

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

**Cannabinoid-basierte 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

Marius Eberhard Sichler

aus

Sömmerda

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

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

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. T. Dresbach

Prüfungskommission

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

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. T. Dresbach

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

Datum der mündlichen Prüfung: 04.10.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Cannabinoid
basierte 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

.....
(Unterschrift)

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

Sichler ME, Löw MJ, Schleicher EM, Bayer TA, Bouter Y (2019): Reduced Acoustic Startle Response and Prepulse Inhibition in the Tg4-42 Model of Alzheimer's Disease *J Alzheimers Dis Rep* 3, 269-278

Bouter C, Henniges P, Franke TN, Irwin C, Sahlmann CO, **Sichler ME**, Beindorff N, Bayer TA, Bouter Y (2018): (18)F-FDG-PET Detects Drastic Changes in Brain Metabolism in the Tg4-42 Model of Alzheimer's Disease *Front Aging Neurosci* 10, 425

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

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

Kongressbeiträge:

Sichler ME, Löw MJ, Bayer TA, Tucholla P, Bouter Y: 30th Symposium of the AGNP München 04.-06.10.2017. Posterpräsentation: Tetrahydrocannabinol (THC) Improves Motor and Memory Deficits in a Sporadic Alzheimer-Model

Sichler ME, Löw MJ, Kostul I., Wiltfang J., Bayer TA, Bouter Y: The International Annual Congress on Controversies on Cannabis-Based Medicines Wien 25.-26.06.2018. Posterpräsentation: Chronic Tetrahydrocannabinol-Treatment Improves Behavior Deficits and Rescues Neuron Loss in a Sporadic Alzheimer Model

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Die Alzheimer-Erkrankung	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Klassifikation	1
1.1.3 Ätiologie.....	2
1.1.4 Neuropathologische Merkmale	3
1.1.5 Pathogenese.....	5
1.1.6 Symptomatik und klinischer Verlauf	10
1.1.7 Diagnostik	11
1.1.8 Mausmodelle.....	12
1.1.9 Therapie	14
1.2 Das Endocannabinoidsystem	16
1.2.1 Aufbau.....	17
1.2.2 Signaltransduktion	19
1.2.3 Funktion	20
1.3 Das Endocannabinoidsystem und die Alzheimer-Erkrankung	22
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Versuchstiere	28
2.1.1 Haltungsbedingungen.....	28
2.1.2 Genotypisierung von Mäusen der Tg4-42 _{hom} -Mauslinie	28
2.2 Behandlung mit Tetrahydrocannabinol	31
2.2.1 Herstellung der Injektionslösung	31
2.2.2 Intraperitoneale Injektion.....	31
2.2.3 Behandlungsgruppen.....	31
2.3 Verhaltensversuche.....	32
2.3.1 Rotarod.....	33
2.3.2 Elevated plus maze.....	34
2.3.3 Light/dark box.....	35
2.3.4 Open field maze und object recognition test.....	36
2.3.5 Morris water maze	38
2.4 Präparation des Hirngewebes	40
2.4.1 Perfusion	40

Inhaltsverzeichnis

2.4.2	Probenentnahme.....	41
2.4.3	Fixation	41
2.4.4	Herstellung von Gewebeschnitten	42
2.5	Färbetechniken.....	43
2.5.1	Immunhistochemische Färbungen	43
2.5.2	Kresylviolett-färbung	45
2.6	Mikroskopie.....	46
2.6.1	Stereologie	46
2.6.2	Quantifizierung der Neurogenese	48
2.6.3	Quantifizierung der Inflammation und CB1-Expression	48
2.7	Statistik	49
2.8	Software	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Nachweis des Transgens der Tg4-42 _{hom} -Mauslinie	51
3.2	Verhaltensversuche.....	51
3.2.1	Fehlender Einfluss von Δ 9-THC auf die Motorik der Tg4-42-Mauslinie	51
3.2.2	Auswirkungen von Δ 9-THC auf das Angstverhalten der Tg4-42-Mauslinie	52
3.2.3	Einfluss von Δ 9-THC auf die Gedächtnisleistung der Tg4-42-Mauslinie.....	56
3.3	Verminderter Nervenzellverlust infolge THC-Behandlung.....	61
3.4	Auswirkungen der THC-Behandlung auf immunhistologische Marker	62
3.4.1	Unveränderte Neurogenese im Gyrus Dentatus.....	62
3.4.2	Verstärkte Neuroinflammation im Cortex cerebri	63
3.4.3	Verstärkte CB1-Expression im Cortex cerebri	65
4	Diskussion	67
4.1	Die Tg4-42-Mauslinie eignet sich zur Untersuchung einer THC-Behandlung	67
4.2	Δ 9-THC verbessert die kognitive Leistung in der Tg4-42-Mauslinie	68
4.3	Reduktion des Hippocampus-spezifischen Nervenzellverlustes durch THC-Behandlung	72
4.4	Verstärkte Astrozytenantwort infolge der Langzeitbehandlung mit Δ 9-THC	75
4.5	Angleichung an das Angstverhalten von Wildtyp-Tieren infolge THC-Behandlung.....	77
4.6	Δ 9-THC stellt eine Therapieoption der Alzheimer-Erkrankung dar	81
5	Zusammenfassung.....	83
6	Literaturverzeichnis.....	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Unterscheidung in den amyloidogenen- und nicht-amyloidogenen Weg der β APP-Prozessierung anhand einer schematischen Darstellung angelehnt an Bayer und Wirths (2008).....	6
Abbildung 1.2: Intraneuronales Beta-Amyloid stellt in der modifizierten Amyloid-Kaskade pathophysiologisch den Ausgangspunkt für die Alzheimer-Erkrankung dar.....	8
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der charakteristischen Merkmale der Tg4-42-Mauslinie.....	14
Abbildung 2.1: Beginn der Behandlung im präventiven Behandlungsansatz vor- und im therapeutischen Behandlungsansatz nach Eintreten des signifikanten Nervenzellverlustes.....	32
Abbildung 2.2: Zeitliche Staffelung der Verhaltensversuche innerhalb von 14 Versuchstagen.....	33
Abbildung 2.3: Versuchsaufbau Rotarod: Überprüfung des motorischen Lernvermögens und der Koordination.....	34
Abbildung 2.4: Versuchsaufbau EPM: Untersuchung des Angstverhaltens.....	35
Abbildung 2.5: Versuchsaufbau DLB: Untersuchung des Angstverhaltens.....	36
Abbildung 2.6: Versuchsaufbau OFM: Untersuchung des Angstverhaltens.....	37
Abbildung 2.7: Versuchsaufbau ORT: Untersuchung des Explorationsverhaltens, der Präferenz für Neues und Gedächtnisleistung.....	38
Abbildung 2.8: Versuchsaufbau MWM: Untersuchung des Hippocampus-abhängigen Lernens und räumlichen Bezugsgedächtnisses.....	40
Abbildung 2.9: Randomisierte Auswahl der Quadrate in der CA1-Region des Hippocampus.....	47
Abbildung 2.10: Schematische Abbildung der Aufnahmen von Hippocampus und Cortex cerebri.....	49
Abbildung 3.1: Nachweis des Transgens der Tg4-42-Mauslinie bei 248bp.....	51
Abbildung 3.2: THC hat keinen Einfluss auf die Lernkurve der Tg4-42-Mauslinie im Rotarod Test.....	52
Abbildung 3.3: Verändertes Angstverhalten von unbehandelten Tg4-42-Mäusen in der präventiven Behandlungsgruppe.....	53
Abbildung 3.4: Unverändertes Angstverhalten zwischen unbehandelten- und THC-behandelten Tg4-42-Mäusen im LDB.....	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.5: Vermindertes Angstverhalten der THC-behandelten Tg4-42-Mäuse in der präventiven Behandlungsgruppe.....	56
Abbildung 3.6: Erhöhter Präferenz-Index von THC behandelten Mäusen der therapeutischen Behandlungsgruppe.....	57
Abbildung 3.7: Δ 9-THC hat keinen Einfluss auf Motorik und Visuelle Fähigkeiten der Versuchstiere.....	58
Abbildung 3.8: Δ 9-THC verbessert das räumliche Lernen sowohl in der präventiven- als auch in der therapeutischen Behandlungsgruppe.....	60
Abbildung 3.9: Tiere der Tg4-42-Mauslinie zeigen eine Verbesserung des räumlichen Lernens durch Langzeit-THC-Behandlung.....	61
Abbildung 3.10: THC-behandelte Tiere der präventiven Behandlungsgruppe weisen im Vergleich zu unbehandelten Tieren eine erhöhte Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus auf.....	62
Abbildung 3.11: Fehlender Einfluss von Δ 9-THC auf die Neurogenese im Gyrus Dentatus.....	63
Abbildung 3.12: Verstärkte GFAP-Expression im Cortex cerebri infolge THC-Behandlung.....	64
Abbildung 3.13: THC hat keinen Einfluss auf die IBA1-Expression in der Tg4-42-Mauslinie.....	65
Abbildung 3.14: Erhöhte CB1-Expression im Cortex cerebri bei THC-behandelten Tieren.....	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Chemikalien und Reagenzien.....	24
Tabelle 2.2: Primer.....	25
Tabelle 2.3: Primäre Antikörper.....	25
Tabelle 2.4: Sekundäre Antikörper.....	26
Tabelle 2.5: Geräte.....	26
Tabelle 2.6: Gebrauchswaren.....	27
Tabelle 2.7: Reaktionsmix für Tg4-42-PCR.....	30
Tabelle 2.8: PCR-Protokoll.....	30
Tabelle 2.9: TBE-Puffer pH 8,3.....	30
Tabelle 2.10: MWM Protokoll.....	40
Tabelle 2.11: Dehydratationsprotokoll.....	42
Tabelle 2.12: Lösungen für Kresylviolett-färbung.....	46
Tabelle 2.13: Formeln für Berechnung der Gesamtneuronenzahl.....	47
Tabelle 2.14: Parameter für die Berechnung der Gesamtneuronenzahl.....	47
Tabelle 2.15: Schwellenwerteeinstellung Image J.....	49
Tabelle 2.16: Softwares.....	50

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Aufschlüsselung
11-OH-THC	11-Hydroxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
2-AG	2-Arachidonylglycerol
AEA	N-Arachidonylethanolamide
AICD	<i>APP intracellular domain</i> (intrazelluläre APP-Domäne)
APP	<i>amyloid precursor protein</i> (Amyloid-Vorläuferprotein)
asf	<i>area sampling fraction</i> (Fläche-Auswahlsatz)
A β	Beta-Amyloid
CA1	Cornu Ammonis 1
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CB1	Cannabinoidrezeptor 1
CB2	Cannabinoidrezeptor 2
cCT	craniale Computertomographie
cMRT	craniale Magnetresonanztomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCX	Doublecortin
DG	<i>dentate gyrus</i> (Gyrus Dentatus)
dNTP's	Dinukleotidtriphosphate
DSI	<i>depolarization induced suppression of inhibition</i> (depolarisationsinduzierte Unterdrückung der Hemmung)
ECS	Endocannabinoidsystem
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOAD	<i>early onset Alzheimer's disease</i> (früh einsetzende Alzheimer-Erkrankung)
EPM	<i>elevated plus maze</i> (erhöhtes Pluslabyrinth)
FAD	<i>familial alzheimer's disease</i> (Familiäre Alzheimer Erkrankung)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FDG-PET	<i>2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose-positron-emission-tomography</i>
FELASA	<i>federation of european laboratory science associations</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> (saures Gliafaserprotein)
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> (G Protein-gekoppelter Rezeptor)
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde

Abkürzungsverzeichnis

HEPA	<i>high efficiency particulate air</i>
HMPAO-SPECT	<i>99mTc-hexamethylpropyleneamine oxime- single photon emission computed tomography</i>
IBA1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule</i>
ICD-10	<i>international classification of diseases-10</i> (Internationale Statistische Klassifikation der Krankheiten-10)
IVC	<i>individually ventilated cages</i> (einzeln belüftete Käfige)
LAVES	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
LDB	<i>light/dark box</i> (Hell/Dunkel Box)
LOAD	<i>late onset alzheimer's disease</i> (spät einsetzende Alzheimer- Erkrankung)
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCI	<i>mild cognitive impairment</i> (leichte kognitive Störung)
mGluR1	metabotroper Glutamatrezeptor 1
MWM	<i>Morris water maze</i> (Morris-Wasserlabyrinth)
NFT	<i>neurofibrillary tangles</i> (Tau-Fibrillen)
OFM	<i>open field maze</i> (offenes Feldlabyrinth)
ORT	<i>object recognition test</i> (Objekt-Erkennungstest)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
pE-A β	Pyroglutamat-Beta-Amyloid
PFA	Paraformaldehyd
PHF	<i>paired helical filaments</i> (paarige helikale Filamente)
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
S.E.M.	<i>standard error of the mean</i> (Mittelwert \pm Standardfehler)
SAD	<i>sporadic alzheimer's disease</i> (sporadische Alzheimer- Erkrankung)
sAPP β	<i>secreted APPβ</i> (sekretiertes APP β)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPF	spezifisch pathogenfreie Bedingungen
ssf	<i>section sampling fraction</i> (Schnitt-Auswahlsatz)
TGN	trans-Golgi-Netzwerk

Abkürzungsverzeichnis

tmc	<i>total markers counted</i> (Gesamtanzahl der Markierungen)
TRH	<i>thyrotropin releasing hormone</i>
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TRPV1	<i>transient receptor potential vanilloid 1</i>
tsf	<i>thickness sampling fraction</i> (Dicke-Auswahlsatz)
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
UpM	Umdrehungen pro Minute
ZNS	zentrales Nervensystem
ZTE	zentrale tierexperimentelle Einrichtung
β AAPP	<i>amyloid β precursor protein</i> (Beta-Amyloid Vorläuferprotein)
Δ 9-THC	Tetrahydrocannabinol

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer-Erkrankung

Gemäß *international classification of diseases-10* (ICD-10; Internationale Statistische Klassifikation der Krankheiten-10) zählt die Alzheimer-Erkrankung zu den degenerativen Krankheiten des Nervensystems mit begleitender organischer und symptomatischer psychischer Störung (DIMDI, BMG und KKG 2017).

1.1.1 Epidemiologie

Sowohl die Demenzen im Allgemeinen, als auch die Alzheimer-Erkrankung im Speziellen gelten als Krankheiten des fortgeschrittenen Alters, welche einen starken Anstieg in der altersspezifischen Prävalenz und Inzidenz ab dem 65. Lebensjahr zeigen (Qiu et al. 2009). Von allen Demenzen nimmt dabei die Alzheimer-Erkrankung mit einem Anteil von 50 – 75 % den wohl größten Stellenwert ein (Lane et al. 2018).

Weltweit ist die Demenz-Prävalenz von 20,2 Millionen im Jahr 1990 auf 43,8 Millionen im Jahr 2016 angestiegen (Nichols et al. 2019; Sathianathan und Kantipudi 2018). In Deutschland betrug die Demenz-Prävalenz 1,2 Millionen im Jahr 2016 (Nichols et al. 2019). Hochrechnungen gehen davon aus, dass sich die Zahl der Demenz-Erkrankten aufgrund des demografischen Wandels bis 2050 mehr als verdreifachen wird (Brookmeyer und Gray 2000; Ferri et al. 2005; Lane et al. 2018; Robinson et al. 2017).

Metaanalysen konnten regionale Unterschiede in der Demenz-Prävalenz im Sinne einer erhöhten Zahl in Entwicklungsländern aufzeigen (Ferri et al. 2005). Weiterhin bestehen zwischen ethnischen Gruppen relevante Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit und den Risikofaktoren, an Alzheimer zu erkranken (Babulal et al. 2019).

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Frauen im Vergleich zu Männern ein erhöhtes kumulatives Risiko haben, an Alzheimer zu erkranken (Andersen et al. 1999).

1.1.2 Klassifikation

Bei der Einteilung der Alzheimer-Erkrankung wird zwischen der spät einsetzenden- (*late onset Alzheimer's disease*, LOAD) und der deutlich selteneren früh einsetzenden Alzheimer-Demenz (*early onset Alzheimer's disease*, EOAD) unterschieden (Bekris et al. 2010). Zu Letzterer wird jene Form gezählt, welche als Familiäre Alzheimer-Erkrankung (*familial Alzheimer's Disease*, FAD) bezeichnet wird und mit einer Prävalenz von weniger als 1 % sehr selten vorkommt (van Cauwenberghe et al. 2016). Die FAD beruht auf Mutationen in den Genen APP als Gen für die Kodierung des Amyloid-Vorläuferproteins, PSEN1 und PSEN2 und wird autosomal dominant

an die Nachkommen vererbt (Campion et al. 1999; Goate et al. 1991; Scheuner et al. 1996; Selkoe et al. 1988). Die Formen der Alzheimer-Erkrankung, welche nicht mit jenen Mutationen assoziiert sind, werden zur sporadischen Alzheimer-Erkrankung (*sporadic Alzheimer's disease*, SAD) zusammengefasst (Dorszewska et al. 2016).

1.1.3 Ätiologie

Neben den mit der FAD assoziierten Genen konnten genomweite Assoziationsstudien zahlreiche Risikogene für die LOAD identifizieren und darstellen, dass der APP-Metabolismus mit beiden Formen der Alzheimer-Erkrankung assoziiert ist (Jansen et al. 2019; Kunkle et al. 2019; Lambert et al. 2013).

Eine Schlüsselrolle nimmt das Apolipoprotein ϵ ein, welches mit seinen Isoformen entscheidend das Erkrankungsrisiko beeinflusst (Raber et al. 2000). Während das Allel für Apolipoprotein $\epsilon 4$ als starker Risikofaktor für die LOAD identifiziert wurde, gilt das Allel für Apolipoprotein $\epsilon 3$ als protektiv (Corder et al. 1993; Farrer et al. 1997; Liu et al. 2013).

Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass Menschen mit der numerischen Chromosomenaberration Trisomie 21 im Alter von durchschnittlich 40 Jahren in nahezu 100 Prozent der Fälle neuropathologische Merkmale der Alzheimer-Krankheit aufweisen und überdurchschnittlich häufig klinisch an Alzheimer erkranken, wodurch die Trisomie 21 als weiterer Risikofaktor anerkannt ist (Head et al. 2012; McDowell 2001; Olson und Shaw 1969). Neben genetischen Faktoren konnten zahlreiche Umwelteinflüsse als Faktor für die Erkrankungswahrscheinlichkeit beschrieben werden. So konnte gezeigt werden, dass ein überdurchschnittlicher IQ, Schulbildung, beruflicher Erfolg, sowie eine aktive Freizeitgestaltung mit einem geringeren Erkrankungsrisiko assoziiert sind (Stern 2006). Ein niedriger sozioökonomischer Status hingegen wird mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht (Evans et al. 1997).

Zahlreiche weitere Risikofaktoren und prädisponierende Faktoren wurden für die Alzheimer-Erkrankung nachgewiesen, wie betroffene Verwandte ersten Grades, das weibliche Geschlecht, Kopfverletzungen, Diabetes mellitus, Cholesterin, arterielle Hypertonie, Virus-Infektionen und oxidativer Stress (Grant et al. 2002; McDowell 2001; Pasquier et al. 2006; van Duijn et al. 1991).

Als womöglich größter Risikofaktor gilt das Lebensalter, wobei ein exponentieller Anstieg der Prävalenz ab einem Alter von 65 Jahren vorliegt und jener Anstieg nachgewiesenermaßen bis in die fortgeschrittenen Altersgruppen bestehen bleibt (Qiu et al. 2009; Rocca et al. 1991; von Strauss et al. 1999).

1.1.4 Neuropathologische Merkmale

Im Rahmen des Krankheitsprozesses treten neuropathologische Veränderungen des Gehirns auf, welche mitunter pathognomonisch für die Alzheimer-Krankheit sind (Castellani et al. 2006).

Jene lassen sich in strukturelle- und mikroskopische Veränderungen unterteilen (Drew 2018). Strukturelle Veränderungen umfassen eine Atrophie der grauen Substanz und feinstrukturelle Defekte der weißen Substanz, sowie eine progressive Erweiterung des Ventrikelsystems des Großhirns (Nestor et al. 2008; Weiler et al. 2015).

Mikroskopische Veränderungen können in „positive“- und „negative“- Läsionen unterteilt werden. Erstere bezeichnen Amyloid-Plaques, Neurofibrillen, Gliose und die zerebrale Amyloidangiopathie, während Letztere durch Nervenzellverlust und Synapsenverlust repräsentiert werden (Ghiso et al. 2010; Kidd 1964; Rodriguez-Arellano et al. 2016; Selkoe 2002; Serrano-Pozo et al. 2011; West et al. 1994).

1.1.4.1 Amyloid-Plaques

Die für die Alzheimer-Erkrankung pathognomonischen Amyloid-Plaques sind extrazellulär gelegene, unlösliche Komplexe, welche als Hauptbestandteil proteinreiche Aggregate aus Beta-Amyloid und insbesondere der Isoform A β ₄₂ aufweisen (Castellani et al. 2006; Golde et al. 2000; Kidd 1964; Masters et al. 1985; Miller et al. 1993; Roher et al. 1993). Amyloid-Plaques werden zunehmend mit aktivierten Mikroglia, sowie reaktiven Astrozyten (1.1.4.3) assoziiert, welche eine konsekutive lokale Neuroinflammation verursachen (Dickson 1997). Entsprechend ihrer Morphologie und Zusammensetzung wird ein Großteil der Amyloid-Plaques in die vier Plaque-Typen ‚diffus‘, ‚primitiv‘, ‚klassisch‘ und ‚kompakt‘ eingeteilt (Armstrong 1998).

1.1.4.2 Tau-Fibrillen

Neurofibrilläre *Tangles* (NFT's; Tau-Fibrillen) sind intraneuronal vorkommende Akkumulationen aus zytoskelettalen Fibrillen, sogenannten *paired helical filaments* (PHF) (Wisniewski und Wen 1985). Diese PHF bestehen aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein τ (Tau), welches unter physiologischen Bedingungen an der Bildung von Mikrotubuli beteiligt ist (Grundke-Iqbal et al. 1986; Weingarten et al. 1975). Jenes Tau ist bei Alzheimer-Patienten fehlgefaltet und atypisch hyperphosphoryliert (Grundke-Iqbal et al. 1986; Iqbal et al. 2005; Opattova et al. 2013). Die Modifikation des Tau-Proteins scheint dabei die Interaktion mit Mikrotubuli zu beeinträchtigen, was in der Entstehung von Tau-Fibrillen resultiert (Avila et al. 2004; Congdon et al. 2008).

Einleitung

Dabei besteht eine negative Korrelation zwischen der Anzahl an Tau-Fibrillen und Neuronenanzahl im frontalen und temporalen Cortex, sowie Hippocampus (Bondareff et al. 1989). Es konnte gezeigt werden, dass der klinisch beurteilte Schweregrad der Alzheimer-Demenz verhältnismäßig der Akkumulation an Tau-Fibrillen im Neocortex entspricht (Arriagada et al. 1992; Bierer et al. 1995; Cho et al. 2016).

1.1.4.3 Neuroinflammation

Die bisher beschriebenen neuropathologischen Veränderungen gehen einher mit einer massiven Entzündungsreaktion in den betroffenen Hirnregionen, der Neuroinflammation (Shadfar et al. 2015). Daran beteiligt sind Gliazellen, speziell Mikroglia und Astroglia, sowie Immunmediatoren und Immunmodulatoren (Heneka et al. 2015).

Aktivierte Mikroglia agieren als Makrophagen des Zentralnervensystems, während nicht-aktivierte Mikroglia die Anzahl an funktionellen Synapsen regulieren und somit die Synapsenaktivität beeinflussen (Ji et al. 2013; Kettenmann et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Beta-Amyloid Fibrillen durch Bindung eines membranständigen A β -Rezeptor-Komplexes eine Signaltransduktionskaskade auslösen und somit Mikrogliazellen aktivieren (Bamberger et al. 2003). Aktivierte Mikrogliazellen ihrerseits phagozytieren Aggregate aus Beta-Amyloid mittels Scavenger-Rezeptoren, wodurch jenen Zellen eine entscheidende Bedeutung bei der Elimination von Beta-Amyloid zugeschrieben wird (Paresce et al. 1996).

Astroglia wiederum werden in reaktive und nicht-reaktive Astroglia unterschieden (Sofroniew 2009). Nicht-reaktive Astroglia sind u.a. an der Bereitstellung von Energiereserven für Neuronen, der Synapsenfunktion und Plastizität, sowie der Aufrechterhaltung des extrazellulären Milieus beteiligt (Sofroniew 2009; Sofroniew und Vinters 2010).

Reaktive Astroglia treten im Rahmen von pathologischen Prozessen des Gehirns auf. Bei der Alzheimer-Demenz tritt jene reaktive Astroglie insbesondere in räumlicher Nähe zu senilen Plaques auf (Medeiros und LaFerla 2013). Es konnte gezeigt werden, dass Astroglia Beta-Amyloid mittels Beta-Amyloid Rezeptoren binden und infolgedessen abbauen können (Wyss-Coray et al. 2003). Weiterhin bewirken Astrozyten eine verstärkte Expression von Proteasen, welche maßgeblich am Abbau von Beta-Amyloid beteiligt sind (Saido und Leissring 2012).

Sowohl Mikroglia als auch Astroglia setzen bei Kontakt mit Beta-Amyloid Mediatoren und Modulatoren, wie Zytokine oder Interleukine frei, welche wiederum zu einer verstärkten Neuroinflammation führen (Heneka et al. 2015).

1.1.4.4 Synapsen- und Nervenzellverlust

Ein frühes Ereignis der Alzheimer-Erkrankung ist die strukturelle Schädigung von Synapsen und der damit einhergehende Synapsenverlust insbesondere im Neocortex und limbischen System (Crews und Masliah 2010; Davies et al. 1987; DeKosky und Scheff 1990; Masliah et al. 1994; Selkoe 2002). Dabei zeigt sich eine hohe Korrelation zwischen dem Synapsenverlust und der Ausprägung der neuropsychologischen und kognitiven Symptomatik (DeKosky und Scheff 1990; Terry et al. 1991). Im Rahmen der Schädigung von Synapsen kommt es konsekutiv zu einer retrograden Schädigung von Neuronen, was in Nervenzellverlust resultiert (Masliah 2001; Masliah et al. 1994; Selkoe 2002).

Post-mortem Analysen haben gezeigt, dass zwischen altersbedingtem- und Alzheimer-bedingtem Nervenzellverlust unterschieden werden kann, wobei jeweils spezifische Hirnregionen betroffen sind (West et al. 1994). Zu den von Alzheimer-bedingtem Nervenzellverlust betroffenen Hirnregionen zählen die CA1 Region des Hippocampus und Teile der Area entorhinalis (Gomez-Isla et al. 1996; West et al. 1994). Die CA1 Region zeigt eine krankheitsspezifische Korrelation zwischen Volumen bzw. Neuronenanzahl und der Schwere der klinischen Symptomatik, wobei der Nervenzellverlust stadienabhängig voranschreitet (Bobinski et al. 1998; Rossler et al. 2002).

1.1.5 Pathogenese

1.1.5.1 β APP-Prozessierung

Beta-Amyloid stellt ein Spaltprodukt des membranständigen Vorläuferproteins *amyloid β precursor protein* (β APP) dar, welches durch die APP-Sequenz auf Chromosom 21 kodiert wird (Glenner und Wong 1984; Goate et al. 1991; Kang et al. 1987; Selkoe et al. 1988; St George-Hyslop et al. 1987). Neben Beta-Amyloid entstehen während der β APP-Prozessierung weitere Spaltprodukte, wobei α -, β -, und γ -Sekretasen als Spaltenzyme fungieren (Esch et al. 1990; MacLeod et al. 2015).

Die Prozessierung des β APP wird dabei in den amyloidogenen- und den nicht-amyloidogenen Weg unterteilt, welche sich in den entstehenden Produkten und beteiligten Enzymen unterscheiden (Abbildung 1.1) (Roberts et al. 1994).

Infolge des nicht-amyloidogenen Wegs kommt es vermittelt durch α -Sekretasen zur Spaltung des β APP in das N-terminale lösliche APP α (*soluble APP α* , sAPP α) und das C-terminale C83. Letzterem wird dabei in einem zweiten Schritt das P3 Fragment abgespalten (Esch et al. 1990; Kojro und Fahrenholz 2005; Naslund et al. 1994; Sisodia et al. 1990).

Einleitung

Beta-Amyloid ist hingegen ein Produkt des amyloidogenen Wegs, wobei β APP zunächst durch β -Sekretasen in das N-terminale lösliche APP β (*soluble APP β* , sAPP β), sowie das C-terminale CTF99 gespalten wird (Chow et al. 2010; Wilson et al. 1999). Letzteres wird durch γ -Sekretasen in die N-terminale APP *intracellular domain* (AICD) und das C-terminale Beta-Amyloid aufgespalten (Chow et al. 2010; Esch et al. 1990; Sisodia et al. 1990; Wilson et al. 1999).

Das *beta-site APP-cleaving enzyme 1* (BACE 1) wurde als β -Sekretase beschrieben und spaltet Vollängen- β APP an Asp1 und Glu11 der A β -Sequenz (Cai et al. 2001; Gurses et al. 2016; Nunan und Small 2000; Sinha et al. 1999; Vassar et al. 1999; Yan et al. 1999). Die γ -Sekretase hingegen besteht aus einem Enzymkomplex von 4 Untereinheiten, welcher zunächst aus CTF99 eine lange A β 48- oder A β 49-Variante und anschließend durch schrittweise Spaltung A β 40 oder A β 42 generiert (Carroll und Li 2016; Qi-Takahara et al. 2005). Prinzipiell können in Abhängigkeit von der Schnittstelle der γ -Sekretase A β -Varianten von 34- bis 50 Aminosäurenlängen gebildet werden (Kummer und Heneka 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in den Genen PSEN1/2 eine verstärkte Exposition des β APP gegenüber der γ -Sekretase bewirken und somit zu einer Erhöhung der extrazellulären Konzentration an Beta-Amyloid führen (Bentahir et al. 2006; Scheuner et al. 1996).

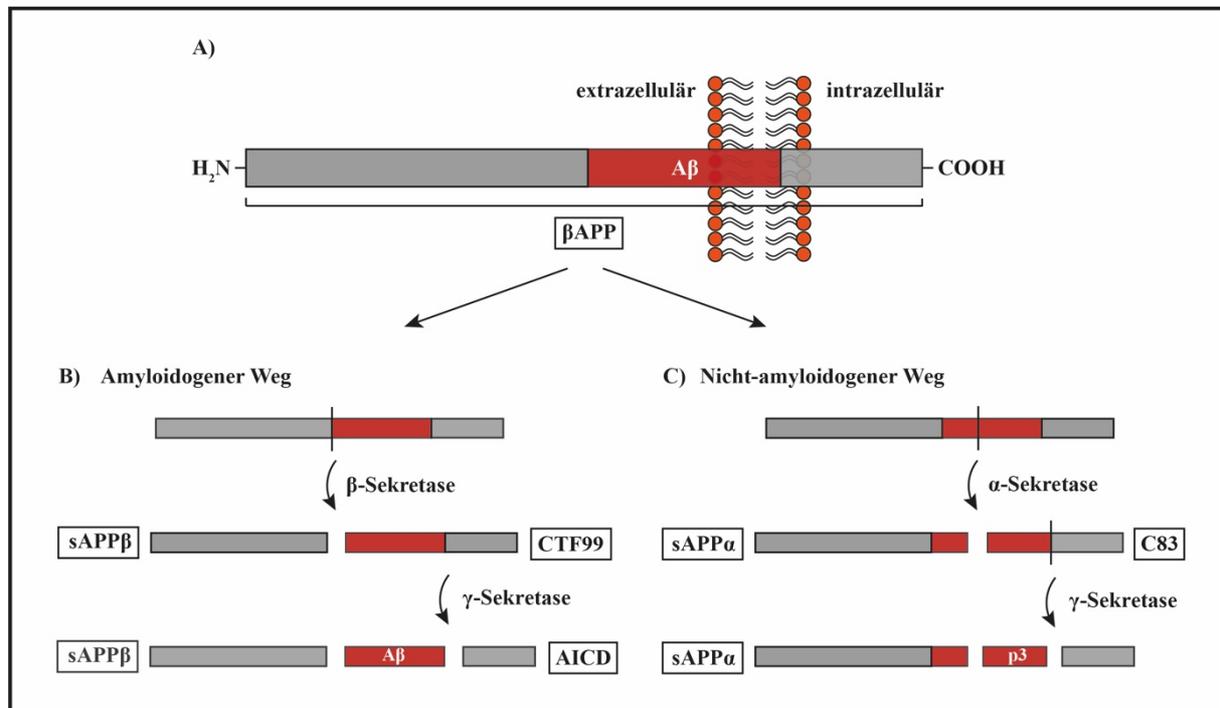


Abbildung 1.1: Unterscheidung in den amyloidogenen- und nicht-amyloidogenen Weg der β APP-Prozessierung anhand einer schematischen Darstellung angelehnt an Bayer und Wirths (2008). Der amyloidogene Weg (B) beschreibt die Spaltung des β APP durch β - und γ -Sekretasen mit Beta-Amyloid als Produkt. Als nicht-amyloidogenen Weg (C) wird die Spaltung des β APP durch α - und γ -Sekretasen bezeichnet, wobei kein Beta-Amyloid entsteht.

Einleitung

1.1.5.2 Die Amyloid-Hypothese

Die Amyloid-Hypothese geht von der Annahme aus, dass die Akkumulation und Ablagerung von Beta-Amyloid eine Schlüsselrolle in der Krankheitsentstehung einnehmen (Hardy und Allsop 1991; Hardy und Selkoe 2002). Jene Akkumulation beruht auf einer Ungleichheit zwischen Bildung und Abbau von Beta-Amyloid (Selkoe 2001). Neuropathologische Veränderungen im Sinne einer Akkumulation von Beta-Amyloid setzen bereits zehn bis 15 Jahre vor Beginn der Alzheimer-typischen Symptome ein (Reiman et al. 2012).

Mutationen in den Genen APP, PSEN1 und PSEN2 konnten kausal mit der familiären Form der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht werden und haben entscheidend zum Verständnis der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung beigetragen (Goate et al. 1991; Scheuner et al. 1996; van Cauwenberghe et al. 2016). Entsprechend der Hypothese beeinflussen jene Mutationen die Proteolyse des *amyloid β precursor Proteins* (β APP) (siehe 1.1.5.1), infolgedessen es zu einer extrazellulären Erhöhung der Konzentration an insbesondere $A\beta_{42}$ kommt und der Abbau von Beta-Amyloid nicht ausreichend gewährleistet werden kann (Hardy und Allsop 1991; Younkin 1998).

Nachfolgend kommt es in der Kaskade zu extrazellulären Ablagerungen von $A\beta_{42}$ und zeitlich versetzt von $A\beta_{40}$, welche in der Bildung von unlöslichen Fibrillen und Plaques resultieren (Iwatsubo et al. 1995; Levy et al. 1990; Masters et al. 1985; Selkoe 1998; Wisniewski et al. 1991).

Dem Beta-Amyloid konnte eine zytotoxische Wirkung insbesondere auf Nervenzellen nachgewiesen werden, wodurch die Akkumulation jenes Peptids mit dem Synapsen- und Nervenzellverlust assoziiert wird (Kim et al. 2003; Selkoe 2001; Zhang et al. 2002).

Dies wird von einer Immunantwort im Sinne einer Mikro- und Astroglie, sowie einer veränderten Aktivität von Kinasen und Phosphatasen mit Bildung von hyperphosphoryliertem Tau begleitet (Braithwaite et al. 2012; Hardy und Selkoe 2002).

Neueren Erkenntnissen zufolge findet neben extrazellulären Prozessen eine intraneuronale Ablagerung von Beta-Amyloid statt, welche durch die modifizierte Amyloid-Hypothese beschrieben wird (Wirhns et al. 2004). Dieser zufolge stellt die intrazelluläre Akkumulation von Beta-Amyloid und insbesondere $A\beta_{42}$ den Startpunkt für die im Vorfeld beschriebene Kaskade dar (Abbildung 1.2) (Aoki et al. 2008; Gouras et al. 2000; Wirhns et al. 2004).

Die Amyloid-Hypothese führt folglich die Entwicklung einer Alzheimer-Demenz mitsamt der damit einhergehenden Symptome auf die Dysregulation des Beta-Amyloid Metabolismus zurück (Selkoe 2001).

Einleitung

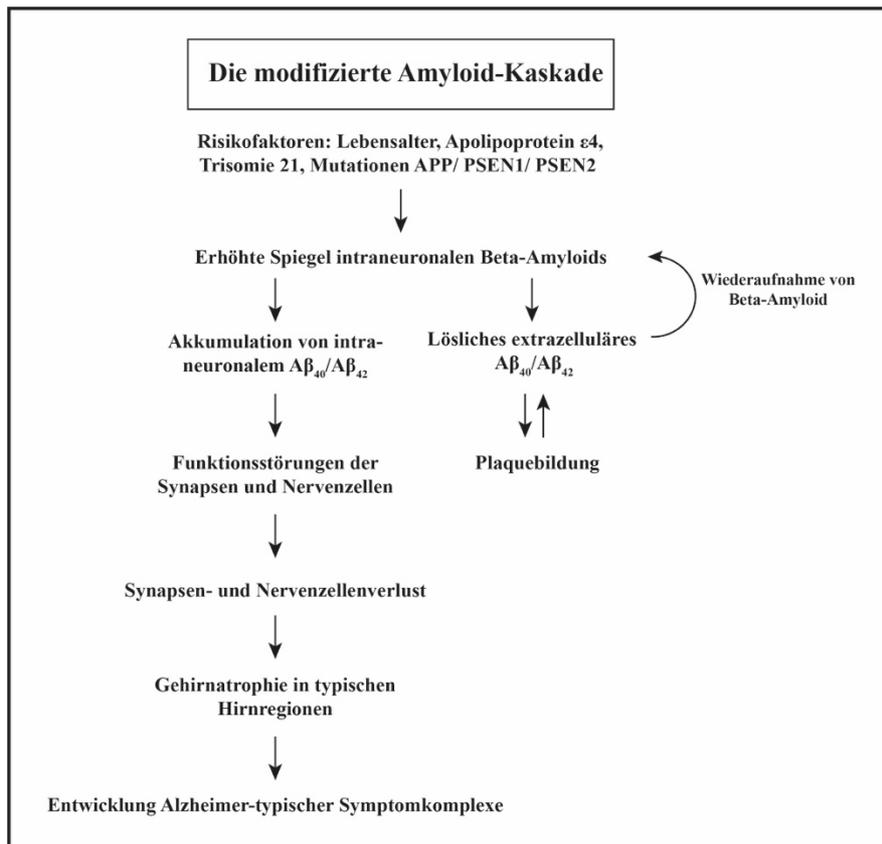


Abbildung 1.2: Intraneuronales Beta-Amyloid stellt in der modifizierten Amyloid-Kaskade pathophysiologisch den Ausgangspunkt für die Alzheimer-Erkrankung dar. Angelehnt an die von Wirths et al. (2004) publizierte schematische Darstellung der modifizierten Amyloid-Kaskade prädisponieren bekannte Risikofaktoren die intraneuronale Anreicherung von Beta-Amyloid, welche den Ausgangspunkt für nachfolgende Kaskade darstellt (Aoki et al. 2008; Gouras et al. 2000).

1.1.5.3 Aggregationsformen des Beta-Amyloids

Gehirne von Alzheimer-Patienten weisen im Vergleich zu Gehirnen von Patienten ohne klinische Demenz massiv erhöhte Werte an löslichem und unlöslichem kortikalem Beta-Amyloid auf (Wang et al. 1999). Während unlösliches Beta-Amyloid in Form von Fibrillen fixiert im Kern von Amyloid-Plaques vorkommt, diffundiert lösliches Beta-Amyloid in Form von Oligomeren im Extrazellularraum (Glennier 1980; Masters et al. 1985; Waters 2010). Es besteht dabei eine starke Korrelation zwischen der Schwere der Alzheimer-Krankheit und der Höhe an löslichem Beta-Amyloid, nicht aber unlöslichem Beta-Amyloid oder gesamtem Amyloid (Lue et al. 1999; McLean et al. 1999). Löslichen Beta-Amyloid Oligomeren wird daher eine toxische Wirkung zugeschrieben (Haass und Selkoe 2007). Hinweise verdichten sich, dass Amyloid-Plaques lösliches Beta-Amyloid binden und somit eine Schutzfunktion in Bezug auf toxische Beta-Amyloid Oligomere einnehmen, wodurch es erst bei Überschreiten der Pufferkapazität zu einem entsprechenden Anstieg der Konzentration an löslichen Beta-Amyloid Oligomeren kommt (Esparza et al. 2018; Esparza et al. 2013).

Einleitung

1.1.5.4 Varianten des Beta-Amyloids

Unter den Amyloid-Isoformen ist im Liquor cerebrospinalis von Gesunden $A\beta_{40}$ die häufigste und $A\beta_{42}$ die zweithäufigste Form, wobei letzterer eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit zugesprochen wird (Ida et al. 1996; Mo et al. 2015; Younkin 1995). Es konnte gezeigt werden, dass $A\beta_{42}$ im Vergleich zu $A\beta_{40}$ besonders hydrophob ist und zur schnelleren Fibrillenformation neigt, sowie frühzeitiger und entscheidender Bestandteil von senilen Plaques ist (Jarrett et al. 1993; Younkin 1998).

Neben unfragmentiertem Beta-Amyloid konnten N-terminal verkürzte Beta-Amyloid Varianten als Hauptbestandteil von Amyloid-Plaques identifiziert werden, welche als $A\beta_{4-42}$ mit der Aminosäure Phenylalanin anstatt von Aspartat beginnen (Masters et al. 1985). Weitere N-terminal verkürzte Beta-Amyloid Varianten stellen $A\beta_{pE3-42}$, $A\beta_{4-38}$ und $A\beta_{4-40}$ dar (Bouter et al. 2013). N-terminal verkürzte Beta-Amyloid Varianten zeigen im Vergleich zu unfragmentiertem Beta-Amyloid eine verstärkte Aggregation zu Amyloid-Fibrillen, wobei davon ausgegangen wird, dass dies einen möglichen Ausgangspunkt für die Plaque-Formation darstellt (Bayer und Wirths 2014; Bouter et al. 2013; Pike et al. 1995).

1.1.5.5 Intraneuronales Beta-Amyloid

Es konnte gezeigt werden, dass Beta-Amyloid und insbesondere $A\beta_{42}$ in den für die Alzheimer Erkrankung typischen Hirnregionen intrazellulär akkumuliert (Aoki et al. 2008; Gouras et al. 2000). Jene intrazelluläre Akkumulation von Beta-Amyloid scheint dabei bereits vor der Plaque-Formation und Entstehung von NFT's aufzutreten und wird damit als Frühereignis der Alzheimer-Erkrankung gewertet (Gouras et al. 2000; Gyure et al. 2001). Die Konzentration an intrazellulärem Beta-Amyloid sinkt mit der Bildung von extrazellulären Plaques, wodurch das intrazelluläre Beta-Amyloid mutmaßlich als Quelle der für die Plaque-Formation notwendigen Substrate fungiert (Gyure et al. 2001; LaFerla et al. 2007; Oddo et al. 2006). Wegiel et al. (2007) hingegen konnten jene Akkumulation altersunabhängig in gesunden Individuen nachweisen und gehen davon aus, dass die Akkumulation von intrazellulärem Beta-Amyloid ein physiologischer Prozess im Rahmen des Amyloid Metabolismus ist.

Die Produktion von Amyloid-Isoformen findet in spezifischen Zellkompartimenten statt, wobei $A\beta_{40}$ im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und $A\beta_{42}$ im Endoplasmatischen Retikulum (ER) generiert wird (Hartmann et al. 1997).

Weiterhin kann Beta-Amyloid und insbesondere $A\beta_{42}$ zum einen durch Bindung des $\alpha 7$ -nikotinischen Acetylcholinrezeptors, zum anderen durch passive Diffusion durch die Zellmembran intrazellulär aufgenommen werden (Bayer und Wirths 2010; Knauer et al. 1992;

Li et al. 2007; Nagele et al. 2002). Internalisiertes A β ₄₂ akkumuliert dabei im endosomal-lysosomalen System, wodurch es zu einer Störung des lysosomalen Protonengradienten mit konsekutiver Durchlässigkeit der lysosomalen Membran und folglich einem Untergang der Nervenzelle kommt (Bayer und Wirths 2010; Ditaranto et al. 2001; Yang et al. 1998; Zheng et al. 2012).

Dementsprechend scheint die intrazelluläre Akkumulation von Beta-Amyloid Peptiden in Synapsen- und Nervenzellverlust zu resultieren (Bayer und Wirths 2010).

1.1.6 Symptomatik und klinischer Verlauf

Die Klinik von Alzheimer-Patienten kann zu drei Symptomkomplexen entsprechend des ABC-Systems zusammengefasst werden, wobei jeder Buchstabe einen Symptomkomplex repräsentiert: *activities of daily living* (Alltagsaktivitäten), *behavioral and psychological symptoms* (neuropsychiatrische Begleitsymptome) und *cognition* (geistige Leistungsfähigkeit) (Corey-Bloom 2002; Grossberg 2002; Potkin 2002; Schmidtke und Otto 2012).

Die Einschränkung von Alltagsaktivitäten stellt für Betroffene eine starke Beeinträchtigung dar, da jene langfristig in einem Verlust der Eigenständigkeit und Handlungsfähigkeit resultiert (Potkin 2002). Dies bedeutet nicht zuletzt auch für Angehörige und Pflegende eine starke Belastung mit Beeinträchtigung der Lebensqualität (Liu et al. 2018; Wang et al. 2018).

Weiterhin sind neuropsychiatrische Begleitsymptome ein zentrales Element der Alzheimer-Erkrankung, wobei diese sich häufig bereits in einem frühen Krankheitsstadium manifestieren (Lyketsos et al. 2011). Jene Begleitsymptome konnten zu folgenden Subsyndromen in absteigender Häufigkeit zusammengefasst werden: Teilnahmslosigkeit, Hyperaktivität, Gemütskrankheit und Psychose (Aalten et al. 2007). Neuropsychiatrische Begleitsymptome nehmen dabei im Verlauf der Erkrankung an Intensität zu und bedürfen intensiver Behandlung und Pflege (Grossberg 2002).

Das Kernelement der Alzheimer-Symptomatik ist die Einschränkung der geistigen Leistungsfähigkeit, welche sich in einer Beeinträchtigung der Lernfähigkeit, des Gedächtnisses, der Sprache und der visuell-räumlichen Fähigkeiten zeigt (Corey-Bloom 2002; Quental et al. 2009; Weiner et al. 2008). Jene Beeinträchtigungen resultieren in einer reduzierten Autonomie mit enger Verknüpfung zum Symptomkomplex der Einschränkung von Alltagsaktivitäten (Corey-Bloom 2002; Potkin 2002).

Anhand der Ausprägung der Symptome kann der klinische Verlauf der Alzheimer-Erkrankung in Stadien eingeteilt werden. Der klinisch manifesten Alzheimer-Demenz gehen die präklinische Phase und *mild cognitive impairment* (MCI) voraus, wobei Letztere durch ein

Einsetzen der Symptome charakterisiert wird (Alzheimer's Association 2020; Albert et al. 2011; Jack et al. 2011; McKhann et al. 2011).

Entlang des chronisch progredienten Verlaufs der Alzheimer-Erkrankung hängt die Prognose insbesondere vom Alter bei Erkrankungsbeginn ab. Patienten in der siebten- und zu Beginn der achten Lebensdekade haben eine mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit von sieben bis zehn Jahren, welche bei entsprechend älteren Patienten abnimmt (Zanetti et al. 2009).

1.1.7 Diagnostik

Bei Verdacht auf Vorliegen eines Demenzsyndroms muss zunächst durch eine entsprechende Anamnese und Schweregradeinteilung mittels geeigneter kognitiver Kurztests die Diagnose einer Demenz mit entsprechendem Schweregrad gestellt werden, bevor eine ätiologische Differenzierung erfolgt (Leitlinie Demenzen 2016). Anschließend wird eine neuropsychologische Diagnostik, beispielsweise mittels der in Deutschland weit verbreiteten CERAD+-Testserie empfohlen (Morris et al. 1989; Leitlinie Demenzen 2016; Schmidtke und Otto 2012). Die Leitlinie empfiehlt bei Demenzsyndromen weiterhin eine strukturelle Bildgebung durch konventionelles cCT (craniale Computertomographie) oder cMRT (craniale Magnetresonanztomographie), wobei das cMRT ohne Kontrastmittel den höheren Stellenwert hat (Dormont et al. 2008; Leitlinie Demenzen 2016). Ein charakteristischer Frühbefund bei Alzheimer-Patienten ist die Dilatation der Seitenventrikelunterhörner bei Atrophie in temporomedialen Hirnregionen (Schmidtke und Otto 2012).

Eine weitere diagnostische Methode ist die Bestimmung von Neurodegenerationsmarkern in der Liquorchemie, wobei die kombinierte Bestimmung von $A\beta_{42}$ und Tau bzw. $A\beta_{42}$ und phosphoryliertem Tau gegenüber der einzelnen Parameterbestimmung eine höhere Sensitivität und Spezifität aufweist (Engelborghs et al. 2008; Mitchell 2009; Welge et al. 2009; Leitlinie Demenzen 2016). Typischerweise präsentieren sich Tau und phosphoryliertes Tau in erhöhter- und $A\beta_{42}$ in erniedrigter Konzentration (Mottet et al. 1995; Sunderland et al. 2003; Trojanowski et al. 1999). Bei Unklarheit der Diagnose infolge der o.g. Verfahren und insbesondere bei möglichen Differentialdiagnosen, können die nuklearmedizinischen Verfahren *2-[^{18F}]fluoro-2-Deoxy-D-Glucose-Positron-Emission-Tomography* (FDG-PET) und *^{99mTc}-hexamethylpropyleneamine oxime-single photon emission computed tomography* (HMPAO-SPECT) in der Diagnostik eingesetzt werden (Leitlinie Demenzen 2016). Diese Methoden zählen zur sogenannten funktionellen Bildgebung und treffen Aussagen über den Glukose- bzw. Sauerstoffmetabolismus (Bloudek et al. 2011). Dabei zeigt sich bei Alzheimer-Patienten in der FDG-PET ein deutlich verminderter Glukosemetabolismus im posterioren Cingulum, sowie dem temporoparietalen und präfrontalen Assoziationscortex (Herholz et al. 2002). Ein

ähnliches Muster zeigt sich in der SPECT mit verminderter Hirnperfusion insbesondere in temporoparietalen Hirnregionen (Bonte et al. 1986).

Bei gesicherter Diagnose einer Alzheimer-Erkrankung kann bei Verdacht auf autosomal-dominanten Erbgang in Rücksprache mit dem Patienten und ggf. den Angehörigen eine humangenetische Diagnostik erwogen werden (Leitlinie Demenzen 2016).

1.1.8 Mausmodelle

Für die Alzheimer-Erkrankung existieren inzwischen zahlreiche Mausmodelle, welche entscheidende Krankheitsmerkmale hinsichtlich Pathologie, Physiologie und Verhalten darstellen. Derzeit existiert jedoch kein Mausmodell, welches die Gesamtheit der Alzheimer-Erkrankung repräsentieren kann (Elder et al. 2010; Foidl und Humpel 2020).

Von besonderem Interesse bei der Entwicklung von Alzheimer-Mausmodellen sind die bei der FAD beteiligten Gene APP, PSEN1 und PSEN2, wobei zwischen transgenen Mausmodellen mit einer Überexpression von APP und denen mit einer Überexpression von Präsenilin-Mutationen unterschieden werden muss (Elder et al. 2010).

Die PDAPP-Mauslinie gilt als eine der ersten repräsentativen Mausmodelle der Alzheimer-Erkrankung, wobei humanes APP mit der FAD-assoziierten Indiana-Mutation V717F als Transgen dient (Elder et al. 2010; Games et al. 1995). Jene und weitere APP-basierte Mauslinien zeigen eine altersabhängige Amyloid-Ablagerung und Plaque-Bildung, einhergehend mit weiteren neuropathologischen Merkmalen und altersabhängigen kognitiven Defiziten (Games et al. 1995; Games et al. 2006). Die häufigste verwendete Mutation ist die schwedische Mutation K670N/M671L, welche eine Überexpression von Beta-Amyloid bedingt (Citron et al. 1992; Sasaguri et al. 2017). So existieren die Tg2576- und APP23-Mauslinie mit ausschließlich schwedischer Mutation, sowie die J20-Mauslinie mit einer Kombination aus schwedischer- und Indiana-Mutation (Hsiao et al. 1996; Mucke et al. 2000; Sturchler-Pierrat et al. 1997).

Anhand von Mauslinien mit ausschließlich Präsenilin-Mutationen konnte gezeigt werden, dass diese eine erhöhte Konzentration an $A\beta_{42}$ und einen altersabhängigen Nervenzellverlust, jedoch keine Plaque-Bildung in den entsprechenden Individuen bewirken (Chui et al. 1999; Duff et al. 1996; Holcomb et al. 1998). Bei Kreuzung von Mauslinien mit einer Überexpression von zum einen APP- und zum anderen Präsenilin-Mutationen zeigt sich hingegen eine ausgeprägte und bereits früher einsetzende Plaque-Bildung (Holcomb et al. 1998).

Der 5XFAD-Mauslinie wurden multiple APP- und PSEN1-Mutationen implementiert, wodurch die Tiere eine ausgeprägte und ausgesprochen frühzeitig einsetzende Alzheimer-Pathologie aufweisen (Oakley et al. 2006).

Einleitung

Durch die Entwicklung der 3xTg-Mauslinie kann durch eine zusätzliche Mutation des MAPT-Gens neben der Beta-Amyloid-, die Tau-Pathologie abgebildet werden, einhergehend mit bereits frühzeitig einsetzenden kognitiven Defiziten (Oddo et al. 2003; Stover et al. 2015).

Hinsichtlich neuropathologischer Merkmale der Alzheimer-Erkrankung bilden jedoch nur wenige dieser Mausmodelle den charakteristischen Nervenzellverlust ab.

Ein von FAD-basierten Mausmodellen unabhängiger Ansatz ist die Entwicklung von Mausmodellen, die eine Überexpression von N-terminal verkürztem Beta-Amyloid aufweisen. So zeigen Tiere der TBA2.1/2.2-Mauslinie und der TBA42-Mauslinie einen hippocampalen Nervenzellverlust, eine Überexpression von $A\beta_{pE3-42}$ mit Ablagerungen von Beta-Amyloid und $A\beta_{pE3-42}$, sowie eine neuroinflammatorische Reaktion (Alexandru et al. 2011; Meißner et al. 2015; Wittnam et al. 2012).

1.1.8.1 Die Tg4-42_{hom}-Mauslinie

Die Tg4-42_{hom}-Mauslinie ist eine transgene Mauslinie auf dem Hintergrund der C57BL/6J-Linie. Das Transgen kodiert für humanes N-terminal trunkiertes $A\beta_{4-42}$, wobei die transgene Sequenz an die Signalsequenz für murines Thyreotropin Releasing Hormon (TRH) gekoppelt ist und durch den Thy-1 Promotor reguliert wird (Bouter et al. 2013). Jenes Fusionspeptid ermöglicht die extrazelluläre Sekretion von $A\beta_{4-42}$, welches intraneuronal akkumuliert und maßgeblich an der Bildung stabiler Aggregate beteiligt ist (Bouter et al. 2013; Casas et al. 2004). Intraneurales $A\beta_{4-42}$ wird dabei vorwiegend in der CA1 Region des Hippocampus und ab einem Alter von zwei Monaten exprimiert, wobei es eine Korrelation mit dem altersabhängigen Nervenzellverlust und damit einhergehenden kognitiven Defiziten gibt (Abbildung 1.3) (Bouter et al. 2013; Bouter et al. 2014). Homozygote Tiere der Tg4-42-Mauslinie zeigen im Vergleich zu gesunden Wildtyp-Tieren einen signifikanten Nervenzellverlust in der CA1 Region des Hippocampus mit fünf, sechs und sieben Monaten von entsprechend 43-, 50- und 58 % (Antonios et al. 2015). Damit einhergehend findet sich eine verstärkte Neuroinflammation im Sinne einer Astro- und Mikrogliose und weiterhin ein reduzierter Glukosemetabolismus im gesamten Gehirn von Tieren der Tg4-42-Mauslinie (Bouter et al. 2018; Bouter et al. 2013).

Tiere der Tg4-42-Mauslinie zeigen, einhergehend mit Merkmalen der Alzheimer-Pathologie, Defizite in Hinblick auf Verhalten und Lernen. So konnte im *Morris water maze* als Test für räumliches Lernen in Nagetieren ein altersabhängiges Defizit beginnend ab einem Alter von fünf Monaten nachgewiesen werden (Antonios et al. 2015; Vorhees und Williams 2006).

Einleitung

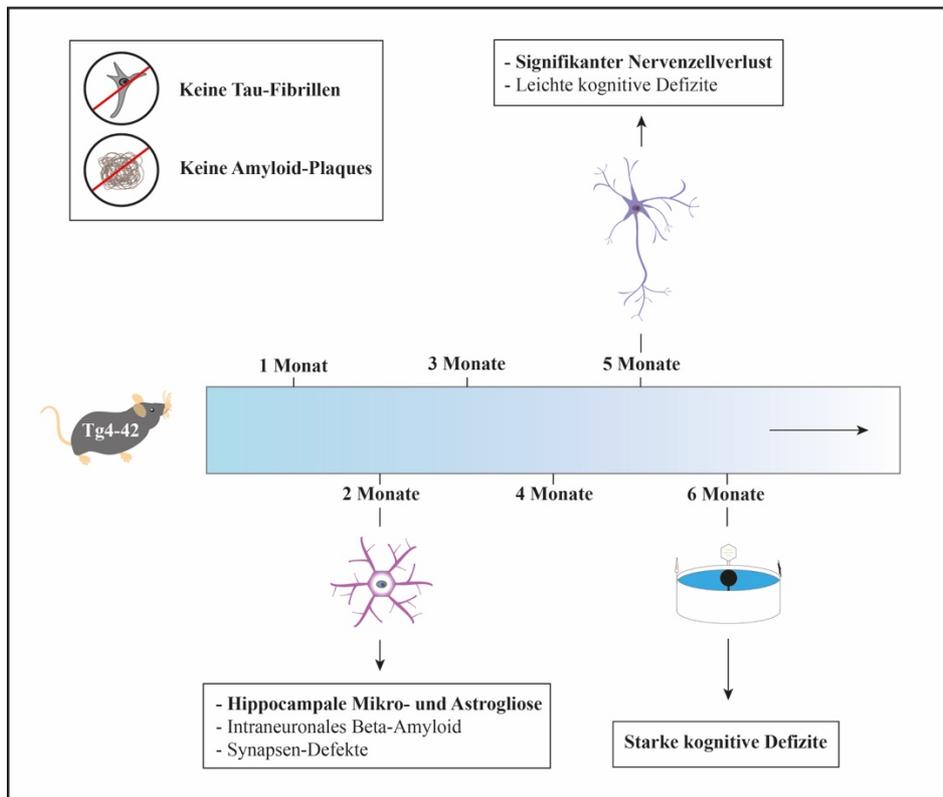


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der charakteristischen Merkmale der Tg4-42-Mauslinie. Bereits mit einem Alter von zwei Monaten setzt die hippocampale Neuroinflammation ein, welche von intraneuronalem Beta-Amyloid und Synapsen-Defekten begleitet wird (Bouter et al. 2013; Dietrich et al. 2018). Mit fünf Monaten sind signifikante Nervenzellverluste von -43 % in der CA1-Region des Hippocampus nachweisbar mit damit einhergehenden leichten kognitiven Defiziten. In einem Alter von sechs Monaten ruft der Nervenzellverlust von -50 % klinisch starke kognitive Defizite hervor, welche sich mittels etablierter Verhaltensversuche objektivieren lassen (Antonios et al. 2015).

1.1.9 Therapie

1.1.9.1 Aktuell zugelassene Therapien

Derzeit existieren zwei Substanzgruppen, die für die Therapie der Alzheimer-Erkrankung zugelassen sind und entsprechend der aktuellen Leitlinie empfohlen werden: Acetylcholinesterase-Inhibitoren und nicht-kompetitive NMDA-Antagonisten (Leitlinie Demenzen 2016). Erstere erhöhen durch Inaktivierung der Acetylcholinesterase die Bioverfügbarkeit von Acetylcholin an der Synapse und sind bei leichten bis mittelschweren Alzheimer-Demenzen zugelassen (Casey et al. 2010; Leitlinie Demenzen 2016). Memantin als nicht-kompetitiver NMDA-Antagonist greift durch Blockade des L-Glutamatrezeptors in das Glutamat-System ein und ist bei moderaten und schweren Alzheimer-Demenzen zugelassen (Hampel et al. 2012; Leitlinie Demenzen 2016). Beide Substanzgruppen haben einen bewiesenen symptomatischen Effekt in Bezug auf die in Abschnitt Symptomatik (1.1.6) beschriebenen drei Symptomkomplexe der Alzheimer-Erkrankung (Birks 2006; McShane et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass mit Acetylcholinesterase-Inhibitoren vorbehandelte

Einleitung

Patienten mit moderater bis schwerer Alzheimer-Demenz unter Umständen von einer zusätzlichen Therapie mit Memantin in Bezug auf die Kognition profitieren (Folch et al. 2018; Tariot et al. 2004).

Die mit der Alzheimer-Erkrankung einhergehenden Begleitsymptome können den zusätzlichen Einsatz von Antidepressiva, Antipsychotika, Antikonvulsiva oder Tranquilizern notwendig machen (Leitlinie Demenzen 2016).

1.1.9.2 Forschungsansätze

Die aktuell zugelassenen Substanzklassen wirken symptomatisch und haben keine Auswirkung auf die Krankheitsprogredienz, sodass großes Interesse an der Erforschung sogenannter *disease modifying drugs* (krankheitsmodifizierende Therapien) besteht (Leitlinie Demenzen 2016).

Die aktive Immunisierung zeigte vielversprechende Ergebnisse in Tiermodellen für die Alzheimer-Erkrankung im Sinne einer reduzierten Progredienz von neuropathologischen Merkmalen bei bereits erkrankten Tieren (Gelinis et al. 2004; Schenk et al. 1999). Eine Phase IIa Studie mit AN-1792, einem aktiven Impfstoff aus aggregiertem A β ₄₂, musste aufgrund damit assoziierter postvakzinaler Meningoenzephalitiden bei mit AN-1792 behandelten Patienten abgebrochen werden (Orgogozo et al. 2003; Senior 2002). Es konnte allerdings eine Verlangsamung der klinischen Progredienz und in *post-mortem* Analysen eine Reduktion von Amyloid-Plaques bei mit AN-1792 behandelten Patienten gezeigt werden (Hock et al. 2003; Nicoll et al. 2003). Weitere aktive Impfstoffe befinden sich derzeit in klinischer Testung (Huang et al. 2020).

Eine kontrollierbarere und damit im klinischen Einsatz sicherere Alternative stellt die passive Immunisierung dar, bei der die Antikörper gegen Beta-Amyloid im Gegensatz zur aktiven Immunisierung nicht vom Körper selbst gebildet-, sondern peripher injiziert werden (Melnikova 2007). Ein derzeit viel diskutierter passiver Impfstoff ist Aducanumab der Firma Biogen, ein humaner monoklonaler Antikörper gegen Beta-Amyloid Aggregate mitsamt löslicher Oligomere und unlöslicher Fibrillen (Sevigny et al. 2016).

Neben Vollängen Beta-Amyloid spielen zunehmend auch trunkierte Varianten als Therapieziel eine Rolle (Lues et al. 2015). So wird die Bildung des N-terminal trunkierten Pyroglutamat-Beta-Amyloids (pE-A β) durch die Glutaminyl-Cyclase katalysiert, welche durch den Glutaminyl-Cyclase-Inhibitor PQ912 gehemmt werden kann (Schilling et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass eine Langzeitbehandlung mit PQ912 zu einer Reduktion des neurotoxischen pE-A β führt und behandelte Tiere klinisch im Sinne eines signifikanten Effekts auf das räumliche Lernen von der Behandlung profitieren (Hoffmann et al. 2017).

Neben den bereits beschriebenen- existieren andere Therapieansätze, wie etwa die Reduktion von Tau-Aggregation und Tau-Phosphorylierung oder der Einsatz von Antioxidantien zur Reduktion von oxidativem Stress (Ferreira et al. 2015; Takashima 2010).

Ein weiterer Forschungsansatz konnte eine enge Verknüpfung zwischen der Alzheimer-Erkrankung und dem Endocannabinoidsystem (ECS) herstellen (1.2) (Bedse et al. 2015). So konnte gezeigt werden, dass das ECS zum einen pathologische Prozesse der Alzheimer-Erkrankung modulieren kann und zum anderen einen neuroprotektiven Effekt aufweist (Bedse et al. 2015; Rossi et al. 2015). Im Tierversuch hat Δ 9-THC als Phytocannabinoid bereits einen positiven Effekt auf altersbedingte kognitive Beeinträchtigungen mit Verbesserung des räumlichen Lernens und Langzeitgedächtnisses gezeigt (Bilkei-Gorzo et al. 2017). Bei Demenz-Patienten im Allgemeinen und Alzheimer-Patienten im Speziellen wurde bereits ein hinreichender therapeutischer Effekt von Endocannabinoiden auf neuropsychiatrische Symptome der Alzheimer-Erkrankung beschrieben, wobei aussagekräftige Studien weiterhin notwendig sind (Liu et al. 2015; Walther et al. 2006).

1.2 Das Endocannabinoidsystem

Die Cannabispflanze *Cannabis sativa* hat ihren Ursprung mutmaßlich in Zentralasien, wo sie bereits vor über 2000 Jahren bei der *Gushi-Kultur* für ihre psychoaktive Wirkung bekannt war und zur medizinischen Nutzung, für Weissagungspraktiken oder für den Einsatz als Halluzinogen angebaut wurde (Andre et al. 2016; Russo et al. 2008; Touw 1981). Mitte des 19. Jahrhundert wurde in Europa die Erforschung der Cannabispflanze zunehmend vorangetrieben, sodass über ein Jahrhundert später der psychoaktive Bestandteil der Cannabispflanze, Δ 9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC), isoliert werden konnte (MacGillivray 2017; Mechoulam und Gaoni 1965, 1967; Pisanti und Bifulco 2017). Mit der Identifikation der Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 als Zielstruktur der Cannabinoide und der darauf folgenden Entdeckung der in Säugetieren produzierten Endocannabinoide, konnte das Endocannabinoidsystem (ECS) beschrieben werden (Devane et al. 1988; Devane et al. 1992; Matsuda et al. 1990; Mechoulam et al. 1995; Munro et al. 1993; Pisanti und Bifulco 2017; Sugiura et al. 1995). Seither widmet sich die Cannabis-Forschung mitunter dem potentiellen Einsatz von Cannabinoiden als Medizinprodukt, wobei die mögliche Regulation des ECS durch Cannabinoide in zahlreichen Studien untersucht wird (Di Marzo et al. 2004; Pisanti und Bifulco 2017).

1.2.1 Aufbau

Das ECS ist als neuromodulatorisches System Teil des zentralen Nervensystems (ZNS), bestehend aus Cannabinoidrezeptoren, als endogene Liganden agierenden Cannabinoiden und für Synthese und Abbau verantwortlichen Enzymen (Lu und Mackie 2016).

1.2.1.1 Cannabinoidrezeptoren

Die Signaltransduktion im ECS wird über die Bindung von Cannabinoiden an die membrangebundenen Cannabinoidrezeptoren, Cannabinoidrezeptor 1 (CB1) und Cannabinoidrezeptor 2 (CB2), vermittelt (Devane et al. 1988; Lu und Mackie 2016; Matsuda et al. 1990; Munro et al. 1993). Beide Rezeptoren zählen zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) vom $G_{i/o}$ -Typ (Howlett et al. 2002; Matsuda et al. 1990). Im Wesentlichen unterscheiden sich die Rezeptoren hinsichtlich der Zellen, auf denen der jeweilige Rezeptor bevorzugt exprimiert wird (Pertwee 1997). Der CB1-Rezeptor ist einer der im ZNS am häufigsten vorkommenden GPCR und wird dort vor allem im Bereich der Basalganglien, des Cerebellums, Hippocampus und Cortex exprimiert, wobei eine deutliche Präferenz für präsynaptische Neurone besteht (Di Marzo et al. 2004; Herkenham et al. 1990; Pertwee 1997). Der CB2-Rezeptor findet sich vorrangig auf peripheren Zellen des Immunsystems (Munro et al. 1993). Es konnte gezeigt werden, dass der CB2-Rezeptor außerdem auf Neuronen sowohl des zentralen-, als auch des peripheren Nervensystems exprimiert wird (Anand et al. 2008; Onaivi et al. 2006).

Ein weiterer möglicher Cannabinoidrezeptor ist der GPR55-Rezeptor, welcher auf Zellen des Nervensystems, Skelettsystems und Gastrointestinaltrakts exprimiert wird und an welchen nachgewiesenermaßen Endo- und Phytocannabinoide, sowie synthetische Cannabinoide binden (Ryberg et al. 2007; Shore und Reggio 2015).

Neben den Cannabinoidrezeptoren als GPCR binden Cannabinoide an weiteren Rezeptorklassen, wie den nukleären Rezeptoren und den Ionenkanälen mitsamt der thermosensitiven *transient receptor potential (TRP) Kationen-Kanäle* (De Petrocellis und Di Marzo 2010; Di Marzo und Piscitelli 2015).

1.2.1.2 Liganden

Cannabinoide agieren als Liganden an Cannabinoidrezeptoren mit agonistischer bzw. antagonistischer Wirkung (Pertwee und Ross 2002). Bei natürlich vorkommenden Cannabinoiden kann zwischen den aus Gewebe von Säugetieren isolierten Endocannabinoiden und den aus der Cannabispflanze isolierten Phytocannabinoiden unterschieden werden (Mechoulam et al. 2014; Pertwee 2006).

Einleitung

Zu den Endocannabinoiden zählen mindestens fünf verschiedene Moleküle, wobei N-Arachidonylethanolamide (Anandamid; AEA) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) die am besten erforschten sind (Devane et al. 1992; Di Marzo et al. 2004; Grotenhermen 2004; Mechoulam et al. 1995; Sugiura et al. 1995). Die Endocannabinoide sind Derivate der Arachidonsäure und werden durch enzymatische Aktivität von insgesamt fünf verschiedenen Enzymen synthetisiert bzw. hydrolytisch inaktiviert (Di Marzo und Piscitelli 2015; Lu und Mackie 2016; McAllister und Glass 2002).

Besondere Bekanntheit haben die von der Pflanze *Cannabis sativa L.* gebildeten Phytocannabinoide durch die damit assoziierte psychotrope Wirkung erlangt, welche bei derzeit mehr als 120 bekannten Phytocannabinoiden bislang nur auf Δ 9-THC und Δ 8-Tetrahydrocannabinol zurückgeführt werden konnte (Mechoulam und Gaoni 1967; Morales et al. 2017).

1.2.1.2.1 Δ 9-Tetrahydrocannabinol

Δ 9-THC ist eine trizyklische Kohlenwasserstoff-Verbindung mit ausgeprägter Lipophilie (Mechoulam und Gaoni 1967; Sharma et al. 2012). Sowohl Δ 9-THC, als auch der aktive Metabolit 11-Hydroxy- Δ 9-Tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) besitzen eine psychotrope Wirkung, was im Wesentlichen durch das Zusammenspiel aus Bindungsverhalten an Cannabinoidrezeptoren und Verteilung von Cannabinoidrezeptoren im Gewebe begründet werden kann (Di Marzo et al. 2004; Mechoulam und Gaoni 1967; Sharma et al. 2012). Δ 9-THC konnte als partieller Agonist des CB1- und CB2-Rezeptors mit einer Präferenz für den CB1-Rezeptor identifiziert werden (Pertwee 2008). Zudem interagiert Δ 9-THC mit verschiedenen nicht-CB1- und nicht-CB2-Rezeptoren, wobei u.a. eine antagonistische Wirkung auf 5HT_{3A}- und eine modulierende Wirkung auf Opioid-Rezeptoren beschrieben wurde (Morales et al. 2017). Weiterhin wird Δ 9-THC die Fähigkeit zugesprochen, gewisse Signalwege der Endocannabinoide zu blockieren und dadurch die Freisetzung von Transmittern zu beeinflussen (Pertwee 2008; Shen und Thayer 1999).

Im medizinischen Alltag wird Dronabinol als synthetisch hergestelltes Δ 9-THC bereits sehr vielfältig eingesetzt, beispielsweise zur Appetitsteigerung oder Schmerztherapie (Malik et al. 2017; Plasse et al. 1991; Volicer et al. 1997). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass Δ 9-THC den Alterungsprozess hinsichtlich der kognitiven Funktion günstig beeinflusst, indem die Abnahme der kognitiven Leistung bei älteren Individuen verlangsamt wird (Bilkei-Gorzo et al. 2017).

Bei Langzeitbehandlung mit Δ 9-THC kann eine Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung beobachtet werden, welche bei abruptem Absetzen der Behandlung jedoch in der Regel nicht

mit einem Abstinenzsyndrom einhergeht (Pertwee 2006). Dies ist auf die Anreicherung von $\Delta 9$ -THC im Fettgewebe zurückzuführen, woraus die Substanz nur langsam ausgeschwemmt wird (Pertwee 2006).

1.2.2 Signaltransduktion

Bei der Endocannabinoid-vermittelten Signaltransduktion kann zwischen dem retrograden-, dem nicht-retrograden-, und dem neuronal-astrozytären Signalweg unterschieden werden (Castillo et al. 2012).

Entsprechend des retrograden Signalwegs werden die Endocannabinoide an der Postsynapse aus Vorläuferproteinen synthetisiert und wirken retrograd an der Präsynapse (Brown et al. 2003; Di Marzo et al. 1994; Piomelli 2003). Im Wesentlichen wird durch die Bindung eines Agonisten an den G-Protein-gekoppelten Cannabinoidrezeptor die Freisetzung von exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmittern reduziert (Felder et al. 1995; McAllister und Glass 2002). Die Cannabinoidrezeptoren zeigen jedoch spezifische Bindungsaffinitäten für die jeweiligen G-Protein Subtypen, was in unterschiedlichen Signalwegen resultiert (Glass und Northup 1999; McAllister und Glass 2002). Durch Aktivierung des CB1-Rezeptors werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle gehemmt und einwärts gerichtete K^{+} -Kanäle aktiviert, was in einer reduzierten Acetylcholin-, GABA-, Glutamat- oder Noradrenalin-Freisetzung resultiert (Gessa et al. 1997; Gifford und Ashby 1996; Kathmann et al. 1999; Katona et al. 1999; Mackie et al. 1995; McAllister und Glass 2002; Shen et al. 1996). Dieser Mechanismus wird als Kurzzeitplastizität bezeichnet, da die direkte Rezeptorwirkung nur für Sekunden andauert (Brown et al. 2003; Castillo et al. 2012). Davon unterscheidet sich als zweiter Mechanismus die Langzeit-Depression, deren Wirkung mehr als eine Stunde lang bestehen bleibt und eine Herunterregulierung der synaptischen Übertragung bedeutet (Chevalleyre et al. 2006; Linden 1994). Durch Hemmung der Adenylylcyclase wird dabei der cAMP/Proteinkinase A Signalweg herunterreguliert und damit neben der Reduktion der Transmitterfreisetzung auch auf die Genexpression Einfluss genommen (Chevalleyre et al. 2007; Childers und Deadwyler 1996).

Der nicht-retrograde Signalweg wird insbesondere über den TRPV1-Rezeptor vermittelt, einen TRP Kationen-Kanal mit Expression an der Postsynapse, welcher durch Aktivierung u.a. eine postsynaptische Langzeit-Depression bewirkt (Castillo et al. 2012).

Neben der direkten Signaltransduktion an der Synapse konnte eine Endocannabinoid-vermittelte Interaktion zwischen Synapsen und Astrozyten identifiziert werden. Dabei wird durch Aktivierung des auf Astrozyten exprimierten $\text{G}_{q/11}$ -gekoppelten CB1-Rezeptors die

Phospholipase C aktiviert, welche über eine Erhöhung der intraneuronalen Calcium-Konzentration eine Glutamat-Freisetzung bewirkt (Navarrete und Araque 2008).

1.2.3 Funktion

Anhand der Rezeptorverteilung und Signalwege konnten unterschiedliche Funktionen des ECS identifiziert werden. Herausgestellt werden soll hierbei die Endocannabinoid-basierte Neuromodulation, im Rahmen derer die Signalübertragung an der Synapse beeinflusst und neuronale Prozesse reguliert werden (Galve-Roperh et al. 2007; Marsicano und Lutz 2006).

Das Phänomen der *depolarization induced suppression of inhibition* (DSI; depolarisationsinduzierte Unterdrückung der Hemmung) konnte mit dem ECS in Verbindung gebracht werden. Dieser Vorgang beschreibt eine durch postsynaptische Depolarisation ausgelöste Freisetzung von Endocannabinoiden und die damit einhergehende präsynaptisch unterdrückte Freisetzung von inhibitorischen Neurotransmittern, speziell von GABA (Kreitzer und Regehr 2001; Llano et al. 1991; Narushima et al. 2006; Ohno-Shosaku et al. 2001; Piomelli 2003; Pitler und Alger 1992; Wilson und Nicoll 2001). Jene DSI kann ineffektive Signalwege aktivieren und eine Langzeit-Potenzierung in hippocampalen Neuronen bewirken. Entsprechend dieser Hypothese kommt es infolgedessen zur Ausbildung sogenannter *Place Fields*, in denen besonders aktive Neurone mit einer hohen Feuerrate vorkommen (Carlson et al. 2002; Ekstrom et al. 2001). Weiterhin konnte ein Einfluss des ECS auf hippocampale Gamma Oszillationen nachgewiesen werden, welche entscheidend an der Vernetzung zwischen Neuronen beteiligt sind (Buzsaki und Chrobak 1995; Hajos et al. 2000; Piomelli 2003; Wilson und Nicoll 2001).

Eine weitere Funktion des ECS ist die Regulation von affektivem Verhalten, welche auf der Aktivierung von CB1-Rezeptoren in der basolateralen Amygdala beruht (Katona et al. 2001; McDonald und Mascagni 2001; Navarro et al. 1997; Piomelli 2003).

Über eine Endocannabinoid-vermittelte Suppression der GABA- und Glutamat-Freisetzung in Basalganglien und Cerebellum wird eine regulatorische Wirkung auf die motorische Aktivität beschrieben, wobei auch eine Assoziation zum Dopamin-System besteht (Giuffrida et al. 1999; Levenes et al. 1998; Piomelli 2003; Romero et al. 2002).

Die Verteilung von Cannabinoidrezeptoren zeigt, dass die Neuromodulation neben dem zentralen-, auch im peripheren Nervensystem stattfindet und damit einhergehend in verschiedene neuronale Prozesse eingreift. So scheint das ECS an der Schmerzverarbeitung mit antinozizeptiver Wirkung beteiligt zu sein, was u.a. auf eine Wirkungsverstärkung des Opioidsystems zurückgeführt wird (Anand et al. 2009; da Fonseca Pacheco et al. 2008; Hohmann 2002; Ibrahim et al. 2005).

Einleitung

Hinsichtlich der funktionellen Bedeutung des ECS muss hervorgehoben werden, dass für einige Cannabinoide eine neuroprotektive und antioxidative Wirkung diskutiert wird (Fowler et al. 2010; Hampson et al. 1998). Mittels unterschiedlicher Mechanismen sind jene Cannabinoide in der Lage, Neuronen vor dem Zelltod zu bewahren. So können Cannabinoid-vermittelt die Körpertemperatur herunterreguliert- oder die Neuronen vor Exzitotoxizität geschützt werden (Bonfils et al. 2006; Hayakawa et al. 2007; Leker et al. 2003; Shen und Thayer 1998).

Weiterhin konnte eine Wechselwirkung zwischen Immunsystem und ECS nachgewiesen werden. Zum einen werden Endocannabinoide von aktivierten Immunzellen synthetisiert, zum anderen wird sowohl der CB1-, als auch der CB2-Rezeptor auf immunkompetenten Zellen exprimiert (Di Marzo et al. 1996; Galiegue et al. 1995; Klein 2005). In experimentellen Modellen für Neuroinflammation und Neurodegeneration konnte gezeigt werden, dass Cannabinoide eine antiinflammatorische- und den Krankheitsprogress verlangsamende Wirkung haben (Ni et al. 2004; Pryce et al. 2003).

Zahlreiche weitere Funktionen, wie die Regulation von Gastrointestinaltrakt, kardiovaskulärem System und Respirationstrakt, konnten für das ECS beschrieben werden (Di Carlo und Izzo 2003; Di Marzo et al. 2004; Randall et al. 2002; Schmid et al. 2003).

1.3 Das Endocannabinoidsystem und die Alzheimer-Erkrankung

Aufgrund des Expressionsmusters von Cannabinoidrezeptoren und der funktionellen Verknüpfung mit dem ZNS ist das ECS hinsichtlich seiner Bedeutung in Bezug auf die Alzheimer-Erkrankung von großem Interesse. *Post-mortem* Analysen konnten im Cortex von Alzheimer-Patienten eine herunterregulierte CB1- und eine hochregulierte CB2-Rezeptor Expression nachweisen, wobei letztere mit dem Level für A β ₄₂ und senile Plaques korrelieren (Solas et al. 2013). In den senilen Plaques von Alzheimer-Patienten wurden wiederum CB1- und CB2-Rezeptoren identifiziert, welche eine verstärkte Nitrierung im Rahmen der Mikroglia-Aktivierung aufwiesen (Ramirez et al. 2005). Weiterhin zeigten sich in Hirnproben von Alzheimer-Patienten signifikant niedrigere Werte für das Endocannabinoid Anandamid und dessen Vorläuferprotein, jeweils mit einer inversen Korrelation für A β ₄₂ Level (Jung et al. 2012).

In-vitro- und *In-vivo*-Studien untersuchen den Einfluss des ECS auf die Alzheimer-Pathologie, wobei konkrete Zusammenhänge hergestellt werden konnten. Sowohl für endogene, als auch für exogene Cannabinoide wurde eine inhibitorische Wirkung auf die Beta-Amyloid Pathologie nachgewiesen (Benito et al. 2007; Eubanks et al. 2006; Martin-Moreno et al. 2012; Milton 2002). Während CB1- und CB2-Rezeptor Antagonisten die Akkumulation und Toxizität von Beta-Amyloid verstärken, stimulieren CB1- und CB2-Rezeptor Agonisten den Abbau von intraneuronalem Beta-Amyloid und verstärken die Clearance von Beta-Amyloid entlang der Blut-Hirn-Schranke (Bachmeier et al. 2013; Currais et al. 2016). Zudem wird über einen Agonismus am CB2-Rezeptors die Beta-Amyloid vermittelte Mikroglia-Aktivierung gehemmt und dadurch Einfluss auf die neuroinflammatorische Komponente der Alzheimer-Erkrankung genommen (Benito et al. 2007; Ehrhart et al. 2005; Ramirez et al. 2005).

Sowohl in mit Beta-Amyloid behandelten Ratten, als auch in FAD-basierten Mausmodellen konnte in Verhaltensversuchen ein positiver Effekt von Cannabinoiden mit Agonismus am CB1- und/oder CB2-Rezeptor auf die Kognition beobachtet werden (Aso und Ferrer 2014; Aso et al. 2013; Aso et al. 2012; Haghani et al. 2012; Martin-Moreno et al. 2012; Martin-Moreno et al. 2011; Ramirez et al. 2005; Wu et al. 2013).

Auf die Hyperphosphorylierung als weiteres neuropathologisches Merkmal der Alzheimer-Erkrankung haben entsprechende Cannabinoide ebenfalls eine inhibitorische Wirkung, was sowohl in Zellkulturen, als auch im Alzheimer-Modell nachgewiesen wurde (Aso und Ferrer 2014; Aso et al. 2013; Aso et al. 2012; Esposito et al. 2006).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Wie bereits ausführlich in Abschnitt 1.2.3 beschrieben wurde, ist das ECS an zahlreichen neuronalen Prozessen und insbesondere an der Ausbildung neuronaler Netzwerke beteiligt (Buzsaki und Chrobak 1995; Hajos et al. 2000; Marsicano und Lutz 2006; Piomelli 2003; Wilson und Nicoll 2001). Eine Stimulation des Endocannabinoidsystems mit der Möglichkeit einer günstigen Beeinflussung der Alzheimer-Pathologie und dem damit assoziierten Gedächtnisverlust stellt daher einen interessanten Forschungsansatz dar. Δ 9-THC hat als psychoaktives Phytocannabinoid das Potential, zusätzlich auf neuropsychiatrische Symptome der Alzheimer-Erkrankung einzuwirken. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass Δ 9-THC intraneuronales Beta-Amyloid abbaut (Currais et al. 2016).

In dieser Doktorarbeit sollte nun erstmals *in vivo* untersucht werden, was für einen Einfluss jenes Phytocannabinoid auf den Nervenzellverlust, als auch auf Kognition und Verhalten in einem Modell für die sporadische Alzheimer-Erkrankung als epidemiologisch häufigste Form hat (Bekris et al. 2010). Dazu wurden Tiere der Tg4-42-Mauslinie in einem präventiven und einem therapeutischen Ansatz für jeweils sechs Wochen mit Δ 9-THC behandelt und anschließend etablierten Verhaltensversuchen für Motorik, Gedächtnisleistung und Angstverhalten unterzogen. Hirnproben wurden anhand standardisierter Färbeprotokolle immunhistochemisch und stereologisch untersucht mit Hauptaugenmerk auf die Quantifizierung der Neuronenzahl und der in Neurogenese befindlichen Nervenzellen in der CA1 Region des Hippocampus.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.1: Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Herstellerfirma
Ameisensäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Argarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Citratpuffer 0,01M pH 6,0	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DAB-Peroxidase-Substrate-Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Dinukleotidtriphosphate (dNTP's)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
DNA Ladder 100bp	Bioron GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
Dronabinol [(-)-trans-Δ^9-Tetrahydrocannabinol]	THC Pharm GmbH, Frankfurt/ Main, Deutschland
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Th. Geyer Ingredients GmbH & Co. KG, Höxter, Deutschland
Ethanol 99,5%, reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
H₂O für Argarose-Gel	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HD Green Plus DNA Stain	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Histofix 4%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin 10%	Medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg, Deutschland
Kresylviolett	Honeywell International Inc., Morristown, NJ, USA
Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Magnesiumchlorid (MgCl₂)	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na₂EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat Trihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid-Lösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland

Material und Methoden

Substanz	Herstellerfirma
Paraffin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Proteinkinase K	VWR Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland
Puffer BD	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Roth®-Histokitt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Taq Polymerase	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T. Compound Kleber	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tris Base	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris/HCl pH 8,5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween80	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Vectastain Elite ABC-Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylarium (Xylazinhydrochlorid 23,3 mg/ml)	Ecuphar GmbH, Greifswald, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2.2: Primer

	Bezeichnung	Hersteller	5'3'-Sequenz
Primer 1	Aβ3-42 for2	Eurofins Medigenomix Forensik GmbH, Ebersberg, Deutschland	GTGACTCCTGACCTTCCAG
Primer 2	Aβ3-42 rev2	Eurofins Medigenomix Forensik GmbH, Ebersberg, Deutschland	GTTACGCTATGACAACACC

Tabelle 2.3: Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Donator	Verwendung
Anti-Cannabinoid Rezeptor 1 (Anti-CB1)	Abcam plc., Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:2000	Kaninchen	3,3'-Diaminobenzidin-Immunfärbung (2.5.1.2)

Material und Methoden

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Donator	Verwendung
Anti-Doublecortin (Anti-DCX)	Synaptic Systems GmbH, Göttingen, Deutschland	1:4000	Kaninchen	Free-Floating-3,3'-Diaminobenzidin-Immunfärbung (2.5.1.1)
Anti-Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1 (Anti-IBA1)	Synaptic Systems GmbH, Göttingen, Deutschland	1:1000	Meerschweinchen	3,3'-Diaminobenzidin-Immunfärbung (2.5.1.2)
Anti-Saures Gliafaserprotein (Anti-GFAP)	Synaptic Systems GmbH, Göttingen, Deutschland	1:1000	Meerschweinchen	3,3'-Diaminobenzidin-Immunfärbung (2.5.1.2)

Tabelle 2.4: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Konjugat	Donator	Verwendung
Anti-Kaninchen	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA	1:250 (2.5.1.1) bzw. 1:200 (2.5.1.2)	Biotinyliert	Schwein	Free-Floating-3,3'-Diaminobenzidin-Immunfärbung (2.5.1)
Anti-Meerschweinchen	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA	1:200 (2.5.1.2)	Biotinyliert	Esel	,3'-Diaminobenzidin-Immunfärbung (2.5.1.2)

Tabelle 2.5: Geräte

Gerät	Herstellerfirma
Elektrophoresekammer BlueMarine™ 100	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Serva BlueCube 300	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Heraeus Biofuge Pico Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Heraeus Biofuge Stratos Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
HM 335E Microtome	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
LabCycler	SensoQuest GmbH, Göttingen, Deutschland

Material und Methoden

Gerät	Herstellerfirma
Leica CM1850 Kryostat	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica EG1140 H Heated Paraffin Embedding Module	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
MS 300V Power Supply	Major Science, Saratoga, Kalifornien, USA
NanoDrop One	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Perfusionspumpe Ismatec ISM861	IDEX Corporation, Lake Forest, IL, USA
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TP 1020 Automatic Tissue Processor	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
UNO-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Medax GmbH & Co. KG, Olching, Deutschland
BX Stereology Workstation	Olympus K.K., Shinjuku, Tokio, Japan
Olympus BX 51	Olympus K.K., Shinjuku, Tokio, Japan
Tierhaltungsschrank	Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA, USA
RotaRod®	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Kamera Computar® 2,8-12mm	CBC Co., Ltd., Chuo-Ku, Tokio, Japan
Moticam Pro 282 B	Motic, Hong Kong, China

Tabelle 2.6: Gebrauchswaren

Gebrauchsmaterial	Herstellerfirma
Corning® NetteWell® Einsätze	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Einmal-Insulinspritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Filterpapier 150mm	Th. Geyer Ingredients GmbH & Co. KG, Höxter, Deutschland
IVC Käfig	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
Menzel Deckgläser 24 x 50mm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Microtome Blades C35	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Microtome Blades S35	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
PCR-Gefäße	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sterican®-Kanülen 26G (0,45 x 25mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Superfrost®-Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TC-Platte 12 Well	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Titanweiße Acrylfarbe	Lukas-Nerchau GmbH, Düsseldorf, Deutschland

2.1 Versuchstiere

Alle Versuchstiere gehören zur Gruppe der Farbmäuse (*Mus Musculus*). Hauptaugenmerk liegt in dieser Arbeit auf der Behandlung von Mäusen der Tg4-42-Mauslinie, welche auf dem Hintergrund der C57BL/6J Mauslinie gezüchtet wurde (Bouter et al. 2013). Das an die Signalsequenz für murines *thyreotropin releasing hormone* (TRH) gekoppelte und durch den Thy-1 Promotor regulierte Transgen der Tg4-42-Mauslinie kodiert für humanes N-terminal trunkiertes A β ₄₋₄₂. Als Kontrollgruppe dienen in dieser Studie Mäuse des Wildtyp-Stammes C57BL/6J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA).

Zucht, Austragung und Haltung der Versuchstiere wurden entsprechend den Vorgaben der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) und der *federation of european laboratory science associations* (FELASA) von dafür ausgebildetem Personal durchgeführt. Die Behandlung der Versuchstiere, sowie die Versuche selbst, wurden nach Genehmigung des Niedersächsischen Landesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) in der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) in der hauseigenen zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, die Anzahl der Versuchstiere zur Reduktion von Schmerz und Leid so klein wie möglich zu halten.

2.1.1 Haltungsbedingungen

Zucht, Austragung und Haltung fanden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) statt. Bis zu fünf Versuchstiere wurden nach Geschlechtern getrennt in einzeln belüfteten Käfigen (IVC, 32 x 16 x 14 cm) und einem 12/12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Ausschließlich während der Verhaltensversuche wurden die Versuchstiere in einem mit *high efficiency particulate air*- (HEPA-) gefilterter Raumluft gefüllten Tierhaltungsschrank in der Interimshaltung unseres Labors gehalten.

Auf spezielles Enrichment für die Versuchstiere wurde während der gesamten Haltung verzichtet. Futter und Wasser waren zu jeder Tages- und Nachtzeit frei verfügbar.

2.1.2 Genotypisierung von Mäusen der Tg4-42_{hom}-Mauslinie

Zur Identifikation der Tg4-42_{hom}-Mauslinie wurde der Transgen-tragende DNA-Abschnitt isoliert, quantifiziert, mittels *polymerase chain reaction* (PCR; Polymerase Kettenreaktion) amplifiziert und letztlich mittels Gelelektrophorese nachgewiesen.

2.1.2.1 DNA-Isolierung aus Mausschwanzbiospien

Dem Lysepuffer (200 mM Tris/HCl pH 8,5; 10 mM EDTA; 0,4 % SDS; 400 mM NaCl ad 200 ml H₂O) wurden vor Gebrauch 10 μ l/ml Proteinase K hinzugegeben. Die Mausschwanzbiopsie

Material und Methoden

wurde mit 200 µl Lysepuffer versetzt und für ca. 20 h bei 56 °C und 450 U/min im Thermomixer Compact inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 20 min bei 4 °C und 17 000 U/min in der Heraeus Biofuge Stratos Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand der Probe wurde mit 200 µl kaltem Isopropanol versetzt. Das Gemisch wurde geschwenkt, bis ein Präzipitat sichtbar wurde. Die Probe wurde für 10 min bei 13 000 U/min bei Raumtemperatur in der Heraeus Biofuge Pico Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Zu dem Pellet wurden 200 µl kaltes 70 % Ethanol hinzugegeben und das Gemisch wurde für 10 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Der Überstand wurde abpipettiert. Das Pellet wurde für ca. 60 min bei 56 °C auf dem Thermoblock getrocknet. Anschließend wurden 30 µl H₂O auf das Pellet gegeben und darin gelöst. Die Probe wurde über Nacht bei 56 °C und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.1.2.2 DNA-Quantifizierung

Für die Messung der Reinheit und der DNA-Konzentration wurde das NanoDrop One Photometer verwendet. Zunächst wurde der Sensor mit destilliertem Wasser gereinigt. Anschließend wurden 2 µl der Probe auf den Sensor des Photometers aufgetragen. Zur Sicherstellung einer ausreichenden Konzentration und Reinheit der Proben, wurde der Extinktionskoeffizient für A₂₆₀/A₂₈₀ und A₂₆₀/A₂₃₀ bestimmt. Entsprechend der ermittelten Konzentration wurden die Proben mit H₂O auf 20 ng/µl verdünnt, um eine einheitliche Konzentration herzustellen.

2.1.2.3 DNA-Amplifizierung durch PCR

Die Amplifizierung wurde mittels einer PCR durchgeführt. Als Positivprobe wurde eine bereits positiv getestete Probe einer Tg4-42_{hom}-Maus verwendet. Als Negativprobe diente der Mastermix ohne Zugabe einer DNA-Probe. Zunächst wurde der Reaktionsmix gemäß Tabelle 2.7 angesetzt. 18 µl des Reaktionsmix wurden mit 2 µl der DNA-Verdünnung in einem PCR-Gefäß vermischt. Die Proben wurden in dem LabCycler platziert und das PCR-Programm gestartet (Tabelle 2.8).

2.1.2.4 Gelelektrophorese

Um das Argarose-Gel herzustellen, wurden 35 ml der Puffer-Lösung, bestehend aus 50 ml 5 x TBE-Puffer (Tabelle 2.9) und 200 ml H₂O, mit 0,7 g Argarose versetzt. Das Gemisch wurde bei 200 W in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Argarose vollständig gelöst hat. Anschließend ließ man das Gemisch auf 65 °C abkühlen. Unter dem Abzug wurden 2 µl HD Green Plus DNA Stain hinzugegeben. Die Flüssigkeit wurde in die mit einem Probenkamm für zwölf

Material und Methoden

Probenkammern versehene Elektrophoresekammer BlueMarine™ 100 gegeben und bei Zimmertemperatur stehen gelassen, bis eine gelartige Konsistenz erreicht war. Als Puffer wurden die restlichen 215 ml der o.g. Puffer-Lösung verwendet. Als Marker wurden 5 µl DNA Ladder 100 bp verwendet. 1 µl des Ladepuffers wurden mit jeweils 10 µl der Probe vermischt und in die Taschen des Gels gefüllt. Für 45 min wurde durch den MS 300 V Power Supply eine Stromspannung von 135 V angelegt. Das Gel wurde unter ultraviolettem Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm mithilfe des Serva BlueCube 300 ausgewertet.

Tabelle 2.7: Reaktionsmix für Tg4-42-PCR

Reagenz	Volumen
Primer 1 (Tabelle 2.2)	1 µl
Primer 2 (Tabelle 2.2)	1 µl
dNTP's	2 µl
MgCl ₂ 25 mM	1,6 µl
Puffer BD 10x	2 µl
H ₂ O	10,2 µl
Taq Polymerase	0,2 µl

Tabelle 2.8: PCR-Protokoll

Schritt	Temperatur	Dauer
1	94 °C	3 min
2	94 °C	45 s
3	58 °C	1 min
4	72 °C	1 min
5	Schritt zwei bis vier werden 35x wiederholt	
6	72 °C	5 min
7	4 °C	∞

Tabelle 2.9: TBE-Puffer pH 8,3

Reagenz	Mengenangabe
Tris Base	54,5 g/l
Borsäure	27,8 g/l
0,5 M Na ₂ EDTA pH 8,0	20 ml

2.2 Behandlung mit Tetrahydrocannabinol

2.2.1 Herstellung der Injektionslösung

In dieser Studie dient Dronabinol bzw. (-)-trans- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) als Behandlungssubstanz. Das Δ^9 -THC wurde bei 70 °C in einem Inkubator für 5 min erwärmt und anschließend 100 mg Δ^9 -THC in 2,5 ml 100 % Ethanol und 2,5 ml Tween80 gelöst. Die Lösung wurde zu 45 ml 0,9 % NaCl-Lösung gegeben. Die Lösung wurde lichtgeschützt verpackt und entsprechend Empfehlungen der Herstellerfirma gelagert. Zur Herstellung der Vehikellösung für die Behandlung der Kontrollgruppe wurden 2,5 ml 100 % Ethanol zu 2,5 ml Tween80 addiert und die Lösung zu 45 ml 0,9 % NaCl-Lösung gegeben.

2.2.2 Intraperitoneale Injektion

Sowohl die Wildtyp- als auch die transgenen Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von 42 Tagen täglich mit 20 mg/kg Körpergewicht THC behandelt. Zur Ermittlung des zu injizierenden Volumens wurden die Versuchstiere wöchentlich gewogen. Die Injektionslösung wurde mit Einmal-Insulinspritzen intraperitoneal injiziert. Die Kontrollgruppe wurde mit der Vehikellösung nach gleichem Schema behandelt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die mit Vehikellösung behandelten Mäuse im Nachfolgenden als „*unbehandelt*“ bezeichnet, da ihnen keine wirksame Substanz injiziert wurde.

2.2.3 Behandlungsgruppen

Bezüglich des Behandlungsschemas wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Behandlungsansatz A) begann bei einem Alter der Versuchstiere von drei Monaten \pm drei Tage und endete sechs bis sieben Wochen vor Beginn der Verhaltensversuche (Wash-out-Periode). Behandlungsansatz B) begann bei einem Alter der Versuchstiere von fünf Monaten \pm drei Tage, wobei die Verhaltensversuche zu Ende der Behandlungsphase stattfanden. Während zu Beginn der Behandlung bei Tieren der Behandlungsgruppe A) noch kein signifikanter Nervenzellverlust eingetreten war, wiesen Tiere der Behandlungsgruppe B) bereits einen signifikanten Nervenzellverlust von 43 % auf (Antonios et al. 2015). Somit ist Behandlungsansatz A) im Sinne einer präventiven- während Behandlungsansatz B) im Sinne einer therapeutischen Behandlungsstrategie zu verstehen (Abbildung 2.1). Die Behandlungsgruppen werden daher im Folgenden als *präventiv* und *therapeutisch* bezeichnet.

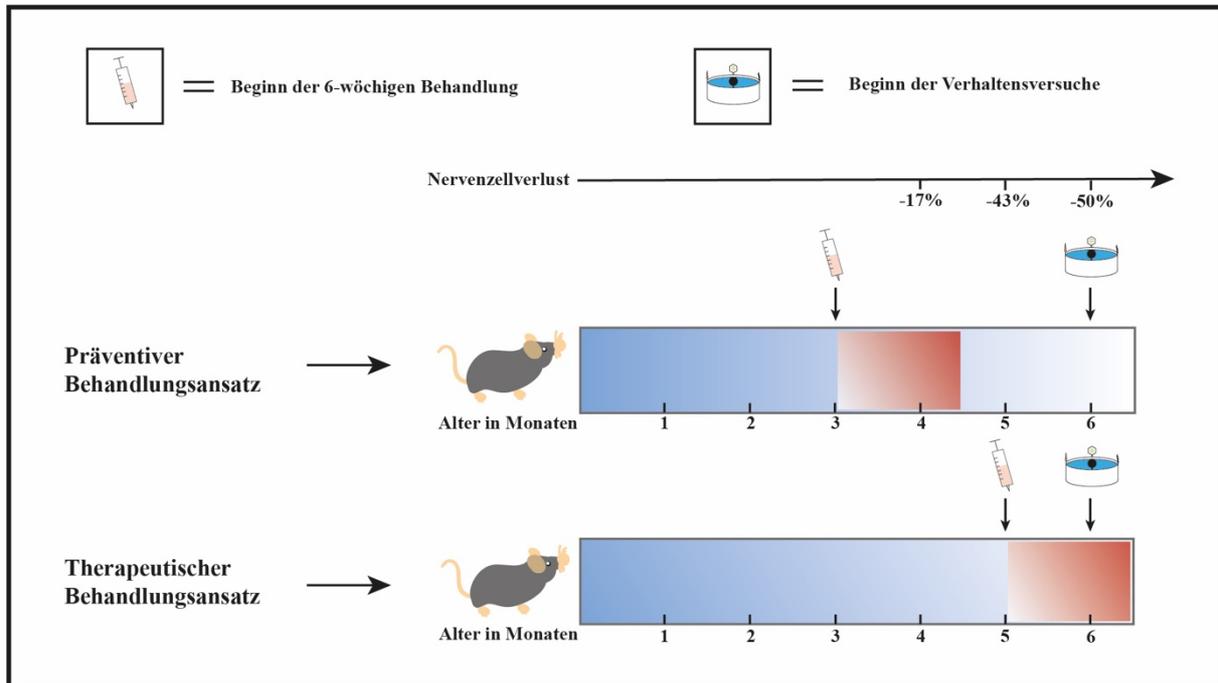


Abbildung 2.1: Beginn der Behandlung im präventiven Behandlungsansatz vor- und im therapeutischen Behandlungsansatz nach Eintreten des signifikanten Nervenzellverlustes. Die sechswöchige THC-Behandlung setzte in der präventiven Behandlungsgruppe mit drei Monaten- und damit vor Beginn eines signifikanten Nervenzellverlustes ein. Die therapeutische Behandlungsgruppe wurde erst mit einem Alter von fünf Monaten behandelt, wobei die Tg4-42 Mäuse zu diesem Zeitpunkt bereits einen signifikanten Nervenzellverlust von -43 % aufweisen (Antonios et al. 2015). Die Verhaltensversuche wurden bei beiden Behandlungsgruppen ab einem Alter von sechs Monaten durchgeführt.

2.3 Verhaltensversuche

Die Verhaltensversuche wurden während der Nachtphase zwischen acht- und 20 Uhr durchgeführt. Die Versuchstiere wurden in einem Alter von sechs Monaten getestet. Alle Versuchstiere durchliefen eine Testbatterie von insgesamt sechs verschiedenen Tests. Die Reihenfolge dieser Tests war bei allen Versuchstieren identisch, wobei darauf geachtet wurde, maximal einen motorischen Test und einen Angst- oder Gedächtnistest pro Tag durchzuführen. Die Testbatterie begann mit dem Rotarod Test zur Überprüfung der Motorik, worauf die Angsttests *elevated plus maze* und *light/dark box* folgten. Dem schlossen sich *open field maze* und *object recognition test* zur Beobachtung des Verhaltens in neuen Umgebungen an. Beendet wurde die Versuchsreihe mit dem *Morris water maze* als Test für räumliches Lernen (Abbildung 2.2).

Für die Versuche wurden männliche und weibliche Mäuse in gleicher Gruppenstärke getestet. Um die Anzahl der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten, wurde die Kontrollgruppe zusammen mit Herrn M. J. Löw getestet.

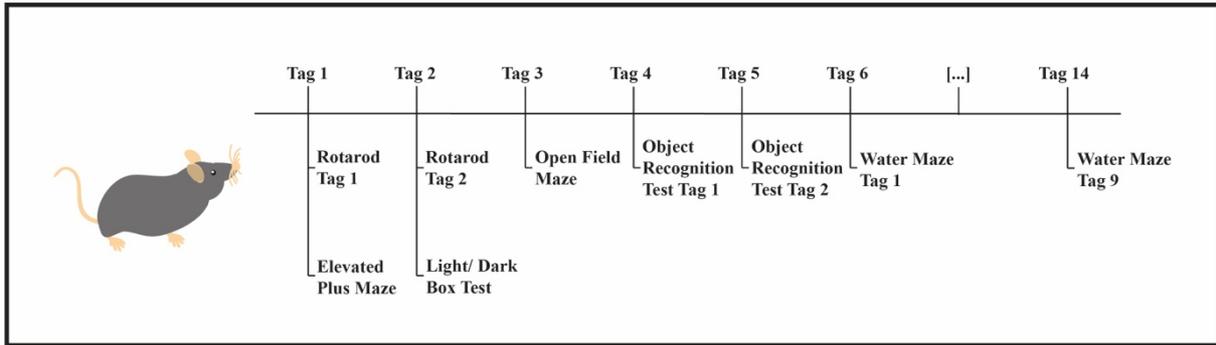


Abbildung 2.2: Zeitliche Staffelung der Verhaltensversuche innerhalb von 14 Versuchstagen. Begonnen wurde die Testbatterie mit dem Rotarod Test, um motorische Defizite für die darauf folgenden Tests auszuschließen. Innerhalb von 14 Tagen durchliefen die Versuchstiere verschiedene Tests zur Untersuchung der Motorik, des Angstverhaltens und Lernvermögens.

2.3.1 Rotarod

Als erster Verhaltenstest der Testbatterie wurde der Rotarod Test zur Überprüfung des motorischen Lernvermögens und der Koordination der Mäuse durchgeführt, um motorische Einschränkungen der Versuchstiere auszuschließen (Shiotsuki et al. 2010). Dadurch wird sichergestellt, dass die Mäuse motorisch in der Lage sind, die nachfolgenden Tests zu absolvieren (Deacon 2013). Des Weiteren kann hiermit ein möglicher Einfluss der Behandlungssubstanz auf das motorische System der Versuchstiere detektiert werden.

Der Rotarod Test wurde in einem dafür vorgesehenen RotaRod[®]-Apparat durchgeführt (Abbildung 2.3). Der Apparat wurde über eine zugehörige RotaRod[®]-Software gesteuert. Der Apparat bestand aus fünf gleichgroßen Kammern, in welchen die Mäuse platziert wurden. Diese Kammern waren an der Ober- und Vorderseite mittels durchsichtiger Wände verschlossen. Die restlichen Wände waren undurchsichtig. In der Mitte der Kammern befand sich ein längs rotierender Zylinder. 12 cm unterhalb dieses Zylinders wurde ein Gitter angebracht. Der Test wurde bei Rotlicht durchgeführt. Der Rotarod Test wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils vier Durchgängen durchgeführt, wobei Tag zwei 24 h später (± 1 h) begonnen wurde. Zwischen den einzelnen Durchgängen wurde eine Ruhepause von 15 min für die Versuchstiere eingehalten. Es wurden maximal drei Mäuse gleichzeitig getestet.

Zu Beginn des Tests wurden die Versuchstiere auf dem Zylinder platziert und die Kammern verschlossen. Anschließend wurde die Rotation des Zylinders mit einer Eingangsgeschwindigkeit von vier Umdrehungen pro Minute (UpM) gestartet. Die Beschleunigung betrug 7,2 UpM. Sobald die Maus den Zylinder verlassen hatte und auf dem Gitter aufgekommen war, erleuchtete die grüne Signalleuchte und die Zeit wurde gestoppt. Die Dauer des Tests betrug maximal 300 Sekunden, wobei die Drehgeschwindigkeit unter oben

genannter Drehbeschleunigung stetig zunahm. Nach jedem Versuch wurde der Apparat mit 70 % Ethanol gereinigt, um Gerüche zu beseitigen.



Abbildung 2.3: Versuchsaufbau Rotarod: Überprüfung des motorischen Lernvermögens und der Koordination

2.3.2 Elevated plus maze

Das *elevated plus maze* (EPM) dient der Untersuchung von Angstverhalten in Nagetieren. In dem Test werden die Mäuse mit offenen, frei exponierten Ebenen konfrontiert, was ein Vermeidungsverhalten der Mäuse herbeiführt (Walf und Frye 2007). Angelehnt an den Versuchsaufbau von Handley und Mithani, bestand der Apparat aus vier Armen (Handley und Mithani 1984). Die Arme mit den Maßen 15 cm x 5 cm waren in einem 90 ° Winkel zu einer zentralen Fläche mit den Maßen 5 cm x 5 cm angeordnet und befanden sich in einer Höhe von 141,5 cm. Die offenen bzw. geschlossenen Arme lagen sich jeweils gegenüber. Die geschlossenen Arme waren an drei Seiten von einer 15 cm hohen und durchsichtigen Wand aus Plexiglas umgeben, während die offenen Arme keine Begrenzung hatten (Abbildung 2.4). Der Versuch wurde von einer oberhalb der Arena angebrachten Kamera Computar® 2,8-12 mm aufgezeichnet und mit dem Video-Tracking-System Any-Maze® die Aufenthaltsdauer in den jeweiligen Arealen und die zurückgelegte Distanz ausgewertet.

Für den Test wurde die Maus in der Mitte der Arena mit dem Gesicht zu einem der offenen Arme platziert und konnte sich in der Arena für 300 s frei bewegen. Eine Zunahme der Aufenthaltsdauer in den offenen Armen kann als vermindertes Angstverhalten interpretiert werden.

Nach jedem Versuch wurde die Arena mit 70 % Ethanol gereinigt, um Gerüche zu beseitigen.

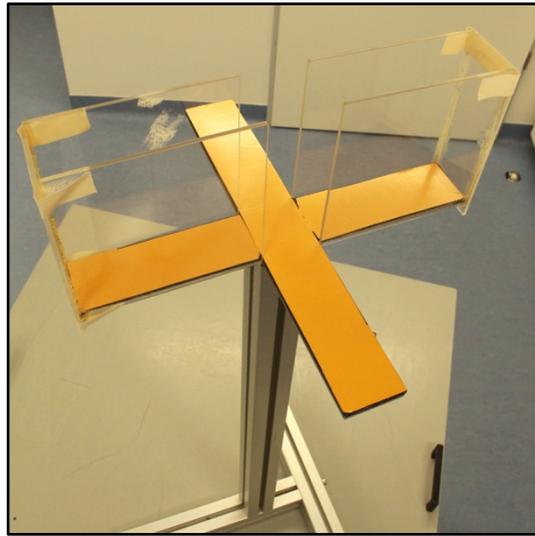


Abbildung 2.4: Versuchsaufbau EPM: Untersuchung des Angstverhaltens

2.3.3 Light/dark box

Light/dark box (LDB) ist ein etablierter Test zur Untersuchung des Angstverhaltens und des Einflusses von psychoaktiven Substanzen auf das Verhalten von Nagetieren. Der Test beruht auf der natürlichen Abneigung von Nagetieren gegen lichtexponierte Räume, sowie dem Verhalten in unbekanntem Umgebungen (Takao und Miyakawa 2006).

Die Arena bestand aus zwei miteinander verbundenen Boxen, von welchen eine komplett geschlossen- und die andere durch den fehlenden Deckel hell erleuchtet war. Die geschlossene Box trug die Maße 31 cm x 25 cm und die hell erleuchtete Box 42 cm x 25 cm. Üblicherweise ist die helle Box größer, als die geschlossene Box, sodass auch in diesem Versuchsaufbau beide Boxen unterschiedliche Maße aufwiesen (Bourin und Hascoet 2003). Die Arena hatte eine Höhe von 32 cm. Beide Boxen waren durch eine Wand voneinander getrennt und nur über eine Aussparung mit den Maßen 4,8 cm x 4,8 cm verbunden (Abbildung 2.5). Der Versuch wurde von einer über der Arena angebrachten Kamera Computar® 2,8-12 mm aufgezeichnet und mit dem Video-Tracking-System Any-Maze® die Aufenthaltsdauer in der jeweiligen Box und die Zeitdauer bis zum Kompartimentwechsel aufgezeichnet. Dabei wurde die Maus während des Versuchs nur in der hell erleuchteten Box beobachtet. Die Maus wurde zu Beginn des Versuchs mit dem Gesicht der Trennwand abgewandt in der hell erleuchteten Box platziert. Anschließend konnte sich die Maus für die Dauer von 300 s frei in beiden Boxen bewegen. Die Aussparung in der Trennwand war groß genug, als dass die Maus die benachbarte Box betreten konnte. Eine Zunahme der Aufenthaltsdauer in der hellen Box kann als vermindertes Angstverhalten interpretiert werden.

Nach jedem Versuch wurden die Boxen mit 70 % Ethanol gereinigt, um Gerüche zu beseitigen.

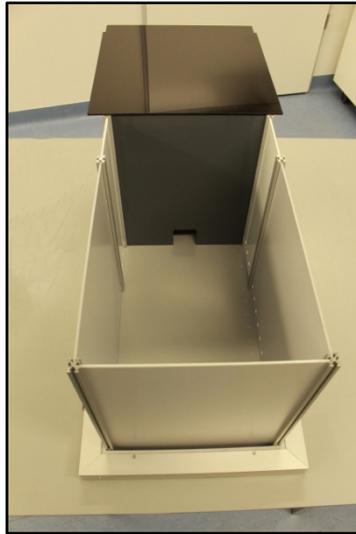


Abbildung 2.5: Versuchsaufbau DLB: Untersuchung des Angstverhaltens

2.3.4 Open field maze und object recognition test

Das *open field maze* (OFM) ist einer der am weitesten verbreiteten Verhaltenstests für Angstverhalten in Tieren. Dieser Test beruht im Allgemeinen auf einer Abneigung von Nagetieren gegen weite, hell erleuchtete und unbekannte Umgebungen (Seibenhener und Wooten 2015). In diesem Versuchsaufbau dient das OFM außerdem als Habituationsphase für den sich am Folgetag anschließenden *object recognition test* (ORT) (Frick und Gresack 2003; Leger et al. 2013).

Das OFM fand in einer an den Seiten geschlossenen Box mit den Maßen 40 cm x 50 cm x 50 cm bei geöffnetem Deckel unter Weißlicht statt (Abbildung 2.6). Hinsichtlich der Auswertung des Tests wurde der Apparat in ein im Zentrum befindliches Quadrat und die randständige Peripherie eingeteilt. Der Versuch wurde von einer oberhalb der Box angebrachten Kamera Computar® 2,8-12 mm aufgezeichnet und mit dem Video-Tracking-System Any-Maze® die Aufenthaltsdauer im Zentrum und in der Peripherie, sowie die zurückgelegte Distanz ausgewertet. Die Maus wurde in der Mitte der Box platziert. Die Dauer des Tests betrug 300 s.

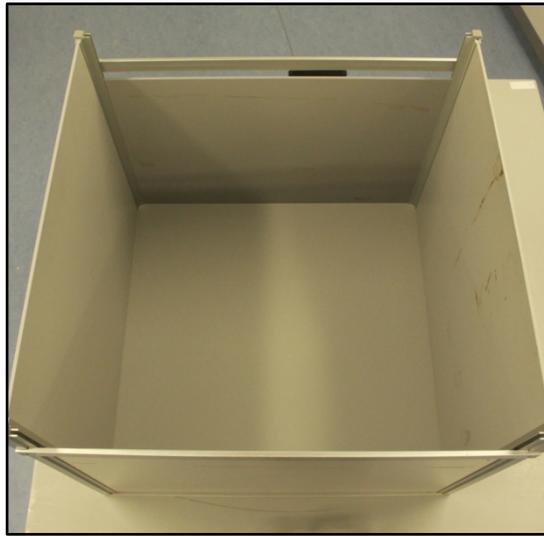


Abbildung 2.6: Versuchsaufbau OFM: Untersuchung des Angstverhaltens

Am darauffolgenden Tag schloss sich der ORT an. Mit diesem Test wird das Explorationsverhalten, die Präferenz für Neues, sowie das Gedächtnis der Mäuse untersucht (Antunes und Biala 2012; Ennaceur und Delacour 1988). Wildtyp-Mäuse haben ein natürliches Verlangen, neue Objekte zu explorieren. Folglich würden Mäuse zwischen einem neuen und einem bekannten Objekt eine Präferenz für das neue Objekt zeigen (Lueptow 2017). Der Test fand an zwei aufeinanderfolgenden Tagen statt, wobei der zweite Teil 24 h später ($\pm 1h$) begonnen wurde. Der Versuchsaufbau entsprach dem des OFM. Hinzu kamen an Tag eins Objekt 1 (O1) und Objekt 2 (O2), wobei sich diese identisch in Form eines Quaders aus braunem Holz darstellten (Abbildung 2.7A). Die Maus hatte 300 s Zeit, die Umgebung mitsamt den Objekten zu explorieren. An Tag zwei wurde Objekt 1 durch ein neues Objekt (nO) in Form eines Salzstreuers mit gelber Schaumstofffüllung ausgetauscht, wodurch sich dieser in Form, Material und Farbe von dem ausgetauschten Objekt unterschied (Abbildung 2.7B). Erneut hatte die Maus 300 s Zeit, die Umgebung mitsamt den Objekten zu inspizieren. Ausgewertet wurden an beiden Tagen die Aufenthaltsdauer an Objekt 1 bzw. neuen Objekt und Objekt 2, sowie die zurückgelegte Distanz. Die Aufenthaltsdauer am jeweiligen Objekt wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Aufenthaltsdauer am Objekt [\%]} = \frac{(\text{Aufenthaltsdauer Objekt } x \text{ [s]} \times 100)}{(\text{Aufenthaltsdauer O1 bzw. nO [s]} + \text{Aufenthaltsdauer O2 [s]})}$$

Nach jedem Versuch wurde die Box mit 70 % Ethanol gereinigt, um Gerüche zu beseitigen.



Abbildung 2.7: Versuchsaufbau ORT: Untersuchung des Explorationsverhaltens, der Präferenz für Neues und Gedächtnisleistung

2.3.5 Morris water maze

Das *Morris water maze* (MWM; Morris-Wasserlabyrinth) ist ein etablierter Test für räumliches Lernen in Nagetieren (Vorhees und Williams 2006). Das MWM wurde von Richard Morris entwickelt und anschließend von verschiedenen Arbeitsgruppen ergänzt (Morris 1984). In dieser Arbeit wurde sich an den 2006 von Vorhees und Williams entwickelten Versuchsprotokollen orientiert, wobei das Hippocampus-abhängige Lernen und räumliche Bezugsgedächtnis getestet wird (Bromley-Brits et al. 2011; Morris 1984; Vorhees und Williams 2006). Während der einzelnen Testphasen sollen die Versuchstiere erlernen, eine unter der Wasseroberfläche verborgene Plattform anhand visueller Orientierungshilfen aufzusuchen.

Der Apparat zur Durchführung des MWM bestand aus einem zylinderförmigen Wasserbecken, der kreisförmigen Plattform, einer dreieckigen Fahne und vier Schildern, welche am Rand der Arena befestigt werden können. Das Wasserbecken aus rostfreiem Stahl hatte einen Durchmesser von 110 cm und eine Höhe von 24 cm und wurde ca. zur Hälfte mit Wasser gefüllt. Die Plattform hatte einen Durchmesser von 11 cm und wurde unterhalb der Wasseroberfläche platziert. Das Wasser wurde mit titanweißer Acrylfarbe eingefärbt, sodass die Plattform während des Versuchs nicht sichtbar war. Der Versuch wurde bei einer Wassertemperatur von ca. $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durchgeführt. Die Arena war an drei Seiten von weißen Wänden- und an einer Seite von einem weißen Paravent umgeben. An jeder dieser vier Flächen wurden Hinweise in unterschiedlicher Form und Farbe angebracht. Der Versuchsleiter befand sich während des Versuches im Raum hinter dem Paravent. Der Versuch wurde mit einer

Material und Methoden

oberhalb der Arena angebrachten Kamera Computar® 2,8-12 mm aufgezeichnet und mit dem Video-Tracking-System Any-Maze® die Aufenthaltsdauer in den einzelnen Quadranten, die Zeit bis zum Erreichen der Plattform und die Schwimmgeschwindigkeit ausgewertet.

Der Versuch besteht aus drei Abschnitten: dem *cued training*, dem *acquisition training* und dem *probe trial*. Die jeweilige Start- und Zielposition der Versuchstiere wurde aus dem in Tabelle 2.10 dargestellten Protokoll entnommen.

Das *cued training* dient der Identifizierung möglicher Ausschlusskriterien außerhalb kognitiver Funktionen, wie etwa fehlende Schwimmfähigkeit und insuffizientes Sehvermögen. Das *cued training* wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, bestehend aus jeweils vier Durchgängen. Dabei wurde die Plattform bei jedem Durchgang in einen anderen Quadranten verschoben und die Maus an unterschiedlichen Stellen mit dem Gesicht zur Wand in den Apparat gesetzt. Auf der Plattform wurde eine Fahne platziert, welche die Plattform für die Maus anzeigt (Abbildung 2.8A). Jeder Durchgang dauerte maximal 60 Sekunden. Hatte die Maus die Plattform in dieser Zeit nicht gefunden, wurde sie zu der Plattform herangeführt. Sobald sie dort angekommen war, erhielt sie ausreichend Zeit, um sich zu orientieren. Zwischen den einzelnen Durchgängen wurde eine Ruhepause von 15 min für die Versuchstiere eingehalten. Um eine Hypothermie der Mäuse zu vermeiden, wurden sie nach jedem Durchgang vor einer Rotlichtlampe platziert.

Nach einem Tag Pause begann das *acquisition training*. Das *acquisition training* dient dazu, den Lernfortschritt der Versuchstiere zu beobachten. Das *acquisition training* wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, ebenfalls bestehend aus jeweils vier Durchgängen. Die Fahne wurde von der Plattform entfernt und die Plattform nicht mehr verschoben (Abbildung 2.8B). Der Quadrant, in dem die Plattform lokalisiert war, wird ab diesem Zeitpunkt als Zielquadrant bezeichnet. Die Maus wurde an unterschiedlichen Stellen mit dem Gesicht zur Wand in den Apparat gesetzt. Jeder Durchgang dauerte auch hier maximal 60 Sekunden. Sollte die Maus die Plattform in dieser Zeit nicht gefunden haben, wurde sie an die Plattform herangeführt. Nachfolgende Abläufe glichen denen des *cued trainings*.

Am darauffolgenden Tag wurde der *probe trial* durchgeführt. Beim *probe trial* wird das Verhalten der Versuchstiere unter Ausschaltung der Hilfestellungen beobachtet und anhand des Schwimmverhaltens eventuelle Präferenzen für die Quadranten analysiert. Dies dient der Beurteilung des räumlichen Bezugsgedächtnisses (Morris 1984).

Die Plattform wurde entfernt, sodass die Tiere den Test nicht nach Erreichen der Plattform-Zone vorzeitig beenden konnten. Der *probe trial* bestand nur aus einem Durchgang mit einer Dauer von 60 s.

Material und Methoden

Tabelle 2.10: MWM Protokoll: N = Norden; NO = Nordosten; NW = Nordwesten; O= Osten; S = Süden; SO = Südosten; SW = Südwesten; W = Westen.

	Trial 1		Trial 2		Trial 3		Trial 4	
	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel
Cued training								
1	O	NO	W	SO	N	SO	S	SW
2	W	NO	S	NO	O	SO	N	NW
3	S	NW	N	NO	W	SW	O	NW
Acquisition training								
1	NO	NW	O	NW	S	NW	SW	NW
2	S	NW	NO	NW	SW	NW	O	NW
3	SW	NW	S	NW	O	NW	NO	NW
4	O	NW	SW	NW	NO	NW	S	NW
5	SW	NW	NO	NW	S	NW	O	NW
Probe trial								
1	SO	entfernt						

A



B



Abbildung 2.8: Versuchsaufbau MWM: Untersuchung des Hippocampus-abhängigen Lernens und räumlichen Bezugsgedächtnisses

2.4 Präparation des Hirngewebes

2.4.1 Perfusion

Die Perfusion beschreibt eine Methode zur Gewinnung von annähernd blutleerem Gewebe. Dazu wird das Blutvolumen durch eine farblose Flüssigkeit ersetzt.

Zur Vorbereitung der Perfusion wurde der Schlauch der Perfusionspumpe Ismatec ISM861 mit 0,01 M Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS) gespült, um Luftblasen zu entfernen. Der Schlauch wurde mit einer Sterican®-Kanüle 26G für die spätere Punktion des Ventrikels versehen.

Anschließend wurde die Narkoselösung angesetzt. Dazu wurden 2 % Ketamin und 10 % Xylazin in Reinstwasser gelöst. 100 µl/10 g Körpergewicht Narkoselösung wurden der Maus mit einer Einmal-Insulinspritze intraperitoneal injiziert. Die Narkotisierung wurde von Mitarbeitern mit entsprechender Ausbildung und Genehmigung für dieses Projekt durchgeführt.

Sobald die entsprechenden Reflexe, inklusive des Zehenkneifreflexes nicht mehr auslösbar waren, wurde die Maus auf dem Perfusionstisch fixiert. Anschließend wurde die Haut, sowie das Subkutangewebe von Abdomen und Thorax mit einer chirurgischen Schere median inzidiert und dieser Schnitt jeweils lateral erweitert. Das freigelegte Peritoneum wurde angehoben und ebenfalls inzidiert und somit das Abdomen eröffnet. Das Diaphragma wurde linksseitig inzidiert und abpräpariert. Der Rippenbogen wurde durch mediane Inzision des Sternums gespalten. Der Schnitt wurde lateral erweitert und der Rippenbogen abpräpariert, sodass das schlagende Herz sichtbar wurde. Dieses wurde mit einer stumpfen Pinzette fixiert. Das rechte Atrium wurde mit einer feinen chirurgischen Schere inzidiert, um den Blutaustritt zu gewährleisten. Die Kanüle des Perfusionsschlauches wurde in den linken Ventrikel eingeführt und die Perfusion gestartet. Es wurden ungefähr 30 ml 0,01M PBS perfundiert. Durch Entfärbung der Leber wurde die suffiziente Perfusion sichergestellt.

2.4.2 Probenentnahme

Im Anschluss an die in Abschnitt 2.4.1 beschriebene Prozedur wurde die Dekapitation mit einer chirurgischen Schere vorgenommen. Die Haut des Schädels wurde abpräpariert und das Schädeldach median mittels einer feinen chirurgischen Schere inzidiert. Zwei weitere Inzisionen wurden temporal vorgenommen. Das Schädeldach wurde abpräpariert und das Gehirn stumpf aus dem Schädel gelöst. Die Hemisphären wurden median gespalten.

2.4.3 Fixation

Zunächst wurden die benötigten Lösungen für den Fixierungsvorgang angesetzt. Zur Herstellung der 4 % Paraformaldehyd (PFA)-Lösung wurden 4 % PFA in 0,01 M PBS erhitzt und nachdem sich das PFA restlos in dem PBS gelöst hatte die Lösung auf 4 °C heruntergekühlt. Für die Herstellung der Zuckerlösung wurden 30 % D(+)-Saccharose in PBS gelöst und auf 4 °C heruntergekühlt.

Im Anschluss an die Präparation des Hirngewebes (2.4.2) wurde die jeweils linke Hemisphäre mindestens über Nacht in einer 4 % PFA-Lösung bei 4 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Fixierung in einer 30 % Zuckerlösung und Schockgefrierung bei -80 °C, sobald die Hemisphären in der Zuckerlösung abgesunken waren.

Die rechte Hemisphäre wurde entweder sofort bei -80 °C schockgefroren oder in Einbettkassetten platziert und für mindestens drei Tage in 4 % phosphatgepufferter Formaldehydlösung (Histofix 4 %) gelagert.

2.4.3.1 Einbettung in Paraffin

Nachdem das Hirngewebe für mindestens drei Tage in Histofix 4 % gelagert hat (2.4.3), wurden die Einbettkassetten mitsamt Hirngewebe für die Dehydratation und Immersion des Paraffins im TP 1020 Automatic Tissue Processor platziert und gemäß Dehydratationsprotokoll behandelt (Tabelle 2.11). Anschließend wurden die Kassetten mitsamt Hirngewebe für eine Stunde in geschmolzenes Paraffin gegeben. Das Hirngewebe wurde nun mithilfe der Einbettmaschine Leica EG1140 H Heated Paraffin Embedding Module in Paraffinblöcke eingebettet.

Tabelle 2.11: Dehydratationsprotokoll

Substanz	Dauer
Histofix 4 %	5 min
Reinstwasser	30 min
50 % Ethanol	1 h
60 % Ethanol	1 h
70 % Ethanol	1 h
80 % Ethanol	1 h
90 % Ethanol	1 h
100 % Ethanol	2 x 1 h
Xylol	1 h
Paraffin (geschmolzen)	2 x 1 h

2.4.4 Herstellung von Gewebeschnitten

2.4.4.1 Anfertigung von Hirnschnitten am Kryostat

Zur Herstellung von 30 µm-Schnitten wurden jene Hemisphären verwendet, welche in 4 % PFA-Lösung konserviert, in 30 % Zuckerlösung fixiert- und anschließend bei -80 °C gefroren wurden (2.4.3). Dazu wurde das Leica CM1850 Kryostat verwendet. Das Cerebellum wurde

zum größten Teil entfernt und das zu schneidende Hirngewebe mit Tissue-Tek O.C.T. Compound Kleber fixiert und eingebettet. Das Hirngewebe wird mit Microtome Blades C35 koronar in Schnitte mit einer Dicke von 30 µm geschnitten und chronologisch auf 10 Probengefäße aufgeteilt. Die Proben wurden Free-Floating-3,3'-Diaminobenzidin-Immunfärbungen (2.5.1.1) und Kresylviolett-färbungen (2.5.2) verwendet.

2.4.4.2 Anfertigung von Hirnschnitten am Mikrotom

Zur Herstellung von 4 µm-Schnitten wurden Paraffin-fixierte Hemisphären verwendet (2.4.3.1). Dazu wurde das HM 335E Microtome verwendet.

Das Hirngewebe wird mit Microtome Blades S35 sagittal in Schnitte mit einer Dicke von 4 µm geschnitten, in einem Wasserbad bei Raumtemperatur platziert und auf Superfrost®-Objektträger aufgezogen. Die Schnitte werden nun in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 52 °C getaucht, damit sich die Schnitte entfalten können. Die Schnitte werden am Rand des Wasserbads bei 52 °C getrocknet und über Nacht in einem Inkubator bei 37 °C platziert. Mit diesen Hirnschnitten wurden 3,3'-Diaminobenzidin-Immunfärbungen durchgeführt (2.5.1.2)

2.5 Färbetechniken

2.5.1 Immunhistochemische Färbungen

2.5.1.1 Free-Floating-3,3'-Diaminobenzidin-Immunfärbung

Für diese Färbung wurden Hirnschnitte im Koronarschnitt mit einer Schichtdicke von 30 µm verwendet (2.4.4.1). Eines der zehn Gläser mit den darin enthaltenen Hirnschnitten wurde mit eiskaltem 0,01 M PBS gefüllt und vorsichtig bewegt, sodass sich die Schnitte von den Oberflächen lösen. Die Schnitte wurden in 12 Well TC Platten mit einem Corning® Nettwell® Einsatz gegeben und für 5 min und anschließend erneut für 10 min in kaltem 0,01 M PBS gewaschen. Zur Hemmung endogener Peroxidasen wurden die Schnitte mit einem Peroxidase Block, bestehend aus 0,3 % H₂O₂ gelöst in 0,01 M PBS, für 30 min inkubiert. Die Schnitte wurden für 3 x 10 min in einer Lösung aus 0,1 % Triton und 0,01 M PBS permeabilisiert und anschließend für eine min in 0,01 M PBS gewaschen. Ein unspezifischer Block zur Hemmung unspezifischer Bindungsstellen, bestehend aus 10 % *fetal calf serum* (FCS), 4 % Milchpulver und 0,01 M PBS, wurde den Schnitten für 1 h hinzugegeben. Der primäre Antikörper Anti-Doublecortin (Anti-DCX) (Tabelle 2.3) wurde in 10 % FCS und 0,01 M PBS gelöst, den Schnitten hinzugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte für 3 x 10 min in einer Lösung aus 0,1 % Triton und 0,01 M PBS und anschließend für 1 min in 0,01 M PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper

Material und Methoden

Anti-Kaninchen (Tabelle 2.4) wurde in 10 % FCS und 0,01 M PBS gelöst, den Schnitten hinzugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 3 x 10 min in 0,01 M PBS gewaschen. Die Avidin-Biotin-Complex-Lösung (ABC-Lösung) wurde mittels Vectastain Elite ABC-Kit 30 min vor Verwendung nach Vorgaben des Herstellers vorbereitet. Die Schnitte wurden in der ABC-Lösung für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden 3 x 10 min in 0,01M PBS gewaschen. Die Diaminobenzidin-Lösung (DAB-Lösung) wurde mittels DAB-Peroxidase-Substrate-Kit nach Vorgaben des Herstellers hergestellt. Die Schnitte wurden für 2 min mit der DAB-Lösung bedeckt. Die Schnitte wurden 3 x 10 min in 0,01 M PBS gewaschen und anschließend auf Superfrost®-Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden über Nacht in einem Inkubator mit einer Temperatur von 37 °C getrocknet.

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte 10 min in 0,01 M PBS gewaschen. Die Schnitte wurden zur Herstellung einer Gegenfärbung für 40 s in gefiltertes Hämatoxylin gestellt. Die Schnitte wurden in deionisiertes Wasser getaucht und anschließend für 5 min unter laufendes Leitungswasser gestellt. Die Schnitte wurden nach folgendem Dehydratationsprotokoll behandelt: 1 min 70 % Ethanol; 5 min 95 % Ethanol; 10 min 100 % Ethanol; 2 x 5 min Xylol. Anschließend wurde ein Tropfen Roth®-Histokitt auf den Objektträger gegeben und mit einem Menzel Deckglas 24 x 50 mm bedeckt. Die Schnitte verblieben über Nacht abgedeckt unter dem Abzug.

2.5.1.2 3,3'-Diaminobenzidin-Immunfärbung

Für diese Färbung wurden Paraffinschnitte im Sagittalschnitt mit einer Schichtdicke von 4 µm verwendet (2.4.4.2).

Zunächst wurden die Schnitte für 2 x 5 min in Xylol entparaffiniert. Anschließend durchliefen die Schnitte die folgende Behandlungsreihe: 10 min 100 % Ethanol; 5 min 95 % Ethanol; 5 min 70 % Ethanol; 1 min deionisiertes Wasser. Darauffolgend wurden die Schnitte für 30 min mit einem Peroxidase-Block, bestehend aus 0,3 % H₂O₂ gelöst in 0,01 M PBS, inkubiert und anschließend 1 min mit deionisiertem Wasser gewaschen. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte mit einem 10 mM Citratpuffer bedeckt und dieser in einer Mikrowelle bei 800 W aufgeköcht und anschließend bei 80 W für 8 min in der Mikrowelle belassen. Die Schnitte ließ man in dem Citratpuffer für 15 min abkühlen. Anschließend wurden die Schnitte 1 min in deionisiertem Wasser, 15 min in einer Lösung aus 0,1 % Triton und 0,01 M PBS, und anschließend 1 min in 0,01 M PBS gewaschen. Die Schnitte wurden daraufhin für 3 min mit 88 % Ameisensäure behandelt und anschließend 1 min in 0,01 M PBS und für weitere 5 min in 0,01 M PBS gewaschen. Nicht-spezifische Bindungsstellen wurden mit einer Lösung bestehend

aus 10 % FCS, 4 % Milchpulver und 0,01 M PBS gehemmt. Dazu wurden die Schnitte mit einem Lipidstift umrandet und für 1 h bei 37 °C mit dem unspezifischen Block inkubiert. Anschließend wurde der unspezifische Block entfernt und der primäre Antikörper, gelöst in 10 % FCS und 0,01 M PBS, hinzugegeben. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Als primäre Antikörper wurden Anti-CB1, Anti-GFAP und Anti-IBA1 verwendet (Tabelle 2.3).

Am folgenden Tag wurden die Schnitte für 3 x 10 min in einer Lösung aus 0,1 % Triton und 0,01 M PBS- und anschließend für 1 min in 0,01 M PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper Anti-Meerschweinchen (Tabelle 2.4) wurde in einer Verdünnung von 1:200 in 10 % FCS und 0,01 M PBS gelöst. Die Schnitte wurden für 1 h bei 37 °C mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Die Schnitte wurden für 3 x 5 min mit 0,01 M PBS gewaschen. Die ABC-Lösung wurde 30 min vor Verwendung nach Vorgaben des Herstellers vorbereitet. Anschließend wurden die Schnitte mit der ABC-Lösung behandelt und bei 37 °C inkubiert. Die Schnitte wurden 3 x 5 min mit 0,01 M PBS gewaschen. Die DAB-Lösung wurde nach Vorgaben des Hersteller hergestellt und die Schnitte bis zur gewünschten Farbintensität inkubiert. Die mit den entsprechenden Antikörpern behandelten Schnitte wurden für folgenden Zeitraum mit der DAB-Lösung behandelt: Anti-CB1 für 64 s; Anti-GFAP für 55 s; Anti-IBA1 für 53 s. Die Schnitte wurden daraufhin 3 x 5 min mit 0,01 M PBS gewaschen. Die Schnitte durchliefen anschließend folgendes Dehydratationsprotokoll: 1min 70 % Ethanol; 5 min 95 % Ethanol; 10 min 100 % Ethanol; 2 x 5 min Xylol. Anschließend wurde ein Tropfen Roth®-Histokitt auf den Objektträger gegeben und mit einem Menzel Deckglas 24 x 50 mm bedeckt. Die Schnitte verblieben über Nacht abgedeckt unter dem Abzug.

2.5.2 Kresylviolett-färbung

Die Kresylviolett-färbung dient der Sichtbarmachung von Nissl-Substanz und wird in dieser Arbeit für stereologische Analysen genutzt (Alvarez-Buylla et al. 1990). Für die Färbung wurden Hirnschnitte im Koronarschnitt mit einer Dicke von 30 µm verwendet (2.4.4.1). Die benötigten Lösungen wurden entsprechend Tabelle 2.12 angesetzt. Lösung 2 wurde dabei über Nacht gerührt und vor Gebrauch gefiltert. Lösung 3A wurde vor Verwendung 1 h gerührt. Die Schnitte wurden in eine mit 0,01 M PBS gefüllte Petrischale gegeben, auf Superfrost®-Objektträger aufgezogen und über Nacht in einem Inkubator bei 37 °C getrocknet.

Die Schnitte wurden für 2 x 10 min mit Arbeitslösung 1B-, weiterhin für 20 min mit Arbeitslösung 3B- und anschließend erneut für 2 x 10 min mit Arbeitslösung 1B behandelt. Die Schnitte wurden für 2 x 8 min mit Lösung 2 gefärbt. Die nun angefärbten Schnitte wurden nach folgendem Dehydratationsprotokoll behandelt: 3 x 1 min Arbeitslösung 3B, 3 min 100 %

Ethanol, 10 min Isopropanol, 2 x 5 min Xylol. Anschließend wurde ein Tropfen Roth®-Histokitt auf den Objektträger gegeben und mit einem Menzel Deckglas 24 x 50 mm bedeckt. Die Schnitte verblieben über Nacht abgedeckt unter dem Abzug.

Tabelle 2.12: Lösungen für Kresylviolett-färbung

Lösungen	Zusammensetzung
1A Vorratslösung	13,61 g Natriumacetat Trihydrat 100 ml Reinstwasser
1B Arbeitslösung	80 ml von Lösung 1A 19,2 ml 100 % Essigsäure 900,8 ml Reinstwasser
2 Färbelösung	0,1 g Kresylviolett 1 l von Lösung 1B
3A Vorratslösung	20 ml Triton X-100 980 ml Reinstwasser
3B Arbeitslösung	2,5 ml von Lösung 3A 50 ml Reinstwasser 150 ml 100 % Ethanol

2.6 Mikroskopie

2.6.1 Stereologie

Die Design-basierte Stereologie ist eine Mikroskopiermethode zur Quantifizierung der Neuronenzahl (West et al. 1991). Dafür wurden die Zellen jedes zehnten Hirnschnittes mittels Kresylviolett-färbung angefärbt (2.5.2). Anschließend wurden die Schnitte für den Untersucher verblindet, um systematischen Bias zu verhindern. In dieser Arbeit wurden die Neuronen der CA1 Region des Hippocampus in den Abschnitten Bregma -1,34 bis Bregma -3,80 mm quantifiziert (Paxinos und Franklin 2001). Als Mikroskop wurde die BX 51 Stereology Workstation inklusive motorisiertem Objektisch verwendet.

Mittels der Software Stereo Investigator 7 wurden die im Folgenden beschriebenen Einstellungen vorgenommen. Entsprechend der von Paxinos und Franklin erstellten schematischen Abbildungen wurden die Begrenzungen der CA1 Region bei einer 4 x Vergrößerung vorgenommen. Die Neuronen wurden unter Anwendung eines Immersionsöls bei einer 100 x Vergrößerung ausgezählt.

Die Neuronen wurden in Kästchen mit den Maßen 14 x 14 µm gezählt, wobei jene Kästchen zufällig in einem Gitternetz mit einer Maschenweite von 49 x 105 µm platziert wurden. Die Schichtdicke jedes Kästchens wurde bei einer *disector height* von 5 µm bestimmt. Die Neurone

wurden entsprechend der *optical disector* Zählmethode gezählt. Mithilfe der *optical fractionator* Methode wurde die totale Anzahl an Neuronen bei einer *top guard zone* von 2 μm annähernd bestimmt (West et al. 1991). Die Neuronen wurden anhand der Prinzipien der Stereologie ausgezählt (Schmitz und Hof 2005; West et al. 1991). Die totale Anzahl der Neuronen in der CA1 Region wurde anhand entsprechender Formeln bestimmt (Tabelle 2.13).

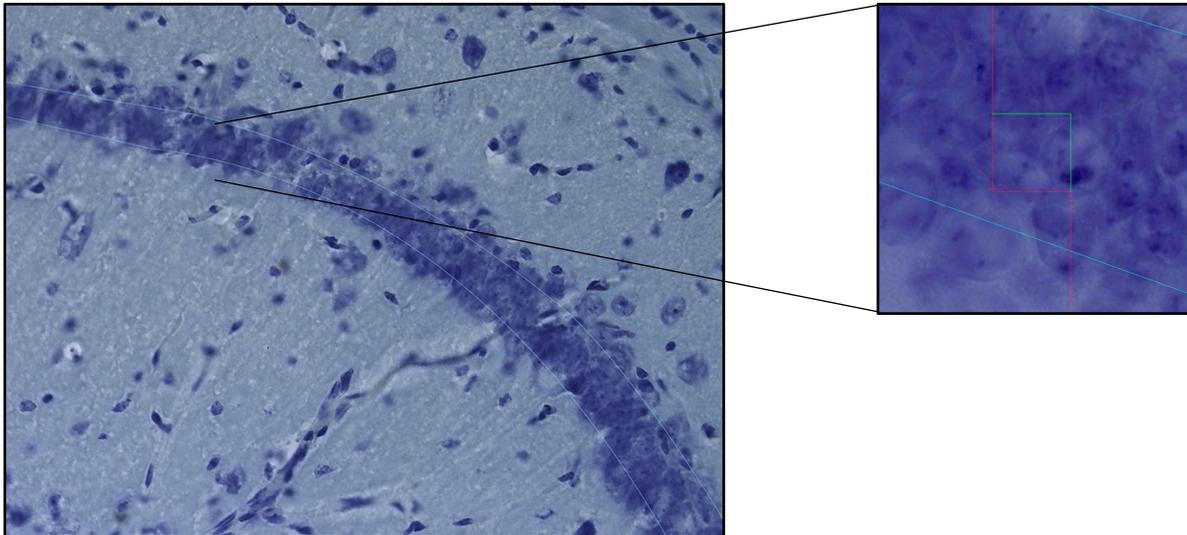


Abbildung 2.9: Randomisierte Auswahl der Quadrate in der CA1-Region des Hippocampus. Mithilfe der Stereo Investigator 7 Software werden die entsprechenden Begrenzungen der zu untersuchenden Region manuell vorgegeben (blaue Linie). Die Software verteilt randomisiert quadratische Flächen in und unmittelbar um die Region. Bei der manuellen Zählung der in dem Quadrat liegenden Neurone wurden nur diese gezählt, welche die rote Linie nicht berühren. Die Neurone, welche in dem Kästchen liegen oder die grüne Linie berühren, wurden quantifiziert.

Tabelle 2.13: Formeln für Berechnung der Gesamtneuronenanzahl

	Formel
Berechnung des Zwischenwertes (P)	$P = asf \times ssf \times tsf$
Berechnung der Neuronenanzahl pro Schnitt (N)	$N = P \times tmc$
Berechnung der Gesamtneuronenanzahl (Veitenhansl et al. 2004)	$N_{ges} = \sum_{i=1}^n (P \times tmc)_i$

Tabelle 2.14: Parameter für die Berechnung der Gesamtneuronenzahl

Abk.	Parameter	Berechnung
asf	<i>area sampling fraction</i>	$asf = \frac{\text{Gitternetzmasche } [\mu\text{m} \times \mu\text{m}]}{\text{Zählrahmen } [\mu\text{m} \times \mu\text{m}]} = \frac{49 \mu\text{m} \times 105 \mu\text{m}}{14 \mu\text{m} \times 14 \mu\text{m}}$
ssf	<i>section sampling fraction</i>	10
tsf	<i>thickness sampling fraction</i>	$tsf = \frac{\text{Schichtdicke } [\mu\text{m}]}{\text{optical disector height } [\mu\text{m}]} = \frac{\text{Schichtdicke } [\mu\text{m}]}{5 \mu\text{m}}$

Abk.	Parameter	Berechnung
tmc	<i>total markers counted</i>	Gezählte Neuronen im Stereo Investigator 7

2.6.2 Quantifizierung der Neurogenese

Zur Quantifizierung der in Neurogenese befindlichen Neuronen wurden zunächst die Gewebeproben von 30 µm Schichtdicke gemäß des in Abschnitt 2.5.1.1 beschriebenen Färbeprotokolls behandelt und damit DCX-positive Zellen sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Schnitte für den Untersucher verblindet, um systematischen Bias zu verhindern. In dieser Arbeit wurden die Neuronen des Gyrus Dentatus des Hippocampus in den Abschnitten Bregma -1,34 bis Bregma -3,80 mm quantifiziert (Paxinos und Franklin 2001). Als Mikroskop wurde die BX 51 Stereology Workingstation inklusive motorisiertem Objektisch verwendet. Entsprechend der von Paxinos und Franklin erstellten schematischen Abbildungen wurden die Begrenzungen der CA1 Region bei einer 4 x Vergrößerung vorgenommen. Die DCX-positiven Neuronen wurden unter Anwendung eines Immersionsöls bei einer 100 x Vergrößerung in einer Mäander-Technik ausgezählt. Um die in Neurogenese befindlichen Zellen auf das gesamte Gehirn hochzurechnen, wurde die Anzahl der Zellen mit dem Faktor 10 multipliziert.

2.6.3 Quantifizierung der Inflammation und CB1-Expression

Zur Quantifizierung der Inflammation und CB1-Expression wurden zunächst Gewebeproben mit einer Schichtdicke von 4 µm entsprechend des in Abschnitt 2.5.1.2 beschriebenen Färbeprotokolls angefärbt und damit CB1-, GFAP-, bzw. IBA1-positive Zellen sichtbar gemacht. Insgesamt wurden pro Färbung drei Hirnschnitte mit einem Mindestabstand von 20 µm quantifiziert.

Für die Mikroskopie der Hirnschnitte wurde das Olympus BX 51 Mikroskop mit angebrachter Moticam Pro 282 B Kamera, sowie die Motic Images Plus 2.0 Mikroskopier-Software verwendet. Es wurden pro Schnitt jeweils unter gleichen Bedingungen drei Bilder des Cortex cerebri in 40 x Vergrößerung und ein Bild des Hippocampus in 10 x Vergrößerung aufgenommen. Bei Ersteren wurde zunächst eine Aufnahme exakt dorsal des Hippocampus generiert, auf welche jeweils eine Aufnahme zwei Gesichtsfelder rostral bzw. okzipital folgt (Abbildung 2.10).

Die Aufnahmen wurden mit der ImageJ Software in ein 8 bit Binärbild gewandelt und ausgewertet. Zunächst wurde ein Schwellenwert festgelegt, welcher für die gesamten Aufnahmen ein optimales Ergebnis liefert. Mit den in Tabelle 2.15 ersichtlichen Schwellenwerten wurden die Aufnahmen des entsprechenden Hirnareals ausgewertet, wobei

das Ergebnis die angefärbte Fläche repräsentiert. Die Ergebnisse wurden auf die Kontrollgruppe normalisiert.

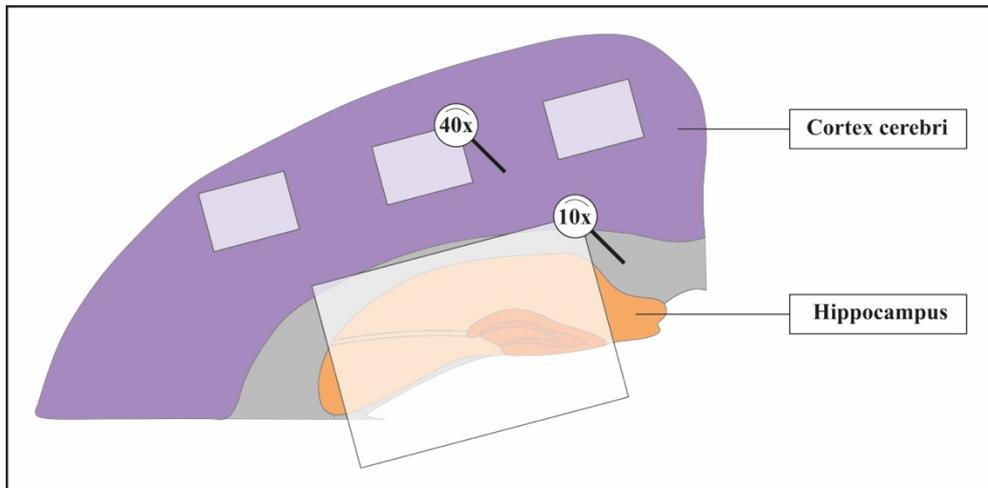


Abbildung 2.10: Schematische Abbildung der Aufnahmen von Hippocampus und Cortex cerebri. Pro Schnitt wurden jeweils eine Aufnahme des Hippocampus in 10 x Vergrößerung und drei Aufnahmen des Cortex cerebri in 40 x Vergrößerung generiert. Das erste Bild des Cortex cerebri wurde exakt dorsal des Hippocampus- und die nachfolgenden jeweils zwei Gesichtsfelder rostral bzw. okzipital aufgenommen.

Tabelle 2.15: Schwellenwerteinstellung Image J

Antikörper	Schwellenwert Hippocampus	Schwellenwert Cortex cerebri
Anti-CB1	230	240
Anti-GFAP	200	200
Anti-IBA1	215	230

2.7 Statistik

Im Rahmen der Auswertung mittels GraphPad Software Prism 6 wurden gepaarte und ungepaarte Zweistichproben-t-Tests, einfache Varianzanalysen und zweifaktorielle Varianzanalysen mit Bonferroni-Korrektur (*two-way ANOVA*) durchgeführt. Die Anzahl der verwendeten Tiere (n) wurde im Beschriftungstext des jeweiligen Graphen angegeben. Die Signifikanzniveaus wurden bei allen statistischen Auswertungen wie folgt angegeben: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben (*standard error of the mean*, S.E.M.). Statistische Ausreißer wurden aus der statistischen Analyse entfernt.

2.8 Software

Die Verhaltenstests wurden mithilfe der Any-Maze[®]-Software analysiert. Der Rotarod-Test wurde mit der RotaRod[®]-Software durchgeführt und analysiert. Design-basierte Stereologie

Material und Methoden

wurde mithilfe der Stereo Investigator 7 Software durchgeführt. Motic Images Plus 2.0 und ImageJ wurde für immunhistochemische Analysen verwendet. GraphPad Software Prism 6 wurde für die Darstellung der Graphen und für die statistische Auswertung verwendet (Tabelle 2.16). Die in der Einleitung und im Methodenteil verwendeten Grafiken wurden mithilfe von Adobe Illustrator 2021 erstellt.

Tabelle 2.16: Software

Software	Hersteller
Any-Maze[®] Version 4	Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA
GraphPad Software Prism 6	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
Image J Version 1.51	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Microsoft Office 365 Plus	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Motic Images Plus 2.0	Motic, Hong Kong, China
RotaRod[®]-Software	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Stereo Investigator 7	MBF Bioscience, Williston, VT, USA
Adobe Illustrator 2021	Adobe Inc., San José, CA, USA

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des Transgens der Tg4-42_{hom}-Mauslinie

Für die folgenden Versuche wurden homozygote Mäuse der Tg4-42-Mauslinie verwendet. Es wurden stichprobenartig entsprechende Genotypisierungen durchgeführt, um das Vorhandensein des Transgens zu bestätigen. Die Ergebnisse wurden exemplarisch in Abbildung 3.1 dargestellt. Erwartungsgemäß befinden sich die Banden der homozygoten Tg4-42-Mäuse bei 248bp auf Höhe der Positivkontrolle. Die Negativkontrolle zeigt aufgrund des fehlenden Transgens keine Bande.

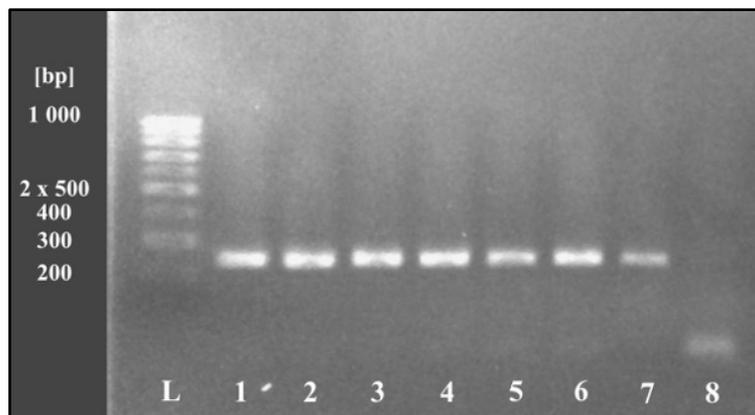


Abbildung 3.1: Nachweis des Transgens der Tg4-42-Mauslinie bei 248bp. Die Banden 1-6 repräsentieren die zu testenden Tiere der Tg4-42-Mauslinie, während Bande 7 der Positivkontrolle und Bande 8 der Negativkontrolle entspricht. Der DNA Ladder (L) ist ganz links in der Abbildung aufgetragen und entsprechend beschriftet.

3.2 Verhaltensversuche

3.2.1 Fehlender Einfluss von Δ^9 -THC auf die Motorik der Tg4-42-Mauslinie

Um den Einfluss von Δ^9 -THC auf das motorische Lernen der Versuchstiere vor Durchführung der nachfolgenden Verhaltensversuche zu überprüfen, wurde der Rotarod Test durchgeführt (Deacon 2013).

Sowohl in der präventiven-, als auch in der therapeutischen Behandlungsgruppe fanden sich keine Unterschiede zwischen unbehandelten- und THC-behandelten Tieren (Abbildung 3.2A-B; Zweifaktorielle Varianzanalyse; *Behandlungssubstanz*: $p > 0,05$).

Sowohl Gruppen der präventiven-, als auch der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigten im Rotarod Test eine ansteigende Lernkurve im Sinne einer verlängerten Zeitdauer auf dem Zylinder entlang der durchgeführten Durchgänge (Abbildung 3.2A-B; Zweifaktorielle Varianzanalyse; *Durchgänge*: $p < 0,001$).

Ergebnisse

Das Gewicht diente insbesondere in diesem Versuch als Kontrolle, wobei sich in beiden Behandlungsansätzen kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen feststellen ließ (Abbildung 3.2C-B; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$).

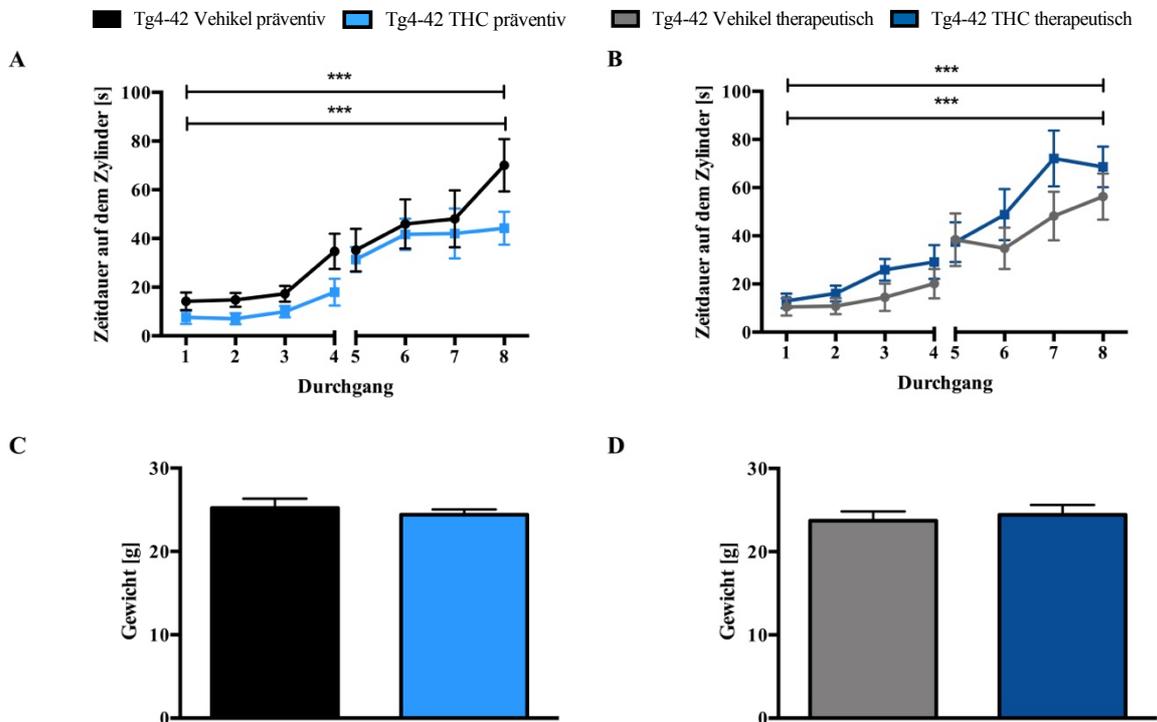


Abbildung 3.2: THC hat keinen Einfluss auf die Lernkurve der Tg4-42-Mauslinie im Rotarod Test. Sowohl THC-behandelte Versuchstiere des präventiven- (A), als auch THC-behandelte Versuchstiere des therapeutischen Behandlungsansatzes (B) zeigen gegenüber der Kontrollgruppe in den einzelnen Durchgängen keine signifikanten Unterschiede in der Zeitdauer auf dem Zylinder. Zwischen den Behandlungsgruppen fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich des Gewichtes (C, D). Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur (A, B), ungepaarter Zweistichproben-t-Test (C, D). $n = 12 - 15$ pro Gruppe. *** $p < 0,001$. Daten dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.

3.2.2 Auswirkungen von Δ^9 -THC auf das Angstverhalten der Tg4-42-Mauslinie

Zur Testung des Angstverhaltens wurden unterschiedliche Verhaltensversuche durchgeführt, welche allesamt die Versuchstiere in eine Konfliktsituation versetzen. Das physiologische Verhalten von Nagetieren, eine neue Umgebung zu explorieren, wird beispielsweise durch die Angst vor Höhe, offenen- oder hell exponierten Räumen gestört. Zu diesen Tests zählen das EPM, OFM und der LDB (Bailey und Crawley 2009).

3.2.2.1 Verändertes Angstverhalten in unbehandelten Tieren der Tg4-42-Mauslinie im elevated plus maze (EPM)

Das EPM dient der Untersuchung des Angstverhaltens von Nagetieren gegenüber der Exposition von Höhe in einem dafür vorgesehenen Apparat (Handley und Mithani 1984).

Ergebnisse

In der präventiven Behandlungsgruppe verbrachten die unbehandelten Tg4-42-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant mehr Zeit in den offenen Armen des Apparates (Abbildung 3.3A; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,05$), während sich zwischen den THC-behandelten Tg4-42-Mäusen und den Wildtyp-Tieren kein Unterschied darstellte. Unbehandelte Tiere der Tg4-42-Mauslinie zeigen somit gegenüber Wildtyp-Tieren ein vermindertes Angstverhalten. Die THC-behandelten Tg4-42-Mäuse legten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren signifikant größere Distanzen zurück (Abbildung 3.3B; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,05$).

In der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Zeitdauer in den offenen Armen und der zurückgelegten Distanz (Abbildung 3.3C-D; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$).

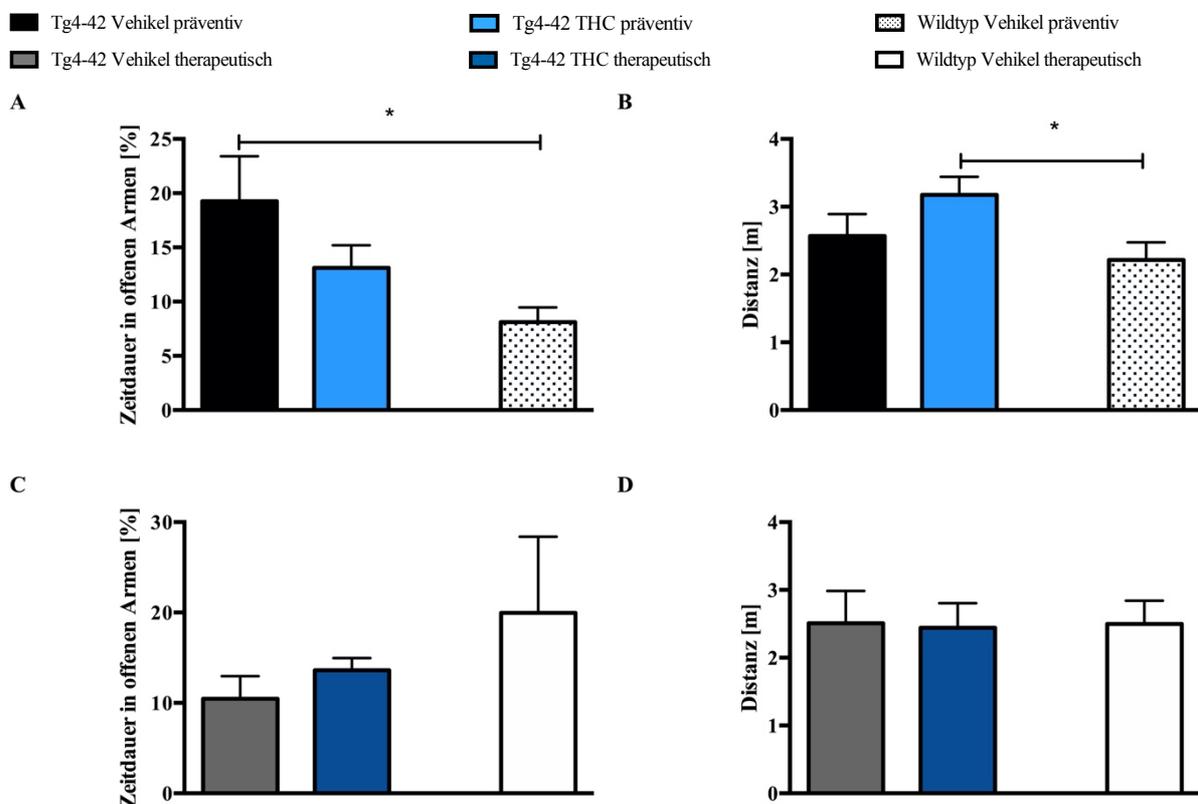


Abbildung 3.3: Verändertes Angstverhalten von unbehandelten Tg4-42-Mäusen in der präventiven Behandlungsgruppe. In der präventiven Behandlungsgruppe verbringen die unbehandelten Tg4-42-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren signifikant mehr Zeit in den offenen Armen des Apparates, wohingegen sich zwischen den mit THC-behandelten Tg4-42-Mäusen und den Wildtyp-Tieren keine Unterschiede zeigen (A). In der präventiven Behandlungsgruppe legen die mit THC behandelten Tg4-42-Mäuse im Vergleich zu den anderen Gruppen eine signifikant größere Distanz zurück (B). In der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Zeitdauer in den offenen Armen (C) und der zurückgelegten Distanz (D). Ungepaarter Zweistichproben-t-Test. $n = 12 - 15$ pro Gruppe. $*p < 0,05$. Daten dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.

Ergebnisse

3.2.2.2 Fehlender Einfluss auf das Angstverhalten im Light/ Dark Box Test (LDB)

Mithilfe des LDB kann die Aversion von Nagetieren gegenüber lichtexponierten Umgebungen in Kombination mit dem Verhalten in unbekanntem Umgebungen untersucht werden (Takao und Miyakawa 2006).

In der präventiven Behandlungsgruppe verbringen sowohl die unbehandelten (Abbildung 3.4A; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,01$), als auch die mit THC-Lösung behandelten Tg4-42-Mäuse (Abbildung 3.4A; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,05$) gegenüber Wildtyp-Tieren signifikant weniger Zeit in der hellen Box, wohingegen die Zeit bis zum ersten Übertritt in die dunkle Box zwischen den Gruppen äquivalent ist (Abbildung 3.4B; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$). Folglich hat die THC-Behandlung im LDB keinen Einfluss auf das Angstverhalten der Tg4-42-Mauslinie.

In der therapeutischen Gruppe war die Zeitdauer bis zum ersten Übertritt in die dunkle Box bei den unbehandelten Tg4-42-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren verlängert (Abbildung 3.4D; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,01$). Hinsichtlich der Zeitdauer in der hellen Box zeigten sich im therapeutischen Behandlungsansatz keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 3.4C; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$).

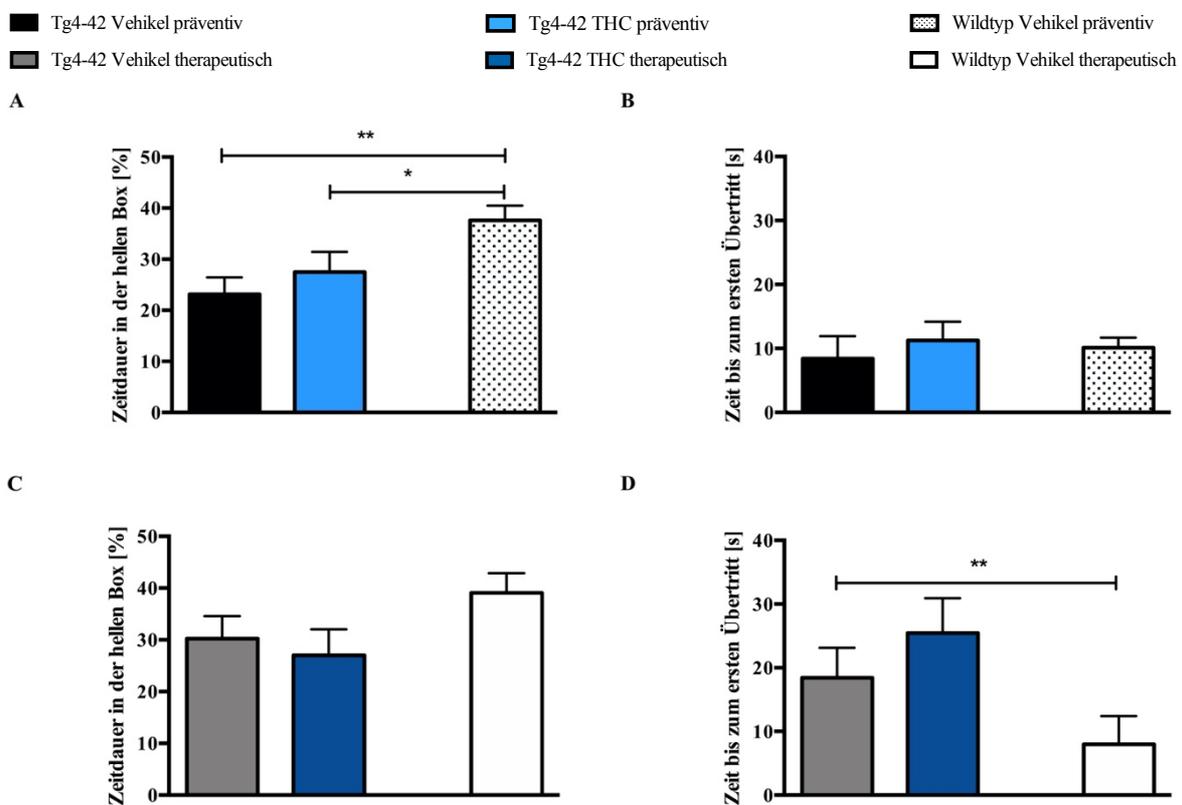


Abbildung 3.4: Unverändertes Angstverhalten zwischen unbehandelten- und THC-behandelten Tg4-42-Mäusen im LDB. In der präventiven Behandlungsgruppe verbringen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren beide Behandlungsgruppen der Tg4-42-Mauslinie signifikant weniger Zeit in der hellen Box (A). In der Zeit bis zum

Ergebnisse

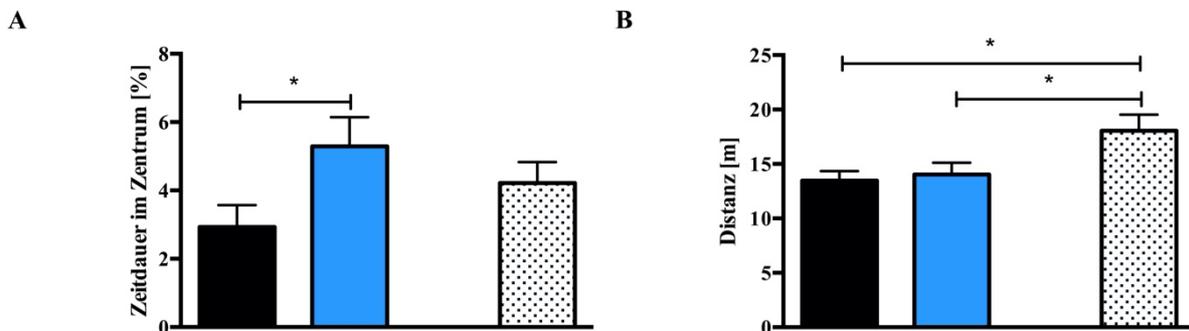
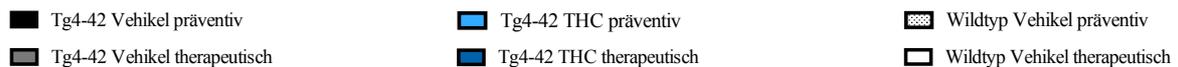
ersten Übertritt in die dunkle Box finden sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen der präventiven Behandlungsgruppe (B). In der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigen sich keine Unterschiede bezüglich der Zeitdauer in der hellen Box (C). Unbehandelte Tg4-42-Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine signifikant verlängerte Zeitdauer bis zum Übertritt in die dunkle Box (D). Ungepaarter Zweistichproben-t-Test. $n = 12 - 15$ pro Gruppe. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$. Daten dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.

3.2.2.3 Vermindertes Angstverhalten im open field maze (OFM)

Anhand des OFM wird das Verhalten der Versuchstiere in einer weiten, hell erleuchteten und unbekanntem Umgebung untersucht (Seibenhener und Wooten 2015).

In der präventiven Behandlungsgruppe zeigten sich hinsichtlich der Zeitdauer im Zentrum keine Unterschiede zwischen unbehandelten bzw. THC-behandelten Tg4-42-Mäusen und Wildtyp-Tieren (Abbildung 3.5A; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$). THC-behandelte Tg4-42-Mäuse verbrachten im Vergleich zu den unbehandelten Tg4-42-Mäusen prozentual mehr Zeit im Zentrum des Apparates (Abbildung 3.5A; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,05$). THC-behandelte Tiere der Tg4-42-Mauslinie zeigten somit innerhalb des präventiven Behandlungsansatzes ein vermindertes Angstverhalten im Vergleich zu unbehandelten Tieren derselben Mauslinie. Wildtyp-Tiere legten im Vergleich zu Mäusen der Tg4-42-Mauslinie eine längere Wegstrecke zurück (Abbildung 3.5B; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,05$).

Innerhalb des therapeutischen Behandlungsansatzes zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Zeit im Zentrum des Apparates und der zurückgelegten Distanz (Abbildung 3.5C-D; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$). THC hat somit keinen Einfluss auf Angst- und Erkundungsverhalten in dieser Behandlungsgruppe.



Ergebnisse

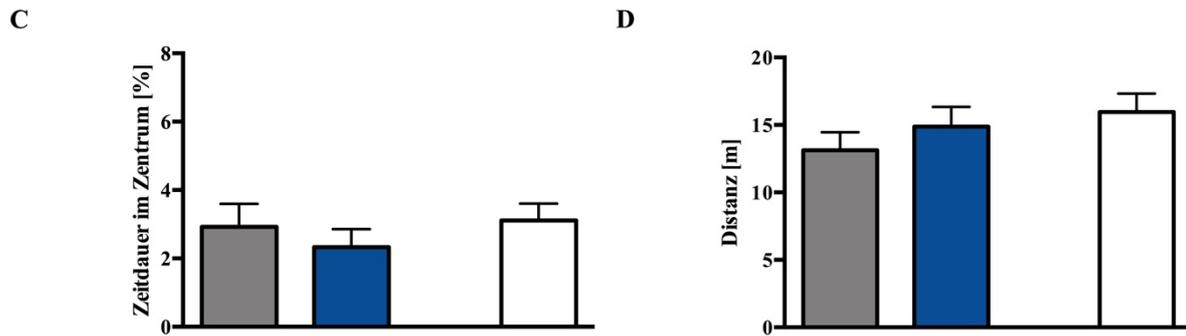


Abbildung 3.5: Vermindertenes Angstverhalten der THC-behandelten Tg4-42-Mäuse in der präventiven Behandlungsgruppe. Die THC-behandelten Tg4-42-Mäuse verbringen im Vergleich zu den unbehandelten Tg4-42-Mäusen der präventiven Behandlungsgruppe signifikant mehr Zeit im Zentrum des Apparates (A). Wildtyp-Mäuse legen im Vergleich zur Tg4-42-Mauslinie eine längere Distanz zurück (B). In der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zeitdauer im Zentrum (C) und zurückgelegter Distanz (D). Ungepaarter Zweistichproben-t-Test. $n = 12 - 15$ pro Gruppe. $*p < 0,05$. Daten dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.

3.2.3 Einfluss von $\Delta 9$ -THC auf die Gedächtnisleistung der Tg4-42-Mauslinie

3.2.3.1 Verbesserte Gedächtnisleistung im object recognition test (ORT)

Anhand des ORT wird das angeborene Explorationsverhalten und die Gedächtnisleistung getestet (Antunes und Biala 2012; Ennaceur und Delacour 1988; Lueptow 2017). Es wird getestet, ob die Versuchstiere zwischen einem neuen und einem bereits bekannten Objekt unterscheiden können. Der Präferenz-Index stellt ein Maß für die Zeit am jeweiligen Objekt dar und ist die Ratio aus der Zeitdauer am Objekt und der Summe aus der Zeitdauer an beiden Objekten (Antunes und Biala 2012; Wang et al. 2007).

In der präventiven Behandlungsgruppe zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich Präferenz-Index und zurückgelegter Distanz (Abbildung 3.6A-B; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$).

In der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigen die mit $\Delta 9$ -THC behandelten Mäuse eine Präferenz für das neue Objekt an Tag zwei (Abbildung 3.6C; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,01$), während unbehandelte Tg4-42-Mäuse nicht zwischen den Objekten unterscheiden können (Abbildung 3.6C; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$). In der zurückgelegten Distanz zeigt sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 3.6D; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$).

Ergebnisse

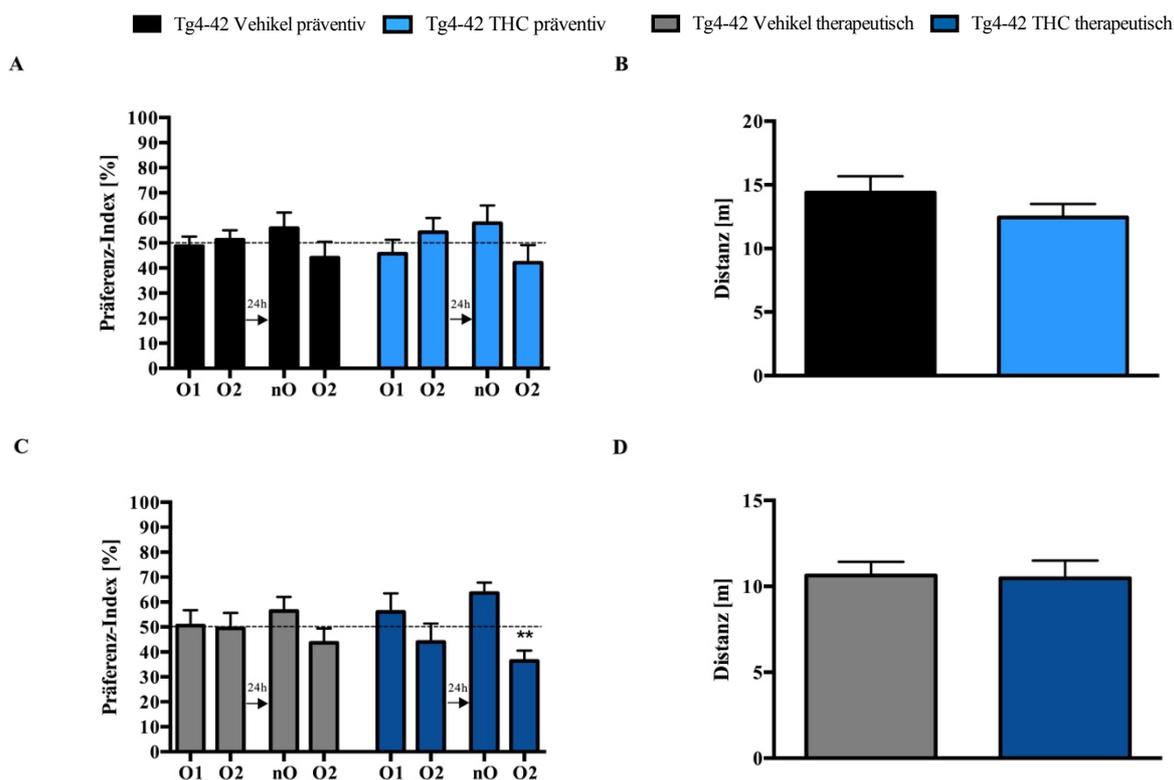


Abbildung 3.6: Erhöhter Präferenz-Index von THC behandelten Mäusen der therapeutischen Behandlungsgruppe. In der präventiven Gruppe zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich des Präferenz-Index (A) und der zurückgelegten Distanz (B). In der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigen die THC-behandelten Tiere eine Präferenz für das neue Objekt (C). In der zurückgelegten Distanz zeigen sich auch hier keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Ungepaarter Zweistichproben-t-Test. $n = 12 - 15$ pro Gruppe. O1 = Objekt 1; O2 = Objekt 2; nO = neues Objekt. $**p < 0,01$. Daten dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.

3.2.3.2 Verbessertes räumliches Lernen im Morris water maze (MWM)

Der MWM Test dient der Untersuchung des Arbeitsgedächtnisses, sowie des räumlichen Lernens in Nagetieren (Morris 1984).

Begonnen wurde der Test mit dem dreitägigen *cued training*, bei welchem neben der Testung der Gedächtnisleistung auch die Eignung der Mäuse für die weiteren Testphasen sichergestellt wird.

In der präventiven Behandlungsgruppe zeigten die Gruppen eine ansteigende Lernkurve entlang der Testtage (Abbildung 3.7A; Zweifaktorielle Varianzanalyse; *Tage*: $p < 0,001$). Ein Unterschied zwischen unbehandelten- und THC-behandelten Tieren im *cued training* bezüglich der Zeit bis zum Erreichen der Plattform fand sich nicht (Abbildung 3.7A; Zweifaktorielle Varianzanalyse; *Behandlungssubstanz*: $p > 0,05$). Sowohl unbehandelte- als auch THC-behandelte Tiere zeigten einen signifikanten Unterschied in der Zeit bis zum Erreichen der Plattform zwischen Tag eins und Tag drei (Abbildung 3.7A; Zweifaktorielle Varianzanalyse

Ergebnisse

mit multiplen Vergleichen; $p < 0,001$). THC-behandelte Mäuse zeigten an Tag drei im Vergleich zu unbehandelten Tieren eine reduzierte Schwimmgeschwindigkeit (Abbildung 3.7B; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,05$).

In der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigten die Gruppen eine ansteigende Lernkurve entlang der Testtage (Abbildung 3.7C; Zweifaktorielle Varianzanalyse; *Tage*: $p < 0,001$). Ein Unterschied zwischen unbehandelten- und THC-behandelten Tieren im bezüglich der Zeit bis zum Erreichen der Plattform fand sich nicht (Abbildung 3.7C; Zweifaktorielle Varianzanalyse; *Behandlungssubstanz*: $p > 0,05$). THC-behandelte Tiere benötigten an Tag eins signifikant mehr Zeit zum Erreichen der Plattform im Vergleich zu unbehandelten Tieren, was auf die überraschenderweise gute Performance der unbehandelten Tiere zurückzuführen ist (Abbildung 3.7C; Zweifaktorielle Varianzanalyse; $p < 0,05$). Nur THC-behandelte Tiere zeigten einen signifikanten Unterschied in der Zeit bis zum Erreichen der Plattform zwischen Tag eins und Tag drei (Abbildung 3.7C; Zweifaktorielle Varianzanalyse mit multiplen Vergleichen; *THC*: $p < 0,001$; *Vehikel*: $p > 0,05$). Ein Unterschied hinsichtlich der Schwimmgeschwindigkeit fand sich nicht (Abbildung 3.7D; Zweifaktorielle Varianzanalyse mit multiplen Vergleichen; $p > 0,05$).

Anhand dieser Daten wurden motorische- und visuelle Defizite der Versuchstiere ausgeschlossen und eine Teilnahme am *acquisition Training* gewährleistet.

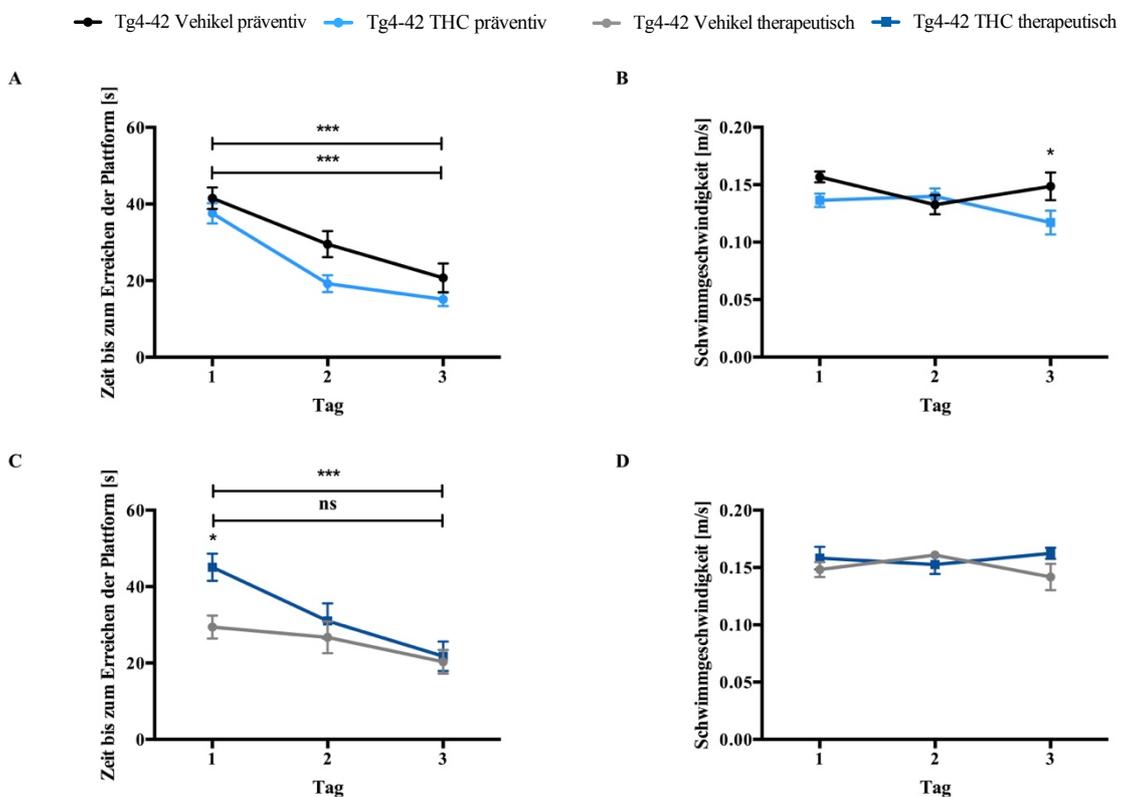


Abbildung 3.7: $\Delta 9$ -THC hat keinen Einfluss auf Motorik und Visuelle Fähigkeiten der Versuchstiere. In der präventiven Behandlungsgruppe zeigen beide Gruppen eine zunehmende Lernkurve entlang der einzelnen

Ergebnisse

Testtage (A). THC-behandelte Tiere zeigen an Tag drei eine reduzierte Schwimmgeschwindigkeit in der präventiven Behandlungsgruppe (B). In der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigt sich nur bei den THC-behandelten Tieren eine zunehmende Lernkurve entlang der Testtage (C). In der Schwimmgeschwindigkeit gibt es keine Unterschiede zwischen den Gruppen (D). Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur, ungepaarter Zweistichproben-t-Test. $n = 12 - 15$ pro Gruppe. ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Daten dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.

Auf das *cued training* folgte das fünftägige *acquisition training*, in welchem die Plattform nicht mehr verrückt wird. Die Mäuse werden aus verschiedenen Positionen in das Becken gesetzt und können sich anhand von am Beckenrand angebrachten Zeichen im Raum orientieren, wodurch das räumliche Lernen anhand der Zeit bis zum Erreichen der Plattform studiert wird. In der präventiven Behandlungsgruppe zeigten die Gruppen eine ansteigende Lernkurve entlang der Testtage (Abbildung 3.8A; Zweifaktorielle Varianzanalyse; *Tage*: $p < 0,001$). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und THC-behandelten Tieren in der Zeit bis zum Erreichen der Plattform (Abbildung 3.8A; Zweifaktorielle Varianzanalyse; *Behandlungssubstanz*: $p < 0,05$). Nur die THC-behandelten Tiere zeigten einen signifikanten Unterschied in der Zeit bis zum Erreichen der Plattform zwischen Tag eins und Tag fünf (Abbildung 3.8A; Zweifaktorielle Varianzanalyse mit multiplen Vergleichen; *THC*: $p < 0,001$; *Vehikel*: $p > 0,05$). An Tag vier und fünf zeigten THC-behandelte Tiere eine signifikant verkürzte Zeit bis zum Erreichen der Plattform (Abbildung 3.8A; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; *Tag vier*: $p < 0,05$; *Tag fünf*: $p < 0,01$). Hinsichtlich der Schwimmgeschwindigkeit zeigten THC-behandelte Tiere einen signifikanten Unterschied zwischen Tag eins und Tag fünf (Abbildung 3.8B; Zweifaktorielle Varianzanalyse mit multiplen Vergleichen; *THC*: $p < 0,001$; *Vehikel*: $p > 0,05$).

In der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigten die Gruppen eine ansteigende Lernkurve entlang der Testtage (Abbildung 3.8C; Zweifaktorielle Varianzanalyse; *Tage*: $p < 0,001$). Ein Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich der Zeit bis zum Erreichen der Plattform fand sich nicht (Abbildung 3.8C; Zweifaktorielle Varianzanalyse; *Behandlungssubstanz*: $p > 0,05$). Nur THC-behandelte Tiere zeigten einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Zeit bis zum Erreichen der Plattform zwischen Tag eins und Tag fünf (Abbildung 3.8C; Zweifaktorielle Varianzanalyse mit multiplen Vergleichen; *THC*: $p < 0,001$; *Vehikel*: $p > 0,05$). An Tag drei zeigten THC-behandelte Tiere eine signifikant verkürzte Zeitdauer bis zum Erreichen der Plattform (Abbildung 3.8C; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,01$). Sowohl unbehandelte-, als auch THC-behandelte Tiere zeigten einen signifikanten Unterschied in der Schwimmgeschwindigkeit zwischen Tag eins und Tag fünf (Abbildung 3.8D; Zweifaktorielle Varianzanalyse mit multiplen Vergleichen; $p < 0,05$).

Ergebnisse

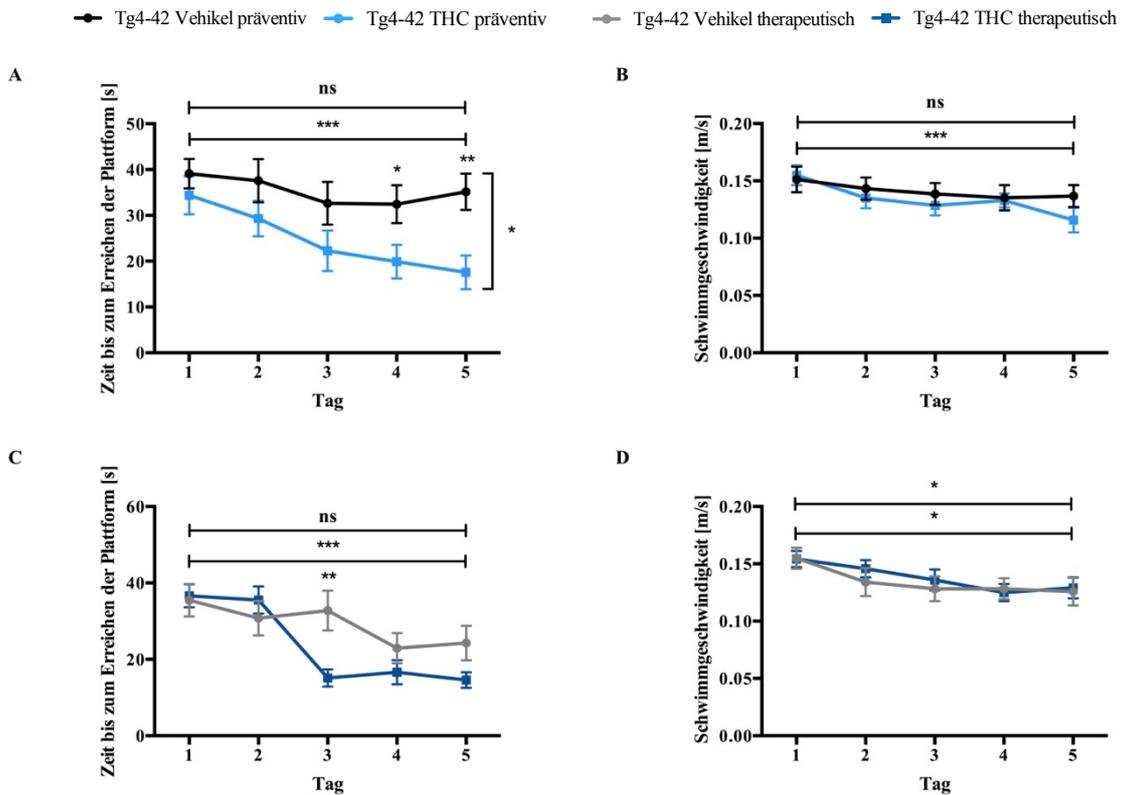


Abbildung 3.8: Δ^9 -THC verbessert das räumliche Lernen sowohl in der präventiven- als auch in der therapeutischen Behandlungsgruppe. In der präventiven Behandlungsgruppe zeigen THC-behandelte Mäuse eine ansteigende Lernkurve entlang der einzelnen Testtage (A). THC-behandelte Tiere der präventiven Behandlungsgruppe zeigen eine abfallende Schwimmgeschwindigkeit entlang der einzelnen Testtage (B). In der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigen THC-behandelte Mäuse im Vergleich zu unbehandelten Mäusen eine ansteigende Lernkurve und an Tag drei eine kürzere Zeitdauer bis zum Erreichen der Plattform (C). In der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigen beide Gruppen eine abfallende Schwimmgeschwindigkeit entlang der einzelnen Testtage (D). Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur, ungepaarter Zweistichproben-t-Test. $n = 12 - 15$ pro Gruppe. ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Daten dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.

Nach dem fünftägigen *acquisition training* folgte der *probe trial* bestehend aus einem Durchgang, in welchem die Plattform entfernt und das Schwimmverhalten über die Zeitdauer von einer Minute analysiert wurde. Hierbei wurde neben der Schwimmgeschwindigkeit die Zeitdauer in den jeweiligen Quadranten dargestellt und mithilfe jener Quadrantenverteilung als Auswertungsparameter nähergehend das räumliche Lernen untersucht.

In der präventiven Behandlungsgruppe zeigte sich bei den THC-behandelten Tieren eine deutliche Präferenz für den Zielquadranten (Abbildung 3.9A; gepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,001$), während unbehandelte Tiere eine Präferenz für die Nicht-Zielquadranten aufwiesen (Abbildung 3.9A; gepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,05$).

Ergebnisse

Die Schwimmgeschwindigkeit zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 3.9B; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$).

In der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigten THC-behandelte Tiere eine Präferenz für den Zielquadranten, während unbehandelte Tiere keine Präferenz in der dargestellten Quadrantenverteilung aufwiesen (Abbildung 3.9C; gepaarter Zweistichproben-t-Test; *THC*: $p < 0,01$; Vehikel: $p > 0,05$). Hinsichtlich der Schwimmgeschwindigkeit fanden sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 3.9D; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$).

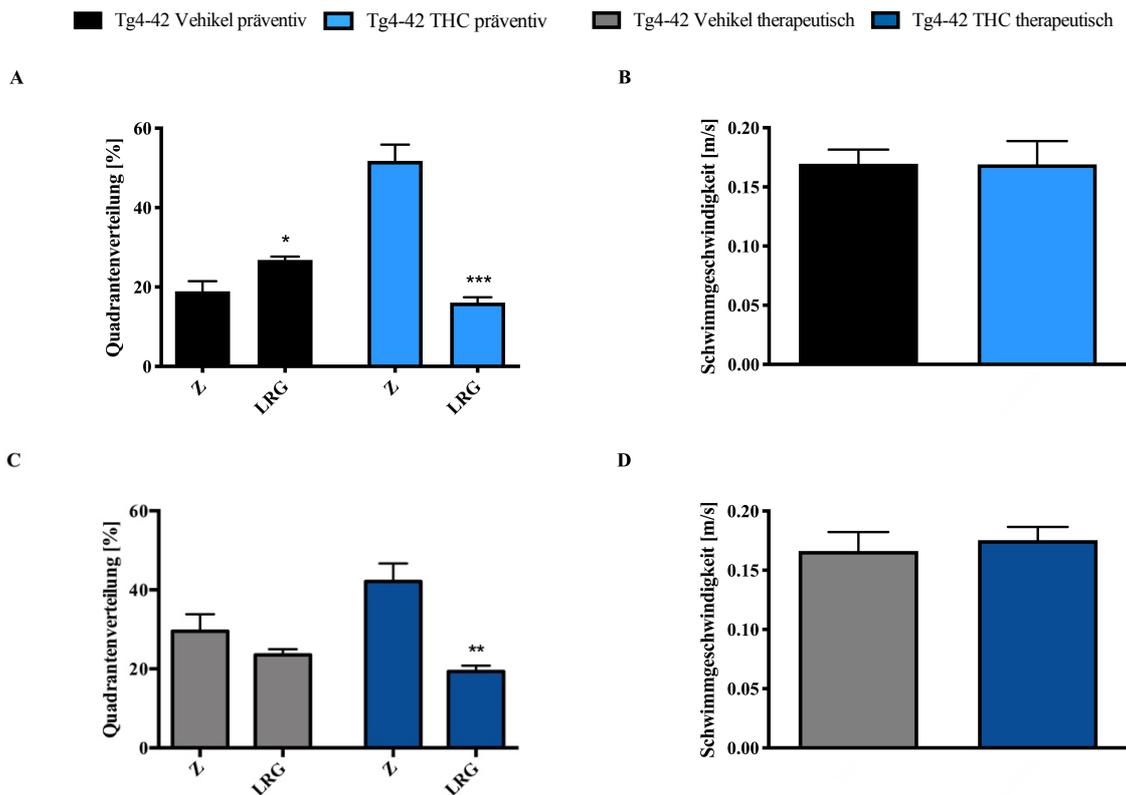


Abbildung 3.9: Tiere der Tg4-42-Mauslinie zeigen eine Verbesserung des räumlichen Lernens durch Langzeit-THC-Behandlung. Sowohl in der präventiven (A), als auch in der therapeutischen Behandlungsgruppe (C) zeigen die THC-behandelten Tiere eine deutliche Präferenz für den Zielquadranten. Unbehandelte Tiere zeigen keine Präferenz für den Zielquadranten. In der Schwimmgeschwindigkeit zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (B, D). Gepaarter- und ungepaarter Zweistichproben-t-Test. $n = 12 - 15$ pro Gruppe. Z = Zielquadrant; LRG = Mittelwert aus linkem, rechtem und gegenüberliegendem Quadranten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Daten dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.

3.3 Verminderter Nervenzellverlust infolge THC-Behandlung

Mittels Design-basierter Stereologie wurde die Neuronenanzahl in der CA1-Region des Hippocampus ermittelt (2.6.1) (West et al. 1991).

In der präventiven Behandlungsgruppe wurden gemäß Tabelle 2.13 für unbehandelte Tg4-42-Mäuse eine durchschnittliche Neuronenanzahl von 100 972- und für THC-behandelte Tg4-42-

Ergebnisse

Mäuse von 118 537 berechnet. Prozentual betrachtet zeigte sich bei THC-behandelten Mäusen der Tg4-42-Mauslinie im Vergleich zu unbehandelten Mäusen desselben Genotyps eine um 17 % erhöhte Neuronenanzahl in der CA1-Region des Hippocampus (Abbildung 3.10A; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,01$).

In der therapeutischen Behandlungsgruppe zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 3.10B; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$).

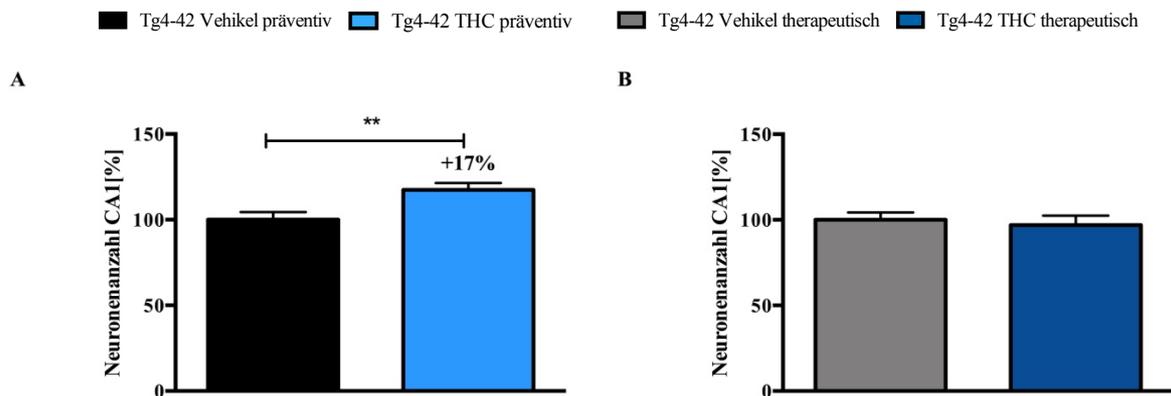


Abbildung 3.10: THC-behandelte Tiere der präventiven Behandlungsgruppe weisen im Vergleich zu unbehandelten Tieren eine erhöhte Neuronenanzahl in der CA1-Region des Hippocampus auf. In der präventiven Behandlungsgruppe zeigt sich in Relation zu unbehandelten Tg4-42-Mäusen eine um 17 % erhöhte Neuronenanzahl der THC-behandelten Mäuse (A). In der therapeutischen Behandlungsgruppe finden sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (B). Ungepaarter Zweistichproben-t-Test. $n = 9 - 11$ pro Gruppe. $**p < 0.01$. Daten dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.

3.4 Auswirkungen der THC-Behandlung auf immunhistologische Marker

Ausgewählte immunohistochemische Färbungen wurden zur Untersuchung von Neurogenese, Neuroinflammation und CB1-Rezeptostatus durchgeführt (2.5.1).

3.4.1 Unveränderte Neurogenese im Gyrus Dentatus

Mittels Free-Floating-3,3'-Diaminobenzidin-Immunfärbung wurde DCX als Marker für die adulte Neurogenese im Gyrus Dentatus angefärbt und die in Neurogenese befindlichen Neuronen unter Anwendung der Mäander-Technik ausgezählt (Knoth et al. 2010).

Sowohl in der präventiven-, als auch in der therapeutischen Behandlungsgruppe fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 3.11A/B; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$).

Ergebnisse

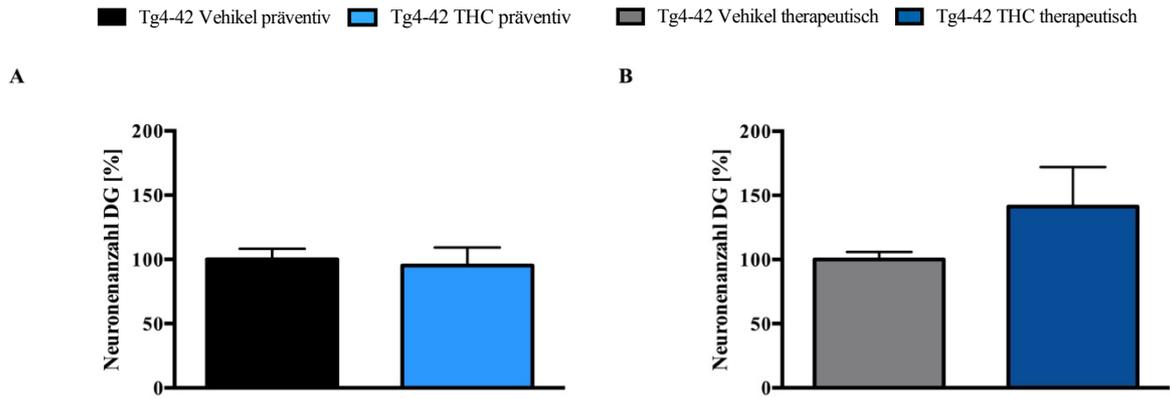
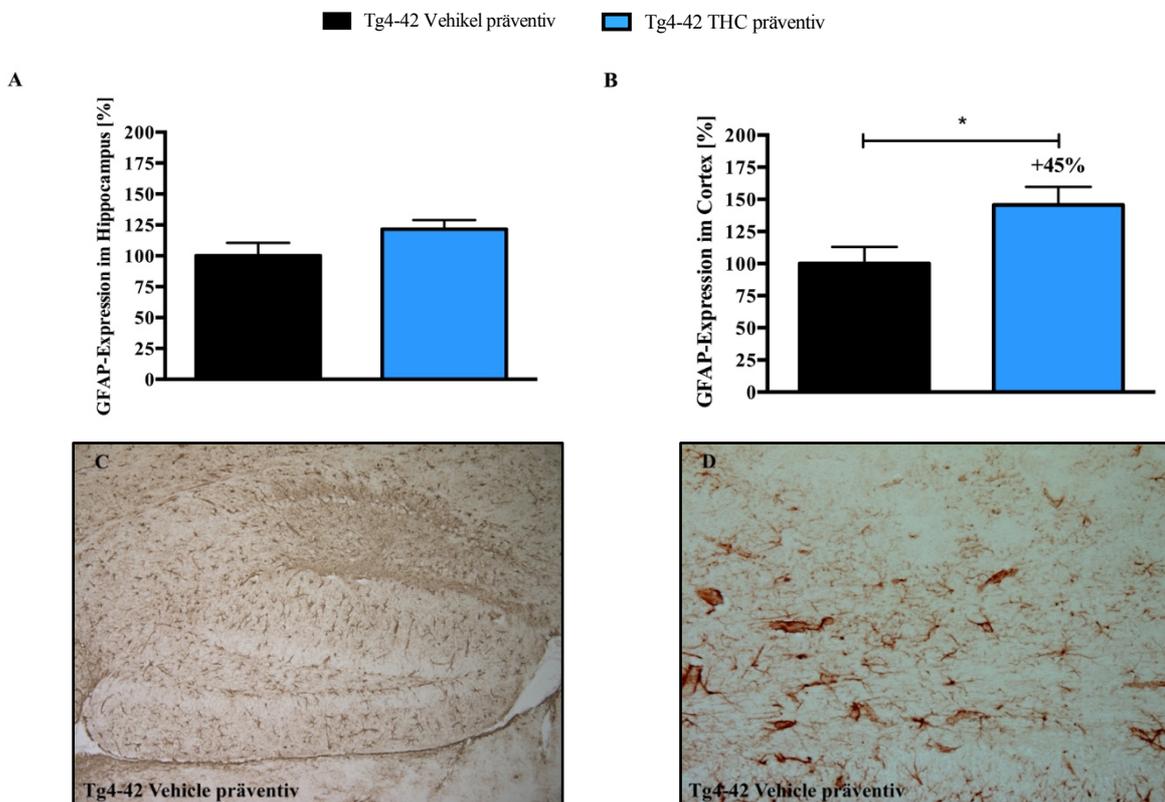


Abbildung 3.11: Fehlender Einfluss von Δ^9 -THC auf die Neurogenese im Gyrus Dentatus. Sowohl in der präventiven Behandlungsgruppe (A), als auch in der therapeutischen Behandlungsgruppe (B) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Zweistichproben-t-Test. $n = 9 - 14$ pro Gruppe. DG = Gyrus Dentatus. Daten dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.

3.4.2 Verstärkte Neuroinflammation im Cortex cerebri

Die Neuroinflammation hinsichtlich Mikrogliose und Astrogliose wurde in der präventiven Behandlungsgruppe und dabei ausschließlich an weiblichen Individuen getestet.

Die GFAP-Expression als Marker für Astrogliose zeigte im Hippocampus keinen Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 3.12A; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$). Im Cortex cerebri zeigte sich eine um 45 % erhöhte GFAP-Expression bei THC-behandelten Tieren (Abbildung 3.12B; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p < 0,05$).



Ergebnisse

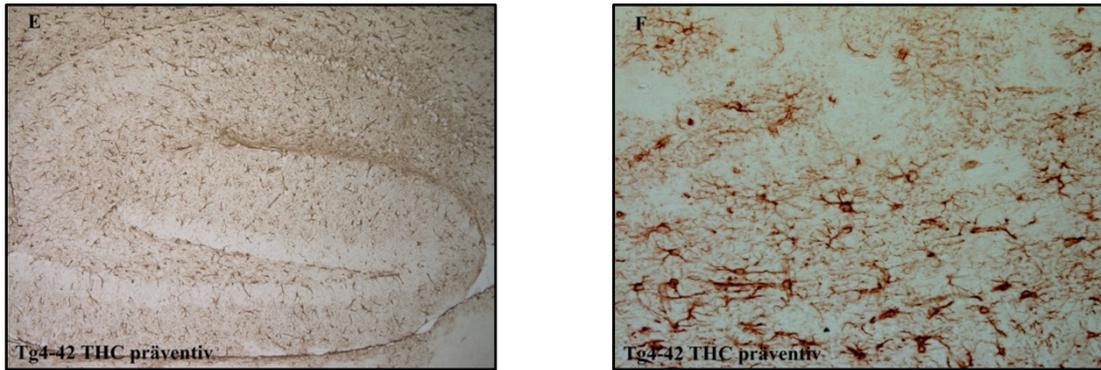
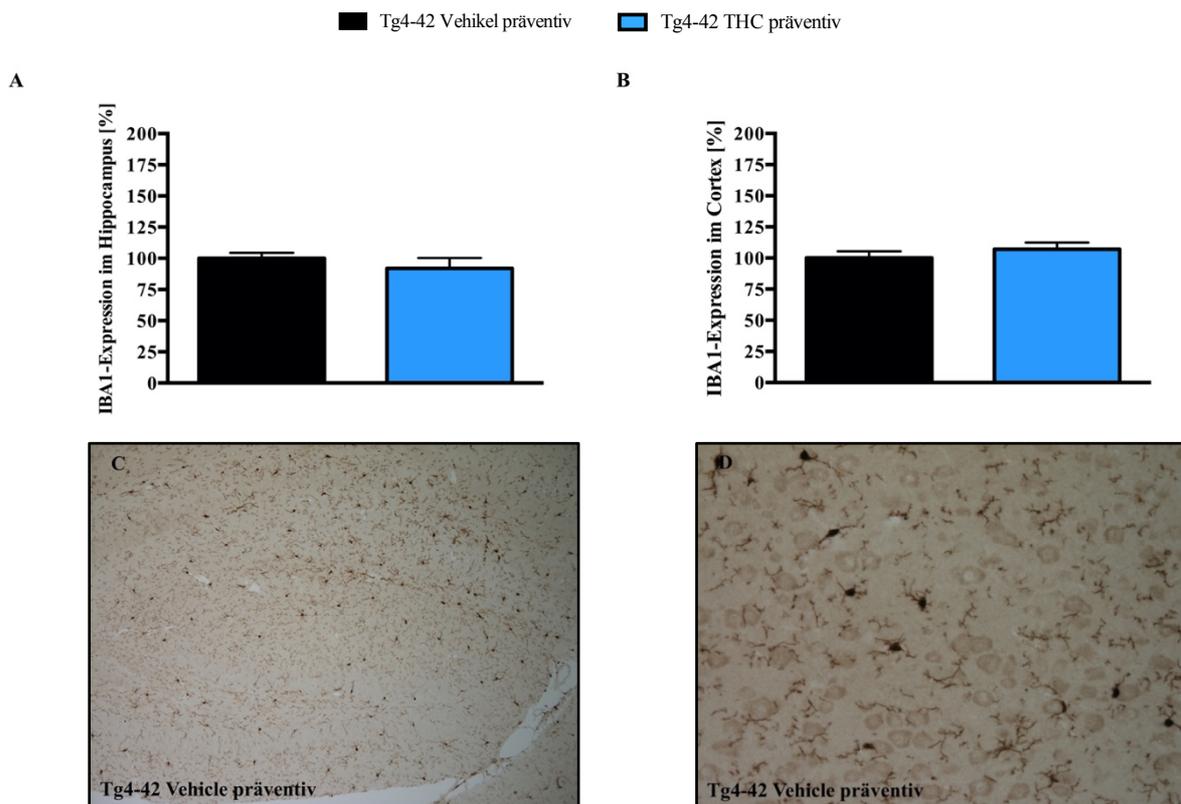


Abbildung 3.12: Verstärkte GFAP-Expression im Cortex cerebri infolge THC-Behandlung. Während im Hippocampus (A, C, E) kein Unterschied hinsichtlich der GFAP-Expression zwischen den Gruppen besteht, zeigt sich im Cortex cerebri (B, D, F) eine um 45 % erhöhte GFAP-Expression bei THC-behandelnten Tieren der präventiven Behandlungsgruppe i.S. einer verstärkten Astrogliose. Zweistichproben-t-Test. $n = 3$ pro Gruppe. $*p < 0.05$. Daten dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.

Die IBA1-Expression als Marker für Mikrogliose zeigt sowohl im Hippocampus als auch im Cortex cerebri keinen Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 3.13A/B; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; $p > 0,05$).



Ergebnisse

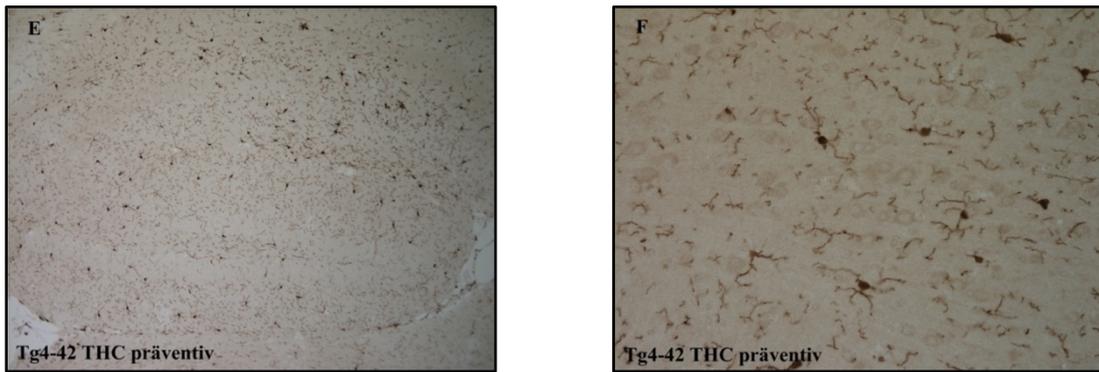
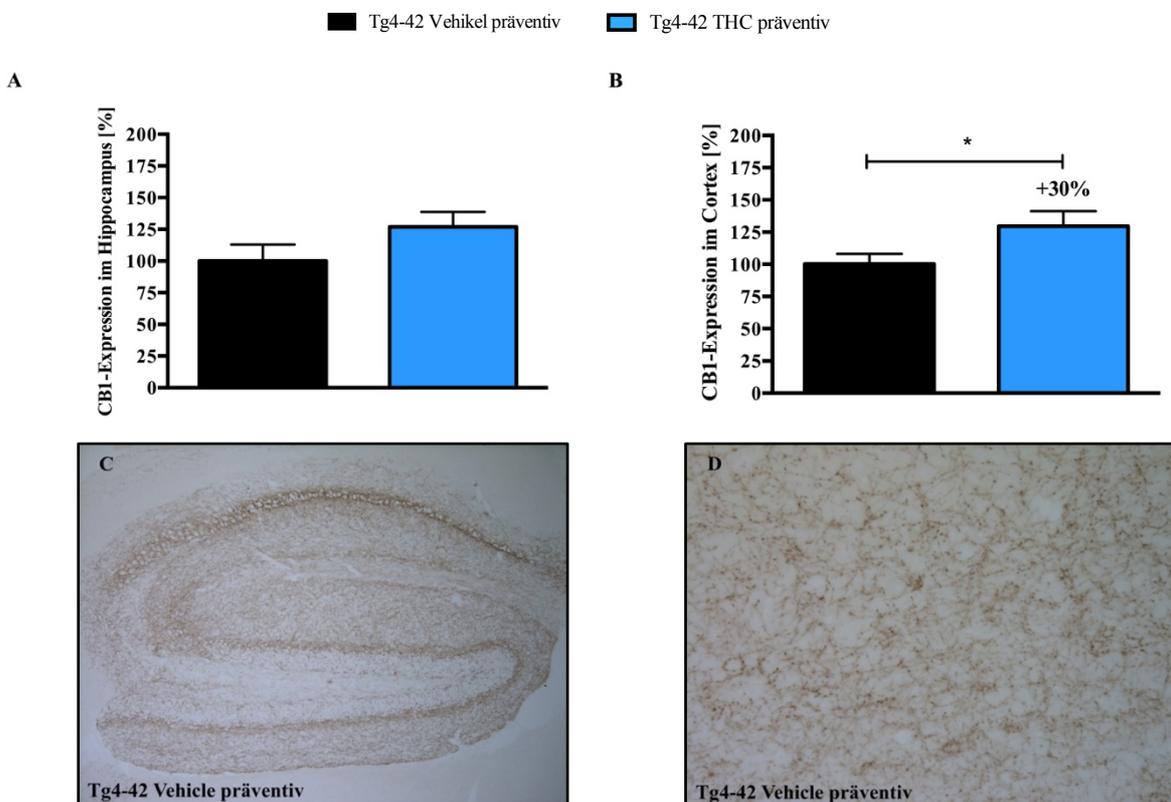


Abbildung 3.13: THC hat keinen Einfluss auf die IBA1-Expression in der Tg4-42-Mauslinie. Hinsichtlich der IBA1-Expression als Marker für Mikrogliose findet sich sowohl im Hippocampus (A, C, E), als auch im Cortex cerebri (B, D, F) kein Unterschied zwischen THC-behandelten und unbehandelten Tieren der präventiven Behandlungsgruppe. Zweistichproben-t-Test. $n = 3$ pro Gruppe. Daten dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.

3.4.3 Verstärkte CB1-Expression im Cortex cerebri

Die CB1-Expression wurde in der präventiven Behandlungsgruppe und dabei ausschließlich an weiblichen Individuen getestet.

Während sich hinsichtlich der CB1-Expression im Hippocampus keine Signifikanz zeigte, fand sich im Cortex cerebri eine um 30 % erhöhte CB1-Expression in der präventiven Behandlungsgruppe (Abbildung 3.14A/B; ungepaarter Zweistichproben-t-Test; *Hippocampus*: $p > 0,05$; *Cortex cerebri*: $p < 0,05$).



Ergebnisse

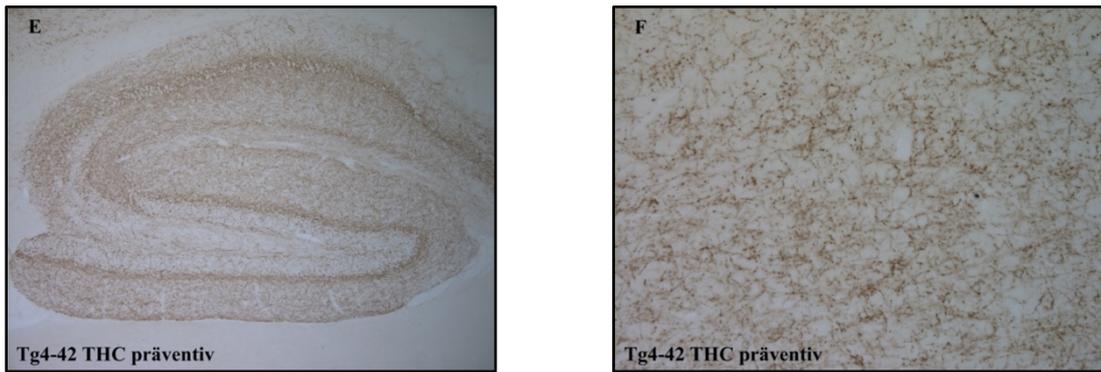


Abbildung 3.14: Erhöhte CB1-Expression im Cortex cerebri bei THC-behandelten Tieren. Während sich im Hippocampus (A, C, E) kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen findet, zeigt sich im Cortex cerebri (B, E, F) eine um 30 % erhöhte CB1-Expression. Zweistichproben-t-Test. $n = 3$ pro Gruppe. $*p < 0.05$. Daten dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.

4 Diskussion

4.1 Die Tg4-42-Mauslinie eignet sich zur Untersuchung einer THC-Behandlung

In der präklinischen Alzheimer-Forschung hat die Entwicklung von Tiermodellen als Forschungsgegenstand einen großen Stellenwert. Da bis heute kein Tiermodell die Alzheimer-Pathologie vollständig abbilden kann, ist die Zusammenschau unterschiedlicher Alzheimer-Modelle mit ihren spezifischen Merkmalen der Erkrankung weiterhin notwendig (Drummond und Wisniewski 2017; Elder et al. 2010). *Drosophila* und Zebrafische haben sich als Alzheimer-Modelle hinsichtlich der Genetik und Arzneimittelforschung etabliert, wobei ein kurzer Regenerationszyklus mit großer Reproduktionskapazität und niedrige Kosten zu den Vorteilen gehören. Aufgrund des speziebedingten Abstands zu menschlichen Pathomechanismen und einer unzureichenden Präsentation kognitiven Verhaltens, eignen sich jene Tiermodelle nur bedingt in der Alzheimer-Forschung. Die wohl am häufigsten verwendeten Alzheimer-Modelle sind transgene Mausmodelle (Bouleau und Tricoire 2015; Copenhaver et al. 2011; Drummond und Wisniewski 2017; McKoy et al. 2012; Newman et al. 2014). Eine Ausgangsbasis für die Entwicklung zahlreicher transgener Mausmodelle wurde durch die Entdeckung der Genmutationen in APP, PSEN1 und PSEN2 geschaffen. Jene Mutationen werden mit der FAD assoziiert und beeinflussen als Ausgangspunkt der Amyloid-Hypothese die Proteolyse des β APP (Goate et al. 1991; Hardy und Allsop 1991; Scheuner et al. 1996; Selkoe 2001). Die Mehrzahl der Alzheimer-Mausmodelle basiert auf einer oder mehr der oben genannten Genmutationen und repräsentiert damit die FAD, die mit einer Prävalenz von $< 1\%$ zu den selten vorkommenden Formen der Alzheimer-Erkrankung gehört (C Bouter und Y Bouter 2019; van Cauwenberghe et al. 2016). Häufig genutzte Alzheimer-Mausmodelle tragen die schwedische Mutation K670N/M671L, welche eine Überexpression von Beta-Amyloid bewirkt und in jenen Mauslinien eine früh einsetzende Bildung von Amyloid-Plaques zur Folge hat (Citron et al. 1992; Sasaguri et al. 2017). Zur Untersuchung des für die Alzheimer-Erkrankung charakteristischen Nervenzellverlustes in typischen Hirnregionen eignen sich jene Mauslinien jedoch nur bedingt. So zeigt sich in der Tg2576-Mauslinie gar kein Nervenzellverlust, während dieser in der 5XFAD-Mauslinie lediglich in untypischen Hirnregionen auftritt und in der APP23-Mauslinie zeitlich nicht mit dem Einsetzen der kognitiven Defizite assoziiert werden kann (Calhoun et al. 1998; Eimer und Vassar 2013; Irizarry et al. 1997; Jawhar et al. 2012; Oakley et al. 2006; van Dam et al. 2003).

Den FAD-assoziierten Mausmodellen kann die in dieser Arbeit als Versuchsobjekt dienende Tg4-42-Mauslinie als nicht APP-basiertes Mausmodell gegenübergestellt werden, welche keine bekannten Genmutationen beherbergt und ausschließlich menschliches A β ₄₋₄₂ exprimiert. A β ₄₋₄₂ ist neben anderen N-trunkierten Varianten des Beta-Amyloids für seine Toxizität und die Bildung stabiler Aggregate bekannt. In Mäusen der Tg4-42-Mauslinie kommt es infolge der Überexpression von A β ₄₋₄₂ zur Hippocampus-spezifischen intraneuronalen Akkumulation und einem signifikanten Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus, welcher von kognitiven und sensomotorischen Defiziten in etablierten Verhaltenstests begleitet wird. Folglich kann die Tg4-42-Mauslinie als Modell für die sporadische Alzheimer-Erkrankung betrachtet werden (Antonios et al. 2015; Bouter et al. 2013; Bouter et al. 2014; Sichler et al. 2019).

Die Tg4-42-Mauslinie bietet damit sowohl die Möglichkeit, gewisse Pathomechanismen der Alzheimer-Erkrankung näher zu verstehen, als auch mögliche Einflussfaktoren auf neuropathologische und klinische Merkmale der Erkrankung zu identifizieren. Dass sich diese Mauslinie zur Untersuchung möglicher präventiver Faktoren und Therapiekonzepte eignet, konnte beispielsweise in einer Studie von Hüttenrauch et al. (2016) gezeigt werden. Darin wurde ein positiver Einfluss einer vielseitigen Käfigausstattung mit u.a. Laufrädern, Nistmaterial und Spielzeugen auf Nervenzellverlust, Neurogenese und die kognitive Leistung von Tg4-42-Mäusen bewiesen (Hüttenrauch et al. 2016).

Entsprechend des Behandlungsbeginns einer möglichen Therapieform können in der Tg4-42-Mauslinie unterschiedliche Fragestellungen formuliert werden. Da in einem Alter von fünf Monaten der signifikante Nervenzellverlust von 43 % mit beginnenden kognitiven Defiziten in konventionellen Verhaltenstests einhergeht, lassen sich sowohl präventive, als auch therapeutische Therapieansätze in diesem Mausmodell untersuchen (Antonios et al. 2015). Dieser These folgend wurden in dieser Arbeit Mäuse der Tg4-42-Mauslinie für jeweils sechs Wochen mit Δ 9-THC behandelt, wobei der Therapiebeginn der präventiven Behandlungsgruppe bei drei Monaten (vor Einsetzen des Nervenzellverlustes) und der therapeutischen Behandlungsgruppe bei fünf Monaten (nach Einsetzen des Nervenzellverlustes) angesetzt wurde.

4.2 Δ 9-THC verbessert die kognitive Leistung in der Tg4-42-Mauslinie

Die charakteristische Alzheimer-Symptomatik äußert sich unter anderem in einer Einschränkung der geistigen Leistungsfähigkeit mit Beeinträchtigung des Lernvermögens, des

Gedächtnisses und der visuell-räumlichen Fähigkeiten (Corey-Bloom 2002; Quental et al. 2009).

Der MWM prüft als etablierter Verhaltenstest bei Nagetieren die kognitive Leistung mit Fokus auf das räumliche Lernen und gilt als Hippocampus-abhängig. Die Versuchstiere sind innerhalb des Wasserbeckens frei exponiert, weshalb sie im Rahmen des angeborenen Fluchtverhaltens aus dem im Versuchsaufbau befindlichen Wasser zu entkommen versuchen. Anhand von visuellen Reizen lernen gesunde Versuchstiere, sich im Raum zu orientieren und eine versteckte Plattform gezielt aufzusuchen. Folglich ist im *acquisition training* als Test für räumliches Lernen eine ansteigende Lernkurve und im *probe trial* als Test für das räumliche Gedächtnis eine Präferenz für den Zielquadranten zu erwarten. (Brandeis et al. 1989; Logue et al. 1997; Morris 1984; Vorhees und Williams 2006).

In dem getesteten Alter von sechseinhalb Monaten präsentieren naive Tg4-42-Mäuse bereits ausgeprägte Defizite im *acquisition training* und *probe trial* des MWM, wodurch der Einfluss einer Behandlung mit $\Delta 9$ -THC auf die Kognition im Alzheimer-Modell optimal untersucht werden kann.

THC-behandelte Tg4-42-Mäuse der präventiven Behandlungsgruppe zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere kognitive Leistung. So konnte im *acquisition training* ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungssubstanzen identifiziert werden. THC-behandelte Tiere zeigten im Gegensatz zu Kontrolltieren eine ansteigende Lernkurve. Dieser Effekt konnte auch im *probe trial* beobachtet werden, worin THC-behandelte Tiere eine starke Präferenz für den Zielquadranten hatten. Tiere der Kontrollgruppe zeigten hingegen keine Präferenz für den Zielquadranten, was im Rahmen des Nervenzellverlustes auf Defizite der visuell-räumlichen Fähigkeiten zurückzuführen ist.

In der therapeutischen Behandlungsgruppe stellten sich ähnliche Ergebnisse dar, wenngleich die Effekte nicht so ausgeprägt zu beobachten waren. Interessanterweise zeigte sich auch hier ausschließlich bei THC-behandelten Tieren eine ansteigende Lernkurve entlang der Testtage im *acquisition training*, wobei ein signifikanter Behandlungseffekt jedoch ausblieb. Auch im *probe trial* schnitten THC-behandelte Tg4-42-Mäuse besser ab, da sie im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Präferenz für den Zielquadranten aufwiesen. Den Ergebnissen folgend, präsentierten sich THC-behandelte Tg4-42-Mäuse mit einer höheren Gedächtnisleistung, wobei aufgrund des ausbleibenden Behandlungseffekts im *acquisition training* ein Unterschied zur präventiven Behandlungsgruppe dennoch festgestellt werden muss.

Diskussion

Sowohl in der präventiven-, als auch in der therapeutischen Behandlungsgruppe diente die Schwimmgeschwindigkeit als Kontrolle, um systematische Fehler zu minimieren. Entsprechend der Tatsache, dass sich an den entsprechenden Testtagen in *acquisition training* und *probe trial* in beiden Behandlungsansätzen kein Unterschied zwischen den Gruppen zeigte, kann ein Einfluss der Schwimmgeschwindigkeit auf die Testergebnisse ausgeschlossen werden.

Mittels NOR wurde das Explorationsverhalten und darüber hinaus das Wiedererkennungsgedächtnis getestet. Dieser Verhaltensversuch beruht auf der Beobachtung, dass Säugetiere auf neue Objekte mit einer angeborenen Neugier und verstärkter Exploration reagieren, was im Rahmen des Versuchsaufbaus anhand der Zeit am Objekt gemessen wird. Ein physiologisches Verhalten der Versuchstiere setzt voraus, dass diese sich an die vorherige Testphase mitsamt den Objekten erinnern können. (Antunes und Biala 2012; Ennaceur und Delacour 1988; Reger et al. 2009).

Interessanterweise konnte in der präventiven Behandlungsgruppe kein Unterschied zwischen THC-behandelten- und unbehandelten Tg4-42-Mäusen beobachtet werden. So verbrachten THC-behandelte Tiere zu gleichen Teilen Zeit mit dem neuen und dem bekannten Objekt.

Die therapeutische Behandlungsgruppe profitierte hingegen von der Behandlung mit Δ^9 -THC, sodass sich im Gegensatz zu unbehandelten Tieren eine signifikante Präferenz für das neue Objekt zeigte.

Die divergierenden Ergebnisse im MWM und NOR können auf die in dem jeweiligen Test beteiligten Hirnregionen zurückgeführt werden. So wurde in einer Studie von Logue et al. (1997) belegt, dass isolierte Hippocampus-Läsionen in der C57BL/6-Mauslinie Defizite im MWM verursachen, sodass dieser Test als Hippocampus-spezifisch gilt. An der im NOR getesteten visuellen Objekterkennung scheinen dagegen insbesondere die parahippocampalen Hirnregionen beteiligt zu sein (Antunes und Biala 2012; Murray et al. 2000; Nemanic et al. 2004; Prusky et al. 2004; Winters et al. 2008).

Die kognitiven Defizite der Tg4-42-Mauslinie im MWM werden insbesondere auf den signifikanten Nervenzellverlust in der CA1 Region des Hippocampus zurückgeführt (Antonios et al. 2015). Unter Beachtung der höheren kognitiven Leistung THC-behandelter Tiere im *acquisition training* und *probe trial* des MWM, ist von einem Einfluss auf den hippocampalen Nervenzellverlust auszugehen. Der Umstand, dass in der präventiven Behandlungsgruppe zu Beginn der Behandlung noch kein signifikanter Nervenzellverlust eingetreten ist, lässt den im Gegensatz zur therapeutischen Behandlungsgruppe vorhandenen Behandlungseffekt erklären.

Diskussion

In Zusammenschau der Ergebnisse der kognitiven Testung wirkt sich eine Langzeitbehandlung mit $\Delta 9$ -THC positiv auf die Gedächtnisleistung der Tg4-42-Mauslinie aus.

Damit einhergehend konnte in einer Studie von Bilkei-Gorzo et al. (2017) ein positiver Einfluss einer Langzeitbehandlung mit niedrigdosiertem $\Delta 9$ -THC (mit Wash-out-Periode), auf altersbedingte kognitive Defizite in Wildtyp-Mäusen beschrieben werden. Deren Ergebnissen folgend, profitieren mittelalte und alte Wildtyp-Tiere hinsichtlich der kognitiven Leistung von einer Langzeitbehandlung mit $\Delta 9$ -THC, während behandelte Jungtiere eine kognitive Beeinträchtigung zeigen (Bilkei-Gorzo et al. 2017). Somit scheint der Einfluss von $\Delta 9$ -THC auf die Gedächtnisleistung gesunder Individuen vom Entwicklungsstadium abhängig zu sein. Während die kognitive Leistung von Jungtieren durch eine Langzeitbehandlung mit $\Delta 9$ -THC (mit Wash-out-Periode) negativ beeinflusst wird, zeigen ausgewachsene Tiere keine Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Cha et al. 2006; Rubino et al. 2009). Eine akute THC-Behandlung ohne Wash-out-Periode führt hingegen bei gesunden Individuen sowohl in Jungtieren, als auch in ausgewachsenen Tieren zu einer kognitiven Beeinträchtigung (Cha et al. 2006; Han et al. 2012; Varvel et al. 2005). Jener inhibitorischer Effekt auf die Kognition steht dabei in der Diskussion, dosisabhängig zu sein. Während sehr niedrige Dosen von 1mg/kg $\Delta 9$ -THC und weniger keinen Einfluss auf die Gedächtnisleistung haben, können bereits niedrige Dosen ab 2,5mg/kg $\Delta 9$ -THC kognitive Defizite in gesunden Tieren hervorrufen (Calabrese und Rubio-Casillas 2018; Cha et al. 2006; Puighermanal et al. 2009). Dabei ist eine Verfälschung der kognitiven Testung aufgrund ausgeprägter motorischer Störungen insofern unwahrscheinlich, als dass diese in relevantem Ausmaß erst bei hohen Dosen von 100mg/kg $\Delta 9$ -THC zu erwarten sind (Marshall et al. 2014). Damit einhergehend zeigte die in dieser Arbeit verwendete mittelhohe Dosis von 20mg/kg $\Delta 9$ -THC keinen Einfluss auf Motorik im Rotarod-Test.

In der Tg4-42-Mauslinie lässt sich unter dem in dieser Arbeit verwendeten Therapieschema sowohl für die präventive Behandlungsgruppe (mit Wash-out-Periode), als auch für die therapeutische Behandlungsgruppe (ohne Wash-out-Periode) ein positiver Effekt auf die kognitive Leistung erkennen. Diese Ergebnisse werden durch eine Studie von Aso et al. (2015) gestützt, in welcher Tiere der A β PP/PS1-Mauslinie für fünf Wochen mit einer sehr niedrigen Dosis $\Delta 9$ -THC behandelt wurden. Nach einer Wash-out-Periode von zehn Tagen konnte in THC-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere Gedächtnisleistung beobachtet werden (Aso et al. 2015).

Eine Verabreichung von $\Delta 9$ -THC erscheint folglich insofern diffizil, als dass sie in erkrankten- und gesunden Individuen eine unterschiedliche Wirkung auf die Gedächtnisleistung hat. Dies führt zu der Hypothese, dass $\Delta 9$ -THC einen klinisch relevanten Einfluss auf die Alzheimer-Pathologie hat. Aufgrund der aktuell unzureichenden Datenlage ist eine Aussage über die Wirkung von $\Delta 9$ -THC auf die kognitive Leistung von Alzheimer-Patienten nicht möglich. Hinsichtlich einer langzeitigen THC-Behandlung in gesunden Individuen gibt es gewisse Parallelen zum Mausmodell. So ruft ein chronischer Konsum in Jugendlichen Defizite im räumlichen Gedächtnis hervor, welcher in jungen Erwachsenen ausbleibt (Becker et al. 2014; Broyd et al. 2016; Grant et al. 2012; Harvey et al. 2007). Somit kann in Gesunden ebenfalls eine vom Entwicklungsstadium abhängige THC-Wirkung auf die Kognition vermutet werden.

4.3 Reduktion des Hippocampus-spezifischen Nervenzellverlustes durch THC-Behandlung

Nervenzellverlust gilt als neuropathologisches Merkmal der Alzheimer-Erkrankung und wird aufgrund der Substanzabnahme zu den „negativen“ mikroskopischen Veränderungen gezählt (Serrano-Pozo et al. 2011). Da die Abnahme der Neuronenanzahl auch altersbedingt auftreten kann, ist diese nicht pathognomonisch für die Alzheimer-Erkrankung. Wesentliches Unterscheidungsmerkmal zwischen altersbedingtem- und Alzheimer-bedingtem Nervenzellverlust sind die beteiligten Hirnregionen, wobei bei Alzheimer-Patienten die CA1 Region des Hippocampus und Teile der Area entorhinalis betroffen sind (Gomez-Isla et al. 1996; West et al. 1994). Dabei ist der Nervenzellverlust der CA1 Region des Hippocampus von besonderem Interesse, da eine krankheitsspezifische Korrelation zwischen Neuronenanzahl und Schwere der klinischen Symptomatik besteht (Bobinski et al. 1998).

Charakteristikum der Tg4-42-Mauslinie ist ein CA1-spezifischer Nervenzellverlust, welcher in dem getesteten Alter von sechseinhalb Monaten mindestens 50 % beträgt (Antonios et al. 2015; Bouter et al. 2013). Im Rahmen dieser Arbeit diente die Design-basierte Stereologie als Kontrolle für die in der kognitiven Testung erhobenen Ergebnisse. So wurde die Neuronenanzahl in der CA1 Region des Hippocampus unter Anwendung der Stereologie-Prinzipien bestimmt (Schmitz und Hof 2005; West et al. 1991).

Interessanterweise zeigte sich in der präventiven Behandlungsgruppe, dass die mit $\Delta 9$ -THC behandelten Tg4-42-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe 17 % mehr Nervenzellen in der CA1 Region des Hippocampus besitzen. Wie bereits von Bobinski et al. (1998) publiziert, korreliert die Neuronenanzahl mit der Schwere der klinischen Symptomatik. Damit

einhergehend lässt sich in dieser Arbeit eine positive Korrelation der ermittelten Neuronenanzahl der hippocampalen CA1 Region mit der kognitiven Leistung im MWM feststellen. Dieses Ergebnis könnte prinzipiell durch verstärkte Neurogenese und/ oder einen reduzierten Nervenzellverlust erklärt werden. Hinsichtlich der DCX-Expression stellte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen dar, sodass eine Stimulation der Neurogenese durch Δ 9-THC in mittelhoher Dosis als unwahrscheinlich anzusehen ist. Da DCX erst in späteren Stadien exprimiert wird, kann die adulte Neurogenese hierbei jedoch nur eingeschränkt beurteilt werden (Kempermann et al. 2004; Knoth et al. 2010). In einer Studie von Suliman et al. (2018) wurde der Einfluss einer Langzeitbehandlung mit Δ 9-THC in einer Dosis von 0,75-, 1,5- und 3mg/kg auf verschiedene Marker der adulten Neurogenese untersucht. Dabei wurde nachgewiesen, dass THC-behandelte Tiere in diesem Dosisbereich eine verstärkte Neurogenese im Hippocampus aufwiesen, wobei die mit einer Dosis von 1,5mg/kg behandelten Tiere die ausgeprägtesten Werte zeigten (Suliman et al. 2018). In Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich eine Dosisabhängigkeit der THC-Behandlung auf die Neurogenese vermuten. Demzufolge scheint die adulte Neurogenese nur in einem schmalen Niedrigdosisbereich durch Δ 9-THC induziert zu werden, was den ausbleibenden Effekt der in dieser Arbeit verwendeten mittelhohen Dosis von 20mg/kg erklären würde. Damit einhergehend berichten Wolf et al. (2010), dass eine orale Langzeitbehandlung mit Δ 9-THC keinen Einfluss auf die adulte Neurogenese hat. Entsprechend wahrscheinlicher ist daher eine Reduktion des Nervenzellverlustes in der Tg4-42-Mauslinie durch Langzeitbehandlung mit Δ 9-THC.

Jenes Phytocannabinoid besitzt die Bereitschaft, Elektronen abzugeben und damit als Antioxidans zu agieren (Hampson et al. 1998). *In vivo* reduziert Δ 9-THC Nervenzellschäden und schützt damit Neuronen vor Exzitotoxizität, wodurch der Substanz eine bedingt neuroprotektive Wirkung zugeschrieben wird (van der Stelt et al. 2001). Eine weitere *In-vivo-Studie* an Mäusen konnte zeigen, dass eine Einmaldosis niedrig dosierten Δ 9-THC's die synaptische Plastizität beeinflusst und die Endocannabinoid-vermittelte Langzeitdepression im Nucleus accumbens und Hippocampus vorübergehend aufhebt (Mato et al. 2004). Mato et al. (2004) konnten dabei feststellen, dass ein vor der Δ 9-THC-Gabe applizierter CB1-Rezeptorantagonist dessen Wirkung auf die synaptische Plastizität unterbindet, wodurch dem CB1-Rezeptor eine zentrale Rolle in der THC-vermittelten Signaltransduktion zugeschrieben wird. Dahingehend wurde die Expression jenes Rezeptors in der präventiven Behandlungsgruppe untersucht, wobei sich eine Hochregulation des CB1-Rezeptors im Cortex cerebri darstellte. Ein ähnliches Expressionsverhalten konnte in einer Studie von D'Souza et al.

(2016) nachgewiesen werden, wobei sich bereits zwei Tage nach Beendigung der THC-Behandlung eine Hochregulation der Rezeptordichte darstellte.

Die Ergebnisse hinsichtlich der neuroprotektiven Wirkung von $\Delta 9$ -THC auf das Nervensystem sind allerdings umstritten. So belegen neurohistologische Untersuchungen eine Reduktion der Neuronendichte und des Neuronenvolumens im Hippocampus infolge einer Langzeitbehandlung mit mittelhohen THC-Dosen (Landfield et al. 1988; Scallet et al. 1987). Es wird daher eine Neurotoxizität von $\Delta 9$ -THC in Abhängigkeit von Dosis und Expositionsdauer vermutet (Scallet 1991).

In Bezug auf die Alzheimer-Pathologie gibt es hingegen Hinweise darauf, dass diese durch THC-Exposition günstig beeinflusst wird. So wird Neprilysin als für den Abbau von Beta-Amyloid zuständige Endopeptidase infolge einer THC-Behandlung verstärkt exprimiert (Chen et al. 2013). *In vitro* senkt $\Delta 9$ -THC dosisabhängig die Konzentration an Beta-Amyloid, wobei insbesondere der Abbau intraneuronalen Beta-Amyloids beschrieben wurde (Cao et al. 2014; Currais et al. 2016). Damit einhergehend wurde *in vivo* eine Reduktion von Amyloid-Plaques und degenerierter Neuronen infolge einer Langzeitbehandlung mit niedrig dosiertem $\Delta 9$ -THC beschrieben (Chen et al. 2013).

Es lässt sich vermuten, dass $\Delta 9$ -THC auch *in vivo* den Abbau von intraneuralem Beta-Amyloid stimuliert. Da intraneurales Beta-Amyloid nachgewiesenermaßen ein frühes Ereignis der Erkrankung und mutmaßlich ursächlich für begleitende kognitive Defizite ist, erscheint eine krankheitsverzögernde Wirkung in der Tg4-42-Mauslinie durch dessen Reduktion plausibel (Bayer und Wirths 2010; Billings et al. 2005; Currais et al. 2016; Wirths et al. 2001).

Diese These wird durch die Tatsache gestützt, dass $\Delta 9$ -THC in der therapeutischen Behandlungsgruppe keinen Einfluss auf den Nervenzellverlust hatte. Die Unterschiede zwischen der präventiven- und therapeutischen Behandlungsgruppe liegen mit hoher Wahrscheinlichkeit in dem Zeitpunkt des Therapiebeginns begründet. So findet sich zu Beginn der Behandlung in der präventiven Behandlungsgruppe noch kein signifikanter Nervenzellverlust, während Tiere der therapeutischen Behandlungsgruppe bereits einen Nervenzellverlust von 43 % aufweisen (Antonios et al. 2015). Da $\Delta 9$ -THC in dem verwendeten Dosisbereich keinen Einfluss auf die Neurogenese hat, scheint das Stadium des Nervenzellverlustes für die Wirksamkeit einer THC-Behandlung auf zellulärer Ebene von Bedeutung zu sein. Wenn davon ausgegangen wird, dass $\Delta 9$ -THC über einen Abbau von intraneuralem Beta-Amyloid den Hippocampus-spezifischen Nervenzellverlust der Tg4-42-

Mauslinie reduziert, ist ein Therapiebeginn vor Einsetzen des signifikanten Nervenzellverlustes notwendig, um dessen Progression zu bremsen (Antonios et al. 2015; Bouter et al. 2013; Currais et al. 2016).

4.4 Verstärkte Astrozytenantwort infolge der Langzeitbehandlung mit $\Delta 9$ -THC

Die Neuroinflammation zählt zu den charakteristischen neuropathologischen Merkmalen der Alzheimer-Erkrankung und kann aufgrund einer Zellzahlzunahme im Rahmen der Gliose zu den „positiven“ mikroskopischen Veränderungen gezählt werden (Serrano-Pozo et al. 2011; Shadfar et al. 2015). Diese Entzündungsreaktion besteht aus einem komplexen Zusammenspiel von Gliazellen, Immunmediatoren und Immunmodulatoren (Heneka et al. 2015). In dieser Arbeit wurde sich auf die zelluläre Komponente der Neuroinflammation, im Speziellen auf die GFAP- und IBA1-Expression als Zelltypmarker für Astrozyten und Mikroglia konzentriert.

Tiermodelle für Neuroinflammation und Neurodegeneration konnten bereits eine antiinflammatorische und den Krankheitsprozess verlangsamende Wirkung von exogenen Cannabinoiden beschreiben (Ni et al. 2004; Pryce et al. 2003). Tiere der Tg4-42-Mauslinie entwickeln eine reaktive Astro- und Mikrogliose in vom Nervenzellverlust betroffenen Hirnregionen, weshalb der Einfluss einer Langzeitbehandlung von $\Delta 9$ -THC auf die zelluläre Entzündungsaktivität untersucht wurde (Bouter et al. 2018; Bouter et al. 2013).

Astrozyten exprimieren nachgewiesenermaßen den CB1-Rezeptor, welcher durch $\Delta 9$ -THC als partieller CB1- und CB2-Rezeptor-Agonist adressiert wird (Rodriguez et al. 2001; Salio et al. 2002; Shen und Thayer 1999). Interessanterweise zeigte sich in der präventiven Behandlungsgruppe eine um 45 % gesteigerte kortikale GFAP-Expression in THC-behandelten Tieren, was für eine verstärkte Astrozytenantwort im Cortex spricht. Einhergehend mit diesen Ergebnissen, wurde in einer Studie von Landfield et al. (1988) eine verstärkte Astrozyten-Reaktivität infolge einer Langzeitbehandlung mit $\Delta 9$ -THC nachgewiesen. Dieser Effekt scheint allerdings geschlechtsabhängig zu sein. So konnten Suarez et al. (1999) zeigen, dass männliche Individuen mit einer reduzierten-, und weibliche Individuen mit einer verstärkten Astrozytenantwort auf eine THC-Behandlung reagieren. Da in dieser Arbeit ausschließlich weibliche Individuen zur Untersuchung der Neuroinflammation verwendet wurden, fügen sich die erhobenen Daten gut in die beschriebene Studienlage ein (Suarez et al. 2000).

Diskussion

Allerdings wirft die kortikal verstärkte Astrozytenantwort infolge der THC-Behandlung insofern Fragen auf, als dass ein Fortschreiten der Alzheimer-Pathologie mit der Zunahme reaktiver Astrozyten einhergeht und die bisher diskutierten Ergebnisse in der kognitiven Testung und Stereologie eher für eine Verlangsamung der Krankheitsprogredienz sprechen (Pike et al. 1995). Für die Beurteilung der reaktiven Astroglieose ist dabei ausschlaggebend, dass sich diese in der Tg4-42-Mauslinie vornehmlich im Hippocampus entwickelt (Bouter et al. 2013). In jener Hirnregion zeigte sich kein Einfluss von $\Delta 9$ -THC auf die Astrozytenreaktion, was gegen eine Verstärkung der reaktiven Astroglieose in Tg4-42-Mäusen spricht.

Funktionell sind Astrozyten entscheidend an der Endocannabinoid-vermittelten Signaltransduktion beteiligt. Endocannabinoide werden an der Postsynapse aus Vorläuferproteinen synthetisiert und infolge einer Aktivierung durch hochaktive Neurone freigesetzt (Brown et al. 2003; Di Marzo et al. 1994; Piomelli 2003). Es resultiert zum einen eine Langzeit-Depression an der Präsynapse, was eine Herunterregulierung der synaptischen Übertragung hochaktiver Neurone bedeutet (Chevaleyre et al. 2006; Linden 1994). Zum anderen wird die Aktivität schwacher Neurone infolge einer Glutamat-Freisetzung aus Astrozyten verstärkt (Navarrete und Araque 2008). Jene Interaktion zwischen Synapsen und Astrozyten gewährleistet eine ausgeglichene Neuronenaktivität insbesondere in der CA1-Region des Hippocampus (Castillo et al. 2012; Navarrete et al. 2014).

In einer Studie von Han et al. (2012) wurde hingegen nachgewiesen, dass $\Delta 9$ -THC infolge der Astrozytenaktivierung *in vivo* eine Langzeit-Depression in der CA1-Region des Hippocampus auslöst. Die Autoren bringen jene Astrozyten-vermittelte Langzeit-Depression mit den THC-induzierten kognitiven Defizite in gesunden Individuen in Verbindung (Han et al. 2012). Es scheint somit unwahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit beobachtete kortikale Astrozytenreaktion an der verbesserten kognitiven Leistung THC-behandelter Tg4-42-Mäuse beteiligt ist.

Im Gegensatz zu Astrozyten, exprimieren Mikroglia vornehmlich den CB2-Rezeptor (Nunez et al. 2004). Da dieser ebenfalls durch $\Delta 9$ -THC aktiviert wird und aufgrund ihrer funktionellen Bedeutung bei der Neuroinflammation, wurde die IBA1-Expression als Zelltypmarker für Mikroglia untersucht (Ji et al. 2013; Kettenmann et al. 2011; Shen und Thayer 1999). Interessanterweise blieb bei Tieren der Tg4-42-Mauslinie die IBA1-Expression sowohl im Hippocampus als auch im Cortex infolge der Langzeitbehandlung mit $\Delta 9$ -THC unbeeinträchtigt.

Zusammenfassend zeigt $\Delta 9$ -THC in der Tg4-42-Mauslinie auf zellulärer Ebene keine antiinflammatorische Wirkung. Da der Einfluss auf Immunmediatoren und Immunmodulatoren in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, können mögliche Auswirkungen auf die Neuroinflammation nur bedingt beurteilt und eine generelle antiinflammatorische Wirkung von $\Delta 9$ -THC in jenem Mausmodell nicht ausgeschlossen werden. Dazu bedarf es weiterer Untersuchungen.

4.5 Angleichung an das Angstverhalten von Wildtyp-Tieren infolge THC-Behandlung

Neuropsychiatrische Symptome manifestieren sich typischerweise in einem frühen Erkrankungsstadium und stellen ein zentrales Element der Alzheimer-Erkrankung dar (Lyketsos et al. 2011). In einer Studie von Aalten et al. (2007) wurden jene Symptome zu folgenden Subsyndromen in absteigender Häufigkeit zusammengefasst: Teilnahmslosigkeit, Hyperaktivität, Gemütskrankheit und Psychose. Angst stellt ein häufiges Symptom dar und wird zusammen mit der Depression zu dem Subsyndrom der Gemütskrankheit gezählt (Aalten et al. 2007). Im Allgemeinen kann Angst als Gemütszustand definiert werden, welcher unter entsprechenden Bedingungen durch Aktivierung neuronal emotionaler Schaltkreise hervorgerufen wird (Duval et al. 2015). Interessanterweise geht das Angstverhalten bei Alzheimer-Patienten mit abnormalen Neurodegenerationsmarkern in der Liquorchemie einher, was eine Verknüpfung mit der Alzheimer-Pathologie wahrscheinlich macht (Ramakers et al. 2013).

Im Mausmodell lässt sich Angstverhalten mittels etablierter Versuchsaufbauten objektivieren, wobei die Versuchstiere in unterschiedlicher Weise in Konfliktsituationen versetzt werden. So wird das physiologische Verhalten des Versuchstieres in einer neuen Umgebung durch die Angst vor Höhe, offenen- oder hell exponierten Räumen gestört. Zur Untersuchung des Angstverhaltens wurden die Verhaltenstests EPM, OFM und LDB durchgeführt (Bailey und Crawley 2009). Um das physiologische Angstverhalten von gesunden Individuen abzubilden, wurden in dieser Arbeit gleichaltrige Wildtyp-Tiere als Vergleichsbasis selbigen Behandlungs- und Testprotokollen unterzogen.

Die Auswirkungen von $\Delta 9$ -THC auf das Angstverhalten der Tg4-42-Mauslinie ließ sich vordergründig in der präventiven Behandlungsgruppe beobachten. Gründe hierfür stellen sich in den unterschiedlichen Behandlungsprotokollen dar. So finden in der therapeutischen Behandlungsgruppe während der Verhaltensversuche die täglichen intraperitonealen

Injektionen statt, welche als akuter Stressor Einfluss auf das Angstverhalten und damit auf die Validität der Ergebnisse haben können (Bourin und Hascoet 2003). Entsprechend dieser Hypothese zeigten sich in der therapeutischen Behandlungsgruppe weitgehend keine Unterschiede zwischen dem Angstverhalten behandelter bzw. unbehandelter Tiere der Tg4-42-Mauslinie und dem Verhalten unbehandelter Wildtyp-Tiere.

Inwieweit das Angstverhalten der Tg4-42-Mauslinie durch die THC-Behandlung beeinflusst wird, lässt sich bei der präventiven Behandlungsgruppe insbesondere im EPM und LDB erkennen. In Ersterem werden die Versuchstiere mit frei exponierten Ebenen konfrontiert, was ein Vermeidungsverhalten der Mäuse herbeiführt (Walf und Frye 2007). In Anlehnung an den Versuchsaufbau von Handley und Mithani besteht der Apparat aus zwei geschlossenen- und zwei offenen Armen, wobei gesunde Individuen entsprechend des Vermeidungsverhaltens gegenüber frei exponierter Flächen möglichst wenig Zeit in den offenen Armen verbringen (Handley und Mithani 1984).

Unbehandelte Tiere der Tg4-42-Mauslinie zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine signifikant verlängerte Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des Apparates, was als reduziertes Angstverhalten interpretiert werden soll. Ähnliche Ergebnisse wurden außerdem in der 5XFAD-, APP23-, APP₆₉₅SWE/co+PS1/ Δ E9-, sowie TBA42-Mauslinie als weitere Alzheimer-Mausmodelle beobachtet, was unter anderem auf hippocampale Degeneration zurückgeführt werden kann (Dumont et al. 2004; Jawhar et al. 2012; Lalonde et al. 2005; Meißner et al. 2015).

THC-behandelte Tg4-42-Mäuse der präventiven Behandlungsgruppe zeigten hinsichtlich der Aufenthaltsdauer in den offenen Armen hingegen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Schlussfolgernd findet infolge der THC-Behandlung im EPM eine Angleichung an das Angstverhalten von Wildtyp-Tieren statt.

Die Studienlage ist bezüglich möglicher Auswirkungen von Δ 9-THC auf das Angstverhalten von Alzheimer-Mausmodellen limitiert. Hinsichtlich des Einflusses von Δ 9-THC auf das Verhalten gesunder Individuen stellen sich im EPM heterogene Ergebnisse dar. So wurde in einer Studie von Rubino et al. (2007) gezeigt, dass mit sehr niedrigen THC-Dosen behandelte Nagetiere signifikant mehr Zeit in den offenen Armen des Apparates verbringen. Andere Studien verzeichneten für Δ 9-THC in einem sehr niedrigen- bis mittelhohen Dosisbereich hingegen eine verlängerte Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen bzw. eine verminderte Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des Apparates, was mit einem anxiogenen Phänotyp vereinbar ist (Onaivi et al. 1990; Schramm-Sapota et al. 2007).

Diskussion

Zusammenfassend können in Bezug auf das Angstverhalten der Tg4-42-Mauslinie im EPM zwei Aussagen getroffen werden: zum einen entwickeln unbehandelte Tg4-42-Mäuse einen anxiolytischen Phänotyp, welcher zum anderen durch Langzeitbehandlung mit $\Delta 9$ -THC in der präventiven Behandlungsgruppe außer Kraft gesetzt wird.

Eine ähnliche, wenngleich reziproke Tendenz stellte sich im LDB als weiterer angstbezogener Verhaltenstest dar. Jener Versuch beruht auf dem Konflikt zwischen der angeborenen Aversion gegenüber lichtexponierten Flächen und dem natürlichen Explorationsverhalten von Nagetieren (Takao und Miyakawa 2006).

Hierbei ließ sich in der präventiven Behandlungsgruppe feststellen, dass unbehandelte Tiere der Tg4-42-Mauslinie im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Tieren signifikant weniger Zeit in der hellen Box verbrachten und damit ein verstärktes Angstverhalten im LDB präsentierten. Folglich besteht eine gewisse Diskrepanz zu den im EPM erhobenen Daten, in denen unbehandelte Tg4-42-Mäuse vermindertes Angstverhalten zeigten. Eine mögliche Argumentationsgrundlage bietet der Versuchsaufbau, da die exponierten Areale im LDB durch Helligkeit- und im EPM durch Höhe verkörpert werden und hypothetisch eine heterogene Angstreaktion hervorrufen könnten. Dem gegenüber steht die in Meta-Analysen nachgewiesene Konkordanz der im EPM und LDB erhobenen Daten mit der Schlussfolgerung, dass jene Tests Angstverhalten unter ähnlichen Gesichtspunkten untersuchen (Mohammad et al. 2016). Hierbei soll bemerkt werden, dass Varianten an Versuchsprotokollen existieren, welche sich hinsichtlich Apparat und Versuchsdauer unterscheiden (Bailey und Crawley 2009). Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass bei Variation des Testprotokolls Abweichungen in Bezug auf das Angstverhalten innerhalb des Test auftreten.

Dieser These folgend variieren andere Alzheimer-Mausmodelle hinsichtlich des Angstverhaltens im LDB, sodass in der APP23-Mauslinie kein Unterschied zu Wildtyp-Tieren und in der APP₆₉₅SWE/co+PS1/ Δ E9-Mauslinie ein anxiolytischer Phänotyp beschrieben werden konnte (Cheng et al. 2014; van Dam et al. 2003).

Ähnlich den unbehandelten-, zeigten auch THC-behandelte Tiere der Tg4-42-Mauslinie eine reduzierte Aufenthaltsdauer in der hellen Box, wobei eine Angleichung an den Graphen der Wildtyp-Tiere festgestellt werden muss. In einer Studie von Onaivi et al. (1990) konnte gezeigt werden, dass sich die THC-vermittelte Wirkung auf das Angstverhalten nach Beendigung einer mehrwöchigen Behandlung innerhalb kürzester Zeit zurückbilden kann (Onaivi et al. 1990). Da in der präventiven Behandlungsgruppe eine mehrwöchige Wash-out-Periode zwischen Beendigung der THC-Behandlung und Beginn der Verhaltensbatterie liegt, ist eine

Diskussion

Akutwirkung auf das Angstverhalten der Versuchstiere unwahrscheinlich. Vielmehr lässt sich die in dieser Arbeit beobachtete Angleichung des Angstverhaltens THC-behandelter Tg4-42-Mäuse an das von Wildtyp-Tieren auf die geringere Ausprägung der Hippocampus-spezifischen Alzheimer-Pathologie in der präventiven Behandlungsgruppe zurückzuführen.

Diese These kann durch die Ergebnisse des OFM weder gestützt, noch entkräftet werden. Jener Test überprüft das Explorationsverhalten in einer weiten, hell erleuchteten und unbekanntem Umgebung und gilt damit als weiterer angstassoziierter Verhaltensversuch (Seibenhener und Wooten 2015). So zeigten in der präventiven Behandlungsgruppe unbehandelte Tg4-42-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren keinen Unterschied hinsichtlich der Zeitdauer im Zentrum des Apparats. Folglich lässt sich bei Tieren der Tg4-42-Mauslinie zu diesem Alterszeitpunkt keine Änderung des explorativen Verhaltens im OFM feststellen. Bemerkenswerterweise entwickelten Tg4-42-Mäuse infolge der Langzeitbehandlung mit Δ^9 -THC ein signifikant vermindertes Angstverhalten im Vergleich zu unbehandelten Individuen der gleichen Mauslinie, obwohl ein Unterschied zu unbehandelten Wildtyp-Tieren ausblieb. Studien zur THC-vermittelten Wirkung auf das Verhalten von Nagetieren im OFM berichten einen Einfluss auf die Aktivität unter akuter THC-Exposition, welcher sich jedoch zum einen durch chronische THC-Exposition und zum anderen durch Beendigung der THC-Behandlung weitgehend zurückbildete (Masur et al. 1971; Sjoden et al. 1973). Die Änderung des Angstverhaltens von THC-behandelten Tg4-42-Mäusen im OFM kann somit im Rahmen der bereits diskutierten Reduktion des Nervenzellverlustes interpretiert werden, da ein psychotroper Effekt durch die vorliegende mehrwöchige Wash-out-Periode als unwahrscheinlich angesehen werden kann.

Während Wagner et al. (2019) in weiblichen Individuen der Tg4-42-Mauslinie eine unbeeinträchtigte Bewegungsaktivität im OFM verzeichneten, legten in dieser Arbeit sowohl unbehandelte-, als auch THC-behandelte Tiere eine geringere Distanz im zurück (Wagner et al. 2019). Ursachen für eine verminderte Bewegungsaktivität im OFM bleiben unklar, da sich in keinem weiteren Verhaltenstest ein vergleichbares Ergebnis hinsichtlich der zurückgelegten Distanz zeigte. Retrospektiv kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich Handhabung und das Behandlungsprotokoll auf die Bewegungsaktivität der Versuchstiere ausgewirkt und somit die Diskrepanz zu den von Wagner et al. (2019) publizierten Daten hervorgerufen haben.

In Zusammenschau der angstbezogenen Verhaltenstests kann ein heterogenes Angstverhalten unbehandelter Individuen der Tg4-42-Mauslinie in der präventiven Behandlungsgruppe festgestellt werden. Wie bereits beschrieben, werden durch die einzelnen Versuchsaufbauten

und Testprotokolle spezifische Konfliktsituationen konstruiert. So präsentierte sich im EPM ein anxiolytischer-, im LDB ein anxiogener- und im OFM ein unbeeinflusster Phänotyp. Eine Verminderung jener Heterogenität kann durch die Langzeitbehandlung mit $\Delta 9$ -THC beobachtet werden, wobei eine Annäherung an das physiologische Verhalten von Wildtyp-Tieren stattfindet.

Der Einfluss von Cannabinoiden auf die neuropsychiatrischen Symptome in demenzerkrankten Patienten wurde im Rahmen klinischer Studien untersucht (Inglet et al. 2020). $\Delta 9$ -THC führte nachweislich in einigen dieser Studien zu einer Reduktion insbesondere nächtlicher Unruhe und aggressiven Verhaltens in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (Shelef et al. 2016; Walther et al. 2006; Woodward et al. 2014). Dem gegenüber verzeichneten van den Elsen et al. (2015) keinen Nutzen einer THC-Behandlung für das Patientenkollektiv. Eine Meta-Analyse von Ruthirakuhan et al. (2019) konnte den Cannabinoiden im Allgemeinen keinen signifikanten Einfluss auf die neuropsychiatrischen Symptome von Alzheimer-Patienten nachweisen. Ein möglicher Nutzen wurde am ehesten den synthetischen Cannabinoiden zugesprochen und schien von der Schwere der Alzheimer-Erkrankung und des *Body-Mass-Index* abhängig zu sein (Ruthirakuhan et al. 2019). Zusammenfassend präsentiert sich eine ambivalente Studienlage, deren Ursache multifaktoriell begründet werden kann. Ähnlich zu den Studien im Tiermodell hängen die erhobenen Ergebnisse unter anderem von der Dosis, dem verwendeten Cannabinoid mit dessen spezifischer Rezeptoraffinität, dem Krankheitsstadium des Studienobjekts und dem Studienprotokoll ab. Folglich lässt die aktuelle Studienlage keine eindeutige Schlussfolgerung hinsichtlich des Einflusses von Cannabinoiden auf den neuropsychiatrischen Symptomkomplex der Alzheimer-Erkrankung zu und bedarf weiterer Forschung.

4.6 $\Delta 9$ -THC stellt eine Therapieoption der Alzheimer-Erkrankung dar

Alzheimer-Mausmodelle stellen in der präklinischen Forschung ein bedeutendes Instrument zur Untersuchung neuer Behandlungssubstanzen dar, wenngleich aktuell kein Modell die komplette Alzheimer-Pathologie abbilden kann (Elder et al. 2010). In dieser Arbeit konnte mittels etablierter Verhaltensversuche nachgewiesen werden, dass $\Delta 9$ -THC als Behandlungssubstanz einen positiven Einfluss auf die geistige Leistungsfähigkeit und bedingt auch auf neuropsychiatrische Begleitsymptome in der Tg4-42-Mauslinie hat. Der in der therapeutischen Behandlungsgruppe beobachtete Behandlungseffekt im MWM korrelierte mit der Reduktion des Nervenzellverlustes, was einen kausalen Zusammenhang zwischen der verbesserten kognitiven Leistung und der Neuronenanzahl vermuten lässt. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Studie von Aso et al. (2015) erhoben, in welcher Tiere der A β PP/PS1-

Diskussion

Mauslinie infolge mehrwöchiger THC-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere Gedächtnisleistung zeigten. Inwieweit eine Übertragung jener Ergebnisse in die klinische Forschung möglich ist, kann angesichts der unzureichenden Studienlage zum aktuellen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Im Allgemeinen wird die Translation von Mausmodellen auf klinische Studien aufgrund der niedrigen Erfolgsrate als kritisch betrachtet (Cummings et al. 2014; Drummond und Wisniewski 2017). Hinsichtlich des klinischen Einsatzes von Δ 9-THC an demenzerkrankten Patienten konnte im Niedrigdosisbereich eine gute Verträglichkeit und ein günstiges Nebenwirkungsprofil beschrieben werden (van den Elsen et al. 2015; van den Elsen et al. 2017). Vorübergehende Verwirrtheit und Bewusstseinsminderung wurden als potentielle unerwünschte Arzneimittelwirkungen in anderen Studien genannt (Inglet et al. 2020; Shelef et al. 2016; Volicer et al. 1997).

Zahlreiche vielversprechende Forschungsansätze untersuchen einen möglichen Eingriff in die Alzheimer-Pathologie, wenngleich eine kurative Therapie noch nicht identifiziert werden konnte (Leitlinie Demenzen 2016). Δ 9-THC besitzt nachgewiesenermaßen das Potential, auf zellulärer Ebene in die Alzheimer-Pathologie einzugreifen und den signifikanten Nervenzellverlust der Tg4-42-Mauslinie zu reduzieren (Cao et al. 2014; Currais et al. 2016). Der Einsatz von Δ 9-THC als Medizinprodukt erscheint aufgrund des günstigen Nebenwirkungsprofils in der Alzheimer-Forschung durchaus vertretbar und wird in anderen Anwendungsgebieten bereits als solches eingesetzt, weshalb auf eine gewisse klinische Erfahrung zurückgegriffen werden kann (Malik et al. 2017; Plasse et al. 1991; van den Elsen et al. 2015; van den Elsen et al. 2017; Volicer et al. 1997). Um Δ 9-THC als Therapieoption der Alzheimer-Erkrankung zu untersuchen, sind randomisierte kontrollierte Studien an einem ausgewählten Patientenkollektiv notwendig.

5 Zusammenfassung

Epidemiologisch gewinnt die Alzheimer-Erkrankung durch steigende Prävalenz zunehmend an Bedeutung, wenngleich zum aktuellen Zeitpunkt ausschließlich symptomatische Therapien zugelassen sind und eine kurative Therapieoption bislang nicht identifiziert werden konnte (Nichols et al. 2019; Sathianathan und Kantipudi 2018; Leitlinie Demenzen 2016). Ein interessanter Therapieansatz untersucht die Verknüpfung zwischen der Alzheimer-Pathologie und dem Endocannabinoidsystem, wobei anhand von *In-vitro-Studien* für endogene- und exogene Cannabinoide eine inhibitorische Wirkung auf die Beta-Amyloid-Pathologie nachgewiesen werden konnte (Benito et al. 2007; Eubanks et al. 2006; Martin-Moreno et al. 2012; Milton 2002). Hinsichtlich seiner Rezeptoraffinität und damit einhergehenden psychoaktiven Wirkung nimmt Δ^9 -THC als exogenes Cannabinoid seit jeher eine zentrale Rolle in der Cannabinoid-basierten Therapie ein (Di Marzo et al. 2004; Mechoulam und Gaoni 1967; Sharma et al. 2012).

In dieser Arbeit wurde umfänglich der Einfluss einer Langzeit-THC-Behandlung sowohl auf die Symptomausprägung, als auch auf einige ausgesuchte neuropathologische Merkmale der Alzheimer-Erkrankung in der Tg4-42-Mauslinie als Modell für die sporadische Alzheimer-Erkrankung untersucht. Die Behandlungsgruppen wurden in einen präventiven- und einen therapeutischen Studienarm aufgeteilt, welche sich maßgeblich in dem Erkrankungsstadium zum Zeitpunkt des Therapiebeginns unterschieden. Als Kernelemente dieser Studie dienten etablierte Verhaltenstests zur Untersuchung der Kognition und neuropsychiatrischen Begleitsymptome, sowie die Stereologie zur Quantifizierung der Neuronenzahl.

Innerhalb der präventiven Behandlungsgruppe konnte ein Behandlungseffekt im *Morris water maze* und zusammenfassend eine signifikante Verbesserung der kognitiven Funktion nachgewiesen werden, welche mit einer Reduktion des für die Mauslinie charakteristischen Hippocampus-spezifischen Nervenzellverlusts korrelierte. In der therapeutischen Behandlungsgruppe blieb jener Behandlungseffekt und auch der Einfluss auf die Neuronenzahl aus, wenngleich ebenfalls eine signifikante Verbesserung der Kognition festgestellt wurde.

Wie in anderen Forschungsarbeiten gezeigt werden konnte, senkt Δ^9 -THC *in vitro* die Konzentration an Beta-Amyloid bzw. *in vivo* die Amyloid-Plaques und degenerierten Neuronen (Cao et al. 2014; Chen et al. 2013; Currais et al. 2016). Schlussfolgernd kann vermutet werden, dass die THC-Behandlung in einem präventiven Therapieansatz über eine Reduktion

Zusammenfassung

intra-neuronalen Beta-Amyloids dem Nervenzellverlust in der Tg4-42-Mauslinie entgegenwirkt und klinisch eine Verbesserung der kognitiven Funktion hervorruft.

Weitere Studien sind notwendig, um den Einfluss von Cannabinoiden im Allgemeinen und Δ^9 -THC im Speziellen auf die Alzheimer-Pathologie und den damit einhergehenden Symptomkomplex näher zu untersuchen. Eine klinische Translation erscheint aufgrund des günstigen Nebenwirkungsprofils und der bereits vorhandenen klinischen Erfahrung mit Dronabinol als Medizinprodukt denkbar und sollte als Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten evaluiert werden.

6 Literaturverzeichnis

Aalten P, Verhey FR, Boziki M, Bullock R, Byrne EJ, Camus V, Caputo M, Collins D, De Deyn PP, Elina K, et al. (2007): Neuropsychiatric syndromes in dementia. Results from the European Alzheimer Disease Consortium: part I. *Dement Geriatr Cogn Disord* 24, 457-463

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* 7, 270-279

Alexandru A, Jagla W, Graubner S, Becker A, Bauscher C, Kohlmann S, Sedlmeier R, Raber KA, Cynis H, Ronicke R, et al. (2011): Selective hippocampal neurodegeneration in transgenic mice expressing small amounts of truncated Abeta is induced by pyroglutamate-Abeta formation. *J Neurosci* 31, 12790-12801

Alvarez-Buylla A, Ling CY, Kirn JR (1990): Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain. *J Neurosci Methods* 33, 129-133

Alzheimer's Association (2020): Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 16, 391-460

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

Anand U, Otto WR, Sanchez-Herrera D, Facer P, Yiangou Y, Korchev Y, Birch R, Benham C, Bountra C, Chessell IP, et al. (2008): Cannabinoid receptor CB2 localisation and agonist-mediated inhibition of capsaicin responses in human sensory neurons. *Pain* 138, 667-680

Andersen K, Launer LJ, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Baldereschi M, Brayne C, et al. (1999): Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology* 53, 1992-1997

Andre CM, Hausman JF, Guerriero G (2016): Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front Plant Sci* 7, 19

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, 17338

Antunes M, Biala G (2012): The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13, 93-110

Aoki M, Volkmann I, Tjernberg LO, Winblad B, Bogdanovic N (2008): Amyloid beta-peptide levels in laser capture microdissected cornu ammonis 1 pyramidal neurons of Alzheimer's brain. *Neuroreport* 19, 1085-1089

Literaturverzeichnis

- Armstrong RA (1998): Beta-amyloid plaques: stages in life history or independent origin?. *Dement Geriatr Cogn Disord* 9, 227-238
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992): Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 631-639
- Aso E, Ferrer I (2014): Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving toward the clinic. *Front Pharmacol* 5, 37
- Aso E, Juves S, Maldonado R, Ferrer I (2013): CB2 cannabinoid receptor agonist ameliorates Alzheimer-like phenotype in AbetaPP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis* 35, 847-858
- Aso E, Palomer E, Juves S, Maldonado R, Munoz FJ, Ferrer I (2012): CB1 agonist ACEA protects neurons and reduces the cognitive impairment of AbetaPP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis* 30, 439-459
- Aso E, Sanchez-Pla A, Vegas-Lozano E, Maldonado R, Ferrer I (2015): Cannabis-based medicine reduces multiple pathological processes in AbetaPP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis* 43, 977-991
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004): Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84, 361-384
- Babulal GM, Quiroz YT, Albeni BC, Arenaza-Urquijo E, Astell AJ, Babiloni C, Bahar-Fuchs A, Bell J, Bowman GL, Brickman AM, et al. (2019): Perspectives on ethnic and racial disparities in Alzheimer's disease and related dementias: Update and areas of immediate need. *Alzheimers Dement* 15, 292-312
- Bachmeier C, Beaulieu-Abdelahad D, Mullan M, Paris D (2013): Role of the cannabinoid system in the transit of beta-amyloid across the blood-brain barrier. *Mol Cell Neurosci* 56, 255-262
- Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE (2003): A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci* 23, 2665-2674
- Bailey KN, Crawley JN: Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: Buccafusco JJ (Hrsg.): *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2. Auflage. CRC Press/ Taylor & Francis, Boca Raton (FL), 2009
- Bayer TA, Wirths O (2008): Alzheimer's disease. Molecular pathology, animal models, and current treatment. *Nervenarzt* 79 Suppl 3, 117-125
- Bayer TA, Wirths O (2010): Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2, 8
- 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
- Becker MP, Collins PF, Luciana M (2014): Neurocognition in college-aged daily marijuana users. *J Clin Exp Neuropsychol* 36, 379-398

Literaturverzeichnis

- Bedse G, Romano A, Lavecchia AM, Cassano T, Gaetani S (2015): The role of endocannabinoid signaling in the molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 43, 1115-1136
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010): Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23, 213-227
- Benito C, Nunez E, Pazos MR, Tolon RM, Romero J (2007): The endocannabinoid system and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 36, 75-81
- Bentahir M, Nyabi O, Verhamme J, Tolia A, Horre K, Wiltfang J, Esselmann H, De Strooper B (2006): Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* 96, 732-742
- Bierer LM, Hof PR, Purohit DP, Carlin L, Schmeidler J, Davis KL, Perl DP (1995): Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 52, 81-88
- Bilkei-Gorzo A, Albayram O, Draffehn A, Michel K, Piyanova A, Oppenheimer H, Dvir-Ginzberg M, Racz 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
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (2005): Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45, 675-688
- Birks J (2006): Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 1, 005593
- Bloudek LM, Spackman DE, Blankenburg M, Sullivan SD (2011): Review and meta-analysis of biomarkers and diagnostic imaging in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 26, 627-645
- Bobinski M, de Leon MJ, Tarnawski M, Wegiel J, Reisberg B, Miller DC, Wisniewski HM (1998): Neuronal and volume loss in CA1 of the hippocampal formation uniquely predicts duration and severity of Alzheimer disease. *Brain Res* 805, 267-269
- Bondareff W, Mountjoy CQ, Roth M, Hauser DL (1989): Neurofibrillary degeneration and neuronal loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 10, 709-715
- Bonfils PK, Reith J, Hasseldam H, Johansen FF (2006): Estimation of the hypothermic component in neuroprotection provided by cannabinoids following cerebral ischemia. *Neurochem Int* 49, 508-518
- Bonte FJ, Ross ED, Chehabi HH, Devous MD, Sr. (1986): SPECT study of regional cerebral blood flow in Alzheimer disease. *J Comput Assist Tomogr* 10, 579-583
- Bouleau S, Tricoire H (2015): Drosophila models of Alzheimer's disease: advances, limits, and perspectives. *J Alzheimers Dis* 45, 1015-1038
- Bourin M, Hascoet M (2003): The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 463, 55-65

Literaturverzeichnis

- Bouter C, Bouter Y (2019): (18)F-FDG-PET in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Front Med (Lausanne)* 6, 71
- Bouter C, Henniges P, Franke TN, Irwin C, Sahlmann CO, Sichler ME, Beindorff N, Bayer TA, Bouter Y (2018): (18)F-FDG-PET Detects Drastic Changes in Brain Metabolism in the Tg4-42 Model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 10, 425
- Bouter Y, Dietrich K, Wittnam JL, Rezaei-Ghaleh N, Pillot T, Papot-Couturier S, Lefebvre T, Sprenger F, Wirths O, Zweckstetter M, et al. (2013): N-truncated amyloid beta (A β) 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
- Braithwaite SP, Stock JB, Lombroso PJ, Nairn AC (2012): Protein phosphatases and Alzheimer's disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 106, 343-379
- Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S (1989): The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci* 48, 29-69
- Bromley-Brits K, Deng Y, Song W (2011): Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp* 53, 2920
- Brookmeyer R, Gray S (2000): Methods for projecting the incidence and prevalence of chronic diseases in aging populations: application to Alzheimer's disease. *Stat Med* 19, 1481-1493
- Brown SP, Brenowitz SD, Regehr WG (2003): Brief presynaptic bursts evoke synapse-specific retrograde inhibition mediated by endogenous cannabinoids. *Nat Neurosci* 6, 1048-1057
- Broyd SJ, van Hell HH, Beale C, Yucel M, Solowij N (2016): Acute and Chronic Effects of Cannabinoids on Human Cognition-A Systematic Review. *Biol Psychiatry* 79, 557-567
- Buzsaki G, Chrobak JJ (1995): Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Curr Opin Neurobiol* 5, 504-510
- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC (2001): BACE1 is the major beta-secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4, 233-234
- Calabrese EJ, Rubio-Casillas A (2018): Biphasic effects of THC in memory and cognition. *Eur J Clin Invest* 48, e12920
- Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, Jucker M (1998): Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* 395, 755-756
- Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F, et al. (1999): Early-onset autosomal dominant Alzheimer

Literaturverzeichnis

- disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 65, 664-670
- Cao C, Li Y, Liu H, Bai G, Mayl J, Lin X, Sutherland K, Nabar N, Cai J (2014): The potential therapeutic effects of THC on Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 42, 973-984
- Carlson G, Wang Y, Alger BE (2002): Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat Neurosci* 5, 723-724
- Carroll CM, Li YM (2016): Physiological and pathological roles of the gamma-secretase complex. *Brain Res Bull* 126, 199-206
- 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 Aβ42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* 165, 1289-1300
- Casey DA, Antimisiaris D, O'Brien J (2010): Drugs for Alzheimer's disease: are they effective?. *P T* 35, 208-211
- Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Nunomura A, Perry G, Smith MA (2006): Neuropathology of Alzheimer disease: pathognomonic but not pathogenic. *Acta Neuropathol* 111, 503-509
- Castillo PE, Younits TJ, Chavez AE, Hashimoto Y (2012): Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* 76, 70-81
- Cha YM, White AM, Kuhn CM, Wilson WA, Swartzwelder HS (2006): Differential effects of delta9-THC on learning in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 83, 448-455
- Chen R, Zhang J, Fan N, Teng ZQ, Wu Y, Yang H, Tang YP, Sun H, Song Y, Chen C (2013): Delta9-THC-caused synaptic and memory impairments are mediated through COX-2 signaling. *Cell* 155, 1154-1165
- Cheng D, Low JK, Logge W, Garner B, Karl T (2014): Novel behavioural characteristics of female APPSwe/PS1DeltaE9 double transgenic mice. *Behav Brain Res* 260, 111-118
- Chevalyere V, Heifets BD, Kaeser PS, Sudhof TC, Castillo PE (2007): Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1α. *Neuron* 54, 801-812
- Chevalyere V, Takahashi KA, Castillo PE (2006): Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 29, 37-76
- Childers SR, Deadwyler SA (1996): Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 52, 819-827
- Cho H, Choi JY, Hwang MS, Lee JH, Kim YJ, Lee HM, Lyoo CH, Ryu YH, Lee MS (2016): Tau PET in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 87, 375-383
- Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M (2010): An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med* 12, 1-12

Literaturverzeichnis

- Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W, Inoue H, Shirotani K, et al. (1999): Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat Med* 5, 560-564
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992): Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674
- Congdon EE, Kim S, Bonchak J, Songrug T, Matzavinos A, Kuret J (2008): Nucleation-dependent tau filament formation: the importance of dimerization and an estimation of elementary rate constants. *J Biol Chem* 283, 13806-13816
- Copenhaver PF, Anekonda TS, Musashe D, Robinson KM, Ramaker JM, Swanson TL, Wadsworth TL, Kretschmar D, Woltjer RL, Quinn JF (2011): A translational continuum of model systems for evaluating treatment strategies in Alzheimer's disease: isradipine as a candidate drug. *Dis Model Mech* 4, 634-648
- 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
- Corey-Bloom J (2002): The ABC of Alzheimer's disease: cognitive changes and their management in Alzheimer's disease and related dementias. *Int Psychogeriatr* 14 Suppl 1, 51-75
- Crews L, Masliah E (2010): Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 19, 12-20
- Cummings JL, Morstorf T, Zhong K (2014): Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res Ther* 6, 37
- Currais A, Quehenberger O, A MA, Daugherty D, Maher P, Schubert D (2016): Amyloid proteotoxicity initiates an inflammatory response blocked by cannabinoids NPJ. *Aging Mech Dis* 2, 16012
- D'Souza DC, Cortes-Briones JA, Ranganathan M, Thurnauer H, Creatura G, Surti T, Planeta B, Neumeister A, Pittman B, Normandin MD, et al. (2016): Rapid Changes in Cannabinoid 1 Receptor Availability in Cannabis-Dependent Male Subjects After Abstinence From Cannabis. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging* 1, 60-67
- da Fonseca Pacheco D, Klein A, de Castro Perez A, da Fonseca Pacheco CM, de Francischi JN, Duarte ID (2008): The mu-opioid receptor agonist morphine, but not agonists at delta- or kappa-opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 154, 1143-1149
- Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO (1987): A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 78, 151-164

Literaturverzeichnis

De Petrocellis L, Di Marzo V (2010): Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J Neuroimmune Pharmacol* 5, 103-121

Deacon RM (2013): Measuring motor coordination in mice. *J Vis Exp* 75, e2609

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

Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG) (Hrsg.): ICD-10-GM Version 2018, Systematisches Verzeichnis, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, Stand: 22. September 2017. Version 2018; Deutscher Ärzteverlag, Köln 2017, 155, 156, 224

Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988): Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34, 605-613

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

DGPPN, DGN 2016: Demenzen. S3-Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Hrsg. v. der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN) und der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN). Vollständig überarbeitet: 24.01.2016
[<https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>]
abgerufen am 08.10.2019

Di Carlo G, Izzo AA (2003): Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs* 12, 39-49

Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L (2004): The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3, 771-784

Di Marzo V, De Petrocellis L, Sepe N, Buono A (1996): Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem J* 316 (Pt 3), 977-984

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994): Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372, 686-691

Di Marzo V, Piscitelli F (2015): The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics* 12, 692-698

Dickson DW (1997): The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 321-339

Literaturverzeichnis

- Dietrich K, Bouter Y, Muller M, Bayer TA (2018): Synaptic Alterations in Mouse Models for Alzheimer Disease-A Special Focus on N-Truncated Abeta 4-42. *Molecules* 23, 718
- Ditaranto K, Tekirian TL, Yang AJ (2001): Lysosomal membrane damage in soluble Abeta-mediated cell death in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 8, 19-31
- Dormont D, Seidenwurm DJ, Expert Panel on Neurologic I, American College of R (2008): Dementia and movement disorders AJNR. *Am J Neuroradiol* 29, 204-206
- Dorszewska J, Prendecki M, Oczkowska A, Dezor M, Kozubski W (2016): Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 13, 952-963
- Drew L (2018): An age-old story of dementia. *Nature* 559, 2-3
- Drummond E, Wisniewski T (2017): Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133, 155-175
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, et al. (1996): Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383, 710-713
- Dumont M, Strazielle C, Staufenbiel M, Lalonde R (2004): Spatial learning and exploration of environmental stimuli in 24-month-old female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res* 1024, 113-121
- Duval ER, Javanbakht A, Liberzon I (2015): Neural circuits in anxiety and stress disorders: a focused review. *Ther Clin Risk Manag* 11, 115-126
- Ehrhart J, Obregon D, Mori T, Hou H, Sun N, Bai Y, Klein T, Fernandez F, Tan J, Shytle RD (2005): Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation* 2, 29
- Eimer WA, Vassar R (2013): Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal Abeta42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegener* 8, 2
- Ekstrom AD, Meltzer J, McNaughton BL, Barnes CA (2001): NMDA receptor antagonism blocks experience-dependent expansion of hippocampal "place fields". *Neuron* 31, 631-638
- Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R (2010): Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 77, 69-81
- Engelborghs S, De Vreese K, van de Castele T, Vanderstichele H, van Everbroeck B, Cras P, Martin JJ, Vanmechelen E, De Deyn PP (2008): Diagnostic performance of a CSF-biomarker panel in autopsy-confirmed dementia. *Neurobiol Aging* 29, 1143-1159
- Ennaceur A, Delacour J (1988): A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31, 47-59

- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990): Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124
- Esparza TJ, Gangolli M, Cairns NJ, Brody DL (2018): Soluble amyloid-beta buffering by plaques in Alzheimer disease dementia versus high-pathology controls. *PLoS One* 13, e0200251
- Esparza TJ, Zhao H, Cirrito JR, Cairns NJ, Bateman RJ, Holtzman DM, Brody DL (2013): Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann Neurol* 73, 104-119
- 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)* 84, 253-258
- Eubanks LM, Rogers CJ, Beuscher A, Koob GF, Olson AJ, Dickerson TJ, Janda KD (2006): A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology. *Mol Pharm* 3, 773-777
- 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
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (1997): Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278, 1349-1356
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL (1995): Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 48, 443-450
- Ferreira ME, de Vasconcelos AS, da Costa Vilhena T, da Silva TL, da Silva Barbosa A, Gomes AR, Dolabela MF, Percario S (2015): Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Should We Keep Trying Antioxidant Therapies?. *Cell Mol Neurobiol* 35, 595-614
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, et al. (2005): Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112-2117
- Foidl BM, Humpel C (2020): Can mouse models mimic sporadic Alzheimer's disease?. *Neural Regen Res* 15, 401-406
- Folch J, Busquets O, Ettcheto M, Sanchez-Lopez E, Castro-Torres RD, Verdaguer E, Garcia ML, Olloquequi J, Casadesus G, Beas-Zarate C, et al. (2018): Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications. *J Alzheimers Dis* 62, 1223-1240
- Fowler CJ, Rojo ML, Rodriguez-Gaztelumendi A (2010): Modulation of the endocannabinoid system: neuroprotection or neurotoxicity?. *Exp Neurol* 224, 37-47

Literaturverzeichnis

- Frick KM, Gresack JE (2003): Sex differences in the behavioral response to spatial and object novelty in adult C57BL/6 mice. *Behav Neurosci* 117, 1283-1291
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995): Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232, 54-61
- Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzman M (2007): The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist* 13, 109-114
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. (1995): Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-527
- Games D, Buttini M, Kobayashi D, Schenk D, Seubert P (2006): Mice as models: transgenic approaches and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9 Suppl 3, 133-149
- Gelinas DS, DaSilva K, Fenili D, St George-Hyslop P, McLaurin J (2004): Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2, 14657-14662
- Gessa GL, Mascia MS, Casu MA, Carta G (1997): Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol* 327, 1-2
- Ghiso J, Tomidokoro Y, Revesz T, Frangione B, Rostagno A (2010): Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer's Disease. *Hirosaki Igaku* 61, 111-124
- Gifford AN, Ashby CR, Jr. (1996): Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR 141716A. *J Pharmacol Exp Ther* 277, 1431-1436
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999): Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 2, 358-363
- Glass M, Northup JK (1999): Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol* 56, 1362-1369
- Glenner GG (1980): Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses (second of two parts). *N Engl J Med* 302, 1333-1343
- Glenner GG, Wong CW (1984): Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885-890
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. (1991): Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706
- Golde TE, Eckman CB, Younkin SG (2000): Biochemical detection of A β isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1502, 172-187

Literaturverzeichnis

- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Jr., Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996): Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16, 4491-4500
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, et al. (2000): Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 156, 15-20
- Grant JE, Chamberlain SR, Schreiber L, Odlaug BL (2012): Neuropsychological deficits associated with cannabis use in young adults. *Drug Alcohol Depend* 121, 159-162
- Grant WB, Campbell A, Itzhaki RF, Savory J (2002): The significance of environmental factors in the etiology of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 4, 179-189
- Grossberg GT (2002): The ABC of Alzheimer's disease: behavioral symptoms and their treatment. *Int Psychogeriatr* 14 Suppl 1, 27-49
- Grotenhermen F (2004): Pharmacology of cannabinoids. *Neuro Endocrinol Lett* 25, 14-23
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986): Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261, 6084-6089
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986): Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4913-4917
- Gurses MS, Ural MN, Gulec MA, Akyol O, Akyol S (2016): Pathophysiological Function of ADAMTS Enzymes on Molecular Mechanism of Alzheimer's Disease. *Aging Dis* 7, 479-490
- Gyure KA, Durham R, Stewart WF, Smialek JE, Troncoso JC (2001): Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 125, 489-492
- 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
- Haghani M, Shabani M, Javan M, Motamedi F, Janahmadi M (2012): CB1 cannabinoid receptor activation rescues amyloid beta-induced alterations in behaviour and intrinsic electrophysiological properties of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *Cell Physiol Biochem* 29, 391-406
- Hajos N, Katona I, Naiem SS, MacKie K, Ledent C, Mody I, Freund TF (2000): Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci* 12, 3239-3249
- Hampel H, Graz C, Zetzsche T, Rujescu D, Möller HJ: Pharmakotherapie. In: Wallesch CW, Förstl H (Hrsg.): *Demenzen*. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012, 356-369

Literaturverzeichnis

- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998): Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8268-8273
- Han J, Kesner P, Metna-Laurent M, Duan T, Xu L, Georges F, Koehl M, Abrous DN, Mendizabal-Zubiaga J, Grandes P, et al. (2012): Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell* 148, 1039-1050
- Handley SL, Mithani S (1984): Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 327, 1-5
- Hardy J, Allsop D (1991): Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12, 383-388
- Hardy J, Selkoe DJ (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356
- Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, Roberts GW, Masters CL, Dotti CG, Unsicker K, et al. (1997): Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* 3, 1016-1020
- Harvey MA, Sellman JD, Porter RJ, Frampton CM (2007): The relationship between non-acute adolescent cannabis use and cognition. *Drug Alcohol Rev* 26, 309-319
- Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, Hazeckawa M, Ogata A, Fujioka M, Harada K, Mishima S, Orito K, Egashira N, et al. (2007): Delta9-tetrahydrocannabinol (Delta9-THC) prevents cerebral infarction via hypothalamic-independent hypothermia. *Life Sci* 80, 1466-1471
- Head E, Powell D, Gold BT, Schmitt FA (2012): Alzheimer's Disease in Down Syndrome. *Eur J Neurodegener Dis* 1, 353-364
- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, et al. (2015): Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14, 388-405
- Herholz K, Salmon E, Perani D, Baron JC, Holthoff V, Frolich L, Schonknecht P, Ito K, Mielke R, Kalbe E, et al. (2002): Discrimination between Alzheimer dementia and controls by automated analysis of multicenter FDG PET. *Neuroimage* 17, 302-316
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990): Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1932-1936
- Hock C, Konietzko U, Streffer JR, Tracy J, Signorell A, Muller-Tillmanns B, Lemke U, Henke K, Moritz E, Garcia E, et al. (2003): Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* 38, 547-554
- Hoffmann T, Meyer A, Heiser U, Kurat S, Bohme L, Kleinschmidt M, Buhning KU, Hutter-Paier B, Farcher M, Demuth HU, et al. (2017): Glutaminyl Cyclase Inhibitor PQ912 Improves Cognition in Mouse Models of Alzheimer's Disease-Studies on Relation to Effective Target Occupancy. *J Pharmacol Exp Ther* 362, 119-130

- Hohmann AG (2002): Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids* 121, 173-190
- Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, et al. (1998): Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 4, 97-100
- 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
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996): Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99-102
- Huang LK, Chao SP, Hu CJ (2020): Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. *J Biomed Sci* 27, 18
- Hüttenrauch M, Brauss A, Kurdakova A, Borgers H, Klinker F, Liebetanz D, Salinas-Riester G, Wiltfang J, Klafki HW, Wirths O (2016): Physical activity delays hippocampal neurodegeneration and rescues memory deficits in an Alzheimer disease mouse model. *Transl Psychiatry* 6, e800
- Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah TW, Mata HP, et al. (2005): CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3093-3098
- Ida N, Hartmann T, Pantel J, Schroder J, Zeffass R, Forstl H, Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K (1996): Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J Biol Chem* 271, 22908-22914
- Inglet S, Winter B, Yost SE, Entringer S, Lian A, Biksacky M, Pitt RD, Mortensen W (2020): Clinical Data for the Use of Cannabis-Based Treatments: A Comprehensive Review of the Literature. *Ann Pharmacother* 54, 1109-1143
- Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, et al. (2005): Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739, 198-210
- Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT (1997): APP^{Sw} transgenic mice develop age-related A β deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 965-973
- Iwatsubo T, Mann DM, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y (1995): Amyloid beta protein (A β) deposition: A β 42(43) precedes A β 40 in Down syndrome. *Ann Neurol* 37, 294-299
- Jack CR, Jr., Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH (2011): Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-

Literaturverzeichnis

Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 257-262

Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, Sealock J, Karlsson IK, Hagg S, Athanasiu L, et al. (2019): Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat Genet* 51, 404-413

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. (1993): The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693-4697

Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O (2012): Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal Abeta aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33, e129-140

Ji K, Akgul G, Wollmuth LP, Tsirka SE (2013): Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PLoS One* 8, e56293

Jung KM, Astarita G, Yasar S, Vasilevko V, Cribbs DH, Head E, Cotman CW, Piomelli D (2012): An amyloid beta42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33, 1522-1532

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987): The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736

Kathmann M, Bauer U, Schlicker E, Gothert M (1999): Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359, 466-470

Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF (2001): Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci* 21, 9506-9518

Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF (1999): Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19, 4544-4558

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004): Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27, 447-452

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011): Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91, 461-553

Kidd M (1964): Alzheimer's Disease--an Electron Microscopical Study. *Brain* 87, 307-320

Kim HJ, Chae SC, Lee DK, Chromy B, Lee SC, Park YC, Klein WL, Krafft GA, Hong ST (2003): Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta protein. *FASEB J* 17, 118-120

Literaturverzeichnis

- Klein TW (2005): Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol* 5, 400-411
- Knauer MF, Soreghan B, Burdick D, Kosmoski J, Glabe CG (1992): Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A4/beta protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7437-7441
- Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G (2010): Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* 5, e8809
- Kojro E, Fahrenholz F (2005): The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell Biochem* 38, 105-127
- Kreitzer AC, Regehr WG (2001): Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *J Neurosci* 21, 174
- Kummer MP, Heneka MT (2014): Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimers Res Ther* 6, 28
- Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, Boland A, Vronskaya M, van der Lee SJ, Amlie-Wolf A, et al. (2019): Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates Abeta, tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet* 51, 414-430
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S (2007): Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8, 499-509
- Lalonde R, Kim HD, Maxwell JA, Fukuchi K (2005): Exploratory activity and spatial learning in 12-month-old APP(695)SWE/co+PS1/DeltaE9 mice with amyloid plaques. *Neurosci Lett* 390, 87-92
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, DeStafano AL, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B, et al. (2013): Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 45, 1452-1458
- Landfield PW, Cadwallader LB, Vinsant S (1988): Quantitative changes in hippocampal structure following long-term exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol: possible mediation by glucocorticoid systems. *Brain Res* 443, 47-62
- Lane CA, Hardy J, Schott JM (2018): Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 25, 59-70
- Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, Freret T (2013): Object recognition test in mice. *Nat Protoc* 8, 2531-2537
- Leker RR, Gai N, Mechoulam R, Ovadia H (2003): Drug-induced hypothermia reduces ischemic damage: effects of the cannabinoid HU-210. *Stroke* 34, 2000-2006
- Levenes C, Daniel H, Soubrie P, Crepel F (1998): Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 510 (Pt 3), 867-879

Literaturverzeichnis

- Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B (1990): Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 248, 1124-1126
- Li M, Chen L, Lee DH, Yu LC, Zhang Y (2007): The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 83, 131-139
- Linden DJ (1994): Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* 12, 457-472
- Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G (2013): Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol* 9, 106-118
- Liu CS, Chau SA, Ruthirakuhan M, Lanctot KL, Herrmann N (2015): Cannabinoids for the Treatment of Agitation and Aggression in Alzheimer's Disease. *CNS Drugs* 29, 615-623
- Liu S, Liu J, Wang XD, Shi Z, Zhou Y, Li J, Yu T, Ji Y (2018): Caregiver burden, sleep quality, depression, and anxiety in dementia caregivers: a comparison of frontotemporal lobar degeneration, dementia with Lewy bodies, and Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 30, 1131-1138
- Llano I, Leresche N, Marty A (1991): Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* 6, 565-574
- Logue SF, Paylor R, Wehner JM (1997): Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task. *Behav Neurosci* 111, 104-113
- 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
- Lueptow LM (2017): Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp* 126, 55718
- Lues I, Weber F, Meyer A, Buhning U, Hoffmann T, Kuhn-Wache K, Manhart S, Heiser U, Pokorny R, Chiesa J, et al. (2015): A phase 1 study to evaluate the safety and pharmacokinetics of PQ912, a glutaminyl cyclase inhibitor, in healthy subjects. *Alzheimers Dement (N Y)* 1, 182-195
- Lyketsos CG, Carrillo MC, Ryan JM, Khachaturian AS, Trzepacz P, Amatniek J, Cedarbaum J, Brashear R, Miller DS (2011): Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 532-539
- MacGillivray N (2017): Sir William Brooke O'Shaughnessy (1808-1889), MD, FRS, LRCS Ed: Chemical pathologist, pharmacologist and pioneer in electric telegraphy. *J Med Biogr* 25, 186-196

Literaturverzeichnis

- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R (1995): Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 15, 6552-6561
- MacLeod R, Hillert EK, Cameron RT, Baillie GS (2015): The role and therapeutic targeting of alpha-, beta- and gamma-secretase in Alzheimer's disease. *Future Sci OA* 1, 11
- Malik Z, Bayman L, Valestin J, Rizvi-Toner A, Hashmi S, Schey R (2017): Dronabinol increases pain threshold in patients with functional chest pain: a pilot double-blind placebo-controlled trial. *Dis Esophagus* 30, 1-8
- Marshall R, Kearney-Ramos T, Brents LK, Hyatt WS, Tai S, Prather PL, Fantegrossi WE (2014): In vivo effects of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073 and phytocannabinoid Delta9-THC in mice: inhalation versus intraperitoneal injection. *Pharmacol Biochem Behav* 124, 40-47
- Marsicano G, Lutz B (2006): Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J Endocrinol Invest* 29 Suppl 3, 27-46
- Martin-Moreno AM, Brera B, Spuch C, Carro E, Garcia-Garcia 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
- Martin-Moreno AM, Reigada D, Ramirez 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
- Masliah E (2001): Recent advances in the understanding of the role of synaptic proteins in Alzheimer's Disease and other neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis* 3, 121-129
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R, Alford M, Terry R (1994): Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 174, 67-72
- Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K (1985): Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* 4, 2757-2763
- Masur J, März RM, Carlini EA (1971): Effects of acute and chronic administration of cannabis sativa and (-) delta9-trans-tetrahydrocannabinol on the behavior of rats in an open-field arena. *Psychopharmacologia* 19, 388-397
- Mato S, Chevaleyre V, Robbe D, Pazos A, Castillo PE, Manzoni OJ (2004): A single in-vivo exposure to delta 9THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 7, 585-586
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990): Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564
- McAllister SD, Glass M (2002): CB(1) and CB(2) receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66, 161-171

McDonald AJ, Mascagni F (2001): Localization of the CB1 type cannabinoid receptor in the rat basolateral amygdala: high concentrations in a subpopulation of cholecystokinin-containing interneurons. *Neuroscience* 107, 641-652

McDowell I (2001): Alzheimer's disease: insights from epidemiology. *Aging (Milano)* 13, 143-162

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., 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* 7, 263-269

McKoy AF, Chen J, Schupbach T, Hecht MH (2012): A novel inhibitor of amyloid beta (A β) peptide aggregation: from high throughput screening to efficacy in an animal model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287, 38992-39000

McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999): Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46, 860-866

McShane R, Areosa Sastre A, Minakaran N (2006): Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2, 003154

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995): Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50, 83-90

Mechoulam R, Gaoni Y (1965): A Total Synthesis of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* 87, 3273-3275

Mechoulam R, Gaoni Y (1967): The absolute configuration of Δ^1 -tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett* 12, 1109-1111

Mechoulam R, Hanus LO, Pertwee R, Howlett AC (2014): Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci* 15, 757-764

Medeiros R, LaFerla FM (2013): Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol* 239, 133-138

Meißner JN, Bouter Y, Bayer TA (2015): Neuron Loss and Behavioral Deficits in the TBA42 Mouse Model Expressing N-Truncated Pyroglutamate Amyloid-beta₃₋₄₂. *J Alzheimers Dis* 45, 471-482

Melnikova I (2007): Therapies for Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov* 6, 341-342

Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Biemann K, Iqbal K (1993): Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 301, 41-52

Milton NG (2002): Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid-beta peptide. *Neurosci Lett* 332, 127-130

Mitchell AJ (2009): CSF phosphorylated tau in the diagnosis and prognosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a meta-analysis of 51 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80, 966-975

Mo JA, Lim JH, Sul AR, Lee M, Youn YC, Kim HJ (2015): Cerebrospinal fluid beta-amyloid1-42 levels in the differential diagnosis of Alzheimer's disease--systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 10, e0116802

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

Morales P, Hurst DP, Reggio PH (2017): Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. *Prog Chem Org Nat Prod* 103, 103-131

Morris JC, Heyman A, Mohs RC, Hughes JP, van Belle G, Fillenbaum G, Mellits ED, Clark C (1989): The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 39, 1159-1165

Morris R (1984): Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47-60

Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Clark C, Green R, et al. (1995): Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 38, 643-648

Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000): High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20, 4050-4058

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

Murray EA, Bussey TJ, Hampton RR, Saksida LM (2000): The parahippocampal region and object identification. *Ann N Y Acad Sci* 911, 166-174

Nagele RG, D'Andrea MR, Anderson WJ, Wang HY (2002): Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 110, 199-211

Narushima M, Uchigashima M, Hashimoto K, Watanabe M, Kano M (2006): Depolarization-induced suppression of inhibition mediated by endocannabinoids at synapses from fast-spiking interneurons to medium spiny neurons in the striatum. *Eur J Neurosci* 24, 2246-2252

Literaturverzeichnis

- Naslund J, Jensen M, Tjernberg LO, Thyberg J, Terenius L, Nordstedt C (1994): The metabolic pathway generating p3, an A beta-peptide fragment, is probably non-amyloidogenic. *Biochem Biophys Res Commun* 204, 780-787
- Navarrete M, Araque A (2008): Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57, 883-893
- Navarrete M, Diez A, Araque A (2014): Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130599
- Navarro M, Hernandez E, Munoz RM, del Arco I, Villanua MA, Carrera MR, Rodriguez de Fonseca F (1997): Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport* 8, 491-496
- Nemanic S, Alvarado MC, Bachevalier J (2004): The hippocampal/parahippocampal regions and recognition memory: insights from visual paired comparison versus object-delayed nonmatching in monkeys. *J Neurosci* 24, 2013-2026
- Nestor SM, Rupsingh R, Borrie M, Smith M, Accomazzi V, Wells JL, Fogarty J, Bartha R, Alzheimer's Disease Neuroimaging I (2008): Ventricular enlargement as a possible measure of Alzheimer's disease progression validated using the Alzheimer's disease neuroimaging initiative database. *Brain* 131, 2443-2454
- Newman M, Ebrahimie E, Lardelli M (2014): Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Front Genet* 5, 189
- Ni X, Geller EB, Eppihimer MJ, Eisenstein TK, Adler MW, Tuma RF (2004): Win 55212-2, a cannabinoid receptor agonist, attenuates leukocyte/endothelial interactions in an experimental autoimmune encephalomyelitis model. *Mult Scler* 10, 158-164
- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO (2003): Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9, 448-452
- Nichols E, Collaborators GBDD (2019): Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 18, 88-106
- Nunan J, Small DH (2000): Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett* 483, 6-10
- Nunez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, Gonzalez S, Tolon RM, Romero J (2004): Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53, 208-213
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, van Eldik L, 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

Literaturverzeichnis

- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003): Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409-421
- Oddo S, Caccamo A, Smith IF, Green KN, LaFerla FM (2006): A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of Abeta. *Am J Pathol* 168, 184-194
- Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M (2001): Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29, 729-738
- Olson MI, Shaw CM (1969): Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism. *Brain* 92, 147-156
- Onaivi ES, Green MR, Martin BR (1990): Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *J Pharmacol Exp Ther* 253, 1002-1009
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, et al. (2006): Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci* 1074, 514-536
- Opattova A, Filipcik P, Cente M, Novak M (2013): Intracellular degradation of misfolded tau protein induced by geldanamycin is associated with activation of proteasome. *J Alzheimers Dis* 33, 339-348
- Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, Jouanny P, Dubois B, Eisner L, Flitman S, et al. (2003): Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61, 46-54
- Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR (1996): Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* 17, 553-565
- Pasquier F, Boulogne A, Leys D, Fontaine P (2006): Diabetes mellitus and dementia. *Diabetes Metab* 32 (5 Pt 1), 403-414
- Paxinos G, Franklin KBJ: *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2. Auflage; Academic Press, San Diego (CA) 2001
- Pertwee RG (1997): Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 74, 129-180
- Pertwee RG (2006): Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, 163-171
- Pertwee RG (2008): Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol* 13, 147-159
- Pertwee RG, Ross RA (2002): Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66, 101-121
- Pike CJ, Cummings BJ, Cotman CW (1995): Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 132, 172-179

Literaturverzeichnis

- Pike CJ, Overman MJ, Cotman CW (1995): Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J Biol Chem* 270, 23895-23898
- Piomelli D (2003): The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4, 873-884
- Pisanti S, Bifulco M (2017): Modern History of Medical Cannabis: From Widespread Use to Prohibitionism and Back. *Trends Pharmacol Sci* 38, 195-198
- Pitler TA, Alger BE (1992): Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 12, 4122-4132
- Plasse TF, Gorter RW, Krasnow SH, Lane M, Shepard KV, Wadleigh RG (1991): Recent clinical experience with dronabinol. *Pharmacol Biochem Behav* 40, 695-700
- Potkin SG (2002): The ABC of Alzheimer's disease: ADL and improving day-to-day functioning of patients. *Int Psychogeriatr* 14 Suppl 1, 7-26
- Prusky GT, Douglas RM, Nelson L, Shabanpoor A, Sutherland RJ (2004): Visual memory task for rats reveals an essential role for hippocampus and perirhinal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5064-5068
- Pryce G, Ahmed Z, Hankey DJ, Jackson SJ, Croxford JL, Pocock JM, Ledent C, Petzold A, Thompson AJ, Giovannoni G, et al. (2003): Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. *Brain* 126 (Pt 10), 2191-2202
- Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A (2009): Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* 12, 1152-1158
- Qi-Takahara Y, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Dolios G, Hirotani N, Horikoshi Y, Kametani F, Maeda M, Saido TC, Wang R, et al. (2005): Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci* 25, 436-445
- Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E (2009): Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention Dialogues. *Clin Neurosci* 11, 111-128
- Quental NBM, Brucki SMD, Bueno OFA (2009): Visuospatial function in early Alzheimer's disease: Preliminary study. *Dement Neuropsychol* 3, 234-240
- Raber J, Wong D, Yu GQ, Buttini M, Mahley RW, Pitas RE, Mucke L (2000): Apolipoprotein E and cognitive performance. *Nature* 404, 352-354
- Ramakers IH, Verhey FR, Scheltens P, Hampel H, Soininen H, Aalten P, Rikkert MO, Verbeek MM, Spuru L, Blennow K, et al. (2013): Anxiety is related to Alzheimer cerebrospinal fluid markers in subjects with mild cognitive impairment. *Psychol Med* 43, 911-920

Literaturverzeichnis

- Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML (2005): Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 25, 1904-1913
- Randall MD, Harris D, Kendall DA, Ralevic V (2002): Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol Ther* 95, 191-202
- Reger ML, Hovda DA, Giza CC (2009): Ontogeny of Rat Recognition Memory measured by the novel object recognition task. *Dev Psychobiol* 51, 672-678
- Reiman EM, Quiroz YT, Fleisher AS, Chen K, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M, Fagan AM, Shah AR, Alvarez S, Arbelaez A, et al. (2012): Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: a case-control study. *Lancet Neurol* 11, 1048-1056
- Roberts SB, Ripellino JA, Ingalls KM, Robakis NK, Felsenstein KM (1994): Non-amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase. *J Biol Chem* 269, 3111-3116
- Robinson M, Lee BY, Hane FT (2017): Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *J Alzheimers Dis* 57, 317-330
- Rocca WA, Hofman A, Brayne C, Breteler MM, Clarke M, Copeland JR, Dartigues JF, Engedal K, Hagnell O, Heeren TJ, et al. (1991): Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group. *Ann Neurol* 30, 381-390
- Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM (2001): Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci* 21, 823-833
- Rodriguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhratsky A (2016): Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 323, 170-182
- Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Wolkow C, Wang R, Cotter RJ, Reardon IM, Zurcher-Neely HA, Heinrikson RL, Ball MJ, et al. (1993): Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 268, 3072-3083
- Romero J, Lastres-Becker I, de Miguel R, Berrendero F, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J (2002): The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia. biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Pharmacol Ther* 95, 137-152
- Rossi S, Motta C, Musella A, Centonze D (2015): The interplay between inflammatory cytokines and the endocannabinoid system in the regulation of synaptic transmission. *Neuropharmacology* 96 (Pt A), 105-112
- Rosler M, Zarski R, Bohl J, Ohm TG (2002): Stage-dependent and sector-specific neuronal loss in hippocampus during Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103, 363-369

Literaturverzeichnis

- Rubino T, Realini N, Braidà D, Guidi S, Capurro V, Vigano D, Guidali C, Pinter M, Sala M, Bartesaghi R, et al. (2009): Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus* 19, 763-772
- Rubino T, Sala M, Vigano D, Braidà D, Castiglioni C, Limonta V, Guidali C, Realini N, Parolaro D (2007): Cellular mechanisms underlying the anxiolytic effect of low doses of peripheral Delta9-tetrahydrocannabinol in rats. *Neuropsychopharmacology* 32, 2036-2045
- Russo EB, Jiang HE, Li X, Sutton A, Carboni A, del Bianco F, Mandolino G, Potter DJ, Zhao YX, Bera S, et al. (2008): Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *J Exp Bot* 59, 4171-4182
- Ruthirakuhan M, Lanctot 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
- Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007): The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152, 1092-1101
- Saido T, Leissring MA (2012): Proteolytic degradation of amyloid beta-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006379
- Salio C, Doly S, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M (2002): Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 329, 13-16
- Sasaguri H, Nilsson P, Hashimoto S, Nagata K, Saito T, De Strooper B, Hardy J, Vassar R, Winblad B, Saido TC (2017): APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J* 36, 2473-2487
- Sathianathan R, Kantipudi SJ (2018): The dementia epidemic: Impact, prevention, and challenges for India. *Indian J Psychiatry* 60, 165-167
- Scallet AC (1991): Neurotoxicology of cannabis and THC: a review of chronic exposure studies in animals. *Pharmacol Biochem Behav* 40, 671-676
- Scallet AC, Uemura E, Andrews A, Ali SF, McMillan DE, Paule MG, Brown RM, Slikker W, Jr. (1987): Morphometric studies of the rat hippocampus following chronic delta-9-tetrahydrocannabinol (THC). *Brain Res* 436, 193-198
- 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
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, et al. (1996): Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2, 864-870

Literaturverzeichnis

- Schilling S, Hoffmann T, Manhart S, Hoffmann M, Demuth HU (2004): Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett* 563, 191-196
- Schmid K, Niederhoffer N, Szabo B (2003): Analysis of the respiratory effects of cannabinoids in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 368, 301-308
- Schmidtke K, Otto M: Alzheimer-Demenz. In: Wallesch CW, Förstl H (Hrsg.): *Demenzen*. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012, 203-227
- Schmitz C, Hof PR (2005): Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130, 813-831
- Schramm-Sapota NL, Cha YM, Chaudhry S, Wilson WA, Swartzwelder HS, Kuhn CM (2007): Differential anxiogenic, aversive, and locomotor effects of THC in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology (Berl)* 191, 867-877
- 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 (1998): The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8, 447-453
- Selkoe DJ (2001): Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis* 3, 75-80
- Selkoe DJ (2002): Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789-791
- Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, Oltersdorf T (1988): Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7341-7345
- Senior K (2002): Dosing in phase II trial of Alzheimer's vaccine suspended. *Lancet Neurol* 1, 3
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011): Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, a006189
- Sevigny J, Chiao P, Bussiere T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y, et al. (2016): The antibody aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 537, 50-56
- Shadfar S, Hwang CJ, Lim MS, Choi DY, Hong JT (2015): Involvement of inflammation in Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic potential of anti-inflammatory agents. *Arch Pharm Res* 38, 2106-2119
- Sharma P, Murthy P, Bharath MM (2012): Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: clinical implications. *Iran J Psychiatry* 7, 149-156
- Shelef A, Barak Y, Berger U, Paleacu D, Tadger S, Plopsky I, Baruch Y (2016): Safety and Efficacy of Medical Cannabis Oil for Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia: An-Open Label, Add-On, Pilot Study. *J Alzheimers Dis* 51, 15-19

Literaturverzeichnis

- Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA (1996): Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 16, 4322-4334
- Shen M, Thayer SA (1998): Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. *Mol Pharmacol* 54, 459-462
- Shen M, Thayer SA (1999): Delta9-tetrahydrocannabinol acts as a partial agonist to modulate glutamatergic synaptic transmission between rat hippocampal neurons in culture. *Mol Pharmacol* 55, 8-13
- 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
- Shore DM, Reggio PH (2015): The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55. *Front Pharmacol* 6, 69
- Sichler ME, Low MJ, Schleicher EM, Bayer TA, Bouter Y (2019): Reduced Acoustic Startle Response and Prepulse Inhibition in the Tg4-42 Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis Rep* 3, 269-278
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, et al. (1999): Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540
- Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL (1990): Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248, 492-495
- Sjoden PO, Jarbe TU, Henriksson BG (1973): Effects of long-term administration and withdrawal of tetrahydrocannabinols (delta 8-THC and delta 9-THC) on open-field behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1, 243-249
- Sofroniew MV (2009): Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32, 638-647
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010): Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7-35
- 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
- St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D, et al. (1987): The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235, 885-890
- Stern Y (2006): Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20 Suppl 2, 69-74
- Stover KR, Campbell MA, van Winssen CM, Brown RE (2015): Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 289, 29-38

Literaturverzeichnis

- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, et al. (1997): Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13287-13292
- Suarez I, Bodega G, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, Fernandez B (2000): Neuronal and astroglial response to pre- and perinatal exposure to delta-9-tetra- hydrocannabinol in the rat substantia nigra. *Dev Neurosci* 22, 253-263
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995): 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 89-97
- Suliman NA, Taib CNM, Moklas MAM, Basir R (2018): Delta-9-Tetrahydrocannabinol ((9)-THC) Induce Neurogenesis and Improve Cognitive Performances of Male Sprague Dawley Rats. *Neurotox Res* 33, 402-411
- Sunderland T, Linker G, Mirza N, Putnam KT, Friedman DL, Kimmel LH, Bergeson J, Manetti GJ, Zimmermann M, Tang B, et al. (2003): Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 289, 2094-2103
- Takao K, Miyakawa T (2006): Light/dark transition test for mice. *J Vis Exp* 1, 104
- Takashima A (2010): Tau aggregation is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 7, 665-669
- Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, Graham SM, McDonald S, Gergel I, Memantine Study G (2004): Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *JAMA* 291, 317-324
- 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
- Touw M (1981): The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs* 13, 23-34
- Trojanowski JQ, Clark CM, Arai H, Lee VM (1999): Elevated levels of tau in cerebrospinal fluid: implications for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease elevated levels of tau in cerebrospinal fluid: implications for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 1, 297-305
- van Cauwenberghe C, van Broeckhoven C, Sleegers K (2016): The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genet Med* 18, 421-430
- van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, van Ginneken C, van Meir F, De Deyn PP (2003): Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur J Neurosci* 17, 388-396

Literaturverzeichnis

- van den Elsen GA, Ahmed AI, Verkes RJ, Kramers C, Feuth T, Rosenberg PB, van der Marck MA, Olde Rikkert MG (2015): Tetrahydrocannabinol for neuropsychiatric symptoms in dementia: A randomized controlled trial. *Neurology* 84, 2338-2346
- van den Elsen GA, Tobben L, Ahmed AI, Verkes RJ, Kramers C, Marijnissen RM, Olde Rikkert MG, van der Marck MA (2017): Effects of tetrahydrocannabinol on balance and gait in patients with dementia: A randomised controlled crossover trial. *J Psychopharmacol* 31, 184-191
- van der Stelt M, Veldhuis WB, Bar PR, Veldink GA, Vliementhart JF, Nicolay K (2001): Neuroprotection by Delta9-tetrahydrocannabinol, the main active compound in marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity. *J Neurosci* 21, 6475-6479
- van Duijn CM, Clayton D, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Heyman A, Jorm AF, Kokmen E, Kondo K, Mortimer JA, et al. (1991): Familial aggregation of Alzheimer's disease and related disorders: a collaborative re-analysis of case-control studies. *Int J Epidemiol* 20 Suppl 2, 13-20
- Varvel SA, Anum E, Niyuhire F, Wise LE, Lichtman AH (2005): Delta(9)-THC-induced cognitive deficits in mice are reversed by the GABA(A) antagonist bicuculline. *Psychopharmacology (Berl)* 178, 317-327
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, et al. (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741
- Veitenhansl M, Stegner K, Hierl FX, Dieterle C, Feldmeier H, Gutt B, Landgraf R, Garrow AP, Vileikyte L, Findlow A, et al. (2004): 40(th) EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes : Munich, Germany, 5-9 September 2004. *Diabetologia* 47 Suppl 1, 1-464
- 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
- von Strauss E, Viitanen M, De Ronchi D, Winblad B, Fratiglioni L (1999): Aging and the occurrence of dementia: findings from a population-based cohort with a large sample of nonagenarians. *Arch Neurol* 56, 587-592
- Vorhees CV, Williams MT (2006): Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1, 848-858
- Wagner JM, Sichler ME, Schleicher EM, Franke TN, Irwin C, Low 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, 322-328
- Walther S, Mahlberg R, Eichmann U, Kunz D (2006): Delta-9-tetrahydrocannabinol for nighttime agitation in severe dementia. *Psychopharmacology (Berl)* 185, 524-528

Literaturverzeichnis

- Wang D, Noda Y, Zhou Y, Mouri A, Mizoguchi H, Nitta A, Chen W, Nabeshima T (2007): The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid25-35 i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology* 32, 1261-1271
- Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM (1999): The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol* 158, 328-337
- Wang Z, Ma C, Han H, He R, Zhou L, Liang R, Yu H (2018): Caregiver burden in Alzheimer's disease: Moderation effects of social support and mediation effects of positive aspects of caregiving. *Int J Geriatr Psychiatry* 33, 1198-1206
- Waters J (2010): The concentration of soluble extracellular amyloid-beta protein in acute brain slices from CRND8 mice. *PLoS One* 5, e15709
- Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Frackowiak J, Mazur-Kolecka B, Imaki H, Wegiel J, Mehta PD, Silverman WP, Reisberg B, et al. (2007): Intraneuronal Abeta immunoreactivity is not a predictor of brain amyloidosis-beta or neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol* 113, 389-402
- Weiler M, Agosta F, Canu E, Copetti M, Magnani G, Marcone A, Pagani E, Balthazar ML, Comi G, Falini A, et al. (2015): Following the Spreading of Brain Structural Changes in Alzheimer's Disease: A Longitudinal, Multimodal MRI Study. *J Alzheimers Dis* 47, 995-1007
- Weiner MF, Neubecker KE, Bret ME, Hynan LS (2008): Language in Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 69, 1223-1227
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975): A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1858-1862
- Welge V, Fiege O, Lewczuk P, Mollenhauer B, Esselmann H, Klafki HW, Wolf S, Trenkwalder C, Otto M, Kornhuber J, et al. (2009): Combined CSF tau, p-tau181 and amyloid-beta 38/40/42 for diagnosing Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 116, 203-212
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC (1994): Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344, 769-772
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (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
- Wilson CA, Doms RW, Lee VM (1999): Intracellular APP processing and A beta production in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 787-794
- Wilson RI, Nicoll RA (2001): Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410, 588-592
- Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ (2008): Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 1055-1070

Literaturverzeichnis

- Wirhth O, Multhaup G, Bayer TA (2004): A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. *J Neurochem* 91, 513-520
- Wirhth O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA (2001): Intraneuronal A β accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 306, 116-120
- Wisniewski HM, Wen GY (1985): Substructures of paired helical filaments from Alzheimer's disease neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol* 66, 173-176
- Wisniewski T, Ghiso J, Frangione B (1991): Peptides homologous to the amyloid protein of Alzheimer's disease containing a glutamine for glutamic acid substitution have accelerated amyloid fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun* 179, 1247-1254
- Wittnam JL, Portelius E, Zetterberg H, Gustavsson MK, Schilling S, Koch B, Demuth HU, Blennow K, Wirhth O, Bayer TA (2012): Pyroglutamate amyloid beta (A β) aggravates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287, 8154-8162
- Wolf SA, Bick-Sander A, Fabel K, Leal-Galicia P, Tauber S, Ramirez-Rodriguez G, Muller A, Melnik A, Waltinger TP, Ullrich O, et al. (2010): Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. *Cell Commun Signal* 8, 12
- Woodward MR, Harper DG, Stolyar A, Forester BP, Ellison JM (2014): Dronabinol for the treatment of agitation and aggressive behavior in acutely hospitalized severely demented patients with noncognitive behavioral symptoms. *Am J Geriatr Psychiatry* 22, 415-419
- Wu J, Bie B, Yang H, Xu JJ, Brown DL, Naguib M (2013): Activation of the CB2 receptor system reverses amyloid-induced memory deficiency. *Neurobiol Aging* 34, 791-804
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J (2003): Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9, 453-457
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, et al. (1999): Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533-537
- Yang AJ, Chandswangbhuvana D, Margol L, Glabe CG (1998): Loss of endosomal/lysosomal membrane impermeability is an early event in amyloid A β 1-42 pathogenesis. *J Neurosci Res* 52, 691-698
- Younkin SG (1995): Evidence that A β 42 is the real culprit in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 37, 287-288
- Younkin SG (1998): The role of A β 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris* 92, 289-292
- Zanetti O, Solerte SB, Cantoni F (2009): Life expectancy in Alzheimer's disease (AD). *Arch Gerontol Geriatr* 49 Suppl 1, 237-243

Literaturverzeichnis

Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A (2002): Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J Cell Biol* 156, 519-529

Zheng L, Cedazo-Minguez A, Hallbeck M, Jerhammar F, Marcusson J, Terman A (2012): Intracellular distribution of amyloid beta peptide and its relationship to the lysosomal system. *Transl Neurodegener* 1, 19

Danksagung

Mein größter Dank gilt Frau PD Dr. Yvonne Bouter, welche mir von Beginn meiner Doktorarbeit an mit Rat und Tat zu Seite stand, immer präsent war und bei Fragen jederzeit ein offenes Ohr hatte. Die Forschungsarbeit im Labor hat mir großen Spaß bereitet, nicht zuletzt weil ich mich gut aufgehoben und betreut gefühlt habe. Weiterhin möchte ich Professor Bayer danken, welcher zu Anfang mein Doktorvater war und mir zusammen mit Frau Dr. Bouter die Arbeit an dieser Dissertation ermöglicht hat.

Der Laboralltag hat mich über viele Monate begleitet und wurde insbesondere durch unser Team zu einem Ort, an welchem ich mich stets gern aufgehalten habe. Besonders herausheben möchte ich meine enge Zusammenarbeit mit Idil Ertin, Eva Schleicher und Frederik Ott. Mit Letzteren durfte ich eine wunderbare Zeit in Wien zu einem Kongressbesuch verbringen, welcher mir in Erinnerung bleiben wird.

Diese wenigen Zeilen reichen nicht, um meine tiefe Dankbarkeit für die fachliche und zwischenmenschliche Unterstützung auszudrücken, die ich während meiner Arbeit an dieser Dissertation erfahren durfte. Ich werde sie nie vergessen.