

**Institut für Physiologie
Universität Hohenheim
und
Abteilung für Elektrophysiologie des
Naturwissenschaftlichen Medizinischen Instituts (NMI)
Reutlingen**

**Neuronale Modulation:
Der Einfluss von Agonisten und inverser Agonisten
auf das Cannabinoidsystem einer
hippocampalen Primärkultur**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Fakultät Naturwissenschaften
der Universität Hohenheim

vorgelegt von
Oliver Klink
aus Stuttgart

2007

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer

1. berichtende Person: Prof. Dr. Wolfgang Hanke

2. berichtende Person: Prof. Dr. Elke Günther

Eingereicht am: 06.07.07

Mündliche Prüfung am: 13.11.07

Die vorliegende Arbeit wurde am 24.09.07 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	6
	Ziele.....	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Geräte.....	15
2.1.2	Versuchstiere.....	15
2.1.3	Allgemeine Chemikalien.....	15
2.1.4	Antiseren.....	16
2.1.5	Zellkultur und Gewebekulturschalen.....	16
2.1.5.1	Zellkultur-Medien und Agenzien.....	16
2.1.6	Verwendete Substanzen.....	16
2.1.6.1	Agonisten.....	16
2.1.6.2	Inverse Agonisten.....	16
2.1.6.3	sonstige Wirkstoffe.....	16
2.2	Methoden.....	17
2.2.1	Zellkultur	17
2.2.1.1	Präparation.....	17
2.2.1.1.1	Präparation des Hippocampus von E17 Rattenembryonen.....	17
2.2.1.1.2	Präparation des Rattenembryonen-Cortex für die Glia-Kultur.....	17
2.2.1.2	Kultivierung und Pflege der Zellkultur.....	17
2.2.1.2.1	Kultivierung und Pflege der Gliakultur.....	17
2.2.1.2.2	Kultivierung und Pflege der Glia-/Neuronen Kokultur.....	18
2.2.2	Immuncytochemie von Paraformaldehyd-fixierten Zellen.....	18
2.2.3	Patch Clamp Messungen.....	19
2.2.3.1	Aufbau des Patch Clamp Messstandes.....	19
2.2.3.2	Patchpipetten und Puller.....	19
2.2.3.3	Verwendete Messpuffer	20
2.2.3.3.1	Extrazellular-Puffer.....	20
2.2.3.3.2	Intrazellular-Puffer.....	20
2.2.3.4	Verwendete Ableitkonfigurationen.....	20
2.2.3.4.1	Whole Cell Patch-Clamp.....	20

INHALTSVERZEICHNIS IV

2.2.3.4.2 Loose Patch Clamp.....	21
2.2.3.5 Vorbereitung der Zellen für die Messung.....	21
2.2.3.6 Datenerfassung, -aufzeichnung und -auswertung.....	21
3 ERGEBNISSE	23
3.1 Etablierung einer hippocampalen Primärkultur.....	23
3.1.1 Immunzytochemische Lokalisierung der CB1-Rezeptoren.....	23
3.1.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Kultur.....	25
3.1.2.1 Temperaturabhängigkeit der Spikeaktivität.....	25
3.1.2.2 Pharmakologische Blockierung von Spikeaktivität.....	26
3.1.2.2.1 Blockierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen.....	27
3.1.2.2.2 Blockierung von AMPA EPSCs.....	28
3.1.2.3 Spontane EPSC Aktivität der kultivierten Neuronen.....	29
3.1.2.3.1 Spontane AMPA EPSCs.....	29
3.1.2.3.2 Spontane NMDA EPSCs.....	30
3.2 Spontane Spikeaktivität.....	31
3.2.1 Spikeaktivität der primären hippocampalen Neuronen Kultur.....	32
3.2.1 Induktion repetetiver Spikeaktivität (Bursts).....	32
3.3 Modulation neuronaler Aktivität durch Agonisten und Inverser Agonisten des..... Cannabinoidsystems.....	33
3.3.1 Der CB1 Agonist WIN.....	33
3.3.1.1 Effekt von WIN 55,212-2 auf das Bursten der Neuronen.....	33
3.3.1.2 WIN 55,212-2 Dosis-Wirkungs Kurve.....	35
3.3.1.3 Statistische Analyse der Wirkung von WIN 55,212-2 auf Neuronen.....	36
3.3.1.4 Burstanalyse der Wirkung des CB1-Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2.....	37
3.3.2 Der inverse CB1-Rezeptor Agonist AM 251.....	40
3.3.2.1 Effekt von AM 251 auf das Bursten von Neuronen.....	40
3.3.2.2 AM 251 Dosis-Wirkungs Kurve.....	41
3.3.2.3 Statistische Analyse der Wirkung von AM 251 auf Neuronen.....	42
3.3.2.3 Burstanalyse der Wirkung des inversen CB1-Rezeptor Agonisten AM 251.....	43
3.3.3 Der inverse CB1-Rezeptor Agonist Rimonabant.....	45
3.3.3.1 Effekt von Rimonabant auf das Bursten von Neuronen.....	45
3.3.3.2 Rimonabant Dosis-Wirkungs Kurve.....	46
3.3.3.3 Statistische Analyse der Wirkung von Rimonabant.....	47

INHALTSVERZEICHNIS V

3.3.3.4	Burstanalyse der Wirkung von Rimonabant.....	48
3.3.4	Koapplikation von WIN 55,212-2 und Rimonabant.....	51
3.3.4.1	Dosis-Wirkungs Kurve von Rimonabant bei Koapplikation von WIN 55,212-2....	51
3.3.4.2	Statistische Analyse der Wirkung von Rimonabant unter Koapplikation von..... WIN 55,212-2.....	52
3.3.4.4	Burstanalyse der Koapplikation von Rimonabant und WIN 55,212-2.....	53
3.4	Einfluss der cAMP Signaltransduktion auf Rimonabant und WIN 55,212-2.....	55
3.4.1	Wirkung von WIN 55,212-2 bei gleichzeitiger Blockierung der cAMP..... Signalkaskade.....	56
3.4.2	Wirkung von Rimonabant bei gleichzeitiger Blockierung der cAMP..... Signalkaskade.....	57
3.5	Wirkung von Rimonabant bei gleichzeitiger Blockierung des μ -Opioid Rezeptors.....	58
4	DISKUSSION.....	59
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	64
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	66
	ANHANG.....	80
	Anhang A.....	80
	Summary.....	80
	Anhang B.....	81
	Schematische Darstellung eines TRP Kanals.....	81
	Anhang C.....	82
	Schematische Darstellung der Herstellung der Kokultur.....	82
	Anhang D.....	83
	Lichtmikroskopische Bilder der Neuronenkultur.....	83
	Anhang E.....	84
	Aufbau des Messstandes und der Perfussionskammer.....	84
	Anhang F.....	85
	Allosterisches Selektionsmodell.....	85
	Anhang G.....	86
	Strukturformeln der verwendeten Cannabinoide.....	86

1 EINLEITUNG

Als Cannabinoide bezeichnet man eine heterogene Gruppe biogener und synthetischer Substanzen, die zu (-)-trans- Δ_9 -Tetra-hydrocannabinol (Δ_9 -THC) analoge pharmakologische Charakteristika zeigen, sowie weitere Substanzen, die in den Pflanzen *Cannabis sativa*, *-indica* und *-ruderalis* vorkommen. Δ_9 -THC ist qualitativ und quantitativ betrachtet der stärkste unter den bekannten psychogenen Inhaltsstoffen der Hanfpflanze. Pharmakologisch versteht man unter Cannabinoiden Substanzen, die an einen oder beide der zwei bekannten Cannabinoid-Rezeptoren (CB₁ bzw. CB₂) binden und über diese Rezeptoren charakteristische pharmakologische Effekte vermitteln.

Die wichtigsten neben Δ_9 -THC-Säure sind Cannabidiolsäure und Cannabinolsäure. Allerdings konnte an der Technischen Hochschule in Zürich gezeigt werden, dass N-Isobutylamide von *Echinacea* eine neue Klasse von Cannabinoiden sein könnten, die an die peripheren CB₂ Cannabinoid Rezeptoren auf Immunzellen binden aber nicht an die CB₁ Rezeptoren im zentralen Nervensystem (Raduner et al., 2006;). Somit ist *Cannabis sativa* nicht die einzige Pflanze, welche Cannabinoid-Rezeptor Liganden herstellt (Woelkart et al., 2005; Gertsch et al., 2004)

Mit der Entdeckung der Strukturformel der Substanz Δ_9 -THC 1964 begann die Erforschung von Cannabinoiden und somit die Suche nach weiteren, ähnlich wirksamen Substanzen, sowie die Aufklärung ihrer pharmakologischen Wirkung. 1965 gelang Mechoulam die Synthese von razemischem Δ_9 -Tetrahydrocannabinol (Mechoulam und Gaoni, 1965). Bis heute sind eine Vielzahl von Cannabinoid-Rezeptor-Liganden synthetisiert worden, die sich teilweise stark in ihrer chemischen Struktur von Δ_9 -THC unterscheiden. Ein Nachteil der meisten bisher bekannten Cannabinoid-Rezeptor-Liganden ist deren hohe Lipophilie, die eine Untersuchung in physiologischen Puffern, ihren Einsatz in pharmakologischen Experimenten im Labor und ihre mögliche Verwendung als Wirkstoffe in der Therapie erschwert. Des weiteren können diese stark lipophilen Substanzen die Blut-Hirn Schranke leichter passieren und könnten somit sehr wahrscheinlich zu Nebenwirkungen im ZNS und Immunsystem führen. Auch unterscheiden viele Cannabinoid-Rezeptor-Liganden

nicht zwischen den verschiedenen CB-Rezeptoren und zeigen darüber hinaus oft unterschiedliche pharmakologische Effekte, d.h. sie sind z.B. keine reinen Agonisten oder Antagonisten. Dies könnte zu unvorhergesehenen pharmakologischen Wechselwirkungen zwischen endogenen und applizierten Cannabinoiden führen. Wird durch die Bindung eines solchen Liganden die Signaltransduktionskaskade (ANHANG) aktiviert, wird dieser Ligand als Agonist bezeichnet. Ist der agonistische Effekt gleich dem maximalen biologischen Effekt, dann gilt die Substanz als voller Agonist. Substanzen mit geringerer maximaler Aktivität werden als partielle Agonisten definiert. Partielle Agonisten besitzen somit agonistische als auch antagonistische Eigenschaften, die von dem Aktivitätszustand des Rezeptorsystems abhängt. Bindet ein partieller Agonist ohne die Anwesenheit eines vollen Agonisten an einen Rezeptor, so kommt es zu einer reinen agonistischen Wirkung. Kommt es andererseits zu einer kompetitiven Hemmung des vollen Agonisten durch einen partiellen Agonisten, so wird die Wirkung des vollen Agonisten antagonisiert (Abbildung 1). In *in vivo*, bzw. *in vivo*-nahen *in vitro* Messsystemen wird durch die Anwesenheit endogener Cannabinoide ein partieller Agonist mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer antagonistischen Wirkung führen. Ein weiterer Fall sind die als inverse Agonisten bezeichneten Substanzen. Diese verschieben wahrscheinlich bei der Bindung an den Rezeptor die nachgeschaltete konstitutionell aktive Signalkaskade derart, dass eine im Gegensatz zum natürlichen Agonisten umgekehrte Wirkung zu beobachtet ist.

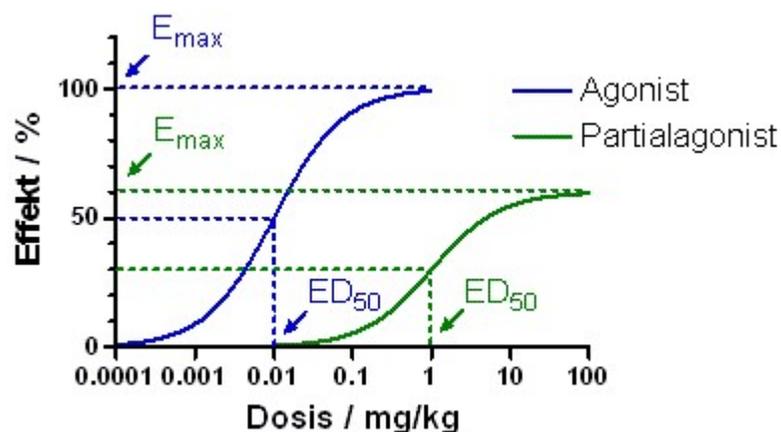


Abbildung 1: Beispiel Dosis-Wirkungskurve eines vollen (blau) und eines partiellen (grün) Agonisten.

Um synthetisch entwickelte Cannabinoide für Medizin und Forschung besser einsetzen zu können, müssen diese sowohl hydrophiler werden als auch spezifischer an einen der CB-Rezeptoren binden. Darüber hinaus sollten diese künstlichen Wirkstoffe keine Kreuzreaktionen mit anderen an Signaltransduktionen beteiligten Komponenten hervorrufen um Nebenwirkungen zu vermeiden.

An dieser Stelle seien die Cannabinoid-Rezeptor-Liganden genannt, die in dieser Arbeit verwendet wurden, nämlich WIN 55,212-2 als CB₁-/CB₂-Rezeptor-Agonist, Rimonabant und AM 251 als selektiver CB₁-Rezeptor inverser Agonisten (Anhang G). Neben den bereits erwähnten Cannabinoiden der Hanfpflanze und den synthetischen Substanzen werden Cannabinoide auch biogen von höheren Lebensformen synthetisiert und für die retrograde Kommunikation von Neuronen (CB₁ Rezeptor) wie auch zur Modulation des Immunsystems (CB₂ Rezeptor) eingesetzt. Diese körpereigenen, endogen synthetisierten Cannabinoide werden demzufolge als Endocannabinoide bezeichnet. Das erstes Endocannabinoid wurde Arachidonylethanolamid (Anandamid) von Devane et al. (1992) entdeckt und pharmakologisch charakterisiert (Fride und Mechoulam, 1993). Als nächstes wurde das Anandamid 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) als Endocannabinoid identifiziert und pharmakologisch charakterisiert (van der Stelt und Di Marzo, 2003). Andere mögliche Endocannabinoide wie z.B. Noladinether (Hanus et al., 2001), Virodhamin (Porter et al., 2002) und N-Arachidonoyldopamin (Huang et al., 2002) sind in einigen Säugetierspezies entdeckt worden. Allerdings steht noch nicht fest ob es sich hierbei tatsächlich um Endocannabinoide handelt.

Der erste Cannabinoid Rezeptor wurde 1988 aus dem Rattenhirn charakterisiert (Devane et al., 1988). Bis dato wurden der CB₁ und der CB₂ Rezeptor kloniert und bilden somit zwei Rezeptor Subtypen die in zwei unterschiedlichen Systemen exprimiert werden. Die entsprechenden Rezeptorproteine gehören zur Superfamilie der G-protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (Abbildung 2) (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993), zu der auch Rezeptoren für Hormone, Transmitter und des olfaktorischen Systems zählen. Diese Rezeptoren zeichnen sich durch sieben transmembranale Schleifen aus deren Struktur eine α -Helix aufweist (Abbildung 2) (Donnelly et al., 1989). Diese Rezeptoren interagieren intrazellulär in der Signaltransduktion n-terminal zuerst mit einer Guanin bindenden Untereinheit (G-Protein) (Vaughan und Christie, 2005) (Abbildung 3). Das G-Protein setzt sich aus

einer $G\alpha$ -, $G\beta$ - und $G\gamma$ Untereinheit zusammen wobei die GTP Bindestelle auf der $G\alpha$ Untereinheit sitzt.

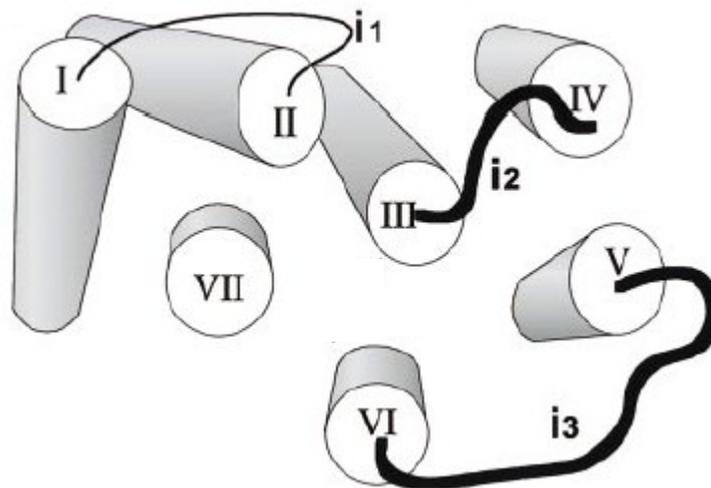


Abbildung 2: Schema eines heptahelicalen Rezeptors

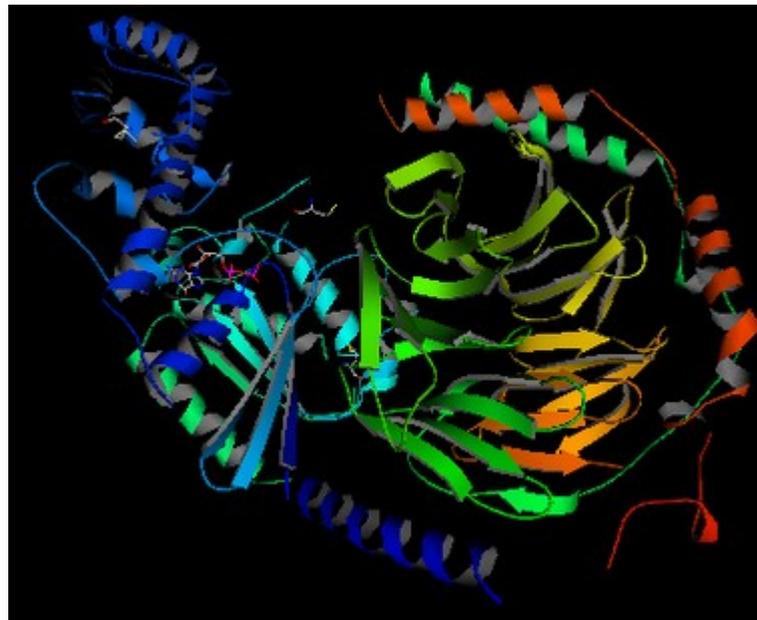


Abbildung 3: Schema eines G-Proteins

Bei der Bindung eines Liganden an den G-Protein gekoppelten Rezeptor verändert sich die Tertiärstruktur des Rezeptors und führt somit zu der Trennung der $G\alpha$ - von

den G $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die Energie für die Abspaltung der G α Untereinheit wird von der Hydrolyse von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) zu Guanosin-5'-diphosphat (GDP) zugeführt. Die G α - und die G $\beta\gamma$ - Untereinheit können weitere Effektorproteine in ihrer Funktion durch Interaktion beeinflussen (Abbildung 4). Zur Verstärkung des Signals kann ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor an mehrere G-Proteine gebunden sein. Nach der Hydrolyse von GTP zu GDP kommt es zu einer Wiedervereinigung der G α - mit der G $\beta\gamma$ -Untereinheit und das G-Protein kann sich wieder an einen Rezeptor um erneut aktiviert zu werden.

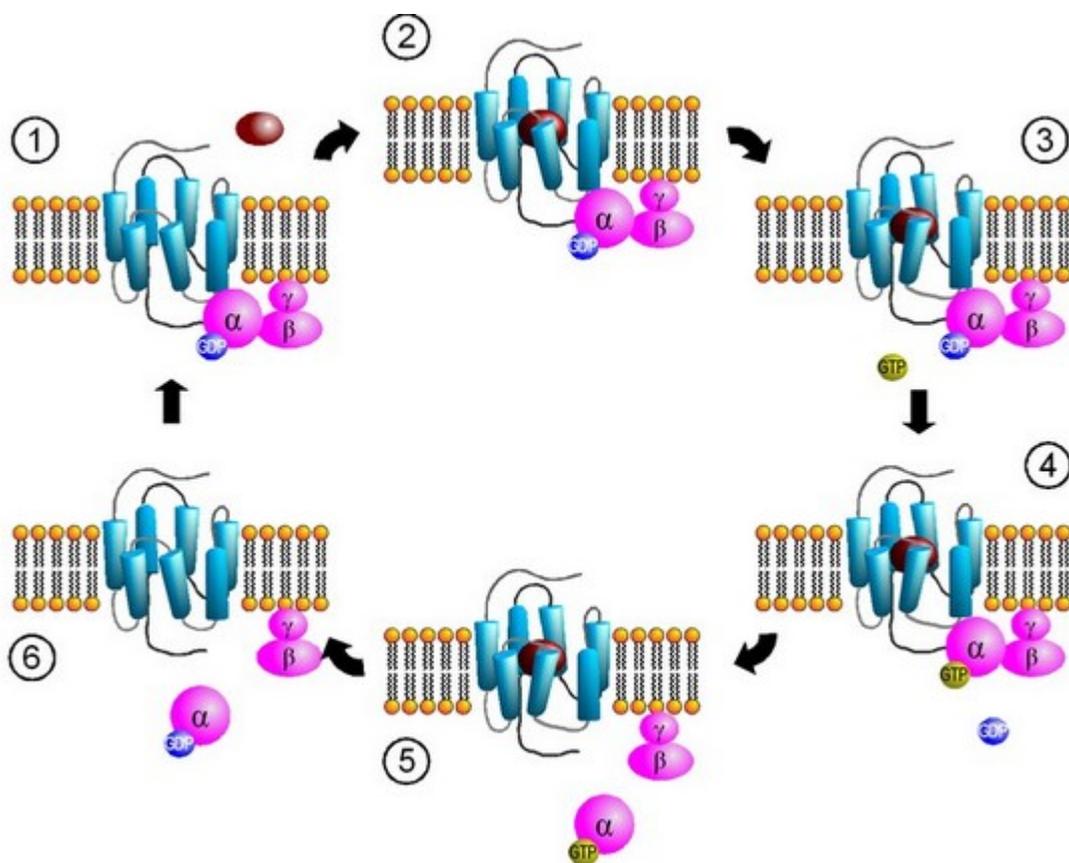


Abbildung 4: Schematische Darstellung der intrazellulären Abläufe nach Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch einen Agonisten.

Der CB₁ sowie der CB₂ Rezeptor sind G_{i/o}-Proteingekoppelte Rezeptoren. G α_i ist das inhibitorische G-Protein, das die Adenylylzyklase inhibiert. G α_o ist das G-Protein, das normalerweise die gleichen Effekte wie das G α_i -Protein vermittelt (Forth et al., 2001; Tachibana et. Al, 2001). Der CB₁-Rezeptor wird vorwiegend im ZNS exprimiert

(Herkenham et al., 1991; Pertwee, 1997). Im Unterschied zu anderen GPCRs zeigt der CB₁-Rezeptor eine hohe Rezeptor-Dichte in vielen Abschnitten des ZNS auf, vor allem im zerebralen Kortex, im Hippocampus, in den Basalganglien und im Cerebellum. Geringere Rezeptor-Dichten zeigen sich dagegen im Hypothalamus und im Rückenmark. Das Fehlen von CB₁-Rezeptoren im Hirnstamm erklärt die geringe Letalität von Cannabinoiden (Robson, 2001). Neben der Expression im ZNS kommen CB₁-Rezeptoren auch in peripheren Neuronen vor, und zwar in sensorischen und in Neuronen des autonomen Nervensystems, z.B. im Magen-Darm-Trakt (Pertwee et al., 1992, 1996; Colombo et al., 1998). Auch wurde der CB₁-Rezeptor in den Testes (Gerard et al., 1991) sowie in geringem Umfang in Geweben des Immunsystems nachgewiesen (Galiegue et al., 1995). Der CB₁-Rezeptor ist präsynaptisch auf gabaergen (Szabo et al., 1998), glutamatergen (Shen et al., 1996), noradrenergen (Schlicker et al., 1997), dopaminergen (Schlicker et al., 1996), serotoninerger (Nakazi et al., 2000) und cholinergen (Kathmann et al., 2001) Neuronen lokalisiert. Im Unterschied zum CB₁- wird der CB₂-Rezeptor ausschließlich peripher von Geweben und Zellen des Immunsystems exprimiert, z.B. der Milz, des Thymus, des Knochenmarks, der Tonsillen, der Lymphknoten als auch von B-Lymphozyten und Makrophagen (Galiegue et al., 1995).

Die Bindung eines Liganden an den CB₁- bzw. an den CB₂-Rezeptor kann durch Aktivierung des G_{i/o}- Proteins mehrere intrazellulären Effekte zur Folge haben:

- Reversible Hemmung der Adenylatcyclase (AC) (Howlett and Fleming 1984, Howlett et al. 1986)
- Pertussistoxin-sensitive Hemmung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle vom N- und P/Q-Typ (Mackie und Hille 1992, Twitchell et al. 1997) durch CB₁ Rezeptoraktivierung (K+ir, Mackie et al. 1995) oder Hemmung der AC (Childers und Deadwyler 1996)
- Modulation der Phospholipase C (Guzman et al. 2002)
- Aktivierung der MAP-Kinase (MAPK) in CB₁ Rezeptor-transfizierten Zellen über einen pertussistoxin-sensitiven Mechanismus (Bouaboula et al. 1995)

Da CB₁-Rezeptoren überwiegend präsynaptisch auf Neuronen des ZNS lokalisiert sind, (auf gabaergen, glutamatergen, noradrenergen, cholinergen, serotonerger und dopaminerger Neuronen), und die Aktivierung der Cannabinoid-Rezeptoren zu einer Verringerung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt, wird die

Transmitterfreisetzung an den entsprechenden Synapsen inhibiert. Aus der Hemmung sowohl inhibitorischer wie exzitatorischer Neuronen, als auch aus der Verteilung des CB₁-Rezeptors in den unterschiedlichen Regionen des ZNS erklärt sich die komplexe Wirkungsweise der Cannabinoide in Neuronalen Netzwerken. So können CB₁-Rezeptor-Agonisten in geringen Dosen zu einer Hyperaktivität führen, wobei höhere Dosen eine Hypoaktivität hervorrufen (Chaperon und Thiebot, 1999). Zu den Effekten von Cannabinoiden zählen die Hypoalgesie/ Antinozizeption, die Abnahme kognitiver Fähigkeiten und des Gedächtnisses, die Änderung der Wahrnehmung, Euphorie und Dysphorie, die Abnahme der Bewegungsaktivität, Steigerung des Appetits, Abnahme der Darmmotilität und der Magensäuresekretion, die Spasmolyse der glatten Muskulatur, Abnahme des Blutdrucks, Steigerung der Herzfrequenz sowie neuroprotektive und antiexzitotoxische Effekte. Mit der Klonierung der CB₁- und CB₂-Rezeptoren gelangen weitere Fortschritte der Cannabinoid-Rezeptor-Pharmakologie. Der erste CB₁-Rezeptor wurde aus der Ratte kloniert (Matsuda et al., 1990), danach gelang es den humanen CB₁-Rezeptors zu klonieren (Gerard et al., 1991) und wegen der Homologie von CB₁-Rezeptoren und CB₂-Rezeptoren folgte die Klonierung des humanen CB₂-Rezeptors (Munro et al., 1993). Durch molekularbiologische Methoden war es nun möglich mutierte Cannabinoid-Rezeptor-Varianten herzustellen, mit deren Hilfe es möglich wurde mittels transfizierter Zelllinien weitere pharmakologische Untersuchungen durchzuführen. Weiterhin war es nun möglich Cannabinoid-Rezeptor-Knockout-Mäuse (CB₁-Rezeptor-KO-Mäuse) herzustellen. Bei KO-Mäuse fehlen ein oder mehrere Gene, demzufolge werden die codierten Proteine nicht mehr exprimiert. Mit vergleichenden Untersuchungen der pharmakologischen Effekte bei WT- und CB₁-Rezeptor-KO-Mäusen kann gezeigt werden, welche Effekte von den CB₁-Rezeptoren vermittelt werden und wie sich der Verlust des CB₁-Rezeptors auf die Entwicklung und das Verhalten der Mäuse auswirkt. Einige Studien zeigen, dass bei CB₁-Rezeptor-KO-Mäusen non-CB₁/non-CB₂-Rezeptor-Effekte durch einige Cannabinoide (z.B. Zimmer et al., 1999; Di Marzo et al., 2000; Baskfield et al., 2004) vorhanden sind. Auch gelang der Nachweis eines endogenen Tonus des Endocannabinoid-Systems in bestimmten Geweben (z.B. Schlicker et al., 2003) sowie die Aufklärung der Relevanz des Endocannabinoid-Systems bei der Abhängigkeitsentwicklung bei dem Konsum von Alkohol und Opioiden (Cossu et al.,

2001; Racz et al., 2003).

Den erste Beleg für einen endogenen Liganden der CB₁-Rezeptoren konnte mit der Entdeckung des Anandamids erbracht werden (Devane et al.; 1992). Weitere Endocannabinoide wie 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) konnten mit physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen in Verbindung gebracht werden. Die Endocannabinoide sind Teil des Endocannabinoid-Systems. Dies umfasst das Zusammenspiel von Endocannabinoiden als physiologischen Agonist der Cannabinoid-Rezeptoren und weiteren Rezeptoren, wie z.B. VR₁-Vanilloid-Rezeptoren (Zygmunt et al., 1999) und bisher nicht identifizierten Rezeptoren (Di Marzo et al., 2000) sowie die Enzymausstattung für die Synthese und den Abbau der Endocannabinoide. Endocannabinoide werden nicht vesikulär gespeichert sondern bei Bedarf synthetisiert und freigesetzt (Marsicano et al. 2003). Hierbei konnte mittels eines in-vivo Mausmodells gezeigt werden, dass die schädigende Wirkung von applizierter Kainsäure bei WT-Mäusen signifikant geringer ist als bei CB₁-Rezeptor KO-Mäusen. Dieser neuroprotektive Effekt wurde mit einem Anstieg von Anandamid im Hippocampus und der daraus resultierenden CB₁-Rezeptor vermittelten Hemmung exzitatorischer Neuronen in Verbindung gebracht. Dies stellt eine wichtige physiologische Aufgabe des Endocannabinoid- Systems dar, die aus der retrograden Hemmung von inhibitorisch und exzitatorisch wirksamer Neuronen besteht. Ausgelöst durch einen Stimulus, z.B. einen kalziumvermittelten, postsynaptischen exzitatorischen oder inhibitorischen Strom kommt es an Postsynapsen zu einer Ausschüttung von Endocannabinoiden. Diese Endocannabinoide führen an den präsynaptisch lokalisierten CB₁-Rezeptoren zu einer Inhibition der Freisetzung von GABA vom inhibitorischen (Wilson und Nicoll, 2001) oder von Glutamat von exzitatorischen Neuronen (Freund et al., 2003). Das Endocannabinoid-System spielt weiterhin eine Rolle bei der Steuerung der Nahrungsaufnahme (Di Marzo et al., 2001; Wang et al., 2003; Cota et al., 2003), bei Stoffwechselprozessen (Cota et al., 2003), bei der Motorik (Costa und Colleoni, 1999), bei Gedächtnisfunktionen (Bohme et al., 2000; Marsicano et al., 2002), bei der Schmerzwahrnehmung (Zimmer et al., 1999) und bei der Belohnung durch die Einnahme von Morphin (Cossu et al., 2001) und Alkohol (Wang et al., 2003). Die Wirkungsdauer von Endocannabinoiden ist von der Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt und dem Abbau abhängig (Di Marzo et al., 1994; Cravatt et al.,

1996; Dinh et al., 2002). Eine unerwartete Möglichkeit der weiteren Untersuchung der Endocannabinoid-Systems gelang mit der Synthese von SR 141716A (Rimonabant; Acomplia) (Rinaldi-Carmona et al., 1994). Rimonabant wurde als CB₁-Rezeptor-Antagonist entwickelt und pharmakologisch charakterisiert. Es zeigte sich allerdings, dass Rimonabant in *in-vivo* Modellen (Bouaboula et al., 1997; Colombo et al., 1998) und in *in-vitro* Modellen (Sim-Selley et al., 2001) Effekte in Abwesenheit von CB₁-Rezeptor-Agonisten zeigte. Diese Wirkungen von Rimonabant sind wahrscheinlich CB₁-Rezeptor vermittelt, da sie in verschiedenen Experimenten von der Anwesenheit von CB₁-Rezeptoren abhängig sind (Bensaid et al., 2003). Die Wirkung von Rimonabant an den CB₁-Rezeptoren führt zu einem dem CB₁-Rezeptor-Agonisten entgegengesetzten Effekt. Diese Eigenschaft von Liganden, entgegengesetzte Effekte in Abwesenheit eines Agonisten auszulösen, bezeichnet man als inversen Agonismus. Rimonabant ist demnach ein CB₁-Rezeptor-Antagonist und CB₁-Rezeptor-inverser Agonist.

Ziele

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine komplexe hippocampale Neuronen- Gliazellen Kokultur etabliert um mittels der weniger invasiven Methode der „on cell patch clamp“ Technik Agonisten und inverse Agonisten des neuronalen Cannabinoidsystems pharmakologisch über die intrinsische Spikeaktivität zu charakterisieren. Des weiteren wurden über erweiterte Spikeanalysen der Einfluss dieser Substanzen auf die neuronale Kommunikation hin bestimmt und Schlüsselemente der Signaltransduktion im Hinblick auf deren Beteiligung an einer beobachteten agonistischen Komponente bei höheren Konzentrationen der verwendeten inversen Agonisten AM 251 und Rimonabant (SR141716A) untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

pH-Meter	F 32 Beckman
Zentrifugen	J2-21 Beckman
Patch Clamp Verstärker	EPC10 HEKA
AD Wandler	National Instruments
Brutschrank	WTB Binder
Perfussionsheizung	Multichannelsystems

2.1.2 Versuchstiere

Die im Tag 17 schwangeren CD Ratten wurden von Charles River bezogen.

2.1.3 Allgemeine Chemikalien

Die Firma **Sigma** lieferte, Borsäure, Bromphenolblau, Dimethylsulfoxid (DMSO), Kaliumchlorid, Natriumchlorid, Natrium-ethylendiamintetraacetat (EDTA), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris). Calciumchlorid, Ethanol, Isopropanol, Magnesiumsulfat, Triton X 100.

Merck stellte Isopropanol, Kaliumchlorid, Di-Natriumhydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumacetat, Salzsäure her.

Bei **Roche** wurde Desoxyadenosintriphosphat (dATP) bezogen.

Die Firma **Roth** war der Produzent von Ampicillin, Carbenicillin,, Magnesiumchlorid und Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF).

Von **J. T. Baker** wurde Ethanol (unvergällt) bezogen.

Alle sonstigen verwendeten Chemikalien wurden im jeweils höchsten Reinheitsgrad bei den Firmen Sigma, Fluka, Merck und Roth bestellt.

Das verwendete Wasser war filtriertes Reinstwasser und wurde für die Zellkultur durch Autoklavieren 50 Min. bei 121°C und 1,2 bar sterilisiert.

2.1.4 Antiseren

Der zum Nachweis des CB₁-Rezeptors verwendete monoklonale Antikörper CB₁ (N-15) stammte von der Firma Santa Cruz. AX488-gekoppelter IgG, der Cy3-gekoppelter IgG und MAP Kinase IgG wurden von Sigma Aldrich bezogen.

2.1.5 Zellkultur und Gewebekulturschalen

Bei der hier verwendeten Zellkultur handelt es sich um eine hippocampale Primärkultur, die aus E17 Rattenembryonen hergestellt wurde. Die verwendeten sterilen 6 cm Petrischalen wurden von der Firma NUNC, die Zellkulturflaschen von der Firma Invitrogen geliefert.

2.1.5.1 Zellkultur-Medien und Agenzien

Die verwendeten Medien wurden, mit Modifikationen, nach Götze und Kollegen 2003 hergestellt.

DMEM, MEM, B27 Supplement, HBSS und Poly-L-Lysine wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Die Firma PAA lieferte Donor Horse Serum (Lot: B02305-0290)

2.1.6 Verwendete Substanzen

2.1.6.1 Agonisten

Der CB₁-Agonist WIN 55,212-2 wurde von Sigma Aldrich bezogen.

2.1.6.2 Inverse Agonisten

Der inverse Agonist AM 251 stammt von Sigma Aldrich. Die Substanz Rimonabant wurde von Boehringer Ingelheim zur Verfügung gestellt.

2.1.6.3 sonstige Wirkstoffe

Der Adenylatcyclase Blocker MDL-12,300A, NBQX, TTX wurden von der Firma Sigma Aldrich bezogen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die hergestellte hippocampale Primärkultur wurde, mit Modifikationen, nach Götze und Kollegen 2003 hergestellt.

2.2.1.1 Präparation

2.2.1.1.1 Präparation des Hippocampus von E17 Rattenembryonen

Die schwangere Ratte wurde mit Ether betäubt und danach durch eine cervicale Dislokation getötet. Zur Entnahme der Embryonen (E17) wurde die Bauchdecke mit einer Präparationsschere entfernt. Die Embryonen wurden aus den Fruchtblasen entnommen und dekaptiert, der Schädelknochen sagittal aufgeschnitten und entfernt. Das Gehirn wurde unter Verwendung eines Spatels in eine mit HBSS gefüllte Petrischale überführt, die Hemisphären sagittal getrennt und die Hirnhaut mit Hilfe einer Pinzette abgezogen. Mittels einer Federschere wurde der Hippocampus entnommen und in ein mit HBSS gefülltes 15ml Falcontube überführt. Die gesammelten Hippocampi wurden mit einem HBSS-Trypsin/EDTA Puffer fünf Minuten trypsiniert und anschließend drei Mal mit 10ml HBSS gewaschen, mit einer Pasteurpipette homogenisiert. Das erhaltene Zell-Homogenat wurde abschließend in ein 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

2.2.1.1.2 Präparation des Rattenembryonen-Cortex für die Glia-Kultur

Für die Herstellung der Glia-Zellkultur wurden die Cortices von der Präparation der Hippocampi verwendet und diese wie unter 2.2.1.1.1 beschrieben trituiert.

2.2.1.2 Kultivierung und Pflege der Zellkultur

2.2.1.2.1 Kultivierung und Pflege der Gliakultur

Die aus der Präparation gewonnenen Gliazellen wurden in Zellkulturflaschen mit DMEM-HS Medium in Kultur genommen, alle vier bis fünf Tage mit PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium versorgt und wenn nötig in einem Verhältnis von 1:3 gesplittet. Nach 10 Tagen wurde die Gliazellen trypsiniert und in einer Dichte von 20000 Zellen in eine 6 cm NUNC-Petrischale ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen

wurde das DMEM-HS Medium durch das Neurobasalmedium ersetzt und die Gliazellen-Kultur für die Kultur der Neuronen verwendet.

2.2.1.2.2 Kultivierung und Pflege der Glia-/Neuronen Kokultur

Die aus der Präparation gewonnenen Neuronen wurden in zuvor mit 95% CO₂ und auf 36,5°C erwärmten Neurobasal-Medium in einer Dichte von 380000 Zellen pro NUNC-Petrischale auf sechs NeuroGlass Coverslips ausplattiert. Fünf bis 24 Stunden später wurden die mit Neuronen besiedelten Coverslips in die NUNC-Petrischalen der Gliazellen-Kultur umgesetzt. Um ein Ansteigen der Osmolalität des Mediums zu verhindern wurde in einem Abstand von zwei Tagen die Osmolarität bestimmt und wenn nötig mit destilliertem Wasser wieder auf einen Wert von ca. 320mOsm eingestellt.

2.2.2 Immuncytochemie von Paraformaldehyd-fixierten Zellen

Für den Nachweis von den exprimierten CB₁-Rezeptorproteinen mit dem CB1 (N-15) Antikörper und der MAP Kinase wurden die kultivierten Neuronen mit 1x PBS (50mM Na-Phosphat pH 7,4; 150mM NaCl) gewaschen und für 30 Minuten mit Fixans (4% Paraformaldehyd in 1x PBS) auf Eis fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Der spezifische erste Antikörper wurde in 1x PBS in der jeweiligen Verdünnung angesetzt und bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für je 5 Minuten mit 1x PBS entfernt. Als zweiter Antikörper wurde fluoreszenz-markiertes Cy3-IgG bzw. AX488-IgG mit einer Verdünnung von 1:500 ebenfalls in 1x PBS/0,1% NDS eingesetzt und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligen Waschen für je 5 Minuten mit 1x PBS wurden die Zellen unter dem Photomikroskop Axiophot betrachtet und mit den entsprechenden Wellenlängen angeregt. Für die Doppelfärbung wurden die spezifischen ersten Antikörper zusammen in der entsprechenden Verdünnung in 1x PBS angesetzt. Die zweiten Antikörper (AX488-gekoppelter IgG und Cy3gekoppelter-IgG) wurden zusammen in einer Verdünnung von 1:500 in 1x PBS aufgenommen.

2.2.3 Patch Clamp Messungen

2.2.3.1 Aufbau des Patch Clamp Messstandes

Die Patch-Clamp-Messungen wurden unter optischer Kontrolle auf dem Objektisch eines inversen Mikroskopes (Carl Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Zusätzlich konnte über eine am Mikroskop angeschlossene Schwarzweiß-CCD-Kamera das mikroskopische Bild auf einem Videomonitor dargestellt werden. Die Temperatur des Messpuffers wurde von einer Perfusionsheizung eingestellt, und konnte über einen Temperaturkontroller (MCS, Reutlingen) kontrolliert werden. Die aus eloxiertem Aluminium und Plexiglas gefertigte Messkammer (Anhang E) passte in den 35 mm Petri-schalehalter des Objektisches. Der Zu- und Ablauf der Perfusion wurde über zwei Mikromanipulatoren in die Perfusionskammer eingebracht und die Perfusionsgeschwindigkeit über eine Peristaltik-Pumpe auf einen Wert von 2ml pro Minute eingestellt. Die Badelektrode wurde durch ein Kabel mit dem Vorverstärker (HEKA, Deutschland) verbunden. Zur Reduzierung elektrischer und mechanischer Störungen wurden alle Komponenten auf einem schwingungsgedämpften Tisch innerhalb eines Faradayschen Käfigs aufgebaut. Anhang E gibt einen Überblick über die Messanordnung und die verwendete Perfusionskammer. Die Messung erfolgte über eine chlorierte Silberlektrode der Patchpipette und wurde über einen Pipettenhalter mit der Head Stage verbunden. Der Vorverstärker wurde mit einer Kombination von Mikromanipulatoren verbunden, mit deren Hilfe die Patchpipette auf die Zelle aufgesetzt werden konnte.

2.2.3.2 Patchpipetten und Puller

Die Patchpipetten wurden mit einem Puller der Firma Zeitz (DMZ Universal-Puller) hergestellt und durch Kontrolle der Puller-Parameter auf einen Widerstand von drei bis sechs Megaohm eingestellt.

2.2.3.3 Verwendete Messpuffer

2.2.3.3.1 Extrazellular-Puffer

Substanz	Menge in mM
NaCl	137
KCl	5
CaCl ₂	3
MgCl	0,1
Glucose	10
Glycin	0,01
Hepes	5

Der Messpuffer wurde auf eine Osmolarität von 320 mOsm (mit Succrose) und einen pH-Wert von 7.25 (mit NaOH) eingestellt. Für die Messungen der AMPA-EPSCs wurde zusätzlich 1µM TTX und 5µM BIC beigefügt. Die Magnesium-Konzentration wurde hierbei auf 2mM erhöht.

2.2.3.3.2 Intrazellular-Puffer

Substanz	Menge in mM
K-Glukonat,	140
KCl	5
CaCl ₂	0,5
MgCl ₂	0,5
EGTA	5
HEPES	10
K ₂ ATP	2

Der Messpuffer wurde auf eine Osmolarität von 315 mOsm (mit Succrose) und einen pH-Wert von 7.25 (mit NaOH) eingestellt.

2.2.3.4 Verwendete Ableitkonfigurationen

2.2.3.4.1 Whole Cell Patch-Clamp

Die Whole Cell Patch-Clamp Messungen wurden für die Erfassung der NMDA-und

AMPA-EPSCs verwendet. Die Technik der Messungen wurden analog zu Kapitel „Tight Seal Whole Cell Recording“ des Buchs „Single-Channel Recording“ von Bert Sakmann und Erwin Neher durchgeführt (Sakmann und Neher, 1983). Zur Durchführung der Strom-Messungen wurde das zu messende Neuron auf eine Haltespannung von -70mV geklemmt.

2.2.3.4.2 Loose Patch Clamp

Die Loose Patch Clamp Messungen wurden für die Erfassung der Aktionspotentiale verwendet. Die Technik der Messungen wurden analog zu Kapitel „The Loose Patch Clamp“ des Buchs „Single-Channel Recording“ von Bert Sakmann und Erwin Neher durchgeführt. Zur Durchführung der Spannungs-Messungen wurde die Patchpipette bis zu einem Wert von 35 MOhm gesealt. Für diese Art der Messung ist der Patchelektroden-Puffer mit dem Messpuffer identisch.

2.2.3.5 Vorbereitung der Zellen für die Messung

Die auf NeuroClean Coverslips kultivierten Neuronen wurden bis zum Zeitpunkt der Messung in einem Brutschrank bei 36,5°C und 95% CO₂ aufbewahrt und zum Zeitpunkt der Messung in eine mit Messpuffer gefüllte NUNC-Petrischale überführt. Anschließend wurden die NeuroClean Coverslips mit den Neuronen nach oben in die Messkammer eingesetzt und sofort mit auf 36,5°C erwärmten Messpuffer perfundiert.

2.2.3.6 Datenerfassung, -aufzeichnung und -auswertung

Zur Datenerfassung wurde die Hardware des EPC-10 Patch Clamp Verstärkers verwendet und die Daten mit einer Erfassungsrate von 10k Hz mittels der Software Patchmaster (HEKA, Deutschland) aufgezeichnet und mit einem 3k Hz Bessel-Filter gefiltert. Um die laufende Messung online kontrollieren zu können wurden die Daten zusätzlich mit einem AD-Wandler der Firma National Instruments (Deutschland) erfasst und die über 30 Sekunden gemittelte Spikefrequenz mit einem selbst geschriebenen LabView Programm dargestellt. Zur weiteren Analyse wurden die Daten in die Software Minianalysis (Synptosoft Inc.; USA) importiert. Die Detektion der Aktionspotentiale und der EPSCs wurden anhand einer Principal Component Analyse (dt. Hauptkomponentenanalyse) (Pierson, 1901) durchgeführt. Statistische Analysen und graphische Darstellung der Daten wurden mit der Software Origin (Microcal, USA)

durchgeführt. Die Frequenz der Aktionspotentiale für Kontroll-Messungen und unter der Wirkung der verwendeten Substanzen wurde anhand von fünfminütigen Messfenstern nach der Formel $((\text{Kontroll AP Freq.} - \text{Substanz Applikations AP Freq.}) / \text{Kontroll AP Freq.}) * 100$ berechnet. EC50- bzw. IC50-Werte sowie die Standardfehler wurden mit der Software Origin ermittelt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Etablierung einer hippocampalen Primärkultur

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur pharmakologischen Charakterisierung inverser Agonisten der CB₁-Rezeptoren wurde eine primäre hippocampale Neuronen Kultur aus der Ratte *rattus norvigicus* etabliert. Die Vorteile dieser Präparation aus nativem Gewebe liegen in der physiologischen Expressionrate der CB₁-Rezeptoren im Vergleich zu hoch exprimierenden artifiziellen Zellkulturen und in der allgemeinen Rezeptorausstattung der Neurone, die eine Identifizierung möglicher Wechselwirkungen der untersuchten Substanzen mit anderen Rezeptoren oder Kanälen ermöglichen könnte.

3.1.1 Immunzytochemische Lokalisierung der CB₁-Rezeptoren

Der Hippocampus ist der mediale Teil des Telencephalons (Großhirn) und bildet den Archicortex. Die den CB₁-Rezeptor exprimierenden Zellen liegen hauptsächlich im stratum pyramidale und stratum moleculare. Einige wenige Interneurone scheinen auch CB₁-Rezeptoren zu exprimieren (Abbildung 4), fallen jedoch im Vergleich zu der Masse der Pyramidalzellen nicht ins Gewicht.

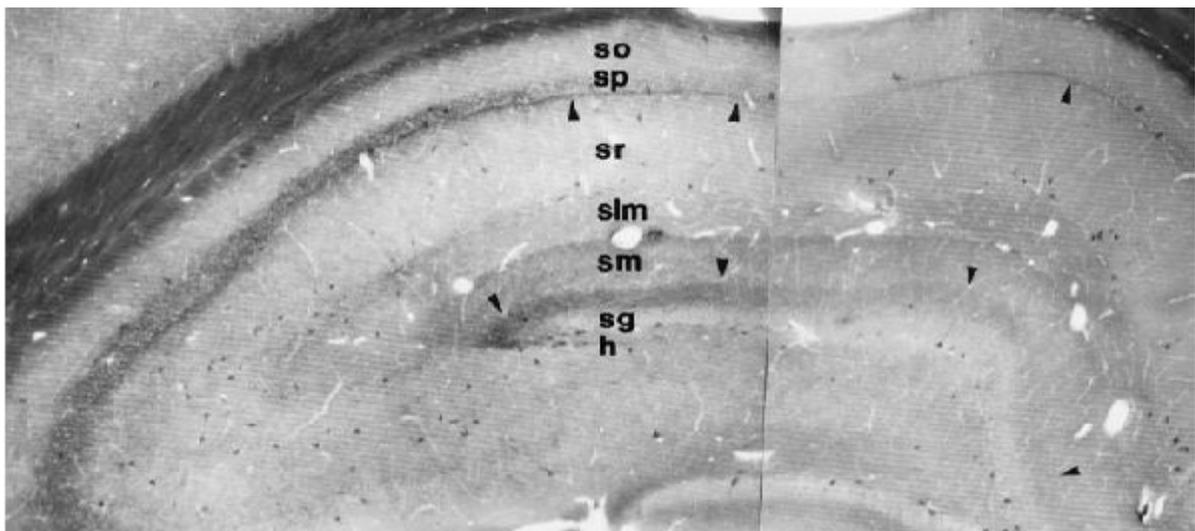


Abbildung 4: CB₁-Rezeptoren

Katona et.al. 1999

stratum oriens (so)

stratum granulosum (sg)

hilus (h)

stratum pyramidale (sp)

stratum moleculare (sm)

stratum reticulare(sr)

Die Neuronen wurden aus Ratten Embryonen des Stamms (CD 1703) isoliert und in einer Dichte von 360`000 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mindestens 14 Tage mit aus kortikalem Gewebe isolierten Gliazellen kokultiviert. Färbungen dieser Kultur zeigen, dass diese Kultur aus ca. 70% Pyramidalzellen bestehen, die restlichen 30% sind Gliazellen und Interneuronen. Um die Expression des CB₁-Rezeptors in der Primärkultur zu kontrollieren wurden die Zellen mit einem spezifische Antikörper (MM) gegen diesen Cannabinoid Rezeptor immunzytochemisch gefärbt (Abbildung 5). Gleichzeitig wurden mit einem Antikörper gegen Tubulin die Neurone der Primärkultur markiert (Abbildung 6).

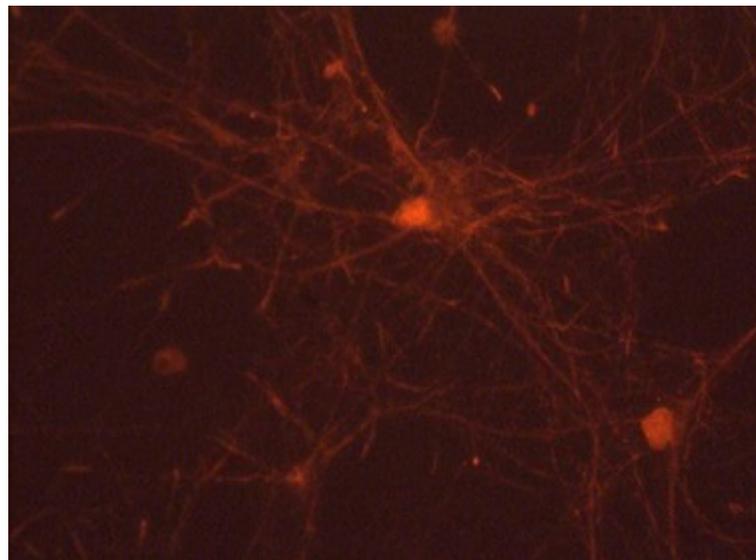


Abbildung 5: Lokalisation der Rezeptorproteine in einer hippocampalen Primärkultur.

Immuncytochemische Färbung von CB₁ Rezeptoren mit dem Antikörper CB1 (N-15) und einem CYE3 gekoppelten Sekundärantikörper

Aus diesen Färbungen konnte man ersehen, dass der CB₁-Rezeptor in den kultivierten Neuronen exprimiert wird und somit die Voraussetzung für elektrophysiologische Untersuchungen gegeben sind.

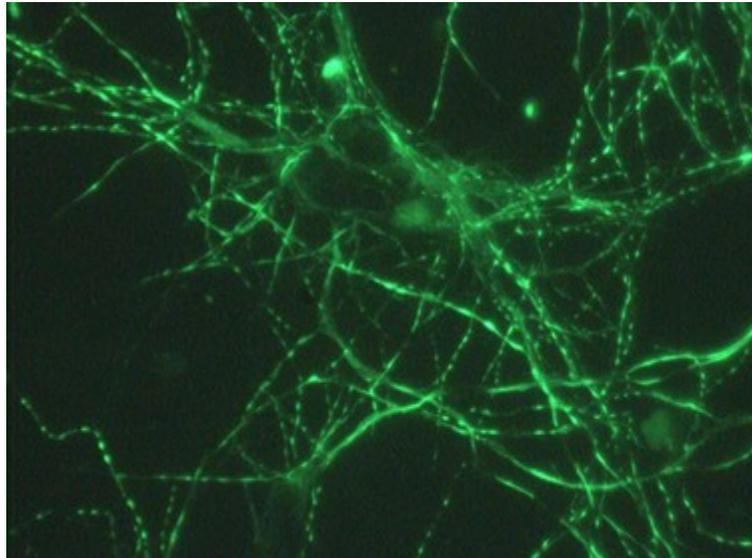


Abbildung 6: Lokalisation von MAP Kinaseproteinen in einer hippocampalen Primärkultur mit einem AX488 gekoppelten Sekundärantikörper

3.1.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Kultur

Um die Eigenschaften der Primärkultur zu evaluieren wurden die Neurone auf mehrere grundlegende elektrophysiologische Parameter hin untersucht. Hierdurch sollte die Funktionalität einer *in vivo* nahe Neuronen-Kultur dargestellt werden.

3.1.2.1 Temperaturabhängigkeit der Spikeaktivität

Zur Ermittlung der Temperaturempfindlichkeit der Neuronen wurden drei Temperaturbereiche (Raumtemperatur, 30°C und physiologische 36,5°C) gewählt, um physiologische Messbedingungen zu erhalten. Um die neuronale Aktivität zu erfassen wurde mittels der „on cell patch clamp“ Technik die Aktionspotentiale (APs) online gemessen. Offline wurden danach die Einzel-Spikeereignisse anhand einer Hauptkomponentenanalyse (principal component analyse) erfasst und über 30 Sekunden gemittelt. Das so erhaltene Rate-Diagramm (Abbildung 7) zeigt eine stabile Spikefrequenz bei 36,5°C, Abweichungen in Richtung geringerer Temperaturen zeigen eine leicht verminderte (bei 30°C) bis fast unterdrückte Spikeaktivität bei Raumtemperatur

(23°C). Der sprunghafte Anstieg der AP-Frequenz bei der Reduktion der Temperatur von 36,5°C nach 30°C war reproduzierbar.

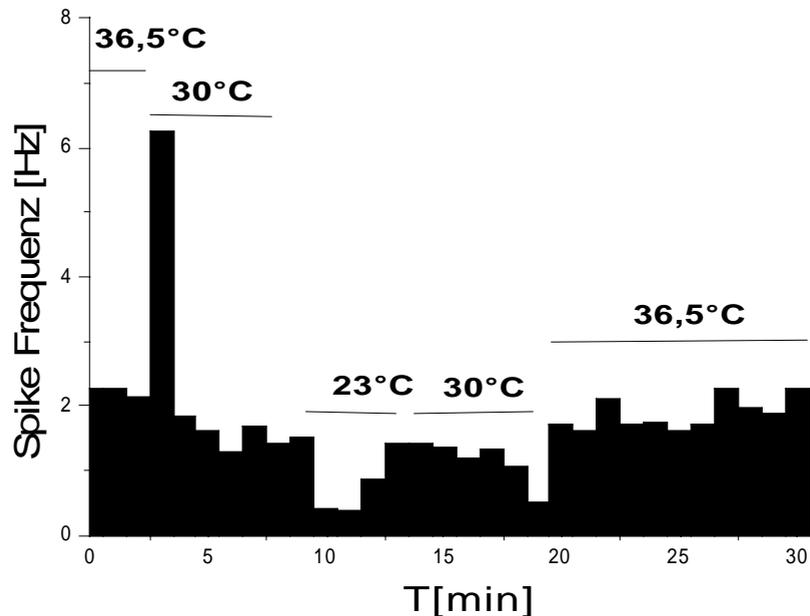


Abbildung 7: Temperaturabhängigkeit der Spikeaktivität der hippocampalen Primärkultur. Die Ordinate zeigt die Spikeaktivität in Hertz, die Abszisse die Zeit in Minuten. Start und Dauer der Temperaturveränderung entspricht den Balken

Allerdings ist der zugrunde liegende physiologische Mechanismus nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung könnte eine Schockreaktion der Neuronen mit vermehrtem Transmitterausstoß sein. Aufgrund der beobachteten Temperaturabhängigkeit der Spikeaktivität von Neuronen wurde mittels einer Perfusionsheizung der Messpuffer auf 36,5°C ±0,5°C erwärmt.

3.1.2.2 Pharmakologische Blockierung von Spikeaktivität

Um die Kanal- bzw. Rezeptorausstattung der Neurone zu überprüfen wurde diese mit verschiedenen Neurotoxinen blockiert.

3.1.2.2.1 Blockierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen

Tetrodotoxin (TTX) blockiert spannungsaktivierte Natrium-Kanäle in Neuronen. Dadurch können keine Aktionspotentiale mehr ausgelöst werden. Hierzu wurde nach der Aufnahme von neun Minuten „Baseline“ (Basale Spikeaktivität der untersuchten Neuronen) über die Perfussion fünf Minuten Messpuffer mit 700nM TTX appliziert (Abbildung 8). Die daraus resultierende Abnahme der AP-Frequenz unter ein Prozent entspricht bereits publizierten Literaturdaten (E. Fournier and F. Crepel; 1984). Daher ist davon auszugehen, dass die Expressionrate der spannungsabhängigen Natriumkanälen der kultivierten Neuronen den *in vivo* erhobenen Daten entspricht.

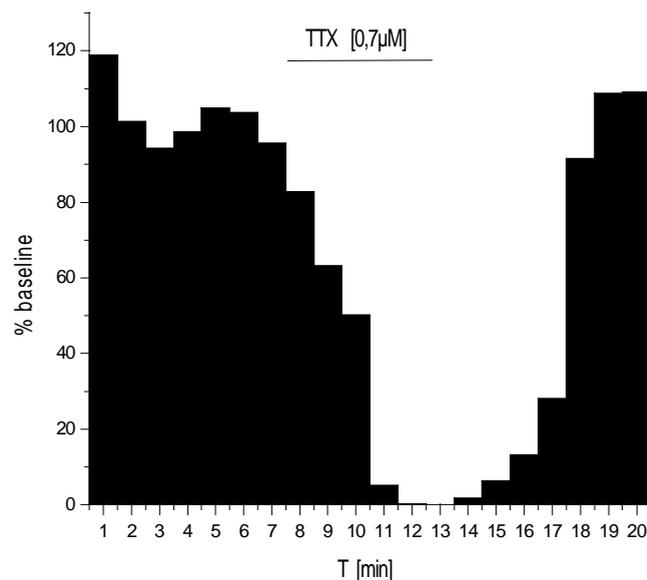


Abbildung 8: Spikeaktivität einer Pyramidalzelle in Abhängigkeit von 700nM TTX. Die Ordinate zeigt die Spikeaktivität in Prozent, die Abszisse die Zeit in Minuten. Start und Dauer der TTX Application entspricht dem Balken.

3.1.2.2.2 Blockierung von AMPA EPSCs

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Validierung der Netzwerkaktivität von Neuronen ist die Synaptische Transmission. AMPA-Rezeptoren bilden neben NMDA-

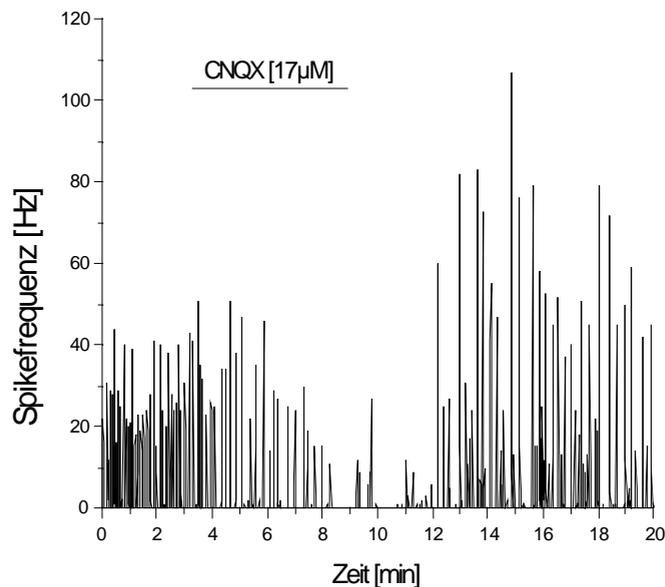


Abbildung 9: Spikeaktivität einer Pyramidalzelle in Abhängigkeit von 17µM CNQX. Die Ordinate zeigt die Spikeaktivität in Hertz, die Abszisse die Zeit in Minuten. Start und Dauer der CNQX Application entspricht dem Balken.

Rezeptoren und Kainat-Rezeptoren eine Untergruppe der Glutamat-Rezeptoren. Sie sind die am häufigsten vorkommenden Neurotransmitter-Rezeptoren im Zentralnervensystem. Durch die spezifische Blockierung dieser Glutamat Rezeptoren mit dem synthetischen Antagonisten CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) kann ein wichtiger Anteil von glutaminerger, excitatorischer Aktivität im Netzwerk unterdrückt werden. Hierzu wurde nach der Aufnahme von fünf Minuten „Baseline Aktivität“ (Basale Spikeaktivität der untersuchten Neuronen) über die Perfusion fünf Minuten Messpuffer mit 17µM CNQX appliziert (Abbildung 9). Die hieraus resultierende verminderte Spikeaktivität auf unter fünf Prozent kann als Maß für die AMPA Rezeptorausstattung herangezogen werden und entspricht veröffentlichten Daten (Baskys und Malenka, 1991). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Expressionsrate der AMPA Rezeptoren der Neuronenkultur der Expressionsrate dieser Rezeptoren in vivo entspricht.

3.1.2.3 Spontane EPSC Aktivität der kultivierten Neuronen

Eine wichtige Voraussetzung für die spontane Netzwerkaktivität ist die synaptische Übertragung. Um die spontanen exitatorischen postsynaptischen ströme (EPSCs) der etablierten neuronalen Primärkultur zu kontrollieren wurden sowohl AMPA, als auch NMDA EPSCs elektrophysiologisch erfasst und analysiert.

3.1.2.3.1 Spontane AMPA EPSCs

Die hippocampale Neuronenkultur besteht zu einem großen Teil aus Pyramidalzellen. Diese bilden exitatorischen Verbindungen und leisten den Großteil der lokalen Informationsübertragung (Martin et al., 1989). Der vermittelnde Neurotransmitter ist hauptsächlich Glutamat. AMPA-Rezeptoren sind eine Untergruppe der Glutamat-Rezeptoren. Sie bilden Ionenkanäle, die eine Komponente des postsynaptischen Stroms vermitteln. Ihre Aktivierung führt zu postsynaptische Leitfähigkeitsänderungen von ca. 10 bis 20 Millisekunden Dauer. Der Name leitet sich von dem synthetischen Agonisten AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure) ab, der zu einer spezifischen Aktivierung führt. Um die Kultur auf ihre Fähigkeit zur Generierung von AMPA EPSCs hin zu überprüfen wurde unter Verwendung der „whole cell patch clamp“ Technik Messspuren erfasst (Abbildung 10).



Abbildung 10: Datenspur einer „whole cell“ Messung von AMPA EPSCs

Um zu verhindern, dass die viel größeren Ströme von Aktionspotentialen NMDA

EPSCs und IPSCs die kleineren AMPA EPSCs überlagern wurde der verwendete Messpuffer mit $1\mu\text{M}$ TTX, $5\mu\text{M}$ BIC versetzt. Des weiteren wurde eine Magnesium Konzentration von 2mM verwendet, um die NMDA Rezeptoren zu inhibieren. Offline wurden danach die Einzel-AMPA EPSCs anhand einer „principal component analyse“ erfasst und die durchschnittliche EPSC Amplitude und die Frequenz berechnet. Sämtliche ermittelten AMPA EPSCs wurden weiterhin auf den 50% Wert ihrer Steigung ausgerichtet und gemittelt (Abbildung 11). Die Kinetik dieses „durchschnittlichen“ AMPA EPSC entspricht bereits veröffentlichten Daten (Ghamari-Langroudi und Glavinovic, 1998). Die AMPA EPSC Frequenz liegt zwischen zwei und drei Hertz und die EPSC Amplitude bei 21 ± 4 pA.

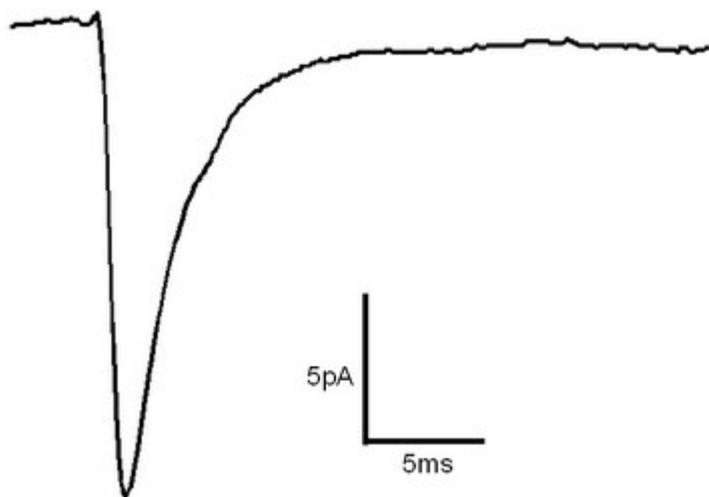


Abbildung 11: gemitteltetes AMPA EPSC

3.1.2.3.2 Spontane NMDA EPSCs

NMDA-Rezeptoren gehören zu den ionotropen Glutamatrezeptoren. Der Name kommt von dem für sie spezifischen Agonisten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA). Diese Substanz führt im Experiment zu der Öffnung dieses Ionenkanals. NMDA-Rezeptoren vermitteln eine langsamere postsynaptische Stromkomponente, deren Dauer im Bereich von hundert Millisekunden liegt. Ihre Leitfähigkeit für Kalzium liegt um das fünfzig fache höher als die der AMPA-Rezeptoren. Demgegenüber ist aufgrund der Blockierung durch Magnesium-Ionen die Leitfähigkeit der NMDA-Rezeptoren bei negativen Membranpotentialen sehr gering. Abbildung 12 zeigt exemplarisch eine

Messspur von erfassten NMDA EPSCs. Diese stimmen mit bereits veröffentlichten Daten überein.

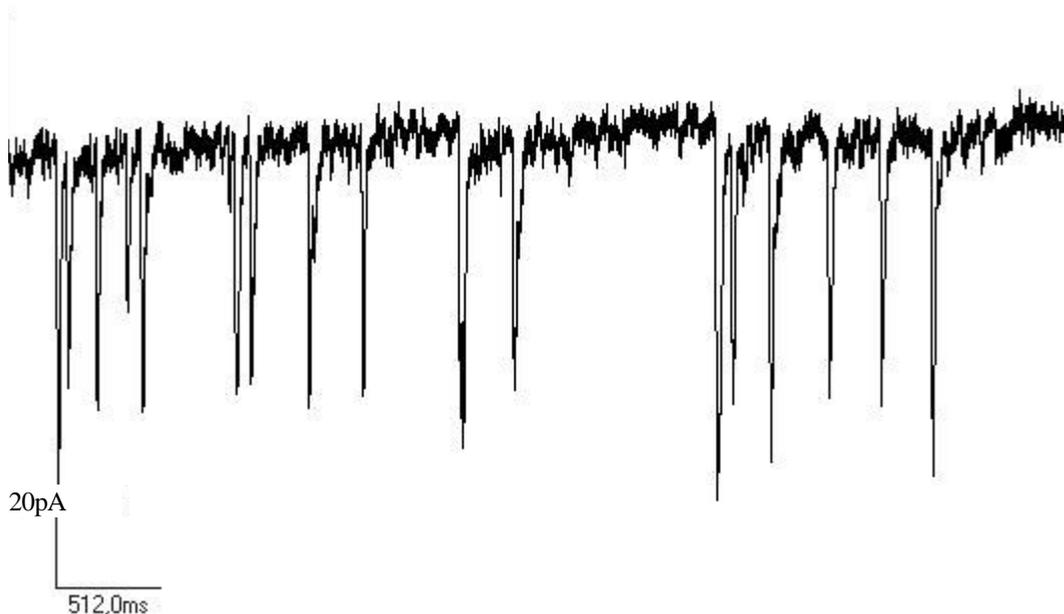


Abbildung 12: Datenspur einer „whole cell“ Messung von NMDA EPSCs

3.2 Spontane Spikeaktivität

Unter einem Aktionspotenzial versteht man eine kurze, in charakteristischer Form ablaufende Modulation des Membranpotenzials einer Zelle. Die Fähigkeit zur Ausbildung von Aktionspotenzialen ist die grundlegende und definierende Eigenschaft elektrisch erregbarer Zellen. Die Ursachen für die Ausbildung und die besonderen Eigenschaften eines Aktionspotenzials ist auf die Ionenkanälausstattung in der Zellmembran zurückzuführen. Eine Depolarisation aktiviert nach Erreichen einer bestimmten Schwelle eine Kette von Öffnungs- und Schließungsvorgängen der beteiligten Kanäle. Die daraus resultierenden Ionenströme führen zu einer sprunghaften Veränderung des Membranpotenzials im Bereich weniger Millisekunden.

Die elektrophysiologischen Messungen wurden mit der weniger invasiven „on cell“ Messmethode durchgeführt um über einen Zeitraum von bis zu 40 Minuten stabile Ableitungen zu erhalten. Sämtliche APs der Messspuren wurden zur weiteren Auswertung mit der Software Minianalysis erfasst.

3.2.1 Spikeaktivität der primären hippocampalen Neuronen Kultur

Um die Kinetik der von den kultivierten Neuronen generierten und „on cell“ gemessenen Aktionspotentialen zu kontrollieren wurde mittels der Software MiniAnalysis tausend Aktionspotentiale auf ihre maximale Amplitude ausgerichtet und gemittelt (Abbildung 13). Die Dauer des Aktionspotentials von der Depolarisation bis zum Erreichen des Ruhemembranpotentials betrug ca. drei Millisekunden.

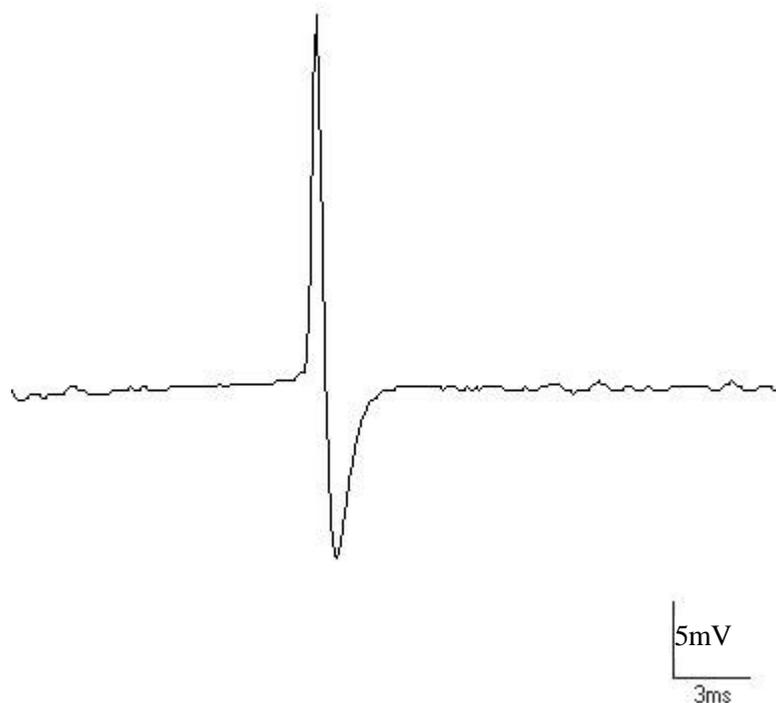


Abbildung 13: Ein über 1000 Aktionspotentiale gemittelter Spike. Für die Mittlung wurden die einzelnen Aktionspotentiale auf ihre Maxima hin ausgerichtet.

3.2.1 Induktion repetetierver Spikeaktivität (Bursts)

Um nicht auf spontane Aktionspotentiale angewiesen zu sein wurde ein Messpuffer mit niedriger Magnesiumkonzentration und dem NMDA Co-Agonist Glyzin gewählt (in mM: 0,01) um Bursts zu induzieren. Dies führt zu einer repetitiven Spikeaktivität (Bursts) (Abbildung 14a). Das „Bursten“ eines Neurons zeichnet sich durch die Generierung von AP-Clustern aus, die aus zwei oder mehr Aktionspotentialen bestehen (Abbildung 14b). Der Vorteil von nieder Magnesium induzierten „Bursts“ liegt in der Gleichmäßigkeit der Aktionspotentialaktivität über den Zeitraum der Messung und führt somit zu einer Reduktion der intrinsischen Variabilität des verwendeten physio-

logischen Assays.

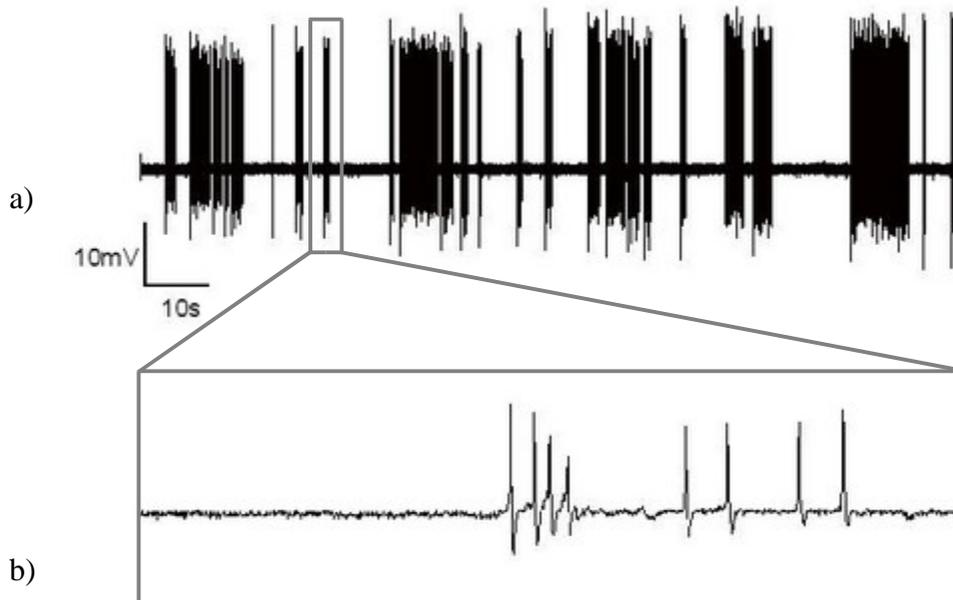


Abbildung 14: Spikebursts eines gemessenen Neurons. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt einen einzelnen Burst.

3.3 Modulation neuronaler Aktivität durch Agonisten und Inverser Agonisten des Cannabinoidsystems.

3.3.1 Der CB₁ Agonist WIN

Die Substanz WIN55,212-2 ist ein synthetischer Agonist des Cannabinoid Rezeptors 1 (CB₁-Rezeptor) und gehört in die Gruppe der Aminoalkylamide.

3.3.1.1 Effekt von WIN 55,212-2 auf das Bursten der Neuronen

Die Abbildungen 13a bis 13c zeigen exemplarisch die Wirkung des CB₁-Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2 auf eine kultivierte hippocampale Pyramidalzelle. Die prozentuale Abnahme der Spikeaktivität wurde nach der Formel $[(AP\text{-Frequenz unter Substanzwirkung} * 100) / \text{basale AP-Frequenz}]$ ermittelt und über der Zeit aufgetra-

gen. Bei geringeren Mengen (3nM) der Substanz wird die Aktivität des Neurons nur schwach reduziert (Abbildung a). Bei der nächst höheren Konzentration (10nM) kann man die Unterdrückung der Spikeaktivität auf unter 50% sehr deutlich ersehen (Abbildung b) und die höchste verwendete Konzentration von 100nM führt nahezu zu einer völligen Blockierung der Spikeaktivität des Neurons auf unter 0,5 Prozent der Spikeaktivität des Neurons (Abbildung c).

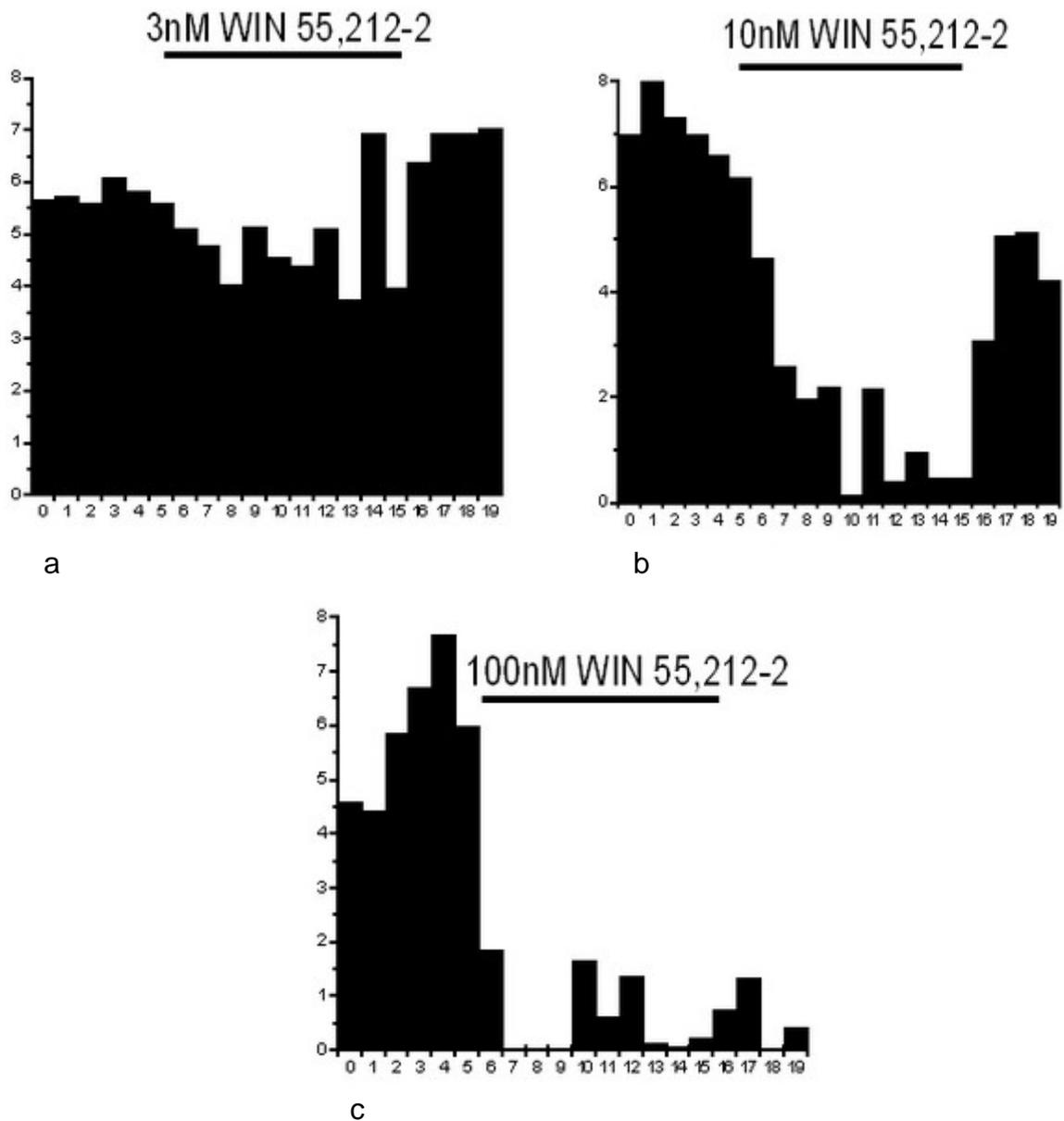


Abbildung 15: Balkendarstellung der Abnahme der Aktionspotentialfrequenz nach 5 Minuten "baseline" und 5 Minuten Applikation von 3nM, 10nM und 100nM WIN 55,212-2. Die Ordinate zeigt die Frequenz in Hertz, die Abszisse die Zeit in Minuten.

3.3.1.2 WIN 55,212-2 Dosis-Wirkungs Kurve

Zur Ermittlung eines IC₅₀-Wertes wurden sämtlichen Werte (Tabelle 1) der prozentuale Abnahme der Spikeaktivität bezogen auf die Kontrolle unter der Wirkung der Substanz WIN 55,212-2 bei den verwendeten Konzentrationen (0,1nM, 1nM, 3nM, 10nM, 100nM) mit der Software Origin statistisch ausgewertet und gegen eine logarithmische Skala der Konzentration aufgetragen. Der Kurvenverlauf der Dosis-Konzentrationsantwort wurde mittels einer nicht linearen Regression nach Hill (Coval; 1970) gefittet (Abbildung 16) und der IC₅₀-Wert durch die Software Origin (Microcal, USA) berechnet. Der erhaltene IC₅₀-Wert von 3,6 nM ±0,3 nM kann mit Daten anderer Studien (2,7 ± 0,3 nM; Shen et al. *J. Neurosci.*; 1996) verglichen werden.

Konzentrationen (nM)	Spikeaktivität in Prozent	Fehler	Anzahl der Messungen
0	100	-	8
0,1	93,87131	6,38195	5
1	77,28424	7,29877	5
3	57,97561	12,1397	5
10	24,32613	7,02142	6
100	2,43432	1,91432	8

Tabelle 1: WIN 55,212-2 Daten bei unterschiedlichen Konzentrationen des CB₁-Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2. Die Prozentuale Spikeaktivität wurde im Bezug zu der basalen Spikeaktivität (Kontrollen) berechnet.

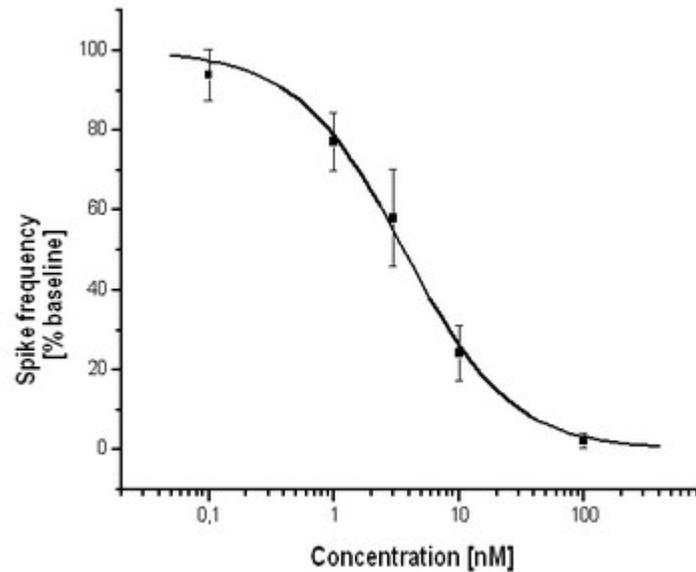


Abbildung 16: *Dosis-Konzentrations Antwort ansteigender Konzentrationen des CB₁ Agonisten WIN 55,212-2 auf die abnehmende Aktionspotentialfrequenz hippocampaler Pyramidalzellen Die Ordinate zeigt die AP-Frequenz in Prozent, die Abszisse die Konzentration in nM; n>5*

3.3.1.3 Statistische Analyse der Wirkung von WIN 55,212-2 auf Neuronen

Zum Vergleich der Mittelwerte der prozentualen Spikeaktivität bei den unterschiedlichen Konzentrationen des Agonisten wurde jede Konzentration mit jeweils nachfolgenden mittels eines t-Tests statistisch analysiert (Tabelle 2). Das Balkendiagramm (Abbildungen 15) zeigt die prozentualen Abnahmen der Aktionspotentialfrequenz durch den CB₁-Rezeptor Agonist WIN 55,212-2. Ab der Konzentration von 3nM WIN 55,212-2 ist jede Aktivität zur nachfolgenden Dosis signifikant.

	0,1	1	3	10
1	0,23583136			
3		0,08772642		
10			0,01603379	
100				0,00305118

Tabelle 2: *p*-Werte des *t*-Test Vergleichs der einzelnen WIN 55,212-2 Konzentration zu der jeweils nächst höheren Dosis.

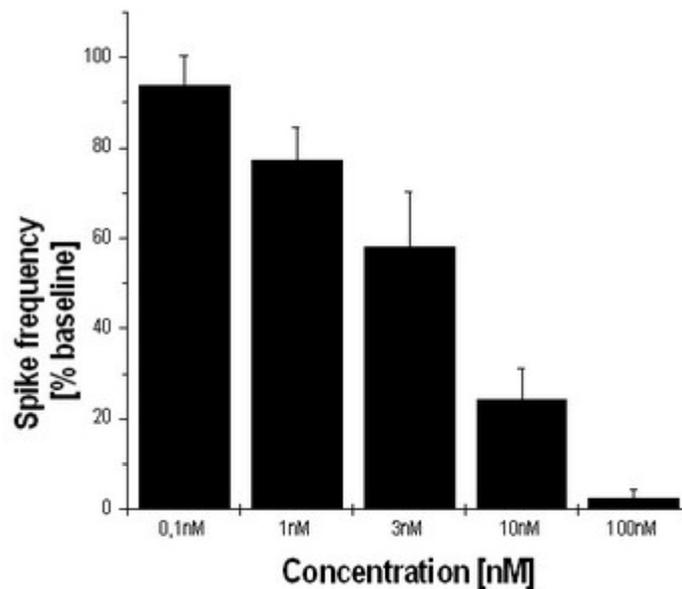


Abbildung 17: Balkendiagramm der Prozentualen Spikeaktivität bei ansteigender Konzentrationen des CB₁ Agonisten WIN 55,212-2. Die Ordinate zeigt die AP-Frequenz in Prozent, die Abszisse die Konzentration in nM ; n>5.

3.3.1.4 Burstanalyse der Wirkung des CB₁-Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2

Um eine Aussage über den Einfluss des CB₁-Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2 auf die Modulation der Burstaktivität der kultivierten Neurone machen zu können wurden zu diesem Zweck mittels der Software MiniAnalysis die Aktionspotential „Bursts“ de-

tektiert und hinsichtlich der Anzahl der Spikes, Dauer des Bursts und Burst-Intereventintervall mit dem Programm Origin (Microcal) ausgewertet. Abbildung 18 zeigt die Pausen der Bursts in Millisekunden unter Kontrollbedingung und während Substanzapplikation. Die Zunahme der Pausen zwischen den Bursts auf über 400% der Aktivität unter Kontrollbedingungen ist signifikant ($p < 0,05$) und entspricht der Beobachtung der verminderten Spikeaktivität aus Kapitel 3.3.1.3.

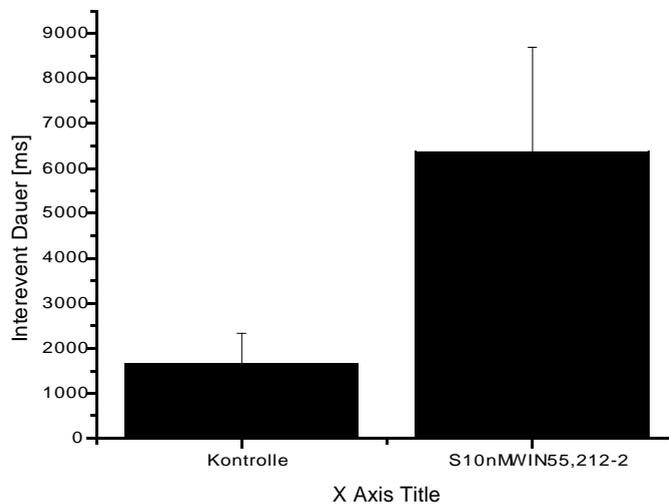


Abbildung 18: Dauer der Pausen zwischen den Bursts unter Kontrollbedingungen und unter der Wirkung der CB_1 -Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2. Die Ordinate zeigt die Zeit in Millisekunden; $n > 5$.

Allerdings kann gleichzeitig eine statistisch signifikante Zunahme der Anzahl von Spikes pro Burst um 25% ermittelt werden (Abbildung 19). Diese erhöhte Anzahl von Spikes innerhalb eines Burst liegt keine intrinsische Erhöhung der Spikefrequenz zugrunde, sondern eine um 35% verlängerte Dauer des Bursts (Abbildung 20). Die Bedeutung einer solchen Modulation der Burstlängen ist nicht bekannt.

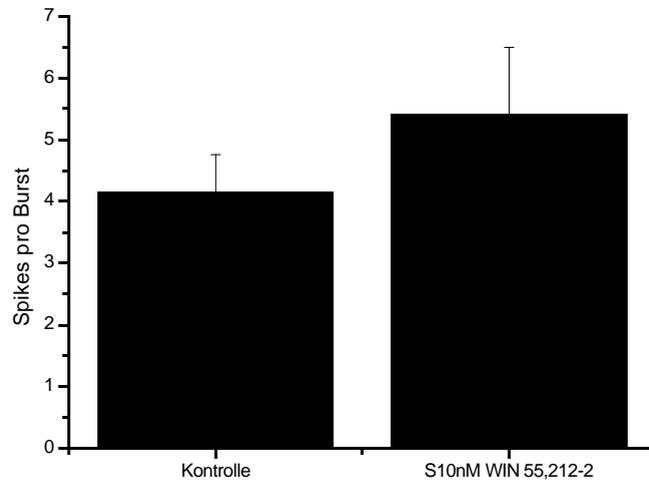


Abbildung 19: Anzahl Spikes pro Bursts unter Kontrollbedingungen und unter der Wirkung der CB₁-Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2. Die Ordinate zeigt die Spikes pro Burst; n>5.

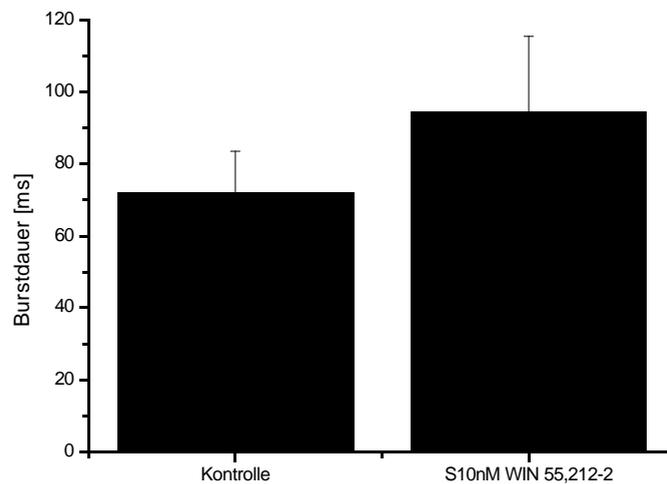


Abbildung 20: Burstlängen unter Kontrollbedingungen und unter der Wirkung der CB₁-Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2. Die Ordinate zeigt die Burstdauer in Millisekunden; n>5.

3.3.2 Der inverse CB₁-Rezeptor Agonist AM 251

Die Substanz AM 251 ist ein synthetischer inverser Agonist des Cannabinoid Rezeptors 1. Inverse Agonisten sind Substanzen, die an einen bestimmten Rezeptor binden, aber im Gegensatz zu einem Agonisten dieses Rezeptors eine gegensätzliche Wirkung erzielen. Im Falle des CB₁-Rezeptors führt dessen Aktivierung durch AM 251 zu einer Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz.

3.3.2.1 Effekt von AM 251 auf das Bursten von Neuronen

In Abbildung 21 ist exemplarisch die Wirkung des inversen CB₁-Rezeptor Agonisten AM 251 auf eine kultivierte hippocampale Pyramidalzelle im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Spikeaktivität wurde über eine Minute gemittelt und über der Zeit aufgetragen. Bei der geringsten Konzentration von 0,1 nM AM 251 lässt sich bereits eine leichte Erhöhung der Spikefrequenz erkennen. Die stärkste inverse Wirkung von AM 251, eine Aktionspotentialfrequenzsteigerung von 60% zeigt sich bei der Konzentration von 1nM. Allerdings zeigt sich bei der nächst höheren Dosis (10nM AM 251) eine Inhibition der Spikefrequenz auf nahezu Baselineaktivität. Dies könnte darauf hinweisen, dass höhere Konzentration dieses inversen Agonisten einen agonistischen Effekt auf die kultivierten Pyramidalzellen haben. Der Effekt konnte hier zum ersten mal gezeigt werden, allerdings ist der zugrunde liegende Mechanismus nicht bekannt.

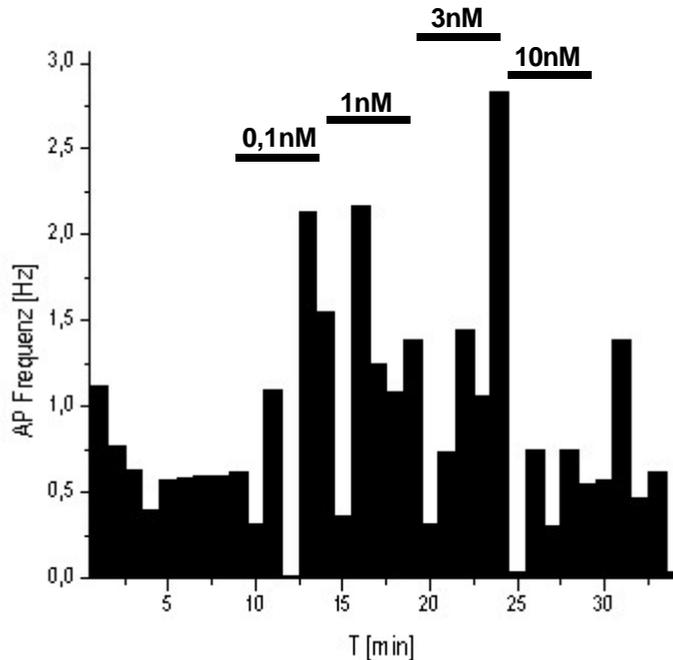


Abbildung 21: AM 251 Balkendarstellung der Zu- und Abnahme der Aktionspotentialfrequenz nach 5 Minuten “baseline” und 5 Minuten Applikation von unterschiedlichen Dosen AM 251. Die Ordinate zeigt die Frequenz in Hertz, die Abszisse die Zeit in Minuten

3.3.2.2 AM 251 Dosis-Wirkungs Kurve

Zur Ermittlung eines EC_{50} -Wertes wurden sämtlichen Werte der prozentuale Abnahme der Spikeaktivität unter der Wirkung der Substanz AM 251 bei den verwendeten Konzentrationen (0,1nM, 1nM, 3nM,10nM) mit der Software Origin statistisch ausgewertet und über eine logarithmische Skala der Konzentration aufgetragen. Die prozentuale Veränderung der Spikeaktivität wurde nach der Formel $[(AP\text{-Frequenz unter Substanzwirkung} * 100) / \text{basale AP-Frequenz}]$ errechnet. Der Kurvenverlauf der Dosis-Konzentrationsantwort wurde mittels einer nicht Regression nach Hill gefittet (Abbildung 22) und der IC_{50} -Wert durch die Software Origin (Microcal, USA) berechnet. Der erhaltene EC_{50} -Wert von 0,12 nM kann allerdings nur als Richtwert genommen werden, da durch die agonistische Wirkung von AM 251 ab der Dosis von 3nM keine maximale Aktivität entsteht und somit der Kurvenfit verfälscht werden kann.

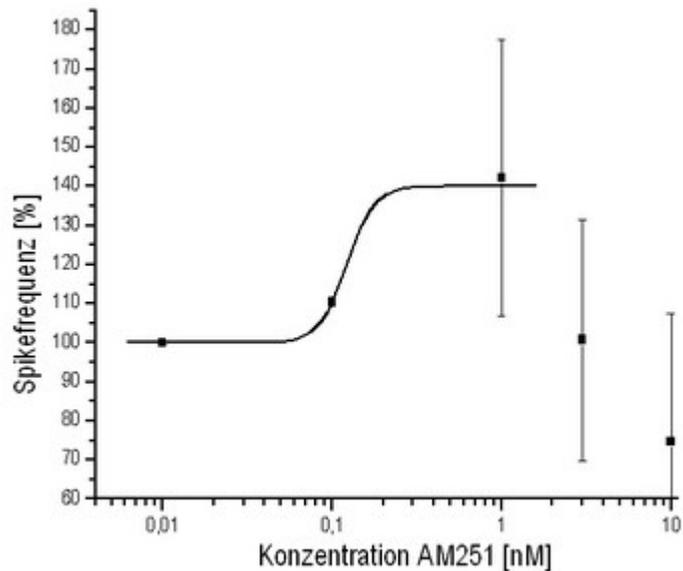


Abbildung 22: Dosis-Konzentrations Antwort des inversen CB_1 Agonisten AM 251 auf die zu- und abnehmende Aktionspotentialfrequenz hippocampaler Pyramidalzellen. Die Ordinate zeigt die AP-Frequenz in Prozent, die Abszisse die Konzentration in nM; n=4.

3.3.2.3 Statistische Analyse der Wirkung von AM 251 auf Neuronen

Zum Vergleich der Mittelwerte der Ab- und Zunahme der prozentualen Spikeaktivität bei dem inversen Agonisten AM 251 wurde die stärkste inverse mit den nachfolgenden agonistischen Dosen unter Verwendung eines t-Tests verglichen (Tabelle 2). Das Balkendiagramm (Abbildungen 18) zeigt, dass die prozentualen zu- und Abnahmen von 1 nM zu 3 nM bzw. von 1 nM zu 10 nM der Aktionspotentialfrequenz durch den inversen CB_1 -Rezeptor Agonist AM 251. Die Erhöhte Spikeaktivität ist bezogen auf die Inhibierung der Aktionspotentialaktivität durch höhere Dosen der Substanz AM 251 statistisch signifikant (Tabelle 3).

Konzentrationen	p-Wert
1nM AM 251 zu 3nM AM 251	0,01427
1nM AM 251 zu 10nM AM 251	0,02122

Tabelle 3: p-Werte des t-Test Vergleichs von 1nM AM 251 zu 3nM und 10nM AM 251

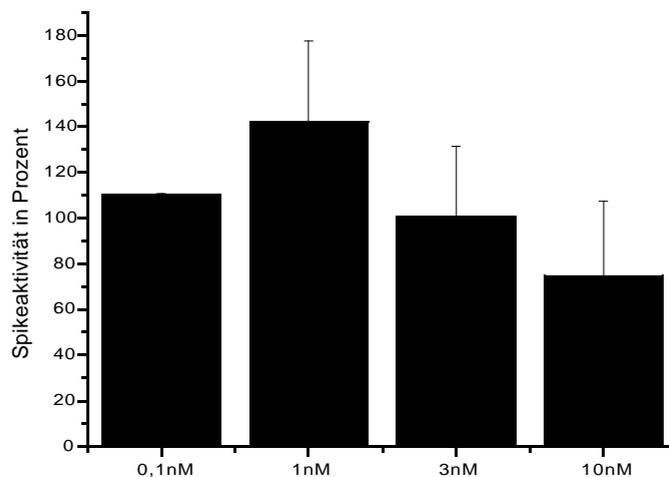


Abbildung 23: Balkendiagramm der Prozentualen Spikeaktivität bei ansteigender Konzentrationen des inversen CB₁ Agonisten AM 251. Die Ordinate zeigt die AP-Frequenz in Prozent, die Abszisse die Konzentration in nM; n=5.

3.3.2.3 Burstanalyse der Wirkung des inversen CB₁-Rezeptor Agonisten AM 251

Abbildung 24 zeigt die mittels Origin ermittelte Anzahl der Spikes pro Burst unter Kontrollbedingungen und 1nM AM 251. Auffallend ist die leichte Abnahme der Anzahl der Spikes pro Burst um 12% ($p=0,01$), entspricht aber der gegenteiligen Wirkung des CB₁-Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2.

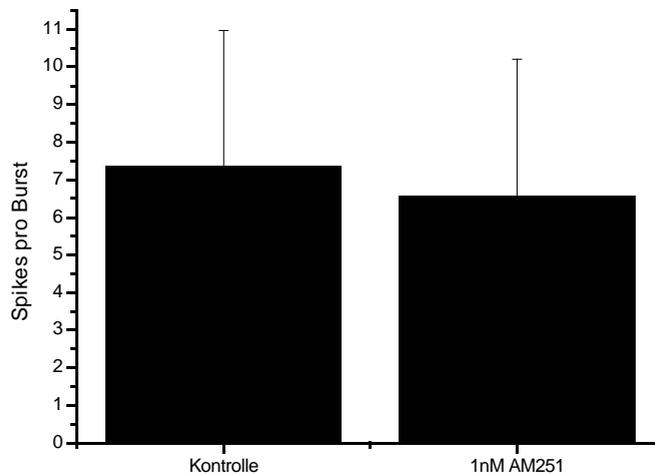


Abbildung 24: Anzahl Spikes pro Bursts unter Kontrollbedingungen und unter der Wirkung des inversen CB₁-Rezeptor Agonisten AM 251. Die Ordinate zeigt die Spikes pro Burst.

Um die Inhibition der Spikeaktivität bei 10nM AM 251 mit der am stärksten aktivierenden Konzentration von 1nM der selben Substanz auf das Burstverhalten hin zu untersuchen wurde mittels der Software MiniAnalysis die AP-Bursts detektiert und hinsichtlich der Burst-Intereventintervalle mit dem Programm Origin (Microcal) ausgewertet. Die Verlängerung der Pausen zwischen den Bursts um 60% ($p=0,03$) (Abbildung 25) zeigt entsprechend der Spikefrequenzanalyse (KAPITEL) eine Unterdrückung der Aktivität der kultivierten Neurone, die der Wirkung des CB₁-Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2 entsprechen könnte.

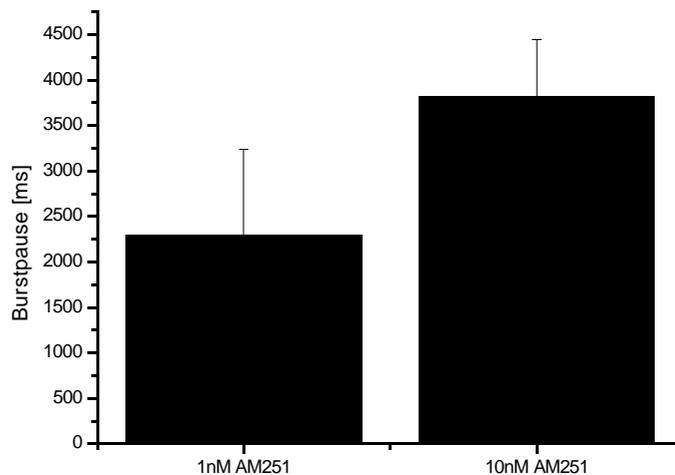


Abbildung 25: Dauer der Pausen zwischen den Bursts unter Kontrollbedingungen und unter der Wirkung des inversen CB₁-Rezeptor Agonisten AM 251. Die Ordinate zeigt die Zeit in Millisekunden.

Bei der Analyse der Burstpausen der stärksten aktivierenden Konzentration von 1nM AM 251 und der agonistischen Konzentration von 10nM AM 251 zeigt sich eine ca 70%ige Verlängerung der Pausen zwischen zwei aufeinander folgender Burst. Diese Art der Modulation hin zu längeren Pausen zwischen zwei Bursts konnte auch bei dem CB₁-Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2 gezeigt werden und spricht somit für eine agonistische Wirkung bei höheren Dosen von AM 251.

3.3.3 Der inverse CB₁-Rezeptor Agonist Rimonabant

Rimonabant (SR141716A, 5-(4-Chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl- N-(piperidin-1-yl)-1H-pyrazol-3-carboxamid) ist ein synthetischer inverser Agonist des CB₁-Rezeptors und führt wie die Substanz AM 251 im Gegensatz zu einem vollen Agonisten zu einer Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz.

3.3.3.1 Effekt von Rimonabant auf das Bursten von Neuronen

Die Spikeaktivität wurde über eine Minute gemittelt und über der Zeit aufgetragen (Daten nicht gezeigt). Bei der Konzentration von 0,3 nM Rimonabant lässt sich eine

Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz erkennen. Die stärkste inverse Wirkung von Rimonabant, eine Aktionspotentialfrequenzsteigerung von ca. 40% zeigt sich bei der Konzentration von 1nM. Allerdings zeigt sich bei der Konzentration von 10nM Rimonabant eine Inhibition der Spikefrequenz auf nahezu Baselineaktivität. Dies könnte darauf hinweisen, dass auch bei diesem inversen Agonisten, analog zu AM 251 (Kapitel 3.3.2), höhere Konzentrationen einen agonistischen Effekt auf die kultivierten Pyramidalzellen haben. Auch hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass diese inversen Agonisten eine reine agonistische Komponente bei nanomolaren Konzentrationen aufweisen.

3.3.3.2 Rimonabant Dosis-Wirkungs Kurve

Zur Ermittlung eines EC_{50} -Wertes wurden sämtlichen Werte (Tabelle 2) der prozentuale Abnahme der Spikeaktivität unter der Wirkung der Substanz Rimonabant bei den verwendeten Konzentrationen (0,01nM, 0,1nM, 1nM, 3nM, 10nM, 100nM) mit der Software Origin statistisch ausgewertet und über eine logarithmische Skala der Konzentration aufgetragen. Die prozentuale Veränderung der Spikeaktivität wurde nach der Formel $[(AP\text{-Frequenz unter Substanzwirkung} * 100) / \text{basale AP-Frequenz}]$ errechnet. Der Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungsantwort wurde mittels einer nicht linearen Regression nach Hill angepasst (Abbildung 26) und der IC_{50} -Wert durch die Software Origin (Microcal, USA) berechnet. Der erhaltene EC_{50} -Wert von 1 nM kann nur als Richtwert angesehen werden, da wie auch bei der der Substanz AM 251, die agonistische Komponente von Rimonabant ab der Konzentration von 3nM kein maximales Plateau entsteht und somit die Kurvenanpassung verfälscht werden kann.

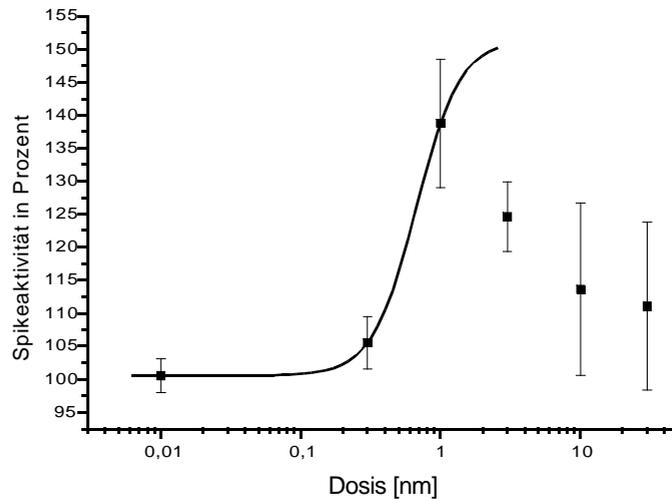


Abbildung 26: Dosis-Konzentrations Antwort ansteigender Konzentrationen des inversen CB₁ Agonisten Rimonabant auf die zu- und abnehmende Aktionspotentialfrequenz hippocampaler Pyramidalzellen. Die Ordinate zeigt die AP-Frequenz in Prozent, die Abszisse die Konzentration in nM; n>5

3.3.3.3 Statistische Analyse der Wirkung von Rimonabant

Zum Vergleich der Mittelwerte der Ab- und Zunahme der prozentualen Spikeaktivität bei dem inversen Agonisten Rimonabant wurde die stärkste inverse mit den nachfolgenden agonistischen Dosen mittels eines t-Tests verglichen. Das Balkendiagramm (Abbildungen 27) zeigt, dass die prozentualen Zu- und Abnahmen von 1nM zu 3nM bzw. von 1nM zu 10nM der Aktionspotentialfrequenz durch den inversen CB₁-Rezeptor Agonist Rimonabant statistisch signifikant sind. Als eine Schwierigkeit stellen sich die relativ großen Fehlerbalken dar, diese könnten durch die gleichzeitige inverse und agonistische Wirkung zustande kommen, die bei unterschiedlichen Zellen jeweils für einen verschieden starken Anteil an der Änderung der Spikefrequenz verantwortlich sind.

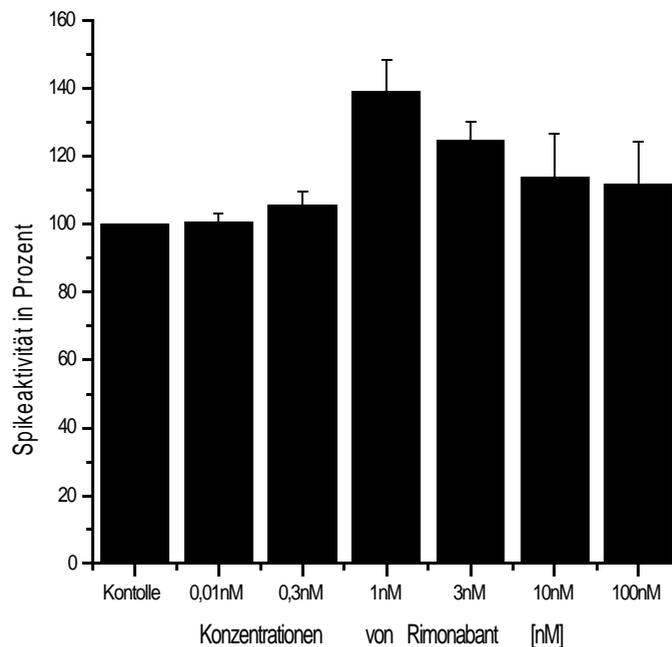


Abbildung 27: Balkendiagramm der prozentualen Spikeaktivität bei ansteigender Konzentrationen des inversen CB₁ Agonisten Rimonabant. Die Ordinate zeigt die AP-Frequenz in Prozent, die Abszisse die Konzentration in nM; n>5.

3.3.3.4 Burstanalyse der Wirkung von Rimonabant

Um eine Aussage über den Einfluss des inversen CB₁-Rezeptor Agonisten Rimonabant auf die Veränderung der Burstaktivität der Pyramidalzellen treffen zu können wurden mittels der Software MiniAnalysis die Bursts detektiert und bezüglich der Anzahl der Spikes, Dauer des Bursts und Burst-Intereventintervall mit dem Programm Origin ausgewertet. Abbildung 28 zeigt die Pausen zwischen den detektierten Bursts in Millisekunden im direkten Vergleich einer Aktivitäts steigerndem Konzentration (0,3nM) zu einer wieder verstärkt agonistisch wirkenden Konzentration (3nM) von Rimonabant. Die Verkürzung der Burstintervalle um ca. 70% bei einer Verzehnfachung der Konzentration von Rimonabant ist signifikant ($p < 0,05$). Gleichzeitig zeigt sich eine Verringerung der Anzahl von Spikes pro Burst um ca. 20% ($p < 0,05$) (Abbildung 29) und eine Verkürzung der Burstlänge um ca. 25% ($p < 0,05$) (Abbildung 30). Die verminderte Anzahl von Aktionspotentialen pro Burst und die kürzeren Bursts sind die Ursache für die verminderte Spikeaktivität. Dies entspricht der beobachteten

geringeren Spikeaktivität ab der Konzentration von 1nM Rimonabant aus Kapitel 3.3.3.3. Somit wird durch die dokumentierte Modulation der Bursts die Beobachtung der agonistischen Wirkung bei höheren Dosen von Rimonabant bestätigt.

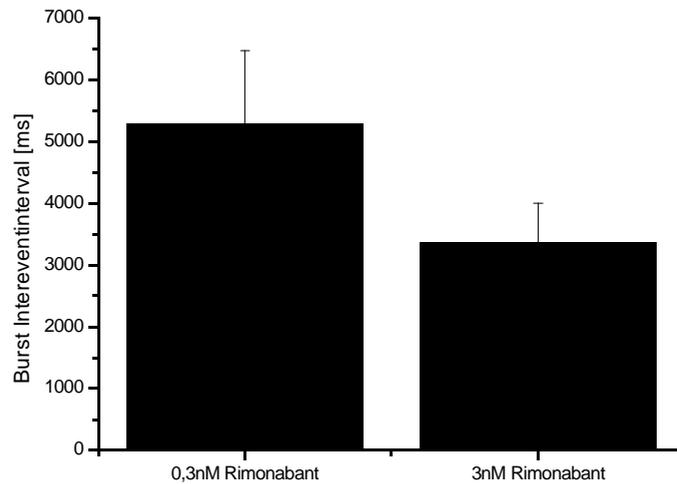


Abbildung 28: Dauer der Pausen zwischen den Bursts unter der Wirkung des inversen CB₁-Rezeptor Agonisten Rimonabant. Die Ordinate zeigt die Zeit in Millisekunden; n=4.

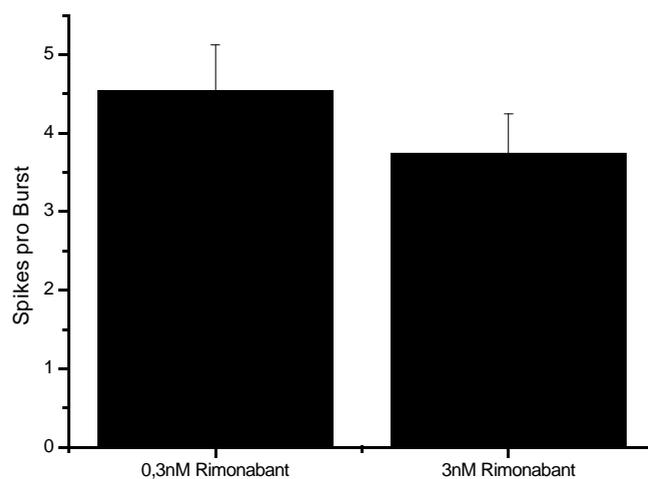


Abbildung 29: Anzahl Spikes pro Bursts unter Kontrollbedingungen und unter der Wirkung des inversen CB₁-Rezeptor Agonisten Rimonabant. Die Ordinate zeigt die Anzahl der Spikes pro Burst; n=4

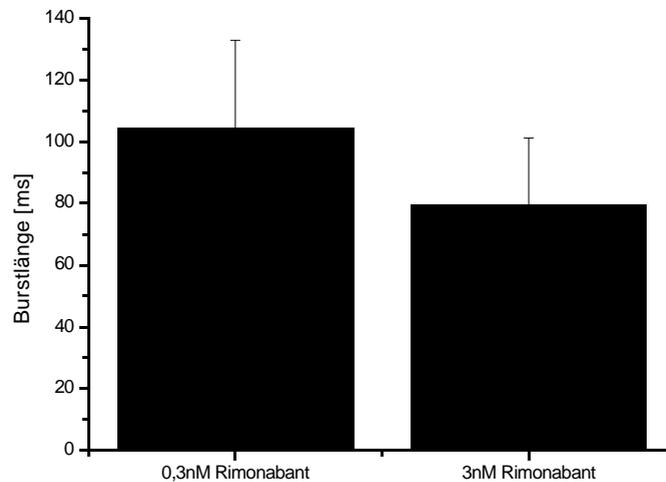


Abbildung 30: Länge der Bursts unter Kontrollbedingungen und unter der Wirkung des inversen CB_1 -Rezeptor Agonisten Rimonabant. Die Ordinate zeigt die Zeit in Millisekunden, n=4

3.3.4 Koapplikation von WIN 55,212-2 und Rimonabant

Aufgrund von Analysen der Abhängigkeit der Rimonabant Stimulation von der basalen Spikeaktivität der kultivierten Neuronen (Daten nicht gezeigt) kann darauf geschlossen werden, dass die Aktivität der konstitutiv aktiven Signalkaskade einen Einfluss auf die Wirkung von Rimonabant hat. Dies führt zwangsläufig zu einer erhöhten Variabilität der erhobenen Daten. Um diesen Effekt zu minimieren wurde mit 10nM CB_1 Agonisten WIN 55,212-2 versucht eine Basalaktivität einzustellen. Die Variabilität konnte hierbei deutlich verringert werden, allerdings zeigte sich weiterhin eine Abhängigkeit der Rimonabantstimulation von der basalen Spikeaktivität der gemessenen Neuronen.

3.3.4.1 Dosis-Wirkungs Kurve von Rimonabant bei Koapplikation von WIN 55,212-2

Zur Ermittlung eines EC_{50} -Wertes wurden sämtliche Werte der prozentuale Zu- und Abnahme der Spikeaktivität unter der Wirkung der Substanz Rimonabant bei den verwendeten Konzentrationen (0,01 0,1nM, 1nM, 3nM,10nM; 100nM) unter der An-

wesenheit von 10nM WIN 55,212-2 mit der Software Origin statistisch ausgewertet und über eine logarithmische Skala der Konzentration aufgetragen. Der Kurvenverlauf der Dosis-Konzentrationsantwort wurde mittels einer nicht linearen Regression nach Hill gefittet (Abbildung 31) und der EC_{50} -Wert durch die Software Origin (Microcal, USA) berechnet. Der erhaltene EC_{50} -Wert von 0,3 nM kann allerdings wie schon zuvor bei AM 251 und Rimonabant nur als Richtwert genommen werden, da durch die agonistische Wirkung von Rimonabant keine maximale Aktivität entsteht und dadurch die Kurvenanpassung verfälscht wird. Es zeichnet sich allerdings eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs Kurve um 0,6 nM des EC_{50} wertes im Vergleich zur Stimulation mit Rimonabant alleine ab.

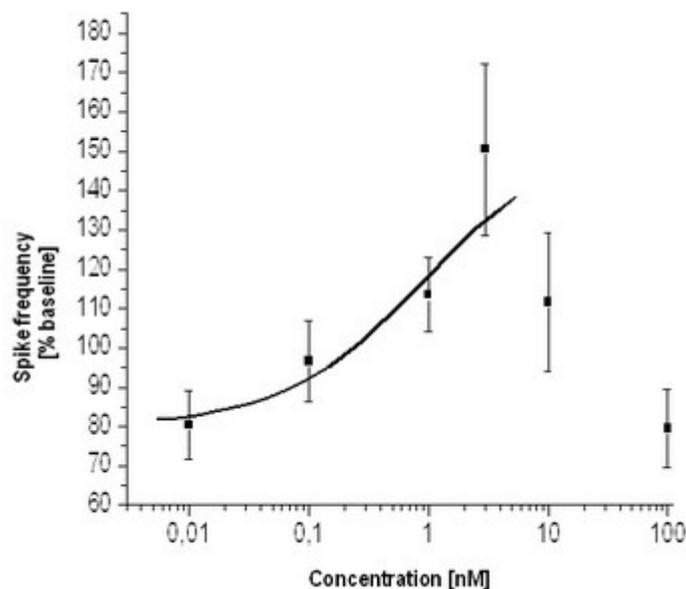


Abbildung 31: Dosis-Konzentrations Antwort ansteigender Konzentrationen des inversen CB_1 Agonisten Rimonabant auf die zu- und abnehmende Aktionspotentialfrequenz hippocampaler Pyramidalzellen Die Ordinate zeigt die AP-Frequenz in Prozent, die Abszisse die Konzentration in nM; $n > 6$.

3.3.4.2 Statistische Analyse der Wirkung von Rimonabant unter Koapplikation von WIN 55,212-2

Zum Vergleich der Mittelwerte der prozentualen Spikeaktivität bei dem Inversen Agonisten Rimonabant unter Gleichzeitiger Stimulation mit der CB₁ Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2 wurde die stärkste inverse mit den nachfolgenden agonistisch wirkenden Dosen mittels eines t-Tests verglichen. Das Balkendiagramm (Abbildungen 32) zeigt, dass die prozentuale Veränderung der Spikeaktivität von 1nM zu 3nM bzw. von 1nM zu 10nM der Aktionspotentialfrequenz durch den inversen CB₁-Rezeptor Agonist Rimonabant statistisch signifikant sind ($p < 0,05$).

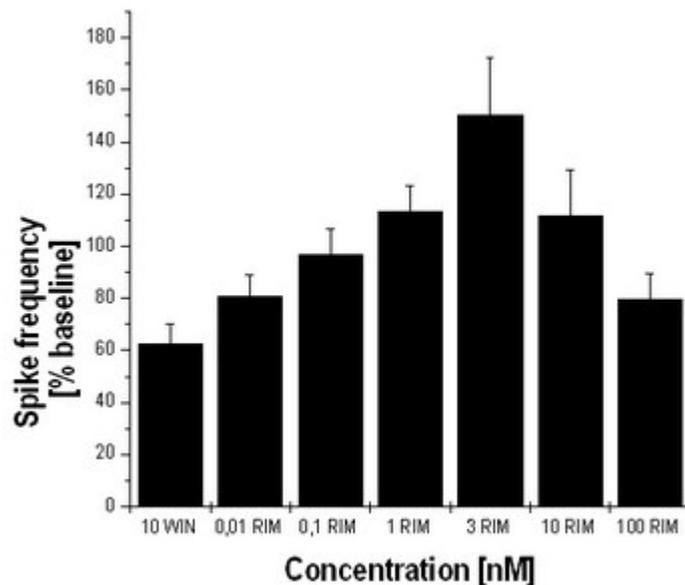


Abbildung 32: Balkendiagramm der Prozentualen Spikeaktivität bei ansteigender Konzentrationen des inversen CB₁ Agonisten Rimonabant in Anwesenheit von 10 nM WIN 55,212-2. Die Ordinate zeigt die AP-Frequenz in Prozent, die Abszisse die Konzentration von Rimonabant in nM; $n > 6$

Aus den durch die Koapplikation von Rimonabant und WIN 55,212-2 gewonnenen Daten kann geschlossen werden, dass die agonistische Wirkung von Rimonabant bei 10nM bzw. 100nM kein Artefakt der größeren Variabilität dieses physiologischen Assays darstellen, sondern einen physiologischen Hintergrund hat der noch nicht beschrieben wurde.

3.3.4.4 Burstanalyse der Koapplikation von Rimonabant und WIN 55,212-2

Um die Aussage über den Einfluss des inversen CB_1 -Rezeptor Agonisten Rimonabant und des CB_1 -Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2 auf die Modulation der Burstaktivität der kultivierten Neurone bestätigen zu können wurden zu diesem Zweck mittels der Software MiniAnalysis die Aktionspotentialbursts detektiert und hinsichtlich der Anzahl der Spikes pro Burst mit dem Programm Origin ausgewertet. Abbildung 33 zeigt exemplarisch einen Burstplot einer gemessenen Pyramidalzelle. Jeder Punkt auf dem Diagramm zeigt einen detektierten Burst, gleichzeitig gibt die Ordinate die Anzahl der Spikes dieses Bursts an. Die verstrichene Zeit wird durch die Abszisse angezeigt. Die rote Linie ist der gleitende Durchschnitt der einzelnen detektierten Bursts über die Zeit. Die ersten 5 Minuten zeigen die basale Burstaktivität dieses Neurons. Bei der anschließenden Applikation von 10 nM WIN 55,212-2 zeigt sich eine deutliche Verlängerung der Bursts, wie bereits in Kapitel 3.3.1.4 gezeigt werden konnte. Die folgende Stimulation mit 0,1 nM bzw 3 nM Rimonabant unter der Anwesenheit von 10 nM WIN 55,212-2 weist deutlich eine Verkürzung der von dem Neuron generierten Bursts auf. Durch das anschließende Auswaschen von Rimonabant unter Anwesenheit von WIN 55,212-2 zeigt sich die gleiche Burstlängenverteilung wie schon bei der ersten Applikation dieses Agonisten. Diese vermehrte Anzahl von Spikes innerhalb eines Burst bei der Stimulation mit WIN 55,212-2 liegt keine Erhöhung der Spikefrequenz zugrunde, sondern eine verlängerte Dauer des Bursts.

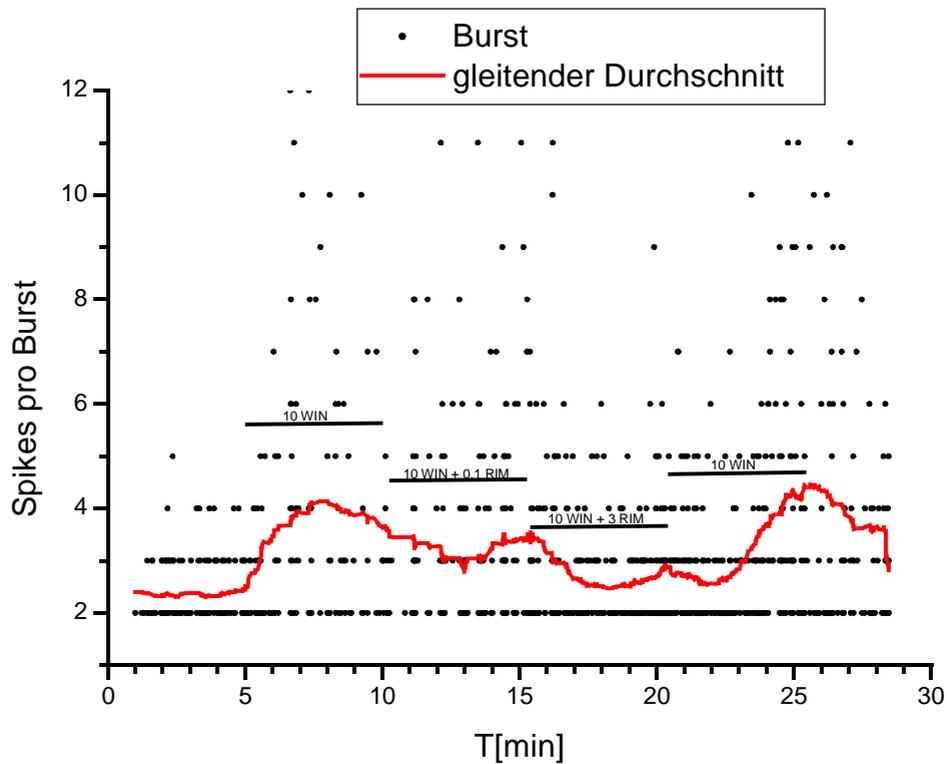


Abbildung 33: Burstplot mit gleichzeitiger Angabe der Anzahl von Spikes pro Burst bei Applikation von WIN 55,212-2 und ansteigenden Konzentrationen des inversen CB_1 Agonisten Rimonabant. Die Ordinate zeigt die Bursts und Anzahl der Spikes pro Burst, die Abszisse die Zeit in Minuten.

3.4 Einfluss der cAMP Signaltransduktion auf Rimonabant und WIN55,212-2

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein vom Adenosintriphosphat (ATP) abgeleitetes körpereigenes Molekül. Es dient als Second Messenger bei der zellulären Signalweiterleitung (Signaltransduktion) und führt u.a. zu einer Aktivierung von Proteinkinasen. Abbildung 34 stellt in einfacher Form die Signaltransduktion des CB_1 -Rezeptors dar.

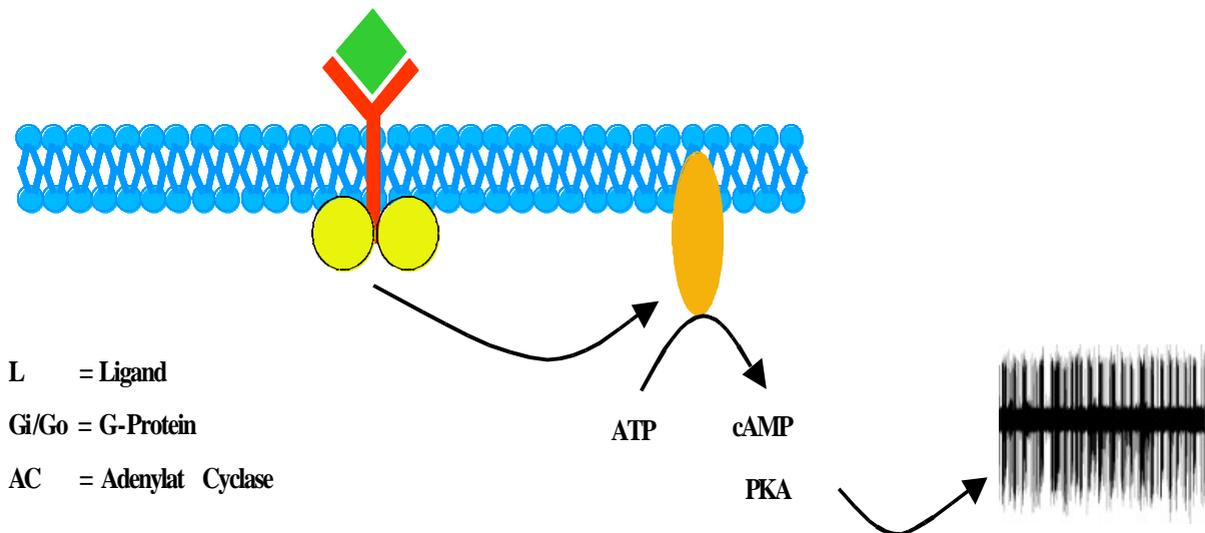


Abbildung 34: CB₁-Rezeptoren gehören zu den sieben Transmembran Rezeptoren und sind ständig an Go oder Gi gekoppelt und somit konstitutiv aktiv.

Um aufzuklären ob der bei AM 251 und Rimonabant beobachtete agonistische Effekt seine Ursache in der beteiligten Signaltransduktion hat, wurde mittels des Adenylatzyklase Hemmers MDL123355 (Gan et al., 1995) die Aktivität der Adenylatzyklase geblockt.

3.4.1 Wirkung von WIN 55,212-2 bei gleichzeitiger Blockierung der cAMP Signalkaskade

Als Evaluierung für die Wirksamkeit des Adenylatzyklase Blockers MDL123355 wurde nach fünf minütiger Applikation mit MDL123355 die Spikeaktivität unter Anwesenheit von WIN 55,212-2 bestimmt. Abbildung 35 zeigt eine eindeutige Blockierung des CB₁-Rezeptorsignalweges, denn die fast vollständige Inhibition der Spikeaktivität durch 100 nM WIN 55,212-2 wurde komplett aufgehoben ($p < 0,05$).

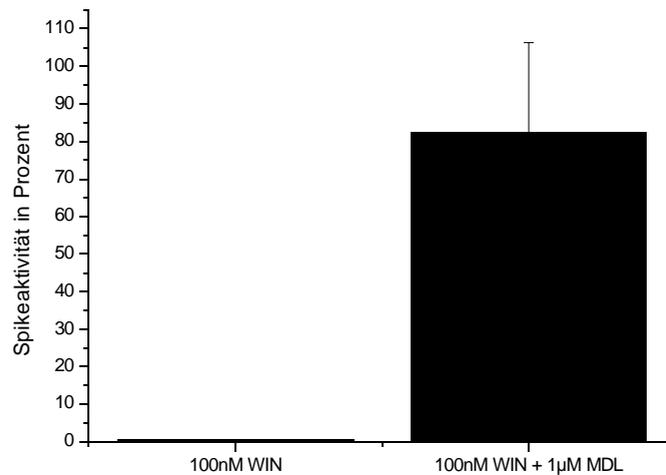


Abbildung 35: Balkendiagramm der prozentualen Spikeaktivität bezogen auf die Kontrolle bei der Konzentrationen von 100 nM des CB₁ Agonisten WIN 55,212-2, und 100 nM Rimonabant koappliziert mit dem Adenylatcyclase Inhibitor MDL123355. Die Ordinate zeigt die AP-Frequenz in Prozent; n=3.

3.4.2 Wirkung von Rimonabant bei gleichzeitiger Blockierung der cAMP Signalkaskade

Bei gleichem Applikationsprotokoll von MDL123355 wie unter Kapitel 3.4.1 nur unter Verwendung des inversen CB₁ Rezeptor Agonisten Rimonabant zeigt sich ein ähnliches Verhalten. Die Signaltransduktion wird an der Stelle der Adenylatzyklase inhibiert und die invers agonistische Wirkung von 1nM Rimonabant vollständig geblockt (Abbildung 36) ($p < 0,05$). Allerdings zeigt sich auch keine agonistische Komponente. Somit ist unwahrscheinlich, dass diese agonistische Wirkung von Rimonabant über einer der Adenylatcyclase nachgeschalteten Signaltransduktionskomponente hervorgerufen wird.

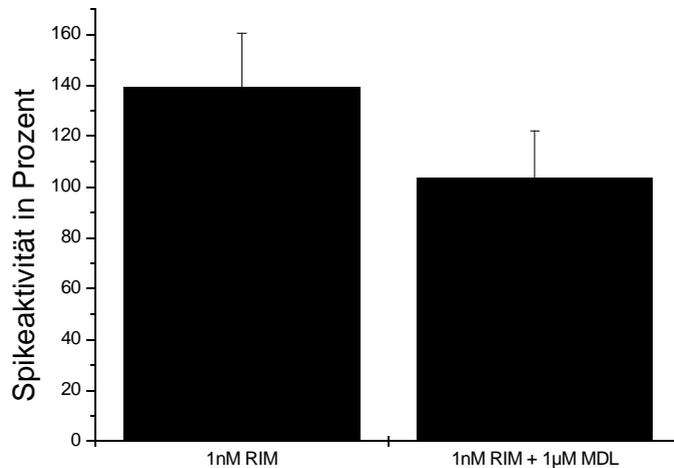


Abbildung 36: Balkendiagramm der prozentualen Spikeaktivität bezogen auf die Kontrolle bei der Konzentrationen von 1nM des inversen CB₁ Agonisten Rimonabant, und 1nM Rimonabant koappliziert mit dem Adenylatcyclase Inhibitor MDL123355. Die Ordinate zeigt die AP-Frequenz in Prozent; n=3

3.5 Wirkung von Rimonabant bei gleichzeitiger Blockierung des μ -Opioid Rezeptors

Eine weitere Möglichkeit für den beobachteten agonistischen Effekt von Rimonabant, ist die Aktivierung eines weiteren Rezeptors durch diese Substanz. Einer dieser möglichen Rezeptoren, die auch auf Cannabinoide reagieren stellen die Opioid-Rezeptoren dar. Ein spannender Kandidat ist der μ Opioid Rezeptor. Im Folgenden Versuch wurden diese Rezeptoren durch den Opioid Antagonisten Naloxon blockiert (1 μ M), und gleichzeitig das Cannabinoid System mit 10nM Rimonabant stimuliert. Jedoch wie in Abbildung 37 dargestellt, zeigen sich keinerlei Veränderungen in der erfassten Spikefrequenz der gemessenen Neuronen ($p=0,85$).

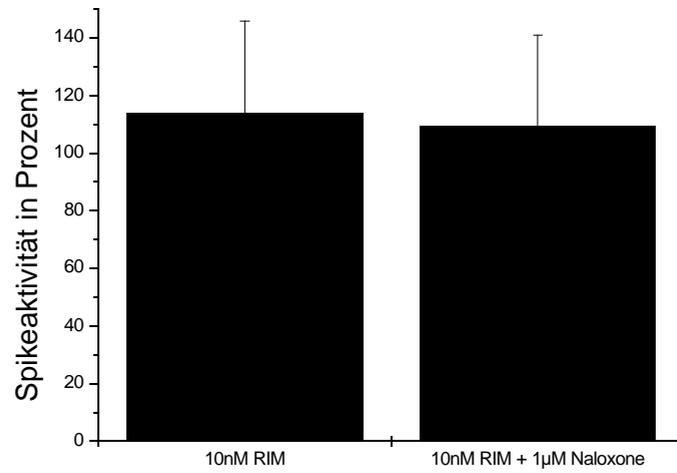


Abbildung 37: Balkendiagramm der prozentualen Spikeaktivität bezogen auf die Kontrolle bei der Konzentrationen von 10nM des inversen CB₁ Agonisten Rimonabant, und 10nM Rimonabant koappliziert mit dem μ Opioid Rezeptor Antagonisten Naloxone. Die Ordinate zeigt die AP-Frequenz in Prozent; n=3

4 DISKUSSION

Die Fähigkeit physiologischer Systeme auf molekularer Ebene zu kommunizieren wird zum großen Teil über Rezeptoren in der Plasmamembran der Zellen realisiert. Diese Rezeptoren befinden sich an der Oberfläche von Lipidmembranen und bestehen aus Proteinen, die mit zusätzlichen Modifikationen versehen sind (z.B. Kohlehydratketten). Sie dienen der Signalübertragung und dem Import von Substanzen in die Zelle. Im ZNS gehört zu den wichtigsten Aufgaben dieser Rezeptoren die Signaltransduktion und -modulation. Der in dieser Arbeit untersuchte CB₁-Rezeptor ist Teil dieses neuronalen Regelsystems.

Für die Herstellung der primären Neuronenkultur zur Untersuchung des Cannabinoidsystems wurde der Hippocampus gewählt, der eine hohe Dichte von CB₁-Rezeptoren aufweist (Tsou et al., 1998; Katona et al., 1999). Im Rahmen der Evaluierung der kultivierten hippocampalen Neuronen wurde durch immunocytochemische Methoden mittels eines Antikörpers die Expression des CB₁-Rezeptors in diesen Neuronen bestätigt. Die lichtmikroskopische Analyse zeigt, dass diese Rezeptoren auf den Zellkörpern in hoher Dichte, und in geringerer Dichte auf den Neuriten vorhanden sind. Durch funktionelle Analysen ist bekannt, dass die CB₁-Rezeptoren präsynaptisch vorhanden sein müssen (Elphick & Egertova, 2001). Die Expression der CB₁-Rezeptoren an den Somata der Zellen stimmt mit bereits veröffentlichten Daten überein (Marsicano & Lutz, 1999; Irving et al., 2000; Tsou et al., 1998). Es ist allerdings nicht bekannt, welche Funktion diese Rezeptoren an den Somata erfüllen. Aufgrund der Annahme, dass die endogenen Cannabinoide „on demand“ synthetisiert werden, ist es durchaus möglich, dass die erfassten CB₁-Rezeptoren sich in den, an der Proteinsynthese beteiligten Zellorganellen (z.B. Ribosomen) befinden (Irving et al., 2000). Zur funktionellen Evaluierung der Neuronenkultur wurde die Temperaturabhängigkeit der feuernden Neurone untersucht. Hierzu wurde über die Perfusionsheizung eine Temperaturrampe von physiologischen 36,5 ± 0,5°C über 30 ± 0,5°C zu Raumtemperatur appliziert (23 ± 0,5°C). Die Analyse der erhobenen Daten zeigt eine Temperaturabhängigkeit der Aktionspotentialfrequenz. Der sprunghafte Anstieg der AP-Frequenz bei der Reduktion der Temperatur von 36,5°C nach 30°C ist bekannt (Horowitz et al., 1987; Gabriel et al. 1997), allerdings ist der zugrunde liegende physiologische Me-

chanismus nicht im Detail beschrieben. Bekannt ist jedoch, dass verschiedene TRP-Kanäle Temperatur sensitiv sind (Brauchi et al., 2004; Voets et al., 2004), und diese Kanäle die neuronale Aktivität beeinflussen können (Xing et al., 2007). Auch ist der Effekt verstärkter neuronaler Aktivität bei schneller Temperaturverminderung der Badlösung aus der Retina bekannt. (Hanke und Weimer, 2005).

Des Weiteren wurde mittels Tetrodotoxin (TTX) die spannungsabhängigen Natriumkanäle der Neurone geblockt um die Physiologie der Primärkultur zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass eine Konzentration von $0,7\mu\text{M}$ TTX zu einer vollständigen Blockade der spannungsabhängigen Natriumkanäle führte, die durch Auswaschen des TTX wieder reversibel war; wie schon von Fournier et al. 1984 beschrieben. Um Daten über die synaptische Transmission erheben zu können wurden mittels $17\mu\text{M}$ CNQX die AMPA-Rezeptoren inhibiert. Dies führte zu einer reversiblen Reduzierung der Spikefrequenz wie bereits von Blake et al. 1988 an Gehirnschnitten beschrieben wurde. Überdies wurden die Frequenz und die Kinetik von spontanen AMPA EPSCs, NMDA EPSCs und Aktionspotentialen bestimmt und diese mit publizierten Studien verglichen. Sowohl auf der Ebene der synaptischen- als auch auf der gesamten Netzwerk-Aktivität zeigte sich eine generelle Konsistenz der erhobenen Daten mit veröffentlichten Studien. Eine Erkenntnis dieser Versuchsreihen, die der Evaluierung der etablierten hippocampalen Neuronenkultur diene, ist, dass die erhobenen Daten der verschiedenen Experimente weitgehend mit bereits veröffentlichten physiologischen Zell- und Organ-Studien übereinstimmen und somit die hergestellte Primärkultur für weiterführende Untersuchungen zur Analyse des Cannabinoidsystems geeignet sind.

Nachdem durch diese Evaluierungstudien die Eignung der primären Hippocampus Kultur demonstriert wurde, konnte mit der Untersuchung des Cannabinoidsystems begonnen werden. Um nicht auf spontane Spikes angewiesen zu sein, wurden sämtliche Messungen mit Messpuffern, die eine geringe Konzentration von Magnesium und $0,01\text{mM}$ Glycin enthalten, durchgeführt. Der Vorteil von niedriger Magnesium induzierten „Bursts“ liegt in der Gleichmäßigkeit der Aktionspotentialaktivität über den Zeitraum der Messung und führt somit zu einer Reduktion der intrinsischen Variabilität des verwendeten physiologischen Assays. Zunächst wurde die Wirkung des CB_1 -Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2 auf die Aktionspotentialfrequenz der kultivierten Pyramidalzellen ermittelt. Hierbei zeigte sich bei den applizierten Konzentrationen

(0,1nM, 1nM, 3nM, 10nM, 100nM) des verwendeten Agonisten ein IC_{50} Wert von 3,6 nM $\pm 0,3$ nM, dieser kann mit Daten anderer Studien mit physiologischen Testsystemen verglichen werden ($2,7 \pm 0,3$ nM; Shen et al. *J. Neurosci.*; 1996). Es zeigt sich hier allerdings schon, dass weniger physiologische Assays, wie z.B. biochemische Methoden an explantierten Material bis um den Faktor 30 weniger empfindlich sind (Breivogel et al., 1998). Auch Studien, in denen elektrophysiologische Messungen an Gehirnschnitten durchgeführt wurden, zeigen eine weniger hohe Empfindlichkeit.

Um eine Aussage über den Einfluss des CB_1 -Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2 auf die Modulation der Burstaktivität der etablierten Neuronenkultur treffen zu können, wurden die Aktionspotentialsalven (Bursts) detektiert und bezüglich der Anzahl der Spikes, Dauer des Bursts und Pausen zwischen den Bursts analysiert. Die unter Substanzbedingung festgestellte Zunahme der Pausen zwischen den Bursts auf über 400% der Aktivität unter Kontrollbedingungen ist signifikant und deckt sich mit der beobachteten verminderten Aktionspotentialfrequenz. Allerdings kann gleichzeitig eine Zunahme der Anzahl von Spikes pro Burst um ca. 25% detektiert werden. Dieser erhöhten Anzahl von Aktionspotentialen innerhalb eines Burst liegt keine Erhöhung der Spikefrequenz zugrunde, sondern eine um ca. 35% verlängerte Dauer des Bursts. Die Bedeutung einer solchen Modulation der Burstlängen ist nicht bekannt. Jedoch zeigen Simulationen anhand neuronaler Netze und Untersuchungen an Gehirnschnitten, dass eine frequenzmodulierte Informationskodierung im Nervensystem durchaus wahrscheinlich ist (Zugaro et al., 2004; Kropp et al., 2005; Harris et al., 2002).

Die verwendeten inversen Agonisten zeigen bis zu höheren Konzentrationen (Rimonabant 10nM, AM 251 3nM) eine normale Dosis-Wirkung Korrelation. Bei noch höheren Dosen weisen diese jedoch eine agonistische Komponente auf, die nicht mit den bisher veröffentlichten Studien übereinstimmt. Eine Erklärung könnte die zuvor angesprochene geringe Selektivität dieser inversen Agonisten darstellen. Jedoch sind diese Kreuzreaktionen mit anderen Membranproteinen oder der Membran selbst erst bei höheren Konzentrationen von Rimonabant bzw. AM 251 zu erwarten. Die eingesetzten geringen Konzentrationen der inversen Agonisten, die diesen beobachteten Effekt auslösen, sprechen eher für eine spezifische Aktivierung von momentan noch unbekanntem Cannabinoid sensitiven Rezeptoren.

Die erweiterten Spikeanalysen, die schon bei dem CB_1 -Rezeptor Agonisten WIN

55,212-2 eine Modulation der Burstpausen und Intereventintervallen zeigten, weisen bei der Applikation von Rimonabant und AM 251 den gegensätzlichen Effekt auf. Somit kann der Status von Rimonabant und AM 251 als inverse Agonisten auch auf der Ebene komplexer Vorgänge, wie der Modulation von Aktionspotential Bursts, wahrscheinlich bestätigt und erweitert werden.

Hinsichtlich der gewonnenen Daten kann angenommen werden, dass die untersuchten inversen Agonisten nicht ausschließlich an den CB₁-Rezeptor binden, da die Komplexität der erhaltenen Spikemodulationen, besonders im Falle der untersuchten inversen Agonisten, wahrscheinlich nicht alleine auf die direkte Modulation der beteiligten cAMP Signaltransduktion des CB₁-Rezeptors zurückgeführt werden können. Für Rimonabant ist bekannt, dass es in höheren Konzentrationen an verschiedene andere membranständige Proteine bindet und physiologische Reaktionen hervorruft (Pertwee; 2006). Auch ist die direkte Beeinflussung der Lipidmembran durch hohe Konzentrationen dieser lipophilen Substanz möglich. Durch die Demonstration der Empfindlichkeit des verwendeten Assays können diese bei hohen Dosen dieser Substanz, erfolgenden unspezifischen Kreuzreaktionen wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da die gezeigten Effekte ausschließlich bei nanomolaren Konzentrationen gemessen wurden. Allerdings zeigen die erhobenen Daten bei der Blockierung der Adenylatcyclase eine signifikante Unterdrückung der Rimonabant Antwort auf der Ebene der Signaltransduktion. Dies widerspricht der oben beschriebenen Hypothese, dass, auch bei niederen Konzentrationen, diese Substanz an andere Rezeptoren bindet. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die zellweite Blockierung der Adenylatcyclase nicht auch weitere „Targets“ des inversen Agonisten Rimonabant inhibiert. Auch kann die Blockierung eines noch unbekanntes Cannabinoid Rezeptors nicht ausgeschlossen werden.

Zahlreiche Arbeiten deuten daraufhin, dass das Opioid- und Endocannabinoid-System sich in ihren Wirkungen wahrscheinlich gegenseitig beeinflussen können (Manzanares et al., 1999). Am weitesten untersucht ist die gegenseitige Beeinflussung von Opioiden und Cannabinoiden auf antinozizeptive Mechanismen. Einige Effekte von Cannabinoiden sowie von Opioiden sind an die Anwesenheit von Rezeptoren des anderen Systems gebunden. So konnte der antinozizeptive Effekt von THC durch eine Antisense-Oligodesoxynukleotid- Behandlung gegen den κ -Opioid-Rezeptor verhindert werden (Pugh et al., 1996). Ein anderes Beispiel für eine Interaktion

des Opioid-Systems mit dem Cannabinoid-System konnte mittels CB₁-Rezeptor-KO-Mäusen gezeigt werden, die nicht auf die Gabe von Morphin reagierten (Cossu et al., 2001). Einen Nachweis für eine Interaktion von Cannabinoid und Opioid-Rezeptor-Liganden an μ - und d-Opioid Rezeptoren erbrachten Vaysse et al. (1987). Sie konnten zeigen, dass Δ^9 -THC und CBD (Cannabidiol) in der Lage sind, μ - und d-Opioid-Rezeptor-Liganden vom jeweiligen Opioid-Rezeptor-Subtyp zu verdrängen. Die Aufklärung der gegenseitigen Beeinflussung von Opioiden und Cannabinoiden hat bereits zur Klärung mancher pharmakologischer Effekte von Opioiden und Cannabinoiden geführt, die nicht alleine über das Opioid- oder das Cannabinoid-System zu erklären ist. Diese bekannte Interaktion des μ -Opioid Rezeptors mit dem Cannabinoidsystem könnte eine Erklärung für die agonistische Wirkung bei der Konzentration von 10nM Rimonabant, bzw 3nM bei AM 251 darstellen. Durch die Antagonisierung dieses μ -Opioid Rezeptors konnte jedoch gezeigt werden, dass dies bei den verwendeten geringen Konzentrationen von Rimonabant im nanomolaren Bereich nicht der Fall ist.

Ein weiterer möglicher Kandidat für eine inhibierende Wirkung von Rimonabant ist der TRPV1 Kanal. Xing und Kollegen konnten 2007 eine Verminderung der neuronalen Aktivität durch den TRPV1 Antagonisten Iodo-Resiniferatoxin nachweisen. Die darüber hinaus postulierte neuroprotektive Wirkung von Rimonabant (Pegorini, 2006) weist auch auf die Fähigkeit von Rimonabant hin, die Aktivität von neuronalem Gewebe zu vermindern.

Abschließend konnte für diesen erstmals beschriebenen agonistischen Effekt von AM251 und Rimonabant kein physiologischer Mechanismus identifiziert werden. Allerdings zeigt auch die Entscheidung der FDA Rimonabant nicht als Medikament zur Behandlung von Fettsucht zuzulassen, dass das pharmakologische Profil von Rimonabant sehr breit ist und keine spezifische Beeinflussung des Endocannabinoidsystems zulässt. Eventuell bietet sich in Zukunft die Möglichkeit, durch eine gezielte gegenseitige Beeinflussung des Opioid- und Cannabinoidsystems oder des TRPV1 Kanals, Fortschritte in der Aufklärung der beteiligten Signaltransduktionen zu erzielen. Mit dem etablierten hoch empfindlichen Testsystem können diese weiterführenden Untersuchungen durchgeführt werden, da die Neuronen aus nativem Gewebe entstammen, und somit die Voraussetzungen für komplexe Interaktionen der verwendeten Substanzen mit den beteiligten Rezeptoren oder den Signalkaskaden untereinander gegeben sind.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von inversen Agonisten des CB₁-Rezeptors anhand einer primären hippocampalen Neuronen-/Gliazellen- Kokultur zu untersuchen. Immunocytochemisch konnte gezeigt werden, dass in den kultivierten Neuronen die CB₁-Rezeptoren in nachweisbaren Mengen exprimiert werden. Die aus Rattenembryonen erstellte Primärkultur wurde weiterhin auf elektrophysiologische Parameter untersucht um eine *in vivo* nahe *in vitro* Kultur zu gewährleisten. So reagieren die Neuronen auf TTX mit verminderter Spikeaktivität die auf die Blockierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle zurückzuführen ist. Auch die Inhibition von AMPA Rezeptoren unter Verwendung von CNQX zeigte eine Reduktion der Spikefrequenz auf synaptischer Ebene. Analysen der Kinetik und der Frequenz der generierten Aktionspotentiale, sowie der AMPA- und NMDA EPSCs sind mit bereits publizierten *in vitro* und *in vivo* Daten weitgehend vergleichbar. Um die intrinsische Variabilität des verwendeten Assays zu verringern, wurde der für die pharmakologischen Untersuchungen des Cannabinoidsystems eingesetzte Messpuffer mit einer geringen Konzentration Magnesium versehen, um den NMDA-Rezeptorblock aufzuheben. Die daraus resultierenden Aktionspotential-Bursts sorgten einerseits für eine geringere Variabilität der Messungen, andererseits konnte durch erweiterte Analysen dieser Bursts die Auswirkungen der eingesetzten CB₁-Agonisten und inversen CB₁-Agonisten auf das Burstverhalten der gemessenen Neuronen ermittelt werden. Hierbei zeigte sich ein gegensätzliches Verhalten von Aktionspotentialfrequenz zur Modulation der generierten Aktionspotentiale pro Burst, Pausen zwischen den Bursts und Länge der Bursts. Auf der Basis der durch die Aktionspotential-Frequenzanalysen gewonnenen Daten konnte erstmals eine agonistische Komponente bei nanomolaren Dosen der inversen Agonisten gezeigt werden, was auf eine spezifische Interaktion mit einem beteiligten oder noch nicht bekannten Rezeptor hindeutet. Die Blockierung der Adenylatzyklase, eines Schlüsselenzyms in der Signaltransduktion des CB₁-Rezeptors, hebt diesen Effekt auf, allerdings ist auch kein invers agonistischer Effekt mehr messbar. Des weiteren wurde auf eine Beteiligung des Opioidsystems an der agonistischen Wirkung des

inversen Agonisten Rimonabant untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte keine der publizierten Wechselwirkungen dieser beiden Systeme im Bezug auf den agonistischen Effekt von Rimonabant beobachtet werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Baskfield, C. Y.; Martin, B. R. & Wiley, J. L. (2004), 'Differential effects of delta9-tetrahydrocannabinol and methanandamide in CB1 knockout and wild-type mice.', *J Pharmacol Exp Ther* **309**(1), 86--91.

Baskys, A. & Malenka, R. C. (1991), 'Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus.', *J Physiol* **444**, 687--701.

Bensaid, M.; Gary-Bobo, M.; Esclangon, A.; Maffrand, J. P.; Fur, G. L.; Oury-Donat, F. & Soubrié, P. (2003), 'The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells.', *Mol Pharmacol* **63**(4), 908--914.

Blake, J. F.; Brown, M. W. & Collingridge, G. L. (1988), 'CNQX blocks acidic amino acid induced depolarizations and synaptic components mediated by non-NMDA receptors in rat hippocampal slices.', *Neurosci Lett* **89**(2), 182--186.

Bohme, G. A.; Laville, M.; Ledent, C.; Parmentier, M. & Imperato, A. (2000), 'Enhanced long-term potentiation in mice lacking cannabinoid CB1 receptors.', *Neuroscience* **95**(1), 5--7.

Bouaboula, M.; Perrachon, S.; Milligan, L.; Canat, X.; Rinaldi-Carmona, M.; Portier, M.; Barth, F.; Calandra, B.; Pecceu, F.; Lupker, J.; Maffrand, J. P.; Fur, G. L. & Casellas, P. (1997), 'A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions.', *J Biol Chem* **272**(35), 22330--22339.

Bouaboula, M.; Poinot-Chazel, C.; Bourrié, B.; Canat, X.; Calandra, B.; Rinaldi-Carmona, M.; Fur, G. L. & Casellas, P. (1995), 'Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1.', *Biochem J* **312 (Pt 2)**, 637--641.

Brauchi, S.; Orio, P. & Latorre, R. (2004), 'Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(43), 15494--15499.

Breivogel, C. S.; Selley, D. E. & Childers, S. R. (1998), 'Cannabinoid receptor agonist efficacy for stimulating [35S]GTPgammaS binding to rat cerebellar membranes correlates with agonist-induced decreases in GDP affinity.', *J Biol Chem* **273**(27), 16865--16873.

Chaperon, F. & Thiébot, M. H. (1999), 'Behavioral effects of cannabinoid agents in animals.', *Crit Rev Neurobiol* **13**(3), 243--281.

Childers, S. R. & Deadwyler, S. A. (1996), 'Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors.', *Biochem Pharmacol* **52**(6), 819--827.

Colombo, G.; Agabio, R.; Diaz, G.; Lobina, C.; Reali, R. & Gessa, G. L. (1998), 'Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716.', *Life Sci* **63**(8), PL113--PL117.

Colombo, G.; Agabio, R.; Lobina, C.; Reali, R. & Gessa, G. L. (1998), 'Cannabinoid modulation of intestinal propulsion in mice.', *Eur J Pharmacol* **344**(1), 67--69.

Cossu, G.; Ledent, C.; Fattore, L.; Imperato, A.; Böhme, G. A.; Parmentier, M. & Fratta, W. (2001), 'Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse.', *Behav Brain Res* **118**(1), 61--65.

Costa, B. & Colleoni, M. (1999), 'SR141716A induces in rats a behavioral pattern opposite to that of CB1 receptor agonists.', *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **20**(12), 1103--1108.

Cota, D.; Marsicano, G.; Lutz, B.; Vicennati, V.; Stalla, G. K.; Pasquali, R. & Pagotto, U. (2003), 'Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake.', *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**(3), 289--301.

Cota, D.; Marsicano, G.; Tschöp, M.; Grübler, Y.; Flachskamm, C.; Schubert, M.; Auer, D.; Yassouridis, A.; Thöne-Reineke, C.; Ortman, S.; Tomassoni, F.; Cervino, C.; Nisoli, E.; Linthorst, A. C. E.; Pasquali, R.; Lutz, B.; Stalla, G. K. & Pagotto, U. (2003), 'The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis.', *J Clin Invest* **112**(3), 423--431.

Coval ML.

Analysis of Hill interaction coefficients and the invalidity of the Kwon and Brown equation. *J Biol Chem.* 1970 Dec 10;**245**(23):6335-6.

Cravatt, B. F.; Giang, D. K.; Mayfield, S. P.; Boger, D. L.; Lerner, R. A. & Gilula, N. B. (1996), 'Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides.', *Nature* **384**(6604), 83--87.

Devane, W. A.; Dysarz, F. A.; Johnson, M. R.; Melvin, L. S. & Howlett, A. C. (1988), 'Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain.', *Mol Pharmacol* **34**(5), 605--613.

Devane, W. A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; 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.

Devane, W. A.; Spain, J. W.; Coscia, C. J. & Howlett, A. C. (1986), 'An assessment of the role of opioid receptors in the response to cannabimimetic drugs.', *J Neurochem* **46**(6), 1929--1935.

Dinh, T. P.; Freund, T. F. & Piomelli, D. (2002), 'A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation.', *Chem Phys Lipids* **121**(1-2), 149--158.

Donnelly, D.; Johnson, M. S.; Blundell, T. L. & Saunders, J. (1989), 'An analysis of the periodicity of conserved residues in sequence alignments of G-protein coupled receptors. Implications for the three-dimensional structure.', *FEBS Lett* **251**(1-2), 109--116.

Elphick, M. R. & Egertová, M. (2001), 'The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling.', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1407), 381--408.

Fournier, E. & Crepel, F. (1984), 'Electrophysiological properties of in vitro hippocampal pyramidal cells from normal and staggerer mutant mice.', *Brain Res* **311**(1), 87--96.

Freund, T. F.; Katona, I. & Piomelli, D. (2003), 'Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling.', *Physiol Rev* **83**(3), 1017--1066.

Fride, E. & Mechoulam, R. (1993), 'Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent.', *Eur J Pharmacol* **231**(2), 313--314.

Gabriel, A.; Klussmann, F. W. & Igelmund, P. (1998), 'Rapid temperature changes induce adenosine-mediated depression of synaptic transmission in hippocampal slices from rats (non-hibernators) but not in slices from golden hamsters (hibernators).', *Neuroscience* **86**(1), 67--77.

Galiègue, S.; Mary, S.; Marchand, J.; Dussossoy, D.; Carrière, D.; Carayon, P.; Bouaboula, M.; Shire, D.; Fur, G. L. & Casellas, P. (1995), 'Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations.', *Eur J Biochem* **232**(1), 54--61.

Gan, J.; Alonso-Gómez, A. L.; Avendano, G.; Johnson, B. & Iuvone, P. M. (1995), 'Melatonin biosynthesis in photoreceptor-enriched chick retinal cell cultures: role of cyclic AMP in the K(+)-evoked, Ca(2+)-dependent induction of serotonin N-acetyltransferase activity.', *Neurochem Int* **27**(2), 147--155.

Gertsch, J.; Schoop, R.; Kuenzle, U. & Suter, A. (2004), 'Echinacea alkylamides modulate TNF-alpha gene expression via cannabinoid receptor CB2 and multiple signal transduction pathways.', *FEBS Lett* **577**(3), 563--569.

- Ghamari-Langroudi, M. & Glavinović, M. I. (1998), 'Changes of spontaneous miniature excitatory postsynaptic currents in rat hippocampal pyramidal cells induced by aniracetam.', *Pflugers Arch* **435**(2), 185--192.
- Goetze, B.; Grunewald, B.; Kiebler, M. A. & Macchi, P. (2003), 'Coupling the iron-responsive element to GFP--an inducible system to study translation in a single living cell.', *Sci STKE* **2003**(204), PL12.
- Gérard, C.; Mollereau, C.; Vassart, G. & Parmentier, M. (1990), 'Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA.', *Nucleic Acids Res* **18**(23), 7142.
- Gérard, C. M.; 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.
- Hanus, L.; Abu-Lafi, S.; Fride, E.; Breuer, A.; Vogel, Z.; Shalev, D. E.; 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.
- Harris, K. D.; Henze, D. A.; Hirase, H.; Leinekugel, X.; Dragoi, G.; Czurkó, A. & Buzsáki, G. (2002), 'Spike train dynamics predicts theta-related phase precession in hippocampal pyramidal cells.', *Nature* **417**(6890), 738--741.
- Herkenham, M.; Groen, B. G.; Lynn, A. B.; Costa, B. R. D. & Richfield, E. K. (1991), 'Neuronal localization of cannabinoid receptors and second messengers in mutant mouse cerebellum.', *Brain Res* **552**(2), 301--310.
- Horowitz, J. M.; Thomas, M. P. & Eckerman, P. (1987), 'Thermal dependence of neural activity in the hamster hippocampal slice preparation.', *J Therm Biol* **12**(2), 97--101.
- Howlett, A. C. & Fleming, R. M. (1984), 'Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes.', *Mol Pharmacol* **26**(3), 532--538.

Howlett, A. C.; Qualy, J. M. & Khachatrian, L. L. (1986), 'Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs.', *Mol Pharmacol* **29**(3), 307--313.

Huang, S. M.; Bisogno, T.; Trevisani, M.; Al-Hayani, A.; Petrocellis, L. D.; Fezza, F.; Tognetto, M.; Petros, T. J.; Krey, J. F.; Chu, C. J.; Miller, J. D.; Davies, S. N.; Geppetti, P.; Walker, J. M. & Marzo, V. D. (2002), 'An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12), 8400--8405.

Irving, A. J.; Coutts, A. A.; Harvey, J.; Rae, M. G.; Mackie, K.; Bewick, G. S. & Pertwee, R. G. (2000), 'Functional expression of cell surface cannabinoid CB(1) receptors on presynaptic inhibitory terminals in cultured rat hippocampal neurons.', *Neuroscience* **98**(2), 253--262.

Kathmann, M.; Weber, B.; Zimmer, A. & Schlicker, E. (2001), 'Enhanced acetylcholine release in the hippocampus of cannabinoid CB(1) receptor-deficient mice.', *Br J Pharmacol* **132**(6), 1169--1173.

Katona, I.; Sperl agh, B.; S ik, A.; K afalvi, A.; Vizi, E. S.; Mackie, K. & Freund, T. F. (1999), 'Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons.', *J Neurosci* **19**(11), 4544--4558.

Kropp, M.; Gabbiani, F. & Prank, K. (2005), 'Differential coding of humoral stimuli by timing and amplitude of intracellular calcium spike trains.', *Syst Biol (Stevenage)* **152**(4), 263--268.

Mackie, K. & Hille, B. (1992), 'Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(9), 3825--3829.

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.

Manzanares, J.; Corchero, J.; Romero, J.; Fernández-Ruiz, J. J.; Ramos, J. A. & Fuentes, J. A. (1999), 'Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids.', *Trends Pharmacol Sci* **20**(7), 287--294.

Marsicano, G.; Goodenough, S.; Monory, K.; Hermann, H.; Eder, M.; Cannich, A.; Azad, S. C.; Cascio, M. G.; Gutiérrez, S. O.; van der Stelt, M.; López-Rodríguez, M. L.; Casanova, E.; Schütz, G.; Zieglgänsberger, W.; Marzo, V. D.; 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, C. T.; Azad, S. C.; Bisogno, T.; Rammes, G.; Cascio, M. G.; Hermann, H.; Tang, J.; Hofmann, C.; Zieglgänsberger, W.; Marzo, V. D. & Lutz, B. (2002), 'The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories.', *Nature* **418**(6897), 530--534.

Martin, D.; Bowe, M. A. & Nadler, J. V. (1989), 'A grease-gap method for studying the excitatory amino acid pharmacology of CA1 hippocampal pyramidal cells.', *J Neurosci Methods* **29**(2), 107--114.

Marzo, V. D.; Breivogel, C. S.; Tao, Q.; Bridgen, D. T.; Razdan, R. K.; Zimmer, A. M.; Zimmer, A. & Martin, B. R. (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.

Marzo, V. D.; Fontana, A.; Cadas, H.; Schinelli, S.; Cimino, G.; Schwartz, J. C. & Piomelli, D. (1994), 'Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.', *Nature* **372**(6507), 686--691.

Marzo, V. D.; Goparaju, S. K.; Wang, L.; Liu, J.; Bátkai, S.; Járai, Z.; Fezza, F.; Miura, G. I.; Palmiter, R. D.; Sugiura, T. & Kunos, G. (2001), 'Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake.', *Nature* **410**(6830), 822--825.

Matsuda, L. A.; Lolait, S. J.; Brownstein, M. J.; Young, A. C. & Bonner, T. I. (1990), 'Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA.', *Nature* **346**(6284), 561--564.

Munro, S.; Thomas, K. L. & Abu-Shaar, M. (1993), 'Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.', *Nature* **365**(6441), 61--65.

Nakazi, M.; Bauer, U.; Nickel, T.; Kathmann, M. & Schlicker, E. (2000), 'Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors.', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **361**(1), 19--24.

Pegorini, S.; Zani, A.; Braidà, D.; Guerini-Rocco, C. & Sala, M. (2006), 'Vanilloid VR1 receptor is involved in rimonabant-induced neuroprotection.', *Br J Pharmacol* **147**(5), 552--559.

Pertwee RG

The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview.

Int J Obes (Lond). 2006 Apr;30 Suppl 1:S13-8.

Pertwee, R. G. (1997), 'Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors.', *Pharmacol Ther* **74**(2), 129--180.

Pertwee, R. G.; Fernando, S. R.; Nash, J. E. & Coutts, A. A. (1996), 'Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in guinea-pig small intestine.', *Br J Pharmacol* **118**(8), 2199--2205.

Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Elrick, D. B.; Mechoulam, R. & Corbett, A. D. (1992), 'Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse vas deferens and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine.', *Br J Pharmacol* **105**(4), 980--984.

Petrocellis, L. D.; Cascio, M. G. & Marzo, V. D. (2004), 'The endocannabinoid system: a general view and latest additions.', *Br J Pharmacol* **141**(5), 765--774.

Porter, A. C.; Sauer, J.; Knierman, M. D.; Becker, G. W.; Berna, M. J.; Bao, J.; Nomikos, G. G.; Carter, P.; Bymaster, F. P.; Leese, A. B. & Felder, C. C. (2002), 'Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor.', *J Pharmacol Exp Ther* **301**(3), 1020--1024.

Pugh, G.; Smith, P. B.; Dombrowski, D. S. & Welch, S. P. (1996), 'The role of endogenous opioids in enhancing the antinociception produced by the combination of delta 9-tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord.', *J Pharmacol Exp Ther* **279**(2), 608--616.

Racz, I.; Bilkei-Gorzo, A.; Toth, Z. E.; Michel, K.; Palkovits, M. & Zimmer, A. (2003), 'A critical role for the cannabinoid CB1 receptors in alcohol dependence and stress-stimulated ethanol drinking.', *J Neurosci* **23**(6), 2453--2458.

Raduner, S.; Majewska, A.; Chen, J.; Xie, X.; Hamon, J.; Faller, B.; Altmann, K. & Gertsch, J. (2006), 'Alkylamides from Echinacea are a new class of cannabinomimetics. Cannabinoid type 2 receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects.', *J Biol Chem* **281**(20), 14192--14206.

Rinaldi, L. (1994), 'Marijuana: a research overview.', *Alaska Med* **36**(2), 107--113.

Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Héaulme, M.; Shire, D.; Calandra, B.; Congy, C.; Martinez, S.; Maruani, J.; Néliat, G. & Caput, D. (1994), 'SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor.', *FEBS Lett* **350**(2-3), 240--244.

Robson, P. (2001), 'Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids.', *Br J Psychiatry* **178**, 107--115.

Schlicker, E.; Redmer, A.; Werner, A. & Kathmann, M. (2003), 'Lack of CB1 receptors increases noradrenaline release in vas deferens without affecting atrial noradrenaline release or cortical acetylcholine release.', *Br J Pharmacol* **140**(2), 323--328.

Schlicker, E.; Timm, J. & Göthert, M. (1996), 'Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina.', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **354**(6), 791--795.

Schlicker, E.; Timm, J.; Zentner, J. & Göthert, M. (1997), 'Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus.', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356**(5), 583--589.

Shen, M.; Piser, T. M.; Seybold, V. S. & Thayer, S. A. (1996), 'Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures.', *J Neurosci* **16**(14), 4322--4334.

Sim-Selley, L. J.; Brunk, L. K. & Selley, D. E. (2001), 'Inhibitory effects of SR141716A on G-protein activation in rat brain.', *Eur J Pharmacol* **414**(2-3), 135--143.

van der Stelt, M. & Marzo, V. D. (2003), 'The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders.', *Eur J Pharmacol* **480**(1-3), 133--150.

Szabo, B.; Dörner, L.; Pfreundtner, C.; Nörenberg, W. & Starke, K. (1998), 'Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum.', *Neuroscience* **85**(2), 395--403.

Tachibana, T.; Endoh, M. & Nawa, T. (2001), 'Immunohistochemical expression of G protein alpha-subunit isoforms in rat and monkey Merkel cell-neurite complexes.', *Histochem Cell Biol* **116**(3), 205--213.

Tsou, K.; Brown, S.; Sañudo-Peña, M. C.; Mackie, K. & Walker, J. M. (1998), 'Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system.', *Neuroscience* **83**(2), 393--411.

Twitchell, W.; Brown, S. & Mackie, K. (1997), 'Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons.', *J Neurophysiol* **78**(1), 43--50.

Vaughan, C. W. & Christie, M. J. (2005), 'Retrograde signalling by endocannabinoids.', *Handb Exp Pharmacol*(168), 367--383.

Vaysse, P. J.; Gardner, E. L. & Zukin, R. S. (1987), 'Modulation of rat brain opioid receptors by cannabinoids.', *J Pharmacol Exp Ther* **241**(2), 534--539.

Voets, T.; Droogmans, G.; Wissenbach, U.; Janssens, A.; Flockerzi, V. & Nilius, B. (2004), 'The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels.', *Nature* **430**(7001), 748--754.

Wang, L.; Liu, J.; Harvey-White, J.; Zimmer, A. & Kunos, G. (2003), 'Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age-dependent decline in mice.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3), 1393--1398.

Weimer, M. S. & Hanke, W. (2005), 'Correlation between the durations of refractory period and intrinsic optical signal of retinal spreading depression during temperature variations.', *Exp Brain Res* **161**(2), 201--208.

Wilson, R. I. & Nicoll, R. A. (2001), 'Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses.', *Nature* **410**(6828), 588--592.

Woelkart, K.; Xu, W.; Pei, Y.; Makriyannis, A.; Picone, R. P. & Bauer, R. (2005), 'The endocannabinoid system as a target for alkaloids from *Echinacea angustifolia* roots.', *Planta Med* **71**(8), 701--705.

Xing, J. & Li, J. (2007), 'TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons.', *J Neurophysiol* **97**(1), 503--511.

Zimmer, A.; Zimmer, A. M.; Hohmann, A. G.; Herkenham, M. & Bonner, T. I. (1999), 'Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10), 5780--5785.

Zugaro, M. B.; Monconduit, L. & Buzsáki, G. (2005), 'Spike phase precession persists after transient intrahippocampal perturbation.', *Nat Neurosci* **8**(1), 67--71.

Zygmunt, P. M.; Petersson, J.; Andersson, D. A.; Chuang, H.; Sjørgård, M.; Marzo, V. D.; Julius, D. & Högestätt, E. D. (1999), 'Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide.', *Nature* **400**(6743), 452--457.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AS	Aminosäure
BIC	Bicuculline
Bidest	Zweifach destilliertes Wasser
CBD	Cannabidiol
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPSC	excitatory postsynaptic current
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
IPSC	inhibitory postsynaptic current
min	Minute
M	Molar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
µg	Mikrogramm
RT	Raumtemperatur
Sec	Sekunden
Tab.	Tabelle

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 79

T.E.	Tris-EDTA
THX	Tetrahydrocannabinol
TTX	Tetrodotoxin
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

ANHANG

Anhang A Summary

The aim of this thesis was to investigate the effect of inverse agonists on the CB₁-receptor with an established complex neuronal-/ glia- co culture obtained from hippocampi of embryonic rats. To provide evidence of the expression of the CB₁-receptors in the established culture immunocytochemical studies have been used and showed a sufficient expression level of the CB₁-receptors. The neuronal culture was further tested on various electrophysiological parameters to verify an *in vitro* assay that resembles *in vivo* characteristics. Thus the exposure of TTX to neurons lead to reduced spike activity which refers to the blocking of voltage gated sodium channels. Also the inhibition of AMPA receptors using CNQX showed a reduction of spike activity in respect of the reduced synaptic activity. Analyses of the kinetic and spike frequencies of the generated actionpotentials as well as the kinetics and frequencies of spontaneous AMPA- and NMDA epscs are to a large extent comparable to published data of *in vitro* and *in vivo* assays. To reduce the intrinsic variability of the established cannabinoid assay the method of induced burst activity under low magnesium conditions has been used. This method results indeed in a lower variability of the assay but also the analysis of the effect of cannabinoid agonists and inverse agonists on the evoked burst activity showed interesting inverse modulations of burst durations, event intervals and inter-event intervals compared to alterations of the spike frequencies. On the basis of the obtained data by the analyzed spike-frequencies an agonistic effect of nanomolar concentrations of the investigated inverse agonists could be shown for the first time. This observation could lead to the conclusion that this might be a specific interaction of the investigated inverse agonist with an other receptor. The inhibition of the adenylatcyclase, a key-enzyme of the CB₁ signal transduction, neutralizes the agonistic effect, although the inverse agonistic effect dissapeard. In addition the interaction of the opioid system in respect to the observed agonistic effect of rimonabant has been investigated. However, non of the published interaction of this two systems in respect to the agonistic effect of rimonabant could be observed.

Anhang B

Schematische Darstellung eines TRP Kanals

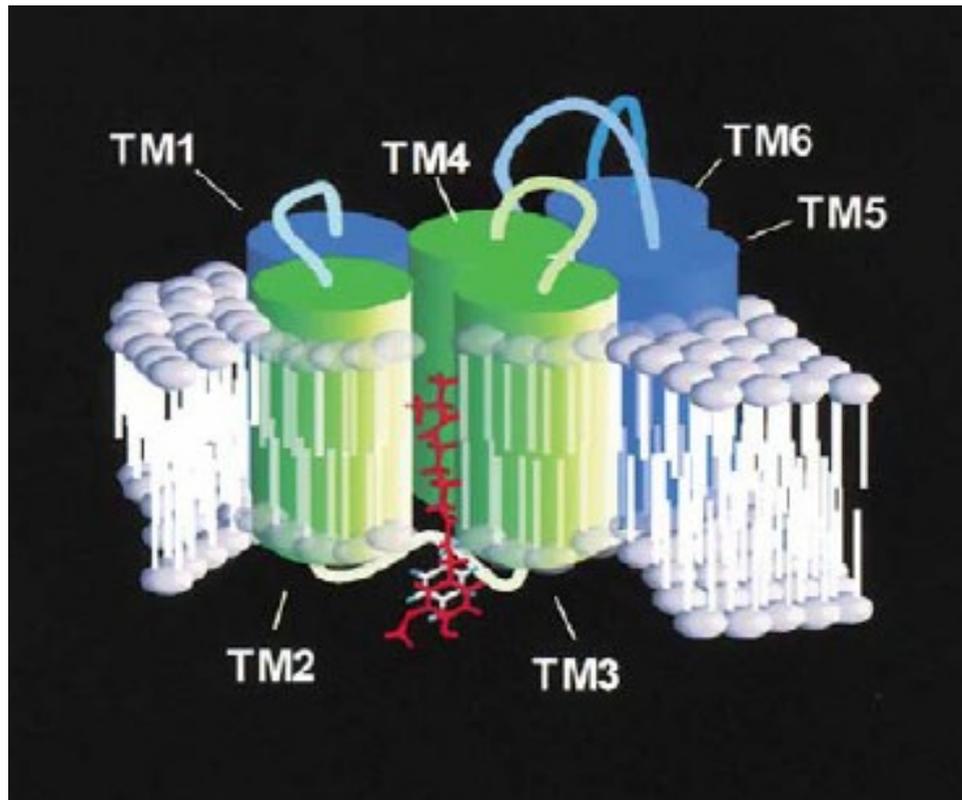


Abbildung 38: Schematische Darstellung eines TRP Kanals

Anhang C

Schematische Darstellung der Herstellung der Kokultur

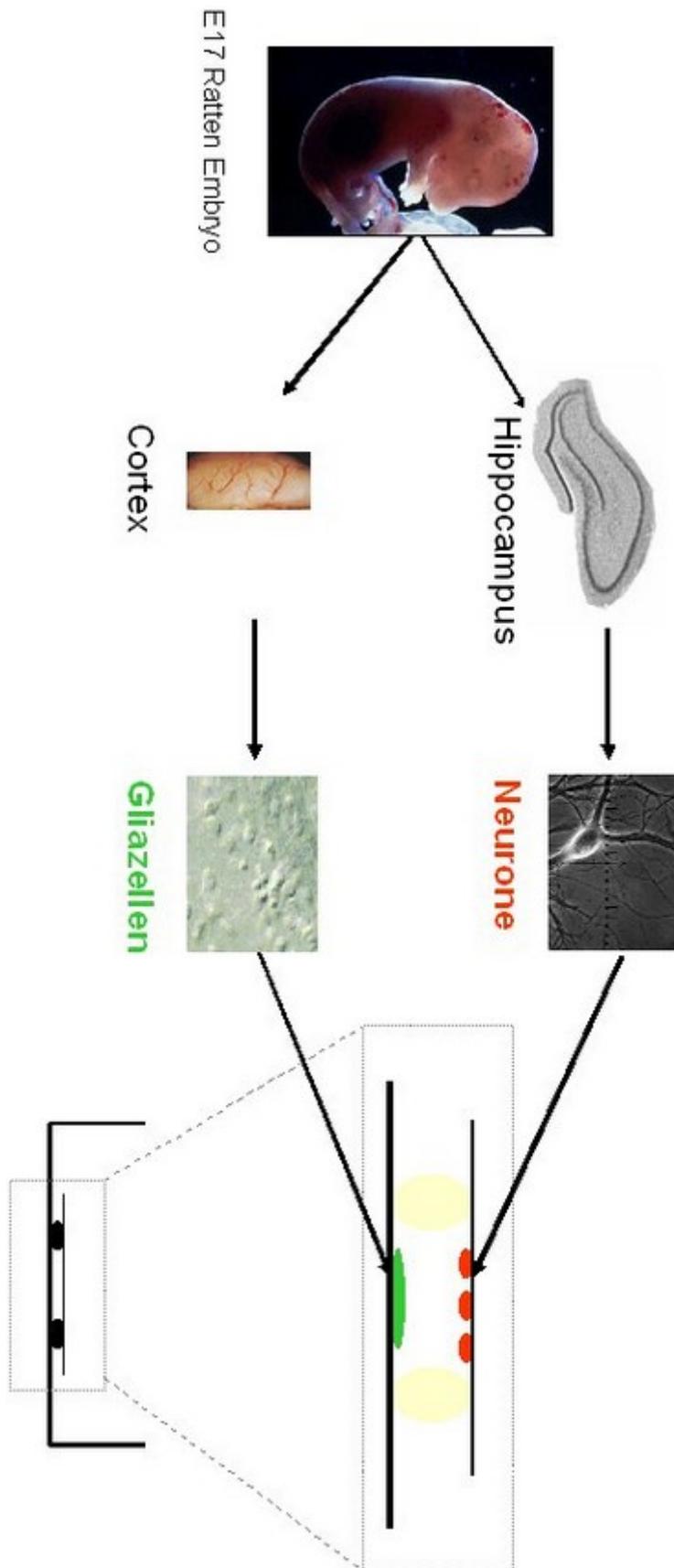


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Herstellung der Neuronen-/Gliazellen Kokultur

Anhang D

Lichtmikroskopische Bilder der Neuronenkultur

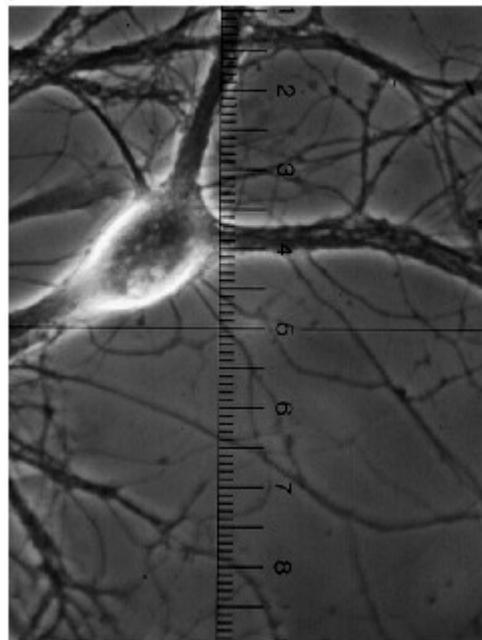
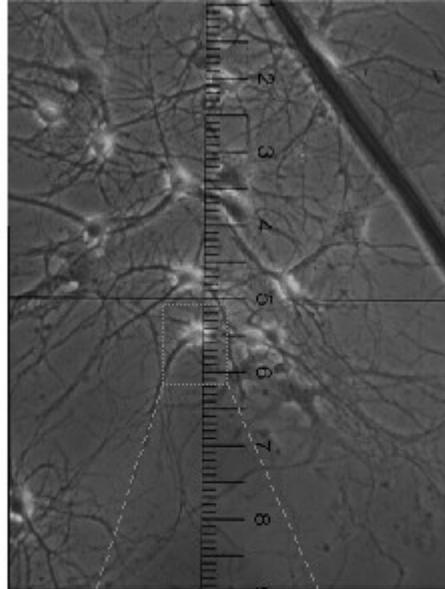
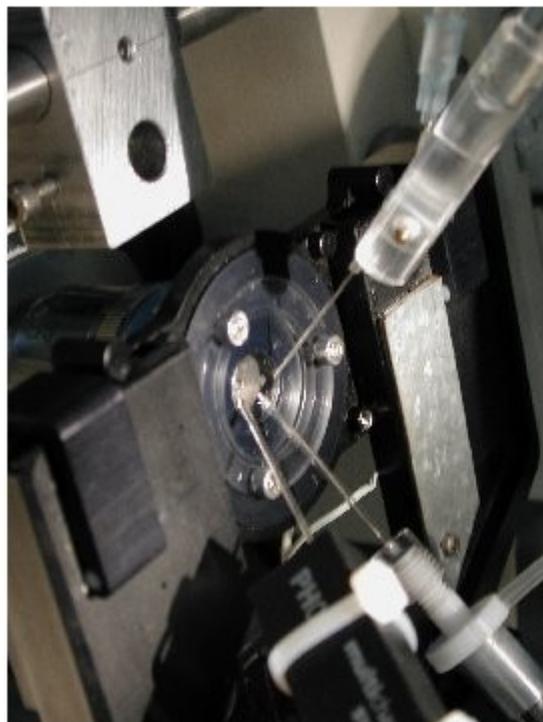
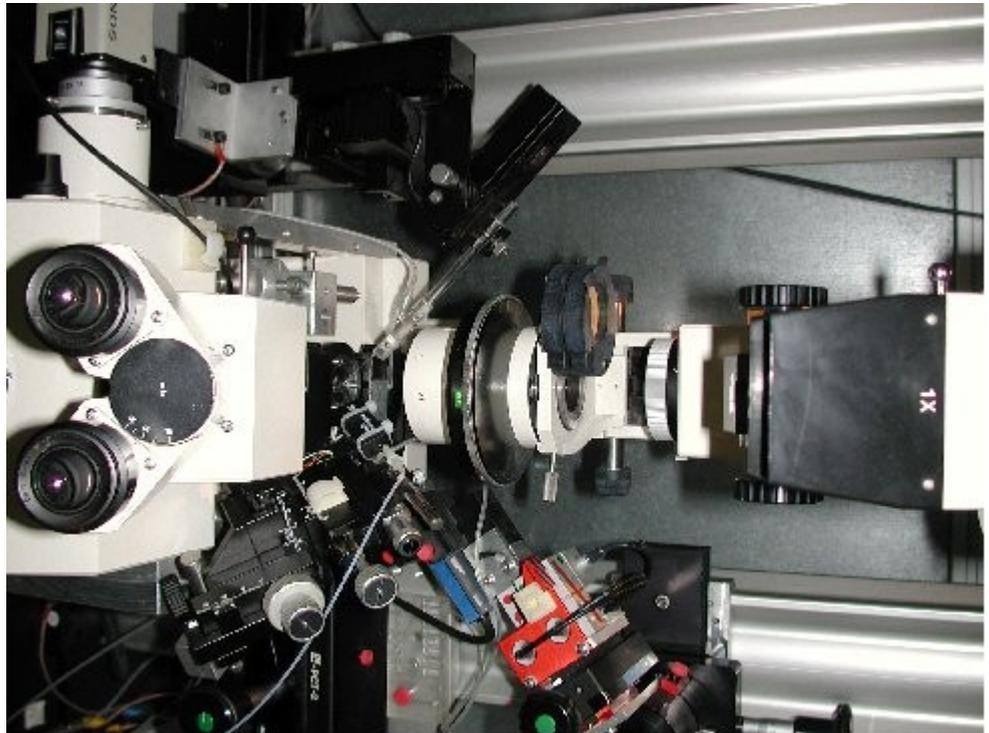


Abbildung 41: Auf einem Deckglas kultivierte Pyramidalzellen, bei einer 20 fachen (links) bzw. 40 fachen (rechts) Vergrößerung

Anhang E

Aufbau des Messstandes und der Perfussionskammer

Abbildung 42: Darstellung des verwendeten Setups (a); der Messkammer (b) bzw (d)



Anhang F

Allosterisches Selektionsmodell

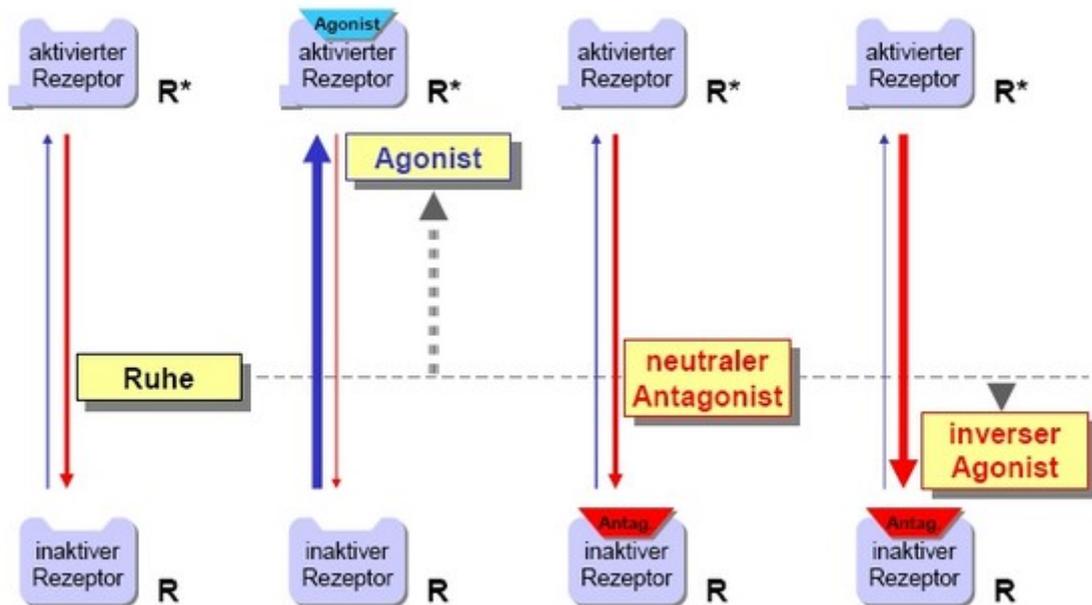


Abbildung 42: Schematische Darstellung des allosterischen Selektions Modells (Griessbacher, 2000)

Anhang G

Strukturformeln der verwendeten Cannabinoide

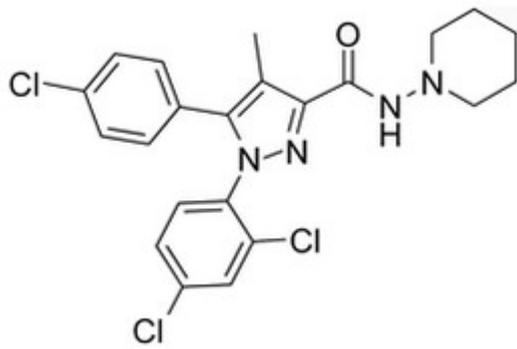


Abbildung 43: Rimonabant

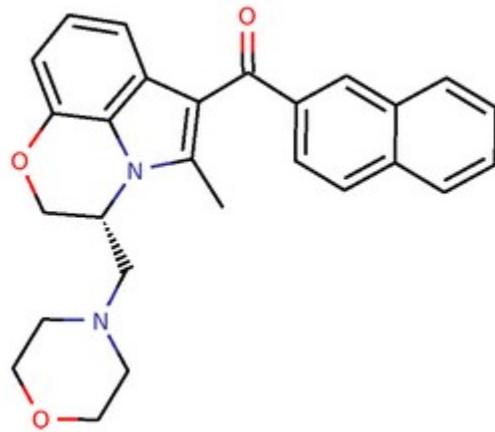


Abbildung 44: WIN 55,212-2

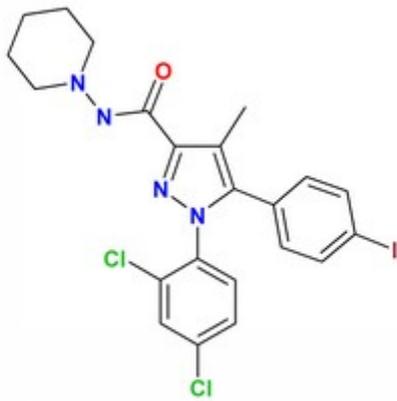


Abbildung 45: AM 251

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Diplom-Biologe Oliver Klink, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt habe, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Stuttgart, 06.07.07