***1.3.1.1 Depolarization induced suppression of inhibition***

1991 wurde von Llano und Mitarbeitern im Kleinhirn erstmals beobachtet, dass schnell aufeinander folgende oder länger anhaltende Depolarisation von Purkinje-Zellen zu einer Abnahme der GABAergen Transmission an den angrenzenden inhibitorischen Synapsen führt (Llano et al., 1991). Dieses Phänomen der neuronalen Autoregulation, das sich kurz darauf auch an hippocampalen Pyramidenzellen nachweisen ließ (Pitler und Alger, 1992), erhielt in der Folge die Bezeichnung „depolarization induced suppression of inhibition“ (DSI).

Typisch für die DSI ist, dass ihr ein deutlicher Anstieg des intrazellulären Calciums vorangeht, und dass sie eine Inhibierung der Transmitterausschüttung an der Präsynapse bewirkt. So machte man sich

alsbald auf die Suche nach einem Mediator für diesen Mechanismus und wurde im Jahre 2001 fündig. Fast gleichzeitig identifizierten damals mehrere Arbeitsgruppen die Endocannabinoide als retrograd wirkende Vermittler der DSI, sowohl für den Hippocampus (Ohno-Shosaku et al., 2001; Wilson und Nicoll, 2001) als auch für das Kleinhirn (Kreitzer und Regehr, 2001a). Später folgte dann der Nachweis für den Neocortex (Trettel und Levine, 2002) und die Substantia nigra (Yanovsky et al., 2003). Eine weitere Spezifizierung allerdings, um welches Endocannabinoid es sich dabei handelt, bzw. welches Endocannabinoid in welchen Zellen dafür zum Einsatz kommt, steht bis zum heutigen Tage aus.

Wie bereits angedeutet arbeiten die synthetisierenden Enzyme für Anandamid und 2-AG calciumabhängig, was sicherlich eine entscheidende Rolle bei der dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg folgenden Ausschüttung der Endocannabinoide spielt. Dennoch stellen sich die Regulationsmechanismen der DSI weit komplexer dar und scheinen unter anderem auch noch dem Einfluss metabotroper Glutamat- und Acetylcholinrezeptoren zu unterliegen (Freund et al., 2003; Vaughan und Christie, 2005). Demnach gibt es mehrere Möglichkeiten, die Endocannabinoidsynthese auszulösen (Abb. 1.4): Zum einen kommt dafür eine starke Depolarisation der Postsynapse mit konsekutiver Öffnung der Calciumkanäle in Frage. Zum anderen kann die alleinige Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren bereits die Transmitterausschüttung bewirken. Wahrscheinlich ist allerdings eine Synergie beider Systeme als Trigger der retrograden Hemmung (Freund et al., 2003).

Allerdings ist längst noch nicht klar, welchen physiologischen Stellenwert die Cannabinoid-vermittelte DSI besitzt, denn in vivo sind die Triggermechanismen bislang noch ungenügend untersucht. Besonders diskutiert man darüber, unter welchen Umständen die für die DSI notwendige Calciumkonzentration in der Zelle auftreten könnte (Diana und Marty, 2004; Freund et al., 2003).

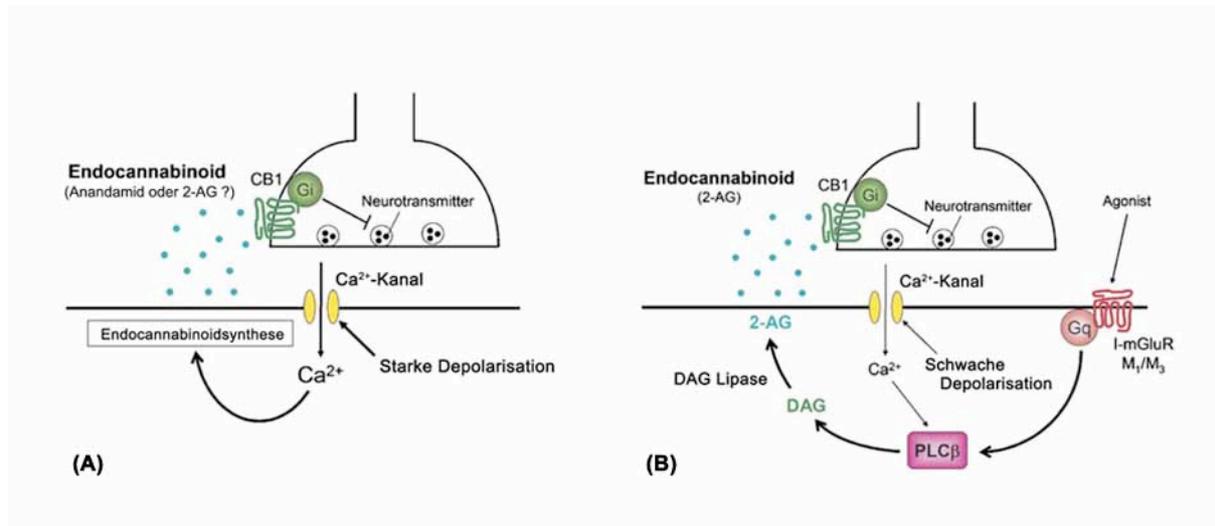
Allgemeiner Konsens herrscht hingegen darüber, dass Cannabinoide an der Präsynapse hemmend auf die Ausschüttung verschiedener Transmitter wirken. Wichtigste Komponente innerhalb der  $\text{CB}_1$  vermittelten Signaltransduktion (s.o.) dürfte dabei die Blockierung spannungsabhängiger Calciumkanäle sein. Neben GABA wird dadurch auch an anderen Synapsen die Freisetzung von Botenstoffen wie Glycin, Acetylcholin, sowie der Monoamine Serotonin, Dopamin und Noradrenalin beeinträchtigt. Dies geschieht jedoch im Vergleich zu GABA in weitaus geringerem Maße (Szabo und Schlicker, 2005).

### ***1.3.1.2 Depolarization induced suppression of excitation***

Nach fast identischem Muster induzieren Cannabinoide eine Signalabschwächung an glutamatergen Synapsen (Kreitzer und Regehr, 2001b). In Anbetracht der exzitatorischen Natur dieses Neurotransmitters spricht man deswegen von „depolarization induced suppression of excitation“ (DSE).

Sie ist beschrieben u.a. für das Cerebellum (Kreitzer und Regehr, 2001b), die hippocampale Formation (Ohno-Shosaku et al., 2002; Straiker und Mackie, 2005) und den Neocortex (Fortin und Levine,

2006). Dabei scheint die DSE im Wesentlichen den gleichen Prinzipien zu unterliegen wie die DSI, obwohl besonders im Hippocampus die Bedeutung der CB<sub>1</sub>-Rezeptoren oftmals stark in Frage gestellt wurde (Hajos et al., 2001). Neueste Untersuchungen gehen allerdings wieder von einer klar dominierenden Rolle von CB<sub>1</sub> in der Vermittlung der DSE aus (Katona et al., 2006; Kawamura et al., 2006). Auch für die DSE konnte noch keine klare physiologische Aufgabe definiert werden. Einige Kommentatoren schreiben ihr jedoch neuroprotektive Eigenschaften zu (Diana und Marty, 2004).



**Abb. 1.4:** Trigger der Ausschüttung von Endocannabinoiden (z.B. im Hippocampus). Möglichkeit (A): Starke Depolarisation postsynaptischer Calciumkanäle führt zur Synthese eines bisher noch nicht eindeutig identifizierten Endocannabinoids; Möglichkeit (B): Schwache Depolarisation postsynaptischer Calciumkanäle in Kombination mit der Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren führt zur retrograden Hemmung der Präsynapse, wahrscheinlich über die Synthese von 2-AG; (modifiziert nach Ohno-Shosaku, 2005)

### 1.3.1.3 Long term depression

Während DSI und DSE lediglich eine kurzfristige Modulation der synaptischen Aktivität bewirken, sind die Effekte der Langzeit-Potenzierung (long term potentiation, LTP) von längerer Dauer (Lømo, 2003). Auch in dieses Phänomen der Signalregulierung scheinen die Endocannabinoide einzugreifen. Mehr noch als die LTP (Slanina et al., 2005; van Beugen et al., 2006) dürfte das ECS aber ihr Gegenstück, die sogenannte „long term depression“ (LTD) beeinflussen. In einigen zentralnervösen Netzwerken wurde es sogar als ihr Induktor beschrieben. So erwies sich die LTD an bestimmten GABAergen Synapsen in Hippocampus (Chevalyere und Castillo, 2003) und Amygdala (Marsicano et al., 2002) als abhängig von der Aktivierung von CB<sub>1</sub>-Rezeptoren.

Auch für viele glutamaterge Synapsen ist eine essentielle Rolle des ECS bei der Vermittlung der LTD beschrieben worden. Positive Befunde hierfür ergaben sich bisher im Striatum (Gerdeman et al., 2002), im Nucleus accumbens (Robbe et al., 2002), im Neocortex (Sjostrom et al., 2003) und im Cerebellum (Safó und Regehr, 2005).

Da es sich bei LTP und LTD um hochkomplexe Prozesse handelt, die an unterschiedlichen Synapsen völlig verschieden ablaufen können und meistens noch weitere Rezeptorsysteme involvieren (Anwyl, 2006), wird noch viel Forschungsarbeit vonnöten sein, bis das ganze Ausmaß der cannabinoidegen Beteiligung detailgenau ausgeleuchtet ist.

### *1.3.2 Effekte in vivo*

Trotz vieler offener Fragen hat sich in den letzten Jahrzehnten der Cannabis-Forschung doch eine Vielzahl von physiologischen Prozessen im Körper herauskristallisiert, auf die das Endocannabinoidsystem Einfluss nimmt. Ohne einen Anspruch auf Vollständigkeit erheben zu wollen, seien an dieser Stelle nun die wichtigsten Beobachtungen herausgegriffen.

Ein bedeutender Angriffspunkt der Cannabinoide ist die extrapyramidale Motorik. Agonisten am CB<sub>1</sub>-Rezeptor verursachen typischerweise Hypomotilität und muskuläre Starrheit, die in CB<sub>1</sub>-Knockout-Mäusen aufgehoben sind (Rodriguez de Fonseca et al., 1998; Zimmer et al., 1999). Man vermutet hier eine feinregulatorische Beteiligung des ECS vor allem in Basalganglien und Kleinhirn.

Auch für die Emotionsbildung scheinen Cannabinoide mitverantwortlich zu sein. Neben dem Nachweis des Rezeptors in vielen limbischen und kortikalen Kerngebieten, deuten auch konkrete Tierexperimente in diese Richtung. Das ECS scheint hierbei dämpfende Funktionen zu erfüllen, denn in Abwesenheit des CB<sub>1</sub>-Rezeptors zeigen Knockout-Mäuse deutlich vermehrte Angstreaktionen (Haller et al., 2002; Martin et al., 2002) und offenbaren Schwierigkeiten bei der Auslöschung unangenehmer Gedächtnisinhalte (Marsicano et al., 2002).

Inwieweit das ECS im allgemeinen in das Speichern von Erinnerungen involviert ist, lässt sich noch schwer abschätzen, doch die oben bereits besprochenen Effekte auf LTD und LTP belegen zumindest sein Mitwirken an der synaptischen Plastizität. Versuche an lebenden Organismen bekräftigen Einflüsse des ECS auf Lernen und Gedächtnis, wobei das Kurzzeitgedächtnis und das visuell-räumliche Gedächtnis am empfindlichsten auf den Verabreichung von Cannabinoiden reagieren und stark in ihrer Funktion beeinträchtigt werden (Molina-Holgado et al., 1995; Valverde et al., 2005). Dennoch vermutet man eine fördernde Rolle des ECS bei der Ausbildung von Gedächtnisinhalten, indem es nämlich dabei hilft, Relevantes von Irrelevantem zu trennen. Bei übermäßiger externer Zufuhr von Cannabinoiden käme es demnach zu einer ungünstigen Verschiebung der signal to noise ratio, die die Prozessierung der Informationen ineffizient macht und zu erhöhter Vergesslichkeit führt (Riedel und Davies, 2005).

Auch verschiedenste vegetative Regelkreise sind sensitiv für Cannabinoide. Lange bekannt sind in diesem Zusammenhang appetitstimulierende Effekte, die vermutlich über Rezeptoren im Hypothalamus vermittelt werden (Williams und Kirkham, 2002a). Ähnlichen Ursprungs dürfte die cannabinoide Stimulation der Freisetzung von ACTH und Gonadotropinen sein (Maccarrone und Wenger, 2005). Daneben wird dem ECS eine Schwächung der Immunabwehr zugeschrieben (Cabral und Staab,

2005), sowie eine Einflussnahme auf das kardiovaskuläre System (Valverde et al., 2005), Schwangerschaft und Thermoregulation (Maccarrone und Wenger, 2005).

In besonderer Weise konzentriert sich die wissenschaftliche Aufmerksamkeit auf Einflüsse des ECS auf die Nozizeption. Früh hat man nämlich schon die enorme analgetische Potenz von Cannabis erkannt, eine breite klinische Anwendung scheiterte jedoch stets an den ausgeprägten Nebenwirkungen. Darum hat man viel für ein besseres Verständnis der dahinter stehenden Physiologie getan und herausgefunden, dass das ECS auf den unterschiedlichsten Ebenen der Nozizeptionswege modulierend eingreift. Bereits in der Peripherie sorgen CB<sub>1</sub>-Rezeptoren an freien Nervenendigungen und in den Hinterwurzelganglien für eine verminderte Schmerz Wahrnehmung (Hohmann und Herkenham, 1999). Im ZNS sind die Zentren der cannabinoidegen Antinozizeption vor allem im periaquäduktalen Grau (Lichtman et al., 1996), in den Nuclei submedius und ventralis posterolateralis des Thalamus, der rostralen ventromedialen Medulla und der basolateralen Amygdala lokalisiert (Walker und Hohmann, 2005).

In Experimenten haben sich die Cannabinoide als wirksame Suppressoren fast jeder Schmerzqualität erwiesen. Im Falle des inflammatorischen Scherzes kommt dabei den CB<sub>2</sub>-Rezeptoren und damit auch ihren Agonisten besondere Bedeutung zu. Die vor allem auf Zellen des Immunsystems anzutreffenden CB<sub>2</sub>-Rezeptoren reduzieren hier die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine (Puffenbarger et al., 2000).

#### ***1.4 Therapeutische Aspekte***

Das Erfahrungsspektrum für die klinische Anwendung von Cannabinoiden ist sehr schmal. Einzige bisher zugelassene Präparate sind in den USA und einigen anderen Ländern die THC-Analoga Dronabinol und Nabilon, die vor allem zur Behandlung von Kachexie, chronischen Schmerzen und Spastiken verabreicht werden. Ein ausgedehnter therapeutischer Einsatz ist aber aufgrund legaler Barrieren und der bereits erwähnten Schwierigkeiten, die Pharmakokinetik und Nebenwirkungen mit sich bringen, weder möglich noch sinnvoll.

Erst kürzlich hat mit Rimonabant ein weiteres Präparat die Zulassung für den amerikanischen und europäischen Markt erhalten. Rimonabant ist ein selektiver Antagonist am CB<sub>1</sub>-Rezeptor, der bereits in zahllosen wissenschaftlichen Versuchen Verwendung fand (dort meist bezeichnet als SR141716). In den vorangegangenen klinischen Studien zeigten sich dabei gute Effekte bei der Behandlung von kardiovaskulären Risikofaktoren wie Adipositas und Nikotinsucht (Gelfand und Cannon, 2006).

Noch in der Phase klinischer Erprobung befindet sich Sativex, ein Gemisch aus THC und dem nicht psychoaktiven Cannabidiol. Es soll Symptomlinderung vor allem bei Patienten mit Multipler Sklerose schaffen (Barnes, 2006).

Eine große Diskrepanz tut sich auf, wenn man die Zahl der zugelassenen Präparate in Verhältnis setzt zu den therapeutischen Möglichkeiten, die für die Cannabinoide diskutiert werden. Obwohl gezielte

Studien am Menschen noch vergleichsweise dünn gesät sind, gibt es dennoch unzählige Erfahrungsberichte, die dem THC und seinen Derivaten konkrete Wirkungen bei den unterschiedlichsten pathophysiologischen Prozessen zuschreiben. Vielversprechende Erfolge konnten bei der Behandlung der Multiplen Sklerose und von Verletzungen des Rückenmarks vermeldet werden, wo Cannabinoide oftmals eine deutliche Linderung der Spastik und eine Verbesserung der Blasenkontrolle herbeiführen.

Weiterhin haben sich CB-Agonisten als Antiemetika bewährt und vor allem bei chemotherapierten Patienten zu einer signifikanten Minderung der Brechattacken geführt. Darüber hinaus sind sie imstande, Angstzustände zu lösen und empfehlen sich so als Therapieoption bei psychiatrischen Erkrankungen. Die Appetit stimulierende Wirkung macht man sich bei anorektischen Patienten zu Nutze, bei Adipösen erleichtert Rimonabant (s.o.) die Gewichtsreduktion (Robson, 2005). In der Analgetikatherapie zielen neueste Ansätze vor allem auf einen Einsatz der Cannabinoide bei neuropathischem Schmerz und auf eine Kombination mit Opioiden, deren Wirksamkeit dadurch auf synergistische Weise überadditiv gesteigert wird (Cichewicz und McCarthy, 2003).

Hinweise auf positive Effekte gibt es zudem beim Tourette-Syndrom, in der Glaukomtherapie, bei chronisch-inflammatorischen Erkrankungen und bei Dyskinesien wie dem Parkinson-Syndrom (Robson, 2005). Sogar Wirkungen gegen die Proliferation von Krebszellen sind beschrieben (Guzman, 2003).

Bevor jedoch Cannabis-Präparate möglicherweise ein fester und effizienter Bestandteil der klinischen Praxis werden, ist noch ein hohes Maß an Grundlagenforschung erforderlich. Denn ein fundiertes Verständnis der physiologischen Wirkungsweise des Endocannabinoidsystems ist für die Entwicklung gezielter therapeutischer Verfahren unerlässlich.

## **2 Aufgabenstellung**

Trotz der großen Zahl an Studien zur Lokalisation von CB<sub>1</sub> weisen vor allem jene, die sich der In-situ-Hybridisierung (ISH) bedient haben, erhebliche Lücken auf. Besonders auf zellulärer Ebene sind viele Hirnregionen wie zum Beispiel Hypothalamus, Hirnstamm oder Basalganglien noch unzureichend beschrieben. Zudem datieren die meisten dieser Veröffentlichungen aus den frühen neunziger Jahren und basieren somit auf einer weniger ausgereiften Methodik als sie heute zur Verfügung steht.

Auch Widersprüche zwischen einzelnen Publikationen gilt es aufzuarbeiten. Zu nennen ist hier beispielsweise die fragliche Expression der CB<sub>1</sub>-mRNA in den Purkinjezellen des Kleinhirns.

Ebenso ist der Tatsache Rechnung zu tragen, dass Experimente an humanem Gewebe im Vergleich zu Studien an Ratten und Mäusen äußerst dünn gesät sind, und das menschliche Gehirn jenem der Nagetiere strukturell und funktionell ähnlich ist, jedoch auch eine Vielzahl von Eigenheiten aufweist. Exemplarisch sei hier die beträchtlich differierende Architektur der Großhirnrinde hervorgehoben. Eine Überprüfung der Übertragbarkeit von Erkenntnissen an Nagetieren auf den Menschen ist somit von großer Wichtigkeit.

Aus diesen Gründen haben wir nach aktuellsten Protokollen die Verteilung der CB<sub>1</sub>-Rezeptor-RNA im menschlichen ZNS mittels In-situ-Hybridisierung untersucht. In einer breiten Auswahl an Hirnregionen wurde die zelluläre Expression detailgenau quantifiziert und anschließend mit den Ergebnissen einer separat durchgeführten immunhistochemischen Darstellung des Rezeptorproteins verglichen.

Die gleichen Schnittserien wurden verwendet, um die Synthese- und Abbauorte von Anandamid, dem prominentesten endogenen Cannabinoid, zu lokalisieren. Ebenfalls mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung die Expression der mRNA für FAAH und NAPE-PLD bestimmt. Im Falle der NAPE-PLD handelt es sich dabei um die erste ISH-Studie überhaupt; im Falle der FAAH ist es die erste an menschlichem Hirngewebe.

In der Zusammenschau sollen die Erkenntnisse aus unseren Versuchen dazu beitragen, die Signalwege des Endocannabinoidsystems weiter zu entschlüsseln und drängende Fragen bezüglich der involvierten Neurone zu beantworten. Zum Beispiel wird die Expression des Rezeptors auf primären Effektorneuronen behandelt werden, was seit langem kontrovers diskutiert wird. Auch die Bedeutung von Anandamid als endogener Ligand wird über eine Analyse der Kolo-kalisation seiner Enzyme mit dem CB<sub>1</sub>-Rezeptor neue Bewertungsaspekte erhalten. Auf immunhistochemischer Ebene wurden einzelne Zelltypen erstmals auf die Ausbildungen des CB<sub>1</sub>-Rezeptorproteins hin untersucht.

Durch die Verwendung von humanem Hirngewebe mit kurzem post-mortem-Intervall und blander neurologisch-psychiatrischer Anamnese wurde gewährleistet, dass unsere Ergebnisse die physiologischen Sachverhalte in maximaler Annäherung widerspiegeln.

### **3 Methoden**

#### **3.1 Gewinnung und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials**

##### **3.1.1 Gewinnung des Gehirngewebes**

Die verwendeten Gewebeproben wurden in rechtsmedizinischen Sektionen aus Gehirnen von insgesamt fünf Patienten gewonnen, die keine Vorgeschichte für neurologisch-psychiatrische Erkrankungen aufwiesen. Nach neuropathologischer Begutachtung, die keine Auffälligkeiten ergab, wurden die Gewebeproben schnellstmöglich auf Trockeneis (festes CO<sub>2</sub>) eingefroren und bei -80° C in einen Gefrierschrank eingelagert. Die Patienten waren allesamt männlich und hatten zum Zeitpunkt ihres Todes ein durchschnittliches Alter von 43 Jahren (±13 J.). Das mittlere Post-mortem-Intervall bis zum Einfrieren des Gewebes betrug 14,5 Stunden.

##### **3.1.2 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Die in den tiefgefrorenen Gewebelöcken enthaltenen Gehirnstrukturen wurden zunächst mit Hilfe neuroanatomischer Atlanten makroskopisch definiert. Anschließend wurden die Proben bei -25° C in einem Kryostaten (Frigocut, Fa. Reichert-Jung) in anatomisch-coronarer Ausrichtung aufgeblickt und bis zum Erreichen einer planen Schnittebene unmittelbar vor der zu untersuchenden anatomischen Struktur feinadjustiert.

Mit 0,01% Poly-L-Lysin-Lösung beschichtete Objektträger, die zuvor mit 96% Ethanol gereinigt und anschließend heißluftsterilisiert worden waren, dienten als Trägermedium für die angefertigten Gefrierschnitte. Die einzelnen Schnitte besaßen eine Dicke von 20 µm und wurden in Serien von bis zu 100 Stück aus folgenden Hirnregionen angefertigt: Prämotorischer Cortex mit anteriorem cingulärem Cortex, Basalganglien, Amygdala, Hippocampus, Thalamus, Cerebellum Hypothalamus und ausgewählten Regionen des Hirnstamms.

Nach etwa halbstündigem Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Gewebsschnitte in luftdicht schließenden Plastikbehältnissen erneut bei -80°C eingelagert und bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

In einem Abstand von jeweils 20 Schnitten wurde außerdem ein zusätzlicher Schnitt angefertigt, der eine Färbung nach Nissl erhielt und ausschließlich der anatomischen Beurteilung diente.

Am Ende jeder Schnittserie wurde eine Menge von etwa 20-40 Schnitten in ein steriles Gefäß aufgenommen und ebenfalls bei -80°C eingefroren. Dieses Gewebe wurde in der Folge homogenisiert und diente als Grundlage für die Isolierung von mRNA.

Durch dieses Vorgehen ist gewährleistet, dass die isolierte mRNA konkreten Hirnregionen zugeordnet werden kann. Obendrein ergibt sich aus dem gewonnenen Homogenat durch die Feinheit der Schnitte eine besonders große und reine Ausbeute an mRNA.

### 3.2 Revers transkribierte Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

#### 3.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Aus Gründen der höheren methodischen Verlässlichkeit wurde eine Isolierung der Gesamt-RNA einer direkten Isolierung der mRNA vorgezogen. Verwendet wurde dafür ein monophasisches Phenol/Guanidiniumisothiocyanat-Gemisch (Trizol<sup>®</sup>). Nachdem die Gesamt-RNA aus den Homogenaten isoliert worden war, wurden die Isolate verschiedene Gehirne, aber identischer Regionen zu gleichen Teilen gepoolt:

- 1) Zugabe von 4,0ml Trizol<sup>®</sup> zu 300-400mg Gewebe und kräftiges Mischen.
- 2) Homogenisieren der Gewebssuspension von Hand für 2 Minuten.
- 3) Zentrifugation mit 12 000G für 10 Min. bei 4°C.
- 4) Dekantieren des Überstandes und Inkubation für 5 Min. bei Raumtemperatur.
- 5) Zugabe von 1,6ml Chloroform und kräftiges Schütteln für 15 Sek.
- 6) Inkubation für 3 Min. bei Raumtemperatur und Zentrifugation mit 12 000G für 15 Min. bei 4°C.
- 7) Abpipettieren der oberen wässrigen Phase (in der die RNA enthalten ist) und Fällung der RNA durch Zugabe von 2ml 100% Isopropanol.
- 8) Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Min., nachfolgend Zentrifugation mit 12 000G für 10 Min. bei 4°C. Am Boden des Cups ist nun ein zartes RNA-Pellet sichtbar.
- 9) Waschen des Pellets mit 2ml 75% Ethanol und Zentrifugation mit 7 500G für 5 Min. bei 4°C.
- 10) Überstand verwerfen und RNA-Pellets bei 70°C trocknen.
- 11) Lösen der RNA in 100µl H<sub>2</sub>O<sub>PCRgrade</sub> durch wiederholtes Mischen und Inkubation für 10 Min. bei 60°C.
- 12) Fotometrische Bestimmung der Quantität und Reinheit des RNA-Isolats.
- 13) Lagerung der Isolate bei -80°C.

#### 3.2.2 Reverse Transkription (RT)

Die über alle Gehirne gepoolten, aber nach Regionen getrennten Gesamt-RNA-Isolate werden in die RT-Reaktion eingesetzt. Die Selektion der mRNA aus der Gesamt-RNA erfolgt durch die Verwendung eines Oligo dT-Primers in der RT-Reaktion.

Von jedem RNA-Pool werden zwei RT-Reaktionen angesetzt, die sich nur dadurch unterscheiden, dass im einen Fall das Enzym Reverse Transkriptase zugefügt (RT-Ansatz) und im anderen Fall durch Wasser ersetzt wird (No-RT-Ansatz als Kontrollreaktion). Im einzelnen erfolgt die Synthese der cDNA durch:

- 1) Auftauen und Verdünnen der RNA auf eine einheitliche Konzentration von 0,2g/l.
- 2) Zweifacher Ansatz von jeweils:
  - 5,0µl H<sub>2</sub>O<sub>PCRgrade</sub>
  - 1,0µl Oligo dT<sub>12-18</sub>

- 1,0µl dNTP-Mix (10mM)
- 5,0µl RNA (0,2µg/µl)
- 3) Inkubation bei 65°C für 5 Min.
- 4) Zugabe von jeweils:
  - 4,0µl First-Strand Puffer (5x)
  - 2,0µl DTT (0,1M)
  - 1,0µl RNaseOUT (RNase-Inhibitor)
- 5) Inkubation bei 42°C für 2 Min.
- 6) Zugabe von jeweils
  - 1,0µl Reverse Transkriptase (Superscript II<sup>®</sup>) im RT-Ansatz oder
  - 1,0µl H<sub>2</sub>O<sub>PCRgrade</sub> im No-RT-Ansatz.
- 7) Mischen und Inkubation bei 42°C für 50 Min. gefolgt von 70°C für 15 Min.
- 8) Kühlung der cDNA für kurze Zeit bei 4-8°C.

### 3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR für die hier verwendeten cDNAs wurde empirisch optimiert. Neben der cDNA werden in die PCR noch der dazugehörige No-RT-Ansatz und für jedes Primerpaar Wasser zur Negativkontrolle eingesetzt. Hierdurch kann ausgeschlossen werden, dass das Amplifikat aus DNA-Kontaminationen entstanden ist.

Um möglicher Pipettierfehler zu egalisieren, werden die Reagenzien für die einzelnen Proben insgesamt in einem „Mastermix“ angesetzt:

- 1) PCR-Mastermix (pro Ansatz):
  - 38,0µl H<sub>2</sub>O<sub>PCRgrade</sub>
  - 5,0µl PCR-Puffer (10x)
  - 1,5µl MgCl<sub>2</sub> (50mM)
  - 1,0µl dNTP-Mix (10mM)
  - 1,0µl Primer sense (10µM)
  - 1,0µl Primer antisense (10µM)
  - 0,5µl Taq DNA Polymerase.
- 2) Zugabe und Mischen von jeweils 2,0µl cDNA (bzw. No-RT-Ansätze oder H<sub>2</sub>O<sub>PCRgrade</sub> für Negativ-Kontrollen) in 48,0µl PCR-Mastermix.
- 3) Überschichten der Ansätze mit 1-2 Tropfen Mineralöl.
- 4) Inkubation im PCR-Block mit folgendem Programmablauf:
  - i) Aufschmelzen bei 94°C für 4 Min.
  - ii) 40 Zyklen mit
    - 94°C für 30 Sek.

- 56°C für 45 Sek.
- 70°C für 1 Min.

iii) Elongation des Produkts bei 70°C für 10 Min.

5) Kühlung bei 4-8°C für 10 Min.

### **3.2.4 Gelelektrophorese**

In Elektrophoreseeinheit mit 2%igem Agarosegel und TAE-Laufpuffer werden die PCR Produkte über 120 Minuten hinweg bei 130V und 80mA aufgetrennt.

### **3.3 In situ Hybridisierung**

Während die Vorteile der RT-PCR in ihrer hohen Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von mRNA liegen, zeichnet sich die in situ Hybridisierung (ISH) dadurch aus, dass sie die mRNA-Expression im histologischen Kontext darstellen kann.

Wie alle mRNA-Detektionsverfahren beruht auch die ISH auf einer Bildung von Doppelsträngen an komplementären Abschnitten von Nukleinsäuren. Typisch für die ISH ist hierbei die Verwendung einer markierten einzelsträngigen Nukleinsäuresequenz, auch Probe oder Sonde genannt, die direkt auf das zu untersuchende Gewebe aufgetragen wird. Dort bildet die Probe mit ihrer komplementären mRNA-Sequenz in den Zellen doppelsträngige Hybride, die dann entsprechend der Markierung der Sonde (radioaktiv oder nicht radioaktiv) nachgewiesen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Oligonukleotidproben mit einer radioaktiven Markierung versehen. Diese besitzt unter allen Darstellungsverfahren die höchste Sensitivität.

Im Vorfeld der Experimente wurden Hybridisierungstemperatur und -dauer sowie die Zusammensetzung des verwendeten Puffers in eigens dafür angesetzten Versuchen optimiert. Dabei stellte sich heraus, dass bei einem Zusatz von DTT (10mM), einer Temperatur von 42°C und einer Inkubationszeit von 48 Stunden die besten Ergebnisse erzielt werden konnten, vor allem hinsichtlich des Verhältnisses von Signal zu unspezifischem Hintergrund.

Für den Puffer selbst hat sich die Kombination einer 50%igen Formamidlösung mit einem langkettigen Dextran (10%) als opportun erwiesen. Die für die Pufferfunktion notwendigen Elektrolyte werden durch SSC und Natriumphosphat-Puffer (gesamt[Na<sup>+</sup>]=0,69M) beigesteuert.

Im Anschluss an die Hybridisierung werden die Gewebsschnitte in SSC-Lösung gewaschen, um unspezifisch oder unvollständig gebundene Oligonukleotide zu entfernen. In mehreren Reinigungsschritten beginnt man zunächst mit Waschlösungen, deren Temperatur mäßig über jener der Hybridisierung liegt und geht dann in der Folge über auf raumtemperierte Lösungen mit absteigender Ionenstärke (sog. stringentes Waschen).

Als Negativ-Kontrolle, d.h. zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung der Oligonukleotide im Gewebe, sind zwei Verfahren gebräuchlich. Zum einen kann man einzelne Gewebsschnitte vor der

Versuchsdurchführung mit RNase vorbehandeln, zum anderen bei der Hybridisierung unmarkierte Sonden in mehrfachem Überschuss zugeben, so dass das markierte Oligonukleotid kompetitiv aus seiner Hybrid-Bindung verdrängt und anschließend herausgewaschen wird. Aufgrund der erheblichen Gefahr einer Kreuzkontamination und der schwierigen Optimierung der Gewebsbehandlung ist die Verwendung von RNAsen als die unterlegene Methode zu betrachten, weswegen wir die Zugabe unmarkierter Oligonukleotide in 100fachem Überschuss präferierten.

Trotz aller Vorkehrungen ist die Ausbildung eines schwachen unspezifischen Hintergrundsignals nicht zu vermeiden, das durch die Anlagerung der mit Poly- $^{33}\text{P}$ dATP $\alpha$ S-markierten Oligonukleotidprobe an überwiegend nicht neuronale Gewebsbestandteile bedingt ist.

### 3.3.1 Radioaktive Markierung der Oligonukleotide

Die Oligonukleotidproben werden mittels Terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) und  $^{33}\text{P}$ dATP $\alpha$ P (spezifische Aktivität ca. 2500 Ci/mmol) am 3'-Ende radioaktiv markiert. Unter Verwendung des mitgelieferten arsenhaltigen Reaktionspuffers und in Anwesenheit von  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen bildet die TdT fast ausschließlich eine Kette aus  $^{33}\text{P}$ dATP $\alpha$ P am 3'-Ende der Oligonukleotide.

Prozedere:

- 1) 8,0 $\mu$ l TdT-Puffer (5x),  
2,4 $\mu$ l  $\text{CoCl}_2$  (25 mM),  
22,6 $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ ,  
2,0 $\mu$ l des jeweiligen Oligonukleotids (0,36pmol/ $\mu$ l)  
3,0 $\mu$ l  $^{33}\text{P}$ dATP $\alpha$ P  
werden angesetzt und kurz gemischt.
- 2) 2,0 $\mu$ l TdT (50 U) werden zugegeben und nur durch leichtes Umrühren vermischt. Es dürfen keine Luftbläschen im Ansatz verbleiben, da diese die Reaktion der TdT hemmen.
- 3) Inkubation für 30 Min. bei 38°C unter leichter Bewegung.
- 4) die Reaktion wird durch Zugabe von 60,0 $\mu$ l TNES-Puffer gestoppt und kurz auf Eis gekühlt.
- 5) Während der Inkubation wird aus Chromatographie-Säulen der Lagerungspuffer durch Zentrifugation mit 1000g für 2 Min. bei 4°C entfernt.
- 6) Der Markierungsansatz (100 $\mu$ l) wird vollständig auf die Säule gegeben und nach einer etwa 2minütigen Einwirkzeit mit 1000g für 4 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das Polyacrylamid-Gel dieser Säulen ist so beschaffen, dass Nukleotide einer Länge von weniger als 5 Basen zurückgehalten, die markierten längeren Oligonukleotide dagegen eluiert werden.
- 7) 2,0 $\mu$ l der aufgereinigten markierten Oligonukleotide werden in 3,0ml eines Szintillations-Cocktails in einem  $\beta$ -Counter (Fa. Wallace NEN) gemessen. Bei den hier markierten Sonden konnten spezifische Aktivitäten von 0,78-1,42 x 10<sup>6</sup> cpm gemessen werden.
- 8) Um Oxidation und damit Abspaltung der Schwefelgruppen zu vermeiden, wird den einzelnen

Markierungsansätzen abschließend 4µl DTT-Lösung (1M) zugesetzt. Anschließend werden sie bis zur Hybridisierung bei -25°C tiefgefroren.

### **3.3.2 Fixierung der Gewebeschnitte**

Die für die ISH vorgesehenen Gewebeschnitte werden aus der Tiefkühltruhe herausgenommen und bei Raumluft aufgetaut und getrocknet (ca. 30 Min.) Im Anschluss daran erfolgt eine Fixierung mit Paraformaldehyd und eine Dehydrierung mit Ethanol :

- 1) Fixierung in 4% Paraformaldehyd-Lösung bei 4°C für 5 Min.
- 2) Waschen der Schnitte in 1xPBS bei Raumtemperatur für 1 Min.
- 3) Dehydrieren der Schnitte in 70% und darauf folgend 96% Ethanol bei Raumtemperatur für jeweils 5 Min.
- 4) Lagerung der Schnitte bei 4°C und in 96% Ethanol bis zur Hybridisierung. Ablauf der in situ Hybridisierung

Die markierten Oligonukleotidproben werden im Verhältnis 1:100 mit Hybridisierungspuffer (s.o.) verdünnt und nach Zugabe von DTT Lösung (Endkonzentration: 10mM) ausgiebig gemischt. Die Ansätze zur Bestimmung unspezifischer Signale enthalten zusätzlich noch das jeweils korrespondierende unmarkierte Oligonukleotid (0,72pmol/100µl Ansatz).

- 1) Auf die Objektträger werden 9,0µl/cm<sup>2</sup> des Hybridisierungsansatzes pipettiert. Die aufgebrachte Lösung wird durch Auflage von passenden Parafilmstreifen verteilt. Diese verbleiben während der Hybridisierung als Abdeckung.
- 2) Die Objektträger werden nun in Petrischalen gelegt, in denen sich zusätzlich feuchte Papierknäuel (getränkt mit einer Lösung aus 50% Formamid und 4xSSC) befinden, die das Eintrocknen der Schnitte verhindern.
- 3) Hybridisierung für 48 Stunden bei 42°C in einem Umluftofen.
- 4) Abziehen der Parafilmstreifen und Waschen der Schnitte:
  - i) in 1xSSC für 30 Min. bei 56°C (konstant temperiert im Wasserbad).
  - ii) in 1xSSC für 3 Min. bei Raumtemperatur.
  - iii) in 0,1xSSC für 3 Min. bei Raumtemperatur.
- 5) Dehydrieren der Schnitte:
  - i) in 70% Ethanol für 3 Min. bei Raumtemperatur.
  - ii) in 96% Ethanol für 3 Min. bei Raumtemperatur.
- 6) Trocknen der Schnitte für etwa 30 Min. bei Raumtemperatur.

### **3.3.3 Semiquantitative Film-Autoradiografie**

#### *Exposition und Entwicklung*

Die hybridisierten und getrockneten Gewebsschnitte werden mit Klebeband auf vorgeschrittenen Pappbögen fixiert und zusammen mit einem  $^{14}\text{C}$ -Polymer-Standard in Röntgenfilmkassetten gegen Biomax MR<sup>®</sup>-Film exponiert. Nach 28 Tagen werden die Filme bei Raumtemperatur für 3 Min. in Entwicklerlösung GBX gegeben, anschließend ca. 30 Sek. in ein Stoppbad getaucht, in Fixierlösung eingelegt (3 Min.) und schließlich für 5 Min. in entsalztem Wasser gereinigt, bevor sie zum Trocknen aufgehängt werden.

#### *Auswertung der Film-Autoradiografien*

Die Film-Autoradiografien werden mit einem Flachbettscanner in einer Auflösung von 600dpi eingelesen, wobei die Bedingungen (Helligkeit, Kontrast, schwarz/weiß Gradation) für sämtliche Einzelscans konstant gehalten werden.

Anhand dieser Scans erfolgte die makroskopische Beurteilung des Hybridisierungssignals.

### **3.3.4 Semiquantitative Emulsions-Autoradiographie**

#### *Exposition, Entwicklung und Gegenfärbung*

Parallel zu den Schnitten, die in der Film-Autoradiografie Verwendung fanden, wurden für alle Hirne und Regionen Gewebsschnitte für die Emulsions-Autoradiografie hybridisiert. Bei diesem Verfahren entstehen über den einzelnen signaltragenden histologischen Strukturen kleine Silberkörnchen (Grains), die mikroskopisch zugeordnet und gemessen werden können.

Unter strikten Dunkelkammerbedingungen werden die einzelnen hybridisierten Schnitte in Fotoemulsion getaucht, die durch ein Wasserbad von 43°C in flüssiger Form gehalten wird. Anschließend stellt man die Objektträger zum Trocknen senkrecht in ein lichtdichtes Behältnis.

Die weitere Exposition erfolgt über einen Zeitraum von 56 Tagen bei 4°C in lichtisolierten Objektträgerkästen. Hiernach werden die Schnitte in der Dunkelkammer entwickelt, indem sie zunächst für 3 Min. in Entwicklerlösung D19 getaucht werden, dann für 2 Min in Fixierer RT2000, und am Ende zweifach für 10 Minuten gewässert werden. Die Schnitte werden unter möglichst staubfreien Bedingungen bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur mikroskopischen Identifikation der Gewebsstruktur werden die Schnitte nun mittels einer modifizierten Nissl-Methode gefärbt:

- 1) Färbung in 0,05% Thioninlösung
- 2) Differenzierung in
  - i) 70% Ethanol für 1 Min. 30 Sek.
  - ii) 96% Ethanol für 30 Sek.

- iii) zweimalig 100% Ethanol für 1 Min.
- 3) Überführung in Xylolersatz für 5 Min.
- 4) Eindecken der gefärbten Emulsions-Autoradiografien.

#### *Auswertung der Emulsions-Autoradiografie*

Zur Quantifizierung werden die einzelnen Zellpopulationen der jeweiligen Hirnregionen mikroskopisch bei 500facher Vergrößerung identifiziert und mit einer Videokamera sowohl in Hell- als auch in DunkelfeldEinstellung fotografiert. Unter Verwendung der Software Optimas 5.0 wurden die Zellgrenzen im Hellfeldbild manuell definiert und die Fläche der Grains innerhalb dieser Auswahl im Dunkelfeldbild gemessen. Die Ergebnisse repräsentieren die Grainfläche in  $\mu\text{m}^2$  bezogen auf  $1000\mu\text{m}^2$  Zellfläche.

Eine Kalibration des Signals über Isotopen-Standards ist aufgrund der punktuellen und mikroskopischen Natur des Expressionsmusters nicht realisierbar. Deswegen erreicht man mit dieser Methode vor allem die qualitative Charakterisierung signaltragender Zellen. Relative Vergleiche des Expressionsniveaus zwischen Schnitten, die innerhalb des gleichen Experiments mit dem identischen Oligonukleotid hybridisiert worden sind, sind zwar unter bestimmten Einschränkungen möglich, versuchsunabhängige Aussagen über die absolute Höhe der zellulären Signalaktivität können dagegen nicht getroffen werden. Auch die Definition eines möglichen unspezifischen Hintergrundsignals scheitert an den methodischen Grenzen. Aus Kontrollexperimenten lässt sich jedoch von einem empirischen Hintergrundwert um  $10\mu\text{m}^2$  Grainfläche/ $1000\mu\text{m}^2$  Zellfläche ausgehen.

Die Differenzierung der einzelnen neuronalen Untergruppen erfolgte anhand der typischen Morphe. So wurden beispielsweise im Cortex große Zellen mit charakteristischem triangulärem Aspekt den Pyramidenzellen zugerechnet, während kleinere Zellen mit eher runder Gestalt zu den Interneuronen gezählt wurden. Es wurde stets darauf geachtet, die Neurone vor der Messung eindeutig zu identifizieren. In Einzelfällen (zum Beispiel in der Lamina I des prämotorischen Cortex) war eine rein morphologische Unterscheidung zwischen Effektor- und Interneuronen nicht möglich. Hier wurde dann dennoch versucht, nach dem äußeren Aspekt unterschiedliche Neuronen-Subgruppen auszumachen (z.B. „groß“ oder „klein“).

Für die Erfassung der neuroanatomischen Gegebenheiten wurde das Buch „The Synaptic Organization of the Brain“ von Gordon M. Sheperd zugrunde gelegt (Sheperd, 2004).

#### **3.3.5 Auswahlkriterien für Oligonukleotidsonden und Primer**

Die Komposition der bei der ISH verwendeten Sonden bzw. der Primer für die RT-PCR erfolgt nach mehreren Auswahlkriterien. Zum einen müssen die Proben zu 100% komplementär zum nachzuweisenden Transkript sein und dürfen keine nennenswerte Affinität zu anderen genetischen

Sequenzen beim Menschen aufweisen. Zum anderen müssen die Zielsequenzen eine ausreichende Anzahl an Guanin- und Cytosin-Molekülen beinhalten, um eine angemessen hohe Bindungsenergie des Hybrides zu gewährleisten.

Unter Berücksichtigung dieser Erwägungen und auf der Basis der in der Internet-Datenbank NIH BLAST bereitgestellten Informationen wurden schließlich die unter 7.1.4 aufgeführten Oligonukleotidsequenzen für die Experimente ausgewählt.

Das für die In situ Hybridisierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors verwendete Oligonukleotid bindet sowohl an CB<sub>1</sub>-mRNA als auch an die der Splice-Variante CB<sub>1A</sub>. Der besseren Darstellbarkeit halber und angesichts der nachgewiesenen Abwesenheit von CB<sub>1A</sub> im Gehirn (s.u.) ist in der Folge lediglich von CB<sub>1</sub> die Rede.

### ***3.4 Immunhistochemie***

Zur immunhistochemischen Darstellung von CB<sub>1</sub> in den Gewebsschnitten werden primäre, aus Hasen gewonnene Antikörper gegen das Rezeptorprotein verwendet (1:1000, Sigma). Die Antikörper sind gegen das N-terminale Ende gerichtet und wurden in ihrer Spezifität durch zahlreiche vorangegangene Studien (Tsou et al., 1998a) bestätigt.

Nach erfolgter Bindung der Primärantikörper werden sekundäre Antikörper gegen Hasen-IgG hinzugegeben, die mit Biotin versehen sind und durch Zusatz eines Avidin/Biotin-Merettichperoxidase-Komplexes (ABC) gebunden werden. Mittels Diaminobenzidin (DAB), eines chromogenen Substrates der Peroxidase, wird schließlich die Färbung erzielt.

Zur Kontrolle von unspezifischen Reaktionen des Zweitantikörpers, des ABC-Komplexes oder der Färbung, wurden zusätzliche Gewebsschnitte bereitgestellt, denen kein Primärantikörper zugegeben wurde, die aber ansonsten die identische Behandlung erfuhren.

#### ***3.4.1 Fixierung der Gewebeschnitte***

Zunächst werden die tiefgefrorenen Kryostatschnitte bei Raumluft aufgetaut und ca. 30 Minuten getrocknet.

- 1) Fixierung in 4% Paraformaldehyd-Lösung bei 4°C für 15 Min.
- 2) Zweifaches Waschen der Schnitte in 1xPBS bei Raumtemperatur für 5 Min.

#### ***3.4.2 Ablauf der Immunhistochemie***

Zur Vermeidung des Eintrocknens der Schnitte wird unmittelbar nach dem Fixierungsprozess mit dem Versuch begonnen:

- 1) Inkubation in Blockierungspuffer (PBSTN) für 60 Min. bei Raumtemperatur.
- 2) Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-CB<sub>1</sub> 1:1000) für 18 Stunden bei 6°C.
- 3) Dreimaliges Waschen der Schnitte in 1xPBS für je 5 Min. bei Raumtemperatur.

- 4) Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (1:25 in PBSN) für 60 Min. bei Raumtemperatur.
- 5) Dreimaliges Waschen der Schnitte in 1xPBS für je 5 Min. bei Raumtemperatur.
- 6) Inkubation mit ABC-Komplex (1:25 in 1xPBS) für 60 Min. bei Raumtemperatur.
- 7) Dreimaliges Waschen der Schnitte in 1xPBS für je 5 Min. bei Raumtemperatur.
- 8) Farbreaktion mit Diaminobenzidin-Lösung für 10 Min. bei Raumtemperatur.
- 9) Waschen der Schnitte in H<sub>2</sub>O für 5 Min. bei Raumtemperatur.
- 10) Dehydrieren der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) für je 2 Min.
- 11) Überführen in Xylolersatz für 5 Min. und Eindecken der Schnitte.

### ***3.4.3 Auswertung der Immunhistochemie***

Die immunhistochemisch gefärbten Gewebsschnitte werden lichtmikroskopisch beurteilt, und die Intensität der immunhistochemischen Reaktion semiquantitativ in vier verschiedene Stärkegrade eingeteilt (schwach, mittelgradig, stark immunopositiv und immunonegativ).

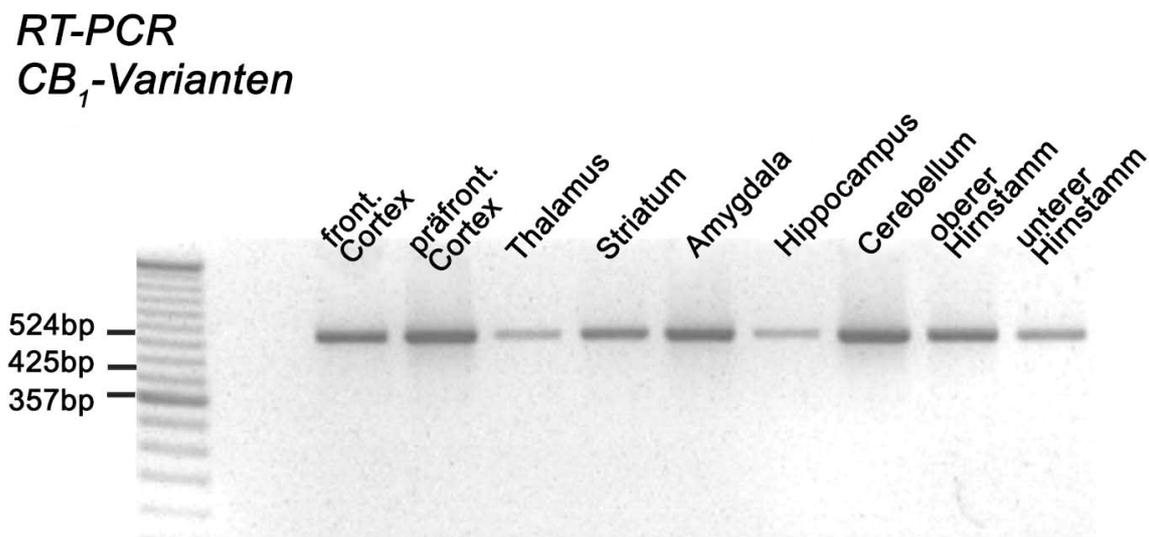
## 4 Ergebnisse

### 4.1 RT-PCR

Ziel des Versuches war es, in verschiedenen Hirnregionen zu überprüfen, in wie weit neben der mRNA des CB<sub>1</sub>-Rezeptors auch die der Splice-Varianten CB<sub>1A</sub> und CB<sub>1B</sub> nachweisbar sein würden (Ryberg et al., 2005; Shire et al., 1995).

Nach der Gewinnung der cDNA durch reverse Transkription wurde für die PCR ein Primerpaar eingesetzt, das in der Lage ist, die cDNA aller drei Rezeptorformen zu unterschiedlich langen Molekülen zu amplifizieren. Das Amplifikat von CB<sub>1</sub> weist dabei eine Länge von 524 Basenpaaren auf, jenes von CB<sub>1A</sub> besteht aus 357 Basenpaaren. CB<sub>1B</sub> besitzt 425 Basenpaare.

In der Gelelektrophorese zeigte sich eine deutliche Bandenbildung bei 524bp in allen untersuchten Hirnarealen. Lediglich in Thalamus und Hippocampus war das Signal leicht abgeschwächt. Im Bereich von 357bp und 425bp ließen sich keine Banden nachweisen, was darauf hindeutet, dass die Splice-Varianten CB<sub>1A</sub> und CB<sub>1B</sub> in den von uns untersuchten Regionen des menschlichen Gehirns nicht exprimiert werden (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1:** RT-PCR aus mRNA-Isolaten verschiedener Hirnregionen. Kein Hinweis für eine Expression der Splice-Varianten CB<sub>1A</sub> (357bp) und CB<sub>1B</sub> (425bp)

## 4.2 *In situ* Hybridisierung

### 4.2.1 mRNA-Expression des Enzyms NAPE-PLD

(Abb. 4.2 - 4.4, Tab. 4.1)

#### *Prämotorischer Cortex (PMC)*

In der makroskopischen Beurteilung der Filme hebt sich das Cortexareal deutlich von der weißen Substanz ab und zeigt eine mittlere Signalintensität, ohne dass sich einzelne Schichten in besonderem Maße abgrenzen ließen.

In der mikroskopischen Analyse präsentieren die Zellen über alle Laminae hinweg mittelstarkes Signal, wobei die Pyramidenzellen eine geringfügig schwächere Expression aufweisen als die Interneurone. Allerdings liegt der Anteil an signaltragenden Zellen bei den Pyramiden mit über 50% deutlich höher als bei den Interneuronen, bei denen nur eine Minderheit das Transkript nennenswert ausbildet. In Lamina I konnten nur sehr wenige Zellen identifiziert werden, die positiv für NAPE-PLD mRNA sind.

#### *Anteriorer cingulärer Cortex (ACC)*

Makroskopisch ohne erkennbaren Unterschied zum PMC folgt die Expression von NAPE-PLD mRNA im Cingulum auch mikroskopisch im Wesentlichen dem gleichen Schema, das im präfrontalen Cortex beobachtet wurde. Auffällig ist lediglich die im Vergleich zum PMC etwas herabgesetzte Markierung der Interneurone, die sich hier bezüglich der Signalintensität von den Pyramidenzellen kaum unterscheiden.

#### *Hippocampus*

Auf den Filmaufnahmen heben sich Gyrus dentatus und CA-Region geringfügig von ihrer Umgebung ab.

In der Auswertung der Gewebsschnitte lässt sich NAPE-PLD mRNA in allen untersuchten Neuronentypen nachweisen. Das Markierungsniveau bewegt sich dabei durchweg im schwachen Bereich.

#### *Amygdala*

In der makroskopischen Betrachtung erweist sich die basolaterale Amygdala als nahezu völlig signalfrei.

Auch mikroskopisch erscheint nur ein verschwindend geringer Teil aller Zellen in einem schwachen Maße positiv für NAPE-PLD mRNA. Die überwiegende Mehrheit der Neurone lässt kein Hybridisierungssignal erkennen.

### *Thalamus*

Die Film-Autoradiografien zeigen eine gleichmäßige Expression von NAPE-PLD im Thalamus. Nur der Nucleus centromedianus stellt sich deutlich aufgehellert dar, was auf ein geringes Vorkommen des Transkriptes hinweist.

In der Einzelzellanalyse lässt sich im Nucleus lateralis dorsalis, dem Nucleus medialis und in den ventralen Nuclei sowohl bei den großen, wohl primären Neuronen als auch bei den kleineren mutmaßlichen Interneuronen ein konstant mäßiger Expressionsgrad beobachten. Der Nucleus reticularis erscheint schwach markiert, das Vorhandensein von NAPE-PLD mRNA im Nucleus centromedianus lässt sich nur bei gut der Hälfte der Interneurone sicher nachweisen. Etwa zwei Drittel der primären Neurone und gut die Hälfte der Interneurone in den untersuchten Thalamuskernen exprimieren NAPE-PLD.

### *Hypothalamus und angrenzende Strukturen*

In jedem der untersuchten Kerne wurden die Zellen unter dem Mikroskop morphologisch in zwei Gruppen (groß und klein) geteilt und ausgemessen. Die Intensität der Expression liegt bei den großen Zellen der Nuclei paraventricularis, dorsomedialis und supraopticus sowie der Stria diagonalis Broca im schwachen Bereich. Mäßig ausgeprägt ist sie im Nucleus infundibularis, fraglich positiv im Corpus mammillare.

Für die kleinen Zellen lässt sich ein mäßiges Signalniveau in den Nuclei paraventricularis, dorsomedialis, ventromedialis und infundibularis beobachten. Schwach markiert erscheinen die kleinen Neurone des Nucleus supraopticus, der Stria diagonalis Broca und des Corpus mammillare.

### *Basalganglien*

Nucleus caudatus und Putamen erscheinen auf den Filmaufnahmen mäßig markiert. Kaum Hybridisierungssignal findet sich im Globus pallidus.

Das zelluläre Expressionsniveau von NAPE-PLD liegt durchweg im schwachen bis mäßigen Bereich. Die höchsten Werte ließen sich dabei in den kleinen Neuronen des Striatums und in den Neuronen des Nucleus subthalamicus messen. Das makroskopisch niedrigere Signal im Globus pallidus lässt sich vor allem auf die geringere Zelldichte dieser Struktur im Vergleich zum Striatum zurückführen.

### *Cerebellum*

Besonders das Stratum granulosum zeigt bei makroskopischer Betrachtung ein hohes Maß an Signalintensität. Deutlich niedriger liegt die Markierung im Bereich des Stratum moleculare, das allerdings auch eine weitaus geringere Neuronendichte besitzt.

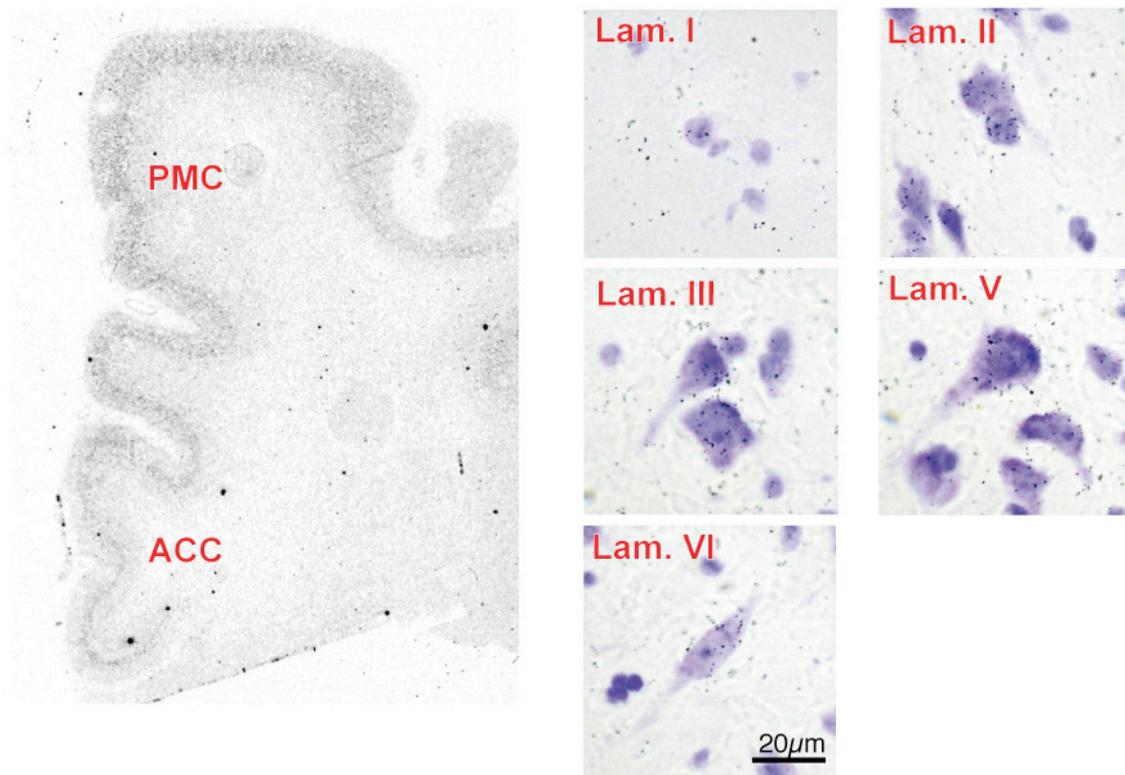
Die Untersuchung der einzelnen Zellpopulationen ergab dann einheitlich ein mäßiges Expressionsniveau, nur die Körnerzellen weisen etwas schwächere Messwerte auf. Unter den Sternzellen erwies sich nur eine Minderheit von etwa 20% als signalpositiv.

*Hirnstamm*

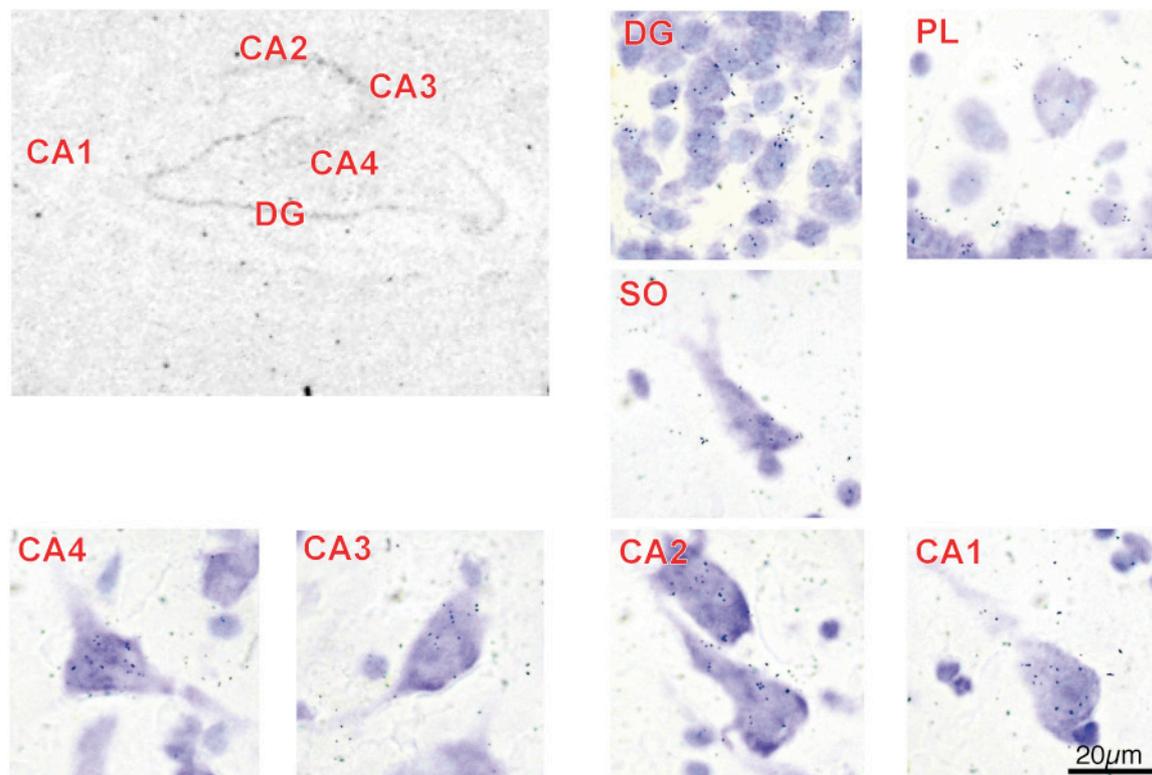
Untersucht wurden das periaquäduktale Grau und der Nucleus olivaris. Makroskopisch wie mikroskopisch präsentieren beide Strukturen eine niedrige Transkriptdichte.

*Weißer Substanz*

Messungen in der weißen Substanz des präfrontalen Cortex lassen ein Expression von NAPE-PLD mRNA fraglich erscheinen. Im Cerebellum konnte ein knapp überschwelliges (mehr als 1% der gemessenen Fläche) Signal nachgewiesen werden.

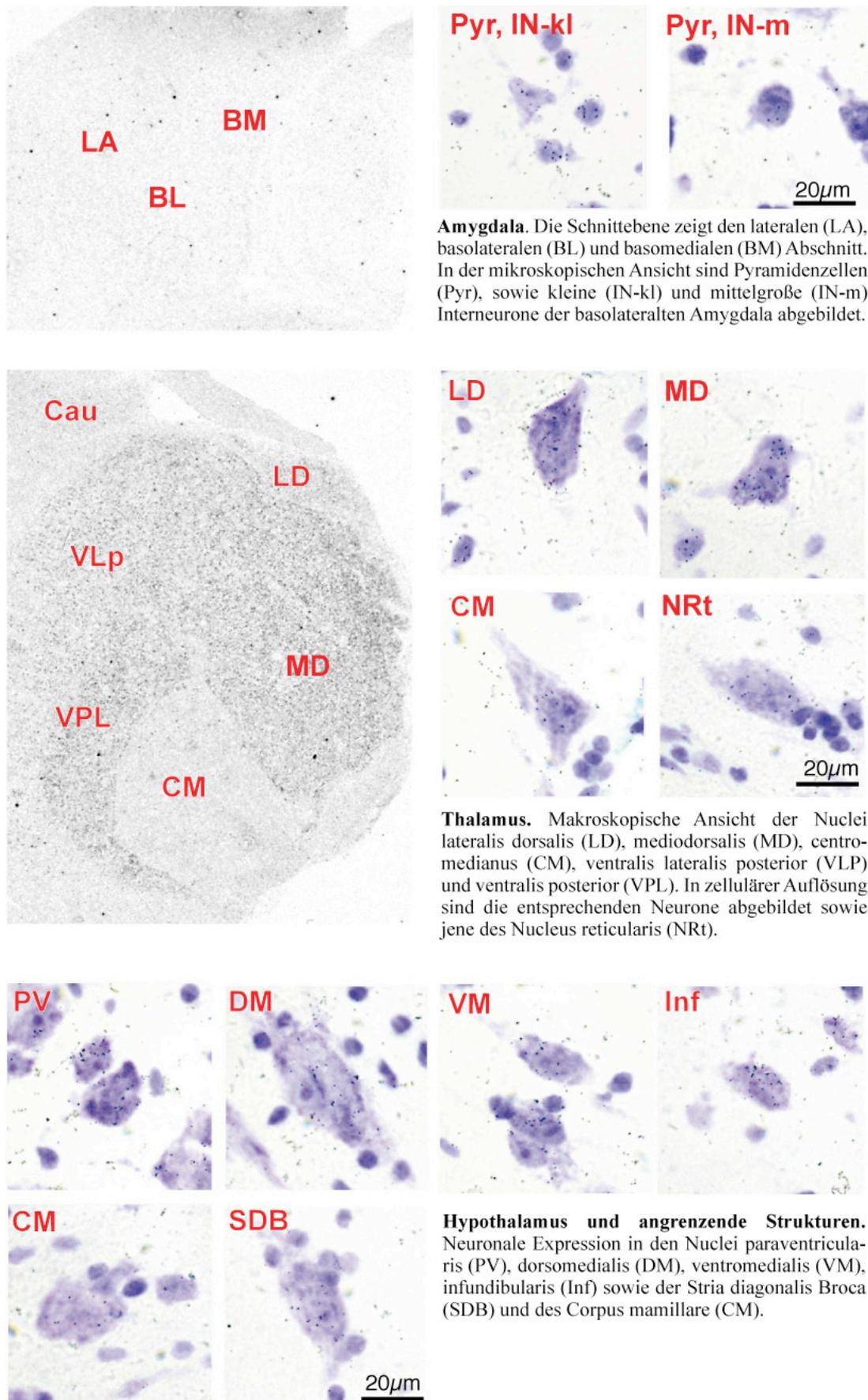


**Cortex.** Die makroskopische Ansicht zeigt den prämotorischen (PMC=BA6) und anterioren cingulären Cortex (ACC). In den mikroskopischen Aufnahmen sieht man einzelne Zellen in den Laminae I-VI des prämotorischen Cortex.

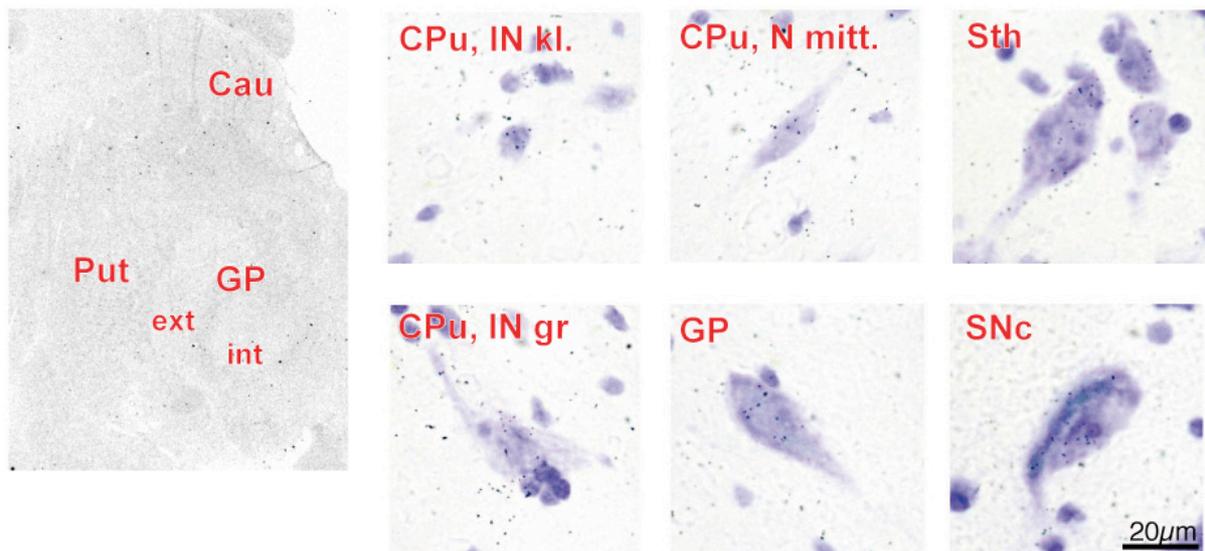


**Hippocampus.** In der Übersicht ist die gesamte hippocampale Formation abgebildet. Darüber hinaus sind einzelne Neurone aus dem Gyrus dentatus (DG), dem Stratum multiforme (PL), dem Stratum oriens (SO) und den Abschnitten 1-4 des Ammonshorns (CA1-4) zu sehen.

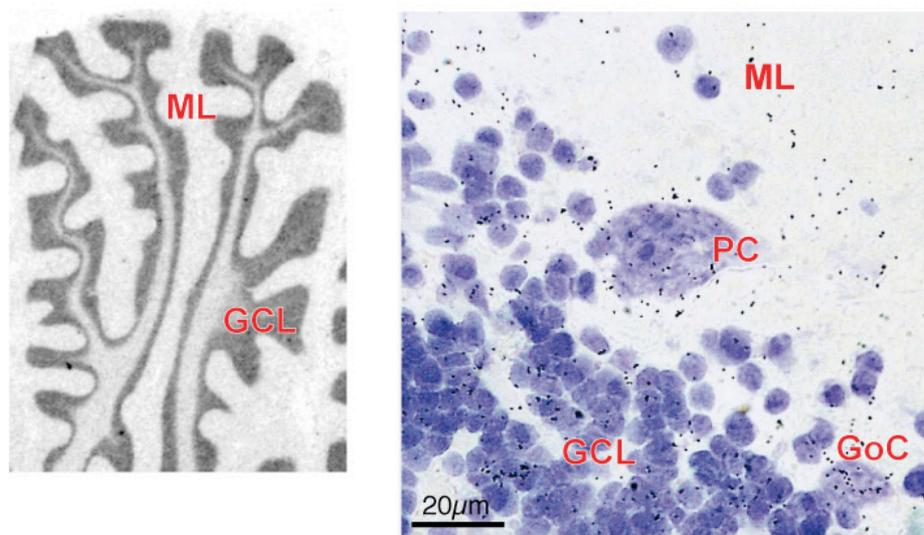
**Abb. 4.2:** Expression von NAPE-PLD mRNA in Cortex und Hippocampus



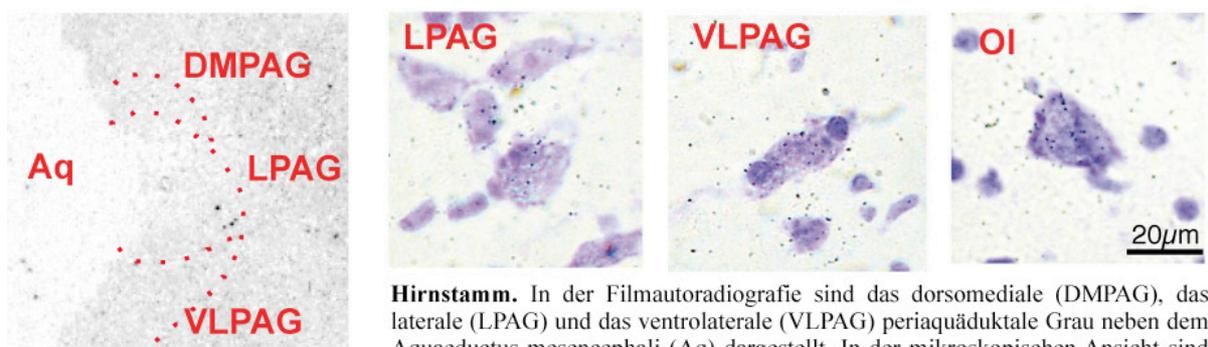
**Abb. 4.3:** Expression von NAPE-PLD mRNA in Amygdala, Thalamus und Hypothalamus



**Basalganglien.** In der makroskopischen Aufnahme sind Nucleus caudatus (Cau), Putamen (Put) und Globus pallidus (GP) markiert. Mikroskopisch wird im Striatum (Caudate putamen = CPu) zwischen den mittelgroßen Neuronen und den kleinen (IN kl) und großen (IN gr) Interneuronen unterschieden. Außerdem abgebildet: Nucleus subthalamicus (Sth) und Substantia nigra, pars compacta (SNc).



**Cerebellum.** Abgebildet sind Purkinje-Zellen (PC), Golgi-Zellen (GoC), die Körnerzellschicht (GCL) sowie die Zellen des Stratum moleculare (ML).



**Hirnstamm.** In der Filmautoradiografie sind das dorsomediale (DMPAG), das laterale (LPAG) und das ventrolaterale (VLPAG) periaquäduktale Grau neben dem Aquaeductus mesencephali (Aq) dargestellt. In der mikroskopischen Ansicht sind zusätzlich Neurone des Nucleus olivaris (OI) abgebildet.

**Abb. 4.4:** Expression von NAPE-PLD mRNA in Basalganglien, Cerebellum und Hirnstamm

#### 4.2.2 mRNA-Expression des Cannabinoid 1-Rezeptors (CB<sub>1</sub>)

(Abb. 4.5 - 4.7, Tab. 4.1)

##### *Prämotorischer Cortex*

In der makroskopischen Ansicht erscheint der gesamte PMC in hohem Maße signalpositiv. Die Laminae II und V stechen dabei besonders hervor und heben sich in doppelbandiger Form von ihrem Untergrund ab.

Mikroskopisch fanden sich in den Pyramidenzellen geringe bis mäßige Mengen von CB<sub>1</sub> mRNA. Unter den übrigen Zellen, bei denen es sich vornehmlich um Interneurone handeln dürfte, war das Markierungsniveau mäßig bis stark. 10-20% dieser Zellen tragen das Transkript. In den Laminae I, II, V und VI konnten immer wieder vereinzelte Neurone aufgespürt werden, die fast vollständig von Silberkörnern bedeckt sind. Insgesamt stellen die CB<sub>1</sub>-positiven Zellen eine Minderheit dar.

##### *Anteriorer cingulärer Cortex*

Im makroskopischen Vergleich zum PMC fällt auf, dass – bei ansonsten nicht ersichtlichem Unterschied – der Gyrus cinguli weitaus dichter mit stark signalgebenden Punkten durchsetzt ist. Die lässt auf eine höhere Präsenz stark markierter einzelner Zellen im ACC schließen.

Auf Ebene der exprimierenden Zellen differieren die Messungen jedoch nur geringfügig. So sind die kleinen Interneurone der Lamina II und die Pyramiden der Lamina V etwas stärker markiert als im PMC, die Pyramiden der Lamina VI hingegen geringfügig schwächer. Für die Zellen der Lamina I liegen die Messwerte deutlich niedriger als im PMC.

##### *Hippocampus*

Deutlich sind auf den Filmen Gyrus dentatus und die CA-Region hervorgehoben. Im Bereich von CA2/CA2 findet sich dabei die höchste Signaldichte. Stratum multiforme, Stratum oriens und das Cornu Ammonis sind zudem durchsetzt von zahlreichen Zellen massiver Signalintensität.

In der mikroskopischen Auswertung finden diese Zellen ihre Entsprechung in mittelgroßen bis kleinen Neuronen, die in den jeweiligen Regionen am ehesten der Gruppe der Interneurone zuzuordnen sind und im Bereich ihrer Somata eine enorm hohe Signalstärke aufweisen. Daneben scheint es aber auch eine zweite Gruppe von Interneuronen zu geben, deren Expressionsrate von CB<sub>1</sub> mRNA nur mäßig ist. Mäßig bis stark markiert waren zudem die Pyramidenzellen von CA1-CA4. Messungen im Stratum granulare ergaben schwache Hybridisierungswerte.

### *Amygdala*

Auch in der basolateralen Amygdala findet sich innerhalb des mit gleichmäßig mittelstarkem Signalniveau imponierenden Kerngebietes eine Vielzahl hoch belichteter Einzelzellen.

Bei näherer Betrachtung lassen sich diese als kleine und mittelgroße Neurone identifizieren, deren Soma fast vollständig unter dem Silberkornbesatz verschwindet. In diesen Zellen wurden die höchsten von uns im ZNS gemessenen Werte erzielt. Eine andere Neuronengruppe, die aufgrund ihrer Größe und Form morphologisch am ehesten den Pyramidenzellen zuzuordnen ist, lässt eine mäßige CB<sub>1</sub> mRNA Expression erkennen.

### *Thalamus*

Auf den Filmaufnahmen erscheint der gesamte Thalamus weitgehend frei von Hybridisierungssignal. Bei der mikroskopischen Betrachtung bestätigt sich im Wesentlichen dieser Eindruck. Die meisten Zellen sind negativ für CB<sub>1</sub> mRNA. Nur vereinzelte Neurone in allen untersuchten Kernen präsentieren sich schwach markiert, allerdings in einer Dimension, die es nicht erlaubt, sie als sicher positiv für CB<sub>1</sub>-Rezeptor mRNA zu bezeichnen. Am ehesten lässt sich das Transkript noch in den kleinen Neuronen des Nucleus centromedianus nachweisen.

### *Hypothalamus und angrenzende Strukturen*

In der Einzelzellmessung erwies sich der gesamte untersuchte Hypothalamus als Ort prominenter CB<sub>1</sub> mRNA-Expression. Die größte Signalintensität zeigen dabei die Zellen der Stria diagonalis Broca, in denen ein sehr hohes Hybridisierungsniveau nachgewiesen werden kann. Auch der Nucleus ventromedialis erscheint stark markiert. Die Zellen der übrigen Kerne bewegen sich im mäßigen bis mittelstarken Signalbereich. Nur die großen Neurone in den Nuclei dorsomedialis und supraopticus sind schwach bzw. fraglich positiv für CB<sub>1</sub> mRNA

### *Basalganglien*

Makroskopisch zeichnen sich Nucleus caudatus und Putamen mit hoher Signaldichte auf den Autoradiografien ab. Der Globus pallidus ist nur sehr schwach zu erkennen.

Unter dem Mikroskop wurden die Zellen des Striatums in drei Gruppen aufgeteilt und vermessen. Für die kleinen Neurone ließ sich ein starkes Hybridisierungssignal ermitteln, die Zellen mittlerer Größe liegen im mittelstarken Bereich, und die großen Interneurone weisen niedrige Expressionswerte für CB<sub>1</sub> mRNA auf. Die Markierung der Zellen im Globus pallidus, dem Nucleus subthalamicus und der Substantia nigra, pars compacta ist schwach ausgeprägt.

### *Cerebellum*

Die Filmaufnahmen des Kleinhirns zeigen eine sehr hohe Hybridisierungsdichte in allen Schichten. Besonders das Stratum granulosum erscheint stark markiert. Auch das Stratum moleculare hebt sich deutlich von der signalfreien weißen Substanz ab.

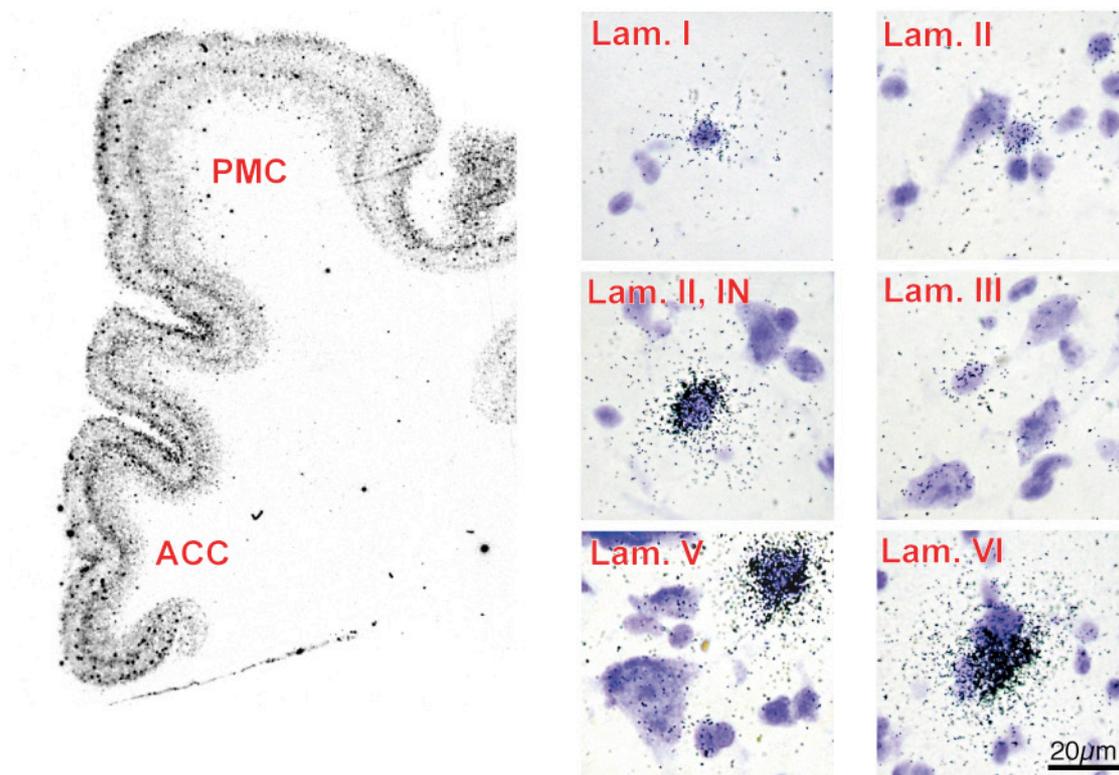
Auf zellulärer Ebene ergaben sich für Purkinje-, Korb und Sternzellen mittelstarke Expressionswerte; ein mäßiges Niveau erreichten die Körnerzellen. Das stärkste Signal ließ sich für die Golgi-Zellen ermitteln.

### *Hirnstamm*

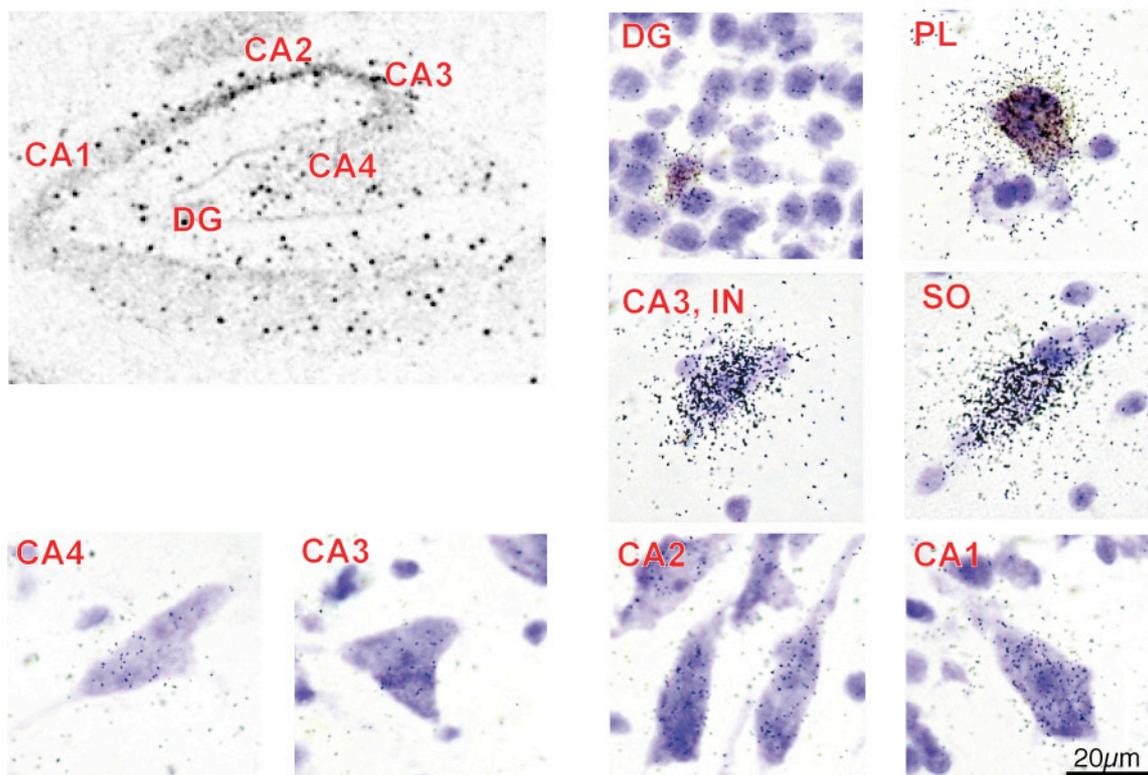
Die niedrigen, ambivalenten Messwerte im lateralen und ventrolateralen periaquäduktalen Grau lassen eine CB<sub>1</sub> mRNA-Expression in dieser Struktur offen. Im Nucleus olivaris ließ sich ein mäßiges Hybridisierungssignal nachweisen.

### *Weißer Substanz*

In der kortikalen weißen Substanz war kein Transkript detektierbar, in der weißen Substanz des Cerebellums lag die Expression knapp über dem Schwellenwert im positiven Bereich.



**Cortex.** Die Abbildungen zeigen das Hybridisierungssignal im prämotorischen (PMC=BA6) und anterioren cingulären Cortex (ACC) sowie einzelne Zellen in den Laminae I-VI des prämotorischen Cortex.



**Hippocampus.** Die makroskopische Ansicht zeigt eine Übersicht über die gesamte hippocampale Formation. Daneben sind einzelne Neurone aus dem Gyrus dentatus (DG), dem Stratum multiforme (PL), dem Stratum oriens (SO) und den Abschnitten 1-4 des Ammonshorns (CA1-4) zu sehen.

**Abb. 4.5:** Expression von CB<sub>1</sub> mRNA in Cortex und Hippocampus

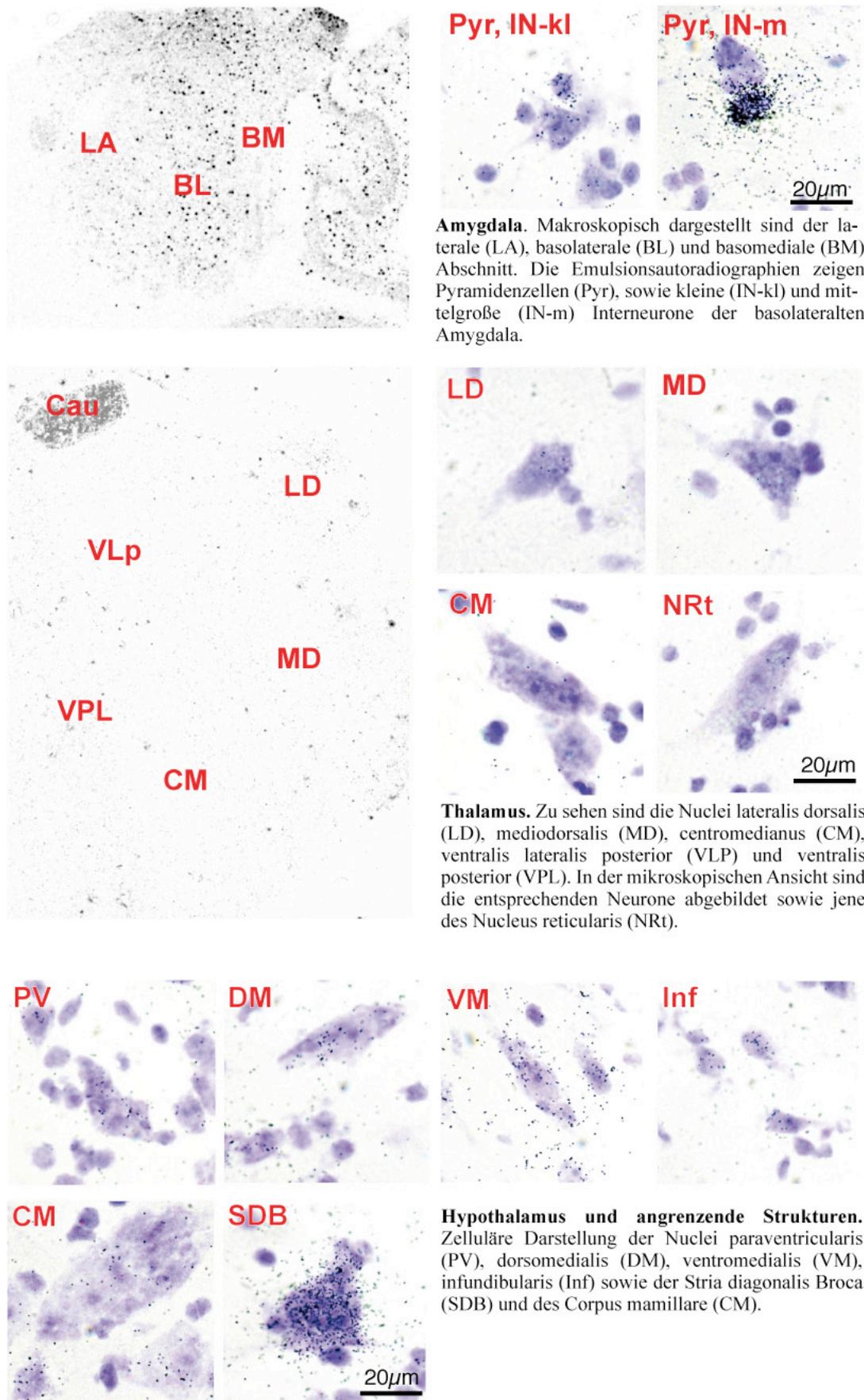
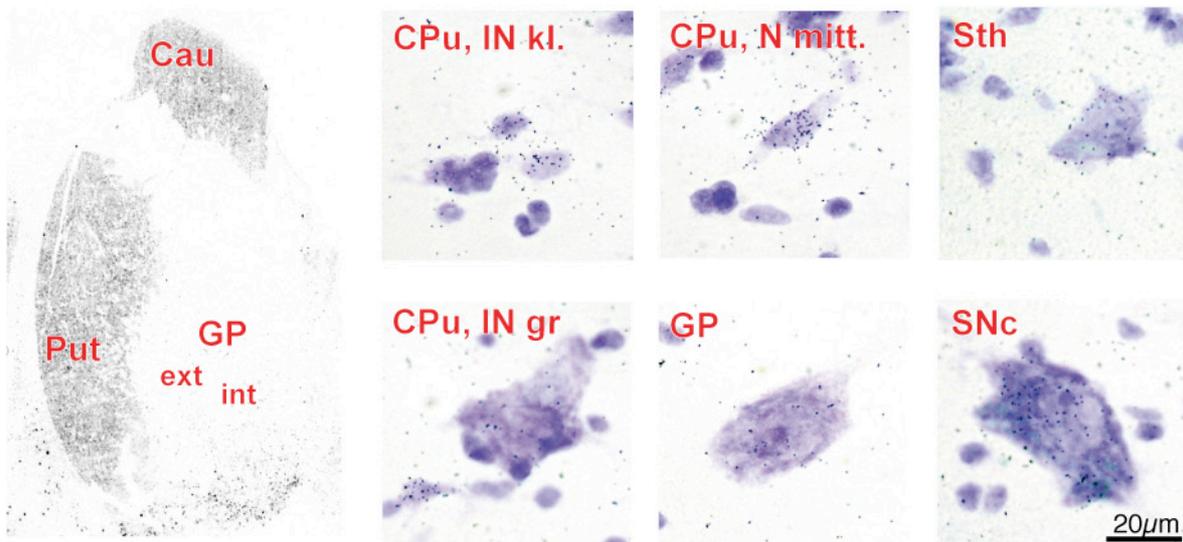
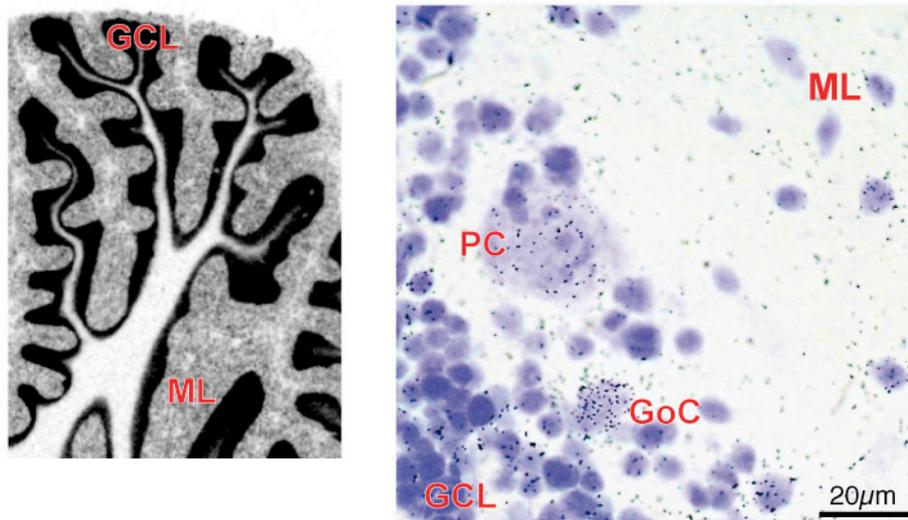


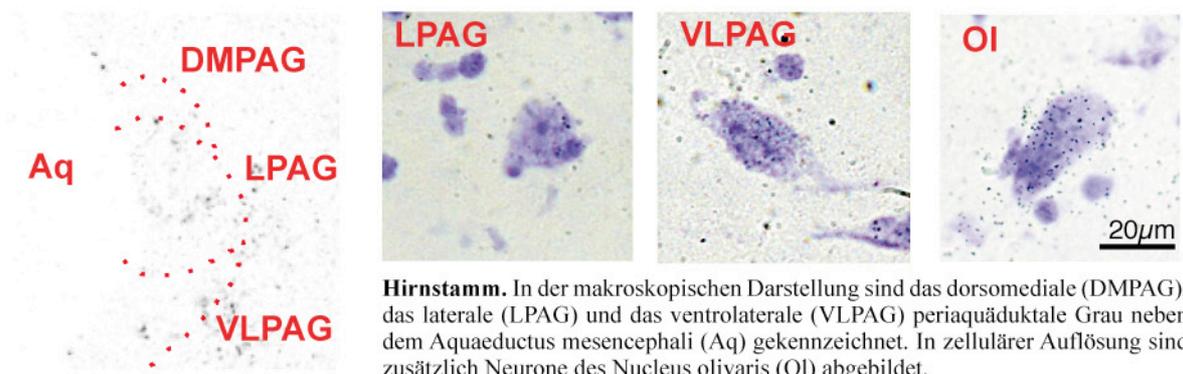
Abb. 4.6: Expression von  $CB_1$  mRNA in Amygdala, Thalamus und Hypothalamus



**Basalganglien.** Auf der Filmautoradiographie sind Nucleus caudatus (Cau), Putamen (Put) und Globus pallidus (GP) hervorgehoben. In der mikroskopischen Ansicht wird im Striatum (Caudate putamen = CPu) zwischen den mittelgroßen Neuronen und den kleinen (IN kl) und großen (IN gr) Interneuronen unterschieden. Weiterhin abgebildet: Nucleus subthalamicus (Sth) und Substantia nigra, pars compacta (SNc).



**Cerebellum.** Dargestellt sind Purkinje-Zellen (PC), Golgi-Zellen (GoC), die Körnerzellschicht (GCL) sowie die Zellen des Stratum moleculare (ML).



**Hirnstamm.** In der makroskopischen Darstellung sind das dorsomediale (DMPAG), das laterale (LPAG) und das ventrolaterale (VLPAG) periaquäduktale Grau neben dem Aquaeductus mesencephali (Aq) gekennzeichnet. In zellulärer Auflösung sind zusätzlich Neurone des Nucleus olivaris (OI) abgebildet.

**Abb. 4.7:** Expression von  $CB_1$  mRNA in Basalganglien, Cerebellum und Hirnstamm

### **4.2.3 mRNA-Expression des Enzyms FAAH**

(Abb. 4.8 – 4.10, Tab. 4.1)

#### *Prämotorischer Cortex*

In den Filmaufnahmen zeigt sich ein homogenes Expressionsmuster mittlerer Intensität. Leicht betont erscheint dabei Lamina II.

In der Einzelzellmessung weisen sämtliche untersuchten Neurone der Lamina II sowie die kleinen Neurone in Lamina VI die höchsten Werte auf. Ihre Signalstärke liegt im mittleren Bereich. Alle restlichen Zellen exprimieren mäßige Mengen an FAAH mRNA.

#### *Anteriorer cingulärer Cortex*

Makroskopisch lässt sich kein Unterschied zur gegenüber dem PMC feststellen, mikroskopisch analysiert reihen sich jedoch im ACC die Neurone von Lamina II und VI in das mäßige Expressionsniveau der übrigen Zellen ein. Darüber hinaus sind die Pyramidenzellen in Lamina III lediglich schwach markiert. Insgesamt weisen sowohl pyramidale als auch nicht pyramidale Neurone in allen Schichten geringere Messwerte auf als die entsprechende Subpopulation im PMC. Damit scheint die Präsenz von FAAH mRNA im cingulären Cortex etwas niedriger zu liegen als im PMC.

#### *Hippocampus*

In der Übersicht ist im gesamten Hippocampus ein schwaches Grundsignal vorherrschend, innerhalb dessen der Gyrus dentatus und die CA2/CA3 Region leicht betont erscheinen.

Alle gemessenen Zelltypen liegen im schwachen Expressionsbereich, das Niveau von FAAH mRNA in den Pyramidenzellen von CA3 und CA4 ist dabei besonders niedrig.

#### *Amygdala*

Bei Betrachtung der autoradiografischen Filme erscheinen die Kerne der basolateralen Amygdala schwach aber dennoch deutlich markiert.

Alle gemessenen Neurone sind positiv für FAAH mRNA; die mittelgroßen und großen Zellen auf geringem, die kleinen Neurone auf mäßigem Niveau.

#### *Thalamus*

Makroskopisch ergibt sich für den Thalamus eine ausgeglichene Verteilung mäßigen Signals, ohne dass ein spezifischer Kern dabei hervorstechen würde.

In zelluärer Auflösung bewegen sich die Zellen der Nuclei lateralis dorsalis und medialis sowie die kleinen Neurone des Nucleus centromedianus im mäßigen Expressionsbereich. Schwache Granulie-

ung zeigen die Neurone der ventralen Nuclei, des Nucleus reticularis und die großen, pyramidenartigen Zellen des Nucleus centromedianus.

#### *Hypothalamus und angrenzende Strukturen*

Über den gesamten Hypothalamus exprimieren die Zellen das Transkript in mäßiger Ausprägung. Schwach ist das Signal lediglich in den großen Neuronen von Corpus mammillare und Nucleus paraventricularis sowie in den kleinen Zellen des Nuclus supraopticus.

#### *Basalganglien*

Beim Betrachten der Filmaufnahmen fällt rasch auf, dass neben dem deutlich hervorgehobenen Striatum der Globus pallidus äußerst signalarm bleibt.

Dementsprechend ergeben sich für die Neurone des Globus pallidus in der Einzelzellmessung niedrige Werte, während in Nucleus caudatus und Putamen die kleinen Neurone ein mittelstarkes und die mittelgroßen Neurone ein mäßiges Expressionsniveau erreichen. Die großen Interneurone tragen eine schwache Markierung, ebenso wie die Zellen der Substantia nigra pars compacta. Mäßig ist die Ausbildung von FAAH mRNA im Nucleus subthalamicus.

#### *Cerebellum*

Makroskopisch lässt sich ein intensives Signal im Bereich der Körnerzellschicht beobachten. Nur leicht markiert erscheint dagegen das Stratum moleculare.

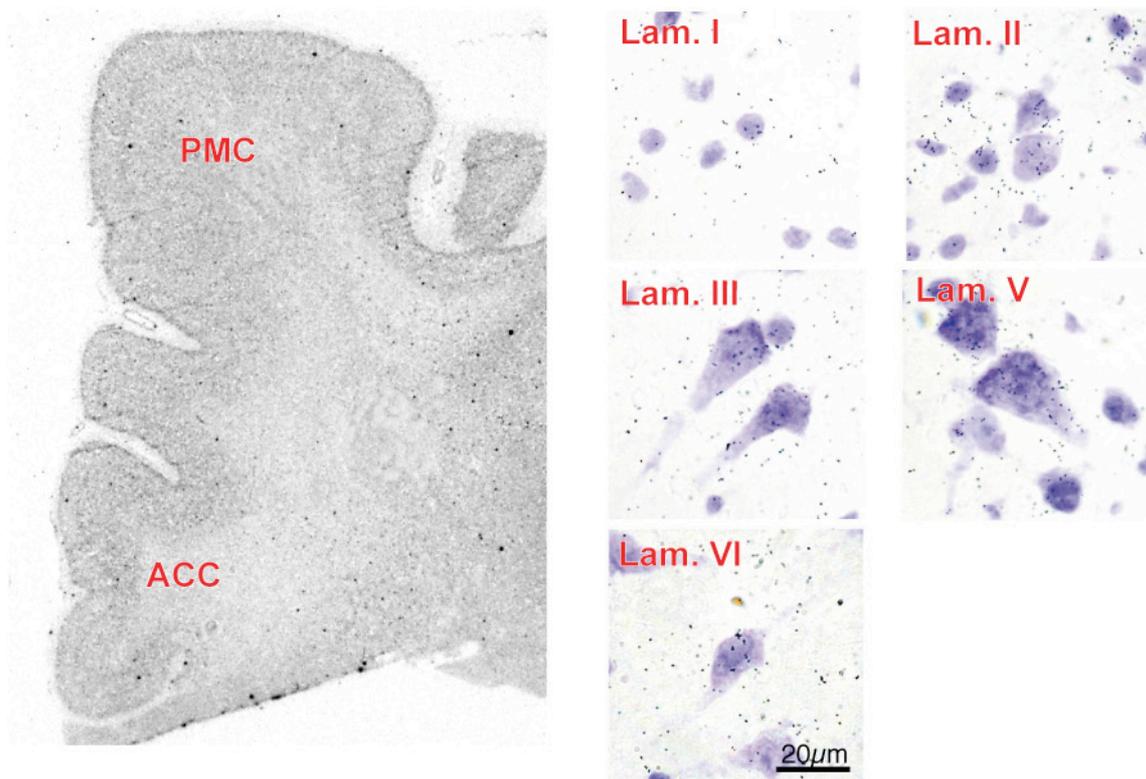
Nur ein geringer Teil von Korb- und Sternzellen stellte sich in der mikroskopischen Analyse als positiv für FAAH mRNA heraus. Das Expressionsniveau erreicht dabei mäßige Werte. Die ermittelten Hybridisierungssignale für Golgi-, Purkinje- und Körnerzellen liegen im schwachen Bereich.

#### *Hirnstamm*

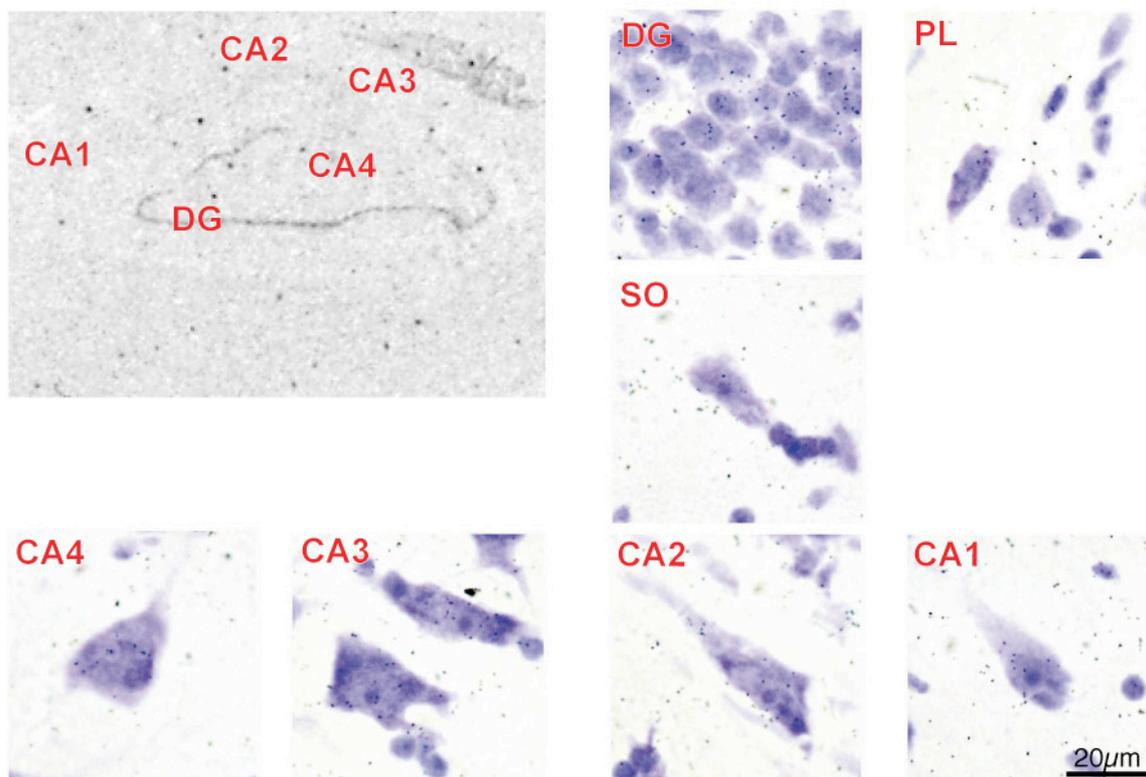
Bei fraglicher Expression im Nucleus olivaris konnte im lateralen und ventrolateralen periaquäduktalem Grau ein schwaches Markierungsniveau gemessen werden.

#### *Weißer Substanz*

Sowohl in der kortikalen als auch in der cerebellären weißen Substanz konnte FAAH mRNA in schwachem Maße detektiert werden.

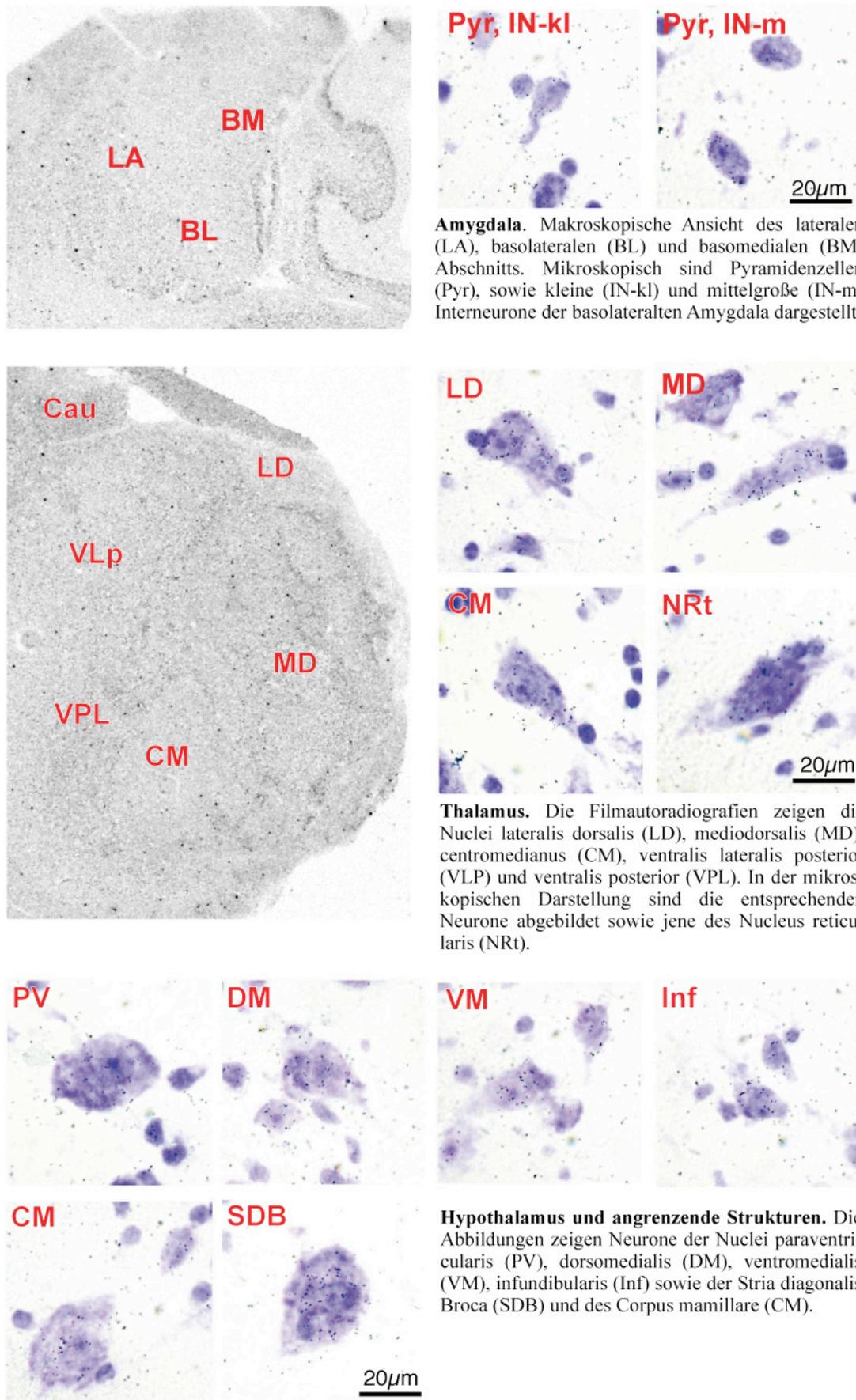


**Cortex.** Die Filmautoradiografie zeigt den prämotorischen (PMC=BA6) und anterioren cingulären Cortex (ACC). In der zellulären Darstellung sind einzelne Neurone der Laminae I-VI des prämotorischen Cortex abgebildet.

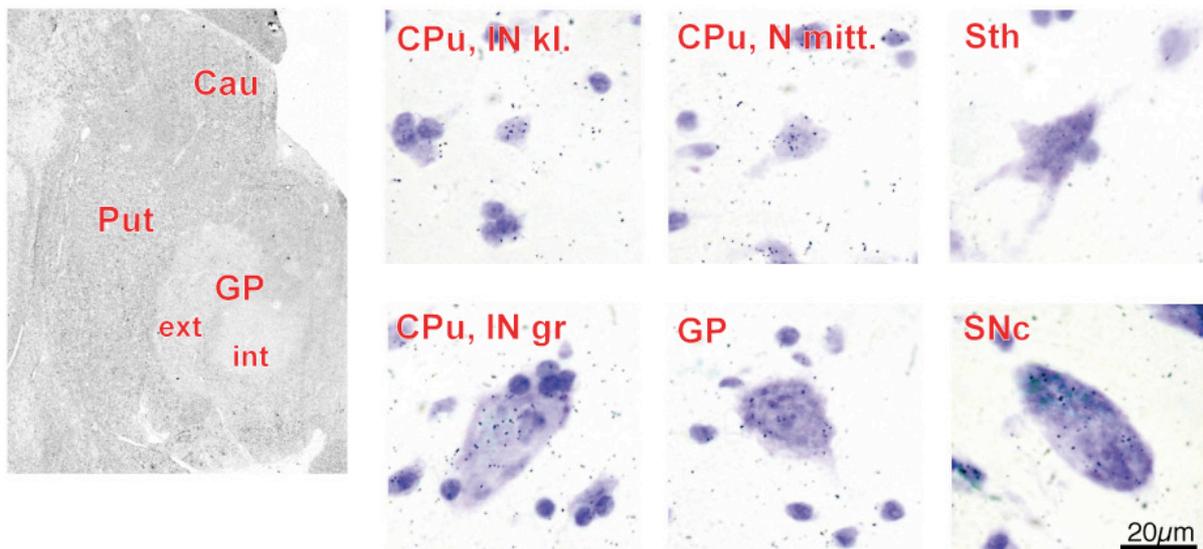


**Hippocampus.** Makroskopische Ansicht der gesamten hippocampalen Formation. Die mikroskopischen Abbildungen entstammen dem Gyrus dentatus (DG), dem Stratum multiforme (PL), dem Stratum oriens (SO) und den Abschnitten 1-4 des Ammonshorns (CA1-4).

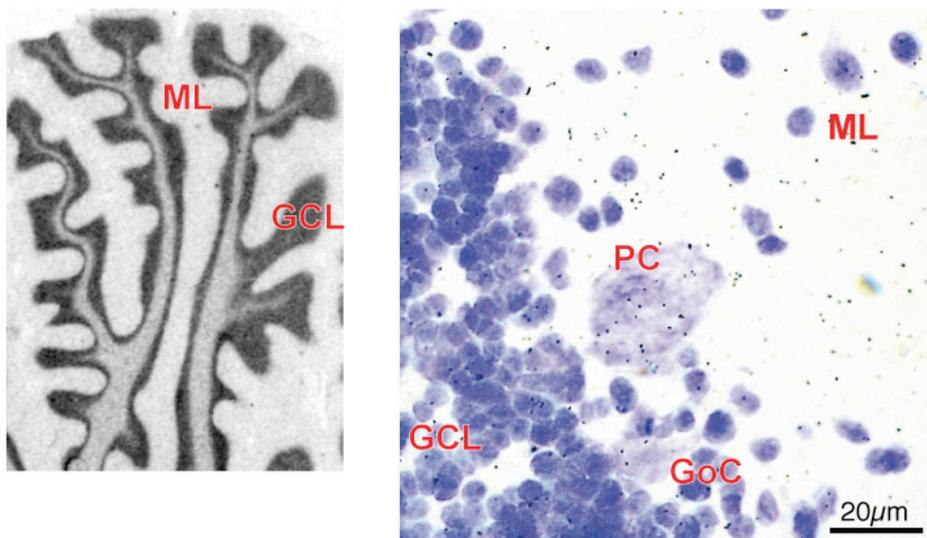
**Abb. 4.8:** Expression von FAAH mRNA in Cortex und Hippocampus



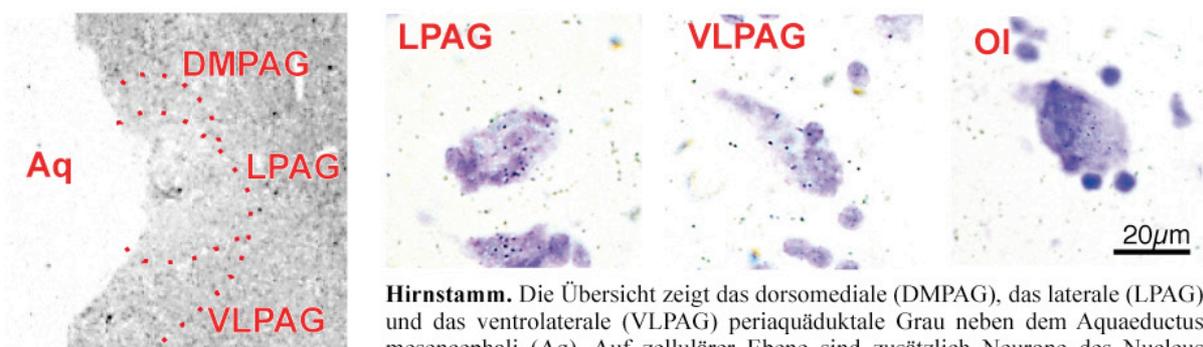
**Abb. 4.9:** Expression von FAAH mRNA in Amygdala, Thalamus und Hypothalamus



**Basalganglien.** In der makroskopischen Ansicht sind Nucleus caudatus (Cau), Putamen (Put) und Globus pallidus (GP) hervorgehoben. Auf zellulärer Ebene wird im Striatum (Caudate putamen = CPu) zwischen den mittelgroßen Neuronen und den kleinen (IN kl) und großen (IN gr) Interneuronen unterschieden. Außerdem abgebildet: Nucleus subthalamicus (Sth) und Substantia nigra, pars compacta (SNc).



**Cerebellum.** Abgebildet sind Purkinje-Zellen (PC), Golgi-Zellen (GoC), die Körnerzellschicht (GCL) sowie die Zellen des Stratum moleculare (ML).



**Hirnstamm.** Die Übersicht zeigt das dorsomediale (DMPAG), das laterale (LPAG) und das ventrolaterale (VLPAG) periaquäduktale Grau neben dem Aquaeductus mesencephali (Aq). Auf zellulärer Ebene sind zusätzlich Neurone des Nucleus olivaris (Ol) abgebildet.

**Abb. 4.10:** Expression von FAAH mRNA in Basalganglien, Cerebellum und Hirnstamm

	NAPE		CB <sub>1</sub>		FAAH	
	Signal	Häufigk.	Signal	Häufigk.	Signal	Häufigk.
<b>Prämotorischer Cortex</b>						
Lamina I	++	selten	++ ++++	selten selten	++	selten
Lamina II Pyr	++	mittelhoch	++	selten	+++	hoch
Lamina II mitt. IN	++	selten	++++	sehr selten	+++	selten
Lamina II kl. IN	+++	selten	++++	selten	+++	selten
Lamina III Pyr	++	mittelhoch	+	selten	++	hoch
Lamina III IN	+++	selten	++++	selten	++	selten
Lamina V Pyr	++	hoch	+	selten	++	hoch
Lamina V IN	+++	mittelhoch	+++ ++++	selten sehr selten	++	selten
Lamina VI Pyr	+	mittelhoch	++	selten	++	hoch
Lamina VI IN	++	selten	+++ ++++	selten sehr selten	+++	selten
<b>Cingulärer Cortex</b>						
Lamina I	+	selten	++ ++++	selten selten	++	selten
Lamina II Pyr	++	mittelhoch	++	selten	++	hoch
Lamina II mitt. IN	++	selten	++++	sehr selten	++	selten
Lamina II kl. IN	++	selten	++++	selten	++	selten
Lamina III Pyr	++	mittelhoch	+	selten	++	hoch
Lamina III IN	++	selten	++++	selten	++	selten
Lamina V Pyr	++	hoch	++	selten	+	hoch
Lamina V IN	++	mittelhoch	+++ ++++	selten sehr selten	++	selten
Lamina VI Pyr	++	mittelhoch	+	selten	++	hoch
Lamina VI IN	++	selten	+++ ++++	selten sehr selten	++	selten
<b>Hippocampus</b>						
<b>Gyrus dentatus</b>						
Stratum granulare	+	mittelhoch	+	mittelhoch	+	mittelhoch
Polym. Schicht IN	+	mittelhoch	++++	selten	+	mittelhoch
<b>Cornu Ammonis</b>						
CA 4 Pyr	+	mittelhoch	++	hoch	(+)	mittelhoch
CA 3 Pyr	(+)	mittelhoch	++	hoch	(+)	mittelhoch
CA 2 Pyr	+	mittelhoch	+++	hoch	+	mittelhoch
CA 1 Pyr	+	mittelhoch	+++	mittelhoch	+	mittelhoch
CA 4-1 IN	+	mittelhoch	++++ ++	sehr selten mittelhoch	+	mittelhoch
CA 1 StO IN	+	selten	++++ ++	selten selten	+	selten
<b>Amygdala (basolat.)</b>						
Pyramidenzellen	+	sehr selten	++	selten	+	mittelhoch
kl. IN	+	sehr selten	++++	selten	++	mittelhoch
mitt. IN	+	sehr selten	++++	selten	+	mittelhoch
<b>Thalamus</b>						
Ncl. laterodorsalis	++	mittelhoch	(+)	selten	++	hoch
- IN	++	mittelhoch	(+)	selten	++	mittelhoch
Ncl. medialis	++	hoch	(+)	selten	++	hoch
- IN	++	mittelhoch	(+)	selten	++	selten
Ventrale Ncl.	++	hoch	(+)	selten	+	hoch
- IN	++	mittelhoch	(+)	selten	+	selten
Ncl. centromedianus	(+)	mittelhoch	(+)	selten	+	hoch
- IN	+	mittelhoch	+	selten	++	selten
Ncl. reticularis	+	mittelhoch	(+)	selten	+	hoch

<b>Hypothalamus und angrenzende Strukturen</b>						
<b>Ncl. paraventricularis groß</b>	+	hoch	++	selten	+	hoch
<b>klein</b>	++	mittelhoch	+++	mittelhoch	++	mittelhoch
<b>Ncl. dorsomedialis groß</b>	+	mittelhoch	+	selten	++	hoch
<b>klein</b>	++	selten	+++	mittelhoch	++	mittelhoch
<b>Ncl. ventromedialis groß</b>	+	mittelhoch	++++	mittelhoch	++	hoch
<b>klein</b>	++	mittelhoch	++++	mittelhoch	++	mittelhoch
<b>Ncl. infundibularis groß</b>	++	hoch	+++	selten	++	hoch
<b>klein</b>	++	mittelhoch	+++	selten	++	mittelhoch
<b>Ncl. supraopticus groß</b>	+	hoch	(+)	mittelhoch	++	hoch
<b>klein</b>	+	mittelhoch	++	mittelhoch	+	mittelhoch
<b>Stria diagonalis Broca groß</b>	+	mittelhoch	+++++	selten	++	hoch
<b>klein</b>	+	mittelhoch	+++++	selten	++	hoch
<b>Corpus mammilare groß</b>	(+)	mittelhoch	++	selten	+	hoch
<b>klein</b>	+	selten	+++	selten	++	hoch
<b>Basalganglien</b>						
<b>Striatum mitt. N</b>	+	mittelhoch	+++	hoch	++	hoch
<b>Striatum kl. N</b>	++	mittelhoch	++++	hoch	+++	hoch
<b>Striatum gr. IN</b>	+	hoch	+	mittelhoch	+	hoch
<b>Globus pallidus IN</b>	+	hoch	+	mittelhoch	+	hoch
<b>Substantia Nigra pc</b>	+	hoch	+	hoch	+	hoch
<b>Ncl. subthalamicus</b>	++	hoch	+	mittelhoch	++	hoch
<b>Cerebellum</b>						
<b>Purkinje-Zellen</b>	++	hoch	+++	hoch	+	mittelhoch
<b>Sternzellen</b>	++	selten	+++	hoch	++	selten
<b>Korbzellen</b>	++	mittelhoch	+++	hoch	++	selten
<b>Körnerzellen</b>	+	hoch	++	hoch	+	mittelhoch
<b>Golgi-Zellen</b>	++	hoch	++++	hoch	+	selten
<b>Hirnstamm</b>						
<b>Periaquädukt. Grau lateral</b>	+	mittelhoch	(+)	selten	+	selten
<b>ventrolateral</b>	+	mittelhoch	(+)	selten	+	hoch
<b>Ncl. Olivaris</b>	+	hoch	++	hoch	(+)	mittelhoch
<b>Weißer Substanz</b>						
<b>Cortex</b>	(+)	-	0	-	+	-
<b>Cerebellum</b>	+	-	+	-	+	-

**Tab. 4.1:** Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression von NAPE-PLD, CB<sub>1</sub>, und FAAH mRNA, sowie der geschätzten relativen Häufigkeit jener Zellen, die das jeweilige Transkript ausbilden. Dabei entsprechen: 0 = nicht nachweisbar (< 0,5% der Zellfläche von Signal bedeckt), (+) = fraglich positiv (0,5% - 1%), + = schwach positiv (1,1% - 2,0%), ++ = mäßig positiv (2,1 - 4,0%), +++ = mittelstark positiv (4,1% - 8,0%), ++++ = stark positiv (8,1% - 16%), +++++ = sehr stark positiv (>16%). Bei der Häufigkeit entspricht: sehr selten = <5%, selten = 5% - 34%, mittelhoch = 35% - 64%, hoch = 65% - 95%, sehr hoch = >95%.

### 4.3 Immunhistochemie mit N-terminalen CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörpern

(Abb. 4.11 – 4.13)

#### *Prämotorischer Cortex*

Die Pyramidenzellen der Laminae II-VI, ebenso wie die sie umgebenden kleineren Neurone weisen mittelgradige Immunreaktivität auf, die über das gesamte Soma verteilt ist und sich bis in die Dendriten hinein erstreckt. Etwas geringer fällt die Färbung des Neuropils aus. Die schwächste Reaktion lässt sich an den Fasern und Zellen der Lamina I feststellen.

#### *Anteriorer cingulärer Cortex*

Bei makroskopischer wie mikroskopischer Betrachtung erscheint die Färbung des Gyrus cinguli intensiver als jene des angrenzenden prämotorischen Cortex. Diese Beobachtung trifft auf alle untersuchten Zelltypen wie auch das Neuropil zu. Die Präsenz des CB<sub>1</sub> Rezeptorproteins ist in dieser Region also generell erhöht und nicht auf einzelne Subpopulationen zurückzuführen.

#### *Hippocampus*

Die Pyramidenzellen von CA1-CA4 sind mittelgradig positiv für das CB<sub>1</sub>-Rezeptorprotein. Gleiches gilt für die meisten Zellen des Stratum multiforme, für die kleinen Neurone in CA1-CA4 und für das Neuropil. Die Zellen des Gyrus dentatus hingegen scheinen etwas schwächer auf den Antikörper zu reagieren. Hohe Immunreaktivität kann man in einigen großen Zellen des Stratum multiforme beobachten sowie in den langgezogenen Interneuronen des Stratum oriens.

#### *Amygdala*

Vor dem mäßig immunreaktiven Neuropil der basolateralen Amygdala heben sich vor allem die stark gefärbten mittelgroßen Neurone ab. Von mittlerer Intensität ist die Farbgebung bei den kleinen Neuronen und den pyramidenförmigen Zellen.

#### *Thalamus*

Vor allem im Nucleus mediodorsalis lässt sich das CB<sub>1</sub> Rezeptorprotein nachweisen. Große wie kleine Zellen erscheinen hier mittelstark gefärbt. Etwas geringer fällt die Immunreaktivität im Nucleus reticularis, den ventralen Kerngebieten und dem Nucleus centromedianus aus. Nur äußerst schwach färben sich die Zellen im Nucleus lateralis dorsalis.

#### *Basalganglien*

Die kleinen Neurone des Striatums heben sich mit ihrer mittelstarken Farbgebung deutlich vom Neuropil ab. Ebenfalls mittelgradig immunreaktiv erscheinen die großen Interneurone und die mittel-

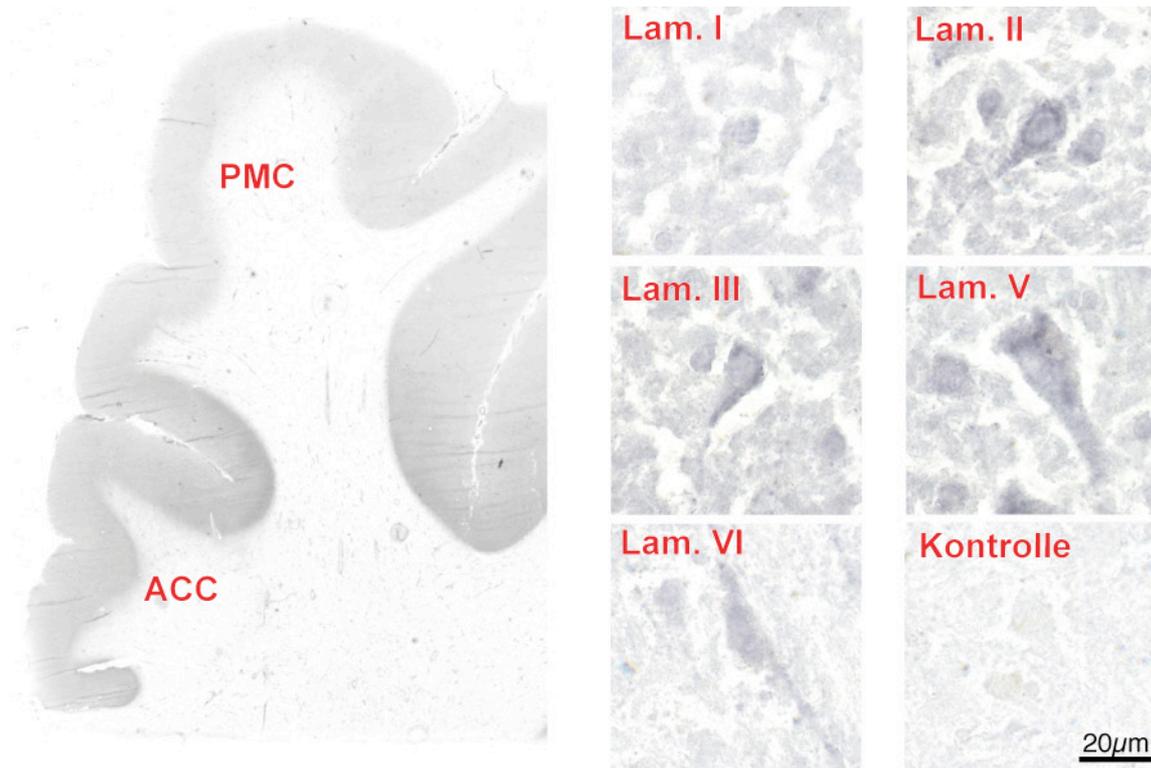
großen Zellen. Die wohl höchste Dichte von Rezeptorprotein in allen beschriebenen Hirnregionen ist den Neuronen des Globus pallidus zueigen. Auch die Pars compacta der Substantia nigra zeigt eine kräftige Färbung.

#### *Cerebellum*

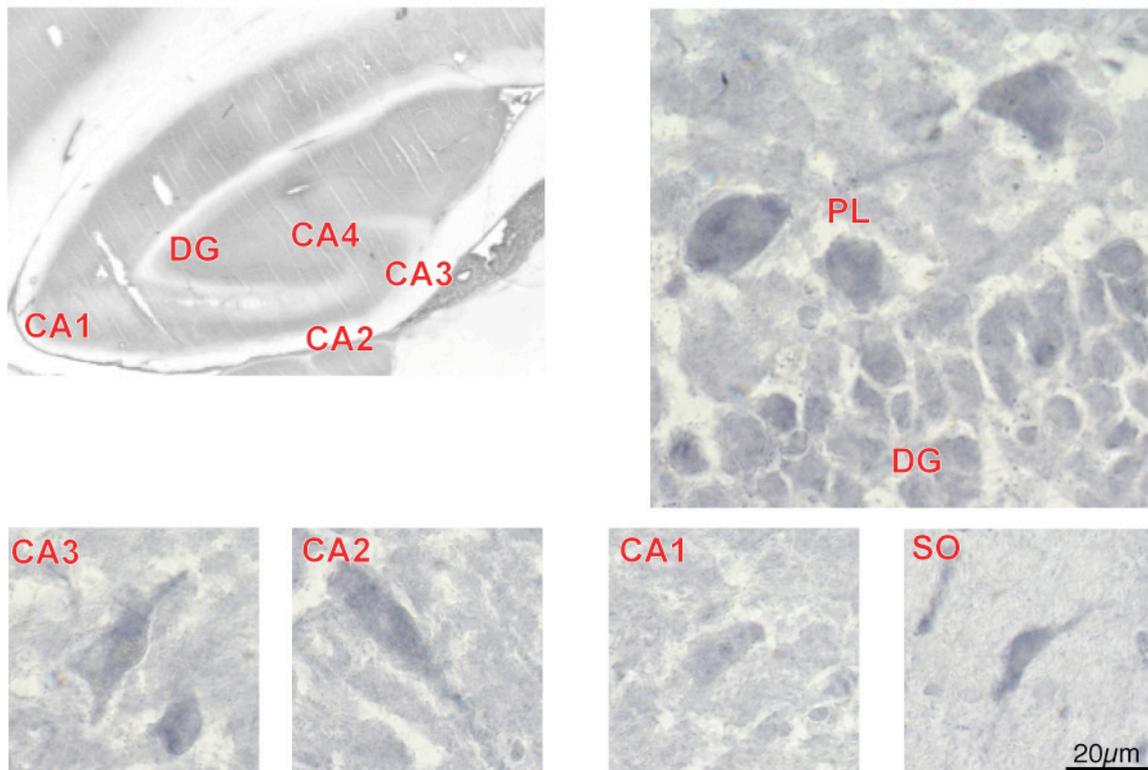
Hohe Immunreaktivität lässt sich in den Purkinje-Zellen beobachten, deren Somata und Fortsätze intensiv gefärbt erscheinen. In Korb-, Stern- und Körnerzellen liegt das Markierungsniveau im mittleren Bereich. Mäßig bis schwach reagieren die Golgi-Zellen.

#### *Hirnstamm*

Eine mittelstarke Färbung kann den Neuronen des Nucleus olivaris zugeordnet werden.

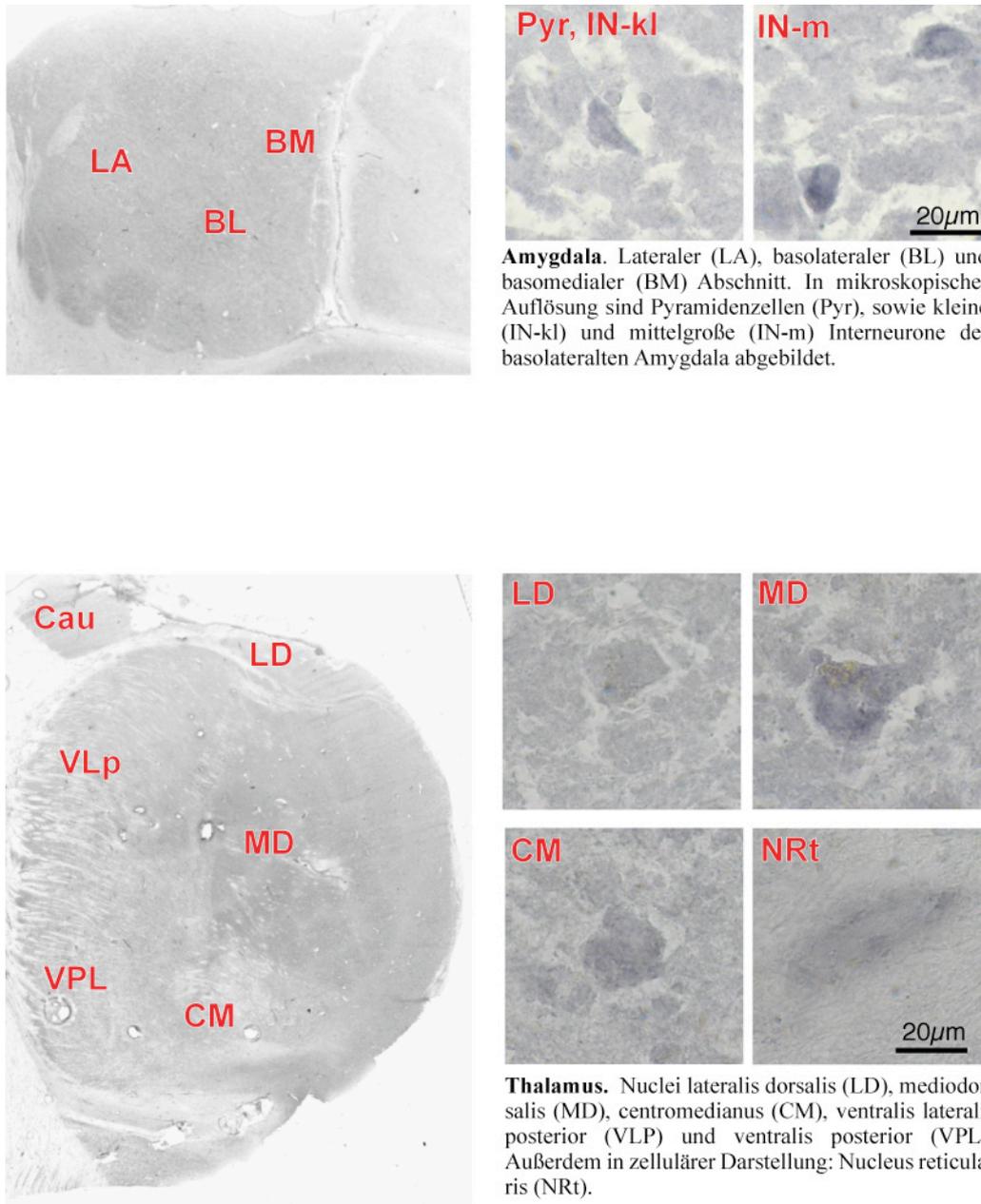


**Cortex.** CB<sub>1</sub> Immunreaktivität im prämotorischen (PMC=BA6) und anterioren cingulären Cortex (ACC). Die einzelnen Zellen auf den Abbildungen entstammen den Laminae 1-6 des PMC.



**Hippocampus.** Immunhistochemische Färbung im Gyrus dentatus (DG), dem Stratum radiatum (PL), dem Cornu Ammonis (CA1-4) und dem Stratum oriens.

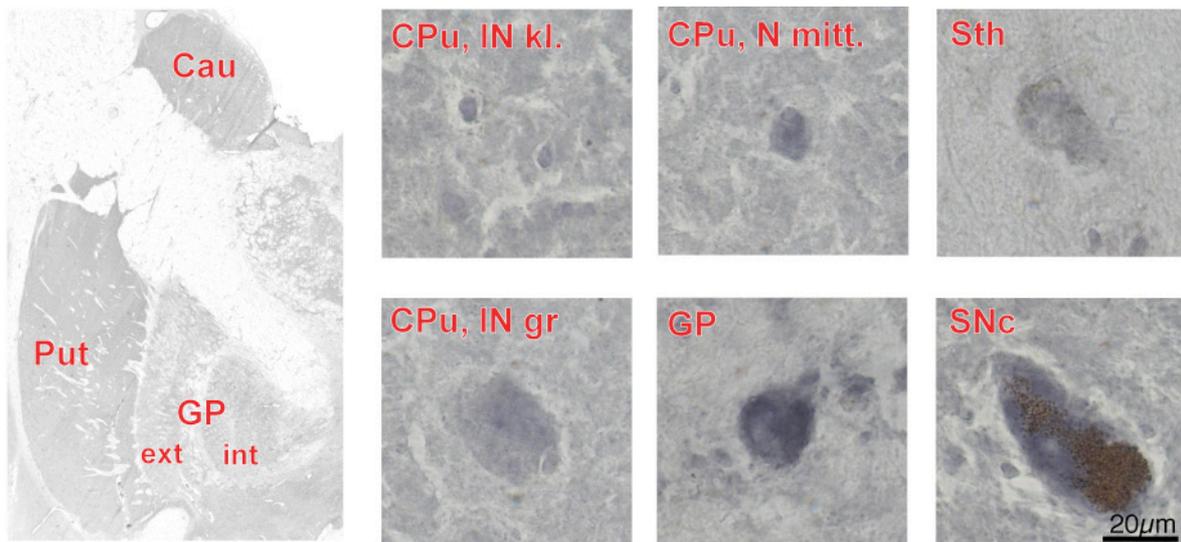
**Abb. 4.11** CB<sub>1</sub>-Immunreaktivität in Cortex und Hippocampus



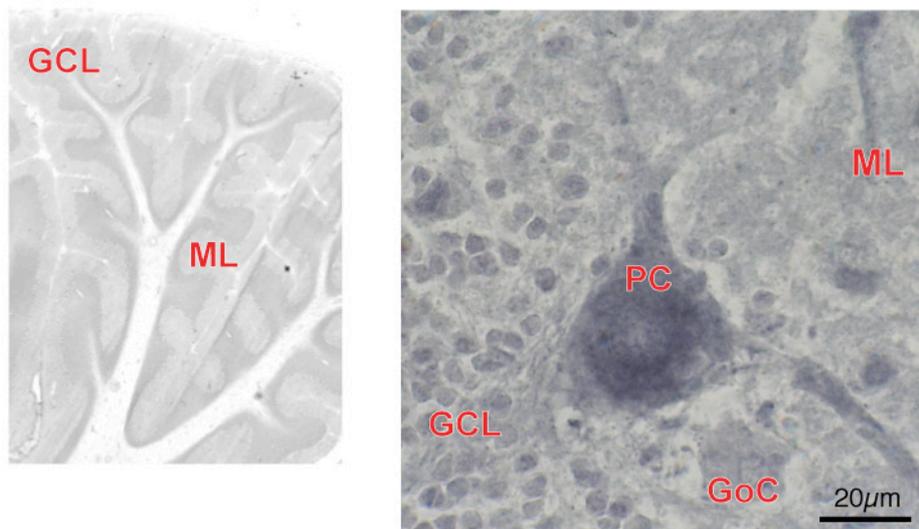
**Amygdala.** Lateraler (LA), basolateraler (BL) und basomedialer (BM) Abschnitt. In mikroskopischer Auflösung sind Pyramidenzellen (Pyr), sowie kleine (IN-kl) und mittelgroße (IN-m) Interneurone der basolateralen Amygdala abgebildet.

**Thalamus.** Nuclei lateralis dorsalis (LD), mediodorsalis (MD), centromedianus (CM), ventralis lateralis posterior (VLP) und ventralis posterior (VPL). Außerdem in zellulärer Darstellung: Nucleus reticularis (NRt).

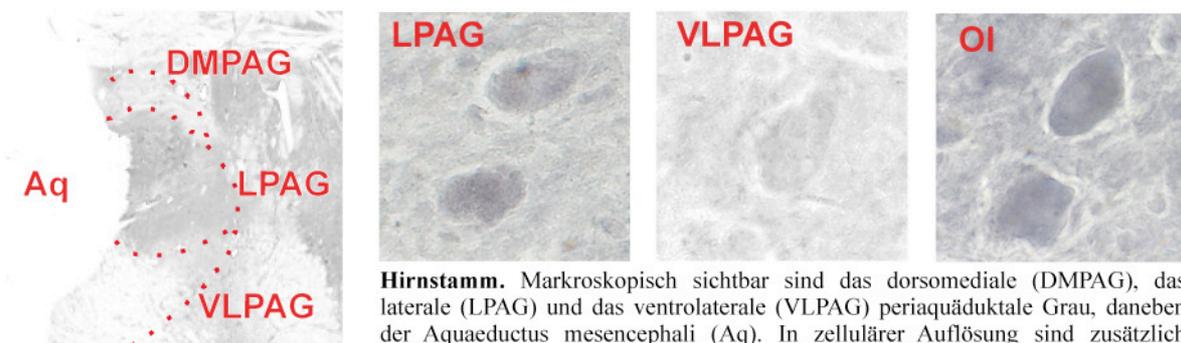
**Abb. 4.12** CB<sub>1</sub>-Immunreaktivität in Amygdala und Thalamus



**Basalganglien.** In der Übersicht sind Nucleus caudatus (Cau), Putamen (Put) und Globus pallidus (GP) dargestellt. Auf zellulärer Ebene wird im Striatum (Caudate putamen = CPu) zwischen den mittelgroßen Neuronen und den kleinen (IN kl) und großen (IN gr) Interneuronen unterschieden. Weiterhin abgebildet: Nucleus subthalamicus (Sth) und Substantia nigra, pars compacta (SNc).



**Cerebellum.** Abgebildet sind Purkinje-Zellen (PC), Golgi-Zellen (GoC), die Körnerzellschicht (GCL) sowie die Zellen des Stratum moleculare (ML).



**Hirnstamm.** Markroskopisch sichtbar sind das dorsomediale (DMPAG), das laterale (LPAG) und das ventrolaterale (VLPAG) periaquäduktale Grau, daneben der Aquaeductus mesencephali (Aq). In zellulärer Auflösung sind zusätzlich Neurone des Nucleus olivaris (OI) abgebildet.

**Abb. 4.13** CB<sub>1</sub>-Immunreaktivität in Basalganglien, Cerebellum und Hirnstamm

## 5 Diskussion

### 5.1 Splice-Varianten des CB<sub>1</sub>-Rezeptors im menschlichen Gehirn

Mehrere Splice-Varianten des CB<sub>1</sub>-Rezeptors konnten bislang geklont werden (Ryberg et al., 2005; Shire et al., 1995; Zhang et al., 2004). Zwei davon (CB<sub>1A</sub> und CB<sub>1B</sub>) liegen in den codierenden DNA-Abschnitten. Ryberg et al. spürten dabei nur äußerst geringe Mengen dieser beiden Unterformen im menschlichen Gehirn auf, während Shire et al. für den CB<sub>1A</sub>-Rezeptor Anteile von bis zu 20% in manchen Hirnregionen (z.B. dem Hippocampus) beschreiben. Da es sich bei den von Shire untersuchten Proben allerdings um Material aus cDNA-Bibliotheken handelt, das vornehmlich Kleinkindern entstammt, bleibt offen, ob die Ergebnisse auf den Erwachsenen übertragbar sind.

In der von uns durchgeführten RT-PCR ließen die beiden Splice-Varianten sich in keiner der untersuchten Hirnregionen nachweisen. Darüber hinaus lag eine *in situ* Hybridisierung, in der ein CB<sub>1A</sub> spezifisches Oligonukleotid verwendet wurde, in allen Hirnarealen im niedrigen Bereich des unspezifischen Hintergrundsignals.

In keiner der von uns untersuchten Hirnregionen ergibt sich also ein Hinweis auf eine relevante Expression der Splice-Varianten CB<sub>1A</sub> und CB<sub>1B</sub>.

### 5.2 Signalwege von Anandamid: Funktion und Expression von NAPE-PLD, CB<sub>1</sub> und FAAH

CB<sub>1</sub>-Rezeptoren sind an der Präsynapse lokalisiert und bewirken dort eine Hemmung der Transmitterausschüttung (Freund et al., 2003; Vaughan und Christie, 2005). Anzeichen für eine postsynaptische Expression gibt es nicht. Deswegen wird in vorliegender Arbeit davon ausgegangen, dass jene Zellen, die in der *in situ* Hybridisierung positiv für CB<sub>1</sub> mRNA sind, das Rezeptorprotein an ihren Axonterminalen ausbilden. Somit ist stets die Projektion der signaltragenden Neurone zu beachten.

Für die NAPE-PLD gilt hingegen, dass sie Anandamid im Bereich der Postsynapse „on demand“ synthetisiert. Analysen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation konnten das Enzym vor allem im Bereich der mikrosomalen und mitochondrialen Fraktion nachweisen (Morishita et al., 2005). NAPE-PLD mRNA exprimierende Neurone werden aus diesem Grund in unseren Überlegungen zu lokalen Regelkreisen als Zellen angesehen, die im somatodendritischen Teil ihrer Synapsen wahrscheinlich Anandamid als retrograden Transmitter verwenden.

Ebenfalls im somatodendritischen Bereich arbeitet das Anandamid abbauende Enzym FAAH. Es ist vor allem gebunden an die Membranen des glatten endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien, findet sich allerdings auch an der Innenseite der Zellmembran (Gulyas et al., 2004).

Die Position der Proteine von FAAH und NAPE-PLD innerhalb der Zelle ist also räumlich relativ eng assoziiert mit der Lokalisation der Rezeptor RNA. Beim CB<sub>1</sub> Rezeptor ist dies anders. Um aber dennoch eine Vorstellung von den lokalen Beziehungen zwischen Synthese, Wirkung und Abbau von

Anandamid zu gewinnen, wurde zusätzlich noch eine immunhistochemische Darstellung von CB<sub>1</sub> durchgeführt und den Autoradiographien der in situ Hybridisierung gegenübergestellt.

Hinsichtlich der Menge an aufgespürter mRNA gehen wir davon aus, dass diese zur Menge des jeweiligen Rezeptorproteins in etwa proportional ist. Zellen, die ein starkes Hybridisierungssignal tragen, bewerten wir also dergestalt, dass ihr Niveau an produziertem Protein ebenfalls eher im hohen Bereich liegt.

### **5.2.1 Neocortex**

Jedes der drei von uns untersuchten Oligonukleotide zeigte in den Zellen des Neokortex deutliche Hybridisierungssignale. Sowohl für NAPE-PLD als auch für CB<sub>1</sub> und FAAH gehörten einige der hier gemessenen Werte zu den höchsten in allen untersuchten Hirnregionen.

Betrachtet man sich die Signalausbreitung im Cortex in einem stark vereinfachten Modell, so sind es vor allem die Pyramidenzellen der Lamina IV, die die Eingangsstation für die vornehmlich dem Thalamus entstammenden Afferenzen bilden. Anschließend erfolgt eine Weiterleitung über die Pyramiden der Laminae II und III auf die großen Pyramidenzellen der Lamina V, die in die subcortikalen Kerngebiete weiterprojizieren und somit das wichtigste Integrations- und Projektionszentrum des Neocortex darstellen. Daneben existieren Myriaden von intracortikalen Quervernetzungen, die mit zahlreichen anderen Hirnarealen der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre in Verbindung stehen. Etwa 15% der corticalen Nervenzellen sind der äußerst heterogenen Gruppe der Interneurone zuzuordnen, die die pyramidalen Netzwerke auf verschiedensten Ebenen inhibitorisch modulieren. Ihr typischer Neurotransmitter ist GABA.

Im prämotorischen Cortex (BA 6) ergaben unsere Versuche bei den Pyramidenzellen der Schichten II, III und V mäßige Expressionswerte für NAPE-PLD mRNA. Schwach ist das Signal bei den Prinzipalneuronen der Lamina VI. CB<sub>1</sub> mRNA hingegen wird in den Pyramiden der Laminae III und V schwach exprimiert. Ein wenig stärker ist die Hybridisierungsrate in den Laminae II und VI. Auch bei der Immunhistochemie imponieren die Pyramiden aller Schichten mäßig gefärbt. Ein mittelstarkes Expressionsniveau lässt sich bei den Lamina II-Pyramiden für FAAH mRNA verzeichnen. Die Prinzipalneurone der übrigen Schichten zeigen eine mäßige Signalintensität.

Bei den Interneuronen konnten in den Laminae II, II und V mittelstarke Messwerte für NAPE-PLD mRNA verzeichnet werden. Im mäßigen Bereich liegt das Signal in Lamina VI, sowie bei den mittelgroßen Zellen der Lamina II und den Neuronen in Lamina I. Für die CB<sub>1</sub> Rezeptor mRNA gibt es in mehreren Laminae unter morphologisch gleichen Interneuronen zwei deutlich verschiedene Expressionsmuster. In Lamina I ist die eine Gruppe mäßig markiert, die andere hingegen sehr stark. Lamina V und Lamina VI weisen sowohl Populationen mit mittelstarkem als auch mit solche sehr

starkem Signal auf. Daneben ließen sich bei den Interneuronen der Laminae II und III starke Messwerte erzielen. Sehr stark wiederum war das Hybridisierungsniveau in den mittelgroßen Zellen der Lamina II. Ebenso fanden sich in der Immunhistochemie in allen Schichten Interneurone, die sich in etwa mittelstark anfärben ließen. Das Expressionsmuster der FAAH mRNA liegt in allen Schichten im mäßigen Bereich. Nur die großen und kleinen Zellen der Lamina II sowie die Interneurone der Lamina VI tragen mittelstarkes Signal.

Somit lässt sich bei allen Oligonukleotiden eine leichte Betonung der Pyramidenzellen und Interneurone in Lamina II ausmachen.

Vergleicht man diese Daten nun mit dem cingulären Cortex, so lässt sich beobachten, dass die Signalgebung bei NAPE-PLD und FAAH sowohl bei Prinzipal- als auch bei Interneuronen niedriger ausfällt. Auch größere Unterschiede zwischen den einzelnen Laminae sind kaum noch erkennbar. Möglicherweise ist dies ein Zeichen für eine geringere Ausschüttung von Anandamid in dieser Region. Beim CB<sub>1</sub>-Oligonukleotid sind die Unterschiede nicht so markant, jedoch ergibt sich bei den Pyramidenzellen der Lamina V ein fast doppelt so hoher Wert im Cingulum wie im prämotorischen Cortex. Dies könnte darauf hindeuten, dass der CB<sub>1</sub> Rezeptor eine größere Bedeutung in den Projektionsarealen des Cingulums besitzt als in jenen des PMC.

In der Immunhistochemie präsentiert sich der Gyrus cinguli etwas stärker gefärbt also der PMC. Eine ähnliche Beobachtung machte bereits Glass bei einem Ligandenbinding im menschlichen Gehirn. In seinen Versuchen lag die Rezeptordichte im Gyrus cinguli mehr als doppelt so hoch wie im prämotorischen Cortex (Glass et al., 1997). Auch eine immunhistochemische Studie an Primaten wies im Cingulum ein höheres Niveau an CB<sub>1</sub> Protein nach als in der BA6-Region (Eggan und Lewis, 2006). Somit ist es insgesamt gesehen denkbar, dass das Cingulum zwar mehr Rezeptoren besitzt als der PMC, gleichzeitig jedoch weniger Anandamid umsetzt.

Auf synaptischer Ebene haben bisherige Publikationen einen Einfluss der Endocannabinoidsystems vor allem bei zwei Neuronentypen festgestellt. Sowohl die Pyramidenzellen der Laminae II und III als auch jene der Lamina V unterliegen verschiedenen cannabinoidergen Regulationsmechanismen.

So zeigt sich an den Pyramidenzellen der Laminae II und III bei Depolarisation der postsynaptischen Membran eine Abschwächung der inhibitorischen Einflüsse und somit eine Verstärkung der pyramidalen Erregung (Bodor et al., 2005; Fortin et al., 2004; Trettel et al., 2004). Dieses Phänomen, das stark an die DSI im Hippocampus (s.u.) erinnert, wird vermittelt durch präsynaptisch platzierte CB<sub>1</sub> Rezeptoren, die die Transmitterausschüttung bei einer Subpopulation GABAerger Interneurone hemmen, welche gleichzeitig Cholecystokinin koexprimieren (Marsicano und Lutz, 1999). Von diesen Interneuronen weiß man, dass sie mit ihren Axonen an Soma und proximalem Dendrit der Pyramidenzellen ansetzen und damit erheblichen Einfluss auf die Integrationsprozesse cortikaler Netzwerke ausüben (Fortin et al., 2004; Trettel und Levine, 2002).

Die hohe Präsenz an CB<sub>1</sub> Transkript, die wir in unseren Versuchen bei den Interneuronen der Laminae II und III ermitteln konnten, lässt vermuten, dass das Phänomen der kortikalen DSI auch beim Menschen vorkommt. Ebenso wie bei den Nagetieren bildet auch hier nur eine bestimmte Fraktion der Zellen die Rezeptor-mRNA aus. Nach unseren Schätzungen sind dies etwa ein Viertel aller Interneurone. Da auch die Interneurone in den übrigen Laminae reichlich Signal tragen, sind dort ebenfalls Einflüsse des Endocannabinoidsystems anzunehmen. Allerdings dürfte dies auf andere Weise geschehen als in Lamina II/III, denn zumindest an den Pyramidenzellen von Lamina V konnte keine bzw. nur marginale DSI nachgewiesen werden (Bodor et al., 2005; Fortin und Levine, 2006). Möglicherweise unterliegen diese Interneurone aber auch dem erst einmalig beschriebenen Phänomen der Autoinhibition (Bacci et al., 2004).

Zwei andere Formen synaptischer Plastizität hat man an den Pyramidenzellen der Lamina V identifizieren können. Beide betreffen die glutamatergen Synapsen. Zum einen handelt es sich um eine Cannabinoid vermittelte Langzeitunterdrückung (LTD) von EPSPs (Sjostrom et al., 2003; Sjostrom et al., 2004), zum anderen um die kürzer andauernde depolarization induced suppression of excitation (DSE) (Auclair et al., 2000; Fortin und Levine, 2006). Postsynaptische Freisetzung von Endocannabinoiden sorgt in beiden Fällen für eine Hemmung der Glutamatausschüttung an der Präsynapse. Davon betroffen sind allerdings nur Verbindungen zwischen Pyramidenzellen innerhalb der Lamina V. Pyramidale Afferenzen aus den Laminae II und III sind nicht cannabinoidempfindlich. Somit regulieren die Cannabinoide auch hier nur bei einer bestimmten neuronalen Untergruppe die synaptische Transmission. Bei unseren Experimenten ließen sich CB<sub>1</sub> mRNA exprimierende Prinzipalneurone in allen Schichten detektieren. Dabei sind insgesamt etwas mehr als die Hälfte aller Pyramidenzellen positiv für den Rezeptor. Die Beeinflussung der glutamatergen Signalgebung durch das ECS könnte damit im humanen Neocortex deutlich weit reichender sein als bisher bekannt. Weiterhin bleibt zu klären, ob die vornehmlich im somatosensorischen Cortex von Ratte und Maus gewonnenen elektrophysiologischen Daten auf den Menschen übertragbar sind, und ob im von uns untersuchten prämotorischen und cingulären Cortex nicht völlig andere Mechanismen vorherrschend sind.

Wenig ist bisher über die Identität der Endocannabinoiden bekannt, die im Neocortex aktiv sind. Sowohl Anandamid als auch 2-AG konnten zwar im Cortex nachgewiesen werden (Stella und Piomelli, 2001), eine Zuordnung zu bestimmten Synapsen existiert jedoch noch nicht. Wir fanden in unserer in situ Hybridisierung in allen Zelltypen ein mäßiges bis mittelstarkes Expressionsniveau von NAPE-PLD und FAAH. Unter den Pyramidenzellen lag dabei der Anteil der positiven Neurone über 50%, bei den Interneuronen deutlich darunter. Somit exprimieren vor allem die Prinzipalneurone die Enzyme des Anandamid-Stoffwechsels, was eine Beteiligung dieses Endocannabinoids an einer Inhibition ihrer somatodendritischen Synapsen nahelegt.

Unsere Ergebnisse bekräftigen also die große Bedeutung, die dem Endocannabinoidsystem in neocortikalen Regionen zugeschrieben wird. In jedem untersuchten Neuronentyp existieren dabei die enzymatischen Voraussetzungen für die Ausschüttung von Anandamid.

### **5.2.2 Hippocampale Formation**

Während wir die mRNA von NAPE-PLD und FAAH im gesamten Hippocampus nur schwach exprimiert finden, ist das Transkript von CB<sub>1</sub> in dieser Region reich vertreten. Dabei sind nicht nur Interneurone CB<sub>1</sub> positiv, sondern auch Pyramidenzellen, womit jüngere Publikationen untermauert werden, die eine modulierende Funktion des CB<sub>1</sub> Rezeptors auch an glutamatergen Synapsen beschreiben.

Es waren die inhibitorischen Synapsen des Hippocampus, an denen im Jahre 2001 erstmals nachgewiesen wurde, dass das Phänomen der DSI durch retrograd wirkende Endocannabinoide vermittelt wird (Ohno-Shosaku et al., 2001; Wilson und Nicoll, 2001). Versuche mit Knockout-Mäusen bestätigten in der Folge, dass es sich bei dem verantwortlichen Rezeptor um CB<sub>1</sub> handelt, der präsynaptisch an den Axonterminalen GABAerger Interneurone lokalisiert ist (Wilson et al., 2001). Die Interneurone gehören jener Subgruppe an, die Cholezystokinin, nicht aber Parvalbumin koexprimiert (Katona et al., 1999; Marsicano und Lutz, 1999).

Bei den exzitatorischen, glutamatergen Synapsen des Hippocampus ließ sich zwar ebenfalls eine cannabinoiderge Inhibierung der synaptischen Aktivität feststellen, allerdings schien diese Hemmung in CB<sub>1</sub> Knockout-Mäusen zu persistieren (Hajos et al., 2001). So ging man zunächst davon aus, dass die hippocampalen Prinzipalneurone an ihren Synapsen einen bislang unbekanntes Cannabinoidrezeptor exprimieren würden. Folgeexperimente konnten jedoch die von Hajos gemachten Beobachtungen nicht bestätigen. Vielmehr zeigte sich bald, dass auch die DSE über CB<sub>1</sub> Rezeptoren vermittelt wird, wenn auch deren Dichte an der exzitatorischen Präsynapse deutlich geringer ist als an der inhibitorischen (Kawamura et al., 2006; Takahashi und Castillo, 2006).

In der Frage, welches Endocannabinoid im Hippocampus als Transmitter an kurz- und langfristiger synaptischer Plastizität beteiligt ist, wird fast einmütig das 2-AG favorisiert. Vor allem DSE und LTD lassen wenig Raum für Zweifel daran, dass sie durch 2-AG vermittelt werden. Denn beiden Phänomenen liegt eine Stimulation postsynaptischer metabotroper Glutamatrezeptoren zugrunde, die über eine Aktivierung der PLC und der DGL die Synthese von 2-AG veranlassen (Chevaleyre et al., 2006; Jung et al., 2005). Außerdem haben verschiedene neurophysiologische und -anatomische Versuchsansätze zu DSE und LTD Daten hervorgebracht, die deutlich für 2-AG und gegen Anandamid sprechen (Chevaleyre und Castillo, 2003; Katona et al., 2006; Stella et al., 1997; Straiker und Mackie, 2005).

Schwerer einzuschätzen ist die Situation bei der DSI. Hier wird die Bedeutung von 2-AG stark in Frage gestellt, denn die DSI persistiert sowohl in PLC-Knockout Mäusen (Hashimoto et al., 2005) als auch bei Hemmung der PLC und der DGL (Chevaleyre und Castillo, 2003; Edwards et al., 2006).

Darüber hinaus konnte die DGL an inhibitorischen Synapsen – im Gegensatz zu den exzitatorischen – immunhistochemisch nicht aufgespürt werden (Katona et al., 2006). Lediglich Makara et al. registrierten eine Verstärkung der DSI durch Hemmung der 2-AG abbauenden Monoacylglycerol Lipase (Makara et al., 2005).

So stellen sich derzeit vor allem folgende Fragen: Wie sind die genauen Triggermechanismen für die Endocannabinoidsynthese im Hippocampus? Ist bei der DSI das 2-AG ohne Bedeutung oder wird es lediglich über einen alternativen Syntheseweg hergestellt? Gibt es im Hippocampus neben dem 2-AG noch andere Endocannabinoide, die an der synaptischen Plastizität beteiligt sind? Welche Rolle spielt Anandamid?

Von allen hippocampalen Neuronen sind die Pyramidenzellen der CA1-Region mit Abstand die bestuntersuchten. Ein Großteil der Erkenntnisse über DSI, DSE, LTP und LTD wurden an ihren somatodendritischen Synapsen gewonnen. Die vorliegende Arbeit befasst sich aber darüber hinaus auch noch mit zahlreichen anderen Zellen aus allen wichtigen Bereichen der hippocampalen Signalverarbeitung.

Verfolgt man den Projektionsweg der glutamatergen Prinzipalneurone, so breitet sich das Signal ausgehend von den Körnerzellen des Gyrus dentatus über die so genannten Moosfasern auf die Pyramiden von CA3 aus, die ihrerseits über die Schaffer-Kollateralen auf die Pyramiden von CA1 projizieren. Die Weiterleitung erfolgt dann hauptsächlich ins Subiculum. Wenig bekannt ist über die Funktion der CA2-Pyramidenzellen. Sie empfangen Afferenzen vor allem aus CA3 und stehen efferent mit CA1 und dem Stratum multiforme in Verbindung. Was CA4 betrifft, so wird dieser Abschnitt von den meisten Autoren nicht mehr von CA3 unterschieden. Dennoch haben wir diese Regionen zur besseren Differenzierung getrennt untersucht.

NAPE-PLD mRNA wird in unseren Versuchen von allen Prinzipalneuronen ausgebildet. Das Expressionsniveau liegt dabei durchweg im schwachen Bereich, wobei die niedrigsten Werte für CA3 gemessen wurden.

Ebenso bilden alle Typen von Prinzipalneuronen CB<sub>1</sub> mRNA aus. In der Körnerzellschicht liegt das Hybridisierungssignal im schwachen Bereich, ein mäßiges Niveau lässt sich in CA4/CA3 beobachten, und mittelstark markiert erscheinen die Pyramiden von CA2 und CA1. Auch das Rezeptorprotein lässt sich in all diesen Zellen immunhistochemisch nachweisen. Dabei präsentiert die Körnerzellschicht eine schwache Färbung, während die Pyramiden des Ammonshorns mittelstarke Immunreaktivität zeigen, ohne dass eine bestimmte CA-Region dabei besonders betont wäre.

Beim FAAH Oligonukleotid sind die Prinzipalneurone schwach positiv mit geringster Ausprägung in CA3. Die hohen Expressionswerte der FAAH, die frühere Publikationen im Rattengewebe fanden (Desarnaud et al., 1995; Hillard et al., 1995; Thomas et al., 1997), konnten wir beim Menschen nicht nachvollziehen.

Was die Interneurone des Hippocampus betrifft, so sind diese fast ausschließlich inhibitorisch-GABAerg. Ihre Verschaltung ist komplex und greift sowohl auf dendritischer als auch auf axonaler Ebene in die Erregungsleitung der Prinzipalneurone ein. Die meisten Interneurone koexprimieren neuroaktive Peptide wie CCK oder Parvalbumin. Wie oben bereits erwähnt sind es die CCK positiven Interneurone, die den CB<sub>1</sub> Rezeptor ausbilden .

In unseren Experimenten weisen alle Typen von Interneuronen ein schwaches Hybridisierungsniveau für NAPE-PLD mRNA auf. Beim CB<sub>1</sub> Oligonukleotid hingegen kristallisierten sich unter den Interneuronen der CA-Region zwei Gruppen heraus. Die eine Gruppe exprimiert CB<sub>1</sub> mRNA auf mäßigem Niveau und stellt gut die Hälfte aller Interneurone des Cornu Ammonis, was in der Größenordnung in etwa dem Anteil CCK positiver Zellen entspricht (Marsicano und Lutz, 1999). Die andere Gruppe weist eine massive Signalintensität auf, kommt aber nur sporadisch vor. Gleiches gilt für die Interneurone im Stratum oriens. Auch hier existieren ein mäßig signaltragender Subtyp und einer mit sehr starker Markierung. Beide Gruppen sind in etwa paritätisch vertreten und stellen gut zwei Drittel aller Neurone im Stratum oriens. Starkes Signal konnte auch über zahlreichen Zellen des Stratum multiforme gemessen werden. Die Morphe dieser Neurone war allerdings zu heterogen, als dass man sie hätte subklassifizieren können.

Fast identische Messwerte wie bei der NAPE-PLD lieferten Interneurone bei der FAAH. Doch trotz der niedrigen Expression von FAAH mRNA liegen die gewonnenen Daten dennoch klar im positiven Bereich und stehen damit im Widerspruch mit vorangegangenen immunhistochemischen Studien, in denen in hippocampalen Interneuronen keine FAAH nachgewiesen werden konnte (Gulyas et al., 2004; Tsou et al., 1998b). Jedoch hatten zuvor bereits Thomas et al. interneuronale FAAH mRNA bei der Ratte detektiert (Thomas et al., 1997). Es bleibt nun zu klären, ob diese Diskrepanz einer posttranskriptionalen Regulation der FAAH-Expression zuzuschreiben ist oder einer mangelnden Sensitivität der verwendeten Antikörper.

In der Zusammenschau bestätigen unsere Ergebnisse an humanem Gewebe, was bisher vornehmlich an Nagetieren beobachtet werden konnte: Prinzipalneurone der hippocampalen Formation exprimieren CB<sub>1</sub> Rezeptoren, die somit wohl auch beim Menschen Vermittler der DSE sind. Vor allem gilt dies für die glutamatergen Synapsen, die die Moosfasern mit den Pyramiden von CA3 ausbilden und für jene der Schaffer-Kollateralen mit den Pyramiden von CA1. Die Präsenz von CB<sub>1</sub> mRNA in den CA1-Prinzipalneuronen macht darüber hinaus auch eine cannabinoide Transmission in den Synapsen des Subiculum und des frontalen Cortex wahrscheinlich.

In gleichem Maße sind unsere Beobachtungen mit den elektrophysiologischen Studien an Ratten- und Mausgewebe vereinbar, in denen die Vermittlung von DSI und LTD CB<sub>1</sub> Rezeptoren zugeschrieben wird, die an den Axonterminalen von Interneuronen lokalisiert sind. Ob den vereinzelt, auffällig stark markierten Interneuronen in Cornu Ammonis, Stratum oriens und Stratum multiforme dabei eine besondere Aufgabe zukommt, lässt sich aus den bisherigen Veröffentlichungen nicht ableiten.

In der Diskussion, welches Endocannabinoid an welchen Synapsen als Botenstoff dient, ergibt sich aus unseren Experimenten, dass eine Beteiligung von Anandamid keineswegs ausgeschlossen werden kann. Zwar liegt das Hybridisierungsniveau für NAPE-PLD und FAAH einheitlich im schwachen Bereich, dennoch bedeutet dies eine Präsenz der mRNA beider Enzyme in den Neuronen aller für DSI, DSE und LTD relevanten Synapsen. Man beachte in diesem Zusammenhang, dass in den Untersuchungen von Felder et al. die höchste Anandamid-Konzentration im gesamten menschlichen Gehirn im Hippocampus gemessen wurde (Felder et al., 1996).

Somit ist es durchaus denkbar, dass Anandamid und 2-AG parallel ausgeschüttet werden, sei es nun durch einen gemeinsamen Triggermechanismus oder durch unterschiedliche Auslöser. Im Vergleich zu anderen Hirnregionen jedoch scheint die lokale Expression von NAPE-PLD und FAAH eher gering zu sein.

### **5.2.3 Amygdala**

Fast signalfrei erscheint die basolaterale Amygdala in der *in situ* Hybridisierung mit dem NAPE-PLD Oligonukleotid. Für die CB<sub>1</sub> mRNA hingegen konnten wir in dieser Region Werte messen, die zu den höchsten im ganzen ZNS zählen. Besonders die Interneurone taten sich hierbei hervor. Das Expressionsniveau von FAAH liegt im niedrigen bis mäßigen Bereich, so dass in diesem Kerngebiet eine auffällige Dissoziation zwischen Synthese und Abbau von Anandamid besteht.

Die Zellen der basolateralen Amygdala befinden sich in intensiver Kommunikation mit zahlreichen Hirnarealen. Afferenzen empfangen sie vor allem aus neocortikalen und thalamischen Gebieten, ihre Efferenzen verlaufen hauptsächlich in den Nucleus centralis, den wichtigsten Ausgangskern der Amygdala, aber auch zum Hippocampus, ins Striatum oder zum Nucleus accumbens. Innerhalb des limbischen Systems wird der Amygdala eine gewichtige Bedeutung zugeschrieben. Ihre Aufgaben liegen unter anderem in der Gedächtnisfixierung emotionalen Verhaltens, der Konditionierung von Angst- und Wutreaktionen (Rogan et al., 1997) sowie einer Mitbeteiligung bei der Schmerzverarbeitung (Gauriau und Bernard, 2002).

Für das Endocannabinoidsystem konnte in dieser Region aufgezeigt werden, dass es für die Auslöschung aversiver Gedächtnisinhalte unerlässlich ist (Marsicano et al., 2002). Präsynaptische CB<sub>1</sub> Rezeptoren vermitteln dabei eine Hemmung der Transmitterausschüttung sowohl an den GABAergen als auch an den glutamatergen Afferenzen der Pyramidenzellen (Azad et al., 2003; Azad et al., 2004; Domenici et al., 2006). Bezüglich des verantwortlichen Endocannabinoids geht man von einer Dominanz von Anandamid gegenüber 2-AG aus, da eine Ausschaltung der FAAH die cannabinoidergen Effekte in der Amygdala deutlich verstärkte, während das Fehlen von DAG keine signifikanten Auswirkungen hatte (Azad et al., 2004).

Diese Beobachtung steht in klarem Kontrast zu unseren Ergebnissen, nach denen NAPE-PLD mRNA lediglich von einer verschwindend kleinen Gruppe von Pyramidenzellen und Interneuronen exprimiert wird. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz sind postnatale Kompensationsmechanismen bei den von Azad et al. verwendeten FAAH Knockoutmäusen; weiterhin könnte es aber auch sein, dass die Anandamid-Synthese in dieser Region durch ein anderes Enzym vollzogen wird als NAPE-PLD. Auch eventuelle Speziesdifferenzen sind nicht auszuschließen.

In guter Übereinstimmung hingegen mit vorangegangenen Studien an der Ratte stehen unsere Messwerte für die Expression von CB<sub>1</sub> mRNA. Die in elektrophysiologischen Experimenten festgestellte cannabinoide Hemmung inhibitorischer Potenziale in der BLA (Marsicano et al., 2002) findet bei uns ihre Entsprechung in der überaus starken Signalgebung kleiner und mittelgroßer Interneurone. Doppelfärbungen an der Ratte legen nahe, dass es sich dabei zum weit überwiegenden Teil um CCK-koexprimierende GABAerge Interneurone handelt (Katona et al., 2001).

Ein deutlich geringeres Signal konnten wir in den Pyramidenzellen aufspüren. Die Expression liegt hier im mäßigen Bereich. Dennoch deutet dies klar darauf hin, dass diese Neurone den Rezeptor an ihren Axonterminalen ausbilden. Allerdings dürfte es sich dabei nicht um jene Fraktion der Pyramidenzellen handeln, die in den Nucleus centralis projizieren, denn dieser Kern hat sich als immunnegativ für das Rezeptorprotein erwiesen (Katona et al., 2001).

Die Expression von FAAH-mRNA zeigt ein einheitliches Verteilungsmuster. Alle Neuronentypen der BLA sind positiv für das Enzym. Die Pyramidenzellen und mittelgroßen Interneurone liegen dabei auf niedrigem, die kleinen Interneurone auf mäßigem Signalniveau. Angesichts der annähernden Abwesenheit der NAPE-PLD, stellt sich die Frage, ob die FAAH in der Amygdala möglicherweise eine andere Aufgabe hat als den Abbau von Anandamid. Immerhin besitzt die FAAH neben dem AEA noch eine ganze Reihe von weiteren Substraten.

Zusammenfassend unterstreichen unsere Versuche im Wesentlichen die am Tiermodell gemachten Beobachtungen. CB<sub>1</sub> Rezeptoren werden in der BLA reichlich exprimiert und könnten somit auch bei Menschen für physiologische Prozesse wie die Auslöschung aversiver Erinnerungen mitverantwortlich sein. Dass allerdings Anandamid dabei – wie von Azad (2004) postuliert – als retrograder Botenstoff wirkt, ist in Anbetracht der nur minimalen Expression von NAPE-PLD, die sich in unseren Versuchen gezeigt hat, wenig wahrscheinlich.

#### **5.2.4 Thalamus**

In allen untersuchten Thalamuskernen ließ sich NAPE-PLD mRNA nachweisen, meist in mäßiger Ausprägung. Für das CB<sub>1</sub> Oligonukleotid hingegen war das gemessene Signal derart schwach, dass

eine Expression des Transkriptes bezweifelt werden darf. Schwach bis mäßig war das Markierungsniveau für FAAH mRNA.

Es mag an der Komplexität des Thalamus liegen, dass für diese Hirnregion bislang fast keine elektrophysiologischen Studien existieren, die die Rolle des Endocannabinoidsystems an thalamischen Synapsen genauer definieren würden. Auch das Bild, das die vereinzelt anatomischen Veröffentlichungen bisher zeichnen, weist deutliche Lücken auf.

Der Thalamus steht in intensiver Verbindung mit den verschiedenen Regionen des Neocortex und moduliert deren Erregungsniveau. Daneben existieren unzählige Vernetzungen mit anderen Hirnarealen wie Hippocampus, Basalganglien, Kleinhirn, Hirnstamm oder Amygdala, sowie eine Vielzahl intrathalamischer Kollaterale. Jedem der einzelnen Thalamuskern können physiologische Aufgaben und typische Projektionsareale zugeordnet werden, über die genaue Verschaltung weiß man aber noch äußerst wenig. Auf Zellniveau lassen sich in einer groben Einteilung die glutamatergen Projektions- oder Relaisneurone von den GABAergen Interneuronen unterscheiden.

Die bisherigen Erkenntnisse über das ECS im Thalamus geben noch einige Rätsel auf. So erwies sich auf der einen Seite die Stärke von NAPE-PLD mRNA-Expression und Enzymaktivität als die höchste im ganzen Gehirn (Morishita et al., 2005), auf der anderen Seite ist der CB<sub>1</sub> Rezeptor im Thalamus nur schwach vertreten (Eggan und Lewis, 2006; Glass et al., 1997; Herkenham et al., 1991). Auch CB<sub>1</sub> mRNA ist nahezu vollständig abwesend in dieser Region (Mailleux et al., 1992; Wang et al., 2003; Westlake et al., 1994). FAAH hingegen wird in den meisten Thalamuskernen mäßig exprimiert, sowohl in Bezug auf die mRNA (Thomas et al., 1997) als auch bezüglich des Proteins (Egertova et al., 2003). Möglicherweise wird aber die geringe Präsenz des Rezeptors zumindest teilweise durch eine erhöhte G-Protein-Kopplung kompensiert (Freund et al., 2003).

Unsere Versuche erstreckten sich auf fünf verschiedene Kerngebiete. Im Nucleus lateralis dorsalis, der afferente und efferente Verbindungen mit dem Cingulum unterhält und somit in limbische Prozesse eingreift, liegt das Expressionsniveau für NAPE-PLD und FAAH mRNA sowohl bei Relais- als auch Interneuronen im mäßigen Bereich. Für CB<sub>1</sub> mRNA ist das Signal in beiden Zelltypen fraglich positiv. Die Immunhistochemie zeigt lediglich eine schwache Färbung der Zellen.

Fast identische Werte ließen sich im Nucleus mediodorsalis messen, einem Kern, der vor allem mit dem präfrontalen Cortex und der Amygdala vernetzt ist. Lediglich die Expression von CB<sub>1</sub> ist hier noch ein wenig geringer ausgeprägt. Dem steht allerdings eine deutliche, mittelstarke Färbung von Prinzipal- und Interneuronen bei der Immunhistochemie gegenüber. Dies spiegelt gut die Beobachtungen von Glass et. al. wider, die im Nucleus mediodorsalis die höchste Rezeptordichte im ganzen Thalamus maßen (Glass et al., 1997).

In der ventralen Kerngruppe, deren Hauptaufgabe in der Modulation sensorischer und motorischer Informationen liegt, lässt sich für NAPE-PLD wiederum ein mäßiges Expressionsniveau ermitteln. CB<sub>1</sub> mRNA wird nur äußerst schwach ausgebildet, und auch FAAH mRNA liegt hier lediglich im

niedrig positiven Bereich. Ebenfalls schwach ausgebildet ist die Farbreaktion bei der CB<sub>1</sub> Immunhistochemie.

Der Nucleus centromedianus bezieht seine Afferenzen unter anderem aus dem Globus pallidus und projiziert ins Striatum. In unseren Versuchen erscheinen seine Prinzipalneurone sowohl für NAPE-PLD als auch für CB<sub>1</sub> mRNA fraglich positiv, FAAH mRNA ist schwach ausgebildet. Bei den Interneuronen jedoch liegen NAPE-PLD und CB<sub>1</sub> mRNA im niedrigen, FAAH mRNA im mäßigen Expressionsbereich. In der Immunhistochemie für das Rezeptorprotein färbten sich beide Zelltypen schwach.

Eine Sonderstellung innerhalb des thalamischen Netzwerkes nimmt der Nucleus reticularis ein. Seine GABAergen Neurone hemmen die Zellen der anderen Thalamuskern über einen Feedback-Mechanismus und stellen somit ein wichtiges Modulationszentrum dar. In der in situ Hybridisierung erscheinen diese Zellen schwach markiert für NAPE-PLD und FAAH mRNA und fraglich positiv für das CB<sub>1</sub> Transkript. Laut Ong et al. sind sie jedoch dicht mit CB<sub>1</sub> Rezeptoren besetzt (Ong und Mackie, 1999). Während also die mRNA von NAPE-PLD und FAAH in allen untersuchten Thalamuskernen deutlich exprimiert wird, und somit eine Ausschüttung von Anandamid in diesen Gebieten wahrscheinlich ist, bleibt eine Synthese des CB<sub>1</sub> Rezeptors durch thalamische Neurone fraglich. Nachdem wir aber im Einklang mit früheren Publikationen (s.o.) das Rezeptorprotein fast überall nachweisen konnten, kann ein Einfluss des ECS auf die Signaltransduktion an thalamischen Synapsen keinesfalls ausgeschlossen werden. Um diesen möglichen Einfluss aber näher zu charakterisieren, sind elektrophysiologische Studien unerlässlich.

### ***5.2.5 Hypothalamus und angrenzende Strukturen***

Während sich das Hybridisierungssignal von NAPE-PLD in den verschiedenen Hypothalamuskernen noch im niedrigen bis mäßigen Bereich bewegt, liegt das Expressionsniveau für CB<sub>1</sub> mRNA insgesamt ziemlich hoch. Der Nucleus ventromedialis und das eng mit dem Hypothalamus assoziierte diagonale Band von Broca stechen dabei besonders hervor. Fast einheitlich mäßig ist die Expression von FAAH mRNA in den untersuchten Gebieten.

Der Hypothalamus empfängt als oberstes Integrationsorgan vegetativer Funktionen Afferenzen aus nahezu allen Regionen des menschlichen ZNS. Efferent projiziert er vor allem in Richtung Hirnstamm und Rückenmark, aber auch die Projektionen in die Hypophyse sind von enormer Bedeutung für den Gesamtorganismus. Die Nuclei supraopticus und paraventricularis versorgen beispielsweise auf diesem Wege die Neurohypophyse mit den Hormonen Oxytocin und Vasopressin. Auf zellulärer Ebene unterscheidet man im Hypothalamus in der Regel parvozelluläre von magnozellularen Neuronen.

Welche Wirkung Cannabinoide auf diese Hirnregion ausüben, ist besonders *in vivo* gut dokumentiert. Berichtet werden unter anderem eine Stimulation des Appetits, die Beeinflussung der Ausschüttung verschiedener neuroendokriner Substanzen (z.B. TSH, Prolactin, ACTH) oder die Induktion von Hypothermie (Maccarrone und Wenger, 2005; Wenger und Moldrich, 2002). An den Synapsen weisen die noch recht spärlichen Daten darauf hin, dass Endocannabinoide über die Stimulation präsynaptischer CB<sub>1</sub> Rezeptoren vor allem die Ausschüttung von Glutamat hemmen (Di et al., 2005a; Di et al., 2005b).

Letztgenannte Erkenntnisse entstammen Experimenten an jenen beiden Kernen, die die Hormone des Hypophysenhinterlappens produzieren. Dort fanden wir in den kleinen Neuronen des Nucleus paraventricularis mäßige Mengen an NAPE-PLD mRNA. Für CB<sub>1</sub> liegt die Expression im mittelstarken, für FAAH im wiederum im mäßigen Bereich. Bei den großen Zellen diesen Kerns liegen die jeweiligen Werte etwas niedriger.

Der hauptsächlich Vasopressin synthetisierende Nucleus supraopticus ist in seinen kleinen Neuronen schwach positiv für NAPE-PLD mRNA. Mäßige Werte ergeben sich für das CB<sub>1</sub> Oligonukleotid, schwach ist die Expression von FAAH mRNA. Die großen Neurone bilden geringe Mengen an NAPE-PLD und CB<sub>1</sub> mRNA aus, wobei die Expression von CB<sub>1</sub> zweifelhaft ist. Dagegen erreicht das Signal bei der FAAH ein mäßiges Niveau.

Damit existieren in allen untersuchten neuronalen Subtypen die Voraussetzungen für eine über Anandamid und den CB<sub>1</sub> Rezeptor vermittelte Modulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse, wie sie bereits mehrfach diskutiert wurde (Maccarrone und Wenger, 2005; Wenger et al., 1997).

Der Nucleus dorsomedialis präsentiert in seinen großen Neuronen ein schwaches Signal für NAPE-PLD und CB<sub>1</sub>. Geringfügig stärker ist die Expression der FAAH. Die kleinen Neurone sind mäßig positiv für NAPE-PLD und FAAH und exprimieren CB<sub>1</sub> mRNA auf mittelstarkem Niveau.

Im Nucleus ventromedialis ergaben sich für NAPE-PLD und FAAH in großen wie kleinen Neuronen ähnliche Werte wie im Nucleus dorsomedialis. Für das CB<sub>1</sub> Oligonukleotid jedoch konnte ein starkes Hybridisierungssignal gemessen werden.

Der Nucleus infundibularis – oft auch als Nucleus arcuatus bezeichnet – enthält eine Vielzahl unterschiedlicher Neuronentypen und übernimmt wichtige Funktionen bei der Steuerung von Hunger- und Sättigungsgefühl. Sowohl große als auch kleine Neurone zeigen hier eine mäßige Expression von NAPE-PLD mRNA, mittelstarke Werte für CB<sub>1</sub> mRNA und mäßige Expressionsstärke beim FAAH Oligonukleotid.

Anatomisch dem Hypothalamus benachbart nimmt als wichtiger Teil des Papez-Neuronenkreises das Corpus mamillare eine zentrale Position innerhalb des limbischen Systems ein. Seine kleinen Neurone imponieren schwach positiv für NAPE-PLD mRNA, während sie CB<sub>1</sub> mRNA auf mittelstarkem und FAAH mRNA auf mäßigem Niveau exprimieren. Bei den großen Neuronen ist das Signal bei allen drei Oligonukleotiden eine Kategorie schwächer ausgeprägt als bei den kleinen Neuronen.

Als letzte Struktur in der hypothalamischen Schnittebene untersuchten wir das diagonale Band von Broca, dessen Neurone unter anderem an der Regulation hippocampaler Aktivität beteiligt sind. Hier ergaben in etwa gleiche Messdaten für große und kleine Neurone. Dabei liegt die Expression von NAPE-PLD mRNA im schwachen Bereich, um dann beim CB<sub>1</sub> Oligonukleotid auf ein sehr starkes Niveau anzusteigen. Die hier ermittelte Signalstärke gehört zu den höchsten Werten, die wir in dieser Studie im ZNS messen konnten. FAAH mRNA wird mäßig exprimiert.

Wir konnten also zeigen, dass besonders CB<sub>1</sub>, aber auch NAPE-PLD und FAAH auf mRNA-Ebene im Hypothalamus reichlich exprimiert werden. Im Hypothalamus selbst scheint daraus zwar lediglich eine geringe bis mäßige Dichte an CB<sub>1</sub> Rezeptoren zu resultieren (Herkenham et al., 1991; Matsuda et al., 1993; Tsou et al., 1998a), allerdings deutet vieles darauf hin, dass die G-Protein-Kopplung des Rezeptors im Hypothalamus effektiver ist als in anderen Hirnregionen (Breivogel et al., 1997).

Insgesamt bieten unsere Ergebnisse ein gutes Korrelat zu den vielfältigen vegetativen Wirkungen der Cannabinoide. Auch könnten sie unter Umständen dazu beitragen, die anorexigene Wirkung, die Rimonabant über die Blockade hypothalamischer CB<sub>1</sub> Rezeptoren vermittelt (Pagotto et al., 2006) konkreten Synapsen zuzuordnen.

### **5.2.6 Basalganglien**

Einflüsse der Endocannabinoidsystems auf die Signalverarbeitung in den Basalganglien sind vielfach belegt (Fernandez-Ruiz et al., 2002). Unsere Experimente zeigen dabei besonders für das Striatum ein hohes Expressionsniveau von CB<sub>1</sub> mRNA, aber auch die Zellen in den ausführenden Kernen wie dem Globus pallidus tragen das Transkript. Ebenso konnten wir die mRNA von NAPE-PLD und FAAH in allen untersuchten Zellen nachweisen. Neben dem Striatum erscheinen bei diesen beiden Oligonukleotiden vor allem die Neurone des Nucleus subthalamicus betont. In der makroskopischen Ansicht präsentiert sich der Globus pallidus sowohl bei CB<sub>1</sub> als auch bei NAPE-PLD und FAAH auffällig signalarm.

Dreh- und Angelpunkt der Signalprozessierung in den Basalganglien sind die mittelgroßen („medium spiny“) Neurone des Corpus Striatum. Sie empfangen ihre Afferenzen aus dem Neocortex und dem Thalamus und projizieren vornehmlich in den Globus pallidus und die Pars reticularis der Substantia nigra, gehen aber auch Kollateralverknüpfungen innerhalb des Striatums ein. Ihr Transmitter ist GABA.

Am gründlichsten ist der Einfluss des ECS bislang für die Synapsen cortikostriataler Afferenzen beschrieben. Dort konnte gezeigt werden, dass präsynaptische CB<sub>1</sub> Rezeptoren eine Hemmung der Glutamatausschüttung vermitteln (Gerdeman und Lovinger, 2001; Kofalvi et al., 2005; Ronesi und Lovinger, 2005). Wie auch in anderen Hirnregionen geschieht dies über eine Freisetzung nicht näher

definierter Endocannabinoide an der Postsynapse. Diese elektrophysiologischen Beobachtungen lassen sich durch unsere Ergebnisse gut stützen, denn wir konnten die CB<sub>1</sub> Rezeptor mRNA sowohl in den kortikalen Projektionsneuronen der Lamina V nachweisen (s.o.) als auch in den Zellen des Nucleus centromedianus thalami, von wo aus die meisten thalamischen Efferenzen in Richtung Striatum abgehen. In letztgenannter Struktur war die Expression allerdings äußerst gering.

Auch die mittelgroßen Neurone selbst sind deutlich positiv für CB<sub>1</sub> mRNA. Gleiches haben bereits Hohmann et al. an der Ratte beschrieben und gleichzeitig aufgezeigt, dass sowohl die Präproenkephalin produzierenden striatopallidalen Neurone das Transkript ausbilden, als auch die Präprotachykinin A/Prodynorphin produzierenden striatonigralen Neurone (Hohmann und Herkenham, 2000). Der Rezeptor ist somit an den GABAergen Synapsen von Globus pallidus und Substantia nigra zu suchen. Tatsächlich haben frühere immunhistochemische und autoradiographische Studien hohe Konzentrationen von CB<sub>1</sub> Rezeptoren im Globus pallidus und der Pars reticularis der Substantia nigra ausmachen können (Egertova und Elphick, 2000; Glass et al., 1997; Herkenham et al., 1991). Auch unsere immunhistochemischen Experimente zeigen eine intensive Färbung der pallidalen Neurone.

Im Gegensatz dazu fällt die Expression von CB<sub>1</sub> mRNA im Globus pallidus äußerst schwach aus. Dennoch befindet sich das Signal deutlich im positiven Bereich, wohingegen vorangegangene Publikationen das humane Pallidum als signalfrei bezeichneten (Mailleux und Vanderhaeghen, 1992; Westlake et al., 1994). Möglicherweise ist dies auf eine geringere Sensitivität der in diesen Studien verwendeten Sonden zurückzuführen.

Ungeklärt ist auch die Präsenz von CB<sub>1</sub> mRNA in der Pars compacta der Substantia nigra. Bislang ging man davon aus, dass in dieser Region kein CB<sub>1</sub> Transkript vorhanden sei (Julian et al., 2003; Mailleux und Vanderhaeghen, 1992; Westlake et al., 1994). Unsere Versuche jedoch konnten dort ein schwaches Expressionsniveau nachweisen, so dass es durchaus möglich erscheint, dass der CB<sub>1</sub> Rezeptor an den dopaminergen Synapsen nigrostriataler Afferenzen mitexprimiert ist. Eine jüngere Studie bestätigt genau dies und detektiert geringe Mengen des Rezeptorproteins an diesen Synapsen. Hinweise auf eine Beeinflussung der dopaminergen Signalübermittlung durch das ECS ergeben sich jedoch nicht (Kofalvi et al., 2005).

Auch dem Nucleus subthalamicus kommt eine wichtige Rolle innerhalb der Funktionalität der Basalganglien zu. Seine Afferenzen kommen vor allem aus dem Pallidum; zurück ins Pallidum sowie in die Substantia nigra verlaufen seine Axone, an deren Ende sich glutamaterge Synapsen befinden. Eine Ausbildung des CB<sub>1</sub> Rezeptors an diesen Synapsen ist als wahrscheinlich anzusehen, da unsere Versuche eine niedriges, aber eindeutiges Signal für die Prinzipalneurone ergaben. In der Literatur sind allerdings bislang kaum Referenzen vorhanden, die die Bedeutung des ECS an diesen Synapsen untersuchen.

Was die striatalen Interneurone betrifft, so konnten wir bei den großen cholinergen Interneuronen ein schwaches und bei den kleineren übrigen Interneuronen ein starkes Niveau an CB<sub>1</sub> mRNA Expression feststellen. Dies steht im Einklang mit vorherigen Beobachtungen an der Ratte, wo das Rezeptorprotein sowohl in cholinergen Interneuronen als auch in verschiedenen Untergruppen GABAerger Interneurone detektiert wurde (Fusco et al., 2004). In einer Doppelfärbungsstudie jedoch war es zuvor Hohmann et al. nicht gelungen, in cholinergen Interneuronen CB<sub>1</sub> mRNA nachzuweisen (Hohmann und Herkenham, 2000). Dies könnte wiederum auf die geringere Sensitivität zurückzuführen sein, die Doppelfärbungsmethoden gegenüber der von uns durchgeführten Hybridisierung mit einem einzelnen Oligonukleotid besitzen, zumal das gemessene Signal lediglich im schwach positiven Bereich lag. Insgesamt sind unsere Ergebnisse gut vereinbar mit Szabos Feststellung, dass Cannabinode die inhibitorische Transmission an striatalen GABAergen Synapsen hemmen (Szabo et al., 1998).

Kaum untersucht ist bislang die genaue Identität der Endocannabinoiden in den Basalganglien, und welche Zellen sie synthetisieren. Lediglich Giuffrida machte vor einigen Jahren die Beobachtung, dass sowohl neuronale Aktivität im Striatum als auch die Stimulation striataler Dopaminrezeptoren im Rattenhirn zu einem bis zu achtfachen Anstieg der Anandamidkonzentration führen. Das Niveau von 2-AG hingegen veränderte sich auf diese Reize hin nicht (Giuffrida et al., 1999). In unseren Experimenten bildeten alle Neuronentypen des Striatums NAPE-PLD mRNA aus; die mittelgroßen und die cholinergen Neurone auf niedrigem Niveau, die kleinen Interneurone auf mäßigem. Somit kann in diesen Zellen davon ausgegangen werden, dass sie Anandamid synthetisieren.

Auch für einen Abbau von Anandamid gibt es klare Anzeichen, da FAAH mRNA sowohl in den medium-spiny-Neuronen (mäßiges Signal) als auch in den cholinergen und kleinen Interneuronen (schwaches bzw. mittelstarkes Signal) nachzuweisen ist. An allen striatalen Synapsen ist also nach unseren Daten eine Involvierung von Anandamid denkbar.

Eine interessante Diskrepanz ergibt sich im Globus pallidus, einer jener Regionen im menschlichen Gehirn mit der höchsten CB<sub>1</sub> Rezeptordichte (Glass et al., 1997). Dieser Abundanz an Rezeptoren steht ein ziemlich schwaches Expressionsniveau von NAPE-PLD und FAAH mRNA gegenüber. Dies erlaubt mehrere Möglichkeiten der Interpretation. Zum einen lässt sich daraus eine geringe Bedeutung von Anandamid in dieser Region im Vergleich zu anderen Endocannabinoiden (in Frage kommt zum Beispiel 2-AG) ableiten. Zum anderen ist es aber auch möglich, dass die Anzahl der Transkripte schlecht korreliert mit den tatsächlich vorhandenen Enzymen.

In der Pars compacta der Substantia nigra lag das Signal für die mRNA beider Enzyme ebenfalls im niedrigen Bereich. Nachdem allerdings an den dendritischen, GABAergen Synapsen dieser Zellen eine cannabinoiderge Hemmung der Transmitterausschüttung berichtet wurde (Yanovsky et al., 2003), muss auch hier die Frage gestellt werden, ob angesichts der geringen Expression von NAPE-PLD und FAAH mRNA Anandamid alleiniger Vermittler dieses Phänomens sein kann, oder ob nicht noch ein anderes Endocannabinoid zumindest mitbeteiligt ist.

Mäßige Expressionswerte für die mRNA beider Enzyme konnten wir in den Zellen des Nucleus subthalamicus messen, einer Region, in der CB<sub>1</sub> Rezeptoren nahezu nicht vorhanden sind (Herkenham et al., 1991). Möglicherweise wird hier eine geringe Rezeptordichte durch einen erhöhten Umsatz von Anandamid kompensiert.

Zusammenfassend konnten wir in unseren Versuchen zeigen, dass besonders die Zellen des Striatums positiv für CB<sub>1</sub> mRNA sind, aber auch andere Kerne der Basalganglien den Rezeptor exprimieren. Synthese und Abbau von Anandamid können dabei in keinen eindeutigen Bezug zur Verteilung des Rezeptors gestellt werden. Dennoch spiegelt sich die prominente Rolle, die dem ECS in den Basalganglien zugeschrieben wird (Fernandez-Ruiz et al., 2002), in unseren Ergebnissen durchaus wieder. Für ein genaueres Verständnis ist jedoch noch ein hohes Maß an wissenschaftlicher Feinarbeit vonnöten.

### **5.2.7 Cerebellum**

Im Kleinhirn konnten wir für die mRNA der NAPE-PLD fast durchwegmäßige Expressionswerte messen. Das CB<sub>1</sub> Oligonukleotid liegt zumeist im mittelstarken Signalbereich, FAAH wird schwach bis mäßig exprimiert.

Aufgrund der guten Eignung des Kleinhirns für elektrophysiologische Studien ist der Einfluss des Endocannabinoidsystems auf die Signaltransduktion in dieser Region gründlicher erforscht als in vielen anderen Teilen des ZNS.

In Messungen am Dendritenbaum der Purkinjezellen konnte nachgewiesen werden, dass Cannabinoide sowohl an den inhibitorischen Synapsen der Interneurone als auch an den exzitatorischen Synapsen der Kletter- und Parallelfasern als retrograder Transmitter fungieren (Brenowitz und Regehr, 2003; Diana et al., 2002; Kawamura et al., 2006; Kreitzer und Regehr, 2001a; Kreitzer und Regehr, 2001b; Yoshida et al., 2002). Durch die postsynaptische Ausschüttung der Cannabinoide wird dabei an den inhibitorischen Synapsen die präsynaptische Freisetzung von GABA gehemmt (DSI, s.o.), an den exzitatorischen jene von Glutamat (DSE). Auch an den dendritischen Synapsen von Interneuronen wird eine retrograde Inhibition durch Endocannabinoide beschrieben (Beierlein und Regehr, 2006). Weitgehend unumstritten ist mittlerweile, dass diese Effekte über präsynaptische CB<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt werden (Kawamura et al., 2006). Wenig Genaues weiß man jedoch darüber, welches Endocannabinoid hierfür als Botenstoff dient.

Einige Autoren vermuten 2-AG hinter der gesuchten Substanz (Beierlein und Regehr, 2006; Maejima et al., 2005; Ohno-Shosaku et al., 2005; Szabo et al., 2006). Als Grund führen sie an, dass DSI und DSE sowohl durch eine Erhöhung der postsynaptischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration getriggert werden als auch durch die Stimulation metabotroper Glutamat-Rezeptoren (mGluR), die wiederum über eine Aktivie-

rung der Phospholipase C die Synthese von 2-AG vermitteln können. Der direkte Nachweis der Substanz steht jedoch noch aus.

Dieser Hypothese steht der eindeutige Nachweis von NAPE-PLD Protein und mRNA in Kleinhirnhomogenaten gegenüber (Morishita et al., 2005), was auf eine maßgebliche Präsenz von Anandamid in dieser Region hindeutet. Unsere Versuche konnten dies auf zellulärer Ebene bestätigen. NAPE-PLD mRNA wird von allen Neuronentypen des Kleinhirns ausgebildet. Gerade die Purkinjezellen zeigen dabei ein deutliches Expressionsmuster, aber auch Stern-, Korb- und Golgizellen sind mäßig positiv. Etwas geringer liegt die Expression der mRNA bei den Körnerzellen.

Was die CB<sub>1</sub> mRNA betrifft, so wird diese von allen inhibitorischen Neuronen, die Synapsen mit den Purkinjezellen ausbilden, reichlich exprimiert. Stern- und Korbzellen erreichen dabei ein mittelstarkes Signalniveau, Golgizellen ein starkes. Dies steht in guter Kongruenz mit der von Kawamura et al. aufgezeigten CB<sub>1</sub>-Vermittlung der DSI (Kawamura et al., 2006). Die Körnerzellen und die Neurone des Nucleus olivaris, deren Parallel- bzw. Kletterfasern exzitatorisch auf die Purkinjezellen wirken, weisen etwas niedrigere, aber immer noch mäßige Messwerte auf. Auch dies ist vereinbar mit den Ergebnissen Kawamuras, der immunhistochemisch eine geringere Dichte von CB<sub>1</sub> an den exzitatorischen Präsynapsen beobachtete als an den inhibitorischen.

Die Purkinjezellen erwiesen sich in unseren Versuchen als klar positiv für CB<sub>1</sub> mRNA, nachdem frühere Veröffentlichungen sie noch als signalfrei beschrieben hatten (Mailleux und Vanderhaeghen, 1992; Matsuda et al., 1993). Damit dürfte die GABAerge Projektion der Purkinjezellen auf die Kleinhirnerne ebenfalls der Modulation durch das Endocannabinoidsystem unterliegen.

In der Immunhistochemie zeigen die Purkinjezellen eine gleichmäßig über Soma und Dendriten verteilte, intensive Färbung. Dies hatte man zuvor bereits in Affe und Ratte beobachtet (Moldrich und Wenger, 2000; Ong und Mackie, 1999), während andere Arbeitsgruppen in Ratten und Primaten lediglich eine trianguläre basale Färbung der sonst unmarkierten Purkinjezellen feststellten (Egertova und Elphick, 2000; Egan und Lewis, 2006; Tsou et al., 1998a).

Auch für FAAH mRNA sind die Purkinjezellen positiv, allerdings wohl in geringerem Maße als in vorangegangenen Untersuchungen an der Ratte (Thomas et al., 1997). Stern- und Korbzellen exprimieren das Transkript auf mäßigem Niveau, schwach ist das Signal bei Körner- und Golgizellen. In immunhistochemischen Studien konnte das Enzymprotein nur bei den Purkinjezellen in größeren Mengen nachgewiesen werden (Egertova et al., 2003; Gulyas et al., 2004). Für die restlichen cerebellären Neurone lag die Färbung jeweils nahe des Hintergrundsignals. Zumindest an den Dendriten der Purkinjezellen wäre damit ein Abbau von Anandamid gewährleistet.

Insgesamt lässt sich aus unseren Ergebnissen ein weit reichendes Mitwirken des Endocannabinoidsystems an allen wichtigen synaptischen Prozessen im Kleinhirn und insbesondere an der Purkinjezelle ableiten, wobei eine Beteiligung von Anandamid wahrscheinlich ist.

### **5.2.8 Hirnstamm**

Im periaquäduktalen Grau lässt sich sowohl im lateralen als auch im ventrolateralen Teil bei allen drei Oligonukleotiden ein schwaches Signal beobachten. Eine Expression von CB<sub>1</sub> ist dabei angesichts der ziemlich niedrigen Werte zweifelhaft.

Das periaquäduktale Grau unterhält intensive Faserverbindungen zum limbischen System, koordiniert Angst und Fluchtreflexe und nimmt entscheidenden Einfluss auf die endogene Antinozizeption. Dabei hat sich herausgestellt, dass neben den Endorphinen auch endogene Cannabinoide zu diesem Prozess beitragen (Hohmann et al., 2005; Walker et al., 1999). Nach Schmerzreiz oder elektrischer Stimulation kommt es zu einem Anstieg der Konzentration von Anandamid und 2-AG, die über CB<sub>1</sub> Rezeptoren die Ausschüttung von GABA und Glutamat im PAG unterdrücken (Vaughan et al., 2000). Die daraus resultierende Analgesie kann durch die Hemmung der FAAH und der MGL verstärkt werden (Hohmann et al., 2005; Suplita et al., 2005).

Unsere Ergebnisse sprechen durchaus für eine Anandamid-Synthese im PAG auch beim Menschen. Allerdings erscheint es fraglich, ob die Neurone in dieser Region den CB<sub>1</sub> Rezeptor ausbilden. Für die synaptische Transmission im PAG ist dies allerdings von untergeordneter Wichtigkeit, da die hier vorhandenen CB<sub>1</sub> Rezeptoren von den afferenten Axonen bereitgestellt werden.

Die zweite von uns untersuchte Hirnstammstruktur, der Nucleus olivaris, besitzt wichtige Funktionen bei der Koordination von Präzisionsbewegungen. Seine Afferenzen empfängt er vor allen Dingen aus dem motorischen Cortex, dem Rückenmark und dem Nucleus ruber. Seine Efferenzen laufen überwiegend ins Kleinhirn, wo sie über die Kletterfasern erregend auf die Purkinjezellen wirken.

In unseren Versuchen exprimieren die Zellen der Olive geringe Mengen an NAPE-PLD mRNA. Mäßige Messwerte lassen sich beim CB<sub>1</sub> Oligonukleotid erzielen. Im Grenzbereich zwischen positiv und negativ liegt die Expression von FAAH mRNA.

Die klare Ausbildung des CB<sub>1</sub> Transkriptes, die wir in den Zellen der Olive messen konnten, spricht eindeutig für die Präsenz des Rezeptors an den Synapsen, die die Kletterfasern mit den Purkinjezellen ausbilden (s. dazu Kapitel Cerebellum).

### **5.2.9 Weiße Substanz**

In der weißen Substanz des Neocortex liegt die Expression von NAPE-PLD und CB<sub>1</sub> mRNA derart niedrig, dass eine relevante Ausbildung des Rezeptors kaum anzunehmen ist. Das Signal für die FAAH hingegen liegt im schwach positiven Bereich.

Schwach positiv ist die Expression auch in der cerebellären weißen Substanz. Hier konnten für alle drei Oligonukleotide fast identische Messwerte erzielt werden. Ob dies tatsächlich Ausdruck einer glialen Expression der jeweiligen mRNA ist oder nur auf ein höheres Hintergrundsignal in dieser Region zurückzuführen ist, kann aus unseren Daten nicht abschließend beantwortet werden.

Frühere Publikationen beschreiben eine Expression von CB<sub>1</sub> mRNA lediglich in der fetalen weißen Substanz (Wang et al., 2003), nicht aber im adulten Gewebe (Mailleux et al., 1992). Das Rezeptorprotein ließ sich in der perivaskulären Zone der weißen Substanz einiger Hirnareale nachweisen (Moldrich und Wenger, 2000), sonst ergaben sich keine Hinweise für seine Präsenz (Ong und Mackie, 1999).

Was die FAAH betrifft, so steht der schwach positive Wert, den wir in unseren Versuchen messen konnten, im Einklang mit früheren Studien. Darin wird sowohl für das Protein als auch für die mRNA eine gliale Expression berichtet, die wohl vor allem den Astrozyten zuzuordnen ist (Egertova et al., 2003; Romero et al., 2002; Thomas et al., 1997).

### ***5.3 Spezies-Differenzen***

#### *NAPE-PLD*

Nachdem unsere Arbeit die erste Studie zur zellulären Verteilung der NAPE-PLD mRNA darstellt und bisher lediglich Quantifizierungen des Transkriptes in Rattenhirn-Homogenaten veröffentlicht wurden (Okamoto et al., 2004; Ueda et al., 2005), kann an dieser Stelle nur ein äußerst grober Vergleich hinsichtlich einer möglichen Spezies-Differenz gezogen werden.

Stellt man aber dennoch unsere Ergebnisse den an Rattenhirnhomogenaten mittels Enzym-Assay, PCR und Western Blot gewonnenen Daten von Morishita (2005) gegenüber, so fällt auf, dass dort die thalamische NAPE-PLD mRNA Expression jene der übrigen Hirnregionen um ein vielfaches übertrifft. Eine derartige Dominanz des Transkriptes im Thalamus konnten wir beim Menschen nicht nachvollziehen, obgleich in diesem Areal ein vergleichsweise starkes Signal zu beobachten war.

Auch, dass Morishita im Cerebellum die niedrigsten Werte des gesamten Gehirnes misst, widerspricht unseren Daten. Auf die zelluläre Expressionen bezogen liegt hier die Signalstärke der einzelnen Zellen deutlich über jener, die wir beispielsweise im Hippocampus messen konnten. Das könnte allerdings auf die klare zahlenmäßige Überlegenheit der Körnerzellen zurückzuführen sein, die bei der Messung in Homogenaten andere Zelltypen nahezu bedeutungslos erscheinen lassen. Dafür spricht auch, dass die Körnerzellen in unseren Versuchen das geringste Niveau an NAPE-PLD mRNA aller cerebellären Neurone exprimieren.

Insgesamt sind derartige Überlegungen allerdings mit großer Vorsicht zu genießen, da zum einen die Datenlage noch äußerst dürftig ist, und zum anderen direkte methodische Vergleiche in Ermangelung passender Studien nicht möglich sind.

### *CB<sub>1</sub>*

Phylogenetisch betrachtet ist die Aminosäuresequenz des CB<sub>1</sub> Rezeptors hoch konserviert. Zwischen den Spezies, bei denen der Rezeptor bislang geklont wurde (Mensch, Maus, Ratte), besteht eine Übereinstimmung von 97-99% (Howlett et al., 2002). Somit überrascht es auch nicht, dass in den bisherigen Studien zur Verteilung des Rezeptors im Gehirn lediglich geringfügige Unterschiede zwischen Mensch und Nagetieren festzustellen waren. So liegt beispielsweise in der Amygdala die Rezeptordichte beim Menschen etwas höher als in der Ratte (Glass et al., 1997; Herkenham et al., 1991).

Auch in unseren Experimenten ergaben sich – sofern die Zellen bereits an der Ratte beschrieben waren – kaum Diskrepanzen zu anderen Spezies. Lediglich einige wenige Auffälligkeiten sind zu vermerken, von denen sicherlich am ehesten die Purkinjenzellen hervorzuheben sind. In diesen Neuronen gelang in keiner in situ Hybridisierung an der Ratte, CB<sub>1</sub> mRNA nachzuweisen (Mailleux und Vanderhaeghen, 1992; Matsuda et al., 1993). In unseren Versuchen dagegen trugen sie ein deutliches Signal. Neben einer phylogenetisch unterschiedlichen Expression ist hier allerdings auch eine mögliche verminderte Sensitivität der genannten Studien an der Ratte in Betracht zu ziehen.

Weiterhin ist der Hypothalamus zu nennen, in dessen Zellen die Signalintensität bei der Ratte als schwach bis mäßig beschrieben wurde (Mailleux und Vanderhaeghen, 1992; Matsuda et al., 1993), bei uns allerdings zumeist im starken Expressionsbereich lag. Insgesamt besteht jedoch eine hohe Kongruenz mit dem Verteilungsmuster der CB<sub>1</sub> mRNA im Gehirn der Nagetiere. Jene Disparitäten, die sich mancherorts beobachten lassen, sind gewiss nicht stark genug ausgeprägt, um klare Aussagen bezüglich Speziesdifferenzen treffen zu können. Gezielt angelegte Vergleichsstudien wären dafür weitaus besser geeignet.

### *FAAH*

Die FAAH variiert in ihrer Struktur zwischen den Spezies. Bezüglich der Aminosäuresequenz herrscht eine Übereinstimmung von 73% zwischen Mensch, Maus, Ratte und Schwein; auch die mRNA unterscheidet sich beträchtlich in ihrer Länge (Deutsch et al., 2002; Ueda et al., 2000).

Zur zellulären Verteilung der FAAH mRNA im Gehirn ist seit der Klonierung des Enzyms im Jahr 1996 erst eine Studie an der Ratte veröffentlicht worden (Thomas et al., 1997). Dennoch lohnt es sich, einen Vergleich zu den von uns am humanen Gewebe gewonnenen Daten zu ziehen.

Grundsätzlich entspricht das menschliche Expressionsmuster der FAAH mRNA im ZNS jenem der Ratte. Drei Hirnregionen zeigen jedoch Abweichungen. So wird der Hippocampus von Thomas et al. als eines von jenen Hirnarealen bezeichnet, in denen das höchste Niveau an FAAH mRNA Expression zu verzeichnen sei. In unseren Versuchen am Menschen jedoch ergaben sich hier äußerst niedrige Werte, die sich zum Teil an der Grenze zum Hintergrundsignal bewegen.

Ähnliches gilt für die Amygdala. Auch hier spricht Thomas von einer prominenten Expression, während bei uns das Signal mäßig bis schwach ausgeprägt ist. Im Kleinhirn schließlich wird für die Ratte ein hohes Maß an Expression in den Purkinje- und Körnerzellen beschrieben. Am Menschen jedoch blieb die Markierung über diesen Zellen vergleichsweise schwach.

Inwieweit sich diese Unterschiede in den beschriebenen Regionen auf den Anandamid-Stoffwechsel in den verschiedenen Spezies auswirken, müssen zukünftige Studien eruieren. Angesichts der sich darstellenden Diskrepanzen würden allerdings phylogenetische Abweichungen vor allem in limbischen und cerebellär gesteuerten Prozessen nicht überraschen.

#### ***5.4 Pathophysiologische und therapeutische Implikationen***

Angesichts der weiten Verbreitung des Endocannabinoidsystems im zentralen Nervensystem und in der Peripherie bestehen auf vielen Ebenen Wechselwirkungen mit wichtigen physiologischen Prozessen. Aus diesem Grund ist es bereits seit längerem immer wieder das Ziel intensiver Studien, mögliche therapeutische Ansatzpunkte innerhalb des ECS aufzudecken. Als erste Frucht dieser Bemühungen hat vor kurzem der CB<sub>1</sub> Antagonist Rimonabant (s.u.) die Zulassung als Arzneimittel erhalten.

Weiterhin ist man bestrebt, die Rolle des ECS in den Ätiologien verschiedener Krankheiten zu definieren, bzw. die Auswirkungen aufzuzeigen, die bestimmte Krankheiten auf die Komposition des ECS haben.

Deswegen sei an dieser Stelle ein Überblick über die wichtigsten zentralnervösen Pathologien und Therapiekonzepte geboten, in die das ECS in irgendeiner Form involviert ist.

##### ***5.4.1 Bewegungsstörungen***

###### *Morbus Parkinson*

Weitgehend ungeklärt sind die Faktoren, die zum Untergang der dopaminergen Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra und damit zur Ausbildung der Parkinsonschen Krankheit (PD) führen. Die Folgen dieser Degeneration sind eine verminderte Hemmung der medium spiny Neurone des Striatums, was in einer generellen Erhöhung der inhibitorischen Wirkung der Basalganglien auf die Motorik resultiert. Rigor, Tremor und Akinese sind die klassischen Symptome der Erkrankung.

Das ECS scheint nach dem Ausfall der dopaminergen Afferenzen kompensatorisch hochreguliert zu werden. So lässt sich auf der einen Seite eine Vermehrung der CB<sub>1</sub> Expression im Striatum beobachten (Lastres-Becker et al., 2001a; Romero et al., 2000), auf der anderen Seite eine Verminderung der Aktivität der FAAH (Gubellini et al., 2002). Auch eine Erhöhung der Liquorkonzentration von Endocannabinoiden bei unbehandelten PD-Patienten wird berichtet (Pisani et al., 2005).

Die Ansätze, sich diese Erhöhung des cannabinoidergen Grundtonus bei der Behandlung der Krankheit zunutze zu machen, sind unterschiedlicher Natur. Da CB<sub>1</sub> Rezeptoren fast überall in den Basalganglien vorkommen und dort an den Synapsen höchst unterschiedliche Effekte auf die Signalausbreitung ausüben, sind positive Auswirkungen auf die Symptomatik sowohl durch CB<sub>1</sub> Agonisten als auch durch entsprechende Antagonisten denkbar. Tatsächlich gibt es für jede der beiden Varianten Hinweise auf eine Wirksamkeit. So existieren gleichsam Studien, in denen eine Besserung der Symptomatik durch die Verabreichung von Rimonabant erreicht wird (Fernandez-Espejo et al., 2005; Gonzalez et al., 2006), wie auch solche, in denen Agonisten am CB<sub>1</sub> Rezeptor dies leisten (Sanudo-Pena et al., 1999; Sanudo-Pena und Walker, 1998).

Bevor jedoch zufriedenstellend geklärt werden kann, in wie fern das ECS in die Pathologie des Morbus Parkinson involviert ist, ist ein besseres Grundverständnis bezüglich der physiologischen Aufgaben des ECS in den Basalganglien vonnöten. Andernfalls kann die Ausarbeitung eines gezielten Therapiekonzeptes in einer derart komplex verschalteten Region kaum gelingen (Pacher et al., 2006).

### *Morbus Huntington*

Beim Morbus Huntington (HD) handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die zu einer Degeneration kortikaler und striataler Neurone führt. Folge ist eine mangelnde Inhibition motorischer Prozesse, die sich in hyperkinetischen und dystonischen Bewegungsstörungen äußert. Auch psychiatrische Phänomene gehen klassischerweise mit dem Krankheitsbild einher (Melone et al., 2005).

Eine Vielzahl von Studien hat aufgezeigt, dass das Endocannabinoidsystem im Verlauf der Erkrankung herunterreguliert wird. Im Gegensatz zum Morbus Parkinson kommt es hierbei zu einer Verminderung der CB<sub>1</sub> Rezeptordichte in den Basalganglien (Glass et al., 2000; Glass et al., 1993; Richfield und Herkenham, 1994). Dieses Phänomen lässt sich bereits in einem Krankheitsstadium beobachten, in dem die Erkrankung noch subklinisch verläuft und noch kein Nervenzellschaden eingetreten ist. Außerdem werden erniedrigte Gewebskonzentrationen von Anandamid und 2-AG in Striatum und Substantia nigra berichtet (Lastres-Becker et al., 2001b).

Es ist also von einer Hypofunktionalität des ECS im Striatum auszugehen, die möglicherweise mitverantwortlich ist für die mangelnde Unterdrückung von Bewegungsimpulsen bei Patienten mit Chorea Huntington (Lastres-Becker et al., 2003b). Dementsprechend zielen Therapieversuche auf einen Einsatz von CB<sub>1</sub> Agonisten und Hemmstoffen des Anandamidtransportes ab, wobei letztgenannter

Ansatz sich als effektivste Maßnahme herausgestellt hat (Lastres-Becker et al., 2003a; Lastres-Becker et al., 2002). Dies könnte damit zusammenhängen, dass AM404, der Inhibitor des Anandamid-transportes, ebenfalls Affinität zum Vanilloid-Rezeptor VR1 besitzt. Dieser Rezeptor, zu dessen Liganden auch Anandamid gehört, wird immer wieder mit dem ECS in Verbindung gebracht (Cristino et al., 2006). Im Periaquäduktalen Grau konnten sogar konkrete Interaktionen von VR1 und dem ECS nachgewiesen werden (Maione et al., 2006).

Es ist also gut möglich, dass diese Interaktionen beim Morbus Huntington von entscheidender Bedeutung sind.

#### **5.4.2 Morbus Alzheimer**

Die Alzheimersche Erkrankung (AD) ist ein progressives neurodegeneratives Leiden, das wohl durch eine Ablagerung von  $\beta$ -Amyloid und  $\tau$ -Protein verursacht wird. Die darauf folgende inflammatorische Reaktion führt zum Untergang von Nervenzellen vor allem im temporo-parietalen Cortex und damit zu einem hochgradigen Verlust kognitiver Fähigkeiten (Weksler et al., 2005).

Hinsichtlich des Endocannabinoidsystems hat man herausgefunden, dass die Expression des CB<sub>1</sub> Rezeptors durch die Erkrankung nicht entscheidend beeinträchtigt wird (Romero et al., 1998; Westlake et al., 1994). Eine neuere Studie jedoch sieht die CB<sub>1</sub> Rezeptoren besonders im frontalen Cortex von AD-Gehirnen deutlich reduziert (Ramirez et al., 2005) und diskutiert eine bedeutende Rolle des ECS bei der Pathogenese der Erkrankung.

Für die Mikroglia und Astrozyten, die um die senilen Plaques herum angeordnet sind, hat man eine signifikante Erhöhung der Expression von CB<sub>2</sub> und FAAH festgestellt (Benito et al., 2003). Man nimmt deswegen an, dass das ECS in Alzheimer-Patienten an der Modulation der Entzündungsreaktion beteiligt ist. Versuche an Ratten mit AD zeigten daraufhin eine fast vollständige Blockade der mikroglialen Neurotoxizität nach Verabreichung diverser Cannabinoide. Die Plaque induzierte Entzündungsreaktion sistierte fast vollständig, und auch die kognitiven Störungen waren rückläufig (Ramirez et al., 2005). Diese vielversprechenden Resultate konnten in einer Studie am Menschen teilweise nachvollzogen werden (Walther et al., 2006). Auf die Gabe von  $\Delta$ -9-THC besserten sich zahlreiche Symptome der Erkrankung, unter anderem auch die intellektuelle Beeinträchtigung und die nächtliche Agitiertheit.

Insgesamt eröffnen sich durch die gewonnenen Erkenntnisse einige potenzielle Ansatzpunkte, Einfluss auf den Krankheitsverlauf des Morbus Alzheimer zu nehmen. Ob sich aber daraus konkrete therapeutische Möglichkeiten ergeben, werden künftige Studien zu klären haben.

#### **5.4.3 Epilepsie**

Epileptische Anfälle entstehen durch eine Imbalance exzitatorischer und inhibitorischer Einflüsse, was zu einer unkontrollierten Erregungsausbreitung im betroffenen Hirnareal führt. Die pathogenetischen

Mechanismen sind unterschiedlichster Natur, eine Vielzahl verschiedener Trigger kann einen Anfall auslösen.

Cannabinoide modulieren in vielen Hirnregionen die Erregbarkeit von Nervenzellen über eine Hemmung der Transmitterfreisetzung an der Präsynapse (Freund et al., 2003). Es liegt also nahe, die Eignung des ECS als Angriffspunkt für neue therapeutische Konzepte zu untersuchen, zumal die Verabreichung von Cannabis bei Krampfleiden eine Jahrhunderte alte Praxis in der Medizin ist (Pacher et al., 2006).

Im Tierversuch hat sich gezeigt, dass im epileptogenen Gewebe sowohl die CB<sub>1</sub> Rezeptordichte als auch die Intensität der CB<sub>1</sub> vermittelten DSI erhöht ist (Chen et al., 2003). Auch die verstärkte Hemmung der Glutamatausschüttung durch Cannabinoide wird beschrieben (Monory et al., 2006). In einer weiteren Studie erwiesen sich CB<sub>1</sub> Agonisten gar als effektiver als gängige Antikonvulsiva wie Phenytoin oder Phenobarbital (Wallace et al., 2003). Darüber hinaus wirkt das ECS protektiv gegen den Zelltod durch übermäßige neuronale Erregung, die Exzitotoxizität, die eine häufige Folge von Epilepsien darstellt (Marsicano et al., 2003).

Trotz dieser vielversprechenden Erkenntnisse mangelt aber es bislang noch an kontrollierten klinischen Studien zur Erprobung der Wirksamkeit von Cannabinoiden bei der Behandlung von Krampfleiden.

#### **5.4.4 Stoffwechselstörungen**

Die appetitsteigernde Wirkung von Cannabis war seit jeher einer der wichtigsten Gründe für die seine medizinische Anwendung. Besonders kachektischen Patienten konnte so geholfen werden. Die vertieften Kenntnisse über die Wirkungsweise des ECS, die man in den vergangenen Jahren erlangt hat, ermöglichen es neuerdings, sich die Effekte der Cannabinoide auf Stoffwechselprozesse therapeutisch nutzbar zu machen.

Besonders die Regulation der Nahrungsaufnahme ist dabei in den Fokus gerückt, nachdem man herausgefunden hatte, dass das ECS unter anderem auf mesolimbischer und hypothalmischer Ebene daran beteiligt ist (Di Marzo und Matias, 2005). Neben der vermittelnden Rolle der CB<sub>1</sub> Rezeptoren (Williams und Kirkham, 2002b) konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration von 2-AG während des Fastens ansteigt und nach anschließender Nahrungsaufnahme wieder abfällt (Hanus et al., 2003). Auch eine Beteiligung des ECS an der Pathogenese der Adipositas wird diskutiert. Man geht hier von einer chronischen Erhöhung des endogenen Cannabinoidtonus aus, der sich durch eine Überexpression des CB<sub>1</sub> Rezeptors und eine verstärkte Produktion von Anandamid und 2-AG äußert (Di Marzo et al., 2001; Di Marzo und Matias, 2005). Dabei könnte ein Polymorphismus der FAAH, der die Enzymaktivität merklich reduziert, eine bedeutende Rolle spielen (Sipe et al., 2005).

In einer vor kurzem abgeschlossenen Phase-III-Studie konnte für dem CB<sub>1</sub> Antagonisten Rimonabant bestätigt werden, dass es besonders bei höhergradig adipösen Patienten (i.e. BMI > 29) zu signifikan-

ter Gewichtsreduktion beitragen kann und obendrein verschiedene cardiovaskuläre Risikoparameter wie z.B. Insulin, Glukose und Triglyzeride im Plasma günstig beeinflusst (Bellocchio et al., 2006). Seit September 2006 ist das Präparat auf dem deutschen Markt verfügbar.

#### **5.4.5 Schmerz und Entzündung**

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Wirkung von Cannabinoiden ist ihre analgetische Potenz. Wie bereits oben mehrfach erwähnt sind sie bei den unterschiedlichsten Schmerzqualitäten effektiv (Pacher et al., 2006) und entfalten ihre Wirkung über periphere, spinale und zentrale CB<sub>1</sub> Rezeptoren. Im Gehirn liegen dabei die Zentren ECS vermittelter Antinozizeption vor allem im periaquäduktalen Grau (s.o.), der rostralen ventromedialen Medulla, den Nuclei submedius und ventrolateralis thalami sowie der basolateralen Amygdala (Walker und Hohmann, 2005).

Studien an menschlichen Probanden lieferten höchst unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Effektivität der Schmerzunterdrückung. Je nach Erkrankung und Arzneimittelkombination lag die Vermittlung der Analgesie im Bereich von hochpotent bis unwirksam (Burns und Ineck, 2006). Dies unterstreicht die Notwendigkeit eines genaueren Verständnisses der Anatomie und Physiologie des ECS, um mögliche Angriffspunkte für therapeutische Modifikationen offenzulegen. Teilerfolge auf diesem Gebiet sind bereits erzielt worden. So konnte zum Beispiel ein THC-Analogon synthetisiert werden, das seine analgetische Wirkung ohne unerwünschte psychotrope Effekte entfaltete (Karst et al., 2003).

Dank ihrer umfangreichen Wechselwirkungen mit verschiedensten Substanzklassen wie Opiaten oder Paracetamol (Ottani et al., 2006) dürfte die Zukunft von Cannabinoiden in der Schmerztherapie am ehesten in der Kombination mit anderen Wirkstoffen liegen.

Immer mehr kommen die Cannabinoide auch als potenzielle Antiinflammatorika ins Gespräch, da sie – vornehmlich mittels des CB<sub>2</sub> Rezeptors – die Aktivierung von Entzündungszellen hemmen können. Welche Möglichkeiten zur klinischen Anwendung sich daraus ergeben könnten, ist Gegenstand zahlreicher aktueller Studien (Klein, 2005). Denkbar wäre beispielsweise ein Einsatz bei der Multiplen Sklerose.

#### **5.4.6 Sonstige Erkrankungen**

Neben den bisher genannten gibt es eine Unmenge an weiteren Erkrankungen, bei denen man Therapien evaluiert, die das ECS mit einbeziehen. So wirken Cannabinoide bei cerebraler Ischämie in Nagetieren neuroprotektiv (Pacher et al., 2006), lindern die Verhaltensauffälligkeiten beim Gilles de la Tourette-Syndrom (Müller-Vahl et al., 2003), verlangsamen im Mausmodell die Progression von amyotropher Lateralsklerose (Bilsland et al., 2006) oder verbessern Spastiken und andere Symptome bei Multipler Sklerose (Teare und Zajicek, 2005). Bei der Schizophrenie vermuten verschiedene

Autoren eine kausale Beteiligung des ECS im Sinne einer Überaktivierung (Lavolette und Grace, 2006).

Pacher (2006) nennt sechs verschiedene Qualitäten cannabinoiderger Effekte auf den Organismus, die man sich therapeutisch zunutze machen kann: 1. Hemmung der Glutamatausschüttung; 2. Modulation von Immun- und Entzündungsreaktionen; 3. Aktivierung zytoprotektiver Signalkaskaden; 4. Beeinflussung der Zellerregung und der Calcium-Homöostase; 5. Antioxidative Effekte; 6. Hypothermie (Pacher et al., 2006).

Damit ist die Menge der Krankheiten schier unerschöpflich, bei denen ein Einfluss des ECS und somit eine das ECS betreffende therapeutische Option denkbar ist. Die Forschung wird es in den kommenden Jahren und Jahrzehnten nicht einfach haben, der Komplexität cannabinoiderger Wechselwirkungen klare Aussagen zu entlocken und sie in medizinische Konzepte mit einzubinden. Der Lohn für derartige Bemühungen verspricht jedoch groß zu sein.

## **6 Zusammenfassung**

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand das endogene Cannabinoid Anandamid. In insgesamt 8 verschiedenen Schnittebenen untersuchten wir mittels in situ Hybridisierung die RNA-Expression des synthetisierenden Enzyms NAPE-PLD, des Rezeptors CB<sub>1</sub> und des abbauenden Enzyms FAAH im menschlichen Gehirn.

Für die NAPE-PLD war es die erste Lokalisationsstudie in zellulärer Auflösung. Dabei ließ sich das Transkript in allen Hirnregionen nachweisen, wobei die höchsten Werte im Cortex und die niedrigsten in der basolateralen Amygdala gemessen wurden. Die Schwankungen der Signalstärke zwischen den einzelnen Zellen waren insgesamt eher gering.

Was das CB<sub>1</sub> Oligonukleotid betrifft, so erfassten unsere Untersuchungen weit mehr Hirnregionen und Einzelzellen als bisherige in situ Hybridisierungen am menschlichen Gehirn dies geleistet hatten. Die höchste Expression ergab sich für die Neurone von Cortex, Hippocampus, Amygdala und Kleinhirn, die niedrigste für den Thalamus. Die verschiedenen Zelltypen zeigten dabei sehr unterschiedliche Signalintensitäten. In einer ergänzenden Immunhistochemie gewannen wir Klarheit über die tatsächliche Lokalisation des Rezeptorproteins. Im Wesentlichen bestätigten sich hier die Erkenntnisse vorangegangener IHC-Studien Nagetieren und Primaten.

Für die FAAH war es die erste umfassende in situ Hybridisierung im Gehirn des Menschen. Bei insgesamt ziemlich geringer Diskrepanz in der Signalausprägung zwischen den einzelnen Zellen, war auch hier im Cortex die höchste Expression zu beobachten. Am schwächsten stellte sich der Hippocampus dar.

Unter Berücksichtigung aktueller Publikationen stellten wir schließlich Überlegungen zum Stoffwechsel und zur Wirkung von Anandamid an lokalen Synapsen an und konnten aufzeigen, dass in nahezu allen untersuchten Neuronen – geht man von der Expression der mRNA aus – eine Produktion und ein Abbau von Anandamid theoretisch möglich ist. Die weitgehend unklare Bedeutung der anderen Endocannabinoide wie 2-AG macht es jedoch schwierig, die Rolle von Anandamid an den einzelnen Synapsen abzuschätzen. Lediglich Tendenzen lassen sich feststellen. So erscheint es zum Beispiel angesichts der hohen Expression von CB<sub>1</sub> und dem schwachen Signal von NAPE-PLD und FAAH in Hippocampus und Amygdala eher unwahrscheinlich, dass Anandamid in diesen Hirnregionen das dominante Endocannabinoid ist.

Insgesamt soll unsere Studie einen Beitrag dazu leisten, den Anandamid-Stoffwechsel und seine anatomischen Korrelate im menschlichen Gehirn besser zu verstehen und künftigen Experimenten, die die Funktion des Endocannabinoidsystems auf zellulärer Ebene untersuchen, als Orientierungshilfe dienen.

## 7 Anhang

### 7.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien ohne Herstellerangabe wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> :	AMPUWA® (Fa. Fresenius)
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> :	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> wird mit 0,1%v/v DEPC (Diethylpyrocarbonat) versetzt und ca. 12 Stunden gerührt, bevor es autoklaviert wird.
H <sub>2</sub> O <sub>PCRgrade</sub> :	hochreines H <sub>2</sub> O; auf RNase- und DNase-Freiheit getestet

#### 7.1.1 Anfertigen der Gefrierschnitte / Histologie

Poly-L-Lysin-Lösung:	0,01% w/v Poly-L-Lysin in H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
Thioninlösung:	0,05% w/v Thioninblau; gelöst in einem Puffer aus 0,1 M Essigsäure und 0,1 M Natriumacetat

#### 7.1.2 *In situ* Hybridisierung

(siehe auch 3.3.5)

10x PBS (RNA):	1,3 M NaCl, 70 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 30 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
20x SSC:	3,0 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat; pH 7,0
TdT:	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (aus Kalbsthymus, 25 U/μl; Fa. Roche Diagnostika); Kit enthält auch den TdT-Puffer und CoCl <sub>2</sub> (25 mM)
[ <sup>33</sup> P]dATPαP:	[ <sup>33</sup> P]-Desoxyadenosin-5'-(α-Phospho-)Triphosphat (Fa. NEN Perkin Elmer)
TNES-Puffer:	140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 0,1% SDS
Polyacrylamid-Säulen:	Bio-Spin 6 Chromatography Columns (Fa. Bio-Rad)
DTT-Lösung:	1,0 M Dithiotreitol in H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
Paraformaldehyd-Lsg.:	4% w/v Paraformdehyd (Merck) wird in 1x PBS (RNA) für ca. 15 min. auf 60°C erhitzt und nach der Klärung der Lösung (was durch Zugabe von wenigen Tropfen 1M NaOH katalysiert wird) filtriert und abgekühlt
Hybridisierungspuffer:	50% v/v Formamide (Fa. Fluka), 10% w/v Dextran (MG>350 000 g/mol; Fa. Fluka); 5x Denhardts Lösung (Fa. Fluka), 0,6 M NaCl, 60 mM Na-Citrat, 25 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 1 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , 200 mg/l Einzelstrang DNA (hydrolysiert aus Lachs-Sperma), 100 mg/l Poly-Adenylyat; pH 7,0
Ethanol:	Zur Fixierung und Lagerung der Gewebeschnitte (70 bzw 96%) wird 100% Ethanol (unvergällt, p.A., Fa. Merck) mit H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> verdünnt

**7.1.3 RT-PCR**

Trizol <sup>®</sup> :	Phenol / Guanidiniumisothiocyanat-Gemisch (Invitrogen)
Chloroform:	(für die Molekularbiologie; Fa. Fluka)
Isopropanol 100%:	(für die Molekularbiologie)
Oligo dT <sub>12-18</sub> :	Oligonukleotid aus 12-18 Desoxy-Thymidinbasen (500µg/ml; Fa. Invitrogen)
dNTP-Mix:	Gleichteiliges Gemisch aus dATP, dTTP, dGTP und dCTP (10mM; Fa. Invitrogen)
RNase-Inhibitor:	RNaseOUT <sup>®</sup> (Fa. Invitrogen)
Reverse Transkriptase:	Superscript II <sup>®</sup> (Fa. Invitrogen), der Kit enthält auch 5x First-Strand Puffer und die zur RT verwendete DTT-Lösung (0,1 M)
Taq DNA Polymerase:	Platinum <sup>®</sup> Taq DANN Polymerase (Fa. Invitrogen), der Kit enthält auch 10x PCR-Puffer und MgCl <sub>2</sub> -Lösung (50mM)
TAE-Laufpuffer:	0,4 M Tris-Base, 0,2 M Essigsäure, 10 mM EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Agarosegel:	2% w/v Agarose werden in TAE-Laufpuffer aufgekocht, mit 1,0 µl/100ml Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) versetzt, in die Gelkammer gegossen und nach dem Erkalten bei Raumtemperatur verwendet

**7.1.4 Oligonukleotide und Primer**

*Oligonukleotide zur In situ Hybridisierung:*

NAPE-PLD:

5'-TTG CAT CCA GTC AAG GAG ACC CAA AGG CAC AAA CCA TCT C-3';

Länge: 40mer

GC-Gehalt: 50%

CB<sub>1</sub>:

5'-ATC GGT TCT TCA CTG CCG TTG TGT GTC TCA TCC ACT GTC T-3' (CB<sub>1</sub>/CB<sub>1A</sub>)

Länge: 40mer

GC-Gehalt: 50%

5'-CTG GAT GTT CTC CTC ATT CTC CTT TGA TGT CTT CGT ACT G-3' (CB<sub>1A</sub>)

Länge: 40mer

GC-Gehalt: 45%

FAAH:

5'-GCA GTC ATA GCT GAA CAT GGA CTG TGG AAC ATT GGT GTG C-3'

Länge: 40mer

GC-Gehalt: 50%

*Primer zur RT-PCR:*

CB<sub>1</sub>:

Sense: 5'-GCA CCA TCA CCA CTG ACC-3'

Länge: 18mer

GC-Gehalt: 61%

Antisense: 5'-CAC GTT GCG GCT ATC TTT-3'

Länge: 18mer

GC-Gehalt: 50%

**7.1.5 Immunhistochemie**

10x PBS: 1,3 M NaCl, 70 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Fixativ: 4% Paraformaldehyd / 0,4% Pikrinsäure-Lösung

Herstellung der Paraformaldehyd-Lösung (4%) wie unter 7.1.2 beschrieben, wobei jedoch keien 1x PBS (RNA), sondern mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> angesetztes PBS verwendet wird. Nach dem Abkühlen der Paraformaldehyd-Lösung wird gesättigte Pikrinsäure-Lösung (4 ml/l) zugegeben

PBSTN: 1x PBS, 0,3% v/v Triton-X, 2,5% v/v Normalserum der Ziege (Fa. Vector)

PBSN: 1x PBS, 10% v/v Normalserum der Ziege (Fa. Vector)

Primärantikörper: N-terminale Meerschweinchen-IgG gegen humanes CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Protein (Fa. Sigma)

Sekundärantikörper: Biotinylierter Antikörper gegen IgG des Meerschweinchens (Fa. Vector)

ABC-Komplex: Avidin-Meerrettichperoxidase-Komplex (Fa. Vector)

DAB-Lösung: Diaminobenzidin-Lösung (4% w/v in 0,06% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0,2% w/v NiCl<sub>2</sub>; Fa. Vector)

## 7.2 Literaturverzeichnis

- Anwyl R. 2006. Induction and expression mechanisms of postsynaptic NMDA receptor-independent homosynaptic long-term depression. *Prog Neurobiol* 78(1):17-37.
- Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F. 2000. Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83(6):3287-3293.
- Azad SC, Eder M, Marsicano G, Lutz B, Zieglgansberger W, Rammes G. 2003. Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse. *Learn Mem* 10(2):116-128.
- Azad SC, Monory K, Marsicano G, Cravatt BF, Lutz B, Zieglgansberger W, Rammes G. 2004. Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling. *J Neurosci* 24(44):9953-9961.
- Bacci A, Huguenard JR, Prince DA. 2004. Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. *Nature* 431(7006):312-316.
- Barnes MP. 2006. Sativex: clinical efficacy and tolerability in the treatment of symptoms of multiple sclerosis and neuropathic pain. *Expert Opin Pharmacother* 7(5):607-615.
- Beierlein M, Regehr WG. 2006. Local interneurons regulate synaptic strength by retrograde release of endocannabinoids. *J Neurosci* 26(39):9935-9943.
- Bellocchio L, Mancini G, Vicennati V, Pasquali R, Pagotto U. 2006. Cannabinoid receptors as therapeutic targets for obesity and metabolic diseases. *Curr Opin Pharmacol*.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. 1997. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277(5329):1094-1097.
- Benito C, Nunez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ, Romero J. 2003. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 23(35):11136-11141.
- Bilsland LG, Dick JR, Pryce G, Petrosino S, Di Marzo V, Baker D, Greensmith L. 2006. Increasing cannabinoid levels by pharmacological and genetic manipulation delay disease progression in SOD1 mice. *FASEB J* 20(7):1003-1005.
- Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, Di Marzo V. 1999. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* 256(2):377-380.
- Bodor AL, Katona I, Nyiri G, Mackie K, Ledent C, Hajos N, Freund TF. 2005. Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. *J Neurosci* 25(29):6845-6856.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 312 ( Pt 2):637-641.
- Bramblett RD, Panu AM, Ballesteros JA, Reggio PH. 1995. Construction of a 3D model of the cannabinoid CB1 receptor: determination of helix ends and helix orientation. *Life Sci* 56(23-24):1971-1982.
- Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR. 2001. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 60(1):155-163.
- Breivogel CS, Sim LJ, Childers SR. 1997. Regional differences in cannabinoid receptor/G-protein coupling in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 282(3):1632-1642.
- Brenowitz SD, Regehr WG. 2003. Calcium dependence of retrograde inhibition by endocannabinoids at synapses onto Purkinje cells. *J Neurosci* 23(15):6373-6384.
- Burns TL, Ineck JR. 2006. Cannabinoid analgesia as a potential new therapeutic option in the treatment of chronic pain. *Ann Pharmacother* 40(2):251-260.
- Cabral GA, Staab A. 2005. Effects on the immune system. *Handb Exp Pharmacol*(168):385-423.
- Caulfield MP, Brown DA. 1992. Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol* 106(2):231-232.
- Chen K, Ratzliff A, Hilgenberg L, Gulyas A, Freund TF, Smith M, Dinh TP, Piomelli D, Mackie K, Soltesz I. 2003. Long-term plasticity of endocannabinoid signaling induced by developmental febrile seizures. *Neuron* 39(4):599-611.
- Chevalere V, Castillo PE. 2003. Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38(3):461-472.
- Chevalere V, Takahashi KA, Castillo PE. 2006. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 29:37-76.
- Cichewicz DL, McCarthy EA. 2003. Antinociceptive synergy between delta(9)-tetrahydrocannabinol and opioids after oral administration. *J Pharmacol Exp Ther* 304(3):1010-1015.
- Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH. 2001. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16):9371-9376.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384(6604):83-87.
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V. 2006. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139(4):1405-1415.

- Desarnaud F, Cadas H, Piomelli D. 1995. Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization. *J Biol Chem* 270(11):6030-6035.
- Deutsch DG, Ueda N, Yamamoto S. 2002. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66(2-3):201-210.
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34(5):605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258(5090):1946-1949.
- Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR. 2000. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem* 75(6):2434-2444.
- Di Marzo V, Deutsch DG. 1998. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis* 5(6 Pt B):386-404.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. 2001. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410(6830):822-825.
- Di Marzo V, Matias I. 2005. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 8(5):585-589.
- Di S, Boudaba C, Popescu IR, Weng FJ, Harris C, Marcheselli VL, Bazan NG, Tasker JG. 2005a. Activity-dependent release and actions of endocannabinoids in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. *J Physiol* 569(Pt 3):751-760.
- Di S, Malcher-Lopes R, Marcheselli VL, Bazan NG, Tasker JG. 2005b. Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology* 146(10):4292-4301.
- Diana MA, Levenes C, Mackie K, Marty A. 2002. Short-term retrograde inhibition of GABAergic synaptic currents in rat Purkinje cells is mediated by endogenous cannabinoids. *J Neurosci* 22(1):200-208.
- Diana MA, Marty A. 2004. Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE). *Br J Pharmacol* 142(1):9-19.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D. 2002. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16):10819-10824.
- Domenici MR, Azad SC, Marsicano G, Schierloh A, Wotjak CT, Dodt HU, Zieglansberger W, Lutz B, Rammes G. 2006. Cannabinoid receptor type 1 located on presynaptic terminals of principal neurons in the forebrain controls glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* 26(21):5794-5799.
- Edwards DA, Kim J, Alger BE. 2006. Multiple mechanisms of endocannabinoid response initiation in hippocampus. *J Neurophysiol* 95(1):67-75.
- 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, Elphick MR. 2000. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol* 422(2):159-171.
- Eggan SM, Lewis DA. 2006. Immunocytochemical Distribution of the Cannabinoid CB1 Receptor in the Primate Neocortex: A Regional and Laminar Analysis. *Cereb Cortex*.
- Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. 1996. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett* 393(2-3):231-235.
- Felder CC, Veluz JS, Williams HL, Briley EM, Matsuda LA. 1992. Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones. *Mol Pharmacol* 42(5):838-845.
- Fernandez-Espejo E, Caraballo I, de Fonseca FR, El Banoua F, Ferrer B, Flores JA, Galan-Rodriguez B. 2005. Cannabinoid CB1 antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental parkinsonism. *Neurobiol Dis* 18(3):591-601.
- Fernandez-Ruiz J, Lastres-Becker I, Cabranes A, Gonzalez S, Ramos JA. 2002. Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66(2-3):257-267.
- Fortin DA, Levine ES. 2006. Differential Effects of Endocannabinoids on Glutamatergic and GABAergic Inputs to Layer 5 Pyramidal Neurons. *Cereb Cortex*.
- Fortin DA, Trettel J, Levine ES. 2004. Brief trains of action potentials enhance pyramidal neuron excitability via endocannabinoid-mediated suppression of inhibition. *J Neurophysiol* 92(4):2105-2112.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83(3):1017-1066.
- Fusco FR, Martorana A, Giampa C, De March Z, Farini D, D'Angelo V, Sancesario G, Bernardi G. 2004. Immunolocalization of CB1 receptor in rat striatal neurons: a confocal microscopy study. *Synapse* 53(3):159-167.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232(1):54-61.
- Gaoni Y, Mechoulam R. 1964. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86:1646-1647.
- Gauriau C, Bernard JF. 2002. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol* 87(2):251-258.

- Gelfand EV, Cannon CP. 2006. Rimonabant: a cannabinoid receptor type 1 blocker for management of multiple cardiometabolic risk factors. *J Am Coll Cardiol* 47(10):1919-1926.
- Gerard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. 1991. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 279 ( Pt 1):129-134.
- Gerdeman G, Lovinger DM. 2001. CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol* 85(1):468-471.
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM. 2002. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 5(5):446-451.
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. 1999. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 2(4):358-363.
- Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG. 2003. Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7):4269-4274.
- Glass M, Dragunow M, Faull RL. 1997. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77(2):299-318.
- Glass M, Dragunow M, Faull RL. 2000. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97(3):505-519.
- Glass M, Faull RL, Dragunow M. 1993. Loss of cannabinoid receptors in the substantia nigra in Huntington's disease. *Neuroscience* 56(3):523-527.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071(1):10-23.
- Gonzalez S, Scorticati C, Garcia-Arencibia M, de Miguel R, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J. 2006. Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1073-1074:209-219.
- Griffin G, Wray EJ, Tao Q, McAllister SD, Rorrer WK, Aung MM, Martin BR, Abood ME. 1999. Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol* 377(1):117-125.
- Gubellini P, Picconi B, Bari M, Battista N, Calabresi P, Centonze D, Bernardi G, Finazzi-Agro A, Maccarrone M. 2002. Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci* 22(16):6900-6907.
- Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF. 2004. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci* 20(2):441-458.
- Guzman M. 2003. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 3(10):745-755.
- Hajos N, Katona I, Naiem SS, MacKie K, Ledent C, Mody I, Freund TF. 2000. Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci* 12(9):3239-3249.
- Hajos N, Ledent C, Freund TF. 2001. Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience* 106(1):1-4.
- Haller J, Bakos N, Szirmay M, Ledent C, Freund TF. 2002. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci* 16(7):1395-1398.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2001. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7):3662-3665.
- Hanus L, Avraham Y, Ben-Shushan D, Zolotarev O, Berry EM, Mechoulam R. 2003. Short-term fasting and prolonged semistarvation have opposite effects on 2-AG levels in mouse brain. *Brain Res* 983(1-2):144-151.
- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Ogata H, Emoto K, Maejima T, Araishi K, Shin HS, Kano M. 2005. Phospholipase C $\beta$  serves as a coincidence detector through its Ca<sup>2+</sup> dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron* 45(2):257-268.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11(2):563-583.
- Hillard CJ, Harris RA, Bloom AS. 1985. Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies. *J Pharmacol Exp Ther* 232(3):579-588.
- Hillard CJ, Jarrhian A. 2000. The movement of N-arachidonyl ethanolamine (anandamide) across cellular membranes. *Chem Phys Lipids* 108(1-2):123-134.
- Hillard CJ, Wilkison DM, Edgmond WS, Campbell WB. 1995. Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonyl ethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1257(3):249-256.
- Hohmann AG, Herkenham M. 1999. Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience* 90(3):923-931.
- Hohmann AG, Herkenham M. 2000. Localization of cannabinoid CB(1) receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse* 37(1):71-80.
- Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. 2005. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435(7045):1108-1112.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54(2):161-202.

- Howlett AC, Fleming RM. 1984. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 26(3):532-538.
- Julian MD, Martin AB, Cuellar B, Rodriguez De Fonseca F, Navarro M, Moratalla R, Garcia-Segura LM. 2003. Neuroanatomical relationship between type I cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 119(1):309-318.
- Jung KM, Mangieri R, Stapleton C, Kim J, Fegley D, Wallace M, Mackie K, Piomelli D. 2005. Stimulation of endocannabinoid formation in brain slice cultures through activation of group I metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 68(5):1196-1202.
- Karst M, Salim K, Burstein S, Conrad I, Hoy L, Schneider U. 2003. Analgesic effect of the synthetic cannabinoid CT-3 on chronic neuropathic pain: a randomized controlled trial. *Jama* 290(13):1757-1762.
- Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF. 2001. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci* 21(23):9506-9518.
- Katona I, Sperlagh B, Magloczky Z, Santha E, Kofalvi A, Czirjak S, Mackie K, Vizi ES, Freund TF. 2000. GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience* 100(4):797-804.
- Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kofalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF. 1999. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19(11):4544-4558.
- Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF. 2006. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 26(21):5628-5637.
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M. 2006. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* 26(11):2991-3001.
- Klein TW. 2005. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol* 5(5):400-411.
- Klein TW, Friedman H, Specter S. 1998. Marijuana, immunity and infection. *J Neuroimmunol* 83(1-2):102-115.
- Kofalvi A, Rodrigues RJ, Ledent C, Mackie K, Vizi ES, Cunha RA, Sperlagh B. 2005. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci* 25(11):2874-2884.
- Kreitzer AC, Regehr WG. 2001a. Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *J Neurosci* 21(20):RC174.
- Kreitzer AC, Regehr WG. 2001b. Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29(3):717-727.
- Lastres-Becker I, Cebeira M, de Ceballos ML, Zeng BY, Jenner P, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ. 2001a. Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. *Eur J Neurosci* 14(11):1827-1832.
- Lastres-Becker I, de Miguel R, De Petrocellis L, Makriyannis A, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz J. 2003a. Compounds acting at the endocannabinoid and/or endovanilloid systems reduce hyperkinesia in a rat model of Huntington's disease. *J Neurochem* 84(5):1097-1109.
- Lastres-Becker I, De Miguel R, Fernandez-Ruiz JJ. 2003b. The endocannabinoid system and Huntington's disease. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2(5):335-347.
- Lastres-Becker I, Fezza F, Cebeira M, Bisogno T, Ramos JA, Milone A, Fernandez-Ruiz J, Di Marzo V. 2001b. Changes in endocannabinoid transmission in the basal ganglia in a rat model of Huntington's disease. *Neuroreport* 12(10):2125-2129.
- Lastres-Becker I, Gomez M, De Miguel R, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J. 2002. Loss of cannabinoid CB(1) receptors in the basal ganglia in the late akinetic phase of rats with experimental Huntington's disease. *Neurotox Res* 4(7-8):601-608.
- Laviolette SR, Grace AA. 2006. The roles of cannabinoid and dopamine receptor systems in neural emotional learning circuits: implications for schizophrenia and addiction. *Cell Mol Life Sci* 63(14):1597-1613.
- Li H. 1978. Hallucinogenic plants in Chinese herbals. *J Psychodelic Drugs* 10(1):17-26.
- Li H, Lin H. 1974. An archeological and historical account of cannabis in China. *Econ Bot* 28(4):437-447.
- Lichtman AH, Cook SA, Martin BR. 1996. Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. *J Pharmacol Exp Ther* 276(2):585-593.
- Lichtman AH, Hawkins EG, Griffin G, Cravatt BF. 2002. Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 302(1):73-79.
- Ligresti A, Morera E, Van Der Stelt M, Monory K, Lutz B, Ortas G, Di Marzo V. 2004. Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide. *Biochem J* 380(Pt 1):265-272.
- Llano I, Leresche N, Marty A. 1991. Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* 6(4):565-574.
- Lomo T. 2003. The discovery of long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1432):617-620.
- Lynn AB, Herkenham M. 1994. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther* 268(3):1612-1623.
- Maccarrone M, Wenger T. 2005. Effects of cannabinoids on hypothalamic and reproductive function. *Handb Exp Pharmacol* (168):555-571.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. 1995. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 15(10):6552-6561.

- Maejima T, Oka S, Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Aiba A, Wu D, Waku K, Sugiura T, Kano M. 2005. Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca<sup>2+</sup>-assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase Cbeta4 signaling cascade in the cerebellum. *J Neurosci* 25(29):6826-6835.
- Mailleux P, Parmentier M, Vanderhaeghen JJ. 1992. Distribution of cannabinoid receptor messenger RNA in the human brain: an in situ hybridization histochemistry with oligonucleotides. *Neurosci Lett* 143(1-2):200-204.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. 1992. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48(3):655-668.
- Maione S, Bisogno T, de Novellis V, Palazzo E, Cristino L, Valenti M, Petrosino S, Guglielmotti V, Rossi F, Di Marzo V. 2006. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 316(3):969-982.
- Makara JK, Mor M, Fegley D, Szabo SI, Kathuria S, Astarita G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Rivara S, Freund TF, Piomelli D. 2005. Selective inhibition of 2-AG hydrolysis enhances endocannabinoid signaling in hippocampus. *Nat Neurosci* 8(9):1139-1141.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B. 2003. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302(5642):84-88.
- Marsicano G, Lutz B. 1999. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 11(12):4213-4225.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Lutz B. 2002. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418(6897):530-534.
- Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. 2002. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 159(4):379-387.
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ. 1993. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 327(4):535-550.
- 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.
- McFarland MJ, Barker EL. 2004. Anandamide transport. *Pharmacol Ther* 104(2):117-135.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. 1995. Identification of an endogenous 2-monoacylglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50(1):83-90.
- Mechoulam R, Gaoni Y. 1967. The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett* 12:1109-1111.
- Melone MA, Jori FP, Peluso G. 2005. Huntington's disease: new frontiers for molecular and cell therapy. *Curr Drug Targets* 6(1):43-56.
- Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A. 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.
- Mikuriya TH. 1969. Marijuana in medicine: past, present and future. *Calif Med* 110(1):34-40.
- Moldrich G, Wenger T. 2000. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* 21(11):1735-1742.
- Molina-Holgado F, Gonzalez MI, Leret ML. 1995. Effect of delta 9-tetrahydrocannabinol on short-term memory in the rat. *Physiol Behav* 57(1):177-179.
- Monory K, Massa F, Egertova M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker M, Long J, Rubenstein JL, Goebbels S, Nave KA, Doring M, Klugmann M, Wolfel B, Dodt HU, Zieglgansberger W, Wotjak CT, Mackie K, Elphick MR, Marsicano G, Lutz B. 2006. The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51(4):455-466.
- Monory K, Tzavara ET, Lexime J, Ledent C, Parmentier M, Borsodi A, Hanoune J. 2002. Novel, not adenylyl cyclase-coupled cannabinoid binding site in cerebellum of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 292(1):231-235.
- Moreau J. 1845. *Du Hachisch et de l'Alienation Mentale: Etudes Psychologiques*. Paris: Librairie de Fortin Mason.
- Morishita J, Okamoto Y, Tsuboi K, Ueno M, Sakamoto H, Maekawa N, Ueda N. 2005. Regional distribution and age-dependent expression of N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D in rat brain. *J Neurochem* 94(3):753-762.
- Mukhopadhyay S, Howlett AC. 2001. CB1 receptor-G protein association. Subtype selectivity is determined by distinct intracellular domains. *Eur J Biochem* 268(3):499-505.
- Müller-Vahl KR, Schneider U, Prevedel H, Theloe K, Kolbe H, Daldrup T, Emrich HM. 2003. Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) is effective in the treatment of tics in Tourette syndrome: a 6-week randomized trial. *J Clin Psychiatry* 64(4):459-465.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365(6441):61-65.
- O'Shaughnessy W. 1843. On the cannabis indica or Indian hemp. *Pharmacol J* 2:594.
- Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Maejima T, Kano M. 2005. Calcium signaling and synaptic modulation: regulation of endocannabinoid-mediated synaptic modulation by calcium. *Cell Calcium* 38(3-4):369-374.
- Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29(3):729-738.

- Ohno-Shosaku T, Matsui M, Fukudome Y, Shosaku J, Tsubokawa H, Taketo MM, Manabe T, Kano M. 2003. Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 18(1):109-116.
- Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Mizushima I, Yoneda N, Zimmer A, Kano M. 2002. Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *J Neurosci* 22(10):3864-3872.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. 2004. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 279(7):5298-5305.
- Ong WY, Mackie K. 1999. A light and electron microscopic study of the CB1 cannabinoid receptor in primate brain. *Neuroscience* 92(4):1177-1191.
- Ottani A, Leone S, Sandrini M, Ferrari A, Bertolini A. 2006. The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 531(1-3):280-281.
- Pacher P, Batkai S, Kunos G. 2006. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 58(3):389-462.
- Pagotto U, Cervino C, Vicennati V, Marsicano G, Lutz B, Pasquali R. 2006. How many sites of action for endocannabinoids to control energy metabolism? *Int J Obes (Lond)* 30 Suppl 1:S39-43.
- Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA. 1998. Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res* 51(3):391-402.
- Pisani A, Fezza F, Galati S, Battista N, Napolitano S, Finazzi-Agro A, Bernardi G, Brusa L, Pierantozzi M, Stanzione P, Maccarrone M. 2005. High endogenous cannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of untreated Parkinson's disease patients. *Ann Neurol* 57(5):777-779.
- Pitler TA, Alger BE. 1992. Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 12(10):4122-4132.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. 2002. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 301(3):1020-1024.
- Puffenbarger RA, Boothe AC, Cabral GA. 2000. Cannabinoids inhibit LPS-inducible cytokine mRNA expression in rat microglial cells. *Glia* 29(1):58-69.
- Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML. 2005. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 25(8):1904-1913.
- Richfield EK, Herkenham M. 1994. Selective vulnerability in Huntington's disease: preferential loss of cannabinoid receptors in lateral globus pallidus. *Ann Neurol* 36(4):577-584.
- Riedel G, Davies SN. 2005. Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. *Handb Exp Pharmacol*(168):445-477.
- Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ. 2002. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12):8384-8388.
- Robson P. 2005. Human studies of cannabinoids and medicinal cannabis. *Handb Exp Pharmacol*(168):719-756.
- Rodriguez de Fonseca F, Del Arco I, Martin-Calderon JL, Gorriti MA, Navarro M. 1998. Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiol Dis* 5(6 Pt B):483-501.
- Rogan MT, Staubli UV, LeDoux JE. 1997. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390(6660):604-607.
- Romero J, Berrendero F, Garcia-Gil L, de la Cruz P, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ. 1998. Loss of cannabinoid receptor binding and messenger RNA levels and cannabinoid agonist-stimulated [35S]guanylyl-5'-O-(thio)-triphosphate binding in the basal ganglia of aged rats. *Neuroscience* 84(4):1075-1083.
- Romero J, Berrendero F, Perez-Rosado A, Manzanares J, Rojo A, Fernandez-Ruiz JJ, de Yebenes JG, Ramos JA. 2000. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *Life Sci* 66(6):485-494.
- Romero J, Hillard CJ, Calero M, Rabano A. 2002. Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study. *Brain Res Mol Brain Res* 100(1-2):85-93.
- Ronesi J, Lovinger DM. 2005. Induction of striatal long-term synaptic depression by moderate frequency activation of cortical afferents in rat. *J Physiol* 562(Pt 1):245-256.
- Ryberg E, Vu HK, Larsson N, Groblewski T, Hjorth S, Elebring T, Sjogren S, Greasley PJ. 2005. Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS Lett* 579(1):259-264.
- Safó PK, Regehr WG. 2005. Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD. *Neuron* 48(4):647-659.
- Sanudo-Pena MC, Tsou K, Walker JM. 1999. Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life Sci* 65(6-7):703-713.
- Sanudo-Pena MC, Walker JM. 1998. Effects of intrapallidal cannabinoids on rotational behavior in rats: interactions with the dopaminergic system. *Synapse* 28(1):27-32.
- Shepherd GM. 2004. *The Synaptic Organization of the Brain*. New York: Oxford University Press, Inc.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. 1995. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem* 270(8):3726-3731.
- Sipe JC, Waalen J, Gerber A, Beutler E. 2005. Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Int J Obes (Lond)* 29(7):755-759.
- Sjostrom PJ, Turrigiano GG, Nelson SB. 2003. Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron* 39(4):641-654.

- Sjostrom PJ, Turrigiano GG, Nelson SB. 2004. Endocannabinoid-dependent neocortical layer-5 LTD in the absence of postsynaptic spiking. *J Neurophysiol* 92(6):3338-3343.
- Slanina KA, Roberto M, Schweitzer P. 2005. Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. *Neuropharmacology* 49(5):660-668.
- Stella N, Piomelli D. 2001. Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 425(3):189-196.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388(6644):773-778.
- Straiker A, Mackie K. 2005. Depolarization-induced suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurones. *J Physiol* 569(Pt 2):501-517.
- Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. 2002. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66(2-3):173-192.
- Suplita RL, 2nd, Farthing JN, Gutierrez T, Hohmann AG. 2005. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase enhances cannabinoid stress-induced analgesia: sites of action in the dorsolateral periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Neuropharmacology* 49(8):1201-1209.
- Szabo B, Dorner L, Pfreundtner C, Norenberg W, Starke K. 1998. Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience* 85(2):395-403.
- Szabo B, Schlicker E. 2005. Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol*(168):327-365.
- Szabo B, Urbanski MJ, Bisogno T, Di Marzo V, Mendiguren A, Bar W, Freiman I. 2006. Depolarization-induced retrograde synaptic inhibition in the cerebellar cortex is mediated by 2-arachidonoylglycerol. *J Physiol*.
- Takahashi KA, Castillo PE. 2006. The CB1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus. *Neuroscience* 139(3):795-802.
- Teare L, Zajicek J. 2005. The use of cannabinoids in multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 14(7):859-869.
- Thakur GA, Nikas SP, Li C, Makriyannis A. 2005. Structural requirements for cannabinoid receptor probes. *Handb Exp Pharmacol*(168):209-246.
- Thomas EA, Cravatt BF, Danielson PE, Gilula NB, Sutcliffe JG. 1997. Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system. *J Neurosci Res* 50(6):1047-1052.
- Touw M. 1981. The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs* 13(1):23-34.
- Trettel J, Fortin DA, Levine ES. 2004. Endocannabinoid signalling selectively targets perisomatic inhibitory inputs to pyramidal neurones in juvenile mouse neocortex. *J Physiol* 556(Pt 1):95-107.
- Trettel J, Levine ES. 2002. Cannabinoids depress inhibitory synaptic inputs received by layer 2/3 pyramidal neurons of the neocortex. *J Neurophysiol* 88(1):534-539.
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM. 1998a. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83(2):393-411.
- Tsou K, Nogueron MI, Muthian S, Sanudo-Pena MC, Hillard CJ, Deutsch DG, Walker JM. 1998b. 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.
- Ueda N, Okamoto Y, Morishita J. 2005. N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D: a novel enzyme of the beta-lactamase fold family releasing anandamide and other N-acylethanolamines. *Life Sci* 77(14):1750-1758.
- Ueda N, Puffenbarger RA, Yamamoto S, Deutsch DG. 2000. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chem Phys Lipids* 108(1-2):107-121.
- Valverde O, Karsak M, Zimmer A. 2005. Analysis of the endocannabinoid system by using CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Handb Exp Pharmacol*(168):117-145.
- van Beugen BJ, Nagaraja RY, Hansel C. 2006. Climbing fiber-evoked endocannabinoid signaling heterosynaptically suppresses presynaptic cerebellar long-term potentiation. *J Neurosci* 26(32):8289-8294.
- Vaughan CW, Christie MJ. 2005. Retrograde signalling by endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*(168):367-383.
- Vaughan CW, Connor M, Bagley EE, Christie MJ. 2000. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol Pharmacol* 57(2):288-295.
- Walker JM, Hohmann AG. 2005. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handb Exp Pharmacol*(168):509-554.
- Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sanudo-Pena MC. 1999. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21):12198-12203.
- Wallace MJ, Blair RE, Falenski KW, Martin BR, DeLorenzo RJ. 2003. The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther* 307(1):129-137.
- Walther S, Mahlberg R, Eichmann U, Kunz D. 2006. Delta-9-tetrahydrocannabinol for nighttime agitation in severe dementia. *Psychopharmacology (Berl)* 185(4):524-528.
- Wang X, Dow-Edwards D, Keller E, Hurd YL. 2003. Preferential limbic expression of the cannabinoid receptor mRNA in the human fetal brain. *Neuroscience* 118(3):681-694.
- Weksler ME, Gouras G, Relkin NR, Szabo P. 2005. The immune system, amyloid-beta peptide, and Alzheimer's disease. *Immunol Rev* 205:244-256.
- Wenger T, Jamali KA, Juaneda C, Leonardelli J, Tramu G. 1997. Arachidonyl ethanolamide (anandamide) activates the parvocellular part of hypothalamic paraventricular nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 237(3):724-728.
- Wenger T, Moldrich G. 2002. The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66(2-3):301-307.

- Westlake TM, Howlett AC, Bonner TI, Matsuda LA, Herkenham M. 1994. Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 63(3):637-652.
- Williams CM, Kirkham TC. 2002a. Observational analysis of feeding induced by Delta9-THC and anandamide. *Physiol Behav* 76(2):241-250.
- Williams CM, Kirkham TC. 2002b. Reversal of delta 9-THC hyperphagia by SR141716 and naloxone but not dexfenfluramine. *Pharmacol Biochem Behav* 71(1-2):333-340.
- Wilson RI, Kunos G, Nicoll RA. 2001. Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron* 31(3):453-462.
- Wilson RI, Nicoll RA. 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410(6828):588-592.
- Yanovsky Y, Mades S, Misgeld U. 2003. Retrograde signaling changes the venue of postsynaptic inhibition in rat substantia nigra. *Neuroscience* 122(2):317-328.
- Yoshida T, Hashimoto K, Zimmer A, Maejima T, Araishi K, Kano M. 2002. The cannabinoid CB1 receptor mediates retrograde signals for depolarization-induced suppression of inhibition in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 22(5):1690-1697.
- Zhang PW, Ishiguro H, Ohtsuki T, Hess J, Carillo F, Walther D, Onaivi ES, Arinami T, Uhl GR. 2004. Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Mol Psychiatry* 9(10):916-931.
- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI. 1999. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10):5780-5785.
- Zuardi AW. 2006. History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr* 28(2):153-157.

***Danksagung:***

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Priv.-Doz. Dr. A. Berthele, unter dessen Verantwortung ich vorliegende Arbeit anfertigen durfte, und der mir sämtliche dafür notwendigen Ressourcen zugänglich machte.

Herrn Prof. Dr. B. Conrad möchte ich dafür danken, dass er mich an der von ihm geleiteten Klinik als Doktorand akzeptiert und gefördert hat.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. S. Platzer, der mich mit großer Kompetenz und unermüdlichem Einsatz über die gesamte Dauer der Arbeit intensiv begleitet und beraten hat.

Großer Dank gilt auch Frau M. Nathmann und ihre wertvolle technische Assistenz bei Laborarbeiten.

Insbesondere aber danke ich meinen Eltern und meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung in allen akademischen und privaten Belangen. Ohne diesen Rückhalt wäre die Realisierung dieser Arbeit nicht denkbar gewesen.