

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
(Prof. Dr. med. J. Wiltfang)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **WIN-55,212-2-Therapie in einem Modell für die sporadische Alzheimer Erkrankung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Frederik Wilhelm Ott**

aus

New York

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer/in: PD Dr. rer. nat. Y. Bouter

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. H. Jarry

### **Prüfungskommission**

Referent/in: PD Dr. rer. nat. Y. Bouter

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. D. Liebetanz

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 22.11.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "WIN-55,212-2-Therapie in einem Modell für die sporadische Alzheimer Erkrankung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 22.11.2022

Frederik Ott

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

**Artikel:**

Schleicher EM\*, **Ott FW\***, Müller M, Silcher B, Sichler ME, Löw MJ, Wagner JM, Bouter Y (2019): Prolonged Cannabidiol Treatment Lacks on Detrimental Effects on Memory, Motor Performance and Anxiety in C57BL/6J Mice. *Front Behav Neurosci* 13, 94.

\* geteilte Erstautorenschaft

**Posterpräsentationen:**

**Ott FW**, Sichler ME, Löw MJ, Wiltfang J, Bayer TA, Bouter Y (2018): Cannabinoid-Based WIN-55,212-2 Therapy in a Mouse Model of Sporadic Alzheimer's Disease.

Posterpräsentation auf dem Kongress „FENS“ 07.-11.07.2018

**Ott FW**, Sichler ME, Löw MJ, Wiltfang J, Bayer TA, Bouter Y (2018): Cannabinoid-Based WIN-55,212-2 Therapy in a Mouse Model of Sporadic Alzheimer's Disease.

Posterpräsentation auf dem Kongress „The International Annual Congress on Controversies on Cannabis-Based Medicine“ 25.-26.06.2018

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</u></b>	<b><u>IV</u></b>
<b><u>TABELLENVERZEICHNIS.....</u></b>	<b><u>V</u></b>
<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>VI</u></b>
<b><u>1 EINLEITUNG.....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b>1.1 DER MORBUS ALZHEIMER .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 EPIDEMIOLOGIE .....	1
1.1.2 RISIKOFAKTOREN .....	2
1.1.3 SYMPTOMATIK UND KLINISCHER VERLAUF .....	3
1.1.4 DIAGNOSTIK.....	4
1.1.5 THERAPIE .....	5
<b>1.2 NEUROPATHOLOGIE .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 AMYLOID-PLAQUES.....	6
1.2.2 VARIANTEN DES BETA-AMYLOIDS.....	9
1.2.3 NEUROFIBRILLENBÜNDEL.....	10
1.2.4 ENTZÜNDUNG.....	11
1.2.5 NEURONENVERLUST UND HIRNATROPHIE.....	12
<b>1.3 DAS ENDOCANNABINOID-SYSTEM.....</b>	<b>13</b>
1.3.1 AUFBAU UND FUNKTION .....	13
1.3.2 DAS ENDOCANNABINOID-SYSTEM IN ALZHEIMER-GEHIRNEN.....	15
1.3.3 WIN UND SEINE WIRKUNG .....	16
<b>1.4 MAUSMODELLE DER ALZHEIMER ERKRANKUNG.....</b>	<b>17</b>
<b>1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>20</b>
<b><u>2 MATERIAL UND METHODEN.....</u></b>	<b><u>21</u></b>
<b>2.1 TIERHALTUNG.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 MEDIKAMENTÖSE BEHANDLUNG UND VERSUCHSGRUPPEN.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 VERHALTENSEXPERIMENTE .....</b>	<b>23</b>
2.3.1 ROTAROD .....	23
2.3.2 DARK LIGHT BOX.....	24
2.3.3 ELEVATED PLUS MAZE.....	25
2.3.4 OPEN FIELD.....	26
2.3.5 MORRIS WATER MAZE.....	27
<b>2.4 GEWEBEGEWINNUNG UND FIXIERUNG .....</b>	<b>30</b>
2.4.1 ANFERTIGEN DER HIRNSCHNITTE.....	31
<b>2.5 IMMUNHISTOCHEMIE UND HISTOLOGIE .....</b>	<b>32</b>

2.5.1	FÄRBUNG MIT KRESYLVIOLETT .....	32
2.5.2	STEREOLOGIE.....	33
2.5.3	3,3' DIAMINO BENZIDINE (DAB)- FÄRBUNG .....	35
2.5.4	QUANTIFIZIERUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN.....	38
<b>2.6</b>	<b>STATISTIK.....</b>	<b>39</b>
<b>2.7</b>	<b>SOFTWARE.....</b>	<b>39</b>
<b>2.8</b>	<b>BEITRÄGE .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE .....</u></b>	<b><u>40</u></b>
<b>3.1</b>	<b>ERGEBNISSE DER VERHALTENSTESTS.....</b>	<b>40</b>
3.1.1	EINFLUSS DER WIN-THERAPIE AUF DAS KÖRPERGEWICHT .....	40
3.1.2	ERGEBNISSE DES ROTAROD-TESTS.....	41
3.1.3	ERGEBNISSE DES DARK-LIGHT BOX TESTS .....	43
3.1.4	ERGEBNISSE DES ELEVATED PLUS MAZE .....	46
3.1.5	ERGEBNISSE DES OPEN FIELD.....	47
3.1.6	ERGEBNISSE DES MORRIS WATER MAZE.....	49
<b>3.2</b>	<b>ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMIE .....</b>	<b>54</b>
3.2.1	ERGEBNISSE DER STEREOLOGIE UND NEUROGENESE.....	54
3.2.2	ERGEBNISSE DER NEUROGENESE-FÄRBUNG .....	54
3.2.3	ERGEBNISSE DER IBA-1-, GFAP-, CB1-REZEPTOR-FÄRBUNGEN.....	55
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION.....</u></b>	<b><u>57</u></b>
<b>4.1</b>	<b>DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE .....</b>	<b>57</b>
4.1.1	PRÄVENTIVE ODER THERAPEUTISCHE BEHANDLUNG – WELCHER ANSATZ IST DER EFFEKTIVERE?.....	57
4.1.2	EINE THERAPIE MIT WIN HAT KEINEN NEGATIVEN EFFEKT AUF DAS KÖRPERGEWICHT VON TG4-42 <sub>HOM</sub> -MÄUSEN.....	58
4.1.3	WIN-THERAPIE BEEINFLUSST DIE MOTORIK VON TG4-42 <sub>HOM</sub> -MÄUSEN .....	59
4.1.4	EINE THERAPIE MIT WIN HAT KEINEN NEGATIVEN EFFEKT AUF DAS ANGSTVERHALTEN VON TG4-42 <sub>HOM</sub> -MÄUSEN .....	62
4.1.5	WIN-THERAPIE VERBESSERT DAS RÄUMLICHE BEZUGSGEDÄCHTNIS VON TG4-42 <sub>HOM</sub> - MÄUSEN .....	64
4.1.6	WIN-THERAPIE HAT KEINEN EINFLUSS AUF DEN NERVENZELLVERLUST UND DIE NEUROGENESE IN TG4-42 <sub>HOM</sub> -MÄUSEN .....	68
4.1.7	WIN-THERAPIE HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE CB1-REZEPTOR EXPRESSION IN TG4- 42 <sub>HOM</sub> -MÄUSEN .....	70
4.1.8	WIN-THERAPIE REDUZIERT DIE MIKROGLIALE, ABER NICHT DIE ASTROGLIALE AKTIVITÄT IN TG4-42 <sub>HOM</sub> -MÄUSEN .....	71
<b>4.2</b>	<b>WIN - EINE THERAPIEOPTION FÜR DEN MORBUS ALZHEIMER? .....</b>	<b>74</b>
<b>4.3</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>75</b>

---

5	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	78
6	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	80

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DIE PROZESSIERUNG DES APP-PROTEINS.....	9
ABBILDUNG 2: CB1-REZEPTOR MODULIERTE HAUPTSIGNALWEGE.....	15
ABBILDUNG 3: STRUKTURFORMELN VON WIN UND THC.....	17
ABBILDUNG 4: KRANKHEITSVERLAUF DES TG4-42 <sub>HOM</sub> -MAUSMODELLS.....	19
ABBILDUNG 5: THERAPIESCHEMA DER TG4-42 <sub>HOM</sub> -MÄUSE.....	22
ABBILDUNG 6: ÜBERSICHT DER VERHALTENSEXPERIMENTE.....	23
ABBILDUNG 7: VERSUCHSAUFBAU DES ROTAROD.....	24
ABBILDUNG 8: VERSUCHSAUFBAU DER DARK LIGHT BOX.....	25
ABBILDUNG 9: VERSUCHSAUFBAU DES ELEVATED PLUS MAZE.....	26
ABBILDUNG 10: VERSUCHSAUFBAU DES OPEN FIELD.....	27
ABBILDUNG 11: VERSUCHSAUFBAU DES MORRIS WATER MAZE.....	29
ABBILDUNG 12: ABLAUF DER DESIGN-BASIERTE STEREOLOGIE IN DER CA1-REGION DES HIPPOCAMPUS.....	34
ABBILDUNG 13: WIN-BEHANDLUNG REDUZIERT DAS KÖRPERGEWICHT VON TG4-42 <sub>HOM</sub> - MÄUSEN IN DER THERAPEUTISCHEN BEHANDLUNGSGRUPPE.....	41
ABBILDUNG 14: PRÄVENTIV BEHANDELTE TG4-42 <sub>HOM</sub> -MÄUSE SIND IHREN VEHIKEL- KONTROLLEN IM ROTAROD-TEST UNTERLEGEN.....	42
ABBILDUNG 15: PRÄVENTIVE UND THERAPEUTISCHE BEHANDLUNG MIT WIN HAT KEINEN EINFLUSS AUF DAS ANGSTVERHALTEN VON TG4-42 <sub>HOM</sub> - UND WT-MÄUSEN IM DLB-TEST .....	45
ABBILDUNG 16: PRÄVENTIVE UND THERAPEUTISCHE BEHANDLUNG MIT WIN HAT KEINEN EINFLUSS AUF DAS ANGSTVERHALTEN IM EPM VON TG4-42 <sub>HOM</sub> -MÄUSEN UND VON WILDTYP-MÄUSEN.....	47
ABBILDUNG 17: KEINE ÄNDERUNG IM ANGSTVERHALTEN VON TG4-42 <sub>HOM</sub> - UND WILDTYP- MÄUSEN IM OF DURCH DEN PRÄVENTIVEN UND DEN THERAPEUTISCHEN BEHANDLUNGSANSATZ MIT WIN.....	49
ABBILDUNG 18: PRÄVENTIVE WIN-THERAPIE VERHINDERT LERNDEFIZITE IM RÄUMLICHEN UND BEZUGSGEDÄCHTNIS VON TG4-42 <sub>HOM</sub> -MÄUSEN IM WATER-MAZE-TEST.....	52
ABBILDUNG 19: THERAPEUTISCHE WIN-BEHANDLUNG VON TG4-42 <sub>HOM</sub> -MÄUSEN REDUZIERTEN LERNDEFIZITE IM RÄUMLICHEN UND BEZUGSGEDÄCHTNIS IM WATER MAZE-TEST MODERAT.....	53
ABBILDUNG 20: WIN-THERAPIE ZEIGTE KEINEN SIGNIFIKANTEN EINFLUSS AUF DIE NEURONENZAHL IN DER CA1-REGION DES HIPPOCAMPUS VON TG4-42 <sub>HOM</sub> -MÄUSEN...54	54
ABBILDUNG 21: KEIN EINFLUSS VON WIN-THERAPIE AUF DIE NEUROGENESE IM GYRUS DENTATUS VON TG4-42 <sub>HOM</sub> -MÄUSEN.....	55
ABBILDUNG 22: ERGEBNISSE DER QUANTIFIZIERUNG DER IBA-1-, GFAP- & CB1-REZEPTOR IMMUNHISTOCHEMIE IM CORTEX VON TG4-42 <sub>HOM</sub> -MÄUSEN.....	56



---

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: START- UND ZIELPOSITIONEN FÜR DAS MORRIS WATER MAZE.....	29
TABELLE 2: FORMELN ZUR BERECHNUNG DER GESAMTNEURONENZAHL IN DER CA1-REGION DES HIPPOCAMPUS .....	33
TABELLE 3: BERECHNUNG DER FAKTOREN VON P .....	34
TABELLE 4: ANTIKÖRPER FÜR DIE FÄRBUNGEN .....	38

## Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonylglycerol
A $\beta$	Beta-Amyloid
ACID	amino-terminale APP-Domäne
AD	<i>Alzheimer's Disease</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ApoE	Apolipoprotein E
APP	<i>amyloid-precursor-protein</i> (Amyloid Vorläufer Protein)
asf	<i>area sampling fraction</i>
BACE1	<i>beta-site APP cleaving enzyme 1</i>
CA1	<i>cornu ammonis 1</i>
CAA	zerebrale Amyloidangiopathie
CB1	Cannabinoidrezeptor 1
CB2	Cannabinoidrezeptor 2
CBD	Cannabidiol
CD33	<i>cluster of differentiation 33</i>
CT	Computertomographie
CTF- $\beta$	C-terminales Fragment- $\beta$
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCX	Doublecortin
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DLB	<i>Dark Light Box</i>
ddH <sub>2</sub> O	<i>aqua bidest</i> (doppelt destilliertes Wasser)
ECS	Endocannabinoid-System
EEG	Elektroenzephalographie
EOAD	<i>early onset Alzheimer's disease</i>
EPM	<i>Elevated Plus Maze</i>
FAD	<i>familial Alzheimer's disease</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> (saures Gliafaserprotein)
IBA-1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
i. p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharide
LOAD	<i>late onset Alzheimer's disease</i>
MCI	<i>mild cognitive impairment</i>
MMST	<i>mini-mental-status-test</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MWM	<i>Morris Water Maze</i>
n. s.	nicht signifikant
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NFT	<i>neurofibrillary tangles</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NORT	<i>novel object recognition task</i>
OF	<i>Open Field</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PET	Positronenemissionstomographie
PHF	<i>paired helical fragments</i>

---

PPAR- $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- $\gamma$
prev.	präventiv
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RT	Raumtemperatur
S.E.M.	<i>standard error of the mean</i>
ssf	<i>section sampling fraction</i>
TG	transgen
Tg4-42 <sub>hom</sub>	homozygote Mäuse des transgenen Mausmodells Tg4-42
THC	(-)- $\Delta^9$ -trans-Tetrahydrocannabinol
ther.	therapeutisch
tmc	<i>total markers counted</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRH	<i>thyrotropin-releasing hormon</i>
TREM-2	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
tsf	<i>thickness sampling fraction</i>
Veh.	Vehikel
WIN	R-(+)-WIN 55,212-2
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

Der Morbus Alzheimer (eng. *Alzheimer's Disease*, AD) ist eine neurodegenerative, chronisch-progrediente Erkrankung, die noch vor den Demenzen des vaskulären-, frontotemporalen- und Lewy-Body-Typs, die häufigste Form der Demenzerkrankungen des Menschen darstellt. Patient\*innen, die an einer Alzheimer Demenz erkrankt sind, leiden vor allem an Gedächtnis- und Orientierungsstörungen sowie Persönlichkeitsveränderungen (Förstl et al. 1999).

Die Erkrankung wurde erstmals 1907 von dem Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer beschrieben und ist mangels einer kausaler Therapiemöglichkeit Gegenstand andauernder Forschung (Alzheimer 1907). Bisherige Therapieansätze sind rein symptomatisch, mildern den Krankheitsverlauf allenfalls und adressieren daher nur unzureichend die erheblichen medizinischen und sozioökonomischen Probleme, die mit der Erkrankung verbunden sind. Die Ätiologie der Erkrankung ist noch nicht in Gänze verstanden und konzentriert sich gegenwärtig auf ein multifaktorielles Geschehen mit Focus auf der krankhaften Ablagerung von intraneuronalem und löslichem Beta-Amyloid (A $\beta$ ) (Blennow et al. 2006).

## 1.1 Der Morbus Alzheimer

### 1.1.1 Epidemiologie

Schätzungsweise über 50 Millionen Menschen weltweit leiden an einer Demenz-Erkrankung, wobei der Anteil des Morbus Alzheimer mit schätzungsweise 60 – 80% am höchsten liegt. Infolge der demografischen Entwicklung und der gestiegenen Lebenserwartung wird alle 20 Jahre eine Verdopplung der Demenzerkrankten erwartet mit voraussichtlich 152 Millionen Betroffenen im Jahr 2050 (Alzheimer's Disease International 2019).

In Deutschland leben derzeit etwa 1,7 Millionen Demenzerkrankte, wobei die Mehrheit der Erkrankungen durch einen Morbus Alzheimer bedingt ist. Mit bis zu 300.000 Neuerkrankungen jährlich bis 2050 wird ein Anstieg auf etwa drei Millionen Betroffene prognostiziert (Georges et al. 2020). Aufgrund von biologischen Unterschieden, wie z. B. der höheren Lebenserwartung und weiteren sozioökonomischen Faktoren sind Frauen mit einem Anteil von etwa zwei Drittel der Demenzerkrankten deutlich häufiger betroffen als Männer (Andrew und Tierney 2018).

Da das Alter der wichtigste biologische Risikofaktor für die AD ist, wird es zur Klassifizierung der Patientengruppen herangezogen. Patient\*innen, bei denen Symptome nach dem 65. Lebensjahr auftreten, erkranken definitionsgemäß an der häufigen, senilen Form (eng. *late onset Alzheimer's Disease* = LOAD) (Rabinovici 2019). Patient\*innen, die vor dem 65. Lebensjahr klinische Symptome zeigen, werden der deutlich selteneren präsenilen

Form der AD (eng. *early onset Alzheimer's Disease* = EOAD) zugerechnet, die ca. 10% Erkrankungsanteil ausmacht (Cacace et al. 2016).

### 1.1.2 Risikofaktoren

Die großen Gruppen der Risikofaktoren der AD bestehen aus Lifestylefaktoren, genetischer Disposition und Umweltfaktoren (Armstrong 2019). Hierbei ist das Alter der mit Abstand wichtigste und gleichzeitig nicht beeinflussbare Risikofaktor. So steigt die Inzidenz der Alzheimer-Demenz mit dem Alter exponentiell an und das Erkrankungsrisiko verdoppelt sich ab dem 65. Lebensjahr alle fünf Jahre (Blennow et al. 2006; Alzheimer's Disease International 2019).

Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren für eine Demenz zählen das Rauchen, chronischer Alkoholkonsum, körperliche Inaktivität und die Ernährung. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Adipositas, Hypercholesterinämie, Hypertonus und chronische zerebrale Minderperfusion erhöhen ebenso das Risiko für eine demenzielle Erkrankung. (Kivipelto et al. 2001; Li et al. 2011; Sofi et al. 2011; de Oliveira et al. 2014; Duncombe et al. 2017).

Weiterhin bestehen Assoziationen mit sozialen Faktoren wie einem niedrigem sozioökonomischem Status, einem niedrigem Bildungsniveau und sozialer Isolation (Evans et al. 1997; Valenzuela 2008; Livingston et al. 2017). Als weiterer Risikofaktor wurde die Schwerhörigkeit beschrieben (Lin et al. 2011; Deal et al. 2017).

#### 1.1.2.1 Genetische Disposition als Risikofaktor

Der weitaus größte Teil der AD-Patient\*innen (95%) erkranken sporadisch und nur bei einem kleinen Teil (< 5%) kann eine genetische Ursache identifiziert werden (Barber 2012; Alzheimer's Association et al. 2013). Die Betroffenen mit einer genetischen Ursache erkranken häufig an der EOAD. Doch kann nur bei 10% der EOAD-Patient\*innen eine ursächliche genetische Mutation entdeckt werden. Wiederum 10 – 15% dieser Patient\*innen erkranken an der autosomal dominant vererbten familiären Alzheimer-Form (eng. *familial Alzheimer's Disease* = FAD) (Jarmolowicz et al. 2015). Die FAD konnte mit drei Mutationen auf verschiedenen Genen (das APP-Gen auf Chromosom 21 und die Presenilin-Gene 1 und 2 auf den Chromosomen 14 und 1 (PSEN1 und PSEN2)) assoziiert werden (Cacace et al. 2016).

Mutationen im APP-Gen wurden als erste im Zusammenhang mit der FAD beschrieben und werden meist autosomal dominant vererbt. Nahe den Amyloid- $\beta$ -kodierenden Exonen 16 und 17 kommt es hierbei meist zu heterozygoten *Missense*-Mutationen (Goate et al. 1991). Des Weiteren sind seltene rezessive Deletionen, aber auch Duplikationen des gesamten Gens bekannt (Rogaev et al. 1995; Rovelet-Lecrux et al. 2006). Diese Mutationen führen zu einer gesteigerten Amyloid-Produktion, Veränderungen im Verhältnis von  $A\beta_{42}$  zu  $A\beta_{40}$  oder zu

erhöhter A $\beta$ -Fibrillenbildung (Bettens et al. 2013). Individuen, die an einer Trisomie 21 leiden, produzieren aufgrund der dreifachen Anlage des APP-Gens vermehrt APP und erkranken mit einer Wahrscheinlichkeit von 90% an einem Morbus Alzheimer (Colacurcio et al. 2018; Zis und Strydom 2018).

Die Gene PSEN1 und PSEN2 kodieren für die Präsenilin-Proteine, die das katalytische Zentrum des Enzyms  $\gamma$ -Sekretase beinhalten. Damit sind sie am Abbau von Typ-I-Transmembranproteinen und damit auch vom Amyloid-Vorläufer-Protein beteiligt. Die Mutationen beeinträchtigen den  $\gamma$ -Sekretase vermittelten Abbau von APP und führen zu einem erhöhten Verhältnis von A $\beta_{42}$  zu A $\beta_{40}$  (Bettens et al. 2013). Die meisten Mutationen im Zusammenhang mit der FAD sind für das PSEN1 beschrieben (215 Mutationen) (Cacace et al. 2016).

Für die LOAD sind hingegen keine genetischen Mutationen bekannt. Jedoch konnte das  $\epsilon$ 4-Allel des Apolipoprotein E-Gens (ApoE) auf Chromosom 19 als bedeutender Risikofaktor für die sporadische Form des Morbus Alzheimer identifiziert werden. Mit dem Vorliegen einer oder sogar beider Kopien des  $\epsilon$ 4-Allels erhöht sich das Risiko an einer AD zu erkranken um den Faktor 3 – 15 (Corder et al. 1993; Farrer et al. 1997; Armstrong 2019). Vom ApoE-Gen sind drei Allele bekannt ( $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 und  $\epsilon$ 4). Das Gen kodiert für das Transportprotein Apolipoprotein E4, das u. a. eine wichtige Funktion beim Cholesterintransport im Lipidstoffwechsel erfüllt (Xiao et al. 2017). Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen einer seltenen Mutation des TREM2-Gens (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), dem eine antiinflammatorische Wirkung in ZNS zukommt, und dem Auftreten der Alzheimer-Erkrankung beschrieben (Ewers et al. 2019). Ein weiteres Immunmolekül, dessen Mutation das Risiko an einer LOAD zu erkranken erhöht, ist das CD33 (*cluster of differentiation 33*) (Hollingworth et al. 2011).

### 1.1.3 Symptomatik und klinischer Verlauf

Die AD ist eine neurodegenerative Erkrankung, die i. d. R. chronisch-progredient verläuft. Die Symptomatik der AD wird in drei Stadien eingeteilt, die klinisch ineinander übergehen und dessen Abgrenzung voneinander gelegentlich erschwert ist (Blennow et al. 2006).

Im präklinischen Stadium der AD (eng. *preclinical AD*) besteht keine klinische Symptomatik bei den Patient\*innen, jedoch sind bereits positive Biomarker-Befunde, sowie bild- und histomorphologische Veränderungen in den Gehirnen vorhanden (Sperling et al. 2011). Neurodegenerative Veränderungen und histologische Pathologien, wie die Ablagerung von A $\beta$ -Amyloid, sind oft bereits Jahre bis Jahrzehnte vor dem Auftritt klinischer Symptome vorhanden (Villemagne et al. 2013). In den frühen Krankheitsstadien können die Beeinträchtigungen der AD-Patient\*innen sehr unterschiedlich ausgeprägt sein und müssen daher klinisch und therapeutisch individuell adressiert werden.

Der *preclinical* AD folgt i. d. R. das zweite Stadium der leichten kognitiven Beeinträchtigung (eng. *mild cognitive impairment* = MCI) (Dubois et al. 2016). Dieses prä-demenzielle Stadium geht mit kognitiven und funktionellen Störungen einher. Zu den häufigsten kognitiven Symptomen gehören die Beeinträchtigung von Gedächtnis, Orientierung, räumlicher Wahrnehmung, Aufmerksamkeit und Sprache (Dubois et al. 2016). Dadurch werden alltägliche Handlungsabläufe hinsichtlich Geschwindigkeit, Effizienz und Fehlerlosigkeit beeinträchtigt. Weiterhin kann es bei Betroffenen zu vegetativen Störungen, wie beispielsweise vermindertem Riechempfinden kommen (Förstl et al. 1999; Kelley und Petersen 2007). Der Alltag kann meist durch kleine Hilfestellungen Dritter selbstständig organisiert und bewältigt werden (Albert et al. 2011).

Das Stadium der MCI geht in 10 – 15% der Fälle in das Vollbild der Erkrankung, der Demenz vom Alzheimer-Typ, über (Grundman et al. 2004). Hierbei kommt es zur Intensivierung der kognitiven, funktionellen, motorischen und vegetativen Symptomatik bis hin zum Verlust der Eigenständigkeit der Patient\*innen (McKhann et al. 2011). Da der Krankheitsprogress bislang nicht mit einer kausalen Therapie gestoppt werden kann, werden die Patient\*innen häufig weitestgehend bettlägerig und pflegebedürftig. Die Anfälligkeit für Infektionen, wie beispielsweise durch Aspirationspneumonien, die durch einen beeinträchtigten Schluckakt hervorgerufen werden können, tragen deutlich zur Verminderung der Lebenserwartung der Betroffenen bei (Wada et al. 2001).

#### 1.1.4 Diagnostik

Bei der Diagnostik der AD bedarf es eines kombinierten Konzepts aus klinischen neuropsychologischen Tests und apparativer Diagnostik mit laborchemischen Biomarkern und bildgebenden Verfahren. Absolute diagnostische Sicherheit kann lediglich in der Autopsie *post mortem* gewährleistet werden. Da viele präventive und therapeutische Ansätze im Frühstadium einer Demenzerkrankung Pflegebedürftigkeit und Belastung verzögern können, ist eine frühe Diagnostik von Vorteil (DGN 2017).

Gemäß der aktuellen S3-Leitlinie Demenzen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie erfolgt zunächst eine ausführliche Eigen- und Fremdanamnese, die Hinweise auf die ätiologische Zuordnung, den psychologischen Befund, die Alltagsbewältigung und den bisherigen Verlauf der Erkrankung gibt (DGN 2017). Eine mentale Leistungseinschätzung sollte über einen kognitiven Kurztest, z. B. dem häufig verwendeten *Mini-Mental-Status-Test* (MMST), erfolgen. Dieser besteht aus verschiedenen Aufgabenfeldern mit Fragen und Handlungsaufgaben aus den Kategorien Denk- und Merkfähigkeit, zeitliche und räumliche Orientierung, Aufmerksamkeit, Erinnerungsfähigkeit, Rechenfähigkeit und Sprache (Folstein et al. 1975). Auf Grundlage der Testpunktzahl kann eine Einschätzung des Schweregrades der Demenz getroffen werden. Besteht der Verdacht auf ein dementielles Syndrom, schließen sich weitere Schritte zur ätiologischen Abklärung an. Dazu zählen standardmäßig eine Blutdiagnostik, sowie eine Untersuchung des Liquor cerebrospinalis. Ein

typischer Liquorbefund für die AD liegt bei der Erhöhung von (phosphoryliertem) Tau-Protein und gleichzeitig vermindertem  $A\beta_{42}$  vor (McKhann et al. 2011).

An Bluttests zur Diagnostik bzw. Frühdiagnostik der AD wird derzeit intensiv gearbeitet. Ein Ansatz liefert der kürzlich beschriebene Nachweis des Tau-Proteinsfragments Plasma-p-tau217, das einerseits sehr spezifisch für Alzheimer ist und andererseits bei Mutationsträgern für die AD bereits sehr früh im Blutplasma der Patient\*innen nachweisbar ist (Palmqvist et al. 2020). Ein weiterer vielsprechender Ansatz für die Frühdiagnostik der AD ist der Nachweis von fehlgefaltetem  $A\beta$  unter Berücksichtigung des Alters und des Apo  $\epsilon 4$ -Status im Blut (Stockmann et al. 2020). In den USA wurde kürzlich ein Bluttest zugelassen, der zwar keine Vorteile bei der Früherkennung, jedoch bei der Diagnostik der AD bietet. Mittels Massenspektroskopie kann der Test Auskunft über das Verhältnis von  $A\beta_{42}$  zu  $A\beta_{40}$  und den Apo  $\epsilon 4$ -Status im Blutplasma geben und lässt somit eine Aussage über die Amyloid-Last im Gehirn von Patient\*innen zu (West et al. 2021).

Bei der bildgebenden Diagnostik ist die kraniale Magnetresonanztomographie (cMRT) als Goldstandard anzusehen (Frisoni et al. 2010). Alternativ kann auch die kraniale Computertomographie (cCT) zur differenzialdiagnostischen Beurteilung herangezogen werden. Charakteristische Befunde für den Morbus Alzheimer sind hierbei eine generalisierten Hirnatrophie, eine Atrophie des *Gyrus parahippocampalis* und des medialen Temporallappens im Bereich des Hippocampus (Frisoni et al. 2010). Darüber hinaus lässt sich mit der Positronenemissionstomographie (PET) ein reduzierter Glukosemetabolismus in betroffenen Arealen teilweise bereits im präklinischen Stadium darstellen (Mosconi et al. 2010; Chételat et al. 2020). Mit der PET ist ebenfalls der Nachweis von Amyloid-Plaques möglich (Suppiah et al. 2019). Aus differenzialdiagnostischen Gründen können in einzelnen Fällen Elektroenzephalographien (EEG), genetische Beratungen und Sonographien der hirnversorgenden Gefäße indiziert sein (DGN 2017).

### 1.1.5 Therapie

Für den Morbus Alzheimer existiert keine kausale Therapie. Bisherige therapeutische Ansätze sind rein symptomatisch und zielen darauf ab, den Krankheitsprozess zu verlangsamen. Die Therapie orientiert sich nach der aktuell gültigen S3-Leitlinie Demenzen an der klinischen Ausprägung der Demenzsymptomatik und muss individuell an jede Patient\*in angepasst werden. Sie beinhaltet psychosoziale Behandlungsmethoden wie Orientierungshilfen zur Alltagsbewältigung und medikamentöse Optionen (DGN 2017). Zwei Gruppen von Medikamenten sind für die Therapie der Alzheimer Erkrankung zugelassen. Einerseits die Gruppe der Acetylcholinesterase-Inhibitoren, bei denen die Wirkstoffe Donepezil, Rivastigmin und Galantamin im Vordergrund stehen. Sie werden bei leichter bis mittelschwerer Demenz empfohlen und zielen auf die Verbesserung der kognitiven und alltäglichen Fähigkeiten ab. Die Wirkung beruht auf der Konzentrationserhöhung des Neurotransmitters Acetylcholin im synaptischen Spalt



cholinergener Neurone und erhöht so deren Erregbarkeit. Da die cholinergen Neurone beim Morbus Alzheimer besonders von der Neurodegeneration betroffen sind, verbessern die Wirkstoffe die kognitive Leistung der Patient\*innen. Andererseits steht bei der schweren Demenz der nicht-kompetitive NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor-Antagonist Memantin als Monotherapie oder als Add-on-Therapie zu den Acetylcholinesterase-Inhibitoren zur Verfügung. Weiterhin kann gemäß der Leitlinie die Demenzbehandlung mit dem Extrakt der Ginkgo bilboa-Pflanze erwogen werden, spielt insgesamt jedoch eine untergeordnete Rolle (DGN 2017).

Neue Arzneimittel zur Therapie der Alzheimer-Demenz werden dringend benötigt und intensiv getestet. Die Wirkung von Cannabinoiden bei Alzheimer-Erkrankten wurde bislang lediglich in zwei Studien und nur hinsichtlich der Appetitlosigkeit (Volicer et al. 1997) und nächtlicher Unruhe der Patient\*innen (Walther et al. 2006) in kleinen Patientenkollektiven untersucht. Zwar legten beide Studien hinsichtlich ihrer Fragestellung positive Behandlungsergebnisse vor, doch wurde die Therapie des Morbus Alzheimer mit Cannabinoiden wegen methodischer Mängel der Studien und fehlender Evidenz in einem Cochrane-Review 2009 nicht empfohlen (Krishnan et al. 2009) und wird auch in der S3-Leitlinie zur Behandlung von Demenzen bis dato nicht empfohlen (DGN 2017).

Insbesondere die Immunisierungstherapie mit monoklonalen Antikörpern gegen Amyloid  $A\beta_{42}$  konnte in transgenen AD-Mausmodellen vielversprechende Ergebnisse erzielen und wurde mehrfach in Phase-3-Studien an Patient\*innen getestet (Schenk et al. 1999). Die Immuntherapie gegen  $A\beta$  konnte bislang in mehreren Studien keine effektive Wirksamkeit gegen die Alzheimer-Demenz zeigen und wird daher kontrovers diskutiert (Mullard 2019). Ein Beispiel aus der Gruppe von Antikörpern ist das Aducanumab, dessen Wirksamkeit in zwei großen Zulassungsstudien an Patient\*innen mit MCI bzw. leichter Demenz untersucht wurde. Jedoch konnte eine Wirksamkeit des Wirkstoffs lediglich bei verlängertem Follow-up in einer der beiden Zulassungsstudien nachgewiesen werden, weshalb die Entscheidung über die Zulassung in den USA gegenwärtig umstritten ist (Kuller und Lopez 2021).

## 1.2 Neuropathologie

### 1.2.1 Amyloid-Plaques

Amyloid-Plaques sind eines der zentralen neuropathologischen Merkmale bei der AD. Die Hauptkomponenten dieser extrazellulären Ablagerungen sind  $A\beta$ -Peptide, die durch enzymatische Spaltung des Amyloid-Vorläufer Proteins (APP) entstehen (Holtzman et al. 2011; Serrano-Pozo et al. 2011). Anhand ihrer Morphologie und ihrer verschiedenen immunhistochemischen Anfärbbarkeit lassen sich die Amyloid-Plaques in die Gruppe der diffusen und der neuritischen Plaques unterscheiden, wobei die neuritischen bzw. senilen Plaques pathologisch im Fokus stehen (Holtzman et al. 2011; Serrano-Pozo et al. 2011). Sie bestehen aus einem zentralen Amyloidfibrillen-Kern, vornehmlich aus der Isoform  $A\beta_{1-42}$ ,

und einem peripheren Kranz mit degenerierten Nervenzellfortsätzen (Holtzman et al. 2011). Neben A $\beta$  finden sich in neuritischen Plaques weitere Proteine, einschließlich APP und Tau, sowie reaktive Astrozyten und aktivierte Mikroglia in der direkten Umgebung (Duyckaerts et al. 2009; Serrano-Pozo et al. 2011). Die Plaque-Pathologie beginnt üblicherweise im Neocortex und geht später auf den Hippocampus, die Basalganglien und das Kleinhirn über (Serrano-Pozo et al. 2011). Im Endstadium der Erkrankung finden sich zusätzlich senile Plaques im Hirnstamm und weiteren subkortikalen Strukturen (Thal et al. 2002). Dennoch korreliert die Anzahl der Plaques nur schlecht mit dem kognitiven Rückgang und der Schwere der Krankheit (Villemagne et al. 2013). Daher werden die Plaques in der Pathogenese des Morbus Alzheimer nicht mehr als ursächlich angesehen, sondern, intraneuronales A $\beta$  steht im Verdacht für die Entstehung ursächlich zu sein. Das frühe Auftreten von intraneuronalem A $\beta$  noch vor extrazellulären Plaques (Fernández-Vizarra et al. 2004; Wirths und Bayer 2012) und die Korrelation von intraneuronalem A $\beta$  mit Nervenzellverlust im Mausmodell unterstützen diese modifizierte Amyloid-Hypothese (Casas et al. 2004; Christensen et al. 2014). Es wird davon ausgegangen, dass extrazelluläre Plaques als Reservoir für toxische A $\beta$ -Oligomere, die ins Neuron aufgenommen werden, weiterhin eine Rolle spielen (Haass und Selkoe 2007; Murphy und LeVine 2010; Brody et al. 2017).

Neben der Ablagerung von A $\beta$  in Form von Plaques werden bei AD-Patient\*innen ebenfalls häufig Ablagerungen von Beta-Amyloid in Blutgefäßwänden des Gehirns beobachtet. Diese zerebrale Amyloidangiopathie (CAA) führt zu zahlreichen Mikroaneurysmen und Stenosen, die wiederum eine häufige Ursache für Hirnblutungen oder Ischämien darstellen (Smith und Greenberg 2009). Die CAA wurde lange als Begleitsymptom der AD angesehen, ist jedoch eine eigenständige Erkrankung, bei der im Gegensatz zu der AD das A $\beta_{1-40}$  als häufigstes Peptid in den Ablagerungen nachgewiesen wurde (Suzuki et al. 1994; Attems et al. 2004). Dennoch besteht eine deutliche Assoziation der CAA mit der AD (Attems et al. 2005).

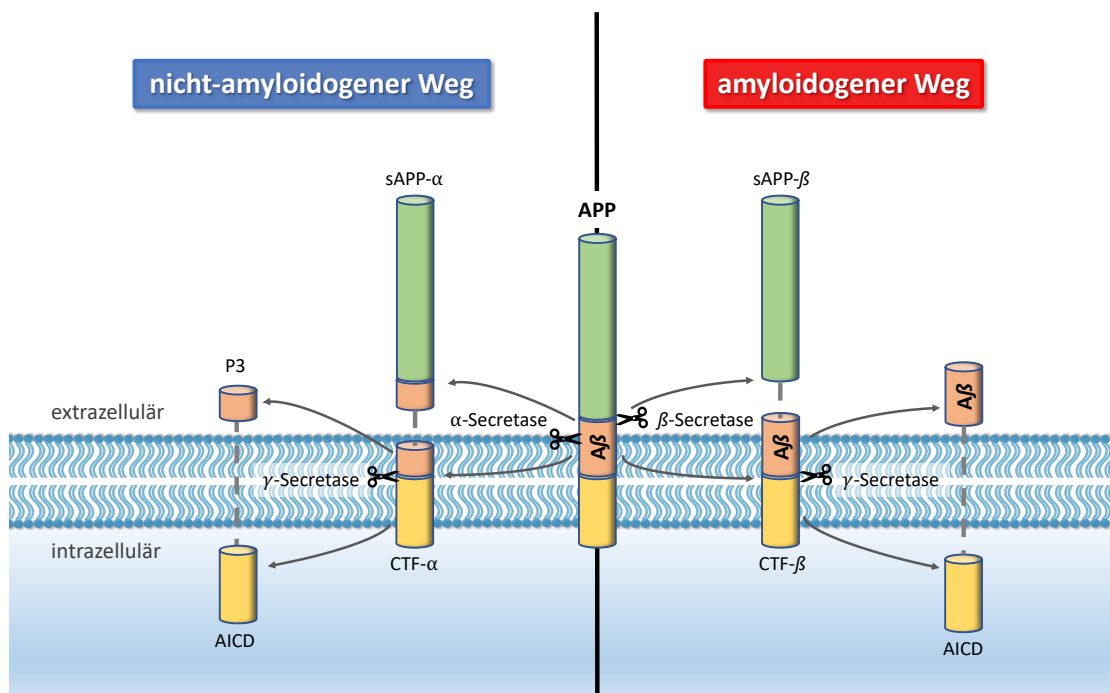
#### 1.2.1.1 APP-Prozessierung

Das A $\beta$ -Peptid entsteht aus der Prozessierung des APP-Proteins, einem Typ-I-Transmembranprotein, das neben den Neuronen im ZNS auch von vielen peripheren Geweben und Organen des Menschen exprimiert wird (Puig und Combs 2013). Die physiologische Rolle von APP ist nicht gänzlich verstanden. So spielt es im Embryo eine wichtige Rolle für die neuronale Entwicklung, aber auch im adulten Gehirn kommen dem APP verschiedene Funktionen, wie Zellsignalprozesse, neuronale Entwicklung und intrazellulärer Transport zu (Coronel et al. 2019). Die proteolytische Spaltung von APP erfolgt durch verschiedene membrangebundene Enzyme, den sogenannten Secretasen. Je nach Angriffspunkt der Secretasen entstehen verschiedene Spaltprodukte mit verschiedenen Funktionen. Bei der Prozessierung von APP wird der nicht-amyloidogene Weg vom pathologischen amyloidogenen Weg unterschieden (Abbildung 1).

---

Beim physiologischen, nicht-amyloidogenen Weg wird das APP zunächst von der  $\alpha$ -Secretase in das lösliche APP- $\alpha$  (sAPP- $\alpha$ ) und C-terminale Fragment (CTF- $\alpha$ ) geschnitten. Über die  $\gamma$ -Secretase werden diese Proteine weiter in das extrazelluläre P3-Protein und die intrazelluläre amino-terminale APP-Domäne (ACID) prozessiert (Abbildung 1). Von zentraler Bedeutung ist, dass die  $\alpha$ -Spaltung in der Sequenz des A $\beta$  erfolgt und somit keine aggregationsfähigen A $\beta$ -Peptide entstehen. Einige Spaltprodukte, wie das sAPP- $\alpha$  scheinen sogar eine neuroprotektive Wirkung zu entfalten (Taylor et al. 2008; Tackenberg und Nitsch 2019). Zu  $\alpha$ -Secretasen gehören Enzyme der Familie der Desintegrin-Metalloproteasen (ADAM) (Chow et al. 2010).

Beim der amyloidogenen Prozessierung wird das APP zunächst von  $\beta$ -Secretase in das extrazelluläre lösliche APP- $\beta$  (sAPP- $\beta$ ) und in das mit 99 Aminosäuren kleinere, membranständige C-terminale Fragment (CTF- $\beta$ , C99) gespalten. Das CTF- $\beta$  wiederum wird von der  $\gamma$ -Secretase in extrazelluläres A $\beta$  und das intrazelluläre AICD prozessiert (Chow et al. 2010). Die A $\beta$ -Peptide variieren je nach Angriffspunkt der  $\gamma$ -Secretase in der Länge von 34-50 Aminosäuren. Ca. 90% der entstandenen A $\beta$ -Fragmente zählen zu der A $\beta_{40}$ -Gruppe. Ein kleinerer Teil entfällt auf die Peptide A $\beta_{42}$  und A $\beta_{43}$ , von denen ersteres maßgeblich an der Bildung der neuritischen Plaques beteiligt ist (van der Kant und Goldstein 2015). Für die  $\beta$ -Secretasen-Spaltung ist in erster Linie das *beta-side APP cleaving enzyme 1* (BACE1) verantwortlich, das zu der Familie der Aspartylproteasen gehört (Das und Yan 2017). Bei der  $\gamma$ -Secretase handelt es sich um einen Enzymkomplex, der sich mindestens aus den Komponenten Nicastrin, Präsenilin, PEN-2 (*presenilin enhancer 2*) und APH-1 (*anterior pharynx defective 1*) zusammensetzt (Bergmans und De Strooper 2010).



**Abbildung 1: Die Prozessierung des APP-Proteins**

Das Amyloid-Vorläufer Protein (APP) kann auf zwei Wegen prozessiert werden. Auf dem physiologischen, nicht-amyloidogenen Weg wird das Transmembranprotein zunächst von dem Enzym  $\alpha$ -Secretase in das lösliche APP- $\alpha$  (sAPP- $\alpha$ ) sowie das C-terminale Fragment  $\alpha$  (CTF- $\alpha$ ) geschnitten. Die  $\gamma$ -Secretase setzt die Fragmente anschließend zum intrazellulären AICD und zum extrazellulären P3 um. Beim pathologischen amyloidogenen Weg schneidet die  $\beta$ -Secretase das APP an einer anderen Stelle, sodass das sAPP- $\beta$  und das CTF- $\beta$  entstehen. Die  $\gamma$ -Secretase wiederum setzt das CTF- $\beta$  in das intrazelluläre AICD, sowie das A $\beta$  um, welches extrazellulär freigesetzt wird. Abbildung erstellt nach O'Brien und Wong (2011).

### 1.2.2 Varianten des Beta-Amyloids

Aufgrund ihrer Neurotoxizität und ihrer Aggregationsfähigkeit steht das Amyloid A $\beta$  im Fokus der Alzheimer-Pathologie. Bei Proteinsequenzierungen aus AD-Gehirnen konnte eine große Heterogenität hinsichtlich der Länge, sowie des C- bzw. N-Terminus der A $\beta$ -Peptide beobachtet werden (Masters et al. 1985; Selkoe 1994). Neben Vollängen-A $\beta$ -Peptiden, die mit Aspartat an Position eins des N-Terminus beginnen, wurden eine Vielzahl N-terminal trunkierter A $\beta$ -Varianten beschrieben. Diese entstehen durch Proteasen und durch unterschiedliche Angriffspunkte der  $\gamma$ -Secretase beim Schneiden des CTF- $\beta$  (van der Kant und Goldstein 2015).

Untersuchungen im Cortex, Hippocampus und Cerebellum von humanen Präparaten mit der familiären, sowie der sporadischen Variante des Morbus Alzheimer konnten die Peptide A $\beta_{1-42}$ , A $\beta_{4-42}$ , A $\beta_{1-40}$ , sowie das pGluA $\beta_{3-42}$  als häufigste A $\beta$ -Isoformen identifizierten (Portelius et al. 2010). Im Cortex und Hippocampus konnten A $\beta_{1-42}$  und A $\beta_{4-42}$  von Portelius

et al. (2010) als häufigste Isoformen im nachgewiesen werden. Die Verteilung der A $\beta$ -Isoformen unterschieden sich zwischen der familiären und der sporadischen AD nicht (Portelius et al. 2010). Die Vollängen A $\beta$ -Isoformen sind das A $\beta_{1-40}$  und A $\beta_{1-42}$ , von denen ersteres in cerebrovaskulären Plaques und letzteres neuritischen Plaques dominiert (Lue et al. 1999). Insbesondere die Isoformen der A $\beta_{42}$  Gruppe zeigen eine hohe Tendenz zur Aggregation.

Eine nicht gänzlich geklärte Rolle spielt das verkürzte, N-trunkierte A $\beta_{4-42}$ , welches im Cortex und im Hippocampus prädominant auftritt (Masters et al. 1985; Portelius et al. 2010). Portelius et al. (2010) vermuten, dass die Zink-Metalloprotease Neprilysin über den Abbau von A $\beta_{1-42}$  für die Produktion von A $\beta_{4-42}$  verantwortlich ist (Iwata et al. 2001; Bayer und Wirths 2014; Hornung et al. 2019). Hornung et al. (2019) konnten *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass A $\beta_{4-42}$  als Substrat von Neprilysin abgebaut wird und, dass A $\beta_{4-42}$  in Neprilysin-knockout Mäusen im Hippocampus akkumuliert. Sedimentationsanalysen zeigten, dass A $\beta_{4-42}$  *in vitro* schneller aggregiert als längere N-termini-A $\beta$ -Varianten (Pike et al. 1995).

Bouter et al. (2013) beschrieben, dass das eigentlich lösliche A $\beta_{4-42}$  Tendenzen zur Bildung stabiler Aggregate zeigt. Es wirkt *in vitro* ebenso neurotoxisch wie das A $\beta_{1-42}$  und bedingt dadurch eine Reduktion der neuronalen Zellviabilität. Die Pathophysiologie der Toxizität des A $\beta_{4-42}$  ist nicht gänzlich geklärt. Kürzlich wurde beschrieben, dass A $\beta_{4-42}$  über die Bildung oligomerer Aggregate hochstabile Ionenkanäle in Lipidmembranen bildet (Karkisaval et al. 2020). Es wird vermutet, dass die Membranpermeabilisierung durch Amyloidoligomere eine häufige Gruppe von nachgeschalteten pathologischen Prozessen auslösen kann, einschließlich einer intrazellulären Kalziumdyshomeostase, der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, veränderter Signalwege und einer mitochondrialen Dysfunktion, die Schlüsseleffektoren für die zelluläre Dysfunktion und den Zelltod darstellen (Bouter et al. 2013).

Die chronische Belastung ausschließlich mit A $\beta_{4-42}$  wurde *in vivo* verschiedentlich in Mausmodellen untersucht (Bayer und Wirths 2014; Lopez-Noguerola et al. 2018). Durch die intraventrikuläre Injektion von N-trunkierten A $\beta$ -Peptiden in die Gehirne von Wildtyp-Mäusen (WT) führte das A $\beta_{4-42}$  zu einem verminderten räumlichen Arbeitsgedächtnis bei den Tieren (Bouter et al. 2013). Mit dem transgenen Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell konnten Bouter et al. (2013) und Antonios et al. (2015) zeigen, dass eine Langzeitexposition mit humanem A $\beta_{4-42}$  in den Tieren zu signifikantem Nervenzellverlust im Hippocampus sowie zu Verhaltensauffälligkeiten, wie eingeschränktem räumlichen Bezugsgedächtnis und reduziertem Lernverhalten führt.

### 1.2.3 Neurofibrillenbündel

Als weiteres Hauptmerkmal der AD ist das Auftreten von Neurofibrillenbündeln (eng. *neurofibrillary tangles* = NFT), die aus dem Protein Tau zusammengesetzt sind, anzusehen (Hanger et al. 2009). Verschiedene neurodegenerative Erkrankungen, die mit der

Aggregation von Tau einhergehen, werden unter dem Begriff Tauopathien zusammengefasst. Tau bindet in Neuronen physiologischerweise an Mikrotubuli im Axon, stabilisiert diese und wirkt somit am axonalen Transport mit (Holtzman et al. 2011). Beim Morbus Alzheimer liegt das Tau jedoch hyperphosphoryliert und in höheren Konzentrationen vor (Khatoun et al. 1992). Dies führt zu reduzierter Bindungsaffinität von Tau an die Mikrotubuli und dazu, dass die Tendenz zur Aggregation in Form sogenannter gepaarter helikaler Filamente (eng. *paired helical filaments* = PHF) gegeben ist. Die PHF führen zu gestörten neuronalen Transportprozessen und Dysfunktionen (Alonso et al. 1996). Die Verteilung der NFT folgt einem hierarchischen Verteilungsmuster über den Hippocampus und die gesamte Großhirnrinde, das sich nach Braak in sechs Stadien einteilen lässt (Braak und Braak 1991).

Die Relevanz und der Beitrag der Tau-Pathologie auf die Pathogenese des Morbus Alzheimer bleibt ungeklärt. Zwar ist bekannt, dass die NFT später im Verlauf der AD als die A $\beta$ -Ablagerungen auftreten, doch korreliert die Tau-Pathologie besser mit der Schwere kognitiver Defizite von AD-Patient\*innen als die Plaque-Pathologie (Holtzman et al. 2011; Galimberti und Scarpini 2012). Da A $\beta$ -Ablagerungen und NFT häufig an denselben Stellen auftreten, ist ebenfalls eine gegenseitige Beeinflussung und Abhängigkeit naheliegend (Ittner und Götz 2011).

#### 1.2.4 Entzündung

Die Entzündung ist als weiteres pathologisches Charakteristikum der AD anzusehen. Geschädigte Nervenzellen, Neurofibrillenbündel und Beta-Amyloid wirken in den Gehirnen der Alzheimer-Patient\*innen proinflammatorisch. Aktivierte Mikroglia und Astrozyten, sowie Zytokine, Chemokine und das Komplementsystem sind an den vielfältigen Entzündungsmechanismen beteiligt (Akiyama et al. 2000; Tuppo und Arias 2005). Chronisch aktivierte Mikroglia und Astrozyten wurden direkt an neuritischen Plaques gefunden, was nahelegt, dass A $\beta$  ein wesentlicher Auslöser dieser Entzündungsreaktion ist (Itagaki et al. 1989; Medeiros und LaFerla 2013). Aktivierte Mikroglia besitzen zudem die Funktion der Phagozytose von A $\beta$  und haben durch die protektiven Eigenschaften ihres TREM-2 Rezeptors auf den AD-Krankheitsverlauf Aufmerksamkeit erregt (Gratuze et al. 2018). Aktivierte Mikroglia setzen eine Vielzahl entzündungsfördernder und toxischer Produkte frei, darunter Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies und Stickoxid (Bolmont et al. 2008). Diese Zytokine, wie Interleukin 6, können über Signalkaskaden zu Hyperphosphorylierung von Tau beitragen (Quintanilla et al. 2004). Somit scheint die Neuroinflammation eine Hauptrolle bei der Verschärfung der A $\beta$ -Belastung und der Tau-Hyperphosphorylierung zu spielen, was darauf hindeutet, dass diese Doppelrolle ebenfalls eine führende Verbindung zwischen diesen scheinbar unterschiedlichen AD-Kernpathologien sein könnte (Kinney et al. 2018). Ein weiterer Signalweg ist der des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ),

der die proinflammatorische Genexpression in Mikroglia senken kann und in AD-Gehirnen vermehrt exprimiert wird (Heneka et al. 2011). Dennoch wird die Bedeutung der Inflammation als Ursache oder Folge der AD kontrovers diskutiert, da neben den zahlreichen pathologischen Auswirkungen auch protektive Eigenschaften beschrieben sind (Krause und Müller 2010; Kinney et al. 2018).

### 1.2.5 Neuronenverlust und Hirnatrophie

Massiver Neuronenverlust und Synapsenverlust sind neben den Plaques und den NFT ein weiteres Hauptmerkmal der AD und das wichtigste pathologische Substrat der kortikalen Atrophie. Nervenzellverluste, die eng mit klinischen Stadien von AD-Patient\*innen korrelierten, konnten mit stereologischen Untersuchungen in der CA1-Region des Hippocampus (West et al. 1991), dem *Gyrus parahippocampalis* (Echávarri et al. 2011), der Amygdala (Poulin et al. 2011), dem *Nucleus basalis meynert* (Whitehouse et al. 1981), im *Bulbus olfaktorius* und *Nucleus olfaktorius anterior* (ter Laak et al. 1994) und in Anteilen des *Nucleus coeruleus* (Busch et al. 1997) identifiziert werden.

Der Nervenzellverlust scheint nach Lokalisation am ehesten mit dem NFT zu korrelieren, übersteigt den Anteil der NFT z. B. im *Sulcus temporalis superior* sogar deutlich (Gómez-Isla et al. 1997). Eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Nervenzell- und des Synapsenverlustes scheint hingegen lösliches, intraneurales A $\beta$  zu spielen (Larson und Lesné 2012; Mukhin et al. 2017). Das räumliche Muster des Synapsenverlustes im Gehirn entspricht dem des Neuronenverlustes. Allerdings deutet vieles darauf hin, dass der Untergang der Synapsen zeitlich noch vor dem Neuronenverlust steht (Serrano-Pozo et al. 2011). Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die synaptische Dichte am besten mit dem kognitiven Rückgang bei der AD korreliert (DeKosky und Scheff 1990; Terry et al. 1991; Ingelsson et al. 2004; Scheff et al. 2007).

Bekannt ist, dass beispielsweise im Hippocampus das Volumen direkt mit der Neuronenzahl korreliert (Kril et al. 2004). Daher konnte in verschiedenen Studien mit MRT-Bildgebung gezeigt werden, dass die Volumina des Hippocampus, des entorhinalen Kortex, der Amygdala und des *Gyrus parahippocampalis* zum klinischen Verlauf von AD-Patient\*innen passen (Xu et al. 2000; Bottino et al. 2002; Stoub et al. 2005; Basso et al. 2006; Devanand et al. 2007). Somit kann mithilfe von Volumenbestimmungen dieser Hirnareale die bildgebende Diagnostik bei der Einordnung der Patient\*innen in die jeweilige Krankheitsphase helfen (Hett et al. 2019).

## 1.3 Das Endocannabinoid-System

Das Endocannabinoid-System (ECS) ist ein körpereigenes, neuromodulatorisches System, das die Cannabinoidrezeptoren sowie endogene Cannabinoide und Enzyme, die für deren Synthese und Abbau verantwortlich sind, umfasst. Es spielt eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität, bei der Reaktion auf endogene und umweltbezogene Gewebeschäden, bei Lern- und Bewegungsprozessen, sowie bei der Immunmodulation (Lu und Mackie 2016). Darüber hinaus ist es in der Entwicklung des ZNS bei der embryonalen Neurogenese und Neuroplastizität von herausragender Bedeutung und wirkt sich auch in adulten Organismen auf die Neurogenese aus (Oliveira et al. 2019).

### 1.3.1 Aufbau und Funktion

Die Funktionen des ECS werden hauptsächlich über die Endocannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 vermittelt. (Lu und Mackie 2016). CB1-Rezeptoren sind die häufigsten G-proteingekoppelten Rezeptoren im ZNS, die sowohl von Neuronen, insbesondere im Cortex, in den Basalganglien, im Hippocampus und im Kleinhirn als auch von Gliazellen exprimiert werden (Mackie 2005). Der CB1-Rezeptor beeinflusst dort Gehirnfunktionen wie die Kognition, das Gedächtnis, die Motorik, die Ernährung und die Schmerzwahrnehmung (Wilson und Nicoll 2002). Entlang der Neurone ist der Rezeptor vorwiegend an den synaptischen Endköpfchen und an präterminalen Axonsegmenten lokalisiert (Nyíri et al. 2005). Weiterhin findet sich der CB1-Rezeptor auch an peripheren Nerven und Geweben (Mackie 2005). Mehrfach wurde beschrieben, dass die Aktivierung des CB1-Rezeptors eine neuroprotektive Funktion aufweisen kann (Kim et al. 2006; Zoppi et al. 2011).

Im Vergleich dazu wird der CB2-Rezeptor im ZNS in geringeren Mengen exprimiert und kommt dort hauptsächlich auf Zellen der Mikroglia und des Gefäßsystems vor (Walter et al. 2003; Golech et al. 2004). Zuerst beschrieben wurde der CB2-Rezeptor auf Zellen des peripheren Immunsystems, wo er die Migration der Zellen und die Freisetzung von Zytokinen moduliert (Munro et al. 1993). Er wird von einigen Neuronen unter pathologischen Zuständen, z. B. einer Nervenverletzung, vermehrt exprimiert (Viscomi et al. 2009). Zudem scheint der CB2-Rezeptor hochgradig induzierbar zu sein, da die Expression im Gewebe nach Verletzungen oder Entzündungen um das Hundertfache zunehmen kann (Maresz et al. 2005). Die Aktivierung des CB2-Rezeptors hat eine immunmodulatorische und eine antiinflammatorische Wirkung zur Folge (Turcotte et al. 2016). Neben den CB1- und dem CB2-Rezeptoren spielen im ECS auch noch auf weitere Rezeptoren eine Rolle. Dazu zählt insbesondere die Aktivierung des transienten Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie V, Subtyp 1 (TRPV1), die sich auf die Schmerzwahrnehmung auswirkt (Zou und Kumar 2018).

Die Aktivierung der Cannabinoidrezeptoren hat verschiedene und oft weitreichende Konsequenzen für die Zellphysiologie, einschließlich der synaptischen Funktion, der Gentranskription, der Zellmobilität und der synaptischen Plastizität. Die CB1- und CB2-

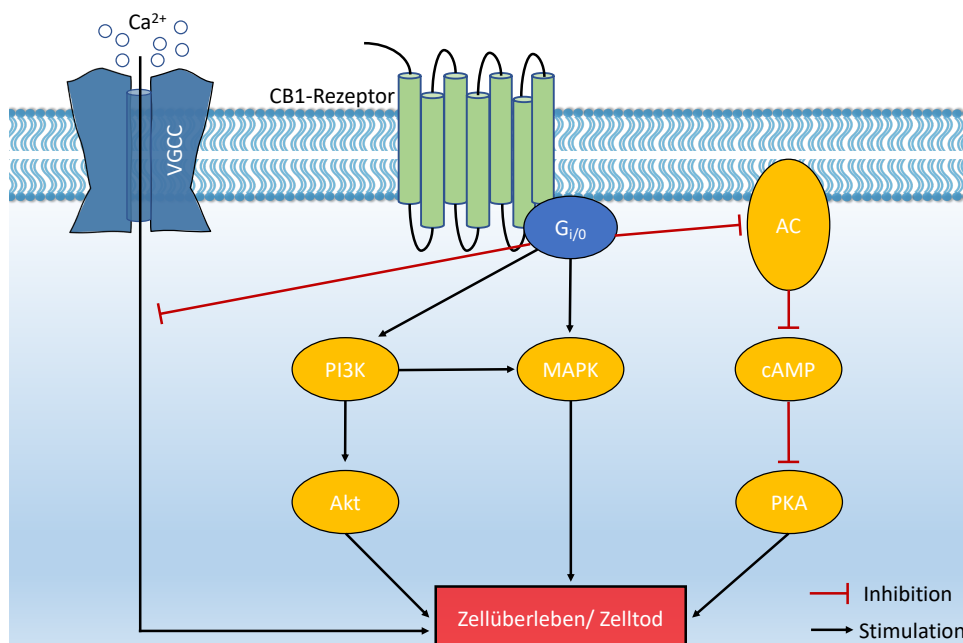


Rezeptoren sind an G<sub>i</sub>-bzw. G<sub>o</sub>-Proteine gekoppelt und vermitteln darüber eine Hemmung der Adenylatzyklase, der spannungsgesteuerten Calciumkanäle und die Aktivierung verschiedener Kinase-Pathways, die sich auf den Zelltod auswirken (Abbildung 2) (Howlett et al. 2002; Zou und Kumar 2018).

Die Charakterisierung der CB1- und CB2-Rezeptoren ermöglichte die Entdeckung der Endocannabinoide, einer Gruppe endogener Lipide, die an die Endocannabinoidrezeptoren binden und über Signalkaskaden verschiedene Wirkungen bedingen. Die häufigsten Vertreter dieser Gruppe sind das Anandamid (Arachidonylethanolamid) und das 2-Arachidonoylglycerin (2-AG) (Howlett et al. 2002). Die Vorläufer der Endocannabinoide stammen aus zellulären Lipidmembranen. Daher können sie bei Bedarf schnell über enzymatische Schritte prozessiert und dann nach extrazellulär freigesetzt werden (Pacher et al. 2006). Die Endocannabinoide unterscheiden sich von klassischen Neurotransmittern in zweierlei Hinsicht: Sie wirken als retrograde Messenger und sie reichern sich nicht im Inneren synaptischer Vesikel an (Wilson und Nicoll 2002; Lu und Mackie 2016). Neben der Aktivierung der Cannabinoidrezeptoren wurde beschrieben, dass Anandamid den TRPV1-Rezeptor aktiviert, sowie inhibitorisch auf L-Typ Calcium-Kanäle wirkt (Zou und Kumar 2018).

Neben den Endocannabinoiden können auch die Exocannabinoide auf das ECS wirken. Die Exocannabinoide bilden eine große Gruppe von Cannabinoiden, die aus der Pflanze *Cannabis sativa* extrahiert wurden. Die wichtigsten Vertreter sind das (-)- $\Delta^9$ -trans-Tetrahydrocannabinol (THC) und das Cannabidiol (CBD). Beide Stoffe stellen potente Antioxidantien dar (Hampson et al. 2000). Neben den pflanzlichen Exocannabinoiden wurden eine Vielzahl von synthetischen Exocannabinoiden, die mit unterschiedlicher Affinität am CB1- oder CB2-Rezeptor oder beiden binden, entwickelt (Pertwee et al. 2010). Das THC wirkt als Partialantagonist am CB1- und CB2-Rezeptor. Über den CB1-Rezeptor vermittelt es eine breite psychotrope Wirkung, die über Stimmungsaufhellung, veränderter Wahrnehmung, appetitanregender Wirkung, antiemetischer Wirkung bis hin zu psychotischen Symptomen reichen kann (Pertwee 2004). Weiterhin ist THC ein allosterischer Modulator an  $\mu$ - und  $\delta$ -Opioidrezeptoren, was für eine potentiell analgetische Wirkung sorgt (Walker und Hohmann 2005).

CBD wirkt als Agonist mit schwacher Affinität für die CB1- und CB2-Rezeptoren, der ebenfalls schwach antagonistisch an diesen Rezeptoren wirken kann (Thomas et al. 2007). CBD wird eine breite Wirkung zugeschrieben, die sich über anti-inflammatorische, immunmodulatorische bis hin zu anti-psychotischen Effekten erstreckt. Im Gegensatz zum THC findet sich beim CBD kein halluzinogener Effekt (Pertwee 2004).



**Abbildung 2: CB1-Rezeptor modulierte Hauptsignalwege**

Der CB1-Rezeptor ist typischerweise an ein G<sub>i</sub>- bzw. G<sub>o</sub>-Protein gekoppelt und hemmt die Aktivität der Adenylatcyclase (AC), die die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert und folgend die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) bestimmt. Zudem kann der CB1-Rezeptor den Kalziumeinstrom über den spannungsgesteuerten Kalziumkanal (VGCC) unterdrücken. Mehrere Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs), sowie der Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3K) bzw. Proteinkinase B (Akt) -Pfad werden durch CB1-Rezeptor aktiviert. Abhängig vom Liganden und der subzellulären Umgebung kann das Ergebnis der CB1-Rezeptor-vermittelten Signalübertragung die Förderung des Zellüberlebens oder des Zelltods sein. (Abbildung erstellt nach Zou und Kumar (2018)).

### 1.3.2 Das Endocannabinoid-System in Alzheimer-Gehirnen

Die Analyse von menschlichen *post-mortem*-Proben aus Alzheimer-Gehirnen ergab, dass sich Veränderungen in der Zusammensetzung des ECS und der Signalübertragung bei der AD nachweisen lassen. Die Unterschiede am CB1-Rezeptor sind jedoch nicht eindeutig. Einige Autor\*innen beschreiben eine signifikant verringerte Expression der Rezeptoren im kortikalen Bereich und in Neuronen, die von senilen Plaques entfernt liegen (Ramírez et al. 2005; Solas et al. 2013). Andere Autor\*innen fanden keine Veränderung in der Expression oder Verteilung des CB1-Rezeptors im Cortex oder im Hippocampus von AD-Patient\*innen (Lee et al. 2010; Mulder et al. 2011; Ahmad et al. 2014). Weiterhin wurde keine Korrelation zwischen der CB1-Rezeptor-Expression und dem kognitiven Status der Patient\*innen beschrieben (Solas et al. 2013). Hingegen ist die CB2-Rezeptor Expression in Alzheimer-Gehirnen signifikant erhöht (Ramírez et al. 2005; Solas et al. 2013). Die Erhöhung geht

hauptsächlich auf die Rezeptoren der Mikroglia zurück, die sich um die senilen Plaques im Rahmen der Entzündungsreaktion sammeln (Solas et al. 2013). Interessanterweise korreliert die CB2-Rezeptor-Expression mit dem Niveau von  $A\beta_{42}$  und der Plaqueablagerung, hingegen nicht mit dem kognitiven Status von AD-Patient\*innen, was nahelegt, dass pathologische Ereignisse die CB2-Rezeptor-Expression induzieren (Solas et al. 2013).

Der Einfluss der AD auf die Endocannabinoide wurde ebenfalls untersucht. Im Blutplasma konnten keine Unterschiede bei den Konzentrationen von Anandamid und 2-AG beobachtet werden (Koppel et al. 2009). In einer weiteren Studie von Jung et al. (2012) wurden niedrigere Konzentrationen von Anandamid im frontalen und temporalen Cortex von Alzheimer-Gehirnen im Vergleich zu den Kontrollen beschrieben. Zusätzlich korrelierten die Anandamid-Konzentrationen invers mit der Konzentration von  $A\beta_{42}$ -Peptiden und mit den kognitiven Defiziten bei den Betroffenen. Dies weist auf eine negative Auswirkung der  $A\beta_{42}$  Peptide auf das Anandamid und einen Beitrag zu kognitiver Beeinträchtigung von AD-Patient\*innen hin (Jung et al. 2012).

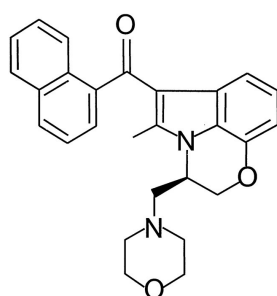
### 1.3.3 WIN und seine Wirkung

R-(+)-WIN 55,212-2 (WIN) ist ein synthetisches Cannabinoid, das mit hoher Affinität an den CB1- und CB2-Rezeptor bindet. Besonders die Rezeptoraffinität zum CB1-Rezeptor ist im Vergleich zum THC deutlich höher (Howlett et al. 2002). WIN gehört zu der Gruppe der Aminoalkylindole und unterscheidet sich in seiner chemischen Struktur deutlich vom THC (Abbildung 3). Da beide Substanzen auf dieselben Rezeptoren wirken, vermittelt WIN das volle Spektrum der THC-Wirkung (Howlett et al. 2002). Dazu gehören unter anderem psychoaktive und analgetische Effekte (Ebrahimzadeh und Haghparast 2011; Tai und Fantegrossi 2014). Zudem ist das Therapialter bei WIN von Bedeutung. Bei Ratten und Mäusen in der Adoleszenz-Phase wurden negative Effekte bei der Gabe von WIN in Bezug auf die Neurogenese, das Gedächtnis und das Angstverhalten festgestellt (Abboussi et al. 2014; Johnson et al. 2019).

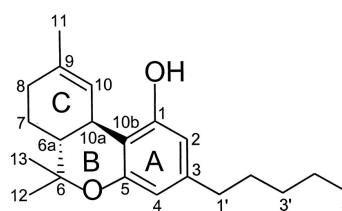
Tzavara et al. (2003) konnten zeigen, dass WIN *in vivo* in niedriger Dosierung (0,5 mg/kg, i. p.) eher stimulierende, und in hohen Dosierungen (5 mg/kg, i. p.) eher inhibitorische Effekte im Hippocampus zeigt. Die Wirkung war in beiden Dosierungen CB1-Rezeptor-vermittelt und verdeutlicht den Stellenwert der Dosierung in der Erforschung des Cannabinoids *in vivo* (Tzavara et al. 2003).

In Bezug auf den Morbus Alzheimer konnten verschiedene Arbeiten positive Effekte von WIN nachweisen. In kultivierten Astrozyten konnte WIN die toxischen Effekte von  $A\beta_{1-42}$  verringern und die Lebensfähigkeit der Zellen erhöhen (Aguirre-Rueda et al. 2015). Esposito et al. (2006) zeigten, dass eine WIN-Therapie die Hyperphosphorylierung von Tau in Zellkultur verhindern kann. Ramirez et al. (2005) konnten *in vitro* belegen, dass WIN eine durch  $A\beta$  induzierte Aktivierung der Mikroglia vermindert und die Neurotoxizität in der

Nervenzellkultur verringern kann. Auch *in vivo* konnten die Autor\*innen in einem pharmakologischen Rattenmodell für die AD beobachten, dass die Ratten geringere mikrogliale Aktivierungen und weniger kognitive Einschränkungen aufweisen (Ramírez et al. 2005). Martín-Moreno et al. (2011) beschrieben ebenfalls eine *in vitro* und *in vivo* Reduktion der mikroglialen Aktivierung durch WIN. Im Mausmodell konnte im Morris Water Maze nachgewiesen werden, dass eine Therapie mit WIN das Lerndefizit dieser Mäuse verminderte (Martín-Moreno et al. 2011). In beiden Arbeiten wurde der Effekt von WIN durch die Blockade der CB1- und CB2-Rezeptoren aufgehoben (Ramírez et al. 2005; Martín-Moreno et al. 2011). Martín-Moreno et al. (2012) konnten weiterhin einen positiven Effekt einer oralen Gabe von WIN auf die Neuroinflammation, die A $\beta$ -Konzentrationen und die kognitive Performance in transgenen APP-Mäusen nachweisen. Auf den Resultaten dieser Publikation basiert die in dieser Arbeit verwendete Dosierung von 0,2 mg/kg WIN, die im Vergleich als relativ niedrig konzentriert einzustufen ist.



R-(+)-WIN 55,212-2

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

### Abbildung 3: Strukturformeln von WIN und THC

Das synthetische Exocannabinoid WIN aus der Gruppe der Aminoalkylindole unterscheidet sich in seiner chemischen Struktur deutlich vom Exocannabinoid THC der Pflanze *Cannabis sativa*. (Abbildung modifiziert nach Howlett et al. 2002).

## 1.4 Mausmodelle der Alzheimer Erkrankung

Zur Untersuchung der komplexen pathophysiologischen Vorgänge des Morbus Alzheimer *in vivo*, sowie zur Erprobung neuer Therapiemöglichkeiten wurden in der Vergangenheit zahlreiche Mausmodelle entwickelt.

Ramirez et al. (2005) und Martín-Moreno et al. (2012) verwendeten bei den unter 1.3.3 genannten Arbeiten pharmakologische Mausmodelle, die auf mehrmaliger Injektion von fibrillärem A $\beta_{25-35}$  in die Hirnventrikel von WT-Mäusen bzw. Ratten beruhen. Diese Mausmodelle entwickeln zwar Hauptsymptome des Morbus Alzheimer, doch lagert sich das

A $\beta$  nicht kontinuierlich ab, sodass sie das Krankheitsgeschehen schlechter als die transgenen Mausmodelle nachbilden.

Weit über einhundert transgene (TG) Mausmodelle wurden für die Erforschung der Alzheimer-Krankheit entwickelt. Die meisten dieser Modelle beruhen auf Mutationen der familiären Form der Erkrankung (Jankowsky und Zheng 2017). Ein weit verbreitetes Tiermodell ist das transgene 5xFAD-Mausmodell (Oakley et al. 2006). Grundlage für das Modell sind fünf Mutationen in den Genen für APP und PSEN1 und PSEN2. Das 5xFAD-Mausmodell exprimiert durch die Mutationen A $\beta_{42}$  in hohen Mengen und entwickelt bereits im Alter von zwei Monaten aggressive extrazelluläre Amyloid-Plaques (Oakley et al. 2006). 5xFAD-Mäuse und die meisten weiteren transgenen Mausmodelle mit Mutationen im APP oder PSEN1 weisen mit Neurodegeneration, Nervenzellverlust und Hippocampus-abhängigen Lerndefiziten die Hauptpathologien des Morbus Alzheimer auf. Problematisch ist hingegen, dass die Modelle auf Mutationen der FAD beruhen, die im Gegensatz zur sporadischen Form nur einen kleinen Teil der Neuerkrankungen ausmacht. Weiterhin ist die Untersuchung von isolierten A $\beta$ -Varianten, wie z. B. dem A $\beta_{4-42}$  an diesem Modell nicht möglich.

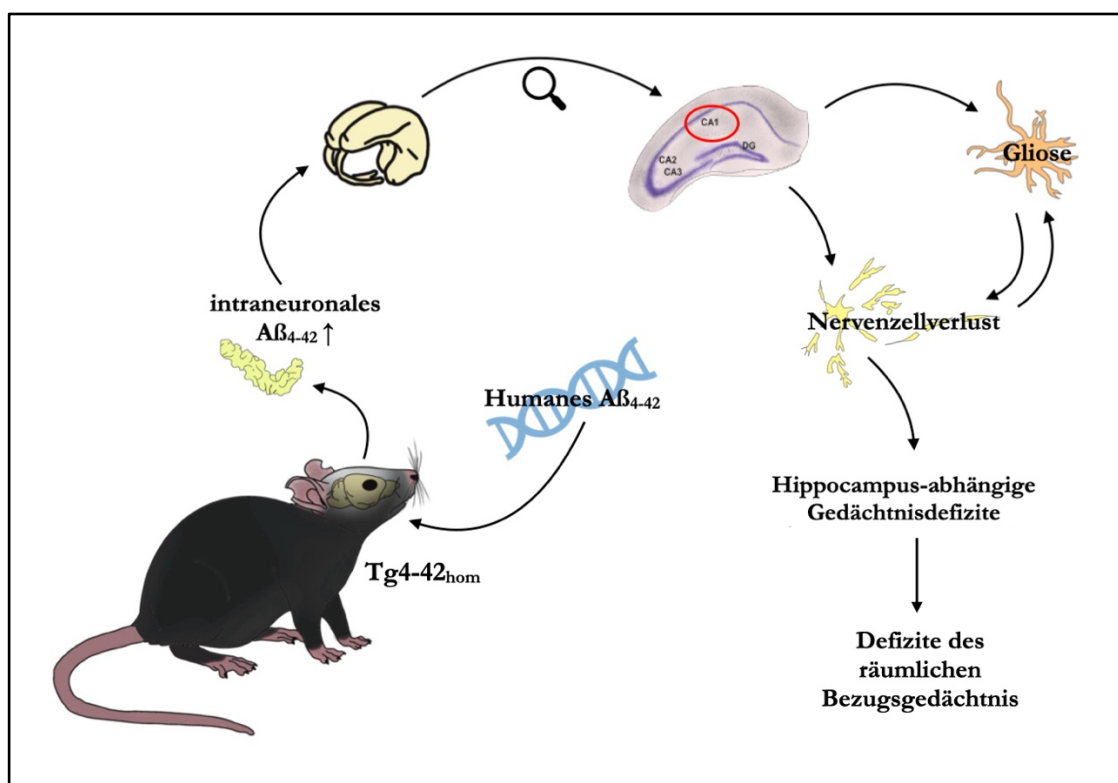
Um den Einfluss von A $\beta_{4-42}$  auf die Alzheimer Erkrankung besser studieren zu können entwickelten Bouter et al. (2013) das Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell (Abbildung 4). Hierbei wurde die genetische Sequenz für A $\beta_{4-42}$  an das murine *thyrotropin-releasing hormone* (TRH) gekoppelt, welches wiederum unter der Kontrolle des neuronalen *Thy1 promoter* steht. Somit kann das Prä-Pro-TRH-A $\beta_{4-42}$ -Fusionspeptid über das endoplasmatische Retikulum und nach weiterem Prozessieren im Golgi-System schlussendlich als frei lösliches A $\beta_{4-42}$  sezerniert werden (Bouter et al. 2013). Das A $\beta_{4-42}$  verteilt sich über den gesamten Cortex, bildet jedoch keine Plaques, sondern sammelt sich hauptsächlich intraneuronal an. Besonders in der CA1-Region des Hippocampus führt das A $\beta_{4-42}$  ab einem Alter von zwei Monaten zu Mikro- und Astrogliose. Ab einem Alter von drei Monaten zeigen Tg4-42<sub>hom</sub> reduzierte Neurogenese im Hippocampus, sowie synaptische Übererregbarkeit, einer typischen Veränderung bei der frühen AD (Dietrich et al. 2018; Gerberding et al. 2019).

Im Alter von vier Monaten findet sich in den homozygoten Tieren im Mittel ein Nervenzellverlust in der CA1-Region von 17%, im Alter von fünf Monaten im Mittel von 43% und im Alter von sechs Monaten im Mittel von 50% (Antonios et al. 2015). Der Nervenzellverlust korreliert in dem Mausmodell mit reduziertem neuronalen Glukosemetabolismus, der sich *in vivo* im Fluordesoxyglukose-PET darstellen lässt (Bouter et al. 2019).

Der Nervenzellverlust hat kognitive Verhaltensauffälligkeiten der Mäuse zur Folge, die sich im eingeschränkten räumlichen Bezugsgedächtnis und reduziertem Lernverhalten zeigen (Bouter et al. 2013; Hinteregger et al. 2021). Erste, leichte Einschränkungen des räumlichen Bezugsgedächtnis sind im Alter von fünf Monaten im Morris Water Maze zu beobachten, starke räumliche Gedächtnisdefizite treten im Morris Water Maze bereits ab dem sechsten

Lebensmonat auf und verschlechtern sich im weiteren Verlauf. Im Alter von drei Monaten hingegen konnten noch kein Gedächtnisdefizite im Morris Water Maze nachgewiesen werden (Antonios et al. 2015). Hinsichtlich der physischen Konstitution zeigen Tg4-42<sub>hom</sub> zudem ab einem Alter von drei Monaten signifikant reduziertes Körpergewicht im Vergleich mit WT-Kontrollen (Hinteregger et al. 2021). Durch die Ablagerung von A $\beta$ <sub>4-42</sub> in den motorischen Anteilen des ZNS, wie bspw. dem Rückenmark, sind die Tg4-42<sub>hom</sub> ab einem Alter von sieben Monaten motorisch und koordinativ stark eingeschränkt (Lopez-Noguerola et al. 2018; Wagner et al. 2019). Über eine Analyse der hippocampalen mikro-RNA-Expression konnte das Modell für die sporadische AD validiert werden. Weiterhin wurden verschiedene mikro-RNAs für die Defizite im Lernverhalten und den Nervenzellverlust in den Tg4-42-Mausmodell identifiziert (Bouter et al. 2020).

So entstand ein Mausmodell, das ohne die typischen Mutationen der FAD-Modelle auskommt, somit die sporadische Alzheimer Erkrankung besser nachbildet, und daher die Grundlage für weitere Verständnis- und Behandlungsstudien des Morbus Alzheimer bildet.



**Abbildung 4: Krankheitsverlauf des Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodells**

Durch Kopplung der genetischen Sequenz für A $\beta$ <sub>4-42</sub> an das murine *thyrotropin-releasing hormon* (TRH) exprimiert das Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell intraneuronales A $\beta$ <sub>4-42</sub>, das sich sukzessive über den kompletten Cortex ausbreitet. Besonders in der CA1-Region des Hippocampus sorgt das A $\beta$ <sub>4-42</sub> für eine Gliose und einen massiven Nervenzellverlust, die sich z. T. gegenseitig verstärken. Auf diesen folgen Hippocampus-abhängige Gedächtnisdefizite, die das räumliche Bezugsgedächtnis und das Angstverhalten beeinflussen. (Abbildung erstellt nach Bouter 2015; Bouter et al. 2018; Wagner et al. 2019).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Cannabinoide stellen durch das Endocannabinoidsystem einen wichtigen Ansatzpunkt in der Forschung zur AD-Therapie dar. Versuche eines Therapieansatzes mit WIN haben bereits vielversprechende Ergebnisse geliefert (Absatz 1.3.3), die jedoch bisher nicht hinreichend in einem transgenen Mausmodell für die sporadische Alzheimer Erkrankung untersucht wurden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkung einer langfristigen Therapie mit WIN auf das Angstverhalten, die Motorik, das räumliche Gedächtnis und das Lernverhalten von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen in Verhaltensversuchen zu beleuchten. Zudem werden die Mäuse auch immunhistologisch untersucht und die Auswirkungen der Therapie auf den Nervenzellverlust und die Neuroinflammation dargelegt. In dieser Arbeit sollen weiterhin zwei zeitlich verschiedene Therapieansätze, ein präventiver und ein therapeutischer Ansatz, miteinander verglichen werden. Hierfür wurde eine Gruppe der Mäuse im Alter von drei Monaten und die Vergleichsgruppe im Alter von fünf Monaten mit WIN therapiert. Zur Vergleichbarkeit wurden die Experimente alle zum selben Zeitpunkt im Alter von sechs Monaten durchgeführt und anschließend gegenübergestellt.

Im Detail wird folgenden Fragestellungen nachgegangen:

Wie wirkt sich eine Therapie mit WIN auf das Angstverhalten, das Lernverhalten und das räumliche Gedächtnis bei Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen aus?

Wie wirkt sich eine Therapie mit WIN auf den Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus und auf die Neurogenese bei Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen aus?

Wie wirkt sich eine Therapie mit WIN auf die Neuroinflammation und Gliose im Cortex von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen aus?

Wie wirkt sich eine Therapie mit WIN auf die CB1-Rezeptorexpression im Cortex von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen aus?

Bedingt eine präventive Therapie mit WIN Vorteile in den Bereichen Verhalten, Nervenzellverlust und Neuroinflammation in Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen im Vergleich mit einer therapeutischen WIN-Behandlung?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tierhaltung

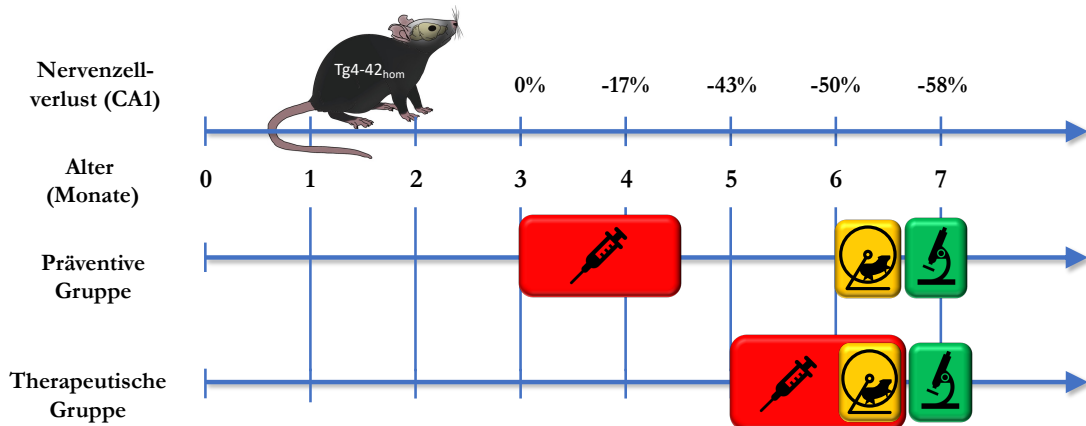
Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse gehörten der Gattung *Mus musculus* an. Die nicht genetisch veränderten Mäuse gehörten dem Inzuchtstamm C57BI/6J an (Jackson Laboratories, Bar Harbour, ME, USA). Alle Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in der Zentralen Tiereinrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen gezüchtet. Die Mäuse wurden in individuell belüfteten Käfigen (32 x 16 x 14 cm; Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland) in Gruppengröße zu maximal fünf Tieren in einem Tag/Nacht Rhythmus von je zwölf Stunden gehalten. Wasser und Nahrung standen *ad libitum* zur Verfügung. Fünf Tage vor den Verhaltenstests wurden die Tiere in das Labor der Abteilung für Molekulare Psychiatrie der Universitätsmedizin Göttingen transferiert und dort in einem ventilierten Käfigschrank (Tecniplast Group Italien & Charles River Laboratories, Frankreich) in einem umgekehrten Tag/Nacht Rhythmus gehalten. Damit wurde sichergestellt, dass sich die Mäuse während der Verhaltenstest in ihrer aktiven Tagesphase befanden. Alle Tiere wurden gemäß den Richtlinien der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) und der *Federation of European Laboratory Animal Science Association* (FELASA) behandelt. Darüber hinaus wurden alle Versuche vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) überprüft und genehmigt. Es wurden alle Anstrengungen unternommen, um das Leiden und die Anzahl der für diese Arbeit verwendeten Tiere zu minimieren. Für alle Tests wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet.

### 2.2 Medikamentöse Behandlung und Versuchsgruppen

Jeweils 1 mg R-(+)-WIN 55,212-2 Mesylatsalz (WIN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) wurden in gleichen Mengen (jeweils 2,5 ml) Ethanol (> 99,5%) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gelöst und anschließend mit 45 ml 0,9% Kochsalzlösung (NaCl) (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verdünnt. Eine Kontrolllösung wurde nach gleichem Verfahren ohne Zugabe von WIN hergestellt. Männliche und weibliche Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse und entsprechende C57BI/6J Wildtyp-Mäuse im Alter von drei (präventive Gruppe) bzw. fünf (therapeutische Gruppe) Monaten wurden täglich über 42 Tage mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg Körpergewicht (KG) der WIN- oder der Kontrolllösung behandelt (siehe Abbildung 5). Die verwendete Dosierung beruht auf den Ergebnissen der Publikation von Martin-Moreno et al. (2012), die dieselbe Dosis den Mäusen hingegen oral verabreichten. Die Applikation erfolgte intraperitoneal (i. p.) mit einem Injektionsvolumen von 10 ml/kg KG und jeden Tag um die



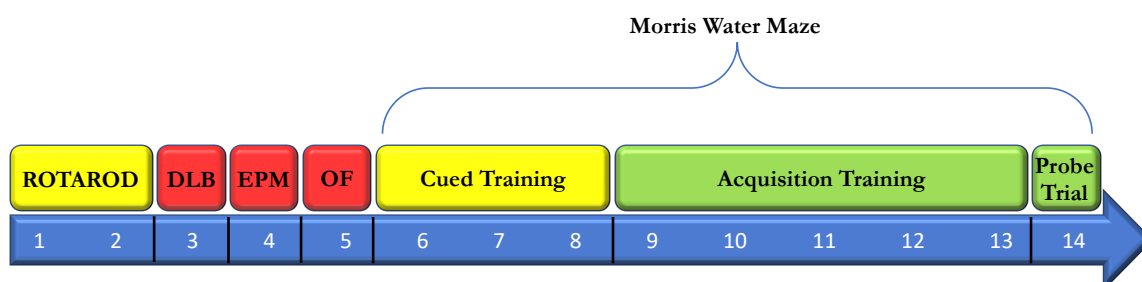
gleiche Tageszeit ( $\pm 2$  Stunden). Während der medikamentösen Behandlung wurden alle Mäuse wöchentlich gewogen und das Injektionsvolumen entsprechend angepasst.



**Abbildung 5: Therapieschema der Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse**

Die Therapie der Mäuse des präventiven Behandlungsansatzes wurden im Alter von drei Monaten gestartet, in dem die Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse noch keinen Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus aufweisen. Die Tg4-42<sub>hom</sub> des therapeutischen Ansatzes, deren Behandlung im Alter von fünf Monaten startete, hatten zu Beginn der Therapie bereits einen durchschnittlichen Nervenzellverlust von 43% in der CA1-Region des Hippocampus. Die Behandlung dauerte in beiden Gruppen 42 Tage und auch die Verhaltenstests wurden zum gleichen Zeitpunkt im Alter von sechs Monaten durchgeführt. In der therapeutischen Gruppe wurde die Behandlung bis zum Ende der Verhaltenstests fortgeführt. Im Alter von ca. sechseinhalb Monaten wurden die Mäuse entnommen und das Gewebe anschließend histologisch aufgearbeitet.

## 2.3 Verhaltensexperimente

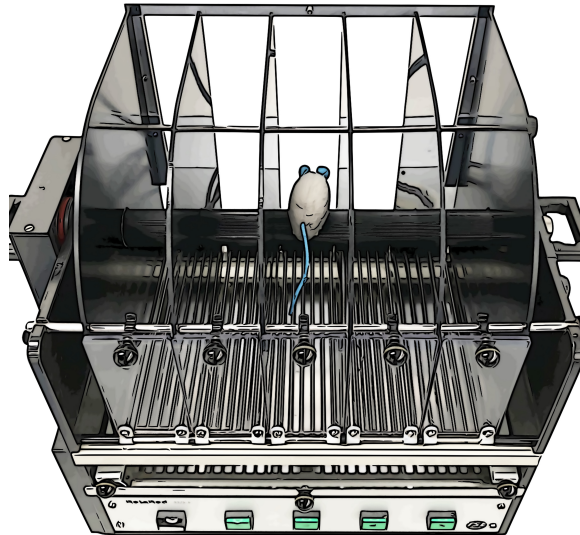


**Abbildung 6: Übersicht der Verhaltensexperimente**

Die Verhaltensexperimente mit den Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen wurden über 14 Tage durchgeführt. Zuerst wurde der Motoriktest (gelb) Rotarod über zwei Tage durchgeführt. Anschließend folgten die Angsttests (rot) Dark Light Box (DLB), Elevated Plus Maze (EPM) und das Open Field (OF). Zuletzt wurde das Morris Water Maze durchgeführt. Das dreitägige *Cued Training* untersucht ebenfalls die Motorik (gelb). Das fünftägige *Acquisition Training* und der eintägige *Probe Trial* testen das Gedächtnis (grün) der Versuchstiere.

### 2.3.1 Rotarod

Der Rotarod-Test (RotaRod 3375-5, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) wurde verwendet, um die Koordination und die motorischen Lernfähigkeiten der Mäuse zu testen (Shiotsuki et al. 2010). Die Mäuse wurden mit Kopf voran auf die Stange der Apparatur gesetzt (60 mm Stangenbreite pro Maus, fünf Mäuse nebeneinander), die sich auf einer Höhe von 14,7 cm befand (siehe Abbildung 7). Um die räumliche Wahrnehmung der Mäuse einzuschränken und sie auf den Versuch zu fokussieren, wurden die Tests unter Rotlicht durchgeführt (siehe Abbildung 7). Über eine Zeitperiode von fünf Minuten rotierte die Stange um ihre eigene Achse und beschleunigte dabei von 0 auf max. 40 Umdrehungen pro Minute. Alle Mäuse wurden insgesamt achtmal getestet, davon mit je vier Testdurchläufen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Zwischen den Durchläufen wurden durchschnittlich fünfzehn Minuten Pause gewährt. Bei jedem Durchlauf wurden die Zeit bis die Mäuse von der Stange fielen von Hand gemessen. Der Testaufbau wurde nach jedem Durchlauf mit Desomed<sup>®</sup> Rapid AF (Dr. Trippen GmbH, Freiburg, Deutschland) gereinigt, um Geruchsspuren zu minimieren.



**Abbildung 7: Versuchsaufbau des Rotarod**

### **2.3.2 Dark Light Box**

Die Dark Light Box (DLB) wurde verwendet, um den Einfluss der WIN-Therapie auf das Angstverhalten der Mäuse zu untersuchen. Der Test basiert auf dem angeborenen Konflikt der Mäuse zwischen ihrer Angst vor offenen, hell beleuchteten Bereichen und ihrem spontanen Explorationsverhalten gegenüber neuen Umgebungen (Bourin und Hascoët 2003). Ein vermehrtes Aufhalten der Maus im hellen Kompartiment des Aufbaus wurde hierbei als ein vermindertes Angstverhalten interpretiert (Ennaceur 2014).

Der Testaufbau bestand aus einer grauen Kunststoffbox (73 x 25 cm), die in ein kleineres dunkles Kompartiment mit einer schwarzen Abdeckung aus PVC (31 x 25 cm) und größeres, helles Kompartiment (42 x 25 cm) geteilt ist (siehe Abbildung 8). Die Teile wurden durch eine graue Wand mit einer Öffnung am Boden (5 x 5 cm) voneinander getrennt, die es den Mäusen erlaubte, frei zwischen den Kompartimenten zu wechseln. Die DLB wurde unter normaler Raumbeleuchtung durchgeführt. Die Mäuse wurden in das helle Kompartiment gesetzt und ihr Verhalten wurde für fünf Minuten mithilfe einer Kamera (Computar, Commack, USA) aufgezeichnet. Die ANY-Maze Video Tracking Software (Stoelting Co., Wood Dale, USA) wertete die Zeit der Maus in jedem Kompartiment und Anzahl der

Wechsel zwischen den Kompartimenten aus. Der Testaufbau wurde nach jedem Durchlauf mit Desomed® Rapid AF (Dr. Trippen GmbH, Freiburg, Deutschland) gereinigt, um Geruchsspuren zu minimieren.

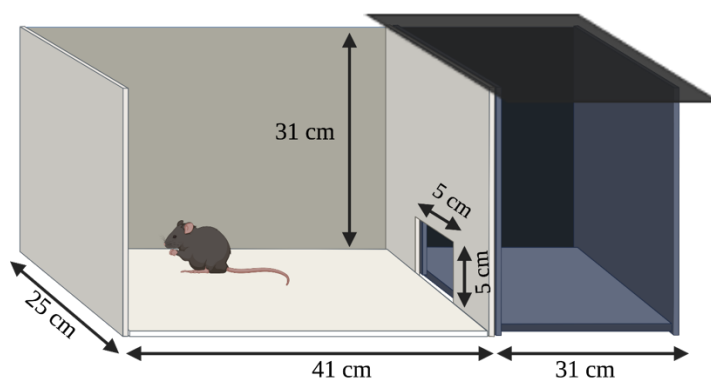


Abbildung 8: Versuchsaufbau der Dark Light Box

### 2.3.3 Elevated Plus Maze

Das Elevated Plus Maze (EPM) ist ein weit verbreiteter Test für Nagetiere, mit dem die Wirkung von pharmakologischen Wirkstoffen auf das Angstverhalten der Mäuse getestet und interpretiert werden kann (Walf und Frye 2007). Das Testprinzip basiert auf dem inneren Konflikt zwischen der natürlichen Aversion von Mäusen gegenüber offenen und erhöhten Räumen und dem natürlichen Drang neue Umgebungen zu erkunden. Insofern wurde ein Tier, das sich mehr in den offenen Armen aufgehalten hat, als weniger ängstlich interpretiert.

Der Aufbau bestand aus einem kreuzförmigen Labyrinth mit vier gleich langen Armen (15 x 5 cm), die alle von einer zentralen Fläche (5 x 5 cm) abgingen (siehe Abbildung 9). Zwei gegenüberliegende Arme sind durch 15 cm hohe, durchsichtige Wände aus Kunststoff an drei Enden „geschlossen“, jedoch zur zentralen Fläche geöffnet. Die anderen Arme haben keine Begrenzung und sind „offen“. Der Versuchsaufbau stand 75 cm über dem gepolsterten Boden erhöht. Die Mäuse wurden für fünf Minuten in die zentrale Fläche gesetzt, ihr Verhalten wurde mit der Kamera (Computar, Commack, USA) aufgezeichnet und mit der ANY-Maze Software (Stoelting Co., Wood Dale, USA) ausgewertet. Die zurückgelegte Strecke im Labyrinth und die prozentuale Zeit in den offenen Armen wurden analysiert. Damit die Mäuse die Höhe des Versuchsaufbaus nicht erfassen konnten, wurde das EPM unter Rotlicht durchgeführt (siehe Abbildung 9). Der Testaufbau wurde nach jedem

Durchlauf mit Desomed<sup>®</sup> Rapid AF (Dr. Trippen GmbH, Freiburg, Deutschland) gereinigt, um Geruchsspuren zu minimieren.

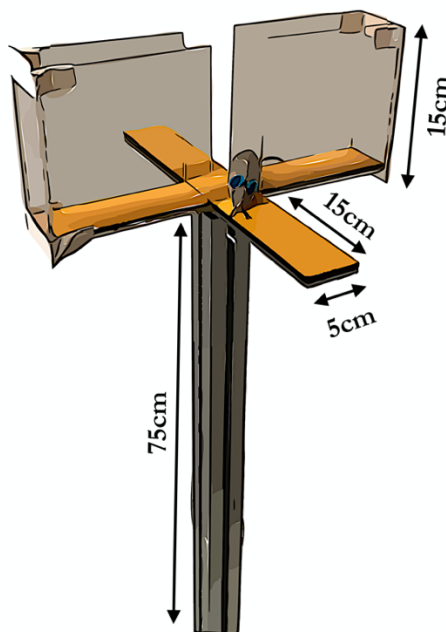


Abbildung 9: Versuchsaufbau des Elevated Plus Maze

#### 2.3.4 Open Field

Das Open Field (OF) ist ein weiterer Test, um das Angstverhalten und die Bewegungsaktivität von Versuchstieren zu erfassen. Wie beim DLB und EPM basiert der Test auf dem inneren Konflikt der Mäuse zwischen der Aversion gegenüber offenen, exponierten Flächen und dem natürlichen Drang, neue Umgebungen zu erkunden. Eine gesunde WT-Maus im gleichen Alter der Testtiere würde sich natürlicherweise vermehrt am Rand, in der „Peripherie“, des Versuchsaufbaus aufhalten, während eine Maus, die sich mehr in Zentrum aufhielt, als reduziert ängstlich angesehen wurde (Denenberg 1969).

Der Versuchsaufbau des OF besteht aus einer quadratischen grauen Kunststoffbox (50 x 50 cm) mit 38 cm hohen Wänden an jeder Seite (siehe Abbildung 10). Jeder Maus durfte die Box für fünf Minuten frei erkunden. Das Verhalten der Mäuse wurde mit der Kamera

(Comptar, Commack, USA) aufgezeichnet und mit der ANY-Maze Software (Stoelting Co., Wood Dale, USA) ausgewertet. In die Box wurde virtuell eine 20 x 20 cm große Fläche als „Zentrum“ definiert. Die umgebende Fläche wurde als „Peripherie“ bezeichnet (siehe Abbildung 10). Analysiert wurden die zurückgelegte Distanz der Maus sowie die prozentuale Aufenthaltsdauer im Zentrum. Der Testaufbau wurde nach jedem Durchlauf mit Desomed® Rapid AF (Dr. Trippen GmbH, Freiburg, Deutschland) gereinigt, um Geruchsspuren zu minimieren.

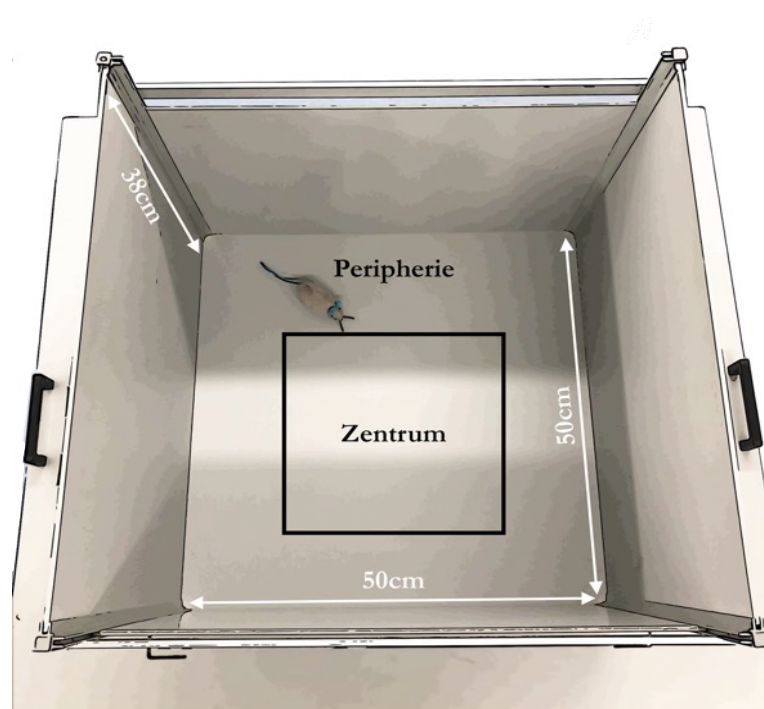


Abbildung 10: Versuchsaufbau des Open Field

### 2.3.5 Morris Water Maze

Mithilfe des Morris Water Maze-Tests wurden das räumliche Bezugsgedächtnis und das Lernverhalten der Mäuse untersucht (Morris 1984). Der Test basiert auf der natürlichen Aversion von Mäusen gegenüber Wasser und dem Antrieb, sich trotz guter Schwimffähigkeiten möglichst schnell aus dem Labyrinth zu befreien.

Im Versuchsaufbau sollten die Mäuse lernen, in einem Wasserbecken mit einem Durchmesser von 110 cm unter Zuhilfenahme von visuellen räumlichen Hinweisen eine unter der Wasseroberfläche verborgene, runde Plattform mit 10 cm Durchmesser zu lokalisieren. Das Becken war mit gewöhnlichem Leitungswasser gefüllt, das mit gesundheitlich unbedenklicher weißer Acrylfarbe (Lukas-Nerchau GmbH, Düsseldorf,

Deutschland) undurchsichtig eingefärbt wurde. Die Wassertemperatur betrug konstant 20°C. Das Becken wurde virtuell in vier Quadranten geteilt, wobei der Quadrant mit der Plattform als Zielquadrant definiert und alle weiteren Quadranten in Beziehung dazu als linker, rechter und gegenüberliegender Quadrant bezeichnet wurden. Die Mäuse wurden, einem standardisierten Protokoll folgend, an bestimmten Startpunkten am Rand ins Wasser gesetzt und ihre Bewegungen per Kamera (Computar, Commack, USA) mit der Any-Maze Software (Stoelting Co., Wood Dale, USA) aufgezeichnet und die Schwimmgeschwindigkeit sowie die Zeit bis zum Auffinden der Plattform ausgewertet. Zwischen den Durchgängen betrug die Pause ca. 15 Minuten, in der die Mäuse mit einer Wärmelampe vor Unterkühlung geschützt wurden.

Die Versuchsprotokolle sind an die von Vorhees und Williams (2006) publizierten angelehnt und in Tabelle 2 dargestellt. Das Water Maze Protokoll begann mit dem dreitägigen *Cued Training* mit vier Durchgängen pro Tag. Die Plattform wurde mit einer sichtbaren Fahne markiert, sodass die Mäuse lernen mussten, dass die Plattform den Ausweg aus dem Labyrinth darstellt. Die Tiere erhielten 60 Sekunden Zeit, um die Plattform zu finden und wurden zur Orientierung 10 Sekunden auf ihr belassen, bevor sie in den Käfig zurückgesetzt wurden. Fand eine Maus die Plattform innerhalb der vorgegebenen Zeit nicht, so wurde sie manuell auf die Plattform gesetzt. Der Startpunkt und die Plattformposition wurden bei jedem Durchgang geändert (siehe Tabelle 1).

Das fünftägige *Acquisition Training* schloss sich direkt an das *Cued Training* an. Hierbei wurde das räumliche Lernen der Mäuse getestet, wobei die Fahne von der Plattform entfernt und zusätzlich zu den bereits im Raum befindlichen distalen Hinweisen, proximale Hinweise am Beckenrand an den Nord-, Süd-, Ost- und Westpolen angebracht wurden. Diese unterschieden sich in Form und Farbe und bleiben während der restlichen Testtage an dieser Position (siehe Abbildung 11). Die Lokalisation der Plattform an der NW Position blieb während fünf Testtage konstant, der Startpunkt variierte jedoch bei jedem der vier Durchgänge pro Tag (siehe Tabelle 1). Ansonsten wurden die Mäuse wie beim *Cued Training* behandelt.

Abschließend wurde der *Probe Trial* am folgenden Tag durchgeführt. Die Plattform wurde hierbei aus dem Becken entfernt und die Mäuse schwammen 60 Sekunden lang, wobei die Bewegung durch den Pool aufgezeichnet und die prozentuale Aufenthaltsdauer in jedem Quadranten bestimmt wurde (siehe Abbildung 11). Bei intaktem räumlichen Bezugsgedächtnis sollten die Mäuse eine klare Präferenz für den Zielquadranten zeigen (D'Hooge und De Deyn 2001; Vorhees und Williams 2006).

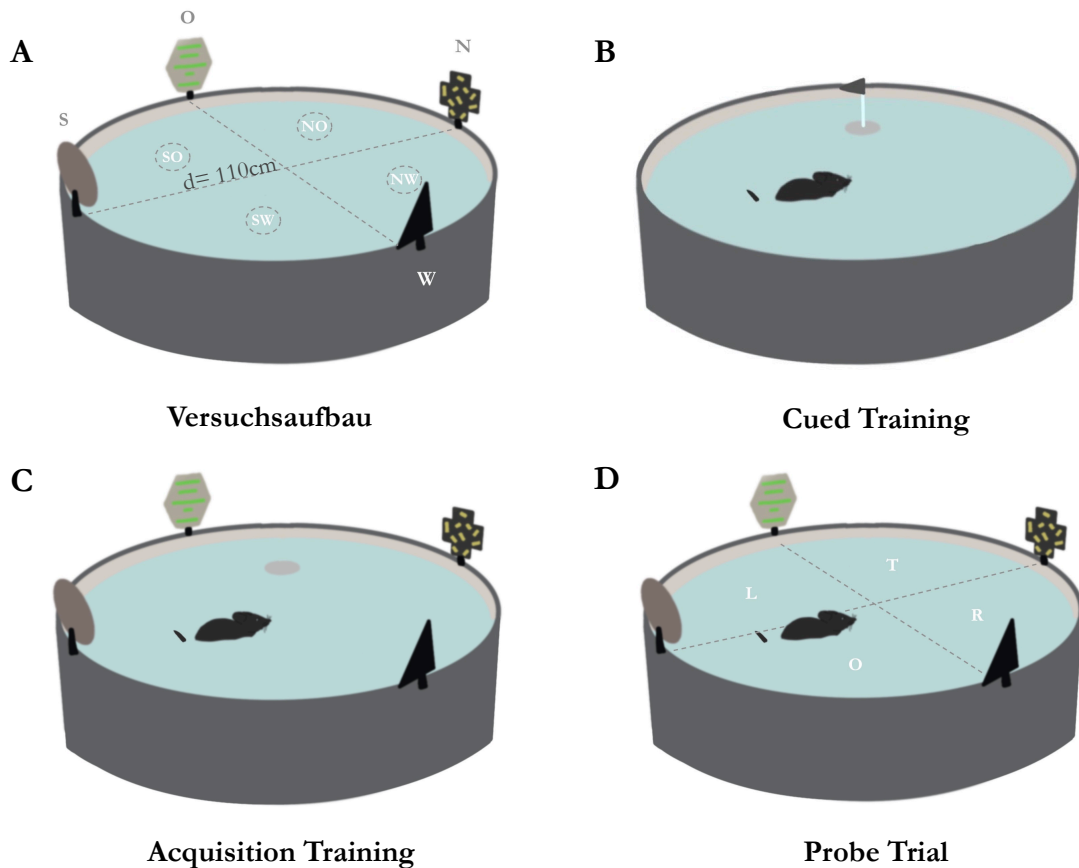


Abbildung 11: Versuchsaufbau des Morris Water Maze

(A) Der Pool ist virtuell in vier Quadranten geteilt. Die Position der Plattform variiert an vier Positionen innerhalb der Quadranten. Räumliche Hinweise werden an den Polen des Beckens angebracht. (B) Im dreitägigen *Cued Training* wird die Zielplattform mit einer Fahne markiert. (C) Im fünftägigen *Acquisition Training* ist die Fahne entfernt und Orientierungshinweise sind an den Polen des Beckens angebracht. Die Position der Plattform wird gemäß eines standardisierten Schemas regelmäßig variiert. (D) Im *Probe Trail* ist die Plattform entfernt und das Schwimmverhalten der Mäuse wird eine Minute lang beobachtet. N = Norden, O = Osten, S = Süden, W = Westen, NO = Nordosten, NW = Nordwesten, SO = Südosten, SW = Südwesten T = *target quadrant* (Zielquadrant), L = linker Quadrant, R = rechter Quadrant, O = *opposite quadrant* (gegenüberliegender Quadrant).

Tabelle 1: Start- und Zielpositionen für das Morris Water Maze

<i>Cued Training</i>	Durchgang 1		Durchgang 2		Durchgang 3		Durchgang 4	
Test Tag	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel
1	N	SO	O	NO	S	SW	W	SO
2	S	NO	N	NW	W	NO	N	SO
3	W	SW	S	SO	O	SW	O	SW



<i>Acquisition Training</i>	Durchgang 1		Durchgang 2		Durchgang 3		Durchgang 4	
Test Tag	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel
1	N	SW	O	SW	SO	SW	NW	SW
2	SO	SW	N	SW	NW	SW	O	SW
3	NO	SW	SO	SW	O	SW	N	SW
4	O	SW	NW	SW	N	SW	SO	SW
5	N	SW	SO	SW	O	SW	NW	SW

<i>Probe Trial</i>	Durchgang 1	
Test Tag	Start	Ziel
1	NO	entfernt

(N = Norden, O = Osten, S = Süden, W = Westen, NO = Nordosten, NW = Nordwesten, SO = Südosten, SW = Südwesten)

## 2.4 Gewebegewinnung und Fixierung

Zur Gewebegewinnung wurde den Mäusen zunächst gewichtsadaptiert ca. 200 – 300 µl eines Anästhetikums intraperitoneal von ausgebildeten Mitarbeitern mit entsprechender Genehmigung unter Verwendung einer Omican® Insulinspritze (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gespritzt. Das Anästhetikum bestand aus 10% Xylazin (Xylarium, Pharma-Partner GmbH, Hamburg, Deutschland), 20% Ketamin (MEDISTAR®, Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg, Deutschland) und 70% H<sub>2</sub>O (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) Nachdem die Maus keinerlei Schmerzreflexe mehr zeigte folgte die Fixierung mit vier Nadeln auf dem Rücken liegend auf einer Perfusionsplatte. Die Perfusionspumpe Ismatec ISM861 (I dex, Lake Forest, IL, USA) wurde mit einer Sterican® Einmalkanüle (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) versehen, und der Schlauch anschließend mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) entlüftet. Danach wurde der Thorax der Maus mithilfe einer chirurgischen Schere eröffnet und die Spitze der Einmalkanüle in den linken Ventrikel des schlagenden Herzens eingebracht. Dann wurde der rechte Vorhof des Herzens inzidiert, um das Ausbluten der Maus zu gewährleisten. Unter Zuhilfenahme der Pumpe folgte die Perfusion der Maus, wobei ihr Blut durch das PBS aus dem Gefäßsystem verdrängt wurde. Als Zeichen einer erfolgreichen Perfusion galt die Entfärbung der Leber. Im Folgenden wurde die nun tote Maus mit einer chirurgischen Schere dekapitiert und der Schädel entlang der Pfeilnaht (*Sutura sagittalis*) eröffnet. Das

Gehirn wurde mit einem Spatel vorsichtig entnommen, und die Hemisphären mit einem Einmalskalpell (Daigger Scientific Inc, Vernon Hills, IL, USA) getrennt.

Die linke Hemisphäre wurde in ein Falcon-Röhrchen mit 4%- Paraformaldehyd (PFA, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in 0,01 M PBS-Lösung fixiert und sieben Tage bei 4°C gelagert. Das PFA wurde bei 70°C unter Verwendung weniger Tropfen 10 M Natronlauge (NaOH, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gelöst und danach auf pH 7 adjustiert. Anschließend wurden die Hemisphären in Falcons mit 30%- D-(+)-Saccharose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gelöst, in 0,01 M PBS umgefüllt und bei 4°C gelagert, bis das Gewebe an den Boden gesunken war. Danach wurden die Hirnhälften bei -80°C eingefroren. Die rechte Hemisphäre wurde entweder gefroren bei -80°C für weitere Experimente gelagert oder in eine Rotilabo<sup>®</sup>-Einbettkassette (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gelegt und für mindestens eine Woche in einer 4%- Roti<sup>®</sup>-Histofix phosphatgepufferten Formaldehydlösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gelagert. Diese Proben wurden am Microtom weiterverarbeitet (siehe Absatz 2.4.1.2).

## 2.4.1 Anfertigen der Hirnschnitte

### 2.4.1.1 Schneiden am Kryotom

Die linken Großhirnhemisphären wurden im weiteren Verlauf am Kryotom CM 1850 UV (Leica, Wetzlar, Deutschland) bei -27°C mit Tissue-Tek O.C.T. Compound Einbettmatrix (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) ummantelt und in koronarer Ebene in Schnitte von 30 µm Dicke geteilt. Zum Schneiden wurden Microtome Blades C35 (Feather, Osaka, Japan) verwendet. Jeder zehnte Schnitt wurde in einem Gläschen gesammelt und bei -80°C gelagert. Je eines dieser Gläschen wurden für die Kresylviolett-Färbung (siehe Absatz 2.5.1) und für die *freefloating* DAB-Färbung (siehe Absatz 2.5.3.1) benutzt.

### 2.4.1.2 Schneiden am Microtom

Eine Woche nach der Fixierung in der Roti<sup>®</sup>-Histofix-Lösung konnten die Hemisphären in den Einbettkassetten mithilfe des Gewebefiltrationsautomaten Leica TP1020 (Leica, Wetzlar, Deutschland) dehydriert und unter Verwendung folgenden Protokolls prozessiert werden: 5 min in 4% Histofix; 30 min in Leitungswasser; 1 h in 50%, 60%, 70%, 80% und 90% Ethanol-Lösung (EtOH), 2 x 1 h in 100% Ethanol; 1 h. in Xylol (Isomer, ≥ 98%, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 2 x 1 h in geschmolzenem Paraffin (Roti<sup>®</sup>-Plast, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Anschließend wurden die Proben unter Verwendung der Einbettstation Leica EG 1140 (Leica, Wetzlar, Deutschland) in Paraffinblöcke eingebettet. Am Microm<sup>™</sup> HM 335 E Mikrotom (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA) wurden Schnitte der Hemisphären in sagittaler Ebene mit 4 µm Dicke hergestellt. In einem *aqua bidest* (ddH<sub>2</sub>O)-Wasserbad konnten die Schnitte bei Raumtemperatur auf Superfrost<sup>®</sup>-Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gezogen werden. Anschließend folgte die Entfernung von Falten aus dem Gewebe mit einem 52°C warmen Paraffinstreckbad (Medax, Olching, Deutschland). Die Proben wurden erst für 10 min auf der 52°C warmen Platte des Paraffinstreckbades und anschließend bei 37°C über Nacht getrocknet.

## 2.5 Immunhistochemie und Histologie

### 2.5.1 Färbung mit Kresylviolett

Die am Kryotom angefertigten Schnitte (siehe Absatz 2.4.1.1) wurden auf Objektträger gezogen und mit Kresylviolettacetat (Fulka Chemie AG, Buchs, Schweiz) gefärbt, um die Nervenzellen für die stereologische Analyse (siehe Absatz 2.5.2) sichtbar zu machen. Die für die Entfettung (Delipidierung) und Färbung der Schnitte verwendeten Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

**Arbeitslösung (1):** 13,61 g Natriumacetat-Trihydrat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurden in 100 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst. Von dieser Lösung wurden 40 ml mit 9,6 ml 100%- Essigsäure (AppliCem GmbH, Darmstadt, Deutschland) gemischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt.

**Färbelösung (2):** 0,1 g Kresylviolett-Acetat wurde in 1 l der Arbeitslösung 1 über Nacht verrührt und mit Alufolie vor Licht geschützt. Unmittelbar vor ihrem Gebrauch wurde die Färbelösung mit einem Faltenfilter 595 ½ (Th. Geyer, Höxter, Deutschland) gefiltert.

**Arbeitslösung (3):** 2 ml Triton X-100 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurden eine Stunde mit 9,8 ml ddH<sub>2</sub>O verrührt. 2,5 ml dieser Lösung wurden anschließend mit 50 ml ddH<sub>2</sub>O und 150 ml 100%- Ethanol gemischt.

Für die Delipidierung wurden die Schnitte nach folgendem Prinzip behandelt: 2 x 10 min in der Arbeitslösung 1, gefolgt von 1 x 20 min in der Arbeitslösung 2 und erneut 2 x 10 min in der Arbeitslösung 1. Anschließend wurden die Präparate 2 x 8 min in der Färbelösung 2 unter Lichtschutz durch eine Abdeckung gefärbt.

Für die darauffolgende Dehydratation wurden die Schnitte dreimal 1 min in der Arbeitslösung 1 gewaschen und mit einer Reihe aus 100%- Ethanol (3 min), 2-Propanol (10 min) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und Xylol (Isomere 98%, 2 x 5 min) dehydriert. Die fertig gefärbten Präparate wurden abschließend mit einem Tropfen Roti<sup>®</sup>-Histokitt (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet und mit Mikroskopdeckgläschen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bedeckt. Nachdem die Proben über Nacht unterm Abzug ausgehärtet waren, konnten sie für die Stereologie verwendet werden.

## 2.5.2 Stereologie

Mittels Stereologie wurde die Auswirkung der WIN-Therapie auf die Neuronenzahl und das Volumen in der CA1-Region des Hippocampus der Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse untersucht (West et al. 1991). Die vorher mit Kresylviolett gefärbten Schnitte (siehe Absatz 2.5.1) wurden mit einem BX51-Mikroskop mit motorisiertem Objektisch (Olympus Corporation, Tokio, Japan) und der Software Stereo Investigator 7 (MicroBrightField, Williston, USA) nach dem Prinzip der design-basierten Stereologie ausgezählt (Schmitz und Hof 2005). Die Schnitte der Bregmata -1,22 mm bis -3,80 mm wurden hierbei berücksichtigt und verblindet gezählt. Nach der Optical-Dissector-Methode wurden Zählrahmen von 14 x 14 µm Kantenlänge mithilfe eines zufällig über die Region gelegten Gitternetzes der Maschenweite 49 x 105 µm verteilt. Die CA1-Region wurde in vierfacher Vergrößerung umrandet und anschließend mit einer hundertfachen Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) ausgewertet. Hierbei wurden nur jene Neurone gezählt, die sich komplett oder nur zum Teil innerhalb des Zählrahmens befanden und deren linke untere Umrandung nicht überragten (siehe Abbildung 12). Für jeden Zählrahmen wurde die Dicke des Schnittes gemessen. Die *optical dissector height* wurde auf 5 µm, die *top guard zone* auf 2 µm eingestellt. Schließlich wurde die Gesamtzahl der Neurone nach den in Tabelle 2 aufgeführten Formeln der *optical fractionator* Methode annäherungsweise bestimmt (West et al. 1991).

Hierbei war die *area sampling fraction* (asf) 26,25 und ergab sich als Quotient der Fläche einer Masche des Gitternetzes in µm<sup>2</sup> zur Fläche eines Zählrahmens in µm<sup>2</sup> (siehe Tabelle 3). Die *section sampling fraction* (ssf) war 10, da jeder zehnte Schnitt einer Großhirnhemisphäre analysiert wurde. Die *thickness sampling fraction* (tsf) errechnete sich als Quotient der jeweiligen Schnittstärken in µm und der *optical dissector height* in µm (Schmitz und Hof 2005).

Die Berechnung des Volumens der hippocampalen CA1-Region erfolgte nach dem Cavalieri-Prinzip (Rosen und Harry 1990).

**Tabelle 2: Formeln zur Berechnung der Gesamtneuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus**

<b>Schritt 1</b>	Berechnung des Zwischenwertes P	$P = asf * ssf * tsf$
<b>Schritt 2</b>	Berechnung der Neuronenzahl eines einzelnen Schnittes $N_{\text{Schnitt}}$	$N_{\text{Schnitt}} = P * tmc$
<b>Schritt 3</b>	Berechnung der Gesamtneuronenzahl $N_{\text{gesamt}}$	$N_{\text{gesamt}} = \sum_{x=1}^n N_{\text{Schnitt } X}$

Tabelle 3: Berechnung der Faktoren von P

Abkürzung	Erklärung	Berechnung
<b>asf</b> ( <i>area sampling fraction</i> )	$\frac{\text{Fläche Gitternetzmasche } [\mu\text{m}^2]}{\text{Fläche Zählrahmen } [\mu\text{m}^2]}$	$\frac{49 \mu\text{m} \times 105 \mu\text{m}}{14 \mu\text{m} \times 14 \mu\text{m}} = 26,25$
<b>ssf</b> ( <i>section sampling fraction</i> )	jeder wievielte Schnitt wird gezählt	10
<b>tsf</b> ( <i>thickness sampling fraction</i> )	$\frac{\text{jeweilige Schichtdicke } [\mu\text{m}]}{\text{optical dissector height}}$	$\frac{\text{Schichtdicke } [\mu\text{m}]}{5 \mu\text{m}}$
<b>tmc</b> ( <i>total markers counted</i> )	Neuronenzahl	im Stereo Investigator ermittelt

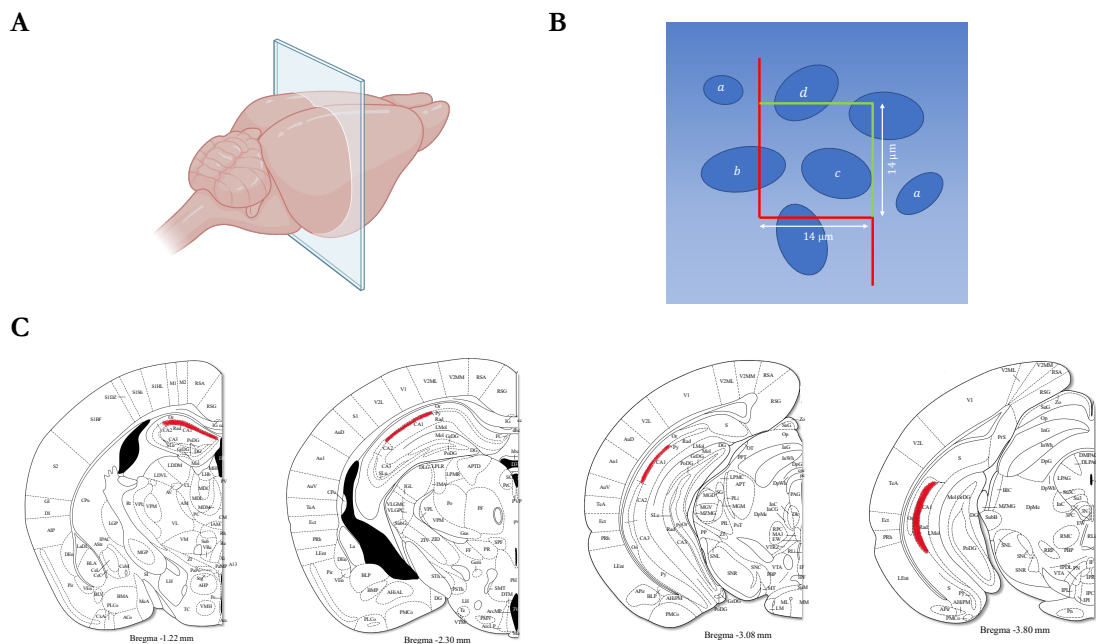


Abbildung 12: Ablauf der design-basierten Stereologie in der CA1-Region des Hippocampus

(A) Am Kryotom wurde die linke Cortex-Hemisphäre in koronarer Ebene in Schnitte von 30 µm Dicke geteilt, von denen jeder 10. Schnitt für die Stereologie verwendet und mit Kresylviolett gefärbt wurde. (B) Am Mikroskop wurden Zellen, die außerhalb des Zählrahmens lagen und solche, die die rote Linie berührten, bei der Stereologie nicht gezählt (a,b). Gezählt wurden Zellen innerhalb des Zählrahmens oder mit Kontakt zur einer der grünen Linien (c,d). Die Position des Zählrahmens wurde zufällig von der Software ausgewählt. (C) Ausgewertet wurde die CA1-Region des Hippocampus in den Bregmata -1,22 mm bis -3,80 mm. Exemplarisch sind die CA1-Zellbänder in den Bregmata -1,22 mm, -2,30 mm, -3,08 mm und -3,80 mm rot dargestellt (Atlasdarstellungen adaptiert von Franklin und Paxinos, 2012).

### 2.5.3 3,3' Diaminobenzidine (DAB)- Färbung

#### 2.5.3.1 *freefloating* DAB-Färbung

Um den Einfluss der WIN-Therapie auf die Neurogenese im *Gyrus dentatus* des Hippocampus zu quantifizieren, wurden die 30 µm Schnitte (siehe Absatz 2.4.1.1) nach dem „*freefloating*“ DAB-Protokoll mit einem Antikörper gegen das Protein Doublecortin (DCX) gefärbt.

Zunächst wurden die tiefgefrorenen Schnitte im Gläschen mit 0,01 M PBS aufgetaut und vom Einbettmedium befreit. Anschließend wurden sie in Cellstar® TC-Platten mit zwölf Kammern (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) mit passenden Einsätzen (Corning Netwells Inersets, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 10 min in 0,01 M PBS hydratisiert. Mit einer 0,01 M PBS-Lösung mit 10% Wasserstoffperoxid-Reagenz (30%, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurden die zelleigenen Peroxidasen blockiert. Die anschließende Permeabilisierung der Zellmembranen erfolgte mit dreimaligem Waschen der Proben für je 10 min in 0,01 M PBS mit 0,1% Triton X-100 mit folgendem kurzen Waschen in 0,01 M PBS. Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden nun für 1 h mit einer 0,01 M PBS-Lösung mit 10% *fetal calf serum* (FCS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) - und 4% fettarmen Trockenmilchpulver-Anteil (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) blockiert. Der Primärantikörper Anti-Doublecortin *polyclonal rabbit* (Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland) wurde mit 0,01 M PBS und 10% FCS auf 1:4000 verdünnt und die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur (RT) mit 2 ml der Antikörper-Lösung inkubiert.

Am zweiten Tag der Färbung wurden die Schnitte 3 x 10 min lang in 0,01 M PBS mit 0,1% Triton X-100 und anschließend kurz in 0,01 M PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Schnitte 2 h bei RT mit dem biotinylierten Sekundärantikörper *Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG* (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde mit einer 0,01 M PBS-Lösung mit 10% FCS, auf die eine Konzentration von 1:250 verdünnt. Es folgten 3 x 10 min Waschgänge mit 0,01 M PBS.

Eine Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Lösung wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers unter Verwendung des VECTASTAIN® Elite ABC-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) wie folgt hergestellt. Die Reagenzien A und B wurden zu einer 0,01 M PBS-Lösung mit 10% FCS in einer Verdünnung von 1:300 gegeben. Die ABC-Lösung wurde 30 min vor der Verwendung hergestellt. Die Schnitte wurden anschließend für 90 min mit der ABC-Lösung bei RT inkubiert. Vor der Färbung erfolgten 3 x 10 min Waschschriffe in 0,01 M PBS. Die DAB-Färbelösung wurde mit Hilfe des DAB-Peroxidase Substrat Kits SK-4100 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) nach Herstellervorgaben angefertigt und 2 min mit den Schnitten inkubiert. Dann erfolgten 3 x 10 min Waschgänge in 0,01 M PBS, bevor die Schnitte auf Superfrost®-Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet wurden.

Am dritten Tag folgte nach 10-minütiger Hydratisierung in 0,01 M PBS die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 40 Sekunden. Die Schnitte wurden anschließend in ddH<sub>2</sub>O getaucht und 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Präparate unter Verwendung der folgenden Inkubationen dehydriert: 1 min in 70% EtOH; 5 min in 95% EtOH; 10 min in 100% EtOH und 2 x 5 min in Xylol. Die gefärbten Objektträger wurden mit zwei Tropfen Eindeckmedium (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bedeckt, bevor jedem Objektträger ein Deckglas hinzugefügt wurde. Über Nacht härtete das Einbettmedium unter dem Abzug aus.

Am BX51-Mikroskop wurde der *Gyrus dentatus* der Hirnschnitte in den Bregmata -1,10 mm bis -3,80 mm mithilfe des Stereo Investigator 7<sup>®</sup> (MicroBrightfield, Williston, USA) erfasst. Anschließend wurden die DCX-positiven Neurone unter 100-facher Vergrößerung ausgezählt.

#### 2.5.3.2 DAB-Färbung von Paraffinschnitten

Um den Einfluss der WIN-Therapie auf die neuronale Entzündung und die CB1-Rezeptor Expression in den Mäusen zu untersuchen wurden die mit dem Microtom angefertigten 4 µm dicken Paraffinschnitte (siehe Absatz 2.4.1.2) mit Antikörpern gegen saures Gliafaserprotein (GFAP), *Ionized calcium-binding adaptor molecule 1* (IBA-1) und gegen den CB1-Rezeptor mit dem DAB-Protokoll gefärbt.

Zuerst wurden die Schnitte entparaffiniert und unter Verwendung folgenden Protokolls rehydratisiert: 2 x 5 min in Xylol, 10 min in 100% EtOH, 5 min in 95% EtOH, 5 min in 70% EtOH und 1 min in ddH<sub>2</sub>O. Um endogene Peroxidasen zu blockieren, wurden die Schnitte 30 min in einer Lösung mit 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,01 M PBS inkubiert. Die Antigendemaskierung wurde durch Erhitzen der Schnitte in 0,01 M Citratpuffer (pH 6,0) für 10 min (800 W bis zum Sieden, gefolgt von 8 min Erhitzen mit 80 W) erreicht. Nachdem die Schnitte abgekühlt waren, wurden sie 1 min in ddH<sub>2</sub>O getaucht und 15 min in 0,1% Triton in 0,01 M PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Schnitte 1 min in 0,01 M PBS gewaschen. Um intrazelluläre Antigene zu demaskieren, folgte die Inkubation der Objektträger in 88% Ameisensäure für 3 min (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Zwei Waschschritte mit 0,01 M PBS über 5 min erfolgten, um die Ameisensäurereste zu entfernen. Die Schnitte wurden mit einem Lipidstift (Pap Pen; Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland) eingekreist und 1 h bei RT mit einer Lösung von 10% FCS und 4% fettarmen Trockenmilchpulver in 0,01 M PBS zur Blockierung unspezifischer Antigene inkubiert. Die Primärantikörper (Tabelle 4) wurden in 0,01 M PBS-Lösung mit 10% FCS, auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Nach dem Entfernen der Blockierungslösung wurden die Schnitte über Nacht bei RT mit 90 µl des verdünnten Primärantikörpers inkubiert.

Am zweiten Tag der Färbung wurden die Schnitte 3 x 5 min lang in 0,01 M PBS mit 0,1% Triton X-100 und anschließend kurz in 0,01 M PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden

---

die Schnitte 1 h bei 37°C mit den jeweiligen biotinylierten Sekundärantikörpern inkubiert (Tabelle 4). Die sekundären Antikörper wurden mit einer 0,01 M PBS-Lösung mit 10% FCS, auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Eine Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Lösung wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers unter Verwendung des VECTASTAIN® Elite ABC-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) wie folgt hergestellt. Jede Komponente wurde zu einer 0,01 M PBS-Lösung mit 10% FCS in einer Verdünnung von 1:100 gegeben. Die ABC-Lösung wurde vor der Verwendung 30 min bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden 3 x mit 0,01 M PBS gewaschen, bevor jeder Schnitt 1,5 h bei 37°C mit 90 µl ABC-Lösung inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurden die Objektträger 3 x 5 min lang mit 0,01 M PBS gewaschen, um die ABC-Lösung zu entfernen.

Für die Färbung wurde ein DAB-Peroxidase Substrat Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) verwendet und die Lösung nach Herstellerangaben angefertigt. Die Schnitte wurden mit 100 µl der Lösung inkubiert und unter dem Lichtmikroskop beobachtet, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht war. (GFAP: 56 s, IBA-1: 60 s, CB1: 80 s) Nach der Färbung mit DAB wurden die Schnitte 3 x 5 min in 0,01 M PBS gewaschen und 40 Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die Schnitte wurden anschließend in ddH<sub>2</sub>O getaucht und 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Präparate unter Verwendung der folgenden Inkubationen dehydriert: 1 min in 70% EtOH; 5 min in 95% EtOH; 10 min in 100% EtOH und 2 x 5 min in Xylol. Die gefärbten Objektträger wurden mit zwei Tropfen Eindeckmedium bedeckt, bevor jedem Objektträger ein Deckglas hinzugefügt wurde. Über Nacht härtete das Einbettmedium unter dem Abzug aus.



**Tabelle 4: Antikörper für die Färbungen**

Primärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Verwendung
<b>Anti-GFAP (<i>guinea pig</i>)</b>	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland	1:1000	GFAP
<b>Anti-IBA1 (<i>guinea Pig</i>)</b>	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland	1:500	IBA-1
<b>Anti-CB1 (<i>rabbit</i>)</b>	Abcam, Cambridge, UK	1:2000	CB1-Rezeptor
<b>Anti-DCX (<i>rabbit</i>)</b>	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland	1:4000	Doublecortin
Sekundäre Antikörper			
<b>Goat Anti-Rabbit IgG biotinyliert</b>	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA	1:200	CB1-Rezeptor, Doublecortin
<b>Goat Anti-Guinea Pig IgG biotinyliert</b>	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA	1:200	GFAP, IBA-1

#### 2.5.4 Quantifizierung der immunhistochemischen Färbungen

Von den DAB-gefärbten Schnitten (siehe Absatz 2.6.3.2.) wurden, mithilfe des mit einer Kamera (Moticam Pro 282A) ausgestatteten BX-51-Mikroskops, Fotos aufgenommen. Die Fotos wurden mit einer 20-fachen Vergrößerung und gleichbleibenden Belichtungsverhältnissen von den Hippocampi und benachbartem frontalem Cortex angefertigt. Um die Vergleichbarkeit der Fotos zu gewährleisten, wurden von jeder Maus drei Hippocampus-Schnitte im Abstand von 20 – 32  $\mu\text{m}$  ausgewählt, die auf derselben Ebene lagen.

In dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (Version 1.5.1, *open source*) wurden die Fotos in binäre 8-Bit Schwarz-Weiß-Bilder umgewandelt. Zudem wurde ein Schwellenwert für die Helligkeit festgelegt, bei dem die jeweils spezifisch angefärbten Strukturen zu erkennen waren, der Hintergrund jedoch ungefärbt blieb. Das Programm berechnete den Anteil der gefärbten Fläche zur Fläche des Bildes.

## 2.6 Statistik

Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit einer einfachen oder zweifachen Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließender Bonferroni-Korrektur und mit t-Tests für gepaarte und ungepaarte Stichproben statistisch dargestellt. Die Signifikanzniveaus betragen bei allen statistischen Analysen \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ . Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (S.E.M., *standard error of the mean*). Die p-Werte werden im Ergebnisteil i. d. R. auf die dritte Nachkommastelle gerundet angegeben. Die Anzahl der verwendeten Tiere (n) ist unterhalb der jeweiligen Abbildungen angegeben. Für die statistische Analyse und für die Erstellung der Graphen wurde GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) genutzt.

## 2.7 Software

Die vorliegende Arbeit wurde mit Hilfe von Microsoft® Word (Version 16.44, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) verfasst. Für die Verwaltung von Messdaten der Experimente wurde Microsoft® Excel (Version 16.47, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) genutzt. Für die Bildbearbeitung und das Erstellen von Grafiken wurden Microsoft® PowerPoint (Version 16.44, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA), Apple® Keynote (Version 10.3.9, Apple Inc., Cupertino, Kalifornien, USA), BioRender.com (BioRender® Software, Toronto, Kanada), und SDFX Paint & Cartoon Filters® (Moonlightning Apps LLC, Cordoba, Argentinien) verwendet. Als Literaturverwaltungsprogramm leistete Zotero (Version 5.0.96.3, *open source*) zuverlässige Dienste.

## 2.8 Beiträge

Marius E. Sichler führte die Therapie, Verhaltensexperimente und die Färbungen mit Kresylviolett und DAB der präventiv und therapeutisch behandelten Vehikel-Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse durch. Maximilian Löw führte die Therapie und die Verhaltensexperimente der Vehikel-Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse durch.

### 3 Ergebnisse

Graphen und Diagramme mit Testergebnissen von präventiv (prev.) mit WIN behandelten Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen sind im Folgenden immer in roter Farbe dargestellt. Graphen und Diagramme mit Testergebnissen von therapeutisch (ther.) mit WIN behandelten Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen sind im Gegensatz dazu immer in blauer Farbe abgebildet. Statistisch nicht signifikante p-Werte werden teilweise mit n. s. (nicht signifikant) zusammengefasst.

#### 3.1 Ergebnisse der Verhaltenstests

##### 3.1.1 Einfluss der WIN-Therapie auf das Körpergewicht

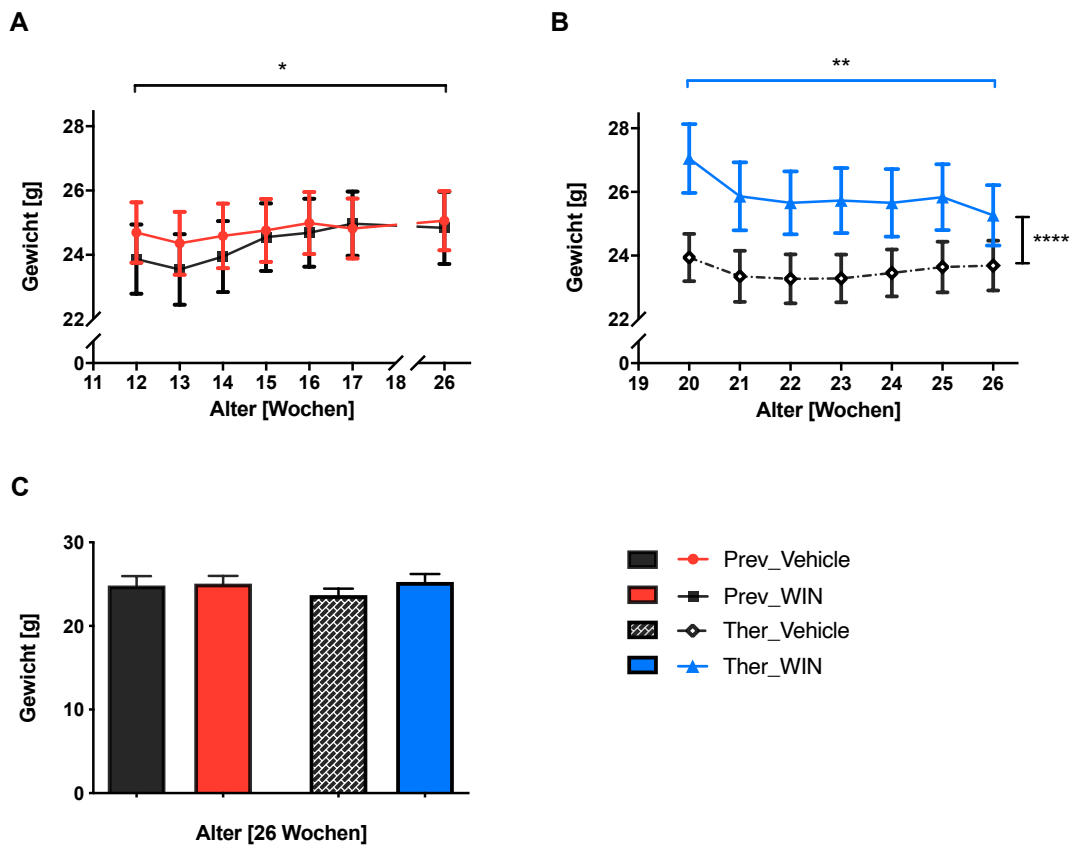
Um einen Überblick auf die systemische Wirkung der WIN-Therapie auf die Gewichtsentwicklung der Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse zu bekommen, wurden die Mäuse wöchentlich und unmittelbar vor der Entnahme (Alterswoche 26) gewogen.

Die präventiv behandelten transgenen Mäuse unterschieden sich im Körpergewicht nicht signifikant von ihren Vehikel-Kontrollen (Abbildung 13 A, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung:  $p = 0,453$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN *vs.* Vehikel: Woche 12,13,14,15,16,17,18,26:  $p = n. s.$ ). Beim Vergleich des Körpergewichts bei Therapiebeginn mit Therapieende war in der Vehikel-Gruppe ein signifikanter Anstieg, in der WIN-Gruppe hingegen kein signifikanter Unterschied des Körpergewichts zu erfassen (Abbildung 13 A, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlungszeitraum:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: Vehikel Woche 12 *vs.* 26:  $p < 0,05$ ; WIN Woche 12 *vs.* 26:  $p = 0,269$ ).

Die therapeutisch mit WIN behandelten Mäuse wiesen über den kompletten Beobachtungszeitraum ein signifikant höheres Gewicht als ihre Vehikel-Kontrollen auf. (Abbildung 13 B, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN *vs.* Vehikel: Woche 20,21,22,23,24,25,26:  $p = n. s.$ ).

Das Körpergewicht zu Therapiebeginn im Vergleich zum Therapieende unterschied sich in der Vehikel-Behandlungsgruppe nicht signifikant (Abbildung 13 B, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlungszeitraum:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: Vehikel Woche 20 *vs.* 26:  $p > 0,99$ ). In der WIN-Gruppe zeigte sich das Körpergewicht nach der Behandlung hingegen signifikant geringer als zu Beginn der Therapie (Abbildung 13 B, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlungszeitraum:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN Woche 20 *vs.* 26:  $p < 0,01$ ).

Im Vergleich der vier Behandlungsgruppen unmittelbar vor dem Ende der Verhaltensexperimente im Alter von 26 Wochen zeigt sich kein Einfluss der Therapie mit WIN, unabhängig vom Therapiezeitraum, auf das Körpergewicht der Tiere (Abbildung 13 C, einfache Varianzanalyse, prev. WIN *vs.* ther. WIN *vs.* prev. Vehikel *vs.* ther. Vehikel (Woche 26):  $p = 0,648$ ).



**Abbildung 13: WIN-Behandlung reduziert das Körpergewicht von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen in der therapeutischen Behandlungsgruppe**

(A) Die präventiv behandelten Mäuse unterschieden sich im Körpergewicht zu keinem Zeitpunkt signifikant von ihren Vehikel-Kontrollen. Vehikel-behandelte Mäuse der präventiven Gruppe konnten ihr Körpergewicht über den Beobachtungszeitraum signifikant steigern. (B) Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse, die therapeutisch mit WIN behandelt wurden, wiesen über den gesamten Behandlungszeitraum signifikant höheres Körpergewicht als ihre Vehikel-Kontrollen auf. Im Laufe der WIN-Behandlung verlieren die Mäuse der therapeutischen Gruppe signifikant an Gewicht. (C) Zum Entnahmezeitpunkt im Alter von 26 Wochen unterscheiden die vier Behandlungsgruppen sich im Körpergewicht nicht signifikant voneinander. Zweifache und einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-korrigierten Messwiederholungen, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .  $n = 14 - 16$ . Daten dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.

### 3.1.2 Ergebnisse des Rotarod-Tests

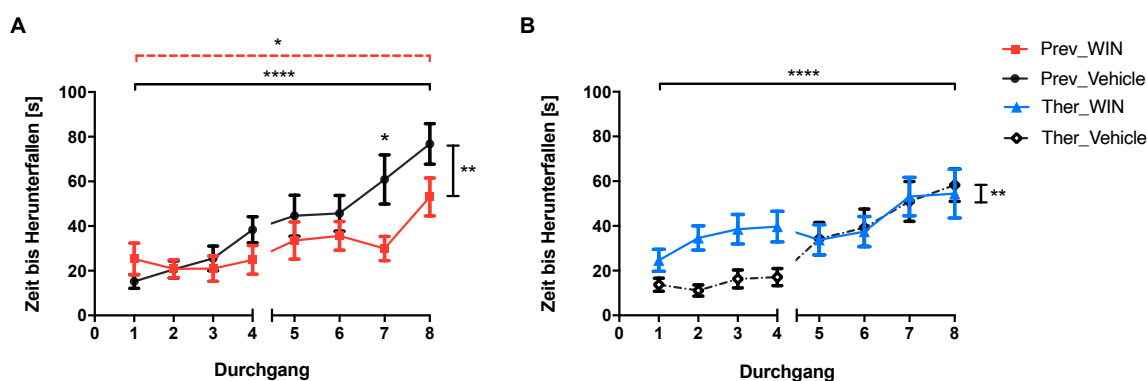
Um den Einfluss einer WIN-Therapie auf das motorische Lernen der Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse zu testen, wurde der Rotarod-Test mit den Tieren durchgeführt.

Sowohl mit Vehikel- als auch mit WIN-Lösung präventiv behandelte Mäuse lernten im Vergleich des ersten mit dem achten Trial signifikant länger, auf der Rolle zu balancieren (Abbildung 14 A, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, *trial*:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: Vehikel *trial* 1 vs. 8:  $p < 0,0001$ ; WIN *trial* 1 vs. 8:  $p < 0,05$ ).

Über die ganzen acht Durchgänge betrachtet, sowie bei Durchgang sieben waren die präventiv mit WIN therapierten Mäuse ihren Vehikel-behandelten Kontrollmäusen signifikant unterlegen (Abbildung 14 A, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung:  $p = 0,0034$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN vs. Vehikel: *trial* 1,2,3,4,5,6,8:  $p = n. s.$ ; *trial* 7:  $p < 0,05$ ).

Therapeutisch mit Vehikel-Lösung behandelte Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse lernten, im Gegensatz zu mit WIN behandelten Tieren, im Vergleich des achten mit dem ersten Durchgang sich signifikant länger in der Versuchsapparatur zu halten (Abbildung 14 B, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, *trial*:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: Vehikel *trial* 1 vs. 8:  $p < 0,0001$ ; WIN *trial* 1 vs. 8:  $p = 0,277$ ).

Statistisch ergab sich über alle acht Durchgänge ein signifikanter Unterschied zwischen therapeutisch mit WIN oder Vehikel behandelter Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse (Abbildung 14 B, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung:  $p = 0,006$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN vs. Vehikel: *trial* 1,2,3,4,5,6,7,8:  $p = n. s.$ ).



**Abbildung 14: Präventiv behandelte Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse sind ihren Vehikel-Kontrollen im Rotarod-Test unterlegen**

(A) In der präventiv behandelten Kohorte lernten sowohl Vehikel- als auch WIN-behandelte Mäuse im Rotarod-Test von Durchgang eins zu Durchgang acht signifikant dazu. Über alle Durchläufe gemessen konnten sich präventiv mit Vehikel behandelte Mäuse signifikant länger auf der Rolle halten als die WIN-behandelten Tiere. (B) Therapeutisch mit WIN behandelte Mäuse unterschieden sich in ihrer Performance signifikant von ihren Vehikel-Kontrollen. Von der therapeutischen Kohorte lernten nur mit Vehikel behandelte Mäuse im Vergleich von Durchgang eins bis Durchgang acht signifikant dazu. Zweifache Varianzanalyse mit Bonferroni-korrigierten Messwiederholungen, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .  $n = 14 - 16$ . Daten dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.

### 3.1.3 Ergebnisse des Dark-Light Box Tests

Bei der Dark Light Box wurde die Auswirkung der WIN-Therapie auf das Angstverhalten der Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse untersucht. Zur besseren Interpretation des Verhaltens der transgenen Mäuse wurden zusätzlich Wildtyp-Mäuse im jeweils gleichen Alter und den gleichen Behandlungsgruppen dargestellt. Vermehrte Zeit im hellen, offenen Bereich wurde als weniger ängstliches Verhalten interpretiert (Ennaceur 2014). Die zurückgelegte Distanz wurde als Kontrollparameter herangezogen, um nachzuvollziehen, dass die Mäuse den Versuchsaufbau während des Tests erkundeten und nicht stationär blieben.

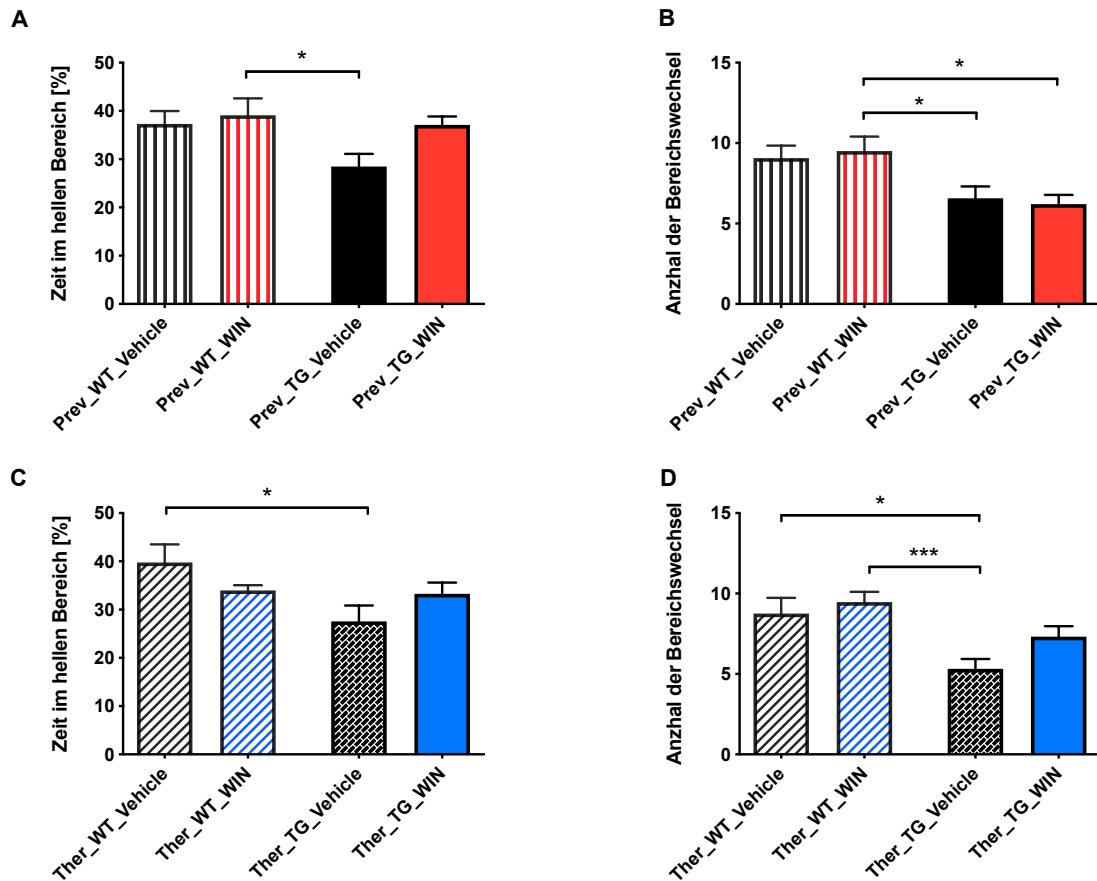
Präventiv mit WIN behandelte Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse zeigten im Vergleich mit ihren Vehikel-Kontrollen kein verändertes Angstverhalten (Abbildung 15 A, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,028$ ; Bonferroni-Korrektur: TG-WIN *vs.* TG-Vehikel:  $p = 0,145$ ). Auch die präventiv behandelten WT-Mäuse zeigten im Vergleich mit den WT-Vehikel-Mäusen keinen signifikanten Einfluss der Therapie auf ihr Angstverhalten in der DLB (Abbildung 15 A, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,028$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-WIN *vs.* WT-Vehikel:  $p > 0,99$ ). Im Vergleich mit den Tg4-42-Mäusen hielten sich die WT-Mäuse in der Tendenz länger im hellen Bereich der DLB auf, wobei dieser Effekt nur zwischen den WT-WIN- und Tg4-42-Vehikel-Mäusen statistisch signifikant war (Abbildung 15 A, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,028$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-WIN *vs.* TG-Vehikel:  $p = 0,042$ ; WT-Vehikel *vs.* TG-Vehikel;  $p = 0,145$ ).

Bei der Anzahl der Bereichswchsel zeigten sich die WT-Mäuse im Vergleich mit den Tg4-42<sub>hom</sub> insgesamt aktiver. Zwischen den WIN-behandelten WT-Tieren im Vergleich mit den Tg4-42-Vehikel- und den Tg4-42-WIN-Mäusen stellte sich dieser Effekt statistisch signifikant dar (Abbildung 15 B, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,0038$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-WIN *vs.* TG-Vehikel:  $p = 0,045$ ; WT-WIN *vs.* TG-WIN:  $p = 0,02$ ). Eine WIN-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der Bereichswchsel innerhalb der Gruppen der WT- und der Tg4-42-Mäuse (Abbildung 15 B, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,0038$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-Vehikel *vs.* WT-WIN:  $p > 0,99$ ; TG-Vehikel *vs.* TG-WIN:  $p > 0,99$ ).

Therapeutisch mit WIN behandelte Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse unterschieden sich in ihrem Angstverhalten in der DLB nicht von ihren Vehikel-Kontrollen (Abbildung 15 C, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,032$ ; Bonferroni-Korrektur: TG-Vehikel *vs.* TG-WIN:  $p = 0,823$ ). Auch bei den WT-Mäusen konnte WIN keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Zeit im hellen Bereich im Vergleich mit den Vehikel-behandelten WT-Tieren bewirken (Abbildung 15 C, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,032$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-Vehikel *vs.* WT-WIN:  $p = 0,945$ ). Ähnlich wie bei den präventiv behandelten Mäusen

(Abbildung 15 A) zeigten die therapeutisch behandelten Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse im Vergleich mit WT-Mäusen in der Tendenz ein ängstlicheres Verhalten, welches sich zwischen den Tg4-42-Vehikel und den Vehikel-behandelten WT-Tieren als statistisch signifikant darstellte (Abbildung 15 C, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,032$ ; Bonferroni-Korrektur: TG-Vehikel *vs.* WT-Vehikel:  $p = 0,02$ ; TG-Vehikel *vs.* WT-WIN:  $p = 0,601$ ).

Bei der Anzahl der Bereichswchsel zeigten sich die therapeutisch behandelten WT-Mäuse im Vergleich mit den Tg4-42<sub>hom</sub> insgesamt aktiver. Zwischen beiden Gruppen der WT-Tiere und den Vehikel-behandelten Tg4-42-Mäusen war dieser Effekt statistisch signifikant (Abbildung 15 D, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,0005$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-Vehikel *vs.* TG-Vehikel:  $p = 0,01$ ; WT-WIN *vs.* TG-Vehikel:  $p = 0,0005$ ). Innerhalb der Gruppen der WT- und der Tg4-42-Mäuse unterschieden sich die Anzahl der Bereichswchsel nicht signifikant (Abbildung 15 D, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,0005$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-Vehikel *vs.* WT-WIN:  $p > 0,99$ ; TG-Vehikel *vs.* TG-WIN:  $p = 0,26$ ).



**Abbildung 15: Präventive und therapeutische Behandlung mit WIN hat keinen Einfluss auf das Angstverhalten von Tg4-42<sub>hom</sub>- und WT-Mäusen im DLB-Test**

(A) Präventive Behandlung mit WIN hatte keinen Einfluss auf das Angstverhalten in der DLB innerhalb der Gruppe der transgenen Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse, sowie in der der WT-Tiere. (B) Präventiv mit WIN behandelte WT-Tiere wechselten signifikant häufiger zwischen den Bereich als Tg-4-42<sub>hom</sub>-Tiere. Innerhalb der Gruppen der Tg4-42- und WT-Tiere hatte eine präventive Behandlung mit WIN keinen Einfluss auf die Bereichswechsel.

(C) Bei therapeutisch mit WIN behandelten T4-42<sub>hom</sub>- und WT-Mäusen war kein signifikanter Unterschied in den Gruppen im Angstverhalten zu erfassen. WT-Tiere zeigten unabhängig von der Behandlung z. T. signifikant reduziertes Angstverhalten im Vergleich mit den transgenen Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen. (D) Bei den Bereichswechseln zeigt sich eine signifikant höhere Aktivität der WT-Tiere im Vergleich mit den Tg4-42-Mäusen. Innerhalb der Gruppen hat die therapeutische Behandlung mit WIN keinen Einfluss die Anzahl der Bereichswechsel. Einfache Varianzanalysen mit Bonferroni-korrigierten Messwiederholungen, \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*  $p < 0,05$ .  $n = 14 - 16$ . Daten dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.



### 3.1.4 Ergebnisse des Elevated Plus Maze

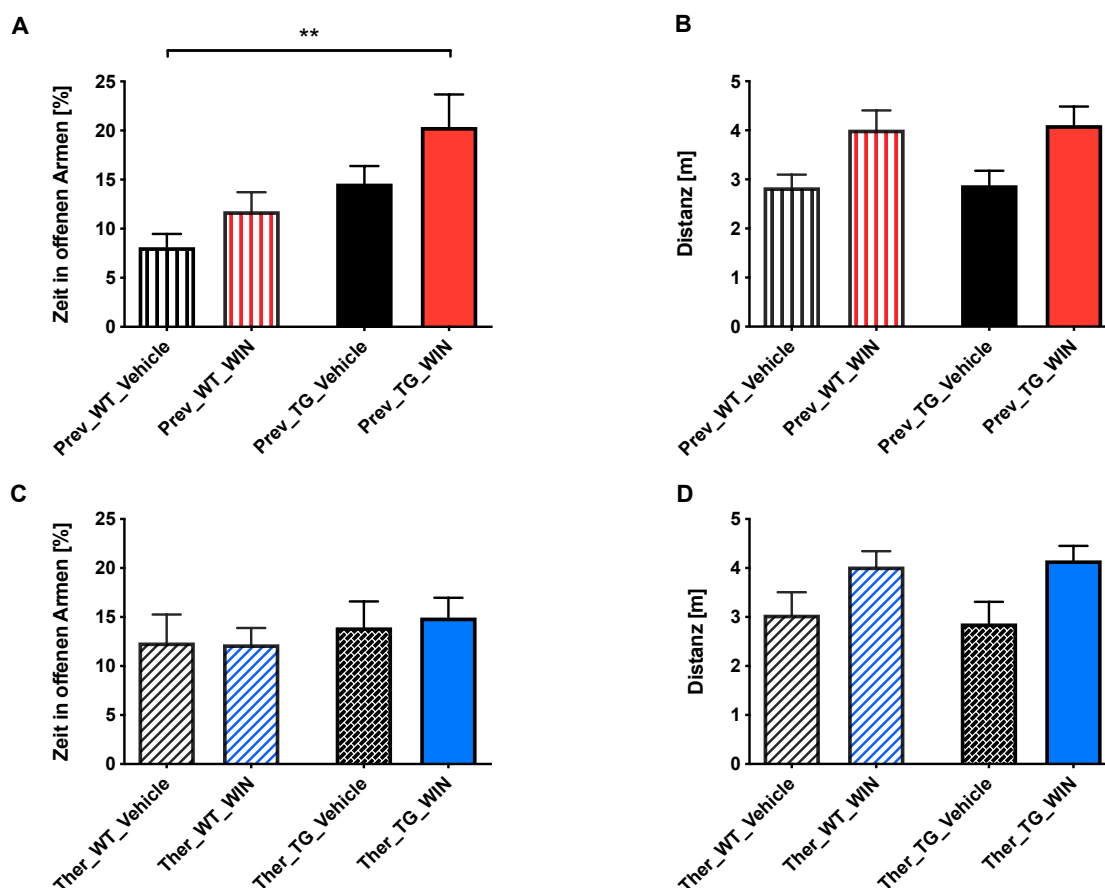
Mithilfe des EPM wurde ebenfalls die Auswirkung der WIN-Therapie auf das Angstverhalten der Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse untersucht (Walf und Frye 2007). Vermehrtes Aufhalten in den offenen Armen des Versuchsaufbaus wurde hierbei als weniger ängstliches Verhalten interpretiert. Die zurückgelegte Distanz wurde als Kontrollparameter herangezogen, um nachzuvollziehen, dass die Mäuse den Versuchsaufbau während des Tests erkundeten und nicht nur stationär blieben. Zum Vergleich und zur besseren Interpretation der Testergebnisse der transgenen Tiere, wurden WT-Mäuse nach dem gleichen Schema behandelt und getestet.

Bei den Tg4-42<sub>hom</sub>- sowie den WT-Mäusen des präventiven Behandlungsansatzes zeigten sich keine Einflüsse der WIN-Therapie auf das Angstverhalten im EPM im Vergleich mit ihren jeweiligen Vehikel-Kontrollen (Abbildung 16 A, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,003$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-Vehikel *vs.* WT-WIN:  $p > 0,99$ ; TG-Vehikel *vs.* TG-WIN:  $p = 0,052$ ). Transgene Mäuse zeigten im Vergleich mit den WT-Tieren z. T. signifikant reduziertes Angstverhalten im EPM (Abbildung 16 A, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,003$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-Vehikel *vs.* TG-WIN:  $p = 0,0019$ ).

Der Unterschied zwischen Tg4-42- und WT-Mäusen ließ sich hinsichtlich der zurückgelegten Distanz der präventiven Gruppen im EPM nicht nachvollziehen (Abbildung 16 B, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,009$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-Vehikel *vs.* TG-Vehikel:  $p = 0,118$ ; WT-WIN *vs.* TG-WIN:  $p > 0,99$ ). Im Gegensatz zu den WT-Tieren legten präventiv mit WIN behandelte transgene Mäuse im Trend mehr Distanz im Vergleich mit ihren Vehikel-Kontrollen zurück (Abbildung 16 B, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,009$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-Vehikel *vs.* WT-WIN:  $p = 0,115$ ; TG-Vehikel *vs.* TG-WIN:  $p = 0,064$ ).

Bei den Mäusen des therapeutischen Behandlungsansatzes hatte WIN keinen Einfluss auf das Angstverhalten von Tg4-42- sowie von WT-Mäusen im Vergleich mit ihren Vehikel-Kontrollen, sowie untereinander (Abbildung 16 C, einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-korrigierten Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,815$ ).

Hinsichtlich der zurückgelegten Distanz zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der präventiven Gruppe. Tg4-42-Mäuse, die mit WIN behandelt wurden, legten im Trend mehr Distanz im Versuchsaufbau des EPM zurück (Abbildung 16 D, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,033$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-Vehikel *vs.* WT-WIN:  $p = 0,545$ ; TG-Vehikel *vs.* TG-WIN:  $p = 0,087$ ; WT-Vehikel *vs.* TG-Vehikel:  $p > 0,99$ ; WT-WIN *vs.* TG-WIN:  $p > 0,99$ ).



**Abbildung 16: Präventive und therapeutische Behandlung mit WIN hat keinen Einfluss auf das Angstverhalten im EPM von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen und von Wildtyp-Mäusen**

(A) Die Tg4-42- sowie die WT-Mäuse des präventiven Behandlungsansatzes zeigten keinen Unterschied hinsichtlich ihres Angstverhaltens im Vergleich mit ihren Vehikel-Kontrollen. Präventiv mit WIN therapierte Tg4-42-Mäuse zeigten jedoch signifikant reduziertes Angstverhalten im Vergleich mit WT-Mäusen mit der gleichen Behandlung. (C) Kein Einfluss von WIN Therapie auf das Angstverhalten von Tg4-42- und von WT-Mäusen ließen sich im therapeutischen Behandlungsansatz beobachten. (B, D) Sowohl im präventiven als auch therapeutischen Behandlungsansatz zeigten mit WIN behandelte Tg4-42-Mäuse im Trend gesteigerte lokomotorische Aktivität verglichen mit ihren Vehikel-Kontrollen. Einfache Varianzanalysen mit Bonferroni-korrigierten Messwiederholungen, \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 14 - 16$ . Daten dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.

### 3.1.5 Ergebnisse des Open Field

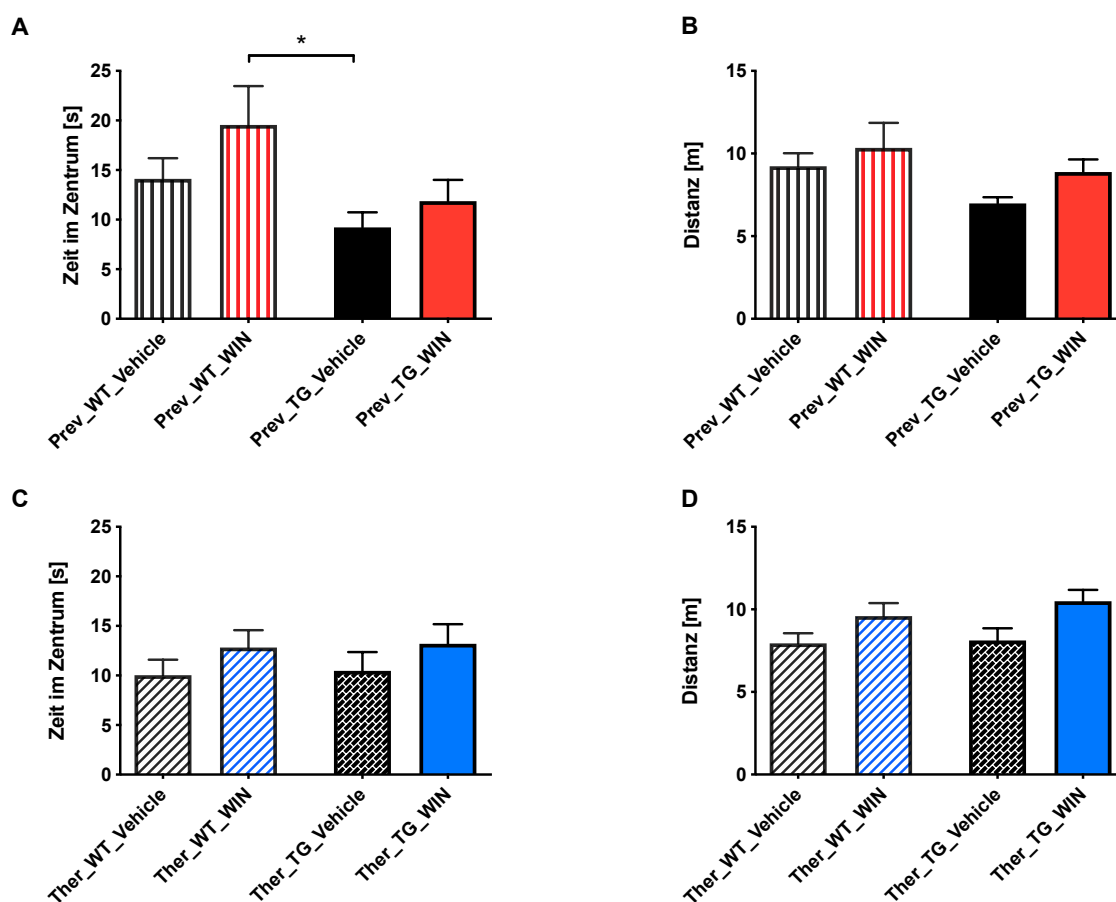
Auch der OF-Test wurde zur Beurteilung des Angstverhaltens der Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse herangezogen (Ennaceur 2014). Vermehrtes Aufhalten im hellen Zentrum des Versuchsaufbaus wurde als weniger ängstliches Verhalten interpretiert. Die zurückgelegte Distanz wurde als Kontrollparameter herangezogen, um nachzuvollziehen, dass die Mäuse den Versuchsaufbau während des Tests erkundeten und nicht nur stationär blieben. Zum

Vergleich und zur besseren Interpretation der Testergebnisse der transgenen Tiere, wurden WT-Mäuse nach dem gleichen Schema behandelt und getestet.

Bei den Tg4-42- sowie den WT-Mäusen des präventiven Behandlungsansatzes zeigten sich keine Einflüsse der WIN-Therapie auf das Angstverhalten im OF im Vergleich mit ihren jeweiligen Vehikel-Kontrollen (Abbildung 17 A, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,036$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-Vehikel *vs.* WT-WIN:  $p = 0,998$ ; TG-Vehikel *vs.* TG-WIN:  $p > 0,99$ ). Die transgenen Mäuse zeigten im Vergleich mit den WT-Tieren z. T. gesteigertes Angstverhalten im OF zeigten, was insbesondere im präventiven Behandlungsansatz im signifikanten Unterschied zwischen WIN-behandelten WT- und Vehikel-behandelten Tg4-42-Tieren zu Darstellung kam (Abbildung 17 A, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,036$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-WIN *vs.* TG-Vehikel:  $p = 0,0298$ ; WT-Vehikel *vs.* TG-WIN:  $p = 0,218$ ).

Hinsichtlich der zurückgelegten Distanz im OF konnten weder bei den Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen noch bei den WT-Tieren statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich mit ihren jeweiligen Vehikel-Kontrollen oder in Gegenüberstellung der Gruppen beobachtet werden (Abbildung 17 B, einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-korrigierten Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,08$ ).

Die therapeutische Behandlung mit WIN hatte weder in Tg4-42- noch in WT-Mäusen einen signifikanten Effekt auf das Angstverhalten der Tiere im OF (Abbildung 17 C, einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-korrigierten Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,529$ ). Hinsichtlich der zurückgelegten Distanz im EPM zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tg4-42- und den WT-Tieren, sowie der WIN- und der Vehikel-Behandlung (Abbildung 17 D, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung und Genotyp:  $p = 0,048$ ; Bonferroni-Korrektur: WT-Vehikel *vs.* WT-WIN:  $p = 0,788$ ; TG-Vehikel *vs.* TG-WIN:  $p = 0,119$ ; WT-WIN *vs.* TG-Vehikel:  $p = 0,862$ ; WT-Vehikel *vs.* TG-WIN:  $p = 0,125$ ).



**Abbildung 17: Keine Änderung im Angstverhalten von Tg4-42<sub>hom</sub><sup>-</sup> und Wildtyp-Mäusen im OF durch den präventiven und den therapeutischen Behandlungsansatz mit WIN**

(A) Im präventiven Behandlungsansatz zeigte sich kein Einfluss von WIN auf das Angstverhalten der Tg4-42<sub>hom</sub><sup>-</sup> im Vergleich mit Vehikel- und WT-Mäusen. (B) Alle Gruppen von Tieren mit präventiver Therapie zeigten ähnliches lokomotorisches Verhalten im OF. (C) Therapeutisch mit WIN behandelte transgene Mäuse zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf ihr Angstverhalten im Vergleich mit Vehikel-Kontrollen und WT-Mäusen. (D) Zudem konnte kein Effekt von WIN im therapeutischen Ansatz auf die zurückgelegte Distanz nachgewiesen werden. Einfache Varianzanalysen mit Bonferroni-korrigierten Messwiederholungen, \*  $p < 0,05$ ,  $n = 14 - 16$ . Daten dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.

### 3.1.6 Ergebnisse des Morris Water Maze

Im Morris Water Maze (MWM) wurde das räumliche Bezugsgedächtnis und Lernverhalten der Tg4-42<sub>hom</sub><sup>-</sup>-Mäuse getestet (Vorhees und Williams 2006).

Im *Cued Training* bewiesen präventiv mit WIN- oder Vehikel-Lösung behandelte Mäuse ihr Sehvermögen und ihre angeborene Fähigkeit zu schwimmen (Abbildung 18 A). Mäuse beider Therapiegruppen konnten ihre mittleren Fluchtzeiten bis zur Plattform im Lauf der drei Tage

signifikant verbessern (zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Fluchtzeit:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN Tag 1 *vs.* 3:  $p < 0,0001$ ; Vehikel Tag 1 *vs.* 3:  $p < 0,0001$ ).

Im anschließenden *Acquisition Training* lernten präventiv mit WIN behandelte Tg4-42-Mäuse die verborgene Plattform über alle Tage und besonders an Tag fünf signifikant schneller zu finden als ihre Vehikel-Kontrollen. (Abbildung 18 C, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN *vs.* Vehikel Tag 1,2,3,4 = n. s.; Tag 5:  $p = 0,002$ ). Zudem konnten lediglich die mit WIN behandelten Mäuse ihre mittleren Fluchtzeiten von Tag eins bis fünf signifikant verbessern (Abbildung 18 C, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Fluchtzeit:  $p = 0,048$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN Tag 1 *vs.* 5:  $p < 0,0001$ ; Vehikel Tag 1 *vs.* 5:  $p > 0,99$ ).

Im abschließenden *Probe Trial* zeigten die mit WIN behandelten Mäuse eine signifikante Präferenz für den Zielquadranten (Z) im Vergleich mit dem linken (L), rechten (R), bzw. gegenüberliegenden Quadranten (O), was auf ein intaktes räumliches Bezugsgedächtnis schließen lässt (Abbildung 18 E, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, WIN:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: Quadranten: Z *vs.* O, Z *vs.* R, Z *vs.* L:  $p < 0,0001$ ). Mit Vehikel-Lösung behandelte Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse zeigten im Probe Trial hingegen keine Präferenz für den Zielquadranten und wiesen somit massive Defizite im räumlichen Bezugsgedächtnis auf (Abbildung 18 E; einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Vehikel:  $p = 0,504$ ; Bonferroni-Korrektur: Quadrant: Z *vs.* O, Z *vs.* R, Z *vs.* L:  $p > 0,99$ ).

Sowohl im *Cued Training* schwammen präventiv mit WIN behandelte Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse über alle Tage, sowie an Tag zwei gemessen signifikant schneller als ihre Vehikel-Kontrollen (Abbildungen 18 B, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN *vs.* Vehikel Tag 1,3:  $p =$  n. s.; Tag 2:  $p = 0,0004$ ).

Im *Acquisition Training* schwammen präventiv mit WIN behandelte Mäuse signifikant schneller als ihre Vehikel-Kontrollen (Abbildung 18 D, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN *vs.* Vehikel Tag 1,2,3,4,5:  $p =$  n. s.). Vehikel-behandelte Tg4-42-Mäuse zeigten einen Trend zu verringerter Schwimmgeschwindigkeit, während mit WIN behandelte Tg4-42-Mäuse ihre Schwimmgeschwindigkeit von Tag eins bis Tag fünf signifikant reduzierten (Abbildung 18 D, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Fluchtzeit:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN Tag 1 *vs.* 5:  $p = 0,012$ ; Vehikel Tag 1 *vs.* 5:  $p = 0,092$ ). Im *Probe Trial* schwammen die Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse, die mit WIN behandelt worden waren, ebenfalls signifikant schneller als ihre Kontrollen (Abbildung 18 F, ungepaarter t-Test, Behandlung:  $p = 0,007$ ).

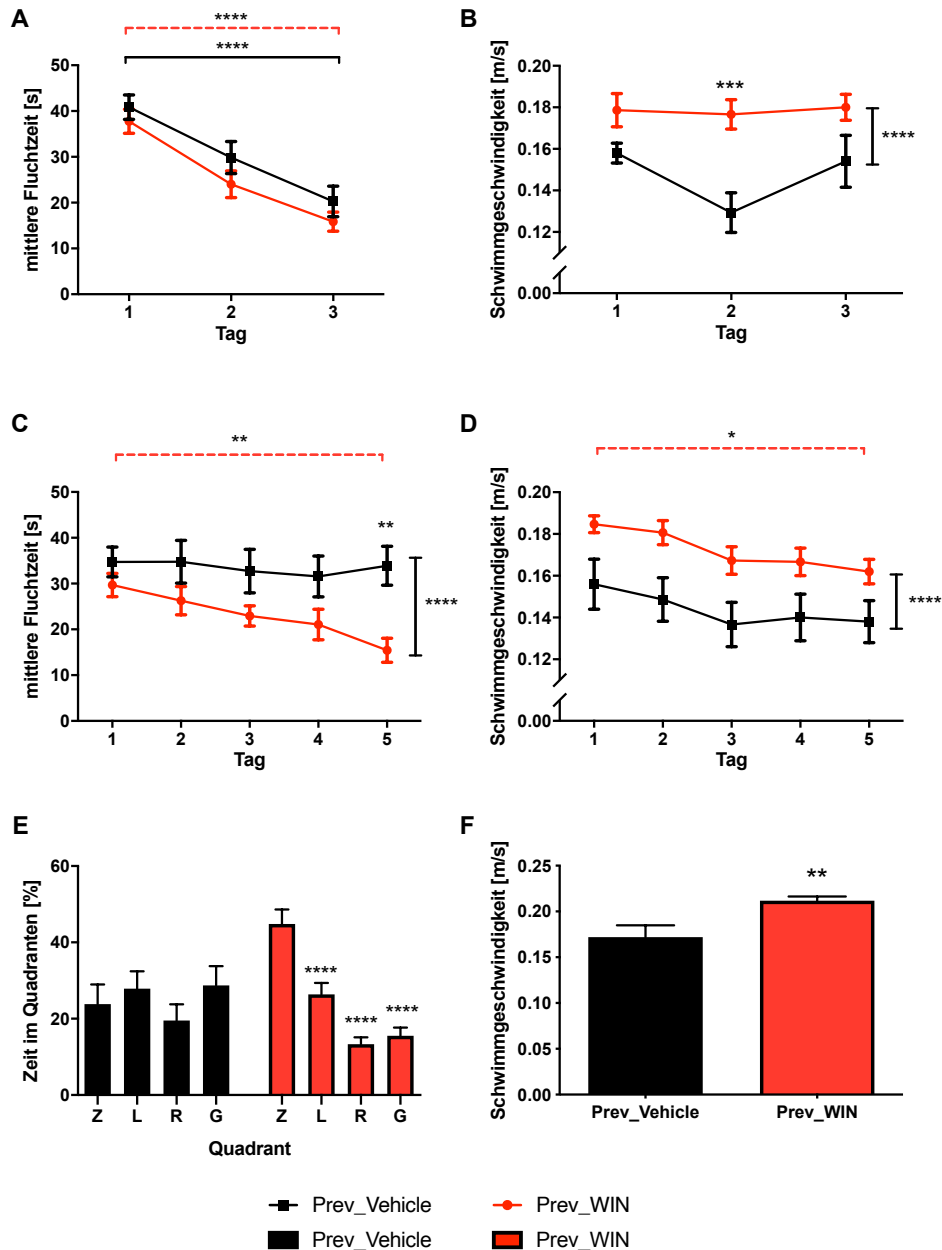
Die Mäuse des therapeutischen Behandlungsansatzes stellten im *Cued Training* ihr Sehvermögen und ihre angeborene Fähigkeit zu schwimmen unter Beweis (Abbildung 19 A). Nur therapeutisch mit WIN behandelte Mäuse konnten hierbei ihre mittleren Fluchtzeiten über die drei Tage signifikant reduzieren, ohne sich jedoch signifikant von den Fluchtzeiten der Vehikel-Gruppe zu unterscheiden (Abbildung 19 A, zweifache Varianzanalysen mit

Messwiederholungen, Behandlung:  $p = 0,598$ ; Fluchtzeit:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrekturen: WIN Tag 1 *vs.* 3:  $p < 0,0001$ ; Vehikel Tag 1 *vs.* 3:  $p = 0,154$ ).

Im *Acquisition Training* lernten therapeutisch mit WIN behandelte Mäuse über alle Tage gemessen signifikant schneller die Plattform zu finden als ihre Vehikel-Kontrollen (Abbildung 19 C, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN *vs.* Vehikel Tag 2,4,5:  $p = n. s.$ ; Tag 1  $p = 0,049$ ; Tag 3:  $p = 0,02$ ). Im Vergleich von Tag eins bis fünf zeigten die Vehikel-behandelten Mäuse einen Trend zu reduzierten Fluchtzeiten (Abbildung 19 C, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Fluchtzeiten:  $p = 0,0017$ ; Bonferroni-Korrektur: Vehikel Tag 1 *vs.* 5:  $p = 0,055$ ; WIN Tag 1 *vs.* 5:  $p = 0,148$ ).

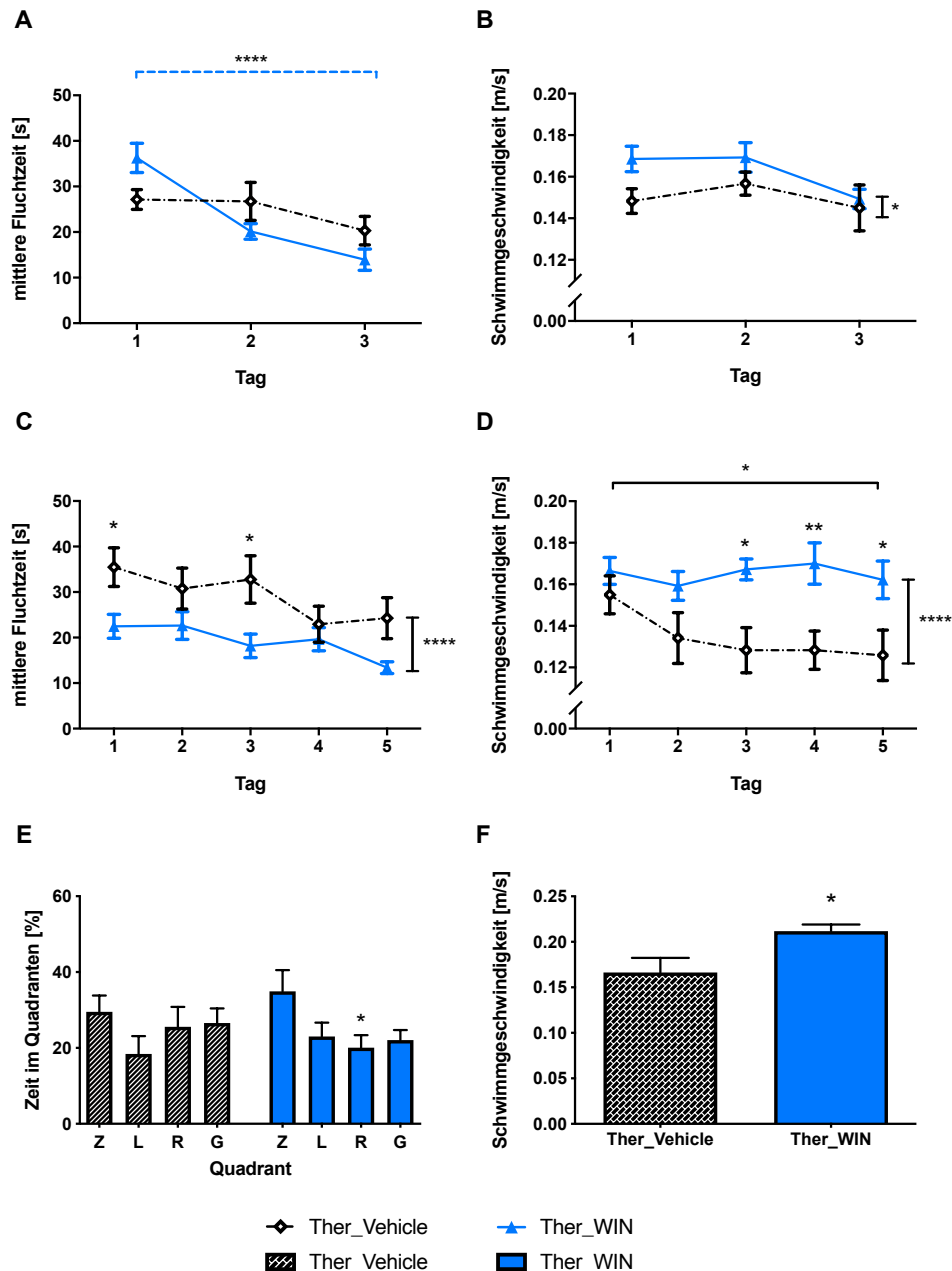
Im abschließenden *Probe Trial* konnten zeigten therapeutisch mit Vehikel-Lösung behandelte Mäuse keine Präferenz für den Zielquadranten (Abbildung 19 E, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Vehikel:  $p = 0,37$ ; Bonferroni-Korrektur: Quadrant: Z *vs.* O, Z *vs.* R:  $= p > 0,99$ ; Z *vs.* L:  $p = 0,272$ ). Bei den WIN-Mäusen konnte statistisch ein Unterschied zwischen den Quadranten in der einfachen Varianzanalyse nachgewiesen werden, die sich in den Bonferroni-korrigierten Messwiederholungen jedoch nur mit einer Signifikanz zwischen dem Zielquadranten (Z) und dem rechten Quadranten (R) zeigte (Abbildung 19 E, einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, WIN:  $p = 0,046$ ; Bonferroni-Korrektur: Quadranten: Z *vs.* O:  $p = 0,08$ ; Z *vs.* R:  $p = 0,033$ ; Z *vs.* L:  $p = 0,117$ ).

Therapeutisch mit WIN behandelte Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse schwammen im *Cued-Training* über alle Durchgänge betrachtet signifikant schneller als die Vehikel-Kontrollen (Abbildung 19 B, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung:  $p = 0,032$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN *vs.* Vehikel Tag 1,2,3:  $p = n. s.$ ). Im *Acquisition Training* schwammen therapeutisch mit WIN behandelte Mäuse signifikant schneller als ihre Vehikel-Kontrollen (Abbildung 19 D, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Behandlung:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni-Korrektur: WIN *vs.* Vehikel Tag 1,2:  $p = n. s.$ ; Tag 3:  $p = 0,018$ ; Tag 4:  $p = 0,009$ ; Tag 5:  $p = 0,031$ ). Vehikel-behandelte Tg4-42-Mäuse verringerten ihre Schwimgeschwindigkeit von Tag eins bis fünf signifikant (Abbildung 19 B, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Fluchtzeit:  $p = 0,123$ ; Bonferroni-Korrektur: Vehikel Tag 1 *vs.* 5:  $p = 0,038$ ; WIN Tag 1 *vs.* 5:  $p > 0,99$ ). Diese Beobachtung ließ sich ebenfalls im *Probe Trial* des Water Maze des therapeutischen Behandlungsansatzes feststellen (Abbildung 19 F, ungepaarter t-Test, Behandlung:  $p = 0,012$ ).



**Abbildung 18: Präventive WIN-Therapie verhindert Lerndefizite im räumlichen und Bezugsgedächtnis von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen im Water-Maze-Test**

(A) Präventiv mit WIN- und Vehikel-Lösung behandelte Mäuse konnten ihre mittleren Fluchtzeiten im *Cued Training* signifikant reduzieren, ohne, dass ein Unterschied zwischen den Gruppen bestand. (C) Im *Acquisition Training* lernten mit WIN behandelte Dreimonatsstiere die verborgene Plattform signifikant schneller als ihre Vehikel-Kontrollen zu finden. (E) Im *Probe Trail* zeigten präventiv mit WIN behandelte Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse intaktes räumliches Gedächtnis durch signifikante Präferenz für den Zielquadranten des Water Maze. Mit Vehikel-Lösung behandelte Mäuse bevorzugten keinen Quadranten im *Probe Trial*. Sowohl im *Cued-* als auch im *Acquisition Training* und *Probe Trail* (B, D, F) schwammen mit WIN therapierte Mäuse signifikant schneller als ihre mit Vehikel behandelten Artgenossen. Einfache (E) und zweifache (A, B, C, D) Varianzanalysen mit Bonferroni-korrigierten Messwiederholungen, ungepaarter t-Test (F), \*\*\*\* p < 0,0001; \*\*\* p < 0,001; \*\* p < 0,01; \* p < 0,05. n = 15 – 16. Daten dargestellt als Mittelwerte ± S.E.M.



**Abbildung 19: Therapeutische WIN-Behandlung von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen reduzierten Lerndefizite im räumlichen und Bezugsgedächtnis im Water Maze-Test moderat**

(A) Nur therapeutisch mit WIN behandelte Mäuse konnten ihre mittleren Fluchtzeiten im *Cued Training* signifikant reduzieren. (B) Im *Acquisition Training* lernten mit WIN behandelte der therapeutischen Gruppe die verborgene Plattform signifikant schneller als ihre Vehikel-Kontrollen zu finden. (E) Im *Probe Trial* zeigten therapeutisch mit WIN behandelte T4-42<sub>hom</sub> ein besseres räumliches Gedächtnis als Vehikel-Tiere, da eine moderate Präferenz für den Zielquadranten zu beobachten war. Die mit Vehikel-Lösung behandelten Mäuse zeigten deutliche Defizite im räumlichen Gedächtnis und keine Präferenz für den Zielquadranten im *Probe Trial*. Sowohl im *Cued* als auch im *Acquisition Training* und *Probe Trail* (B, D, F) schwammen mit WIN therapierte Mäuse signifikant schneller als ihre mit Vehikel behandelten Artgenossen. Einfache (E) und zweifache (A, B, C, D) Varianzanalysen mit Bonferroni-korrigierten Messwiederholungen, ungepaarter t-Test (F), \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .  $n = 12 - 14$ . Daten dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.

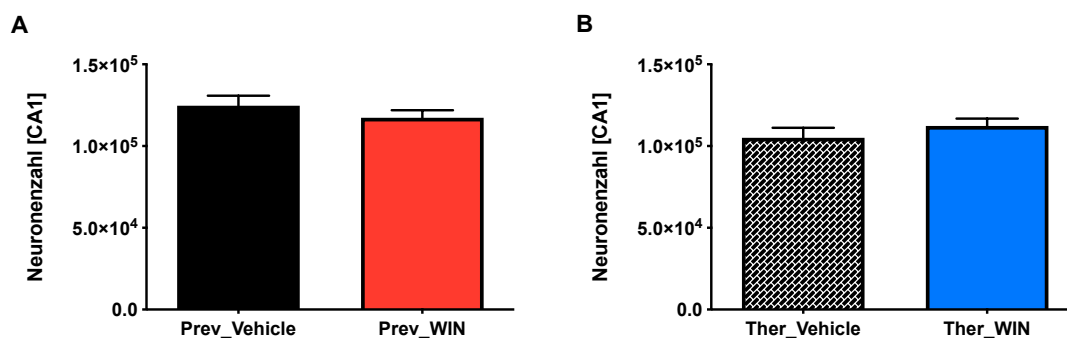


## 3.2 Ergebnisse der Immunhistochemie

### 3.2.1 Ergebnisse der Stereologie und Neurogenese

Präventiv mit WIN behandelte Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse (Abbildung 20 A, Mittelwert  $117287 \pm \text{SEM} \pm 4671$ ,  $n = 14$ ) wiesen keinen signifikanten Unterschied der Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus im Vergleich mit präventiv Vehikel-behandelten transgenen Artgenossen auf (Abbildung 20 A, Mittelwert  $129725$ ,  $\text{SEM} \pm 3856$ ,  $n = 10$ , ungepaarter t-Test, Behandlung:  $p = 0,337$ ).

Therapeutisch mit WIN behandelte Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse (Abbildung 20 B, Mittelwert  $112318 \pm \text{SEM} \pm 15491$ ,  $n = 12$ ) unterscheiden sich in ihrer Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus statistisch nicht von ihren Vehikel-Kontrollen (Abbildung 20 B, Mittelwert  $105007$ ,  $\text{SEM} \pm 22146$ ,  $n = 13$  ungepaarter t-Test, Behandlung:  $p = 0,353$ ).

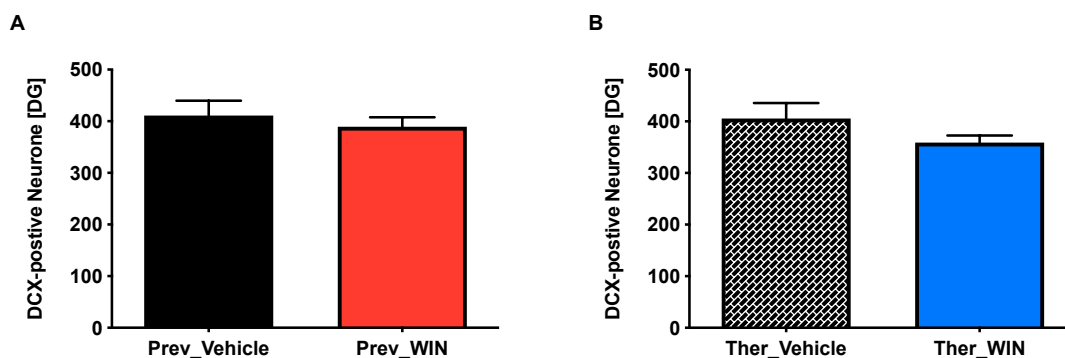


**Abbildung 20: WIN-Therapie zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen**

(A,B) Sowohl präventiv als auch therapeutisch mit WIN behandelte Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse zeigten keinen Unterschied in der Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus auf als ihre Vehikel-Kontrollen. Ungepaarte t-Tests (A, B).  $n = 10 - 14$ . Daten dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.

### 3.2.2 Ergebnisse der Neurogenese-Färbung

Nach einer Auswertung der DCX-positiven Neurone im *Gyrus dentatus* von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen konnte kein Einfluss von präventiver WIN-Therapie auf die Neurogenese nachgewiesen werden (Abbildung 21 A, ungepaarter t-Test, Behandlung:  $p = 0,526$ ). Auch die Mäuse des therapeutischen Behandlungsansatzes unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der Neurogenese im *Gyrus dentatus* von ihren Vehikel-Kontrollen (Abbildung 21 B, ungepaarter t-Test, Behandlung:  $p = 0,153$ ).



**Abbildung 21: Kein Einfluss von WIN-Therapie auf die Neurogenese im Gyrus dentatus von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen**

(A) Der Präventive sowie der therapeutische Behandlungsansatz mit WIN zeigten keinen Einfluss auf die Neurogenese im *Gyrus dentatus* des Hippocampus von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen. Ungepaarte t-Tests (A, B).  $n = 10 - 14$ . Daten dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.

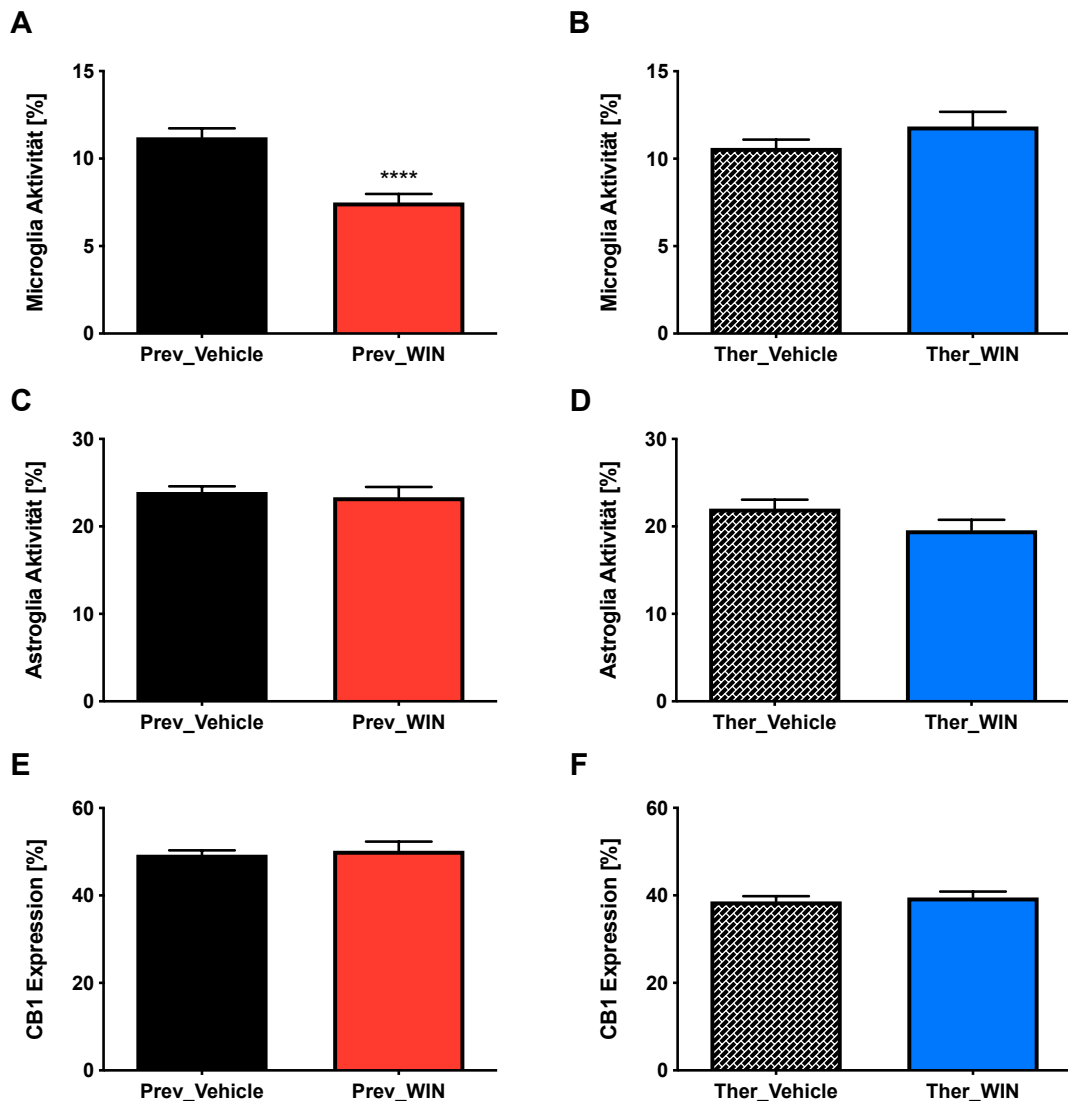
### 3.2.3 Ergebnisse der IBA-1-, GFAP-, CB1-Rezeptor-Färbungen

Um den Einfluss der WIN-Therapie auf Entzündungsreaktion im Cortex der Mäuse zu testen wurde die Aktivität der Mikroglia und Astrozyten über die Marker IBA-1 und GFAP bestimmt, die wesentlich an dieser beteiligt sind (Akiyama et al. 2000).

Präventiv mit WIN therapierte transgene Mäuse zeigten hierbei signifikant geringere mikrogliale Aktivität als ihre Vehikel-Kontrollen (Abbildung 22 A, ungepaarter t-Test, Behandlung:  $p < 0,0001$ ). Therapeutisch mit WIN behandelte Mäuse wiesen keinen Unterschied in der mikroglialen Aktivität im Vergleich zu den Kontrolltieren auf (Abbildung 22 B, ungepaarter t-Test, Behandlung:  $p = 0,216$ ).

Hinsichtlich der astroglialen Aktivität führte die präventive WIN-Therapie zu keiner Veränderung im Cortex der transgenen Mäuse (Abbildung 22 C, ungepaarter t-Test; Behandlung:  $p = 0,663$ ). Auch im therapeutischen Behandlungsansatz konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 22 D, ungepaarter t-Test; Behandlung:  $p = 0,143$ ).

Da WIN als Agonist am CB1-Rezeptor wirkt, wurde die Auswirkung der WIN-Therapie auf die CB1-Rezeptor Expression im Cortex untersucht. Der präventive Behandlungsansatz von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen führte zu keinem Unterschied in der Gruppe (Abbildung 22 E, ungepaarter t-Test, Behandlung:  $p = 0,699$ ). Therapeutische WIN-Behandlung bewirkte ebenfalls keine Veränderung der CB1-Rezeptor Expression in den Mäusen (Abbildung 22 E, ungepaarter t-Test, Behandlung:  $p = 0,634$ ).



**Abbildung 22: Ergebnisse der Quantifizierung der IBA-1-, GFAP- & CB1-Rezeptor Immunhistochemie im Cortex von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen**

(A) Präventiv mit WIN therapierte Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse zeigten in der IBA-1 Quantifizierung verringerte Entzündungsreaktion durch signifikant reduzierte mikrogliale Aktivität im Vergleich zu ihren Vehikel-Kontrollen. (B) Therapeutisch WIN-Behandlung der Mäuse zeigte keinen Unterschied in der IBA-1-Quantifizierung. (C, D) Ein präventiver oder therapeutischer Behandlungsansatz hatte keinen Einfluss auf die Quantifizierung von GFAP im Cortex in Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen. (E, F) Sowohl eine präventive als auch eine therapeutische WIN-Behandlung beeinflusste die CB1-Rezeptor Konzentration im Cortex von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen nicht. Ungepaarte t-Tests (A, B, C, D, E, F), \*\*\*\*  $p < 0,00001$ .  $n = 9 - 10$ . Daten dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.

## 4 Diskussion

Im Mittelpunkt dieser experimentellen Arbeit steht die Frage, ob eine langfristige WIN-Therapie die Alzheimer-Symptomatik im Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell verbessern kann. Zudem sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden, ob eine präventive oder therapeutische WIN-Behandlung die besseren Ergebnisse liefert.

### 4.1 Diskussion der Versuchsergebnisse

#### 4.1.1 Präventive oder therapeutische Behandlung – Welcher Ansatz ist der effektivere?

Der Morbus Alzheimer geht als neurodegenerative Erkrankung mit einem schrittweise verlaufenden Abbau der kognitiven Funktionen der Patient\*innen einher. Ursächlich für den kontinuierlichen Abbau ist die geringe Regenerationsfähigkeit des ZNS, bei dem untergegangene Neurone sich i. d. R. nicht regenerieren können. Der Alzheimer-Demenz wird einerseits mittels Prävention und andererseits mit medikamentöser Therapie begegnet. In dieser Arbeit wurden mit dem präventiven und therapeutischen Behandlungsansatz zwei verschiedene Therapiezeitpunkte, jeweils vor (präventiv) bzw. nach (therapeutisch) Beginn der Symptomatik der Erkrankung, miteinander verglichen. Die Ergebnisse des präventiven Ansatzes zeigten sich deutlich effektiver. Besonders bei den Gedächtnistests des Morris Water Maze zeigte sich der präventive Behandlungsansatz deutlich wirksamer als der therapeutische. Zudem konnte in den histologischen Untersuchungen zusätzlich eine reduzierte entzündliche Aktivität bei den präventiv behandelten Tieren festgestellt werden.

In der Literatur findet sich derzeit keine Arbeit, die eine Therapie der AD mit Cannabinoiden in transgenen Mausmodell zu zwei verschiedenen Zeitpunkten vergleicht. Einige der publizierten Arbeiten untersuchten die Auswirkungen einer Therapie, erst nachdem die AD bei den Therapiemodellen symptomatisch wurden. Die in dieser Arbeit oft erwähnte Publikation von Martin-Moreno et al. (2012) hat beispielsweise die Auswirkungen von WIN auf transgene APP-Mäuse im Alter von 11 Monaten untersucht, einem Mausmodell, das i. d. R. ab einem Alter von sieben Monaten erste Symptome der AD zeigt (Webster et al. 2013). Andere Arbeiten, wie bspw. von Cheng et al. (2014), therapierten transgene APP/PS1-Mäuse bereits früh im Alter von zweieinhalb Monaten mit CBD, jedoch auch für einen Behandlungszeitraum von acht Monaten. Somit lässt sich auch bei dieser Arbeit kein Aussage über den besten Therapiezeitpunkt treffen (Cheng et al. 2014).

Die Behandlung des Morbus Alzheimer ist beim Menschen bis dato rein symptomatisch (DGN 2017). Zudem kommt die Therapie aus einer neurodegenerativen Sichtweise deutlich zu spät. Mangels passender Frühdiagnostik für die Erkrankung können Patient\*innen nicht zu Beginn der Neurodegeneration ausfindig gemacht und therapiert werden. Somit bleibt aus epidemiologischer Sicht einzig die Prävention der AD, bei der vor allem Lifestylefaktoren,

wie Ernährung, Bewegung, sowie Alkohol- und Nikotinkonsum eine Rolle spielen (Crous-Bou et al. 2017).

Ein weiterer Aspekt ist korrekte Dosisfindung. Die in dieser Arbeit verwendete Dosis von 0,2 mg/kg WIN beruht auf den guten Ergebnissen von Martin-Moreno et al. (2012). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass bei Martin-Moreno et al. (2012) das WIN oral und in dieser Arbeit intraperitoneal appliziert wurde. Von Tzavara et al. (2003) ist bekannt, dass WIN *in vivo* i. p. appliziert in geringen Dosierungen (0,5 mg/kg) aktivierende Effekte und in hohen Dosierungen (5 mg/kg) inhibitorische Effekte auf den Hippocampus ausübt. Zudem haben die, hier zum Vergleich, zitierten Arbeiten WIN in sehr breiten Dosierungen von 0,25 – 6 mg/kg eingesetzt, die jedoch alle höher waren als die 0,2 mg/kg dieser Arbeit. Von sehr hohen Dosierungen, wie 6 mg/kg, ist in Anbetracht der Ergebnisse von Tzavara et al. (2003) und möglicher Nebenwirkungen eher abzusehen. Dennoch wäre es denkbar, die Dosis an WIN auf z. B. 0,5 mg/kg zu erhöhen und mögliche positive Effekte auf die Verhaltensversuche und besonders auf die histologischen Untersuchungen zu erlangen.

#### **4.1.2 Eine Therapie mit WIN hat keinen negativen Effekt auf das Körpergewicht von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen**

Im Rahmen der Therapie wurde das Gewicht der Versuchstiere wöchentlich überwacht, um den Einfluss von WIN auf den Stoffwechsel der Mäuse erfassen zu können. Hinsichtlich des Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodells ist bekannt, dass die Tiere im Vergleich mit WT-Mäusen bereits frühzeitig an Gewicht verlieren (Hinteregger et al. 2021). Menschen, die an Morbus Alzheimer erkranken verlieren im Verlauf der Erkrankung ebenfalls an Gewicht (Wolf-Klein et al. 1992). Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, dass Cannabinoide in ihrer akuten Wirkung appetitsteigernd wirken können (Kirkham 2009). In der Studie von Volicer et al. (1997) wurde erfolgreich THC eingesetzt, um einem Gewichtsverlust von AD-Patient\*innen entgegenzuwirken, die eine Nahrungsaufnahme verweigerten. Sinnayah et al. (2008) konnten zeigen, dass die Injektion von 1mg/kg WIN die Nahrungsaufnahme in den Stunden nach der Injektion in WT-Mäusen steigern kann. Eine Entwicklung des Gesamtkörpergewichts wurde in dieser Studie nicht untersucht (Sinnayah et al. 2008).

Jedoch ist ebenfalls bekannt, dass insbesondere die Wirkung des CB1/CB2-Rezeptoragonisten THC in der chronischen Anwendung in hoher (2,5 mg/kg THC) bzw. steigender Dosierung (1-10 mg/kg THC) bei WT-Ratten einen Gewichtsverlust zur Folge hat (Sjödén et al. 1973; Klein et al. 2011).

Bei den in dieser Arbeit präventiv mit WIN behandelten Tieren konnte kein Unterschied im Gewicht festgestellt werden. Lediglich die Vehikel-behandelten Tiere konnten ihr Gewicht von Therapiebeginn im Vergleich mit Therapieende signifikant steigern. Ein anderes Bild ergab sich jedoch für die therapeutische WIN-Gruppe, die bereits vor Beginn der Therapie ein signifikant höheres Körpergewicht als die Kontrollgruppe aufwies. Im Verlauf der Testung verloren die mit WIN therapierten Mäuse signifikant an Körpergewicht und

näherten sich dem Gewicht der Kontrollgruppe an, doch blieb der Unterschied statistisch signifikant. Dennoch wiesen alle vier Behandlungsgruppen kurz vor der Entnahme im Alter von 26 Wochen keine Unterschiede im Körpergewicht auf. Da der Gewichtsunterschied jedoch bereits vor Beginn der Therapie bestand, ist dieser wahrscheinlich nicht auf das WIN zurückzuführen und könnte am ehesten auf einer zufällig ungleichmäßigen Verteilung der Mäuse in den Versuchsgruppen beruhen. Mäuse, die unter präventiver bzw. therapeutischer WIN-Therapie zeigten unverändertes bzw. signifikant reduziertes Körpergewicht unter der Therapie. Somit bewirkt die WIN-Therapie in dieser Arbeit keinen steigernden Effekt auf das Körpergewicht. Im Vergleich des Körpergewichts der vier Behandlungsgruppen kurz vor der Entnahme der Tiere zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht. Somit ist davon auszugehen, dass die WIN-Therapie keinen kritischen Gewichtsverlust bedingt, sondern die Mäuse des therapeutischen Ansatzes sich dem Normalgewicht unter der WIN-Therapie annäherten. Die Daten zeigen zudem, dass die gewählte Dosis von den Tieren hinsichtlich des Stoffwechsels gut toleriert wurde. Der in der Literatur beschriebene Gewichtsverlust unter langfristiger Cannabinoid-Therapie ist mutmaßlich erst bei höheren Dosierungen als die verwendeten 0,2 mg/kg WIN zu erwarten.

#### **4.1.3 WIN-Therapie beeinflusst die Motorik von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen**

Bei Alzheimer-Patient\*innen sind motorische Einschränkungen bis hin zur Agitation insbesondere im Endstadium der Erkrankung bekannt (Buchman und Bennett 2011; Koenig et al. 2016). Auch in den verschiedenen Mausmodellen des Morbus Alzheimer konnten altersabhängige motorische Defizite im Rahmen der Neurodegeneration nachgewiesen werden (Wagner et al. 2019). Das Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell wurde von Wagner et al. (2019) auf die motorischen Funktionen in Abhängigkeit des Alters untersucht. Im Alter von drei Monaten zeigten die Mäuse keine Einschränkungen, im Alter von sieben Monaten waren der Gleichgewichtssinn und die Koordination eingeschränkt. Die generelle motorische Aktivität sowie die Muskelkraft sind im Alter von sieben Monaten intakt (Wagner et al. 2019). Diese Ergebnisse sind mit den Tests in dieser Arbeit gut vergleichbar, da die Verhaltenstests in beiden Therapieansätzen im Alter von sechs Monaten durchgeführt wurden.

Mehrfach wurde in der Literatur dargelegt, dass das Endocannabinoidsystem Auswirkungen auf die Motorik, die synaptische Plastizität und das motorische Lernen hat (Heifets und Castillo 2009; El Manira und Kyriakatos 2010). CB1- und CB2- Rezeptoren wurden auch in für die Motorik wichtigen Hirnabschnitten wie dem Kleinhirn oder den Basalganglien gefunden (Fernández-Ruiz und Gonzáles 2005). Zudem konnte der Nachweis einer biphasischen Wirkung pflanzlicher, synthetischer und endogener Cannabinoide auf die motorische Aktivität nachgewiesen werden (McGregor et al. 1996; Sulcova et al. 1998; Sañudo-Peña et al. 2000). Hierbei wurden bei hohen Dosierungen von Cannabinoiden hypoaktive Effekte bis hin zur Katalepsie, und bei niedrigen Dosen hyperaktive

Auswirkungen auf die Versuchstiere beschrieben. Kataleptische Effekte wurden vermehrt bei der Applikation von THC ab einer Dosis von 4 mg/kg beobachtet, eine Dosierung, die trotz der höheren Bindungsaffinität von WIN an den Cannabinoid-Rezeptoren deutlich höher als die in dieser Arbeit verwendete Dosierung von 0,2 mg/kg WIN eingestuft werden muss (Prescott et al. 1992; Lichtman et al. 2001). Für WIN wurde diese kataleptische Wirkung als nicht so ausgeprägt beschrieben. Drews et al. (2005) konnten in Ratten einen hyperaktiven Effekt mit einer Dosierung von 0,6 mg/kg WIN in Ratten im Open Field nachvollziehen. Eine höhere Dosierung (1,8 mg/kg) zeigte jedoch keine hypoaktiven Effekte auf die Motorik der Tiere (Drews et al. 2005).

Im Morris Water Maze kann durch die Erfassung der Schwimgeschwindigkeit eine Aussage über die Motorik gegeben werden (Vorhees und Williams 2006). Hierbei schwammen sowohl präventiv als auch therapeutisch mit WIN behandelte Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse in allen Testläufen signifikant schneller als ihre Kontrollen. In den Angsttests wurde die Bewegung der Tiere in den Versuchsaufbauten als Kontrollvariable für Bewegung im Testaufbau erfasst. Das Open Field eignet sich jedoch beispielsweise auch für die Messung der allgemeinen lokomotorischen Aktivität der Tiere (Seibenhener und Wooten 2015). Im EPM legten mit WIN behandelte transgene und WT-Mäuse im Trend mehr Distanz zurück als die Vehikel-Kontrolltiere, wobei sich die Gruppen nicht unterschieden. In der DLB wechselten lediglich die WT-Mäuse unabhängig von der Therapie signifikant häufiger zwischen den Bereichen als die transgenen Tiere. Die Erfassung der zurückgelegten Distanz im OF ist für die Motorik der Tiere der Angsttests am aussagekräftigsten. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tg4-42- und WT-Mäusen beider Behandlungsansätze. Jedoch fiel bei allen Angsttests auf, dass sich transgene oder WT-Mäuse, die mit WIN behandelt wurden, in der Tendenz mehr Distanz als die Vehikel-Kontrolltiere zurücklegten. Zusammenfassend lassen sich in den Angsttests geringfügige Einflüsse von WIN auf die Motorik nachweisen. Die prokinetischen Effekte der Therapie sind hingegen nicht so ausgeprägt wie im Morris Water Maze. Zudem zeigt der Vergleich mit WT-Mäusen, dass diese im gleichen Maß mit Bewegungssteigerung auf die WIN-Therapie reagieren wie die Tg4-42<sub>hom</sub>.

Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von WIN auf das motorische Lernen und die Koordination mithilfe des Rotarod-Tests erfasst (Shiotsuki et al. 2010). Wagner et al. (2019) beschrieben eine deutlich reduzierte Rotarod-Performance von Tg4-42<sub>hom</sub> im Alter vom sieben Monaten im Vergleich mit WT-Mäusen und dem 5xFAD-Mausmodell. Das Körpergewicht ist als potentieller Störfaktor für das Rotarod zu beachten. Höheres Körpergewicht, insbesondere Übergewicht, geht mit einer deutlich verringerten Performance im Rotarod einher (Mao et al. 2015). Die präventiven Behandlungsgruppen waren davon unbeeinflusst, da sich ihr Körpergewicht nicht unterschied. In der therapeutischen Behandlungsgruppe waren die Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse durch ihr höheres Körpergewicht zum Testzeitpunkt (ca. Lebenswoche 24) im Nachteil.

Insgesamt stimmt die Leistung der Tg4-42-Mäuse im Rotarod in dieser Arbeit sehr gut mit den Leistungsdaten von Wagner et al. (2019) überein. Folglich liegt auch bei den transgenen Mäusen dieser Arbeit eine Einschränkung der Koordination und der motorischen Lernfähigkeit vor. Präventiv mit WIN behandelte Mäuse waren insgesamt ihren Vehikel-Kontrollen im Rotarod unterlegen. Bei den therapeutisch mit WIN behandelten Tieren zeigte sich ein anderes Bild. Besonders am ersten Tag des Tests hielten sich die mit WIN behandelten Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse signifikant länger auf der Rolle des Rotarod und konnten sich folglich schneller an die neue Situation adaptieren. Aufgrund eines starken Lernzuwachses der Vehikel-Kontrollen am zweiten Tag des Rotarod egalisierte sich die Performance beider Gruppen. Das geringere Körpergewicht der therapeutisch Vehikel-behandelten Mäuse könnte für diese Gruppe im Vergleich mit den therapeutischen Tg4-42-Tieren theoretisch von Vorteil gewesen sein (Mao et al. 2015). Die unterschiedlichen Lernzuwächse der Vehikel- und der WIN-Gruppe im therapeutischen Ansatz sind sehr interessant, dennoch zeigten die Tiere am Ende eine vergleichbare Performance. Daher muss über das gesamte Rotarod gesehen von einer ähnlichen motorischen Lernfähigkeit der Tiere ausgegangen werden. Zusammenfassend hat die WIN-Therapie positive Effekte auf das motorische Lernen am ersten Tag des Rotarod in der therapeutischen Gruppe. In der präventiven Behandlungsgruppe sind keine positiven Effekte auf die Rotarod-Performance zu erkennen.

In der Literatur findet sich eine Arbeit, in der Martini et al. (2010) mit einer deutlich höheren Konzentration von WIN (3 mg/kg) einen negativen Einfluss auf die Performance der WT-Mäuse im Rotarod feststellten. Dieser Effekt lässt sich wahrscheinlich mit der hypomotorischen Wirkung dieser hohen Dosis WIN erklären (Martini et al. 2010). Arévalo-Marin et al. (2003) untersuchten den Effekt der synthetischen Cannabinoide WIN (CB1/CB2-Agonist) ACEA (CB1-Agonist) und JWH-015 (CB2-Agonist) auf das motorische Verhalten in einem Mausmodell für die Multiple Sklerose. Alle Stoffe wurden über zehn Tage i. p. in steigender Dosierung verabreicht (WIN: 2,5mg/kg - 5mg/kg; ACEA: 1,25 mg/kg – 2,5 mg/kg; JWH: 0,6 mg/kg – 1,2 mg/kg). Alle Therapeutika konnten die Performance der Mäuse im Rotarod direkt nach der Behandlung sowie 25 Tage nach der Therapie signifikant verbessern. Die Autor\*innen führten die Beobachtungen auf eine direkte Wirkung der Cannabinoide auf die Motorneurone, sowie auf eine gleichzeitig beobachtete reduzierte Entzündungsaktivität im ZNS der Tiere zurück (Arévalo-Martín et al. 2003). Dass sich die Cannabinoid-Therapie von Arévalo-Marin et al. (2003) effektiv gezeigt hat, könnte mit der mehr als zehnfach höheren Dosierung des WIN begründet werden.

Zusammenfassend zeigt sich im Morris Water Maze und z. T. in den Angsttests, dass die Dosis von 0,2 mg/kg WIN die in der Literatur bereits beschriebenen prokinetischen Effekte in den Mäusen zur Folge hat. Der Vergleich mit den WT-Mäusen in den Angsttests zeigt, dass auch die WT-Mäuse mit ähnlichen prokinetischen Effekten auf das WIN-Therapie reagierten. Bei Betrachtung der WT-Vehikel-Mäuse in den Angsttests, insbesondere im OF, wird ebenso deutlich, dass die Tg4-42<sub>hom</sub> unter einer WIN-Therapie nicht hyperaktiv werden. Auf der anderen Seite spiegeln die prokinetischen Effekte sich nicht in einer verbesserten



motorischen Koordinationsfähigkeit der Tiere im Rotarod wieder, die insgesamt in dem Mausmodell im Rahmen der Alzheimer-Pathologie deutlich eingeschränkt ist (Wagner et al. 2019). Beachtlich ist, dass die Effekte in der präventiven, wie auch in der therapeutischen Behandlungsgruppe auftraten und WIN somit akute sowie nachhaltige Effekte auf die Motorik der Tiere ausübt. Besonders im präventiven Therapieansatz scheint sich die WIN-Therapie sich auf die Pathologie im Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell auszuwirken und mehrere Monate später in den Verhaltenstests messbare Unterschiede zu bewirken.

Die Ursachen für die beobachteten Effekte sind weitestgehend ungeklärt. Durch Lopez-Noguerola et al. (2018) ist bekannt, dass sich das A $\beta$ <sub>4-42</sub> im Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell auch in motorisch wichtigen Bereichen wie dem Rückenmark abgelagert. Der Einfluss von WIN über den CB1-Rezeptor in diesem Bereich könnte an den Ergebnissen mitverantwortlich sein. Auch eine modifizierte Entzündungsreaktion, wie von Arévalo-Marín et al. (2003) beschrieben, könnte die Effekte teilweise erklären, wenngleich einschränkend beachtet werden muss, dass die Studie mit der Multiplen Sklerose ein anderes Krankheitsbild untersucht hat. Weiterhin könnte auch eine deutlich höhere Dosierung von WIN, wie in den zitierten Arbeiten, deutliche Effekte auf die Motorik bedingen.

#### **4.1.4 Eine Therapie mit WIN hat keinen negativen Effekt auf das Angstverhalten von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen**

Alzheimer-Patient\*innen können unter einer Vielzahl von neuropsychologischen Symptomen leiden, z. B. unter Angstzuständen, Enthemmungen oder Depressionen (Lyketsos et al. 2002). Einige Betroffene ziehen sich zurück und zeigen mitunter agitiertes Verhalten, während andere eher antriebsgesteigert sind und vereinzelt sozial inakzeptables Verhalten zeigen (Mega et al. 1996).

Das Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell wurde hinsichtlich des Angstverhaltens von Bouter (2015) und von Hinteregger et al. (2021) unter anderem im Elevated Plus Maze und Open Field untersucht. Hierbei wurden in beiden Arbeiten keine Veränderungen im Angstverhalten der Tiere beschrieben. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass in dem Mausmodell kein intraneuronales A $\beta$  im Bereich der Amygdala nachweisbar war, das solch ein Verhalten auslösen würde (España et al. 2010). Jedoch sind Einflüsse des Endocannabinoidsystems auf das Angstverhalten in der Literatur vielfach beschrieben (Viveros et al. 2005; Lutz et al. 2015). Die Therapie mit WIN könnte daher auch in Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell zu solchen Verhaltensauffälligkeiten führen und damit eine wichtige Störvariable in der Gedächtnistestung darstellen (Harrison et al. 2009). Daher wurde der Einfluss von einer WIN-Therapie auf das Angstverhalten der Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse mithilfe von verschiedenen etablierten Angsttests experimentell analysiert. Um die Ergebnisse besser einschätzen zu können, wurden auch WT-Mäuse mit WIN- bzw. Vehikel-Lösung behandelt und mit den transgenen Tieren verglichen.

In keinem der drei Angsttests (EPM, DLB und OF) in dieser Arbeit konnte WIN, unabhängig vom Behandlungsansatz, einen signifikanten Unterschied im Angstverhalten in der transgenen oder in der Wildtyp-Gruppe bedingen. Lediglich zwischen der WT- und der Tg4-42-Gruppe zeigten sich besonders im präventiven Behandlungsansatz Unterschiede, die sich z. T. signifikant darstellten. Die Unterschiede waren jedoch nicht konsistent, da die transgenen Mäuse im EPM in der Tendenz reduziertes ängstliches Verhalten und in der DLB und im OF eher ängstlicheres Verhalten als die WT-Tiere zeigten. Die Gründe für diese Inkonsistenz sind nicht klar ersichtlich. In einem Review von Mohammad et al. (2016) wird vielfach dargelegt, wie in einer Mauslinie verschiedene Angsttests (u. a. OF, EPM und DLB) inkonsistente Ergebnisse lieferten. Dies führt zu der Erkenntnis, dass die Testung auf Angst problembehaftet ist und durch viele in- und extrinsische Faktoren beeinflusst wird (Mohammad et al. 2016). Eine Untersuchung von WIN auf das Angstverhalten mit deutlich größeren Versuchsgruppen könnte klarere Ergebnisse bringen (Mohammad et al. 2016). Insgesamt zeigte sich kein Hinweis auf eine Induktion von Angstzuständen in Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen durch WIN, welches im Weiteren einen nachhaltigen Einfluss auf die Gedächtnistestung in dieser Arbeit ausschließt.

Die Applikation von 0,25 mg/kg WIN führte in einer Studie von Ghasemi et al. (2017) in einem Rattenmodell für die posttraumatische Belastungsstörung zu einer Verringerung der Angstreaktionen der Tiere. In dieser Studie wurden das EPM und die DLB als Tests verwandt, jedoch bekamen die Ratten nur drei Injektionen mit WIN (Ghasemi et al. 2017). Lisboa et al. (2018) untersuchten die Wirkung von 1 mg/kg WIN auf das Angstverhalten in einem Mausmodell für psychosozialen Stress im OF und EPM. Hierbei konnten die Autor\*innen eine Reduktion von Angstverhalten durch die WIN-Therapie beobachten (Lisboa et al. 2018). Lisboa et al. (2018) führten ihren Mäusen eine fünffach höhere Dosierung WIN zu. Die von Ghasemi et al. (2017) und von Lisboa et al. (2018) gewählten Tiermodelle sind speziell für die Angstforschung etabliert und damit nur eingeschränkt mit dem Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell vergleichbar. Frontera et al. (2018) haben den Effekt einer fünftägigen WIN-Therapie (3 mg/kg ab dem 21. Lebenstag) in der Adoleszenz von WT-Mäusen unter anderem auf das Angstverhalten im EPM und OF untersucht. Sie konnten hierbei im OF ängstlicheres Verhalten der mit WIN behandelten Tiere beobachten, während sich im EPM keine Unterschiede im Angstverhalten zeigten. Zudem war ein nachhaltiger Effekt auf die neuronale Entwicklung der Mäuse zu beobachten (Frontera et al. 2018). Aufgrund des deutlich früheren Behandlungsbeginns, der kurzen Behandlungsdauer und der deutlich höheren Dosierung von WIN ist die Studie von Frontera et al. (2018) mit den Ergebnissen dieser Arbeit nur eingeschränkt vergleichbar.

Im Menschen sind für Cannabinoide, insbesondere das THC, verschiedene Wirkungen auf die Angstempfindung beschrieben. Neben entspannenden, angstlösenden Wirkungen können auch akute Angstzustände bis hin zu Psychosen durch den Konsum ausgelöst werden (Tambaro und Bortolato 2012). Auf der anderen Seite werden Wirkstoffe, wie THC und CBD unter kontrollierten Bedingungen auch als Therapie für Angststörungen erprobt

(Tambaro und Bortolato 2012; Sharpe et al. 2020). In einer Metaanalyse haben Ruthirakuhan et al. (2019) die Effekte von natürlichen und chemischen Cannabinoiden auf die Agitation und Aggression bei AD-Patient\*innen untersucht. Die Autor\*innen sehen leichte Verbesserungen durch Cannabinoide in Bezug auf die Agitiertheit und die Aggression, jedoch war die Behandlung auch mit einer erhöhten Sedierung der Patient\*innen verbunden (Ruthirakuhan et al. 2019). Die Beobachtung, dass keine Angstzustände durch die Cannabinoid-Therapie induziert wurden, deckt sich mit den Beobachtungen in dieser Arbeit.

Das Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell ist kein Angstmodell, da dies eine schwerwiegende Störvariable in der Gedächtnistestung der Tiere darstellen würde. Zudem induziert die WIN-Therapie keine akute Angst bei den Tieren in dieser Arbeit. Wie bei Ghasemi et al. (2017), Lisboa et al. (2018) und Frontera et al. (2018) beschrieben kann WIN auf das Angstverhalten, insbesondere im Jungendalter, Einfluss nehmen. Die gewählte Dosierung liegt zumindest bei Ghasemi et al. (2017) sehr nah an der in dieser Arbeit gewählten therapeutischen Dosis. Um einen Effekt in Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen mit diesen Tests messen zu können, müsste die Dosis WIN mutmaßlich deutlich höher angesetzt werden. Weiterhin haben Metaanalysen gezeigt, dass die Angstforschung in Nagetieren problembehaftet, zum Teil schlecht reproduzierbar ist und erst in Versuchsansätzen mit sehr hoher Stückzahl (N) aussagekräftig wird (Mohammad et al. 2016). Zudem zeigen Cannabinoide bei Alzheimer-Patient\*innen mit Angststörungen keine gute Wirkung, weshalb die Effekte auf das Gedächtnis eine zentrale Rolle in der Erforschung der Cannabinoide spielen (Ruthirakuhan et al. 2019).

#### **4.1.5 WIN-Therapie verbessert das räumliche Bezugsgedächtnis von Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen**

Progredienter Gedächtnisverlust steht im Zentrum der Alzheimer-Symptomatik (McKhann et al. 2011). Um Therapien der Erkrankung zu untersuchen, muss auch ein Mausmodell Gedächtnisstörungen abbilden. Das Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell zeigt progrediente altersabhängige Gedächtnisdefizite, die sich im Alter von drei Monaten noch nicht, jedoch im Alter von sechs Monaten in Verhaltenstests nachweisen lassen (Antonios et al. 2015). Das Endocannabinoidsystem übt über den CB1-Rezeptor nachhaltigen Einfluss auf das Lernverhalten und das Gedächtnis aus (Kruk-Slomka et al. 2017). Abhängig von der Versuchsdurchführung, Applikation und Dosierung von Cannabinoiden wurden in einem Review von Kruk-Slomka et al. (2017) positive und negative Beobachtungen in Bezug auf das Lernverhalten zusammengefasst.

Ein in der Alzheimer-Forschung etablierter Test für die Bewertung des Gedächtnisses ist das Morris Water Maze (MWM). Die Aufgabe, im Water Maze zu navigieren, ist komplex, da mehrere kognitive Prozesse gleichzeitig erforderlich sind: Anpassung an eine neue und stressige Situation, Löschen ineffektiver Suchstrategien, Lokalisierung der Fluchtplattform anhand räumlicher Hinweise und Kodierung von Informationen in das Langzeitgedächtnis

(Tanila 2012). Das MWM ermöglicht die Unterscheidung zwischen abhängigem räumlichem Lernen und langfristigem räumlichem Bezugsgedächtnis. Das *Acquisition Training* und der *Probe Trial* stellen relativ spezifische Tests für die Funktionalität des Hippocampus dar (Morris 1984), einer der am stärksten betroffenen Hirnregionen beim Morbus Alzheimer (West 1993). Da die Tg4-42<sub>hom</sub>-Mauslinie einen massiven und progredienten Nervenzellverlust aufweisen, ist das MWM als Test für das Gedächtnis dieser Tiere besonders gut geeignet (Antonios et al. 2015).

Darüber hinaus können insbesondere im *Cued Training* die visuelle und motorische Leistung bei dieser Verhaltensaufgabe bewertet werden. Die Ergebnisse der getesteten Mäuse zeigen, dass alle Gruppen die motorischen und visuellen Voraussetzungen für das MWM erfüllten. Da im *Cued Training* die Plattform für die Tiere sichtbar markiert war, mussten die Tiere sich nicht an die Position erinnern. Folglich ist für das *Cued Training* kein intakter Hippocampus nötig, denn vielmehr wird das *Corpus striatum* bei dem Test auf seine Funktion geprüft (Morris et al. 1982; Lee et al. 2008). Da das Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell keinen signifikanten Nervenzellverlust in diesem Bereich aufweist, sind somit die ähnlichen Fluchtzeiten der Mäuse beider Behandlungsgruppen gut zu erklären (Antonios et al. 2015).

Die Ergebnisse der präventiven Gruppe des *Acquisition Trainings* legen dar, dass die mit WIN behandelten Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse, im Gegensatz zu ihren Vehikel-Kontrollen, ihre mittleren Fluchtzeiten von Tag eins im Vergleich mit Tag fünf signifikant reduzieren konnten. Dies spricht für ein intaktes räumliches Bezugsgedächtnis bei WIN-Tieren. Bei den therapeutisch behandelten Mäusen ist die Ergebnislage etwas anders. Die WIN- und die Kontroll-Mäuse konnten ihre mittleren Fluchtzeiten von Tag eins zu Tag fünf verringern, jedoch nicht signifikant. Ein Behandlungseffekt von WIN auf die Tg4-42-Mäuse zeigte sich durch die kürzeren Fluchtzeiten über alle fünf Tage verglichen mit den Vehikel-Kontrollen, was ebenfalls auf ein besseres räumliches Bezugsgedächtnis zurückzuführen ist.

Der *Probe Trial* untersuchte das räumliche Bezugsgedächtnis der Tiere. In der präventiven und therapeutischen Gruppe zeigten die mit Vehikel behandelten Mäuse im *Probe Trial* keine Präferenz für den Zielquadranten und somit deutliche Defizite im räumlichen Bezugsgedächtnis. Die therapeutisch behandelten WIN-Mäuse zeigten eine schwache Präferenz für den Zielquadranten im *Probe Trial*. In der präventiven Gruppe zeigten sich eindeutigere Ergebnisse. Hier suchten die präventiv mit WIN behandelten Mäuse im Vergleich mit allen anderen Quadranten signifikant länger im Zielquadranten nach der Plattform. Daraus ist zu schließen, dass therapeutisch behandelte Mäuse eine eingeschränkte, aber durch die WIN-Therapie bessere Gedächtnisleistung als die Kontrolltiere aufwiesen. Die präventive WIN-Therapie konnte die Gedächtniseinschränkungen der Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse verhindern.

Positive Einflüsse von WIN konnten auch von Martin-Moreno et al. (2011) und von Ramirez et al. (2005) im Morris Water Maze in ähnlichen Dosierungen (0,5 mg/kg) an Mäusen bzw. Ratten nachgewiesen werden. Beide Arbeiten verwendeten pharmakologische Modelle des

Morbus Alzheimer, bei der A $\beta$ -Peptide intraventrikulär injiziert wurden. Zudem war das MWM in beiden Arbeiten mit fünf Tagen kürzer und ohne *Probe Trial* angelegt. Martin-Moreno et al. (2011) konnten in derselben Arbeit auch einen positiven Effekt von 20 mg/kg des CB2-Rezeptoragonisten CBD im Water Maze beobachten. Bilkei-Gorzo et al. (2017) konnten zudem zeigen, dass eine chronisch applizierte, niedrige Dosis von 3 mg/kg des CB1/CB2-Rezeptorantagonisten THC das räumliche Bezugsgedächtnis im MWM von gealterten WT-Mäusen (12 bzw. 18 Monate) wiederherstellen konnte. Zwar wurde hier kein Modell für die AD untersucht, dennoch kommt es auch in gealterten WT-Mäusen zur Neurodegeneration und Veränderungen des Endocannabinoidsystems (Bilkei-Gorzo et al. 2017).

In einer weiteren Arbeit untersuchten Martin-Moreno et al. (2012) die Effekte von oral applizierten 0,2 mg/kg WIN und JWH-133 (JWH), einem selektiven CB2-Rezeptoragonisten, auf elf Monate alte, transgene APP-Mäuse im *Novel Object Recognition Task* (NORT). Das NORT ist ein häufig verwendeter Test, bei dem die Tiere in eine Arena gleich dem OF mit zwei identischen Objekten gesetzt werden und beobachtet wird, wie lange sie sich mit diesen auseinandersetzen. Am zweiten Tag des Tests wird eins der Objekte ersetzt und natürlicherweise sollten die Tiere das alte Objekt wiedererkennen und sich mit dem neuen Objekt länger beschäftigen (Broadbent et al. 2010). Interessanterweise konnte nur mit JWH-133 ein positiver Effekt in dem Test nachgewiesen werden, was im Gegensatz zu den Ergebnissen in dieser Arbeit steht.

Die Behandlung mit den Cannabinoiden fand bei Martin-Moreno et al. (2012) über vier Monate, also im Vergleich deutlich länger als in dieser Arbeit, statt. Die kognitiven Defizite treten im transgenen APP-Mausmodell zudem deutlich später auf als im Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell, dennoch könnte der Testzeitpunkt im Alter von elf Monaten bei Martin-Moreno et al. (2012) zu spät gewählt worden sein, damit WIN seine neuroprotektive Wirkung hätte entfalten können. Andererseits könnte die orale Applikation zu schlechterer Bioverfügbarkeit des WIN im Vergleich mit der intraperitonealen Injektion, wie in dieser Arbeit, geführt haben. Dennoch ist erstaunlich, dass JWH-133 als selektiver CB2-Rezeptoragonist eine positive Wirkung erzielen konnte, obwohl auch WIN als CB1/CB2-Agonist diesen Rezeptor ebenfalls binden kann (Howlett et al. 2002). Martin-Moreno et al. (2012) deuten diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der Aktivierung des CB1-Rezeptors durch WIN und folgende negative Effekte auf das Lernverhalten und die Motorik der APP-Mäuse. Im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit ist die Argumentation von Martin-Moreno et al. (2012) jedoch nicht nachvollziehbar, da sich durch die Gabe von WIN das Lernverhalten der Tg4-42<sub>hom</sub> verbesserte und die Motorik der Tiere in dieser Arbeit eher aktiviert wurde.

Die Schwimmgeschwindigkeit der Mäuse im MWM stellt im *Cued- und Acquisition Training* einen Störfaktor dar, da die Tiere durch schnelleres Schwimmen ihre Fluchtzeiten verkürzen können (Tanila 2012). Um den Einfluss der Schwimmgeschwindigkeit auf die Fluchtzeiten

auszuklammern, wäre eine Analyse der Schwimmstrategie nötig. Im *Probe Trial* ist der Einfluss der Schwimmgeschwindigkeit als untergeordnet zu betrachten, da keine Fluchtzeiten angegeben wurden, sondern die prozentuale Aufenthaltsdauer in den Quadranten über den immer gleichen Zeitraum ermittelt wurde (Vorhees und Williams 2006). Hinsichtlich der Ergebnisse zeigt sich, dass sowohl präventiv als auch therapeutisch mit WIN behandelte Mäuse im *Cued-* und *Acquisition Training* und im *Probe Trial* signifikant schneller schwammen als die Vehikel-Kontrollen. Einerseits zeigen diese Ergebnisse einen deutlichen Einfluss der WIN-Therapie auf die Motorik der Tg4-42-Mäuse. Andererseits sind die Ergebnisse insbesondere des *Acquisition Trainings* unter Berücksichtigung der Schwimmgeschwindigkeit zu interpretieren. In der präventiven Behandlungsgruppe sind die Unterschiede in den Fluchtzeiten so deutlich, dass sie durch die höhere Schwimmgeschwindigkeit allein nicht zu erklären wären. Zudem verringerten sich die Fluchtzeiten der präventiven WIN-Mäuse, während der Unterschied in der Schwimmgeschwindigkeit konstant blieb. Somit liegt nahe, dass bei dieser Gruppe die kürzeren Fluchtzeiten auch durch effizienter Schwimmstrategien und besserer räumlicher Orientierung bedingt werden. In der Gruppe der therapeutisch behandelten Tg4-42-Mäuse sind die Unterschiede der Fluchtzeiten im *Acquisition Training* im Vergleich geringer. Somit bleibt unklar, ob die kürzeren Fluchtzeiten der WIN-Mäuse durch die Schwimmgeschwindigkeit oder bessere räumliche Orientierung bedingt sind. Dennoch bleibt der Lerneffekt innerhalb der therapeutischen WIN- bzw. Vehikel-Gruppe im *Acquisition Training* davon unabhängig.

Die zuvor zitierten Arbeiten von Martin-Moreno et al. (2011) und von Ramirez et al. (2005) geben leider keine Schwimmgeschwindigkeiten im MWM an. Tomas-Roig et al. (2017) haben WT-Mäuse in der Adoleszenz-Phase drei Wochen (5. – 8. Lebenswoche) lang mit entweder 0,5 mg/kg, 1 mg/kg oder 3 mg/kg WIN behandelt und nach einer Entzugsphase in der 13. Lebenswoche im MWM getestet. Interessanterweise wiesen alle mit WIN behandelten Tiere eine signifikant geringe Schwimmgeschwindigkeit als die Kontrollen auf, ohne jedoch Unterschiede in den Fluchtzeiten zu zeigen. Mäuse, die mit 0,5 mg/kg WIN behandelt worden waren, schwammen hierbei am langsamsten. Die Autor\*innen konnten diese Beobachtung jedoch nicht auf Defizite in der motorischen Aktivität zurückführen (Tomas-Roig et al. 2017). Aufgrund der ähnlichen WIN-Dosis sind diese Ergebnisse sehr interessant, da sie im Gegensatz zu jenen in dieser Arbeit stehen. Da die WT-Mäuse dieser Arbeit im MWM ebenfalls eine erhöhte Schwimmgeschwindigkeit boten (Daten sind in dieser Arbeit nicht gezeigt), scheint der Entwicklungsstand des Gehirns zur Zeit der Therapie mit WIN, jugendlich oder erwachsen, eine zentrale Rolle für diese Betrachtung zu spielen. Dieser negative Einfluss von WIN auf adoleszente Gehirne wurde auch von Abboussi et al. (2014) beschrieben, die einen negativen Einfluss von 1mg/kg WIN auf adoleszente, jedoch nicht auf adulte, WT-Ratten im MWM beobachteten.

Zusammenfassend führte eine Behandlung mit WIN im Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell im therapeutischen Behandlungsansatz zu leichten Verbesserungen und im präventiven Ansatz zu deutlicher Verbesserung der Gedächtnisleistung. Da das MWM stark vom Hippocampus anhängig ist (Morris 1984), könnte dieser bei den Tieren des präventiven Behandlungsansatzes von der A $\beta$ <sub>4-42</sub>-Pathologie weniger stark geschädigt worden sein als jener der Vergleichstiere. Der frühere Behandlungszeitpunkt scheint hierbei von zentraler Bedeutung für den Erhalt der kognitiven Fähigkeiten der Mäuse zu sein. Der beobachtete Effekt ist am ehesten auf die neuroprotektive Funktion des CB1-Rezeptors mit verbesserter synaptischer Plastizität und über die CB2-Rezeptor-vermittelte reduzierte Neuroinflammation zu erklären (Marchalant et al. 2009). Auf die Effekte auf zellulärer Ebene wird im nächsten Abschnitt eingegangen. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse von Bilkei-Gorzo et al. (2017) hinsichtlich des THC, dass auch andere Cannabinoide, die über dieselben Rezeptoren wie WIN wirken, vielversprechende Ergebnisse bei Therapie der altersbedingten Neurodegeneration liefern.

#### **4.1.6 WIN-Therapie hat keinen Einfluss auf den Nervenzellverlust und die Neurogenese in Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen**

Der Hippocampus hat beim Menschen wichtigen Einfluss auf Lernprozesse, wie auf die Gedächtniskonsolidierung, also der Überführung von Information vom Kurz- ins Langzeitgedächtnis (Duyckaerts et al. 2009). Zudem ist nachgewiesen, dass die Pyramidenzellen in der CA1-Region bei Tieren eine zentrale Rolle bei der räumlichen Orientierung spielen (Nakazawa et al. 2004). Der *Gyrus dentatus* im Hippocampus ist weiterhin eine der wenigen Regionen im adulten ZNS von Säugetieren, in dem Neurogenese stattfindet (Altman und Das 1965). Bei der Alzheimer-Pathologie kommt es neben anderen Hirnregionen besonders im Hippocampus zu signifikanten Nervenzellverlusten (West et al. 1991). Im Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell sorgt die Expression von A $\beta$ <sub>4-42</sub> für signifikanten Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus. Zu Therapiebeginn im Alter von drei Monaten weisen unbehandelte Tg4-42-Mäuse keinen und zum Testzeitpunkt im Alter von sechs Monaten einen Nervenzellverlust von ca. 50% in der CA1-Region auf (Antonios et al. 2015).

Die Therapie mit WIN konnte weder im präventiven noch im therapeutischen Behandlungsansatz den Nervenzellverlust in der CA1-Region im Vergleich mit den Kontrollmäusen vermindern. Besonders im präventiven Behandlungsansatz können die guten Ergebnisse der WIN-Mäuse im Morris Water Maze daher nicht mit geringerem Nervenzellverlust erklärt werden. Dennoch stehen die guten Ergebnisse im MWM und der Nervenzellverlust nicht im Widerspruch zueinander. Broadbent et al. (2004) haben gezeigt, dass das räumliche Bezugsgedächtnis im MWM in Ratten erst ab einer Läsionsgröße von ca. 30 – 50% des Hippocampus geschädigt wird. Moser et al. (1995) konnten zudem zeigen, dass

räumliches Lernen in Ratten im MWM sogar noch mit 30% Restvolumen an Hippocampus möglich ist, sofern sich der gesunde Rest am septalen Pol des Hippocampus befindet. Somit es denkbar, dass der Nervenzellverlust von 50% im Hippocampus der Tg4-42<sub>hom</sub> von Tieren mithilfe der präventiven WIN-Therapie kompensiert werden konnte (Moser et al. 1995; Broadbent et al. 2004).

Auf der anderen Seite wurde bereits gezeigt, dass junge Mäuse des Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodells im Alter von drei Monaten pathologische neuronale Auffälligkeiten zeigen. Dietrich et al. (2018) konnten zeigen, dass drei Monate alte Tg4-42<sub>hom</sub> synaptische Übererregbarkeit und reduzierte synaptische Plastizität im Hippocampus aufweisen. Bouter et al. (2019) wiesen einen reduzierten Glukosemetabolismus im Hippocampus im FDG-PET in älteren (7 – 8 Monate), sowie in jüngeren (3 – 4 Monate) Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen nach. Zwar sind die guten Ergebnisse des Morris Water Maze nicht durch den Nervenzellverlust zu erklären, dennoch könnten die synaptische Plastizität und der neuronale Glukosemetabolismus weitere Ansätze sein, um die positiven Auswirkungen einer WIN-Therapie im Mausmodell zu untersuchen.

In der Literatur haben lediglich Ramirez et al. (2005) den Einfluss von WIN auf den Nervenzellverlust mit einer ähnlichen Dosis in einem pharmakologischen Alzheimer-Rattenmodell untersucht. In der Arbeit konnte WIN den Nervenzellverlust vermindern, doch interpretierten die Autor\*innen diesen anhand von neuronalen Markern (Ramírez et al. 2005). Zur Bestimmung des Nervenzellverlustes ist die Stereologie als deutlich genauer und valider als die Bestimmung neuronaler Marker einzuschätzen (Zhao und van Praag 2020). Zudem ist bei diesem pharmakologischen Rattenmodell kein Nervenzellverlust im Hippocampus beschrieben (Pavía et al. 2000). In einer weitere Studie konnte, in einem Mausmodell für den Morbus Parkinson, mit stereologischen Methoden ein positiver Effekt von 4 mg/kg WIN auf den Nervenzellverlust in der Substantia nigra gezeigt werden (Price et al. 2009).

Eine beeinträchtigte Neurogenese findet bei der Alzheimer-Erkrankung vermutlich schon früher als der Nervenzellverlust statt und kann eine Rolle bei der Initiierung und dem Fortschreiten der Neuropathologie spielen (Lazarov und Marr 2010). Es wird angenommen, dass die Neurogenese im erwachsenen Gehirn eine Rolle bei zahlreichen Formen und Aspekten des Lernens und Gedächtnisses spielt und zur Plastizität des Hippocampus beiträgt (Lazarov und Marr 2010). In gealterten Tg4-42-Mäusen ist das Gen für den Neurogenesemarker Doublecortin herunterreguliert (Bouter et al. 2014). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass physische Aktivität die Neurogenese im *Gyrus dentatus* von Tg4-42-Mäusen vermehrt (Gerberding et al. 2019). Zudem ist bekannt, dass das Endocannabinoidsystem eine wichtige Rolle in die Neurogenese im jugend- und besonders im Embryonalalter spielt (Oliveira et al. 2019). Aber auch in adulten Individuen kann das ECS über die Cannabinoidrezeptoren Einfluss auf die Neurogenese nehmen (Oliveira et al. 2019).



Die Therapie mit WIN in dieser Arbeit hatte im präventiven und therapeutischen Behandlungsansatz keine Auswirkungen auf die Neurogenese der Tg4-42-Mäuse im Vergleich mit den Kontrolltieren. Marchalant et al. (2009) konnten die altersbedingte reduzierte Neurogenese in 23 Monate alten WT-Ratten mit einer Dosis von 2 mg/kg WIN über vier Wochen steigern. In einem pharmakologischen AD-Rattenmodell konnten Esposito et al. (2011) positive Effekte von 20 mg/kg CBD auf die Neurogenese beobachten. Abboussi et al. (2014) haben den Einfluss von 1 mg/kg WIN über 20 Tage auf die Neurogenese in jugendlichen und erwachsenen WT-Ratten untersucht und beobachtet, dass bei den jugendlichen Ratten die Neurogenese im Hippocampus reduziert war. Bei den erwachsenen Tieren konnte jedoch kein Unterschied in der Neurogenese zu den Vehikel-Tieren festgestellt werden (Abboussi et al. 2014). Steel et al. (2014) konnten ähnliche Ergebnisse bei jugendlichen WT-Ratten mit 6 mg/kg THC beobachten. Bei den jugendlichen Tieren waren unter der Cannabinoid-Therapie zudem die Neurogenese und die Neuroplastizität vermindert (Steel et al. 2014).

Die in der Literatur beschriebenen positiven Effekte von Cannabinoiden, speziell von WIN, auf den Nervenzellverlust und die Neurogenese konnten in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden. Dies könnte am ehesten durch die sehr geringe Dosierung von WIN (0,2 mg/kg) bedingt sein. Es ist daher anzunehmen, dass sich bei höherer Dosis auch Auswirkungen auf die histologischen Ergebnisse ergeben hätten. Dennoch stimmen die Daten der Neurogenese mit jenen von Abboussi et al. (2014) überein, die ebenfalls keinen Einfluss von WIN auf die Neurogenese in adulten Tieren feststellen konnten. Insgesamt können die vielversprechenden Ergebnisse aus den Verhaltensversuchen jedoch nicht mit der Neurogenese oder dem Nervenzellverlust erklärt werden.

#### **4.1.7 WIN-Therapie hat keinen Einfluss auf die CB1-Rezeptor Expression in Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen**

Der Hippocampus ist eine der Strukturen mit der höchsten Expression des CB1-Rezeptors im ZNS (Howlett et al. 2002). Die Bindung des Rezeptors aktiviert verschiedene Signalkaskaden, wie die Hemmung der Adenylatzyklase, die Aktivierung verschiedener Kinase-Pathways und die Wirkung auf spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (Zou und Kumar 2018). Unter anderem wurde auch eine, bei der AD-Therapie interessante, neuroprotektive Wirkung beschrieben (Kim et al. 2006; Zoppi et al. 2011). Untersuchungen von Solas et al. (2013) haben jedoch gezeigt, dass keine Korrelation zwischen der CB1-Expression und dem kognitiven Status von AD-Patient\*innen besteht. Zudem ist die Datenlage hinsichtlich der Expression des CB1-Rezeptors in AD-Gehirnen kontrovers (Solas et al. 2013; Ahmad et al. 2014). Da WIN als potenter Agonist am CB1-Rezeptor seine Wirkung entfaltet, wurde die Expression im Hippocampus der Tg4-42-Mäuse bestimmt.

Bei der Untersuchung ergab sich weder im präventiven noch im therapeutischen Behandlungsansatz ein Unterschied in der CB1-Expression in den Tg4-42<sub>hom</sub>. Im präventiven Ansatz stimmen die Ergebnisse mit denen aus der Literatur überein. Mehrfach wurde beschrieben, dass sich die CB1-Expression nach chronischer Gabe von THC oder WIN innerhalb von zwei bis vier Wochen in Menschen und Mäusen normalisiert (Sim-Selley et al. 2006; Hirvonen et al. 2012). Da die präventive Behandlung der Tiere ca. zwei Monate vor der Entnahme stattfand, sind die Ergebnisse vermutlich dadurch zu erklären.

Im therapeutischen Ansatz stehen die vorliegenden Daten in der CB1-Rezeptor Expression zu jenen aus der Literatur im Widerspruch. Mehrfach wurde beschrieben, dass eine akute, langfristige Therapie mit THC oder WIN die CB1-Rezeptor-Expression reaktiv senkt (Breivogel et al. 1999; Sim-Selley 2003; Sim-Selley et al. 2006; Lazenka et al. 2014; Silva et al. 2015). Es ist jedoch anzumerken, dass alle zitierten Arbeiten mindestens die zehnfache Dosis an WIN oder THC in ihren Arbeiten verwendeten. Weiter könnten Untersuchungen mit Methoden zum Nachweisen auf subzellulärer Ebene (z. B. Northern Blots und Immunoblots) zu Ergebnissen führen, die auf histologischer Ebene nicht nachweisbar sind. Zudem wurde bei chronischer Cannabinoid-Applikation eine Toleranzentwicklung, wahrscheinlich durch Herunterregulierung des CB1-Rezeptors im Hippocampus der Tiere, beschrieben (Sim-Selley 2003). Die Herunterregulierung ist hierbei in den ersten 21 Tagen der Therapie am stärksten ausgeprägt (Zhuang et al. 1998; Breivogel et al. 1999). Dies könnte erklären warum die CB1-Rezeptorexpression in den Tieren dieser Arbeit nach 42 Tagen Therapie wieder annähernd normal erscheint. Letztendlich lässt die Bestimmung der CB1-Rezeptorexpression aber keine Rückschlüsse auf die kognitive Leistungsfähigkeit der Tiere zu und steht deshalb nicht in Widerspruch zu den guten Ergebnissen aus dem Morris Water Maze.

#### **4.1.8 WIN-Therapie reduziert die mikrogliale, aber nicht die astrogliale Aktivität in Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen**

Die Neuroinflammation ist ein zentraler Bestandteil in der Pathologie des Morbus Alzheimer (Tuppo und Arias 2005). Die Entzündungsreaktion ist komplex und inkludiert verschiedene Signalwege und Prozesse. Neben anderen Prozessen stehen aktivierte Mikroglia und Astrozyten als zelluläre Immunantwort im Zentrum der A $\beta$ -induzierten Entzündungsreaktion (Tuppo und Arias 2005). Auch das Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell weist ab dem zweiten Lebensmonat bereits Mikrogliose und Astrogliose im Hippocampus auf (Bouter et al. 2014). Die vornehmlich CB2-Rezeptor-vermittelte antiinflammatorische Wirkung von WIN und weiteren Cannabinoiden wurde mehrfach beschrieben (Ramírez et al. 2005; Martín-Moreno et al. 2011; Martín-Moreno et al. 2012; Turcotte et al. 2016).

Astrozyten erfüllen im ZNS Funktionen, wie die Beteiligung an der Blut-Hirn-Schranke, die Aufrechterhaltung der Homöostase sowie eine Stützfunktion für die Neurone. Sie sind jedoch auch immunologisch von Bedeutung, da sie Zytokine und Chemokine freisetzen, die

sowohl eine schützende als auch eine toxische Rolle in neuroinflammatorischen Prozessen spielen (van Kralingen et al. 2013). Zudem exprimieren Astrozyten den CB2-Rezeptor, der unter anderem zur Kommunikation mit Neuronen mittels Endocannabinoiden dient (Navarrete und Araque 2008). In der AD-Pathologie finden sich aktivierte Astrozyten entlang der senilen Plaques geschädigter Neurone, die die Phagozytose von A $\beta$  fördern. In diesem Zustand, der als Astroglieose bezeichnet wird, exprimieren die Astrozyten vermehrt das saure Gliafaserprotein (GFAP) (Medeiros und LaFerla 2013). Die Ergebnisse der Untersuchung in dieser Arbeit zeigen, dass WIN, weder im präventiven noch im therapeutischen Behandlungsansatz, Einfluss auf die astrogliale Aktivität bewirkte.

Aguirre-Rueda et al. (2015) behandelten kultivierte A $\beta_{1-42}$ -Astrozyten mit WIN und beobachteten eine reduzierte entzündliche Reaktion mit geringerer Zytokinausschüttung und positiven Effekten auf die Lebensfähigkeit der Astrozyten. Zudem waren der PPAR- $\gamma$ -Rezeptor und die pro-inflammatorische Genexpression vermindert, sowie das antioxidativ wirkende Enzym Superoxiddismutase (Cu/Zn SOD) vermehrt exprimiert (Aguirre-Rueda et al. 2015). PPAR- $\gamma$ - und CB1-Rezeptor-vermittelte entzündungshemmende Wirkungen einer geringen Dosis WIN wurden auch in einem pharmakologischen AD-Rattenmodell beobachtet (Fakhfour et al. 2012). Dass in dieser Arbeit kein Effekt von WIN auf die GFAP-positive Zellintensität festgestellt werden konnte, deckt sich mit den Beobachtungen von Martín-Moreno et al. (2012). Martín-Moreno et al. (2012) haben ebenfalls den Einfluss von 0,2 mg/kg WIN im transgenen APP-Mausmodell mit immunhistochemischer GFAP-Färbung untersucht und keinen signifikanten Effekt auf die Astroglieose beobachten können. Die Autor\*innen schließen daraus, dass bei dem verwendeten Mausmodell in dem gewählten Alter (elf Monate) eine Mikroglieose vorlag. Jedoch lag nach der Interpretation der Autor\*innen keine Astroglieose vor, was auf die Abwesenheit von Plaques in dem Mausmodell zurückgeführt wurde (Martín-Moreno et al. 2012).

Im präventiven Behandlungsansatz könnte sich in der therapiefreien Zeit bis zur Entnahme der Mäuse die Astroglieose wieder dem Niveau der Vehikel-Kontrollen angeglichen haben. Im therapeutischen Behandlungsansatz wäre daher eher ein Effekt zu erwarten gewesen. Es ist denkbar, dass dieser Effekt bei der gewählten Dosierung nicht so ausgeprägt war, dass er in immunhistochemischen Färbungen darstellbar wäre. Andererseits ist die Entzündungsreaktion komplex und die zitierten Arbeiten haben weitere Signalkaskaden und Genexpressionen mit z. T. sensitiveren Methoden, wie bspw. Western Blots untersucht. Es ist gut vorstellbar, dass sich in diesem Versuchsansatz mit weiteren Untersuchungen dieser Art Effekte von WIN auf Astrozyten nachweisen lassen könnten.

Mikroglia sind Gliazellen des ZNS und als Teil des mononukleär-phagozytären Systems an der zellulären Immunantwort beteiligt. Bei Traumata oder Erkrankungen des ZNS werden sie aus ihrem Ruhezustand heraus durch Zytokine und Chemokine aktiviert und können zum Läsionsort migrieren und dort durch Phagozytose und Zytokinsignale die Immunantwort modulieren (Kinney et al. 2018). Bei der AD-Pathologie phagozytieren aktivierte Mikroglia

A $\beta$  und setzen wegen der fortwährenden Aktivierung eine Reihe von entzündungsfördernden und toxischen Stoffen frei. Zudem exprimieren sie vermehrt das Protein IBA-1. Durch Zytokine angezogen sammeln sich mit der Zeit sich immer mehr aktivierte Mikroglia an den Plaques. Gleichzeitig hypertrophieren die Zellen und der Abbau von A $\beta$  wird zunehmend ineffizient (Kinney et al. 2018). Mikroglia exprimieren auf ihrer Oberfläche den CB1-Rezeptor, aber besonders durch die Aktivierung vermehrt den CB2-Rezeptor, der durch die Bindung von Cannabinoiden zu geringerer Aktivierung von Mikroglia insgesamt, zu gesteigerter Phagozytose und zu reduzierter Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine führt (Stella 2010; Cassano et al. 2017).

Die Therapie mit WIN konnte im präventiven Behandlungsansatz die mikrogliale Aktivität im Hippocampus der Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse signifikant verringern. Im therapeutischen Behandlungsansatz zeigte sich im Vergleich mit den Kontrolltieren kein Unterschied. Ramirez et al. (2005) wiesen erstmals eine reduzierte mikrogliale Aktivierung von mit A $\beta$  inkubierten Zellen durch WIN *in vitro* nach. Fakhouri et al. (2012) beschrieben eine durch WIN reduzierte Expression von entzündungsfördernden Stoffen, wie TNF- $\alpha$ , aktivierter Caspase-3 und nuklearem NF $\kappa$ B im Hippocampus von Ratten mit A $\beta$ -induzierter Neurodegeneration. Martín-Moreno et al. (2012) beschrieben ebenfalls eine reduzierte Expression der Entzündungsmarker TNF- $\alpha$  und COX-2 im Hippocampus von transgenen APP-Mäusen. Interessanterweise konnte WIN keine signifikante Reduktion der IBA-1-positiven Zelldichte in dem Mausmodell bedingen. Die Studie ist sehr gut mit dieser Arbeit vergleichbar, da sie ebenfalls mit einem transgenen Mausmodell, der gleichen Konzentration an WIN (0,2 mg/kg) und den gleichen immunhistochemischen Färbemethoden gearbeitet hat. Anhand der anderen Ergebnisse, die mit Western Blots und quantitativer *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) angefertigt worden sind, konnten die Autor\*innen die reduzierte Entzündungsreaktion und mikrogliale Aktivität belegen (Martín-Moreno et al. 2012).

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine geringere Mikroglialose in den Verhaltenstests zu besserem Lernen beiträgt, was sich in der Überlegenheit der präventiven gegenüber der therapeutischen Gruppe im Morris Water Maze widerspiegelt. Dass die mikrogliale Aktivität in der präventiven Gruppe signifikant geringer war als die der Vehikel-Kontrollen, zeigt weiterhin den deutlichen positiven Einfluss der WIN-Therapie auf die Entzündungsreaktion und passt zu den Erkenntnissen der Arbeiten aus der Literatur. Somit zeigt sich auf histologischer Ebene ein Korrelat zu den guten Ergebnissen der präventiven Gruppe aus den Verhaltenstests, insbesondere dem Water Maze. Da zwischen der WIN-Therapie und der Entnahme der Tiere ca. zwei Monate liegen, belegt das den nachhaltigen Einfluss der Therapie auf neuronale Entzündungsreaktion im präventiven Behandlungsansatz.

## 4.2 WIN - eine Therapieoption für den Morbus Alzheimer?

Cannabinoide haben in Hinblick auf neue Therapieoptionen für die Alzheimer-Demenz präklinisch bereits vielversprechende Ergebnisse gezeigt. In dieser Arbeit wurde mit WIN erstmals ein synthetisches Cannabinoid in einem Modell für die sporadische Alzheimer-Erkrankung untersucht. Neben den positiven Effekten des Therapeutikums stand besonders der Zeitpunkt der Therapie, präventiv oder therapeutisch, im Vordergrund des Projekts. In Zusammenschau der Ergebnisse der Untersuchungen zeigt sich folgendes Bild: im therapeutischen Behandlungsansatz zeigten sich im Vergleich mit den Kontrollmäusen keine Effekte auf das Angstverhalten und auf das motorische Lernen. Die histologischen Untersuchungen zeigten keine Einflüsse auf den Nervenzellverlust im Hippocampus, auf die Neurogenese im *Gyrus dentatus*, oder auf die CB1-Rezeptorexpression im Cortex, sowie auf die mikrogliale oder astrogliale Aktivität im Cortex der Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse. Nachweisen ließen sich prokinetische Effekte in der Motorik und eine leichte Verbesserung des räumlichen Bezugsgedächtnisses im Morris Water Maze. Somit ergibt sich, dass der therapeutische Behandlungsansatz zunächst keine negativen Folgen für die Mäuse hat, auf der anderen Seite aber nur leicht positive Effekte auf die AD-Pathologie bewirkt. Da zu Therapiebeginn bei den Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen im Mittel bereits ein Nervenzellverlust von 43% in der CA1-Region des Hippocampus vorliegt, kommt die WIN-Therapie wohlmöglich zu spät, um signifikante Veränderungen zu bewirken (Antonios et al. 2015). Jedoch könnte eine höhere Dosierung von WIN in diesem Ansatz zu besseren Ergebnissen führen.

Im präventiven Behandlungsansatz zeigten sich im Vergleich mit den Vehikel-Kontrollen eher negative Effekte auf das motorische Lernen im Rotarod. Zudem waren keine Effekte auf das Angstverhalten, auf den Nervenzellverlust im Hippocampus, auf die Neurogenese im *Gyrus dentatus*, auf die CB1-Rezeptorexpression im Cortex, sowie auf die astrogliale Aktivität im Cortex der Tiere zu beobachten. Weiterhin war ein prokinetischer Effekt von WIN nachweisbar. Behandlungserfolge durch das WIN konnten in Bezug auf die verminderte mikrogliale Aktivierung im Cortex und in Bezug auf das deutlich verbesserte räumliche Bezugsgedächtnis im Morris Water Maze beobachtet werden. Diese Resultate lassen die Schlussfolgerung zu, dass der präventive Behandlungsansatz, der deutlich wirksamere ist. Diese Ergebnisse passen auch zu dem Verständnis des Morbus Alzheimer als kontinuierlichem, neurodegenerativen Erkrankungsprozess, bei dem ein frühes Eingreifen aufgrund der Irreparabilität von bereits untergegangenen Nervengewebe die besten Ergebnisse zeigt (Rasmussen und Langerman 2019).

Trotz der guten funktionalen Ergebnisse der WIN-Therapie konnte der Nervenzellverlust nicht signifikant aufgehoben werden. Einerseits ist durch die niedrige Dosierung von WIN auch von weniger Nebenwirkungen in den Tieren auszugehen, andererseits gibt die Literatur Anlass zu der Hypothese, dass höhere Dosen noch effektivere Ergebnisse erzielen könnten (Esposito et al. 2006; Marchalant et al. 2009; Price et al. 2009). Dennoch hat sich WIN auch in der Dosis von 0,2 mg/kg bereits als effektiv gezeigt (Martín-Moreno et al. 2012). Es wurde

belegt, dass auch THC in z. T. sehr geringer Dosierung (0,002 mg/kg und 3 mg/kg) bereits einen positiven Effekt auf gealterte Mäuse ausübt (Bilkei-Gorzo et al. 2017; Sarne et al. 2018). Diese Wirksamkeit bereits in geringer Dosis unterstreicht das enorme Potential von Cannabinoiden, insbesondere der CB1/CB2-Rezeptoragonisten.

Über den Wirkmechanismus von WIN lassen sich auf Basis der vorliegenden Ergebnisse nur eingeschränkt Aussagen treffen. In dieser Arbeit nachgewiesen ist eine wahrscheinlich CB2-vermittelte verringerte mikrogliale Aktivität im präventiven Ansatz, die zu geringerer Entzündungsreaktion geführt hat. Um weitere Aussagen über die Entzündungsreaktion zu treffen, reichen die histologischen Methoden nicht aus. Hierbei müssten weitere Untersuchungen mit Nachweisen auf zellulärer Ebene durchgeführt werden. Beispielsweise wären die Zytokin- und Chemokinexpression, oxidativer Stress und verschiedener Signalwege, wie der PPAR- $\gamma$ -Signalweg, von Interesse (Fakhfour et al. 2012). Die CB1-vermittelte Neuroprotektion von WIN konnte im Nervenzellverlust nicht nachvollzogen werden. Dennoch könnte WIN sich über diesen Signalweg auf die synaptische Plastizität und die Genexpression in den Nerven ausgewirkt haben, was durch weitere Untersuchungen zu eruieren wäre.

### 4.3 Ausblick

Der Bedarf an neuen Therapieoptionen für die Alzheimer-Demenz ist groß. Angesichts der demografischen Entwicklung und der gestiegenen Lebenserwartung werden in Zukunft deutlich mehr Menschen von der Erkrankung betroffen sein. Mit Memantine wurde 2002 das letzte Mal ein Medikament für die Therapie von Alzheimer in Deutschland zugelassen (Sastre und Sherriff 2003). Die klinische Alzheimerforschung hat sich kürzlich auf die Immuntherapie gegen A $\beta$  konzentriert. Antikörperpräparate wie Solanezumab, Gantenerumab und Aducanumab galten in Phase-3-Studien mit Alzheimer-Patient\*innen im frühen Stadium als gescheitert (Mullard 2019). Erneute Auswertungen der Studienergebnisse ergaben bei Aducanumab Hinweise für eine Wirksamkeit, sodass die Zulassung 2021 unter Auflagen in den USA erfolgte (Kuller und Lopez 2021). Trotzdem scheint auch die Immuntherapie nicht in der Lage zu sein, den Morbus Alzheimer kurativ zu therapieren. Es wird von vielen Seiten vermutet, dass auch die Therapie im frühen Stadium der AD zu spät kommt und die Patient\*innen zur Prognoseverbesserung bereits vor Ausbruch der Erkrankung therapiert werden müssten (Holtzman et al. 2011; Rasmussen und Langerman 2019). Der präventive Behandlungsansatz der vorliegenden Arbeit greift genau an diesem Punkt an. Die Erkrankung ist in den Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäusen zu Beginn der Therapie noch nicht in Form von kognitiven Defiziten nachweisbar (Antonios et al. 2015). Dennoch zeigt der präventive Behandlungsansatz im Vergleich dem späteren therapeutischen Ansatz in dieser Arbeit die deutlich besseren Ergebnisse. Dies unterstreicht, dass das untergegangene Nervengewebe in der AD nicht kompensiert werden kann und eine frühe Therapie entscheidend ist. Um bei asymptomatischen Patient\*innen eine Alzheimer-Erkrankung zu

erkennen, muss sich jedoch die Früherkennung weiter verbessern. Bisher gibt es die Möglichkeit eines Amyloid-PET-CT oder eines FDG-PET-CT, bei dem Amyloid-Ablagerungen bzw. der Glukosestoffwechsel im Gehirn evaluiert werden können und z. T. schon Jahre vor dem Ausbruch der Erkrankung auffällig sind (Mosconi et al. 2010; Suppiah et al. 2019). Wegen der Strahlungsbelastung und der hohen Kosten der Untersuchung eignet sich das PET-CT jedoch nicht als Screening-Methode. Ein anderes invasives Diagnostikum, das z. T. schon vor dem Ausbruch erhöht sein kann, ist der Nachweis von A $\beta$  und Tau im Liquor (McKhann et al. 2011). Vielversprechende Ansätze für die Früherkennung liefert der Blut-Nachweis des Proteins Plasma-p-tau217, das einerseits sehr spezifisch für Alzheimer ist und andererseits bei Mutationsträgern für die AD bereits sehr früh im Plasma der Patient\*innen nachweisbar ist (Palmqvist et al. 2020). Ebenfalls erfolgsversprechend für die Früherkennung ist der Nachweis von fehlgefaltetem A $\beta$  im Blutplasma mittels eines speziellen Infrarot-Sensors (Stockmann et al. 2020). Sollten diese Testmethoden Marktreife erlangen, könnten sie einzeln oder in Kombination aufgrund der geringen Invasivität und vergleichsweise geringer Kosten der Schlüssel zu einer erfolgreichen Früherkennung der AD sein.

Cannabinoide erfreuen sich derzeit wachsender Aufmerksamkeit. In den letzten Jahren wurde THC in einigen Teilen der USA legalisiert und auch in Europa ist der Konsum in einigen Staaten erlaubt (Hall und Lynskey 2020). Auch in Deutschland werden die Forderungen lauter, den Besitz und Konsum und von THC straffrei zu gestalten. In der Medizin wurde das THC vor allem als Schmerzmittel mit antiemetischer Wirkung bei onkologischen Patient\*innen wiederentdeckt (Whiting et al. 2015). Wegen seiner entspannenden Wirkung findet es zudem gelegentlich Anwendung bei Schlafstörungen, Angststörungen und dem Tourette-Syndrom (Whiting et al. 2015). CBD, das ohne psychoaktive Wirkung und in Deutschland frei verkäuflich ist, wird u. a. wegen seiner vermeintlich entzündungshemmenden und relaxierenden Wirkung stark nachgefragt (Manthey 2019). Die Unbedenklichkeit von CBD haben wir in unserem Labor mit denselben Verhaltenstests wie in diesem Projekt bereits nachgewiesen (Schleicher et al. 2019). Neben der Alzheimer-Forschung werden Cannabinoide aktuell auch bei anderen neurodegenerativen und psychiatrischen Erkrankungen, sowie in der onkologischen Forschung weiter untersucht (Koppel et al. 2014; Dzierzanowski 2019).

WIN entfaltet im Vergleich mit THC dasselbe Wirkspektrum, kann jedoch aufgrund der höheren Rezeptoraffinität in geringen Dosierungen verabreicht werden und so möglicherweise weniger Nebenwirkungen hervorrufen (Tai und Fantegrossi 2014). In Bezug auf WIN ist noch weitere Forschung bezüglich der Dosisfindung nötig. Im selben Zug sollten auch die Nebenwirkungen, in diesem Fall die prokinetischen Effekte der WIN-Therapie, weiter untersucht werden. Zur genaueren Interpretation der Ergebnisse des Water Maze wird eine Analyse der Schwimmstrategien der Tiere von Nutzen sein. Aufgrund der beobachteten negativen Effekte von WIN und THC in der Adoleszenz-Phase sollte der präventive Behandlungsansatz vornehmlich in adulten Organismen weiter erforscht werden

(Abboussi et al. 2014; Steel et al. 2014; Johnson et al. 2019). Weiterhin müssen die neuroprotektiven Wirkmechanismen der Cannabinoide, speziell von WIN, und die Effekte auf die Neuroinflammation weiter untersucht werden. Bevor klinische Testungen mit den Stoffen möglich sind, sollte auch in weiteren transgenen AD-Mausmodellen die Wirksamkeit belegt werden. Anschließend wäre auch eine klinische Testung denkbar.

Sollte diese Forschung erfolgreich sein, so könnte es zukünftig sein, dass sich bei entsprechender Früherkennung eine Cannabinoid-Therapie in das gesamtheitliche Behandlungskonzept bestehend aus Prävention, Früherkennung und leitliniengerechter Therapie einfügt.



## 5 Zusammenfassung

Aufgrund der gestiegenen Lebenserwartung und der demographischen Entwicklung der Bevölkerung steigt die Prävalenz von dementiellen Erkrankungen stetig an. Der Morbus Alzheimer kann, als häufigste Ursache eine Demenzerkrankung, wegen schlechter Früherkennungsmöglichkeiten und fehlender Therapiemöglichkeiten nicht kausal behandelt werden. Unter Berufung auf die modifizierte Amyloid-Hypothese wurde das Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell entwickelt, in dem lösliches A $\beta$ <sub>4-42</sub> die Alzheimer-Pathologie auslöst. Da dies ohne die Mutationen der familiären AD auskommt, bildet es die wesentlichen Merkmale der sporadischen AD ab. Die Mäuse entwickeln starken Nervenzellverlust und Gliose im Hippocampus und dadurch Defizite des Gedächtnisses und der Motorik.

Mit dem besseren Verständnis des Endocannabinoidsystems und seiner Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen gilt den Cannabinoiden in der präklinischen AD-Forschung gesteigerter Aufmerksamkeit. Der in der Literatur beschriebene neuroprotektive Effekt der Cannabinoide sollte in dieser Arbeit im Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell untersucht werden. Als Therapeutikum wurde das synthetische Cannabinoid WIN-55,212-2, ein gemischter CB1/CB2-Rezeptoragonist mit hoher Rezeptoraffinität, in einer Dosierung von 0,2 mg/kg über 42 Tage verwendet. Neben der Wirksamkeit der WIN-Therapie sollte in dieser Arbeit zudem der Hypothese nachgegangen werden, ob eine frühe, präventive Therapie der Mäuse bessere Behandlungsergebnisse zeigt als eine spätere, therapeutische Behandlung. Die Therapie des präventiven Behandlungsansatzes startete im Alter von drei Monaten, in dem die Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse weder Nervenzellverlust noch kognitive Defizite aufwiesen. Bei Start des therapeutischen Ansatzes im Alter von fünf Monaten wiesen die Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse bereits einen deutlichen Nervenzellverlust und leichte kognitive Defizite auf. Das Gewicht wurde während der Therapie überwacht. Zur Beurteilung des kognitiven Status wurden verschiedene Verhaltenstests in beiden Ansätzen im Alter von sechs Monaten durchgeführt. Für das Angstverhalten wurden das Elevated Plus Maze, die Dark Light Box und das Open Field, für das motorische Lernen das Rotarod und für das Gedächtnis das Morris Water Maze durchgeführt. Nach der Entnahme der Gehirne wurde die Neurogenese im *Gyrus dentatus* und der Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus mittels design-basierter Stereologie bestimmt. Mit immunhistochemischen Färbungen gegen IBA-1, GFAP und CB1 wurden die mikrogliale und die astrogliale, sowie die CB1-Rezeptorexpression mit photometrischer Quantifizierung im Cortex erfasst.

Die Ergebnisse im therapeutischen Behandlungsansatz zeigten keine Effekte auf das Angstverhalten, das motorische Lernen, den Nervenzellverlust im Hippocampus, die Neurogenese im *Gyrus dentatus*, die CB1-Rezeptorexpression sowie auf die mikrogliale oder astrogliale Aktivität im Cortex der Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse. Nachweisen ließen sich prokinetische Effekte in der Motorik und eine leichte Verbesserung des räumlichen Bezugsgedächtnis im Morris Water Maze. Im präventiven Behandlungsansatz zeigten sich ebenfalls keine Effekte auf das Angstverhalten, auf den Nervenzellverlust im Hippocampus, auf die Neurogenese

---

im *Gyrus dentatus*, auf die CB1-Rezeptorexpression und auf die astrogliale Aktivität im Cortex der Tiere. Zudem waren ein prokinetischer Effekt und ein negativer Einfluss auf das motorische Lernen im Rotarod nachzuweisen. Behandlungserfolge durch das WIN konnten in Bezug auf die verminderte mikrogliale Aktivierung im Cortex und in Bezug auf das deutlich verbesserte räumliche Bezugsgedächtnis im Morris Water Maze beobachtet werden.

Daraus ergibt sich, dass der präventive Behandlungsansatz mit WIN der deutlich wirksamere ist. Diese Ergebnisse passen zu der Hypothese, dass beim Morbus Alzheimer ein frühes Eingreifen aufgrund der Irreparabilität von bereits untergegangener Nervengewebe die besten Ergebnisse zeigt. WIN konnte seine Wirksamkeit im therapeutischen und besonders im präventiven Behandlungsansatz unter Beweis stellen. Die kognitiven Verbesserungen der Tg4-42<sub>hom</sub>-Mäuse sind in dieser Arbeit wahrscheinlich mit der reduzierten mikroglialen Aktivität zu erklären. Trotz der guten funktionalen Ergebnisse der WIN-Therapie konnte der Nervenzellverlust nicht signifikant aufgehalten werden. Aufgrund der Studienlage sind von einer höheren Dosis WIN bessere Ergebnisse z. B. in Bezug auf den Nervenzellverlust zu erwarten. Daher sind weitere Untersuchungen zur Dosisfindung und zum Wirkmechanismus auf die Neurone und auf die Entzündungsreaktion empfohlen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass WIN eine wirksame Therapie gegen den Morbus Alzheimer im Tg4-42<sub>hom</sub>-Mausmodell darstellt. Bereits eine chronische, geringe Dosis konnte im Water Maze deutliche kognitive Verbesserungen zeigen. Hierbei ist ein präventiver einem therapeutischen Behandlungsansatz deutlich überlegen. Aufgrund der ernüchternden Ergebnisse der histologischen Untersuchungen drängt sich jedoch die Schlussfolgerung auf, dass das Potential von WIN noch nicht ausgeschöpft ist und weitere Untersuchungen mit höherer Dosis erfolgen sollten.

## 6 Literaturverzeichnis

Abboussi O, Tazi A, Paizanis E, El Ganouni S (2014): Chronic exposure to WIN55,212-2 affects more potently spatial learning and memory in adolescents than in adult rats via a negative action on dorsal hippocampal neurogenesis. *Pharmacol Biochem Behav* 120, 95–102

Aguirre-Rueda D, Guerra-Ojeda S, Aldasoro M, Iradi A, Obrador E, Mauricio MD, Vila JM, Marchio P, Valles SL (2015): WIN 55,212-2, Agonist of Cannabinoid Receptors, Prevents Amyloid  $\beta$ 1-42 Effects on Astrocytes in Primary Culture. *PLoS ONE* 10, e0122843

Ahmad R, Goffin K, Van den Stock J, De Winter FL, Cleeren E, Bormans G, Tournoy J, Persoons P, Van Laere K, Vandebulcke M (2014): In vivo type 1 cannabinoid receptor availability in Alzheimer's disease. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol* 24, 242–250

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, et al. (2000): Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21, 383–421

Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, et al. (2011): The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 7, 270–279

Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996): Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2, 783–787

Altman J, Das GD (1965): Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319–335

Alzheimer A (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Für Psychiatr* 64, 146–148

Alzheimer's Association, Thies W, Bleiler L (2013): 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 9, 208–245

Alzheimer's Disease International (2019): World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia. *Alzheimers Dis Int* 2019, 1–160

Andrew MK, Tierney MC (2018): The puzzle of sex, gender and Alzheimer's disease: Why are women more often affected than men? *Womens Health* 14, 1745506518817995

Antonios G, Borgers H, Richard BC, Brauß A, Meißner J, Weggen S, Pena V, Pillot T, Davies SL, Bakrania P, et al. (2015): Alzheimer therapy with an antibody against N-terminal Abeta 4-X and pyroglutamate Abeta 3-X. *Sci Rep* 5, 1–14

Arévalo-Martín Á, Vela JM, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C (2003): Therapeutic Action of Cannabinoids in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *J Neurosci* 23, 2511–2516

Armstrong R (2019): Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 57, 87–105

Attems J, Lintner F, Jellinger KA (2004): Amyloid beta peptide 1-42 highly correlates with capillary cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease pathology. *Acta Neuropathol* 107, 283–291

- Attems J, Jellinger KA, Lintner F (2005): Alzheimer's disease pathology influences severity and topographical distribution of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* **110**, 222–231
- Barber RC (2012): The Genetics of Alzheimer's Disease. *Scientifica* **2012**, 246210
- Basso M, Yang J, Warren L, MacAvoy MG, Varma P, Bronen RA, van Dyck CH (2006): Volumetry of amygdala and hippocampus and memory performance in Alzheimer's disease. *Psychiatry Res* **146**, 251–261
- Bayer TA, Wirths O (2014): Focusing the amyloid cascade hypothesis on N-truncated Abeta peptides as drug targets against Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **127**, 787–801
- Bergmans BA, De Strooper B (2010): gamma-secretases: from cell biology to therapeutic strategies. *Lancet Neurol* **9**, 215–226
- Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C (2013): Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **12**, 92–104
- Bilkei-Gorzo A, Albayram O, Draffehn A, Michel K, Piyanova A, Oppenheimer H, Dvir-Ginzberg M, Rác I, Ulas T, Imbeault S, et al. (2017): A chronic low dose of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) restores cognitive function in old mice. *Nat Med* **23**, 782–787
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006): Alzheimer's disease. *Lancet Lond Engl* **368**, 387–403
- Bolmont T, Haiss F, Eicke D, Radde R, Mathis CA, Klunk WE, Kohsaka S, Jucker M, Calhoun ME (2008): Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **28**, 4283–4292
- Bottino CMC, Castro CC, Gomes RLE, Buchpiguel CA, Marchetti RL, Neto MRL (2002): Volumetric MRI measurements can differentiate Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and normal aging. *Int Psychogeriatr* **14**, 59–72
- Bourin M, Hascoët M (2003): The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* **463**, 55–65
- Bouter C, Henniges P, Franke TN, Irwin C, Sahlmann CO, Sichler ME, Beindorff N, Bayer TA, Bouter Y (2019): 18F-FDG-PET Detects Drastic Changes in Brain Metabolism in the Tg4-42 Model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* **10**, 425
- Bouter Y (2015): The role of amyloid beta 4-42 in the etiology of Alzheimer's disease. *Med. Diss. Göttingen* 2015
- Bouter Y, Dietrich K, Wittnam JL, Rezaei-Ghaleh N, Pillot T, Papot-Couturier S, Lefebvre T, Sprenger F, Wirths O, Zweckstetter M, Bayer TA (2013): N-truncated amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) 4-42 forms stable aggregates and induces acute and long-lasting behavioral deficits. *Acta Neuropathol* **126**, 189–205
- Bouter Y, Kacprowski T, Weissmann R, Dietrich K, Borgers H, Brauß A, Sperling C, Wirths O, Albrecht M, Jensen LR, et al. (2014): Deciphering the molecular profile of plaques, memory decline and neuron loss in two mouse models for Alzheimer's disease by deep sequencing. *Front Aging Neurosci* **6**, 75
- Bouter Y, Kacprowski T, Rößler F, Jensen LR, Kuss AW, Bayer TA (2020): miRNA Alterations Elicit Pathways Involved in Memory Decline and Synaptic Function in the Hippocampus of Aged Tg4-42

Mice. *Front Neurosci* 14, 580524

Braak H, Braak E (1991): Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239–259

Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Vogt LJ, Sim-Selley LJ (1999): Chronic  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol Treatment Produces a Time-Dependent Loss of Cannabinoid Receptors and Cannabinoid Receptor-Activated G Proteins in Rat Brain. *J Neurochem* 73, 2447–2459

Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2004): Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14515–14520

Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE (2010): Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem* 17, 5–11

Brody DL, Jiang H, Wildburger N, Esparza TJ (2017): Non-canonical soluble amyloid-beta aggregates and plaque buffering: controversies and future directions for target discovery in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 9, s13195-017-0293-3

Buchman AS, Bennett DA (2011): Loss of motor function in preclinical Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 11, 665–676

Busch C, Bohl J, Ohm TG (1997): Spatial, temporal and numeric analysis of Alzheimer changes in the nucleus coeruleus. *Neurobiol Aging* 18, 401–406

Cacace R, Slegers K, Van Broeckhoven C (2016): Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement* 12, 733–748

Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdoux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, et al. (2004): Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated A $\beta$ 42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* 165, 1289–1300

Cassano T, Calcagnini S, Pace L, De Marco F, Romano A, Gaetani S (2017): Cannabinoid Receptor 2 Signaling in Neurodegenerative Disorders: From Pathogenesis to a Promising Therapeutic Target. *Front Neurosci* 11, 30

Cheng D, Spiro AS, Jenner AM, Garner B, Karl T (2014): Long-term cannabidiol treatment prevents the development of social recognition memory deficits in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Alzheimers Dis* 42, 1383–1396

Chételat G, Arbizu J, Barthel H, Garibotto V, Law I, Morbelli S, Giessen E van de, Agosta F, Barkhof F, Brooks DJ, et al. (2020): Amyloid-PET and 18F-FDG-PET in the diagnostic investigation of Alzheimer's disease and other dementias. *Lancet Neurol* 19, 951–962

Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M (2010): An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *Neuromolecular Med* 12, 1–12

Christensen DZ, Huettneraich M, Mitkovski M, Pradier L, Wirths O (2014): Axonal degeneration in an Alzheimer mouse model is PS1 gene dose dependent and linked to intraneuronal A $\beta$  accumulation. *Front Aging Neurosci* 6, 139

Colacurcio DJ, Pensalfini A, Jiang Y, Nixon RA (2018): Dysfunction of autophagy and endosomal-

---

lysosomal pathways: Roles in pathogenesis of Down syndrome and Alzheimer's Disease. *Free Radic Biol Med* 114, 40–51

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993): Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923

Coronel R, Palmer C, Bernabeu-Zornoza A, Monteagudo M, Rosca A, Zambrano A, Liste I (2019): Physiological effects of amyloid precursor protein and its derivatives on neural stem cell biology and signaling pathways involved. *Neural Regen Res* 14, 1661–1671

Crous-Bou M, Minguillón C, Gramunt N, Molinuevo JL (2017): Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimers Res Ther* 9, 71

Das B, Yan R (2017): Role of BACE1 in Alzheimer's synaptic function. *Transl Neurodegener* 6, s400-017-0093-5

de Oliveira FF, Bertolucci PHF, Chen ES, Smith MC (2014): Risk factors for age at onset of dementia due to Alzheimer's disease in a sample of patients with low mean schooling from São Paulo, Brazil. *Int J Geriatr Psychiatry* 29, 1033–1039

Deal JA, Betz J, Yaffe K, Harris T, Purchase-Helzner E, Satterfield S, Pratt S, Govil N, Simonsick EM, Lin FR, Health ABC Study Group (2017): Hearing Impairment and Incident Dementia and Cognitive Decline in Older Adults: The Health ABC Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 72, 703–709

DeKosky ST, Scheff SW (1990): Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27, 457–464

Denenberg VH (1969): Open-Field Behavior in the Rat: What Does It Mean?. *Ann N Y Acad Sci* 159, 852–859

Devanand DP, Pradhaban G, Liu X, Khandji A, De Santi S, Segal S, Rusinek H, Pelton GH, Honig LS, Mayeux R, et al. (2007): Hippocampal and entorhinal atrophy in mild cognitive impairment: prediction of Alzheimer disease. *Neurology* 68, 828–836

DGN (Hrsg.): S3-Leitlinie Demenzen (Interdisziplinäre S3-Praxisleitlinien). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2017

D'Hooge R, De Deyn PP (2001): Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 36, 60–90

Dietrich K, Bouter Y, Müller M, Bayer TA (2018): Synaptic Alterations in Mouse Models for Alzheimer Disease—A Special Focus on N-Truncated Abeta 4-42. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem* 23, 23040718

Drews E, Schneider M, Koch M (2005): Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 80, 145–150

Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, Bakardjian H, Benali H, Bertram L, Blennow K, et al. (2016): Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 12, 292–323

- Duncombe J, Kitamura A, Hase Y, Ihara M, Kalaria RN, Horsburgh K (2017): Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia. *Clin Sci Lond Engl* 1979 131, 2451–2468
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier M-C (2009): Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 118, 5–36
- Dzierżanowski T (2019): Prospects for the Use of Cannabinoids in Oncology and Palliative Care Practice: A Review of the Evidence. *Cancers* 11, 11020129
- Ebrahimzadeh M, Haghparast A (2011): Analgesic effects of cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 in the nucleus cuneiformis in animal models of acute and inflammatory pain in rats. *Brain Res* 1420, 19–28
- Echávarri C, Aalten P, Uylings HBM, Jacobs HIL, Visser PJ, Gronenschild EHBM, Verhey FRJ, Burgmans S (2011): Atrophy in the parahippocampal gyrus as an early biomarker of Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* 215, 265–271
- El Manira A, Kyriakatos A (2010): The Role of Endocannabinoid Signaling in Motor Control. *Physiology* 25, 230–238
- Ennaceur A (2014): Tests of unconditioned anxiety — Pitfalls and disappointments. *Physiol Behav* 135, 55–71
- España J, Giménez-Llort L, Valero J, Miñano A, Rábano A, Rodríguez-Alvarez J, LaFerla FM, Saura CA (2010): Intraneuronal  $\beta$ -Amyloid Accumulation in the Amygdala Enhances Fear and Anxiety in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *Biol Psychiatry* 67, 513–521
- Esposito G, De Filippis D, Carnuccio R, Izzo AA, Iuvone T (2006): The marijuana component cannabidiol inhibits beta-amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/beta-catenin pathway rescue in PC12 cells. *J Mol Med Berl Ger* 84, 253–258
- Evans DA, Hebert LE, Beckett LA, Scherr PA, Albert MS, Chown MJ, Pilgrim DM, Taylor JO (1997): Education and other measures of socioeconomic status and risk of incident Alzheimer disease in a defined population of older persons. *Arch Neurol* 54, 1399–1405
- Ewers M, Franzmeier N, Suárez-Calvet M, Morenas-Rodríguez E, Caballero MAA, Kleinberger G, Piccio L, Cruchaga C, Deming Y, Dichgans M, et al. (2019): Increased soluble TREM2 in cerebrospinal fluid is associated with reduced cognitive and clinical decline in Alzheimer's disease. *Sci Transl Med* 11, eaav6221
- Fakhfour G, Ahmadiani A, Rahimian R, Grolla AA, Moradi F, Haeri A (2012): WIN55212-2 attenuates amyloid-beta-induced neuroinflammation in rats through activation of cannabinoid receptors and PPAR- $\gamma$  pathway. *Neuropharmacology* 63, 653–666
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, Duijn CM van (1997): Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease: A Meta-analysis. *JAMA* 278, 1349–1356
- Fernández-Ruiz J, González S (2005): Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia. *Handb Exp Pharmacol*, 479–507

- Fernández-Vizarra P, Fernández AP, Castro-Blanco S, Serrano J, Bentura ML, Martínez-Murillo R, Martínez A, Rodrigo J (2004): Intra- and extracellular Abeta and PHF in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Histol Histopathol* 19, 823–844
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975): „Mini-mental state“. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12, 189–198
- Förstl H, Bickel H, Kurz A: *Alzheimer Demenz: Grundlagen, Klinik und Therapie*. Springer Berlin Heidelberg 1999
- Frisoni GB, Fox NC, Jack CR, Scheltens P, Thompson PM (2010): The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6, 67–77
- Frontera JL, Gonzalez Pini VM, Messori FL, Brusco A (2018): Exposure to cannabinoid agonist WIN 55,212-2 during early adolescence increases alcohol preference and anxiety in CD1 mice. *Neuropharmacology* 137, 268–274
- Galimberti D, Scarpini E (2012): Progress in Alzheimer's disease. *J Neurol* 259, 201–211
- Georges J, Miller O, Bintener C: Estimating the prevalence of dementia in Europe. *Alzheimer Europe* 2020
- Gerberding AL, Zampar S, Stazi M, Liebetanz D, Wirths O (2019): Physical Activity Ameliorates Impaired Hippocampal Neurogenesis in the Tg4-42 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *ASN Neuro* 11, 1759091419892692
- Ghasemi M, Abrari K, Goudarzi I, Rashidy-Pour A (2017): Effect of WIN55-212-2 and Consequences of Extinction Training on Conditioned Fear Memory in PTSD Male Rats. *Basic Clin Neurosci* 8, 493–502
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L (1991): Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706
- Golech SA, McCarron RM, Chen Y, Bembry J, Lenz F, Mechoulam R, Shohami E, Spatz M (2004): Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 132, 87–92
- Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT (1997): Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41, 17–24
- Gratuzze M, Leyns CEG, Holtzman DM (2018): New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 13, 66
- Grundman M, Petersen RC, Ferris SH, Thomas RG, Aisen PS, Bennett DA, Foster NL, Jack CR, Galasko DR, Doody R, et al. (2004): Mild cognitive impairment can be distinguished from Alzheimer disease and normal aging for clinical trials. *Arch Neurol* 61, 59–66
- Haass C, Selkoe DJ (2007): Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101–112
- Hall W, Lynskey M (2020): Assessing the public health impacts of legalizing recreational cannabis



use: the US experience. *World Psychiatry* 19, 179–186

Hampson AJ, Grimaldi M, Lolic M, Wink D, Rosenthal R, Axelrod J (2000): Neuroprotective antioxidants from marijuana. *Ann N Y Acad Sci* 899, 274–282

Hanger DP, Anderton BH, Noble W (2009): Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 15, 112–119

Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP (2009): Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res* 198, 247–251

Heifets BD, Castillo PE (2009): Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 71, 283–306

Heneka MT, Reyes-Irisarri E, Hüll M, Kummer MP (2011): Impact and Therapeutic Potential of PPARs in Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol* 2, 643–650

Hett K, Ta VT, Catheline G, Tourdias T, Manjón JV, Coupé P (2019): Multimodal Hippocampal Subfield Grading For Alzheimer's Disease Classification. *Sci Rep* 9, 13845

Hinteregger B, Loeffler T, Flunkert S, Neddens J, Bayer TA, Madl T, Hutter-Paier B (2021): Metabolic, Phenotypic, and Neuropathological Characterization of the Tg4-42 Mouse Model for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 1151–1168

Hirvonen J, Goodwin RS, Li CT, Terry GE, Zoghbi SS, Morse C, Pike VW, Volkow ND, Huestis MA, Innis RB (2012): Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabinoid CB1 receptors in chronic daily cannabis smokers. *Mol Psychiatry* 17, 642–649

Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, Abraham R, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvin V, et al. (2011): Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43, 429–435

Holtzman DM, Morris JC, Goate AM (2011): Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* 3, 77sr1

Hornung K, Zampar S, Engel N, Klafki H, Liepold T, Bayer TA, Wiltfang J, Jahn O, Wirths O (2019): N-Terminal Truncated A $\beta$ 4-42 Is a Substrate for Neprilysin Degradation in vitro and in vivo. *J Alzheimers Dis* 67, 849–858

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, et al. (2002): International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev* 54, 161–202

Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, Albert MS, Hyman BT, Irizarry MC (2004): Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 62, 925–931

Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D (1989): Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol* 24, 173–182

Ittner LM, Götz J (2011): Amyloid- $\beta$  and tau-a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12, 65–72

Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC

- (2001): Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292, 1550–1552
- Jankowsky JL, Zheng H (2017): Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 12, s13024-017-0231-7
- Jarmolowicz AI, Chen HY, Panegyres PK (2015): The Patterns of Inheritance in Early-Onset Dementia: Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia. *Am J Alzheimers Dis Dementiasr* 30, 299–306
- Johnson KR, Boomhower SR, Newland MC (2019): Behavioral effects of chronic WIN 55,212-2 administration during adolescence and adulthood in mice. *Exp Clin Psychopharmacol* 27, 348–358
- Jung KM, Astarita G, Yasar S, Vasilevko V, Cribbs DH, Head E, Cotman CW, Piomelli D (2012): An amyloid  $\beta$ 42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33, 1522–1532
- Karkisaval AG, Rostagno A, Azimov R, Ban DK, Ghiso J, Kagan BL, Lal R (2020): Ion channel formation by N-terminally truncated A $\beta$  (4-42): relevance for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 29, 102235
- Kelley BJ, Petersen RC (2007): Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Neurol Clin* 25, 577–v
- Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1992): Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* 59, 750–753
- Kim SH, Won SJ, Mao XO, Jin K, Greenberg DA (2006): Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. *Mol Pharmacol* 69, 691–696
- Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT (2018): Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement Transl Res Clin Interv* 4, 575–590
- Kirkham TC (2009): Cannabinoids and appetite: food craving and food pleasure. *Int Rev Psychiatry Abingdon Engl* 21, 163–171
- Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A (2001): Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322, 1447–1451
- Klein C, Karanges E, Spiro A, Wong A, Spencer J, Huynh T, Gunasekaran N, Karl T, Long LE, Huang XF, et al. (2011): Cannabidiol potentiates  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (THC) behavioural effects and alters THC pharmacokinetics during acute and chronic treatment in adolescent rats. *Psychopharmacology (Berl)* 218, 443–457
- Koenig AM, Arnold SE, Streim JE (2016): Agitation and Irritability in Alzheimer's Disease: Evidenced-based Treatments and the Black Box Warning. *Curr Psychiatry Rep* 18, 3
- Koppel BS, Brust JCM, Fife T, Bronstein J, Youssof S, Gronseth G, Gloss D (2014): Systematic review: Efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders. *Neurology* 82, 1556–1563

- Koppel J, Bradshaw H, Goldberg TE, Khalili H, Marambaud P, Walker MJ, Pazos M, Gordon ML, Christen E, Davies P (2009): Endocannabinoids in Alzheimer's disease and their impact on normative cognitive performance: a case-control and cohort study. *Lipids Health Dis* **8**, 2
- Krause DL, Müller N (2010): Neuroinflammation, microglia and implications for anti-inflammatory treatment in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* **2010**, 732806
- Kril JJ, Hodges J, Halliday G (2004): Relationship between hippocampal volume and CA1 neuron loss in brains of humans with and without Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **361**, 9–12
- Krishnan S, Cairns R, Howard R (2009): Cannabinoids for the treatment of dementia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007204
- Kruk-Slomka M, Dzik A, Budzynska B, Biala G (2017): Endocannabinoid System: the Direct and Indirect Involvement in the Memory and Learning Processes—a Short Review. *Mol Neurobiol* **54**, 8332–8347
- Kuller LH, Lopez OL (2021): ENGAGE and EMERGE: Truth and consequences? *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* **4**, 692–695
- Larson ME, Lesné SE (2012): Soluble A $\beta$  oligomer production and toxicity. *J Neurochem* **120**, 125–139
- Lazarov O, Marr RA (2010): Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. *Exp Neurol* **223**, 267–281
- Lazenka MF, Selley DE, Sim-Selley LJ (2014):  $\Delta$ FosB induction correlates inversely with CB1 receptor desensitization in a brain region- dependent manner following repeated  $\Delta$ 9-THC administration. *Neuropharmacology* **77**, 224–233
- Lee AS, Duman RS, Pittenger C (2008): A double dissociation revealing bidirectional competition between striatum and hippocampus during learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 17163–17168
- Lee JH, Agacinski G, Williams JH, Wilcock GK, Esiri MM, Francis PT, Wong PTH, Chen CP, Lai MKP (2010): Intact cannabinoid CB1 receptors in the Alzheimer's disease cortex. *Neurochem Int* **57**, 985–989
- Li J, Wang YJ, Zhang M, Xu ZQ, Gao CY, Fang CQ, Yan JC, Zhou HD, Chongqing Ageing Study Group (2011): Vascular risk factors promote conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer disease. *Neurology* **76**, 1485–1491
- Lichtman AH, Poklis JL, Poklis A, Wilson DM, Martin BR (2001): The pharmacological activity of inhalation exposure to marijuana smoke in mice. *Drug Alcohol Depend* **63**, 107–116
- Lin FR, Metter EJ, O'Brien RJ, Resnick SM, Zonderman AB, Ferrucci L (2011): Hearing loss and incident dementia. *Arch Neurol* **68**, 214–220
- Lisboa SF, Niraula A, Resstel LB, Guimaraes FS, Godbout JP, Sheridan JF (2018): Repeated social defeat-induced neuroinflammation, anxiety-like behavior and resistance to fear extinction were attenuated by the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2. *Neuropsychopharmacology* **43**, 1924–1933
- Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, Ballard C, Banerjee S,

- Burns A, Cohen-Mansfield J, et al. (2017): Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet Lond Engl* 390, 2673–2734
- Lopez-Noguerola JS, Giessen NME, Ueberück M, Meißner JN, Pelgrim CE, Adams J, Wirths O, Bouter Y, Bayer TA (2018): Synergistic Effect on Neurodegeneration by N-Truncated A $\beta$ 4–42 and Pyroglutamate A $\beta$ 3–42 in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Front Aging Neurosci* 10, 64
- Lu HC, Mackie K (2016): An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol Psychiatry* 79, 516–525
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999): Soluble Amyloid  $\beta$  Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer’s Disease. *Am J Pathol* 155, 853–862
- Lutz B, Marsicano G, Maldonado R, Hillard CJ (2015): The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nat Rev Neurosci* 16, 705–718
- Lyketsos CG, Lopez O, Jones B, Fitzpatrick AL, Breitner J, DeKosky S (2002): Prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia and mild cognitive impairment: results from the cardiovascular health study. *JAMA* 288, 1475–1483
- Mackie K (2005): Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol*, 299–325
- Manthey J (2019): Cannabis use in Europe: Current trends and public health concerns. *Int J Drug Policy* 68, 93–96
- Mao JH, Langley SA, Huang Y, Hang M, Bouchard KE, Celniker SE, Brown JB, Jansson JK, Karpen GH, Snijders AM (2015): Identification of genetic factors that modify motor performance and body weight using Collaborative Cross mice. *Sci Rep* 5, 16247
- Marchalant Y, Brothers HM, Wenk GL (2009): Cannabinoid agonist WIN-55,212-2 partially restores neurogenesis in the aged rat brain. *Mol Psychiatry* 14, 1068–1069
- Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN (2005): Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* 95, 437–445
- Martini L, Thompson D, Kharazia V, Whistler JL (2010): Differential Regulation of Behavioral Tolerance to WIN55,212-2 by GASP1. *Neuropsychopharmacology* 35, 1363–1373
- Martín-Moreno AM, Reigada D, Ramírez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, de Ceballos ML (2011): Cannabidiol and Other Cannabinoids Reduce Microglial Activation In Vitro and In Vivo: Relevance to Alzheimer’s Disease. *Mol Pharmacol* 79, 964–973
- Martín-Moreno AM, Brera B, Spuch C, Carro E, García-García L, Delgado M, Pozo MA, Innamorato NG, Cuadrado A, de Ceballos ML (2012): Prolonged oral cannabinoid administration prevents neuroinflammation, lowers  $\beta$ -amyloid levels and improves cognitive performance in Tg APP 2576 mice. *J Neuroinflammation* 9, 8
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985): Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4245–4249

- McGregor IS, Issakidis CN, Prior G (1996): Aversive effects of the synthetic cannabinoid CP 55,940 in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 53, 657–664
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, et al. (2011): The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 7, 263–269
- Medeiros R, LaFerla FM (2013): Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol* 239, 133–138
- Mega MS, Cummings JL, Fiorello T, Gornbein J (1996): The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology* 46, 130–135
- Mohammad F, Ho J, Woo JH, Lim CL, Poon DJJ, Lamba B, Claridge-Chang A (2016): Concordance and incongruence in preclinical anxiety models: Systematic review and meta-analyses. *Neurosci Biobehav Rev* 68, 504–529
- Morris R (1984): Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47–60
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982): Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683
- Mosconi L, Berti V, Glodzik L, Pupi A, De Santi S, de Leon MJ (2010): Pre-clinical detection of Alzheimer's disease using FDG-PET, with or without amyloid imaging. *J Alzheimers Dis* 20, 843–854
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG (1995): Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9697–9701
- Mukhin VN, Pavlov KI, Klimenko VM (2017): Mechanisms of Neuron Loss in Alzheimer's Disease. *Neurosci Behav Physiol* 47, 508–516
- Mulder J, Zilberter M, Pasquaré SJ, Alpár A, Schulte G, Ferreira SG, Köfalvi A, Martín-Moreno AM, Keimpema E, Tanila H, et al. (2011): Molecular reorganization of endocannabinoid signalling in Alzheimer's disease. *Brain J Neurol* 134, 1041–1060
- Mullard A (2019): Anti-amyloid failures stack up as Alzheimer antibody flops. *Nat Rev Drug Discov* 18, 327–327
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993): Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65
- Murphy MP, LeVine H (2010): Alzheimer's Disease and the  $\beta$ -Amyloid Peptide. *J Alzheimers Dis* 19, 311
- Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, Tonegawa S (2004): NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci* 5, 361–372
- Navarrete M, Araque A (2008): Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57, 883–893
- Nyíri G, Cserép C, Szabadits E, Mackie K, Freund TF (2005): CB1 cannabinoid receptors are

---

enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience* **136**, 811–822

Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Eldik LV, et al. (2006): Intraneuronal  $\beta$ -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J Neurosci* **26**, 10129–10140

O'Brien RJ, Wong PC (2011): Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* **34**, 185–204

Oliveira RW de, Oliveira CL, Guimarães FS, Campos AC (2019): Cannabinoid signalling in embryonic and adult neurogenesis: possible implications for psychiatric and neurological disorders. *Acta Neuropsychiatr* **31**, 1–16

Pacher P, BÁTOKAI S, KUNOS G (2006): The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* **58**, 389–462

Palmqvist S, Janelidze S, Quiroz YT, Zetterberg H, Lopera F, Stomrud E, Su Y, Chen Y, Serrano GE, Leuzy A, et al. (2020): Discriminative Accuracy of Plasma Phospho-tau217 for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders. *JAMA* **324**, 772–781

Pavía J, Alberch J, Álvarez I, Toledano A, de Ceballos ML (2000): Repeated intracerebroventricular administration of  $\beta$ -amyloid25–35 to rats decreases muscarinic receptors in cerebral cortex. *Neurosci Lett* **278**, 69–72

Pertwee RG (2004): Pharmacological and therapeutic targets for  $\Delta^9$  tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Euphytica* **140**, 73–82

Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, et al. (2010): International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>. *Pharmacol Rev* **62**, 588–631

Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW (1995): Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem* **64**, 253–265

Portelius E, Bogdanovic N, Gustavsson MK, Volkman I, Brinkmalm G, Zetterberg H, Winblad B, Blennow K (2010): Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **120**, 185–193

Poulin SP, Dautoff R, Morris JC, Barrett LF, Dickerson BC (2011): Amygdala atrophy is prominent in early Alzheimer's disease and relates to symptom severity. *Psychiatry Res* **194**, 7–13

Prescott WR, Gold LH, Martin BR (1992): Evidence for separate neuronal mechanisms for the discriminative stimulus and catalepsy induced by  $\Delta^9$ -THC in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **107**, 117–124

Price DA, Martinez AA, Seillier A, Koek W, Acosta Y, Fernandez E, Strong JR, Lutz B, Marsicano G, Roberts JL, Giuffrida A (2009): WIN55,212-2, a Cannabinoid Receptor Agonist, Protects Against Nigrostriatal Cell Loss in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Eur J Neurosci* **29**, 2177–

2186

Puig KL, Combs CK (2013): Expression and Function of APP and its Metabolites Outside the Central Nervous System. *Exp Gerontol* **48**, 608–611

Quintanilla RA, Orellana DI, González-Billault C, Maccioni RB (2004): Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res* **295**, 245–257

Rabinovici GD (2019): Late-onset Alzheimer Disease. *Contin Lifelong Learn Neurol* **25**, 14–33

Ramírez BG, Blázquez C, Gómez del Pulgar T, Guzmán M, de Ceballos ML (2005): Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **25**, 1904–1913

Rasmussen J, Langerman H (2019): Alzheimer's Disease – Why We Need Early Diagnosis. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* **2**, 123–130

Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T (1995): Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* **376**, 775–778

Rosen GD, Harry JD (1990): Brain volume estimation from serial section measurements: a comparison of methodologies. *J Neurosci Methods* **35**, 115–124

Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, et al. (2006): APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* **38**, 24–26

Ruthirakuhan M, Lanctôt KL, Vieira D, Herrmann N (2019): Natural and Synthetic Cannabinoids for Agitation and Aggression in Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *J Clin Psychiatry* **80**, 18r12617

Sañudo-Peña MC, Romero J, Seale GE, Fernandez-Ruiz JJ, Walker JM (2000): Activational role of cannabinoids on movement. *Eur J Pharmacol* **391**, 269–274

Sarne Y, Toledano R, Rachmany L, Sasson E, Doron R (2018): Reversal of age-related cognitive impairments in mice by an extremely low dose of tetrahydrocannabinol. *Neurobiol Aging* **61**, 177–186

Sastre AA, Sherriff F (2003): Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003154

Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ (2007): Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* **68**, 1501–1508

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, et al. (1999): Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**, 173–177

Schleicher EM, Ott FW, Müller M, Silcher B, Sichler ME, Löw MJ, Wagner JM, Bouter Y (2019): Prolonged Cannabidiol Treatment Lacks on Detrimental Effects on Memory, Motor Performance and Anxiety in C57BL/6J Mice. *Front Behav Neurosci* **13**, 94

Schmitz C, Hof PR (2005): Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* **130**, 813–831

Seibenhener ML, Wooten MC (2015): Use of the Open Field Maze to measure locomotor and

anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* **96**, e52434

Selkoe DJ (1994): Normal and Abnormal Biology of the beta-Amyloid Precursor Protein. *Annu Rev Neurosci* **17**, 489–517

Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011): Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, 6189

Sharpe L, Sinclair J, Kramer A, de Manincor M, Sarris J (2020): Cannabis, a cause for anxiety? A critical appraisal of the anxiogenic and anxiolytic properties. *J Transl Med* **18**, 374

Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, Funayama M, Takamatsu Y, Ikeda K, Takahashi R, Kitazawa S, Hattori N (2010): A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J Neurosci Methods* **189**, 180–185

Silva L, Harte-Hargrove L, Izenwasser S, Frank A, Wade D, Dow-Edwards D (2015): Sex-Specific Alterations in Hippocampal Cannabinoid 1 Receptor Expression Following Adolescent Delta-9-Tetrahydrocannabinol Treatment in the Rat. *Neurosci Lett* **602**, 89–94

Sim-Selley LJ (2003): Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids. *Crit Rev Neurobiol* **15**, 91–119

Sim-Selley LJ, Schechter NS, Rorrer WK, Dalton GD, Hernandez J, Martin BR, Selley DE (2006): Prolonged recovery rate of CB1 receptor adaptation after cessation of long-term cannabinoid administration. *Mol Pharmacol* **70**, 986–996

Sinnayah P, Jobst EE, Rathner JA, Caldera-Siu AD, Tonelli-Lemos L, Eusterbrock AJ, Enriori PJ, Pothos EN, Grove KL, Cowley MA (2008): *bout*. *PLOS ONE* **3**, e2202

Sjödén PO, Järbe TUC, Henriksson BG (1973): Influence of tetrahydrocannabinols ( $\Delta^8$ -THC and  $\Delta^9$ -THC) on body weight, food, and water intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **1**, 395–399

Smith EE, Greenberg SM (2009): Beta-amyloid, blood vessels, and brain function. *Stroke* **40**, 2601–2606

Sofi F, Valecchi D, Bacci D, Abbate R, Gensini GF, Casini A, Macchi C (2011): Physical activity and risk of cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *J Intern Med* **269**, 107–117

Solas M, Francis PT, Franco R, Ramirez MJ (2013): CB2 receptor and amyloid pathology in frontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* **34**, 805–808

Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, Kaye J, Montine TJ, et al. (2011): Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* **7**, 280–292

Steel RWJ, Miller JH, Sim DA, Day DJ (2014): Delta-9-tetrahydrocannabinol disrupts hippocampal neuroplasticity and neurogenesis in trained, but not untrained adolescent Sprague-Dawley rats. *Brain Res* **1548**, 12–19

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

Stockmann J, Verberk IMW, Timmesfeld N, Denz R, Budde B, Lange-Leifhelm J, Scheltens P, van



- der Flier WM, Nabers A, Teunissen CE, Gerwert K (2020): Amyloid- $\beta$  misfolding as a plasma biomarker indicates risk for future clinical Alzheimer's disease in individuals with subjective cognitive decline. *Alzheimers Res Ther* **12**, 169
- Stoub TR, Bulgakova M, Leurgans S, Bennett DA, Fleischman D, Turner DA, deToledo-Morrell L (2005): MRI predictors of risk of incident Alzheimer disease: a longitudinal study. *Neurology* **64**, 1520–1524
- Sulcova E, Mechoulam R, Fride E (1998): Biphasic effects of anandamide. *Pharmacol Biochem Behav* **59**, 347–352
- Suppiah S, Didier MA, Vinjamuri S (2019): The Who, When, Why, and How of PET Amyloid Imaging in Management of Alzheimer's Disease—Review of Literature and Interesting Images. *Diagnostics* **9**, 9020065
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994): An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* **264**, 1336–1340
- Tackenberg C, Nitsch RM (2019): The secreted APP ectodomain sAPP $\alpha$ , but not sAPP $\beta$ , protects neurons against A $\beta$  oligomer-induced dendritic spine loss and increased tau phosphorylation. *Mol Brain* **12**, 27
- Tai S, Fantegrossi WE (2014): Synthetic Cannabinoids: Pharmacology, Behavioral Effects, and Abuse Potential. *Curr Addict Rep* **1**, 129–136
- Tambaro S, Bortolato M (2012): Cannabinoid-related agents in the treatment of anxiety disorders: current knowledge and future perspectives. *Recent Patents CNS Drug Discov* **7**, 25–40
- Tanila H (2012): Wading pools, fading memories—place navigation in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* **4**, 11
- Taylor CJ, Ireland DR, Ballagh I, Bourne K, Marechal NM, Turner PR, Bilkey DK, Tate WP, Abraham WC (2008): Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol Dis* **31**, 250–260
- ter Laak HJ, Renkawek K, van Workum FP (1994): The olfactory bulb in Alzheimer disease: a morphologic study of neuron loss, tangles, and senile plaques in relation to olfaction. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **8**, 38–48
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991): Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* **30**, 572–580
- Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H (2002): Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* **58**, 1791–1800
- Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG (2007): Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol* **150**, 613–623
- Tomas-Roig J, Benito E, Agis-Balboa R, Piscitelli F, Hoyer-Fender S, Di Marzo V, Havemann-Reinecke U (2017): Chronic exposure to cannabinoids during adolescence causes long-lasting

- behavioral deficits in adult mice. *Addict Biol* 22, 1778–1789
- Tuppo EE, Arias HR (2005): The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 289–305
- Turcotte C, Blanchet MR, Laviolette M, Flaman N (2016): The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell Mol Life Sci* 73, 4449–4470
- Tzavara ET, Wade M, Nomikos GG (2003): Biphasic Effects of Cannabinoids on Acetylcholine Release in the Hippocampus: Site and Mechanism of Action. *J Neurosci* 23, 9374–9384
- Valenzuela MJ (2008): Brain reserve and the prevention of dementia. *Curr Opin Psychiatry* 21, 296–302
- van der Kant R, Goldstein LSB (2015): Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Dev Cell* 32, 502–515
- van Kralingen C, Kho DT, Costa J, Angel CE, Graham ES (2013): Exposure to Inflammatory Cytokines IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  Induces Compromise and Death of Astrocytes; Implications for Chronic Neuroinflammation. *PLoS ONE* 8, e84269
- Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, Szoek C, Macaulay SL, Martins R, Maruff P, et al. (2013): Amyloid  $\beta$  deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 12, 357–367
- Viscomi MT, Oddi S, Latini L, Pasquariello N, Florenzano F, Bernardi G, Molinari M, Maccarrone M (2009): Selective CB2 receptor agonism protects central neurons from remote axotomy-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29, 4564–4570
- Viveros MP, Marco EM, File SE (2005): Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav* 81, 331–342
- Volicer L, Stelly M, Morris J, McLaughlin J, Volicer BJ (1997): Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 12, 913–919
- Vorhees CV, Williams MT (2006): Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1, 848–858
- Wada H, Nakajoh K, Satoh-Nakagawa T, Suzuki T, Ohnui T, Arai H, Sasaki H (2001): Risk factors of aspiration pneumonia in Alzheimer's disease patients. *Gerontology* 47, 271–276
- Wagner JM, Sichler ME, Schleicher EM, Franke TN, Irwin C, Löw MJ, Beindorff N, Bouter C, Bayer TA, Bouter Y (2019): Analysis of Motor Function in the Tg4-42 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Behav Neurosci* 13, 107
- Walf AA, Frye CA (2007): The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2, 322
- Walker JM, Hohmann AG (2005): Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handb Exp Pharmacol*, 509–554
- Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003): Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 23, 1398–1405

- Walther S, Mahlberg R, Eichmann U, Kunz D (2006): Delta-9-tetrahydrocannabinol for nighttime agitation in severe dementia. *Psychopharmacology (Berl)* 185, 524–528
- Webster SJ, Bachstetter AD, Van Eldik LJ (2013): Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 5, 28
- West MJ (1993): Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol Aging* 14, 287–293
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG (1991): Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231, 482–497
- West T, Kirmess KM, Meyer MR, Holubasch MS, Knapik SS, Hu Y, Contois JH, Jackson EN, Harpstrite SE, Bateman RJ, et al. (2021): A blood-based diagnostic test incorporating plasma A $\beta$ 42/40 ratio, ApoE proteotype, and age accurately identifies brain amyloid status: findings from a multi cohort validity analysis. *Mol Neurodegener* 16, 30
- Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR (1981): Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol* 10, 122–126
- Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di Nisio M, Duffy S, Hernandez AV, Keurentjes JC, Lang S, Misso K, Ryder S, et al. (2015): Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 313, 2456–2473
- Wilson RI, Nicoll RA (2002): Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296, 678–682
- Wirhns O, Bayer TA (2012): Intraneuronal A $\beta$  accumulation and neurodegeneration: lessons from transgenic models. *Life Sci* 91, 1148–1152
- Wolf-Klein GP, Silverstone FA, Levy AP (1992): Nutritional patterns and weight change in Alzheimer patients. *Int Psychogeriatr* 4, 103–118
- Xiao H, Gao Y, Liu L, Li Y (2017): Association between polymorphisms in the promoter region of the apolipoprotein E (APOE) gene and Alzheimer's disease: A meta-analysis. *EXCLI J* 16, 921–938
- Xu Y, Jack CR, O'Brien PC, Kokmen E, Smith GE, Ivnik RJ, Boeve BF, Tangalos RG, Petersen RC (2000): Usefulness of MRI measures of entorhinal cortex versus hippocampus in AD. *Neurology* 54, 1760–1767
- Zhao X, van Praag H (2020): Steps towards standardized quantification of adult neurogenesis. *Nat Commun* 11, 4275
- Zhuang S, Kittler J, Grigorenko EV, Kirby MT, Sim LJ, Hampson RE, Childers SR, Deadwyler SA (1998): Effects of long-term exposure to delta9-THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* 62, 141–149
- Zis P, Strydom A (2018): Clinical aspects and biomarkers of Alzheimer's disease in Down syndrome. *Free Radic Biol Med* 114, 3–9
- Zoppi S, Pérez Nieves BG, Madrigal JLM, Manzanares J, Leza JC, García-Bueno B (2011): Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 36, 805–818

Zou S, Kumar U (2018): Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* 19, 833

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau PD Dr. Yvonne Bouter bedanken, die diese Arbeit als Teil ihres Forschungsprojekts zunächst als Betreuerin und schließlich als Doktormutter möglich gemacht und hervorragend betreut hat. Vielen Dank für die umfassenden Einblicke in die Alzheimer-Forschung, für die geduldige praktische und theoretische Einarbeitung, für die Ermöglichung der Kongressteilnahmen, für die vielen Korrekturen, und für die Anwesenheit und Unterstützung bei Problemen jeder Art.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas A. Bayer bedanken, der zunächst meine Betreuung als Doktorvater übernahm, und mit kompetenten fachlichen Anregungen zur Ausreifung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke Marius Sichler und Maximilian Löw für die Durchführung der Verhaltenstest an den Tg4-42-Vehikel-Gruppen und das kollegiale Teilen dieser Daten.

Außerdem danke ich Petra Tucholla und dem gesamten Team der AG Molekulare Psychiatrie für die Unterstützung und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Herzlichen Dank an Prof. Dr. Michael Ott für die Motivation, die fachlichen Anregungen und für die Korrekturen beim Verfassen dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich besonders bei Dr. Eva Schleicher für die Unterstützung und Motivation bei den vielen intensiven Stunden im Labor bedanken.