

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

Analyse der Wirkung von Cannabinoiden auf die synaptische  
Transmission im Caudato-Putamen transgener Mäuse

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg i.Br.

Vorgelegt 2008

von Alexandra Anton  
geboren in Freiburg i.Br.

**Dekan:** Prof. Dr. C. Peters

**1. Gutachter:** Prof. Dr. B. Szabo

**2. Gutachter:** Prof. Dr. G. Nikkhah

**Jahr der Promotion:** 2009

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ACEA</b>	Arachidonyl-2'-chloroethylamid
<b>ACPA</b>	Arachidonylcyclopropylamid
<b>ACSF</b>	Artifizielle, cerebrospinale Flüssigkeit
<b>AIDS</b>	Acquired immune deficiency syndrom
<b>AM251</b>	1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-1-piperidinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide
<b>AM630</b>	[6-Iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1 <i>H</i> -indol-3-yl](4-methoxyphenyl)methanone
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
<b>AP5</b>	DL-2-Amino-5-phosphonvaleriansäure
<b>ATP</b>	Adenosin-5'-triphosphat
<b>BAC</b>	bacterial artificial chromosome
<b>Baclo</b>	Baclofen
<b>Bic</b>	Bicucullin
<b>cAMP</b>	cyclisches Adenosin-mono-phosphat
<b>CB</b>	Cannabinoid
<b>CBD</b>	Cannabidiol
<b>ChAT</b>	Cholin-Acetyl-Transferase
<b>CP55940</b>	(-)-cis-3-[2-Hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)phenyl]- <i>trans</i> -4-(3-hydroxypropyl)cyclohexanol
<b>DA</b>	Dopamin
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNQX</b>	6,7Dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione
<b>EGFP</b>	enhanced green fluorescent protein
<b>EGTA</b>	Ethylenglykol-bis-( $\beta$ -Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<b>FAAH</b>	Fatty acid amide hydrolase
<b>FSN</b>	Fast-spiking-Neuron
<b>GABA</b>	$\gamma$ -Aminobuttersäure
<b>GTP</b>	Guanosin-5'-triphosphat
<b>HEPES</b>	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid
<b>HU-210</b>	(6aR- <i>trans</i> -3-(1,1-Dimethylheptyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-9-methanol
<b>HU-308</b>	{4-[4-(1,1-dimethylheptyl)-2,6-dimethoxy-phenyl]-6,6-dimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-2-en-2-yl}-methanol

## Abkürzungsverzeichnis

<b>IPSC</b>	Inhibitorischer postsynaptischer Strom
<b>JWH-133</b>	(6aR,10aR)-3-(1,1-Dimethylbutyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran
<b>JWH-139</b>	3-(1,1-dimethylpropyl)-6,6,9-trimethyl-6a,7,10,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromene
<b>L-759633</b>	(6aR,10aR)-3-(1,1-dimethylheptyl)-1-methoxy-6,6,9-trimethyl-6a,7,10,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromene
<b>L-759656</b>	(6aR,10aR)-3-(1,1-dimethylheptyl)-1-methoxy-6,6-dimethyl-9-methylene-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-6H-benzo[c]chromene
<b>LY320135</b>	[6-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)benzo[b][thien-3-yl][4-cyanophenyl]methanone
<b>mIPSC</b>	Miniatur inhibitorischer postsynaptischer Strom
<b>MSN</b>	Medium-spiny-Neuron
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>O-1057</b>	3-(5'-Cyano-1'1'-dimethylpentyl)-1-(4-morpholinobutyryloxy)- $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol-HCl
<b>O-1812</b>	(R)-(20-cyano-16,16-dimethyldocosa-cis-5,8,11,14-tetraeno)-1'-hydroxy-2'-propylamine
<b>PLTS</b>	Persistent and low-threshold spike
<b>PRE</b>	initialer Referenzwert der Parameter vor Substanzgabe
<b>PSC</b>	Postsynaptischer Strom
<b>QX314</b>	N-Ethylidocain-HCl
<b>RIM</b>	Rimonabant = SR141716A
<b>S.E.M</b>	Standardfehler
<b>sIPSC</b>	Spontaner inhibitorischer postsynaptischer Strom
<b>SOL</b>	Solvent
<b>SR141716A</b>	N-Piperidino-5-(4-chlorphenyl)-1-(2,4-dichlorphenyl)-4-methyl-3-pyrazolcarboxamid-HCl
<b>SR144528</b>	N-[(1S)-endo-1,3,3-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl]-5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-(4-methylbenzyl)-pyrazol-3-carboxamid]
<b>TTX</b>	Tetrodotoxin
<b>WIN55212-2</b>	(R)-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphtalenylmethanon mesylat
<b><math>\Delta^8</math>-THC</b>	$\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol
<b><math>\Delta^9</math>-THC</b>	(-)- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	
1.1. Die Hanfpflanze	1
1.2. Die Cannabinoidrezeptoren	4
1.2.1. Aufbau der Cannabinoidrezeptoren	4
1.2.2. Lokalisation der Cannabinoidrezeptoren	5
1.3. Beeinflussung der Signalübertragung durch CB <sub>1</sub> -Rezeptoren	9
1.4. Klassifikation von Cannabinoidrezeptorliganden	11
1.4.1. Cannabinoidrezeptoragonisten	11
1.4.1.1. Klassische Cannabinoide	11
1.4.1.2. Nicht-klassische Cannabinoide	12
1.4.1.3. Aminoalkylindole	13
1.4.1.4. Eicosanoide	14
1.4.2. Cannabinoidrezeptorantagonisten, inverse Agonisten	15
1.4.2.1. Diarylpyrazole	15
1.4.2.2. Weitere Antagonisten / inverse Agonisten	16
1.5. Die Basalganglien	17
1.6. Neurone des Caudato-Putamen	19
1.6.1. Projektionsneurone	19
1.6.2. Interneurone	19
1.6.2.1. Parvalbumin-positive fast-spiking-Neurone (PV-FSN)	19
1.6.2.2. Persistent and low-threshold spike cells (PLTS-Zellen)	20
1.6.2.3. Long-lasting afterhyperpolarisation cells (LA-Zellen)	20
1.6.3. Rolle der PV-FSNs	20
1.7. Ziel der Arbeit	22
<b>2. Material und Methoden</b>	23
2.1. Hirnschnitte	23
2.2. Patch-clamp-Aufnahmetechnik	27
2.3. Veranschaulichung von synaptisch verbundenen Neuronen im Hirnschnitt	29
2.4. Aufzeichnungsmethodik	30
2.4.1. Aufzeichnung der synaptischen Transmission zwischen Neuronenpaaren	30
2.4.2. Registrierung von miniatur inhibitorischen postsynaptischen Strömen (mIPSCs) in MSNs	32

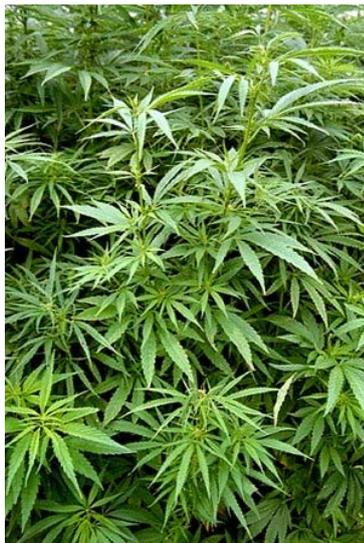
## Inhaltsverzeichnis

2.4.3. Registrierung von Membranpotential, Haltestrom und von durch Depolarisierung verursachte Aktionspotentiale in PV- FSN	33
2.4.4. Protokolle und Statistik	33
2.5. Substanzen	34
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1 Charakterisierung von PV-FSN und MSN	36
3.2. Synaptische Transmission zwischen PV-FSNs und MSNs	39
3.2.1. Charakterisierung der synaptischen Transmission	39
3.2.2. Cannabinoide hemmen die synaptische Transmission	43
3.2.3. Cannabinoide hemmen die synaptische Transmission präsy- naptisch	46
3.2.4. Cannabinoide haben keinen somatodendritische Wirkung auf PV-FSNs	48
3.2.5. Effekte auf die synaptische Transmission durch Depolarisation des postsynaptischen Neurons	50
3.3. Synaptische Transmission zwischen rekurrenten Axonkollateralen von MSNs und MSNs	53
3.3.1. Charakterisierung der synaptischen Transmission	53
3.3.2. Cannabinoide hemmen die synaptische Transmission	53
3.3.3. Cannabinoide haben keinen somatodendritischen Effekt auf MSNs	56
<b>4. Diskussion</b>	<b>58</b>
4.1. Synaptische Verbindungen zwischen identifizierten Neuronen im Cau- dato-Putamen	58
4.2. Aktivierung von CB <sub>1</sub> -Rezeptoren hemmt die synaptische Transmission	59
4.3. Die synaptische Transmission wird präsynaptisch gehemmt	60
4.4. Selektive präsynaptische Cannabinoidwirkung bei fehlenden somato- dendritischen Wirkung	61
4.5. Die Rolle der CB <sub>1</sub> -Rezeptoren in den Basalganglien	62
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>64</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>74</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>75</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Hanfpflanze

Die Hanfpflanze, *Cannabis sativa* (Abb.1.1), gehört zu der Gattung der Hanfgewächse. Die Leitcannabinoide der Pflanze sind das  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Abb. 1.5) und das Cannabidiol (CBD). Je nach deren Gehalt, kann zwischen den einzelnen Züchtungen unterschieden werden. So enthält der Faserhanf, der zur Produktion von Fasern und Ölen gezüchtet wird, hauptsächlich CBD und nur < 0,3% THC. Der Drogenhanf, früher auch als „indischer Hanf“ bezeichnet, welcher der Produktion von Marihuana (getrocknete Blätter und Blüten) und Haschisch (Harz, Harzdrüsen) dient, enthält dahingegen 1-20% THC. Das  $\Delta^9$ -THC ist die psychoaktive Substanz der Hanfpflanze.



**Abbildung 1.1. Hanfpflanze *Cannabis sativa***

Der Ursprung der Hanfpflanze liegt in Zentralasien. Eine exakte Zeitangabe, was die Entdeckung der Cannabispflanze als Heilpflanze betrifft, ist nicht möglich. Um 800 v. Chr. ist die Hanfpflanze von China nach Indien gelangt. Dort wurde ihre berausende Wirkung für Kulthandlungen, ihre heilende Wirkung gegen Katarrh und ihre betäubende Wirkung zur Anästhesie genutzt (Grotenhermen 2004).

Aus dem 7. Jahrhundert v. Chr. gibt es Aufzeichnungen von den Assyrern, die die medizinische Anwendung von Hanf beschreiben (Grotenhermen 2004).

In Persien und Tibet soll Cannabis bereits zu den Zeiten Buddhas (um 500 v. Chr.) als Anästhetikum verwendet worden sein (Grotenhermen 2004).

In alten chinesischen und ägyptischen Dokumenten wird berichtet, dass der chinesische Arzt Hua t'uo um 200 n. Chr. ein Hanfpräparat namens „Ma-jo“ zur Anästhesie bei chirurgischen Eingriffen verwendet haben soll (Grotenhermen 2004).

Auch in der Antike war Cannabis als Heil- und Nutzpflanze bekannt. So wird vermutet, dass das von Homer beschriebene Nepenthes ein Hanfpräparat war. Antike Ärzte wie Dioskurides und Galen beschreiben Wirkungen und Nebenwirkungen des Hanfs (Grotenhermen 2004).

Mit der Übersetzung von antiken Schriften in das Arabische erhielt die medizinische Anwendung von Hanf Einzug in die arabisch-islamische Welt. Avicenna, ein berühmter arabischer Mediziner, erwähnt den Hanf in seiner Schrift „Canon medicinae“ (Grotenhermen 2004).

Unter Karl des Großen wurde im 8. Jahrhundert die Hanfpflanze kultiviert. Sie wurde gegen Gelbsucht, Husten, Gichtknoten und andere Geschwülste eingesetzt (Grotenhermen 2004).

Die deutsche Äbtissin Hildegard von Bingen beschäftigte sich um 1150 ausführlich mit der Hanfpflanze als Heilmittel und beschrieb dies in ihrer Heilmittel- und Naturlehre „Physica“ (Grotenhermen 2004).

In den folgenden Jahrhunderten wurde Hanf weiterhin als Heilpflanze verwendet und wird häufig in Kräuterbüchern erwähnt. Otto Brunfels, Hieronymus Bock und Leonard Fuchs beschrieben ihre Wirkung (Grotenhermen 2004).

Im 18. Jahrhundert wurde der „indische Hanf“, Cannabis indica, in Europa eingeführt. Aufgrund der berauschenden Wirkung stand man diesem skeptisch gegenüber. Es dauerte bis ins 19. Jahrhundert bis der indische Hanf als Heilpflanze in der Schulmedizin anerkannt wurde. Im Jahre 1839 veröffentlichte der in Kalkutta stationierte irische Arzt William B. O'Shaughnessy eine Studie über Einsatzgebiete des indischen Hanfs. Er verwendete ihn gegen Rheumatismus, Tollwut, Cholera, Starrkrampf, Krämpfe und Delirium tremens. Diese Ergebnisse verhalfen dem indischen Hanf zu einem Aufschwung in Europa. Er wurde nun auch dort gegen Cholera, Pest, Tetanus, psychiatrische Erkrankungen und Asthma eingesetzt (Grotenhermen 2004).

Ab Mitte des 19. Jahrhunderts wurden Cannabismedikamente industriell gefertigt. Die meisten Präparate waren zur äußeren Anwendung bestimmt, andere wurden

inhaliert. Ab der Mitte des 20. Jahrhunderts nahm die Bedeutung von Cannabis in der Medizin deutlich ab. Für viele der bis dahin mit Cannabis behandelten Erkrankungen wurden Impfstoffe, Chemotherapeutika und andere chemische Substanzen entwickelt. Hinzu kam, dass Cannabis-Medikamente nach und nach dem Betäubungsmittelgesetz unterlagen, was ihre Anwendung in der Praxis erschwerte (Grotenhermen 2004).

Die heutzutage in den USA zugelassenen Medikamente Marinol<sup>®</sup> ( $\Delta^9$ -THC) und Cesamet<sup>®</sup> (Nabilon) sind für die Indikationen Übelkeit und Erbrechen im Rahmen einer Krebsbehandlung und Marinol<sup>®</sup> zudem für Anorexie und Kachexie bei HIV/AIDS zugelassen.

Es zeigen sich in verschiedenen Studien weitere Möglichkeiten des Einsatzes von Cannabinoiden. Es konnte gezeigt werden, dass Cannabinoidrezeptoragonisten einen positiven Einfluss auf Schmerzzustände (Pertwee 2001; Holdcroft et al., 2006), Bewegungsstörungen (z.B. in Zusammenhang mit Multipler Sklerose (Pertwee 2002), Rückenmarksverletzungen (Consroe et al., 1998), Tourettsyndrom (Müller-Vahl et al., 1999, 2002) oder Dyskinesien bei M. Parkinson (Sieradzan et al., 2001)), Glaukom (Tomida et al., 2004), Krebs (Guzmán 2003), Autoimmunerkrankungen (Yuan et al., 2002; Zurier et al., 2003), Neuroprotektion (Hampson et al., 1998) und Blutdruckstörungen (u.a. Niederhoffer & Szabo, 2000) haben. Bei dem Cannabinoidrezeptorantagonisten Rimonabant konnte ein positiver Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko bei Übergewicht gezeigt werden (Van Gaal et al., 2005; Després et al., 2005).

## 1.2 Die Cannabinoidrezeptoren

Die natürlichen Cannabinoide wirken über spezifische Rezeptoren, die Cannabinoidrezeptoren. Cannabinoidrezeptoren werden in CB<sub>1</sub>- und CB<sub>2</sub>- Rezeptoren unterteilt, wobei die Zahlen die Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung widerspiegeln. Diese beiden Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz, in ihrem Mechanismus der Signalübertragung und in ihrer Lokalisation in verschiedenen Geweben. Des Weiteren wurden Agonisten und Antagonisten, die selektiv für die einzelnen Rezeptoren sind, entwickelt (Abb. 1.3). Es wurden auch CB<sub>1</sub>-, CB<sub>2</sub>- und CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>- Knockout-Mäuse hergestellt.

### 1.2.1 Aufbau der Cannabinoidrezeptoren

Cannabinoidrezeptoren sind G $\alpha_{i/o}$ -Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen.

Der CB<sub>1</sub>-Rezeptor des Menschen (Gérard et al., 1990, 1991) besteht aus 472, der der Maus und der Ratte (Matsuda et al., 1990; Chakrabarti et al., 1995) aus 473 Aminosäuren. Er hat ein langes, extrazelluläres N-terminales Ende von 116, bzw. 117 Aminosäuren. Die CB<sub>1</sub>-Rezeptoren zeigen eine spezieübergreifende 97-99%ige Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz. Auch wenn das N-terminale Ende des CB<sub>1</sub>-Rezeptors ungewöhnlich lang ist, scheint es keine entscheidende Rolle in der Ligandenbindung zu spielen. Eine Deletion der ersten 89 Aminosäuren des menschlichen CB<sub>1</sub>-Rezeptors hat keinen Einfluss auf die Affinität von CP55940, einem CB<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten (Rinaldi-Carmona et al., 1996).

Der CB<sub>2</sub>-Rezeptor des Menschen (Munro et al., 1993) besteht aus einer Sequenz von 360 Aminosäuren, die sich deutlich, vor allem in ihrem wesentlich kürzeren N-terminalen Ende, von der des CB<sub>1</sub>-Rezeptors unterscheidet.

Die Aminosäuresequenz des geklonten CB<sub>2</sub>-Rezeptor-Gens der Maus (Shire et al., 1996) stimmt nur zu 82% mit der des Menschen überein und ist am C-terminalen Ende um 13 Aminosäuren kürzer. Die Aminosäuresequenz des CB<sub>2</sub>-Rezeptors der Ratte (Griffin et al., 2000) stimmt bis auf ein um 13 Aminosäuren längeres C-terminales Ende mit der der Maus überein.

Beide Cannabinoidrezeptoren gehören der Familie A der G $\alpha_{i/o}$ -Protein gekoppelte Rezeptoren an. Normalerweise liegt die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz bei Rezeptoren einer Familie zwischen 70-80%. In ihrer Aminosäuresequenz stim-

men die beiden Cannabinoidrezeptoren jedoch nur zu 44 %, im Bereich der transmembranären Domänen immerhin zu 68 % überein.

### **1.2.2. Lokalisation der Cannabinoidrezeptoren**

Der CB<sub>1</sub>-Rezeptor ist im Zentralnervensystem weit verbreitet (Herkenham et al., 1991b; Tsou et al., 1998; Egertova et al., 2003).

Die Lokalisation der CB<sub>1</sub>-Rezeptoren wurde mittels quantitativer Autoradiographie, in situ Hybridisierung und Immunhistochemie (Abb. 1.2) ermittelt.

Mittels der quantitativen Autoradiographie wurden große Mengen an CB<sub>1</sub>-Rezeptoren in Großhirnrinde, Hippocampus, Basalganglien und Cerebellum nachgewiesen. Geringere Mengen wurden im Hypothalamus und im Rückenmark gefunden. Menschen, Affen und Ratten (Herkenham et al., 1990, 1991; Glass et al., 1997) haben eine ähnliche Verteilung der Cannabinoidrezeptoren. Ein Unterschied besteht jedoch beispielsweise darin, dass Menschen eine höhere Konzentration an Cannabinoidrezeptoren in der Amygdala und dem Gyrus cinguli haben als Affen und Ratten (Herkenham et al., 1990, 1991; Glass et al., 1997).

Durch den Vergleich der Ergebnisse der in situ Hybridisierung (Mailleux et al., 1992, Matsuda et al., 1993) und von Rezeptorbindungsstudien (Herkenham et al., 1990) konnte gezeigt werden, dass CB<sub>1</sub>-Rezeptoren präsynaptisch lokalisiert sind. In den Basalganglien kann CB<sub>1</sub>-Rezeptor-mRNA hauptsächlich in Neuronen des Caudato-Putamen nachgewiesen werden, wohingegen CB<sub>1</sub>-Rezeptorproteine im Globus pallidus und der Substantia nigra pars reticulata vorkommt. Dieses Missverhältnis lässt darauf schließen, dass CB<sub>1</sub>-Rezeptoren in den Somata der Projektionsneurone des Caudato-Putamen synthetisiert werden, dann aber entlang der Axone zu deren terminalen Endigungen transportiert werden. Nach Zerstörung des Caudato-Putamen nimmt die CB<sub>1</sub>-Rezeptordichte im Globus pallidus und der Substantia nigra pars reticulata ab (Herkenham et al., 1991). Auch in den Hinterhörnern des Rückenmarks sind die CB<sub>1</sub>-Rezeptoren präsynaptisch lokalisiert; eine Resektion der Axone der Hinterwurzelganglienzelle verursacht einen signifikanten Abfall der CB<sub>1</sub>-Rezeptoren im Hinterhorn des Rückenmarks (Hohmann et al., 1999).

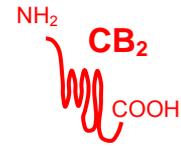
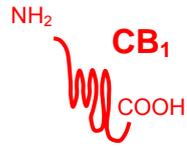
Ein weiteres interessantes Ergebnis der in situ Hybridisierung war, dass die Neurone, die CB<sub>1</sub>-Rezeptoren exprimieren, zwei verschiedene Verteilungsmuster die-

ser haben. In einigen Regionen werden die CB<sub>1</sub>-Rezeptoren weit verbreitet und gleichmäßig exprimiert, in anderen nur von einigen wenigen Neuronen, dafür aber sehr zahlreich. Im Cerebellum beispielsweise exprimieren beinahe alle Körnerzellen CB<sub>1</sub>-Rezeptoren, wohingegen im Hippocampus die meisten Neurone keine CB<sub>1</sub>-Rezeptoren exprimieren, ein paar Wenige dafür aber umso mehr.

Mit Hilfe von Antikörpern gegen CB<sub>1</sub>-Rezeptoren konnte bestätigt werden, dass CB<sub>1</sub>-Rezeptoren in großen Mengen auf Axonen und besonders auf ihren terminalen Endigungen zu finden sind (Tsou et al., 1998; Egertova & Elphick, 2000). Detaillierte elektronenmikroskopische Studien am Hippocampusgewebe des Menschen und der Ratte konnten ebenfalls zeigen, dass die CB<sub>1</sub>-Rezeptoren fast ausschließlich präsynaptisch lokalisiert sind (Hájos et al., 2000; Katona et al., 2000). Im Gegensatz dazu lassen elektronenmikroskopische Studien im Striatum vermuten, dass die CB<sub>1</sub>-Rezeptoren dort verteilter auftreten. Es wurden sogar CB<sub>1</sub>-Rezeptoren postsynaptisch und auf perivaskulärer Astroglia gefunden (Rodriguez et al., 2001).

CB<sub>1</sub>-Rezeptoren werden nicht nur im Zentralnervensystem, sondern auch im peripheren, vegetativen und autonomen Nervensystem exprimiert (Pertwee et al., 1992). Geringe Mengen an CB<sub>1</sub>-Rezeptoren lassen sich auch im Hoden nachweisen (Gérard et al., 1991; Wenger et al., 2001). In geringerem Maße konnte CB<sub>1</sub>-Rezeptor-mRNA in Nebenniere, Knochenmark, Herz, Lunge, Prostata und vereinzelt auch in Organen des Immunsystems wie z.B. Thymus, Tonsillen und Milz gefunden werden (Kaminski et al., 1992; Bouaboula et al., 1993; Galiégue et al., 1995; Noe et al., 2000).





<b>Receptor type</b>	7 transmem. domains		7 transmem. domains
<b>G-Protein</b>	G $\alpha_{i/o}$		G $\alpha_{i/o}$
<b>Localisation</b>	central and peripheral nervous system		immune cells (macrophages, lymphocytes, mast cells)
<b>Natural agonist</b>		$\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol	
<b>Endogenous agonist (endocannabinoid)</b>		anandamide, 2-arachidonylglycerol, noladin ether	
<b>Synthetic agonist</b>	ACEA, ACPA, O-1812	WIN55212-2, CP55940, HU-210	JWH-133, JWH-139, HU-308, L-759656, L-759633
<b>Synthetic antagonist</b>	rimonabant, AM251, LY320135		SR144528, AM 630

**Abbildung 1.3. Eigenschaften der CB<sub>1</sub>- und CB<sub>2</sub>-Rezeptoren.** In der linken Spalte werden die Eigenschaften und die Liganden des CB<sub>1</sub>-Rezeptors beschrieben. In der rechten Spalte werden die Eigenschaften und Liganden des CB<sub>2</sub>-Rezeptors beschrieben. In der mittleren Spalte sind Liganden beider Rezeptoren aufgeführt.

### 1.3 Beeinflussung der Signalübertragung durch CB<sub>1</sub>-Rezeptoren

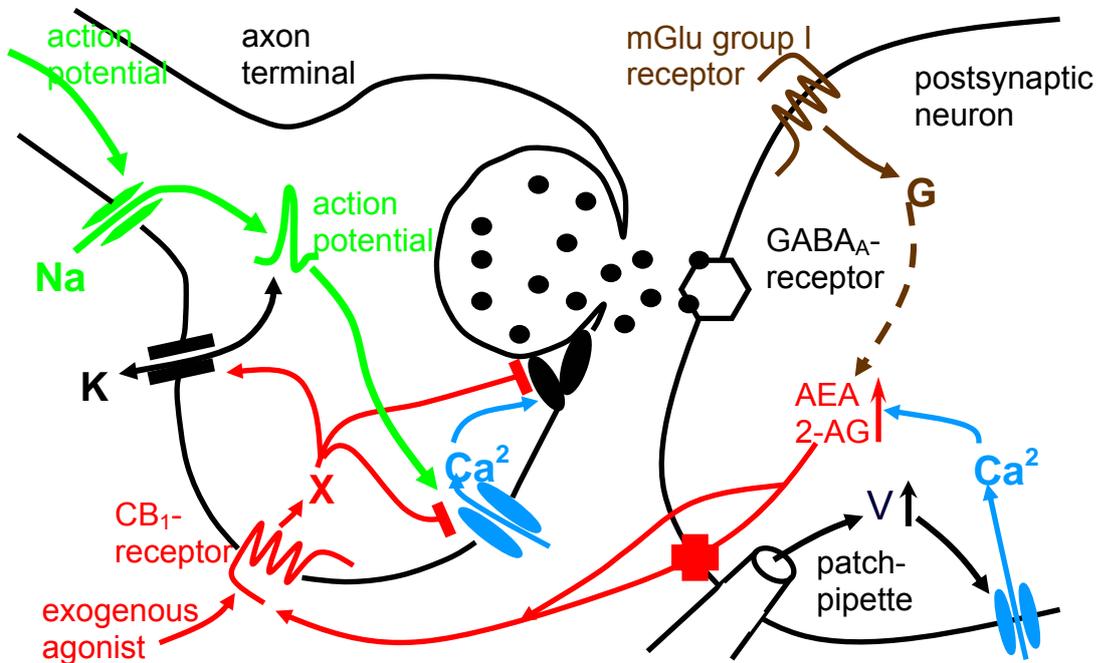
Durch die Reizung eines Neurons entsteht ein Natrium-Einstrom, welcher für die Entstehung des Aktionspotentials verantwortlich ist. Dieses Aktionspotential verursacht einen Calcium-Einstrom, welcher zur Freisetzung des Transmitters aus den Vesikeln führt. Dieser Transmitter diffundiert durch den synaptischen Spalt zum postsynaptischen Neuron und dockt dort an spezifische Rezeptoren an. Je nach Transmitter führt dies zur Aktivierung oder Hemmung der Neurotransmission. Dies beschreibt die anterograde Signalübertragung (Abb. 1.4).

Durch die Gabe eines CB<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten werden intracelluläre Mechanismen aktiviert, sodass die Freisetzung von GABA gehemmt wird.

Die Aktivierung eines CB<sub>1</sub>-Rezeptors führt zu einer Hemmung von spannungsabhängigen Calciumkanälen (Caulfield & Brown, 1992; Mackie et al., 1993). Somit findet kein Calciumanstieg in der Axonendigung statt und die Transmitterfreisetzung wird verhindert. Außerdem aktivieren Cannabinoide Kaliumkanäle (Henry & Chavkin 1995; Mackie et al. 1995; Garcia et al. 1998; McAllister et al., 1999). Die Aktivierung der Kaliumkanäle hyperpolarisiert die Axonendigung. Dadurch kann es in den Axonendigungen zu einer Verhinderung von Aktionspotentialen und somit auch zu einer Blockierung des Calciumeinstroms kommen. Hinzu kommt, dass Cannabinoide unabhängig vom Calciumeinstrom in der Zelle direkt mit dem Transmitterfreisetzungsmechanismus interagieren. Cannabinoide können die synaptische Transmission also auf unterschiedliche Weise hemmen.

Llano et al., 1991 und Pitler et al., 1992 haben noch eine andere Art der Hemmung der synaptischen Transmission beschrieben. Durch die Depolarisation eines Neurons mittels Strominjektion findet eine retrograde Hemmung der synaptischen Transmission statt. Dieses Phänomen wird im Falle des inhibitorischen Transmitter GABA als „depolarisation-induced suppression of inhibition (DSI)“ oder auch depolarisationsinduzierte Suppression der Hemmung, bezeichnet (Alger & Pitler., 1995). Die DSI benötigt einen deutlichen Ca<sup>2+</sup>-Anstieg im postsynaptischen Neuron, welcher zur Freisetzung eines retrograden Messenger führt. Dieser diffundiert retrograd durch den synaptischen Spalt und aktiviert präsynaptisch lokalisierte Rezeptoren. Dadurch wird wiederum die Freisetzungswahrscheinlichkeit von GABA aus der präsynaptischen Nervenendigung reduziert (Abb. 1.4). Es konnte nachgewiesen

werden, dass es sich bei diesem Messenger um Endocannabinoide handelt (Wilson & Nicoll, 2001; Ohno-Shosaku et al., 2001).



**Abbildung 1.4. Wirkung von Cannabinoiden auf die synaptische Neurotransmission.** Die Aktivierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors an der präsynaptischen Axonendigung inhibiert die Transmitterfreisetzung aus dem Vesikel. Drei Mechanismen können bei der präsynaptischen Hemmung beteiligt sein: Hemmung von spannungsabhängigen Calciumkanälen, Aktivierung von Kaliumkanälen und direkte Interaktion mit dem Transmitterfreisetzungsmechanismus aus den Vesikeln. Der CB<sub>1</sub>-Rezeptor kann durch exogene Cannabinoide, ebenso aber auch durch endogenen Cannabinoide, welche vom postsynaptischen Neuron freigesetzt werden, aktiviert werden. Die Synthese der endogenen Cannabinoide wird durch den depolarisationsinduzierten Calciumeinstrom oder aber durch die Aktivierung von G<sub>α<sub>i/o</sub></sub>-Protein gekoppelten Rezeptoren getriggert.

## 1.4 Klassifikation von Cannabinoidrezeptorliganden

### 1.4.1 Cannabinoidrezeptoragonisten

#### 1.4.1.1 Klassische Cannabinoide

Diese Gruppe der Cannabinoide besteht aus trizyklischen Dibenzopyranderivaten, welche entweder als natürliche Bestandteile in der Pflanze *Cannabis sativa* vorkommen oder synthetische Analoga sind. Die am meisten untersuchten klassischen Cannabinoide sind  $\Delta^9$ -THC (Abb. 1.5),  $\Delta^8$ -THC (Abb. 1.5) und 11-Hydroxy- $\Delta^8$ -THC-Dimethylheptyl (HU-210) (Abb. 1.6).

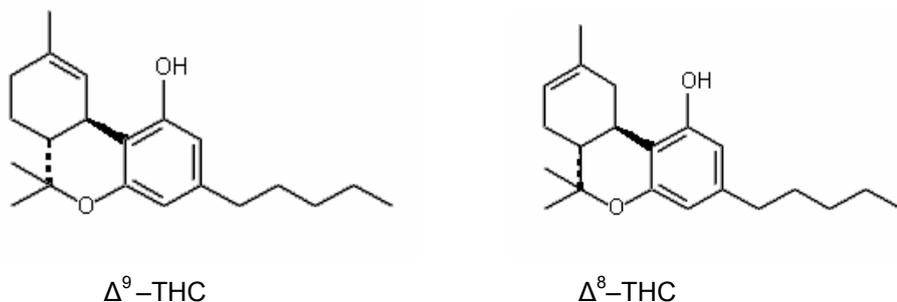
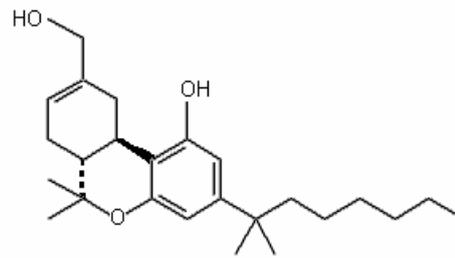


Abbildung 1.5. Klassische Cannabinoide aus *Cannabis sativa*

Von diesen ist das  $\Delta^9$ -THC die Substanz mit der größten psychotropischen Wirkung.  $\Delta^8$ -THC ist ebenfalls ein psychotropisches Cannabinoid der Cannabispflanze, wohingegen HU-210 und Desacetyl-L-Nantradol synthetische Cannabinoide sind. All diese Substanzen bewirken cannabimimetische Antworten, sowohl in vivo als auch in vitro (Johnson & Melvin, 1986; Howlett et al., 1988; Martin et al., 1991, 1995; Pertwee, 1999).  $\Delta^9$ -THC wurde erstmals 1964 von Gaoni und Mechoulam aus der Pflanze *Cannabis sativa* isoliert. Seine vollständige chemische Struktur wurde 1967 von Mechoulam und Gaoni beschrieben.  $\Delta^9$ -THC bindet bereits bei submikromolaren Konzentrationen an Cannabinoidrezeptoren.

Die meisten klassischen Cannabinoide besitzen eine ähnliche Affinität zu beiden Cannabinoidrezeptoren.

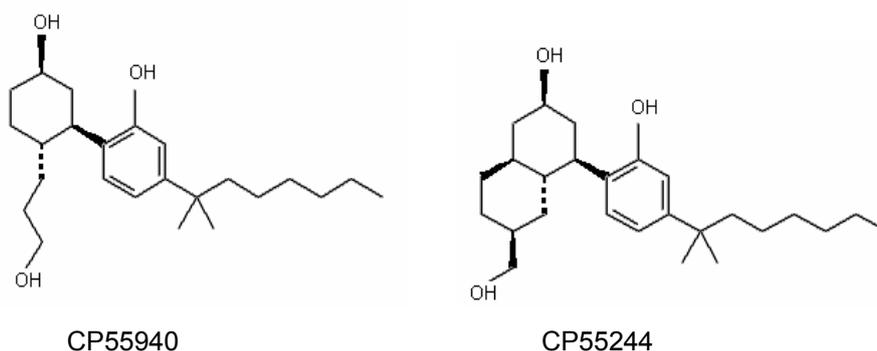


HU-210

**Abbildung 1.6. Klassischer synthetischer Cannabinoidrezeptoragonist**

### 1.4.1.2 Nicht-klassische Cannabinoide

Der Unterschied zu den klassischen Cannabinoiden liegt darin, dass der Dihydropyranring des THC hier fehlt. Das bizyklische Analogon CP55940 (Abb. 1.7) ist einer der meistverwendeten Cannabinoidrezeptoragonisten. Als radioaktiv markiertes ( $^3\text{H}$ )CP55940 verhalf es den  $\text{CB}_1$ -Rezeptor zu entdecken und zu charakterisieren (Devane et al., 1988). Die Affinität von CP55940 zu  $\text{CB}_1$ - und  $\text{CB}_2$ -Rezeptoren ist annähernd gleich. In der Maus in vivo ist CP55940 10 – 50-fach potenter als THC (Johnson & Melvin, 1986; Little et al., 1988). Ein weiteres potentes, nicht-klassisches Cannabinoid ist das trizyklische CP55244 (Abb. 1.7), welches am  $\text{CB}_1$ -Rezeptor sogar eine höhere Affinität und eine höhere intrinsische Aktivität als CP55940 zeigt. (Howlett et al., 1988; Little et al., 1988; Herkenham et al., 1990; Gérard et al., 1991; Griffin et al., 1998).



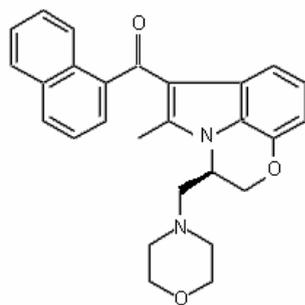
CP55940

CP55244

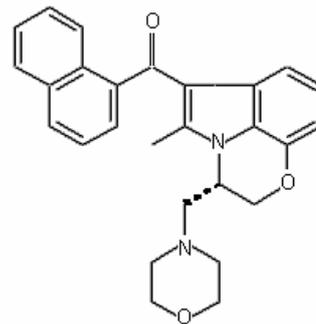
**Abbildung 1.7. Nicht-klassische Cannabinoidrezeptoragonisten**

### 1.4.1.3 Aminoalkylindole

Bis in die frühen 1990er Jahre wurden alle cannabimimetischen Substanzen von THC abgeleitet. Dies änderte sich als von einer neuen Familie von Aminoalkylindolen berichtet wurde. Diese Substanzen wurden bei der Suche nach einem strukturellen Analogon des Pravadolins, eines Cyclooxygenaseinhibitors, zufällig entdeckt (Bell et al., 1991; Pacheco et al., 1991; D'Ambra et al., 1992; Eissenstat et al., 1995). WIN55212-2 (Abb. 1.8) ist die am meisten untersuchte und kommerziell verwendete Substanz dieser Gruppe und zeigt eine hohe Affinität zu CB<sub>1</sub>- und CB<sub>2</sub>-Rezeptoren mit einer geringen Selektivität für den CB<sub>2</sub>-Rezeptor und einer hohen intrinsischen Aktivität an beiden Rezeptoren. (Bouaboula et al., 1997; Griffin et al., 1998; Tao & Abood, 1998; Pertwee, 1999). Interessanterweise hat das Stereoisomer von WIN 55212-2, das WIN55212-3, keine Affinität zu CB<sub>1</sub>-Rezeptoren.



WIN55212-2



WIN55212-3

Abbildung 1.8. Cannabinoidrezeptoragonisten aus der Gruppe der Aminoalkylindole

#### 1.4.1.4. Eicosanoide

Das typische Eicosanoid der Gruppe der Cannabinoidrezeptoragonisten ist das Anandamid (Abb. 1.9). Dies war der erste der endogenen Cannabinoidrezeptoragonisten, welcher im Gehirn und in anderem Gewebe von Säugetieren nachgewiesen wurde (Devane et al., 1992; Howlett et al., 2002; Di Marzo et al., 2005). Die anderen sind 2-Arachidonoylglycerol (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995) (Abb. 1.9), Noladin-Äther (Hanus et al., 2001), Virodhamin und N-arachidonoyldopamin.

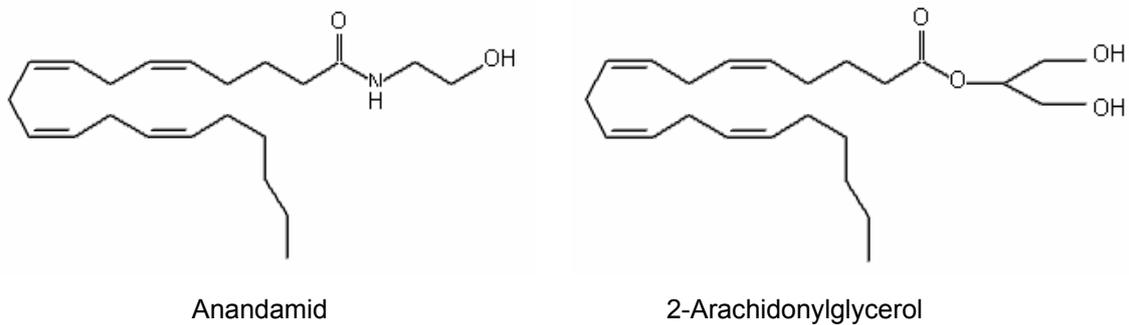


Abbildung 1.9. Endogene Cannabinoidrezeptoragonisten aus der Gruppe der Eicosanoide

Anandamid gleicht dem  $\Delta^9$ -THC in seinem Verhalten als partieller Agonist am  $CB_1$ -Rezeptor. Strukturelle Modifikationen des Anandamidmoleküls, welches selbst nur eine unwesentlich höhere Affinität zum  $CB_1$ - als zum  $CB_2$ -Rezeptor hat, führten zur Entwicklung des ersten selektiven  $CB_1$ -Rezeptoragonisten. Selektive  $CB_1$ -Rezeptoragonisten sind zum Beispiel das R-(+)-Methanandamid (Khanolkar et al., 1996; Lin et al., 1998) und das Arachidonyl-2-Chloroethylamid (ACEA) (Abb. 1.10).

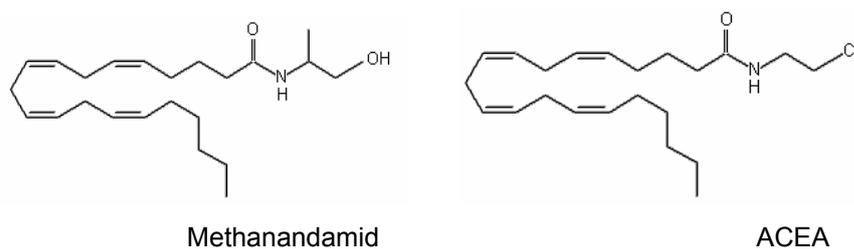
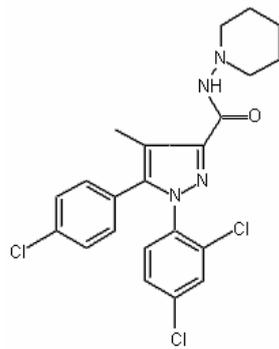


Abbildung 1.10. Synthetische selektive  $CB_1$ -Rezeptoragonisten aus der Gruppe der Eicosanoide

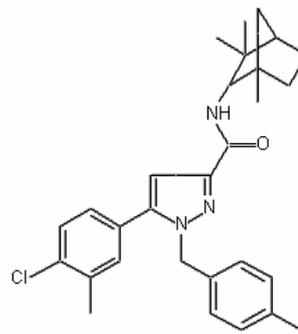
## 1.4.2 Cannabinoidrezeptorantagonisten, inverse Agonisten

### 1.4.2.1. Diarylpyrazole

Typische Vertreter dieser Gruppe sind Rimonabant (früher SR141716), ein potenter selektiver CB<sub>1</sub>-Rezeptorligand, und SR144528, ein potenter CB<sub>2</sub>-Rezeptorligand (Rinaldi-Carmona et al., 1994, 1998) (Abb 1.11). Rimonabant und SR144528 können selbst - ohne Agonisten - an den Cannabinoidrezeptoren wirksam werden und haben den Agonisten entgegengesetzte Wirkungen (Pertwee, 1999). Auch wenn dieser Effekt der Arylpyrazole zum Teil auf die Inhibition endogener Cannabinoide zurückzuführen ist, gibt es Beweise dafür, dass Rimonabant und SR144528 Antworten als inverse Agonisten hervorrufen (MacLennan et al., 1998; Pan et al., 1998; Portier et al., 1999; Sim-Selley et al., 2001).



SR141716



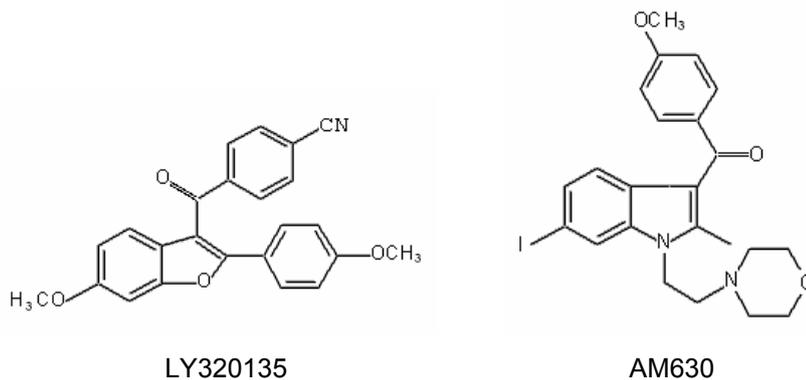
SR144528

Abbildung 1.11. Cannabinoidrezeptorantagonisten aus der Gruppe der Diarylpyrazole

#### 1.4.2.2. Weitere Antagonisten / inverse Agonisten

Zwei weitere Antagonisten sind das Benzofuran LY320135 und das Aminoalkylindol 6-Iodopravadoline (AM630) (Abb. 1.12). LY320135 hat die Eigenschaft sich mit einer wesentlich höheren Affinität an den CB<sub>1</sub>-Rezeptor als an den CB<sub>2</sub>-Rezeptor zu binden. Jedoch hat es eine geringere Affinität zum CB<sub>1</sub>-Rezeptor als Rimona-bant und bindet selbst in geringen mikromolaren Konzentrationen zusätzlich an muscarinische und 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren (Felder et al., 1998). Genauso wie Rimona-bant blockiert LY320135 nicht nur Effekte von CB<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten (Felder et al., 1998; Coruzzi et al., 1999; Holland et al., 1999; Molderings et al., 1999; Christopoulos et al., 2001), sondern weist auch zusätzlich in einigen Signaltransduktionskaskaden des CB<sub>1</sub>-Rezeptors eine Aktivität als inverser Agonist auf (Felder et al., 1998; Christopoulos et al., 2001).

AM 630 ist ein CB<sub>2</sub>-Rezeptor selektiver Antagonist / inverser Agonist. Die Aktivität als inverser Agonist ist geringer als die von SR144528 (Ross et al., 1999).

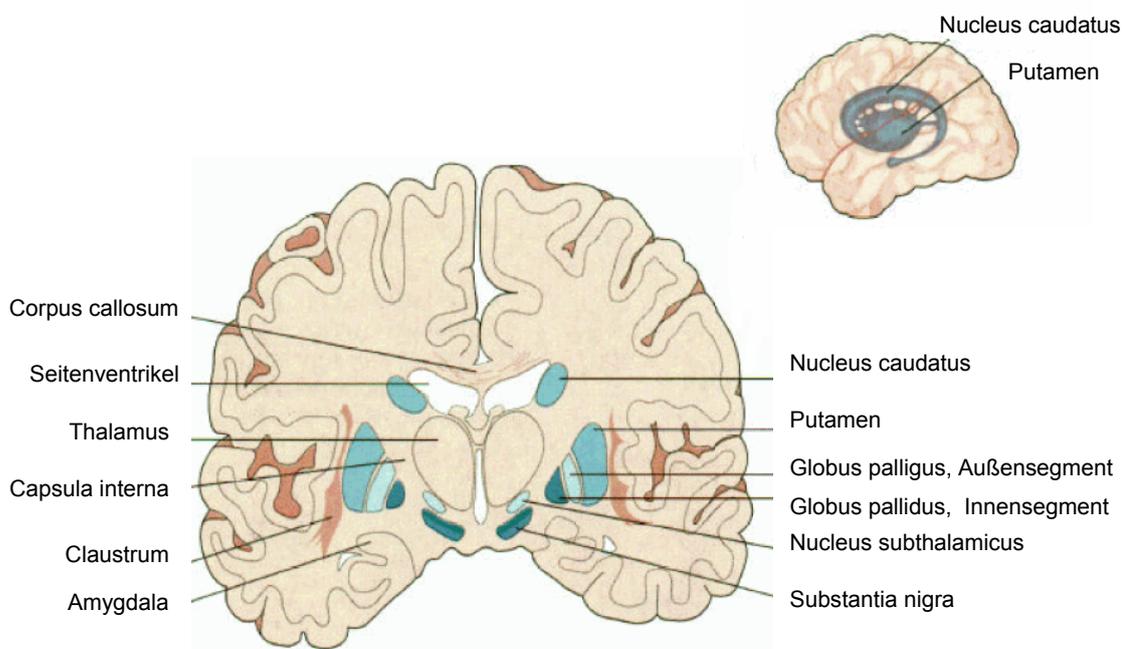


**Abbildung 1.12. Weitere Cannabinoidrezeptorantagonisten**

## 1.5. Die Basalganglien

Zu den Basalganglien, auch als Stammganglien bezeichnet, zählt man den Nucleus caudatus, das Putamen und den Globus pallidus. Der Globus pallidus wird in ein mediales und ein laterales Segment unterteilt (Abb 1.13). Funktionell zählen die Substantia nigra mit ihrer pars compacta (SNC) und ihrer pars reticulata (SNR) und der Nucleus subthalamicus ebenfalls zu den Basalganglien.

Der Nucleus caudatus und das Putamen liegen in der frühen Embryonalentwicklung zusammen und werden dann durch das Durchwachsen der Capsula interna getrennt. Sie bleiben jedoch über feine Streifen grauer Substanz verbunden und werden daher zusammen als Striatum, auch Caudato-Putamen genannt, bezeichnet. Diese Zusammenfassung ist nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell relevant.

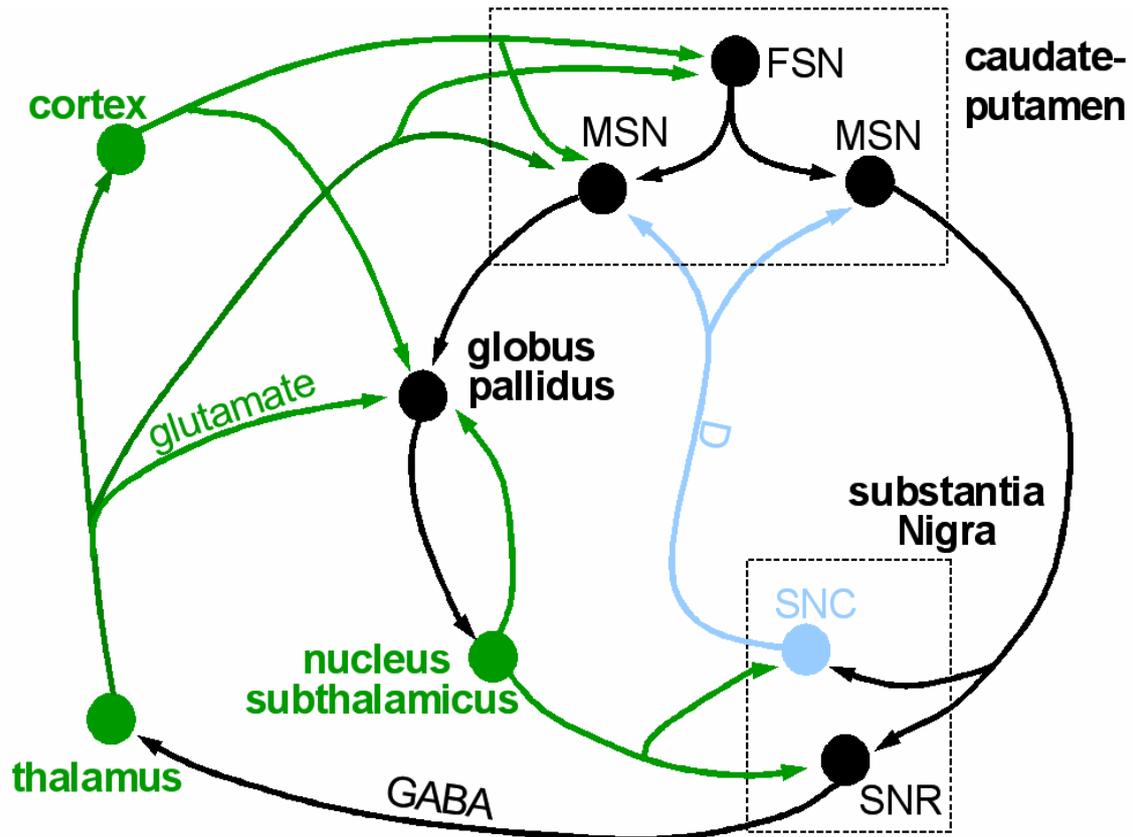


**Abbildung 1.13. Schematische Darstellung der Basalganglien**

Das Caudato-Putamen ist die Eingangskomponente, der Globus pallidus medialis und die Substantia nigra pars reticulata bilden die Ausgangskerne der Basalganglien (Abb. 1.14).

Das Caudato-Putamen erhält überwiegend Informationen vom Cortex und vom Thalamus und ist so in das System der Bewegungskontrolle (Putamen), der Kontrolle von Augenbewegungen (Nucleus caudatus) und der Kontrolle kognitiver Funktionen (Nucleus caudatus) eingebunden.

Die efferenten Bahnen des Globus pallidus und der Substantia nigra pars reticulata ziehen zum Thalamus (Abb. 1.14). Von dort werden sie auf mehrere Gebiete des Cortex umgeschaltet: auf den präfrontalen Cortex, das prämotorische Areal und den primären motorischen Cortex. Durch diese Projektionen beeinflussen die Basalganglien andere absteigende Systeme wie das corticospinale und das cortico-bulbäre System.



**Abbildung 1.14. Neuronale Verbindungen der Basalganglien.** Die einzelnen Hirnareale sind schematisch dargestellt. GABAerge Neurone sind schwarz, glutamaterge grün und dopaminerge blau gezeichnet.

## 1.6 Die Neurone des Caudato-Putamen

Im Caudato-Putamen können zwei Hauptgruppen von Neuronen unterschieden werden: Projektionsneurone und Interneurone.

### 1.6.1 Projektionsneurone (medium-spiny-Neurone)

Die medium-spiny-Neurone (MSN) machen 90 - 95 % der Neurone im Caudato-Putamen aus. Sie sind Projektionsneurone und haben einen Durchmesser von 10 – 20  $\mu\text{m}$ . Gekennzeichnet sind sie durch dornenbesetzte, dendritische Endverzweigungen, die sogenannten Spines (Heimer et al., 1995). Sie besitzen Gamma-Aminobuttersäure (GABA) als Hauptneurotransmitter. Die Neurone, die in die Substantia nigra pars reticulata projizieren, sind durch die Kolokalisation von Substanz P und Dynorphin und die Expression von  $D_1$ -Rezeptoren gekennzeichnet. Die MSN, die in den Globus pallidus projizieren, enthalten Enkephalin und  $D_2$ -Rezeptoren. Die meisten Afferenzen kommen aus dem Cortex und dem Thalamus und sind glutamaterg. Sehr wichtig sind dopaminerge Afferenzen aus der substantia nigra pars compacta des Mittelhirns, welche regulierend in die corticostriatalen excitatorischen Afferenzen eingreifen (Gerfen, 1988). Weiterhin erhalten die MSN Informationen von Interneuronen (Abb 1.15).

### 1.6.2 Interneurone

Interneurone haben wenige oder keine dendritischen Spines. Im Caudato-Putamen können drei Arten von Interneuronen unterschieden werden (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi et al., 1995).

#### 1.6.2.1. Parvalbumin-positive fast-spiking-Neurone (PV-FSN)

PV-FSN machen im Caudato-Putamen weniger als 1 % der Neurone aus. Es sind Neurone, die auf Depolarisation mit kurzen Aktionspotentialen und kurzen Hyperpolarisationsphasen mit konstant hoher Frequenz (200 Hz) reagieren. Ihr Ruhemembranpotential ist negativer und ihr Eingangswiderstand niedriger als bei den übrigen Neuronen. Sie sind immunreaktiv sowohl für Parvalbumin als auch für GABA. Weiterhin kann man zwei Untergruppen von PV-FSN unterscheiden. Die einen haben einen eher lokal begrenzten Dendritenbaum, wohingegen die anderen einen

weiter verbreiteten Dendritenbaum besitzen. Bei beiden Gruppen liegt das Axon innerhalb des Dendritenbaums oder in dessen Nähe. Sie innervieren die MSN (Abb. 1.15).

#### **1.6.2.2. Persistent and low-threshold spike cells (PLTS-Zellen)**

PLTS-Zellen haben längere Aktionspotentiale, größere Eingangswiderstände, ein weniger negatives Ruhemembranpotential und längere Hyperpolarisationsphasen. Sie wurden histochemisch als NADPH Diaphorase-positive Zellen identifiziert. Wie alle anderen NADPH Diaphorase-positive Zellen sind auch diese immunreaktiv für Stickstoffmonoxid-Synthase. Die Axonausbreitung ist bei den PLTS-Zellen am größten.

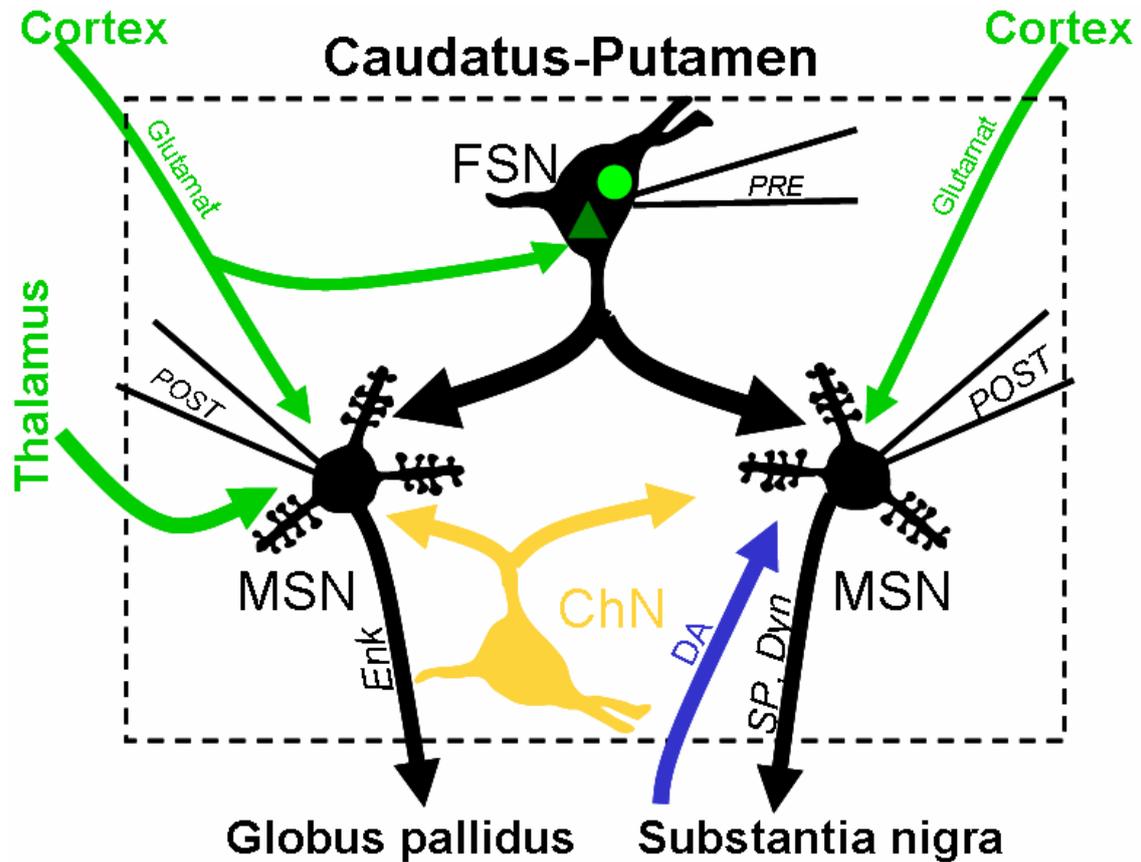
#### **1.6.2.3. Long-lasting afterhyperpolarisation cells (LA-Zellen)**

LA-Zellen haben wie die PLTS-Zellen längere Aktionspotentiale, größere Eingangswiderstände, weniger negative Ruhemembranpotentiale und längere Hyperpolarisationsphasen als PV-FSN. Sie benötigen mehr Zeit als PLTS-Zellen, um den Peak der Afterhyperpolarisation zu erreichen. Sie sind immunreaktiv für Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) und somit cholinerg. Ihr Durchmesser ist größer als 20µm und ihr Dendritenbaum ist verzweigter als der der PLTS-Zellen.

### **1.6.3 Rolle der PV-FSN**

Bisher wurde angenommen, dass eine gegenseitige laterale Hemmung der MSN untereinander nicht existiert oder nur schwach vorhanden ist (Jaeger et al., 1994). Neuesten Ergebnissen zur Folge existiert eine Innervation zwischen den MSN allerdings doch (Czubayko & Plenz, 2002; Tunstall et al., 2002; Plenz, 2003). Trotz dieser neuen Erkenntnisse ist der Beitrag der PV-FSN zur Regulierung der Aktivität der Projektionsneurone im Caudato-Putamen bedeutend. Sie sind die wichtigste Quelle GABAerger Signale an die MSN. Ein einzelnes PV-FSN innerviert über hundert MSN, ein MSN wird von bis zu vier PV-FSN innerviert (Koós & Tepper, 1999). Die PV-FSN dahingegen erhalten keinen Input von den MSN und hemmen sich auch nicht gegenseitig. Sie kommunizieren über gap junctions miteinander (Kita et al., 1990). Die PV-FSN greifen regulierend in die corticostriatalen Übertragung ein

und werden selbst von den glutamatergen Neuronen des Cortex innerviert, wodurch eine Vorwärtshemmung (feed-forward inhibition) zustande kommt (Abb. 1.15).



**Abbildung 1.15. Verschaltungen der Caudato-Putamen Neurone.** GABAerge Neurone sind schwarz, glutamaterge grün, dopaminerge blau und cholinerge gelb gezeichnet. Das Caudato-Putamen wird von großen Teilen des Cortex, des ventrolateralen Thalamus und der Substantia nigra innerviert. Es enthält neben den Projektionsneuronen (MSN) auch Interneurone wie PV-FSN und ChNs. Die Projektionsneurone innervieren den Globus pallidus und die Substantia nigra.

## 1.7. Ziel der Arbeit

Die Aktivierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors führt in vielen Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems zu einer Hemmung der synaptischen Transmission (Schlicker & Kathmann, 2001; Freund et al., 2003; Szabo & Schlicker, 2005).

Diese Studie legt ihr Hauptaugenmerk auf die Funktion der CB<sub>1</sub>-Rezeptoren im Caudato-Putamen. Die Dichte der CB<sub>1</sub>-Rezeptoren im Caudato-Putamen ist hoch und viele der CB<sub>1</sub>-Rezeptoren sind auf präsynaptischen Axonendigungen lokalisiert (Herkenham et al., 1991b; Tsou et al., 1998; Rodriguez et al., 2001). Ein Teil der CB<sub>1</sub>-Rezeptoren ist auf Axonendigungen von glutamatergen afferenten Neuronen lokalisiert. Die Aktivierung dieser führt zu einer präsynaptischen Hemmung der glutamatergen synaptischen Transmission (Gerdeman & Lovinger, 2001; Huang et al., 2001).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion von CB<sub>1</sub>-Rezeptoren auf GABAergen Axonendigungen des Caudato-Putamen definitiv zu klären. In einer vorangegangenen Untersuchung unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt (Szabo et al., 1998), dass die Aktivierung von CB<sub>1</sub>-Rezeptoren den GABAergen Input von MSN präsynaptisch hemmt. Da bei dieser Studie durch Feldreizung alle GABAergen Axone stimuliert wurden, konnte nicht festgestellt werden, welche dieser Axone durch die Cannabinoide gehemmt wurden. Um diese Wissenslücke zu füllen, wollten wir bei den folgenden Experimenten Cannabinoideffekte auf identifizierte synaptische Verbindungen zwischen PV-FSN → MSN und MSN → MSN untersuchen. Dabei sollte die synaptische Übertragung durch gleichzeitige Ableitung von synaptisch verbundenen Neuronpaaren aufgezeichnet werden.

Die MSN lassen sich für die Ableitung leicht identifizieren, denn sie machen mehr als 95 % der Neurone im Caudato-Putamen aus. Es ist jedoch schwierig, die seltenen PV-FSN zu identifizieren, die nur ca. 1 % der Neurone im Caudato-Putamen ausmachen. Hierbei hat uns geholfen, dass in Heidelberg eine transgene Mauslinie generiert wurde, bei der die Expression von "green fluorescent protein" (GFP) unter die Kontrolle des Parvalbumin-Promoters gestellt wurde. Als Folge fluoreszieren die PV-FSN im Caudato-Putamen dieser Mäuse.

Die Hypothese unserer Arbeit war, dass die Aktivierung von CB<sub>1</sub>-Rezeptoren die GABAerge synaptische Übertragung zwischen PV-FSN → MSN und MSN → MSN hemmt.

## 2. Material und Methoden

Die Experimente standen im Einklang mit den Regeln der deutschen Gesetze, die das Verwenden von Tieren bei der biomedizinischen Forschung bestimmen (Tierschutzgesetz). Es wurde darauf geachtet, dass das Leid der Tiere und deren Anzahl so gering wie möglich gehalten wurden.

### 2.1. Hirnschnitte

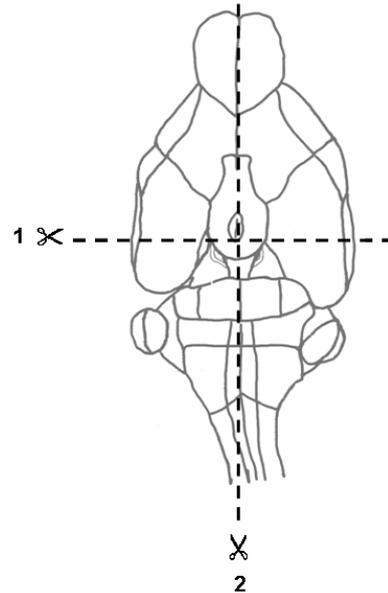
Um die Identifikation der parvalbumin-positiven fast-spiking-Neurone (PV-FSN) zu erleichtern, wurden transgene Mäuse verwendet (Abb. 2.1). Wir erhielten eine solche genetisch veränderte Maus von H. Monyer. Mit dieser Maus konnten wir weiter transgene Mäuse züchten.

In diesen Mäusen ist die Expression von Parvalbumin, dem Marker der PV-FSN, an die Expression von mehreren Kopien des enhanced green fluorescent protein (EGFP) gekoppelt (siehe Meyer et al., 2002 für die Generierung und Charakterisierung dieser Mäuse). Sechszwanzig Prozent der Neurone im Caudato-Putamen, die eine grüne Fluoreszenz aufwiesen, waren immunpositiv für Parvalbumin (Meyer et al., 2002). Die Expression des EGFP im Gehirn beginnt mit dem 10 – 11 postnatalen Tag; folglich wurden 12 – 18 Tage alte Mäuse für unserer Studie verwendet. Ähnliche transgene Mäuse (mit einer Kopie des EGFP/ Parvalbumin Transgen) wurden bereits erfolgreich für die Identifizierung von parvalbumin-positiven Neuronen im Hippocampus in einer Patch-Clamp-Studie verwendet (Bartos et al., 2002).



Abbildung 2.1. Photo einer transgenen PV-FSN-EGFP- Maus

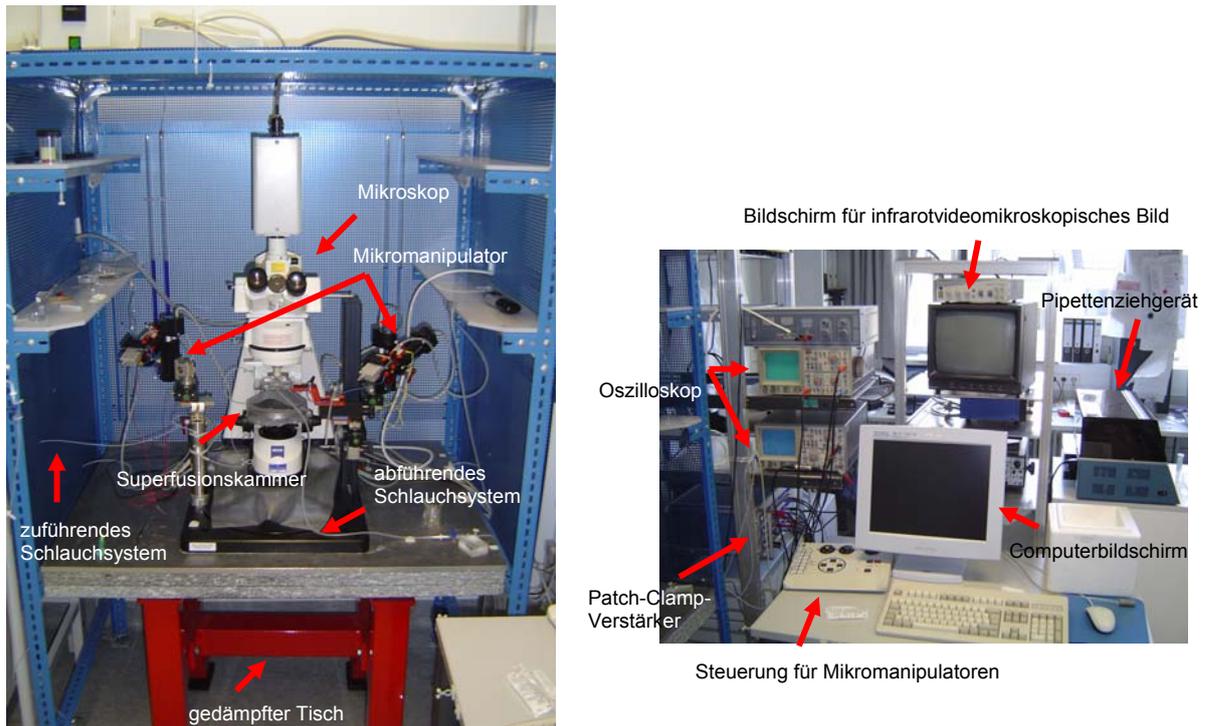
Die Mäuse wurden zunächst mit Halothan narkotisiert. Dazu wurden sie in einen Exsikkator von 15 cm Durchmesser gesetzt, der ein Tuch enthielt, das mit ca. 0,5 ml Halothan beträufelt war. Das Tier schlief innerhalb einer Minute ein. Das narkotisierte Tier wurde anschließend dekapitiert. Die Schädelkalotte wurde nun in caudo-rostraler Richtung entlang der Mittellinie mit Hilfe einer Schere eröffnet. Die beiden Kalottenhälften wurden zur Seite umgeschlagen. Das Gehirn wurde vorsichtig herausgeschält. Die Isolierung des Gehirns musste innerhalb einer Minute erfolgen. Es wurde darauf geachtet, dass das Gehirn weder gedrückt noch an ihm gezerrt wurde. Anschließend wurde das isolierte Gehirn direkt in eisgekühlte, mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) gesättigte, artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) der nachfolgenden Zusammensetzung (mM) überführt: NaCl 126, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, KCl 3, MgCl<sub>2</sub> 5, CaCl<sub>2</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 26, Glucose 20, Na-Lactat 4, pH 7.3-7.4. In dieser Flüssigkeit beließ man das Gehirn für 5 Minuten, um durch Abkühlung den Gehirnmotabolismus zu senken und somit das Überleben der Neurone zu verbessern. Nun wurde das Gehirn mit seiner dorsalen Fläche auf ein mit eisgekühlter ACSF getränktes Filterpapier gelegt. Die Präparation des Gewebblocks erfolgte unter ständiger Kühlung und wiederholter Beträufelung des Gehirns mit eiskalter ACSF. Mit einer Rasierklinge wurde ein coronaler Schnitt auf Höhe des Chiasma opticum und ein sagittaler Schnitt entlang der Mittellinie erstellt (Abb. 2.2). Der caudale Teil wurde verworfen. Auf diese Weise entstanden zwei Gehirnböcke. Zur Herstellung coronaler Schnitte wurde nun der Block mit seiner caudalen Fläche mit Cyanacrylatkleber auf den Schlitten des Gewebeschniders geklebt. Zur Herstellung sagittaler Schnitte wurde der Gewebblock mit seiner medialen Schnittfläche auf den Schlitten geklebt.



**Abbildung 2.2. Herstellung sagittaler und coronaler Gehirnböcke.** Ventrale Ansicht eines isolierten Gehirns. Zur Erstellung der Böcke wurde auf der Höhe des Chiasma Opticum (1) der erste Schnitt gesetzt. Anschließend wurde ein sagittaler Schnitt entlang der Mittellinie (2) gemacht.

Der Schlitten wurde nun direkt im Anschluss in die Halterung der Badkammer des Vibratoms geklemmt. Die Badkammer war ebenfalls mit eisgekühlter und mit Carbogen gesättigter ACSF gefüllt. Nun wurden mit Hilfe einer Rasierklinge, die in das Vibratom eingespannt wurde, sechs bis acht 300  $\mu\text{m}$  dicke Hirnschnitte hergestellt. Die Vorschubgeschwindigkeit des Vibratoms wurde niedrig gehalten. Die Klinge schwang während des Schneidevorgangs mit einer Frequenz von 50 Hz und einer Amplitude von 1 - 1,5 mm. Die einzelnen Hirnschnitte wurden in der Reihenfolge ihrer Herstellung mit Hilfe einer Saugpipette in eine Gibb'sche Kammer überführt. In dieser Kammer befand sich mit Carbogen gesättigter ACSF einer Temperatur von 37°C. Diese wurde vor starker Lichteinstrahlung geschützt (um EGFP-vermittelte Phototoxizität zu verhindern). Diese ACSF hatte folgende Zusammensetzung (mM): NaCl 126,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.2, KCl 3,  $\text{MgCl}_2$  1,  $\text{CaCl}_2$  2.5,  $\text{NaHCO}_3$  26, Glucose 10, Na-Lactat 4, pH 7.3-7.4. Nach 45 Minuten wurde die Heizung der Gibb'schen Kammer abgestellt, sodass die ACSF nun allmählich auf Raumtemperatur sank. Mit den Experimenten konnte nun nach weiteren 30 Minuten begonnen werden. Die Hirnschnitte wurden bis zu sechs Stunden in der ACSF aufbewahrt. Die Hirnschnitte wurden auf den Grund der Superfusionskammer gelegt und dort mit einem Platinrahmen, welcher mit einem Gitter aus Nylon bespannt war, fixiert. Dort wurden die Hirnschnitte kontinuierlich mit ACSF auf Raumtemperatur super-

fundiert. Die Superfusions-ACSF hatte folgende Zusammensetzung (mM): NaCl 126, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, KCl 3, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 26, Glucose 10, pH 7.3-7.4. Die Superfusionsgeschwindigkeit wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe konstant auf 1,5 ml min<sup>-1</sup> eingestellt. Der Zulauf der Badkammer erfolgte über Schläuche aus Teflon. Um ein Überlaufen der Badkammer zu verhindern, wurde diese an eine Absaugpumpe angeschlossen. Die Versuchsanlage befand sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch, um Erschütterungen der Umgebung abzufangen (Abb. 2.3). Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Zeiss Axioskop 2 FS Mikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit einem 40fach vergrößernden Wasserimmersionsobjektiv betrachtet (Abb. 2.3). Um die PV-FSN zu identifizieren wurde folgendes Fluoreszenz Filter Set verwendet: Excitationsfilter, 475AF45; Dichromatischer Spiegel, 505DRLP; Emissionsfilter, 510ALP (Omega Optical, Brattleboro, VT, USA). Die Belichtungszeit der Schnitte wurde gering gehalten, um das Ausbleichen der Fluoreszenz und die Phototoxizität so gering wie möglich zu halten. Nach der Identifikation mit Hilfe der Fluoreszenz wurden die PV-FSN mit „near infrared video microscopy“ während des "patchen" betrachtet (Abb. 2.3, 2.7 C). Es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei mittelgroßen Neuronen ohne Fluoreszenz um MSN handelt.



**Abbildung 2.3. Patch-Clamp-Setup.** Links: Mikroskop, Patch-Clamp-Mikromanipulatoren, Superfusionskammer für Hirnschnitte, zu- und abführendes Schlauchsystem. Rechts: Patch-Clamp-Verstärker, Oszilloskop, Computer.

## 2.2. Patch-Clamp-Aufnahmetechnik

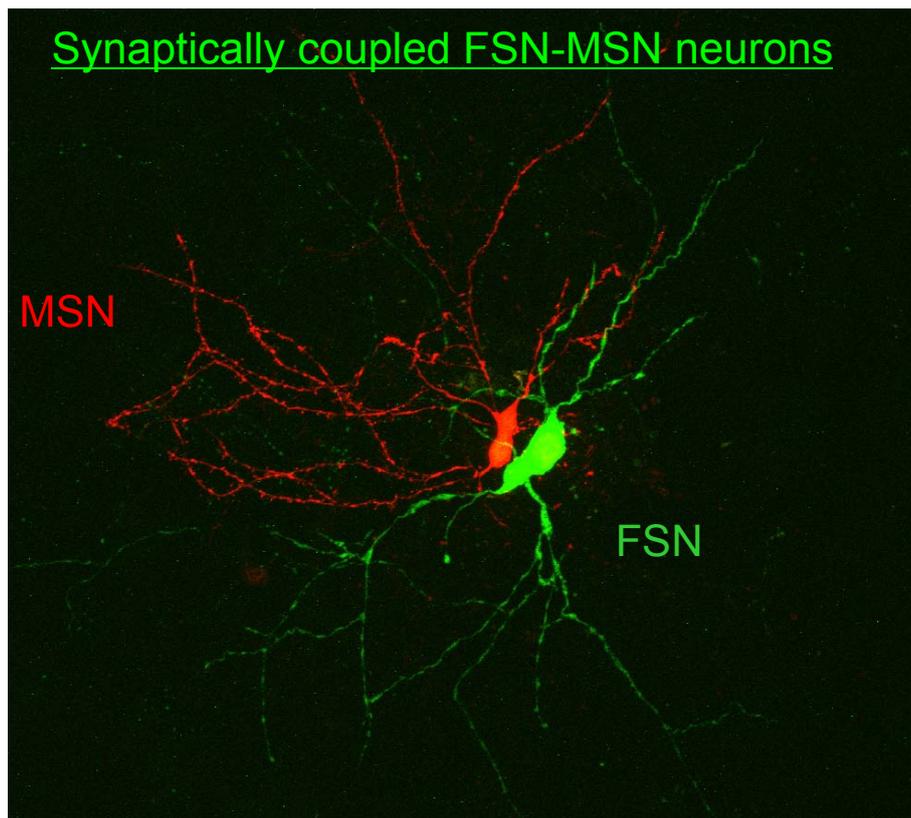
Die Pipetten wurden mit Hilfe des horizontalen Pipettenziehgeräts Model P-97 (Science Products, Hofheim, Deutschland) aus Borosilikatgaskapillaren (Innendurchmesser 1,16 mm, Außendurchmesser 2 mm) gezogen. Sie hatten einen Widerstand von 2 – 5 M $\Omega$  und wurden mit Intrazellulärlösung luftblasenfrei gefüllt. Anschließend wurden ihre Spitzen mit erwärmten, flüssigen Bienenwachs bestrichen. Um die Oberflächenspannung herabzusetzen, wurden sie daraufhin in Polysiloxan (Sigmacote) getaucht. Die nun fertigen Patchpipetten wurden in die Halterung eingespannt. Über einen seitlichen Zugang wurde nun ein Überdruck angelegt, sodass kontinuierlich Puffer aus den Pipetten austrat, um ein Verstopfen dieser beim Eintauchen in die Superfusionskammer zu vermeiden. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden die Pipetten auf den Schnitt heruntergefahren. Befanden sich dann beide Pipetten über den zuvor identifizierten Neuronen, wurde das PV-FSN zuerst „gepatcht“. Hierzu wurde der Überdruck bis auf 5 – 10 cm Wassersäule

reduziert, um Neuronenverbindungen nicht zu zerstören. Sobald die Pipette direkt auf dem Neuron war, wurde der restliche Überdruck weggenommen und ein Unterdruck angelegt, sodass die Zellmembran direkt in Verbindung mit der Pipettenöffnung stand. Nun wartete man ab, ob sich innerhalb von 30 Sekunden ein Giga-seal (Widerstand zwischen Pipette und Zellmembran beträgt Gigaohmwerte) aufbaute. Nach Erreichen eines Gigaseals wartete man eine Minute ab, bevor man durch stoßartiges Anlegen eines Unterdruckes ein Membranpatch herausriss. Nun stand die Zelle in direkter Verbindung mit der mit Intrazellulärpuffer gefüllten Pipette; der sogenannte „Whole-Cell“-Modus wurde erreicht. Nun wurde eine in der Nähe liegende mittelgroße zweite Zelle, die keine Fluoreszenz aufwies, auf dieselbe Weise „gepatcht“ (Abb. 2.7 C).

Die Patch-Clamp-Experimente wurden von dem EPC-9-Doppel-Verstärker aufgezeichnet und die Daten mit Hilfe der TIDA für Windows Software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) ausgewertet. Der Serienwiderstand wurde vor und nach den Aufnahmen bestimmt. Experimente mit deutlichen Veränderungen des Serienwiderstandes (>20 %) wurden verworfen.

### 2.3. Veranschaulichung von synaptisch verbundenen Neuronen im Hirnschnitt

Um die Ausbreitung der Dendriten der Neurone darzustellen und sie nach der Fixierung im Hirnschnitt wieder zu finden, wurden einige Neuronenpaare während des Patch-Clamp-Experiments mit Farbstoffen gefüllt. Hierzu wurden Lucifer Yellow in den Intrazellulärpuffer der Pipette, mit der das PV-FSN gepatcht wurde, gefüllt. Der Pipette für das MSN wurde Alexa Fluor 488 beigelegt. Während des Experiments konnten sich nun die Farbstoffe in den beiden Neuronen ausbreiten. Nach Beendigung des Experiments wurde der Hirnschnitt dann mittels flüssiger Gelatine fixiert und unter einem Laser-scanning Mikroskops betrachtet und so eine dreidimensionale Darstellung der Neurone ermöglicht (Abb 2.4.).



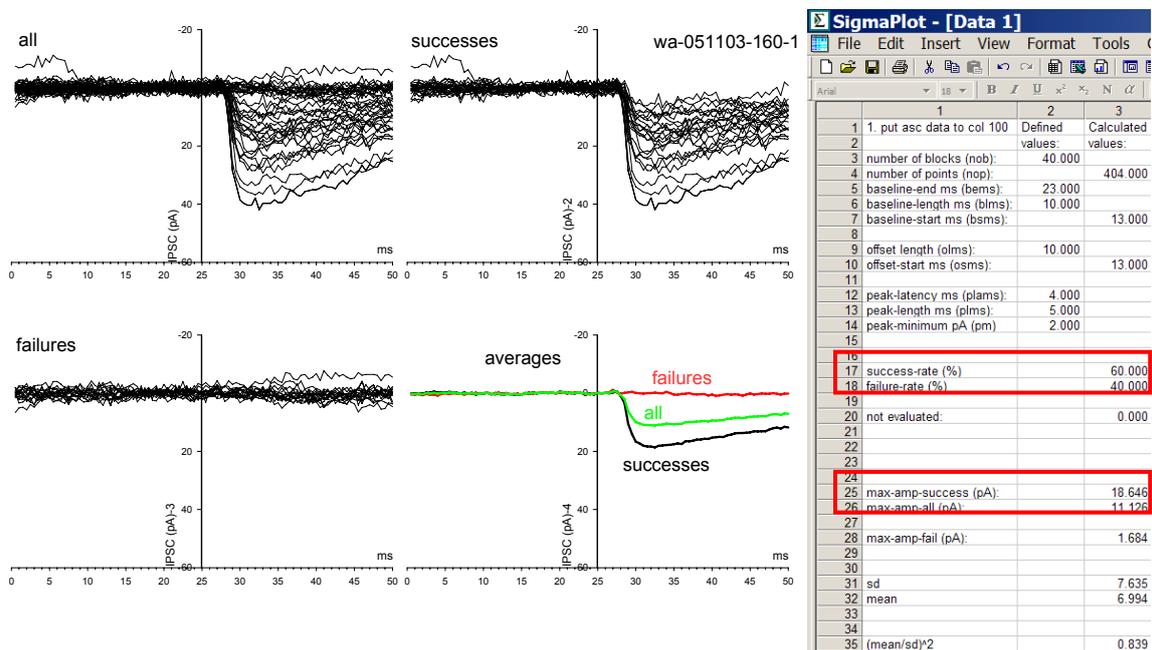
**Abbildung 2.4. Synaptisch verbundenes Neuronenpaar, mit Fluoreszenzfarbstoff gefüllt.** Mit Lucifer Yellow gefülltes PV-FSN. Mit Alexa Fluor 488 gefülltes MSN. Aufnahme mittels eines Laser-scanning Mikroskops.

## 2.4. Aufzeichnungsmethodik

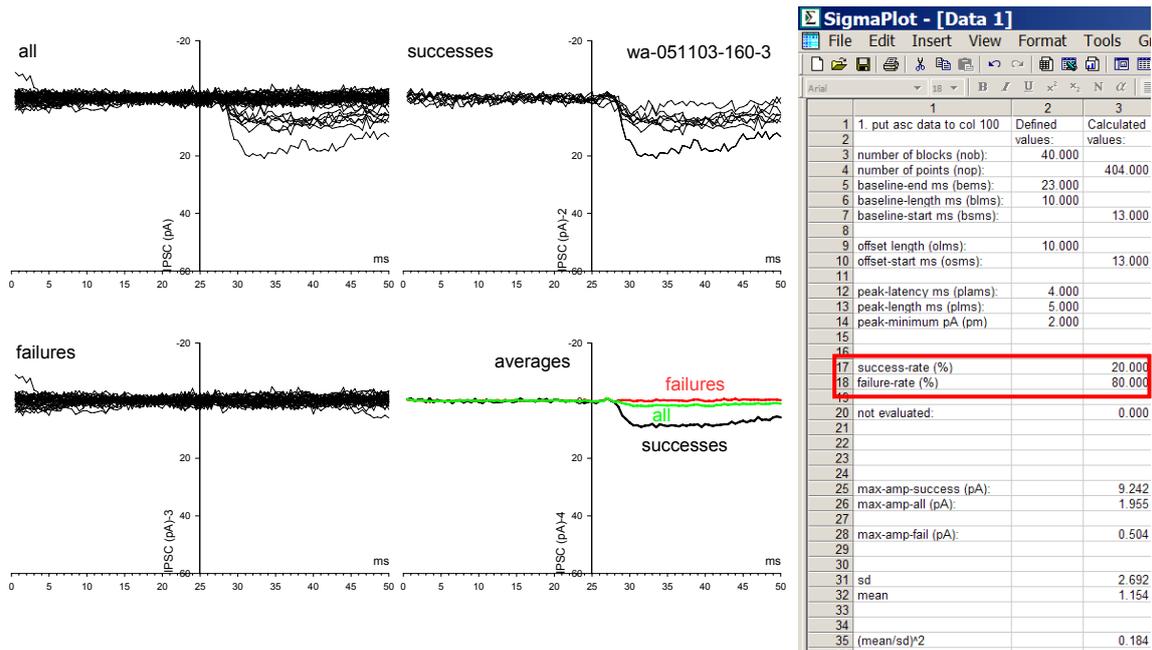
### 2.4.1. Aufzeichnungen der synaptischen Transmission zwischen Neuronenpaaren

Der Superfusions-ACSF wurden AP-5 ( $2.5 \times 10^{-5}$  M) und DNQX ( $10^{-5}$  M) zugesetzt, um schnelle glutamaterge Neurotrasmission zu verhindern. Um die PV-FSN  $\rightarrow$  MSN Neurotrasmission zu untersuchen, wurden die präsynaptischen PV-FSN mit Pipetten gepatcht, die folgende Lösung enthielten (mM): K-gluconat 145,  $\text{CaCl}_2$  0.1,  $\text{MgCl}_2$  2, Hepes 5, EGTA 1.1, ATP-Mg 5, GTP-Tris 0.3, pH 7.4. Die postsynaptischen MSN wurden mit Pipetten gepatcht, die folgende Lösung enthielten: CsCl 142,  $\text{MgCl}_2$  1, Hepes 10, EGTA 1, ATP- $\text{Na}_2$  4, *N*-ethyl-lidocaine Cl (QX-314) 2, pH 7.4. Zur Untersuchung der „depolarization-induced suppression of inhibition“ (DSI) wurden die postsynaptischen MSN mit Pipetten folgenden Puffers gepatcht (mM): CsCl 147,  $\text{MgCl}_2$  1, Hepes 10, EGTA 1, ATP- $\text{Na}_2$  4, GTP- $\text{Na}_2$  0.4, *N*-ethyl-lidocaine Cl 2, pH 7.4. Um die MSN  $\rightarrow$  MSN Neurotrasmission zu untersuchen, wurde eine Pipettenlösung gewählt, die sowohl für die präsynaptischen als auch für postsynaptischen Neurone verwendet werden konnte (mM): K-gluconat 93, KCl 36,  $\text{MgCl}_2$  2, Hepes 10, EGTA 0.02, ATP- $\text{Na}$  3, GTP-Tris 0.3, pH 7.4. Diese machte es möglich, die synaptische Verbindung der Neuronenpaare in beide Richtungen zu testen: dies war notwendig, da die Häufigkeit der synaptischen Verbindung sehr gering war (Tabelle 3.1). Einzelne Aktionspotentiale der präsynaptischen Neurone wurden im Current-Clamp-Modus durch das Anlegen eines depolarisierenden Stroms (500 – 800 pA für 3 – 5 ms) verursacht. Postsynaptische Ereignisse wurden bei einem Haltepotential von -60 mV (PV-FSN  $\rightarrow$  MSN Transmission) oder von -70 mV (MSN  $\rightarrow$  MSN Transmission) aufgezeichnet. Die synaptische Transmission wurde alle 15 s (PV-FSN  $\rightarrow$  MSN Transmission) oder alle 3 s (MSN  $\rightarrow$  MSN Transmission) aktiviert. Die Parameter der synaptischen Transmission (Success-Rate, durchschnittliche Amplitude der Successes, durchschnittliche Amplitude aller Ereignisse, die auf ein Aktionspotential folgen [sowohl Successes als auch Failures] und  $\text{mean}^2/\text{SD}^2$ ) wurden für 40 (PV-FSN  $\rightarrow$  MSN Transmission) und für 200 (MSN  $\rightarrow$  MSN Transmission) synaptische Ereignisse von einem Programm in Sigmaplot (SPSS, Chicago, IL, USA) berechnet, welches mein Doktorvater selbst geschrieben hat. Nach

jeder Aufzeichnung wurden zuerst die auszuwertenden Parameter definiert: 1) die Periode, während der die Baseline berechnet wurde, 2) die Periode, in der nach einem Peak gesucht wurde und 3) die Amplitudengröße, ab welcher ein Ereignis als ein Success gewertet wurde. Auf dieser Grundlage suchte das Programm nach Successes (oberhalb der festgelegten Amplitudengröße) und Failures (unterhalb der festgelegten Amplitudengröße). Alle synaptischen Ereignisse (Successes und Failures) und ihre durchschnittlichen Größen wurden dann graphisch dargestellt (Abb 2.5 und Abb. 2.6). Wurden Successes und Failures nicht richtig erkannt, so wurden die Parameter solange neu definiert, bis diese optimal erkannt wurden. Aufnahmen, die von einem Neuron stammten, wurden immer mit den gleichen Parametern ausgewertet (z. B. Aufnahmen vor und während Cannabinoidgabe). Das Programm ermöglichte es uns, nicht dazugehörige Ereignisse zu löschen (wie z. B. sIPSC). Nachdem eine optimale Auswertung erreicht war, bestimmte das Programm die Success-Rate und aus den Successes und allen Ereignissen, die Amplitude der Successes und aller Ereignisse.



**Abb 2.5. Auswertung synaptischer Ereignisse, die vor Cannabinoidgabe aufgezeichnet wurden.** Dies ist die Auswertung des Experiments aus Abb.3.5.. PRE-Periode (vor Cannabinoidgabe; 40 Ereignisse). Die Success-Rate lag bei 60%, die Amplitude der Successes bei 18.6 pA und die Amplitude aller Ereignisse (inklusive Successes und Failures) bei 11.1 pA.



**Abb 2.6. Auswertung synaptischer Ereignisse, die während Cannabinoidgabe aufgezeichnet wurden.** Dies ist die Auswertung des Experiments aus Abb.3.5. WIN-Superfusion (40 Ereignisse). Die Success-Rate lag bei 20%, die Amplitude der Successes bei 9.2 pA und die Amplitude aller Ereignisse (inklusive Successes und Failures) bei 1.96 pA.

Eine Veränderung der durchschnittlichen Amplitude aller Ereignisse spiegelt eine Veränderung sowohl in der Success-Rate als auch in der Amplitude der Successes wieder. Eine Abnahme des Parameters  $\text{mean}^2/\text{SD}^2$  deutet auf eine verminderte Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit hin (vergleiche Clements, 1990; Koos & Tepper, 2002; Galante & Marty, 2003).

#### 2.4.2. Registrierung von miniatur inhibitorischen postsynaptischen Strömen (mIPSCs) in MSN

Die Superfusions-ACSF enthielt AP-5 ( $2.5 \times 10^{-5}$  M), DNQX ( $10^{-5}$  M) und Tetrodotoxin ( $3 \times 10^{-7}$  M). Die Patchpipetten wurden mit folgender Lösung gefüllt (mM): CsCl 142, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, EGTA 1, ATP-Na<sub>2</sub> 4, N-ethyl-lidocaine Cl (QX-314) 2, pH 7.4.

Die mIPSCs wurden bei einem Haltepotential von -60 mV in 120 s-Perioden registriert und mit der MiniAnalysis Software (Version 6.0.1; Synptosoft, Decatur, GA, USA) ausgewertet.

### **2.4.3. Registrierung von Membranpotential, Haltestrom und von durch Depolarisierung verursachten Aktionspotentialen in PV-FSN**

Die Superfusions-ACSF enthielt AP-5 ( $2.5 \times 10^{-5}$  M), DNQX ( $10^{-5}$  M) und Bicucullin ( $2 \times 10^{-5}$  M), um schnelle glutamaterge und GABAerge Signale zu unterbinden. In diesen Experimenten wurde der Perforated-Patch-Clamp-Modus verwendet, um das intrazelluläre Milieu der Neurone zu erhalten. Die Pipetten enthielten (mM): K-gluconat 145,  $\text{CaCl}_2$  0.1,  $\text{MgCl}_2$  2, Hepes 5, EGTA 1.1, ATP-Mg 5, GTP-Tris 0.3, pH 7.4. Dieser Lösung wurden 300  $\mu\text{g/ml}$  Amphotericin B zugesetzt, um Perforated-Patches herzustellen. Die Aktionspotentiale der PV-FSN wurden jede Minute durch einen depolarisierenden Strom (300 – 900 pA für 500 ms) erzeugt.

### **2.4.4. Protokolle und Statistik**

Mit der Aufzeichnung wurde 15 – 30 Minuten nach dem Erreichen des Whole-Cell oder des Perforated-Patch-Modus begonnen. In den Abbildungen entsprechen 0 Minuten dem Beginn der Aufzeichnung. Die Superfusion mit Solvent oder den verschiedenen Substanzen ist in den Abbildungen dargestellt. Die Werte der Parameter während der Superfusion von Solvent oder den Substanzen werden in Bezug zur initialen Referenzperiode dargestellt.

Es wurden überall Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die nichtparametrische Mann-Whitney- und Wilcoxon-singed-rank-Tests wurden verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Substanz vs. Solvent) und innerhalb einer Gruppe (Substanz vs. PRE) herauszufinden. Als statistische Grenze der Signifikanz wurde  $P < 0.05$  angesetzt.

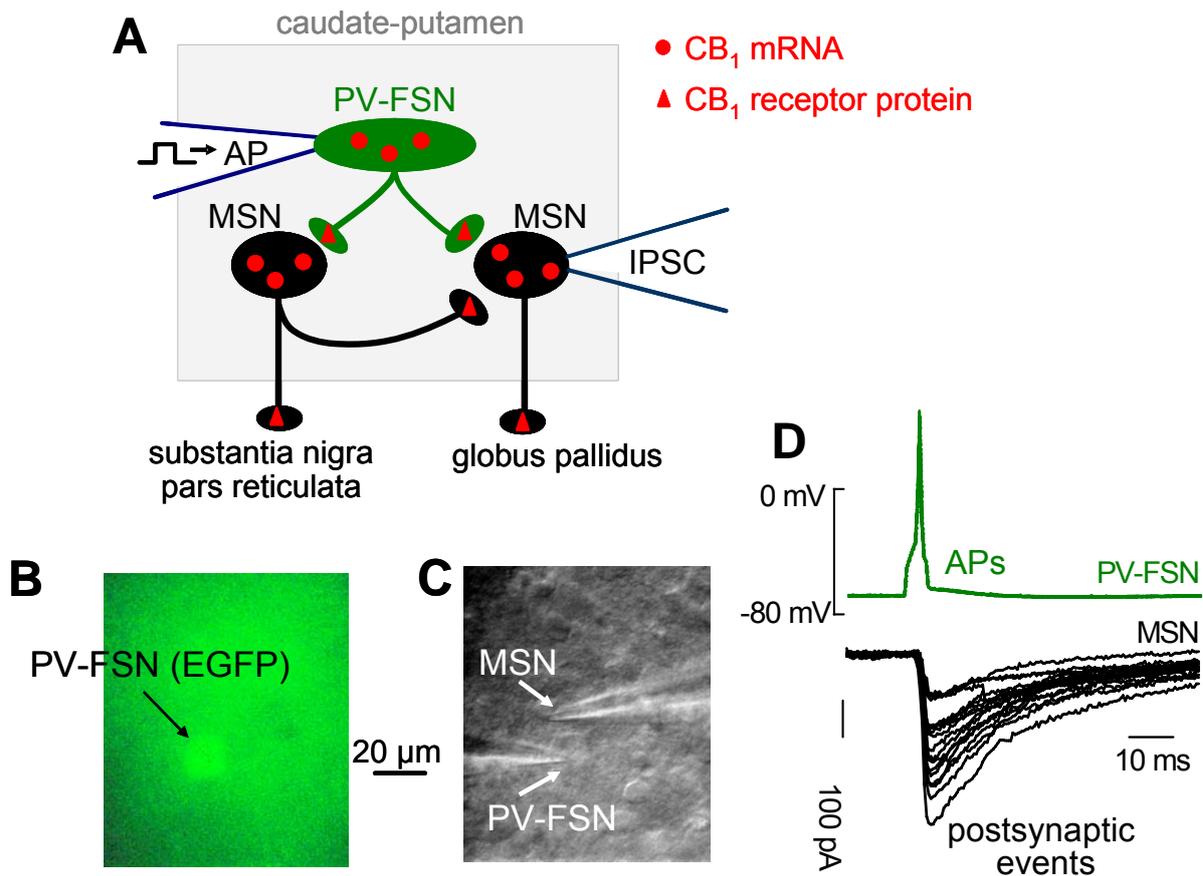
## 2.5. Substanzen

Die Substanzen wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tocris Cookson (Bristol, England)	(R)-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3[(morpholinyl)-methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl)methanone mesylate (WIN55212-2) Tetrodotoxin-citrate (TTX) DL-2-Amino-5-phosphonvaleriansäure (AP5) 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione (DNQX) R-Baclofen
Sanofi (Montpellier, Frankreich)	Rimonabant (früher SR141716)
Sigma (Deisenhofen, Deutschland)	Mg-ATP Amphotericin B +(-)Bicucullin R-Baclofen Lucifer Yellow Na <sub>2</sub> -ATP Tris-GTP
Abbott-GmbH (Wiesbaden, Deutschland)	Halothan
Molecular Probes	Alexa Fluor 488® hydrazide sodium salt
Alamone Labs (Jerusalem, Israel)	N-Ethylidocain-HCl (QX314)

Die Cannabinoidliganden WIN55212-2 und Rimonabant wurden in Dimethylsulphoxid (DMSO) gelöst und in 100 µl Portionen bei -32 °C tiefgefroren. Weitere Verdünnungen wurden mit Superfusionspuffer durchgeführt; die endgültige DMSO-

Konzentration lag bei  $1 \text{ ml l}^{-1}$ . Die Kontrolllösungen enthielten die entsprechende Konzentration an DMSO. Da die Cannabinoidliganden aufgrund ihrer Lipophilie aus den Hirnschnitten nicht auswaschbar sind, konnte jeweils nur eine Konzentration eines Cannabinoidliganden pro Hirnschnitt getestet werden.



**Abbildung 2.7. Aufzeichnung der synaptischen Transmission zwischen PV-FSN und MSN**

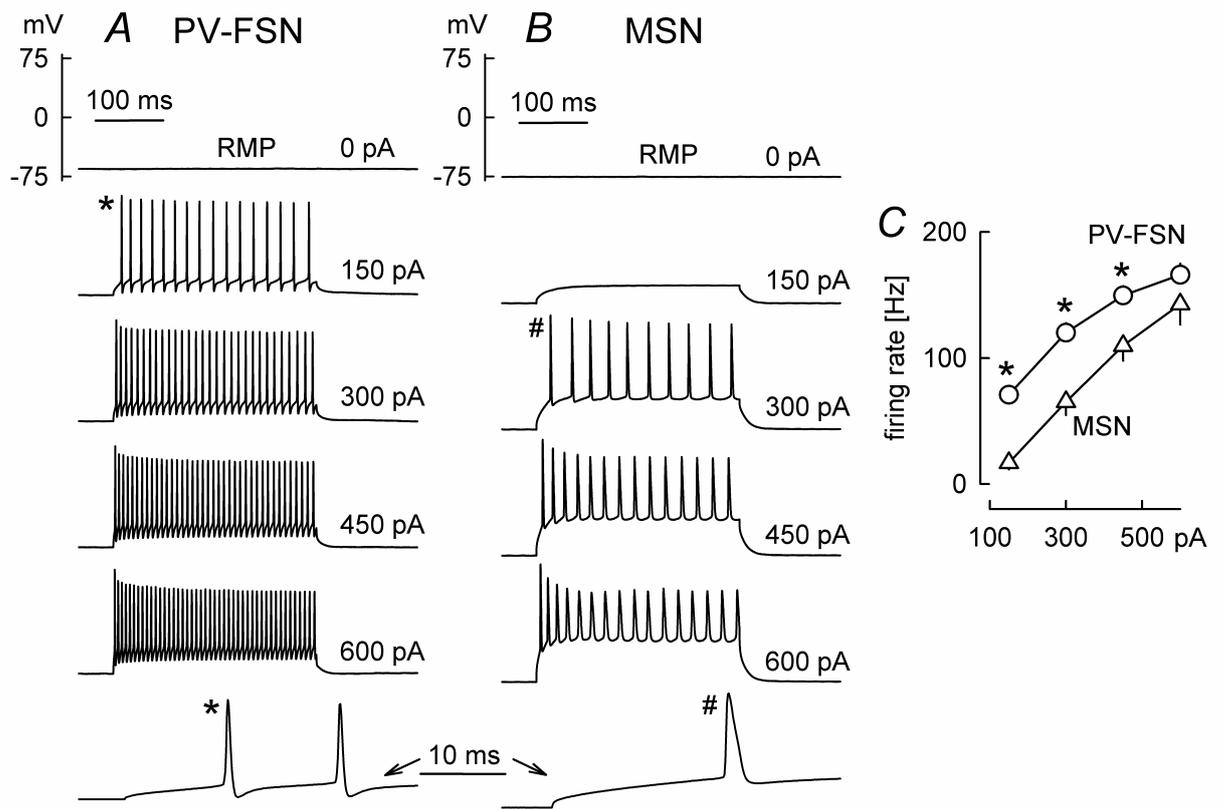
A) Das GABAerge PV-FSN innerviert MSN. GABAerge MSN projizieren zur Substantia nigra pars reticulata und zum Globus pallidus und senden rekurrente Axonkollaterale zu benachbarten MSN. B) Durch enhanced green fluorescent protein (EGFP) grün fluoreszierendes PV-FSN. C) Infrarotvideomikroskopisches Bild eines gepatchten Neuronenpaares (es handelt sich um dasselbe PV-FSN wie in B) D) Synaptische Verbindung der Neurone aus B und C. 20 präsynaptische Aktionspotentiale (APs) (übereinanderprojiziert) und die dazugehörigen postsynaptischen Antworten (events).

### 3. Ergebnisse

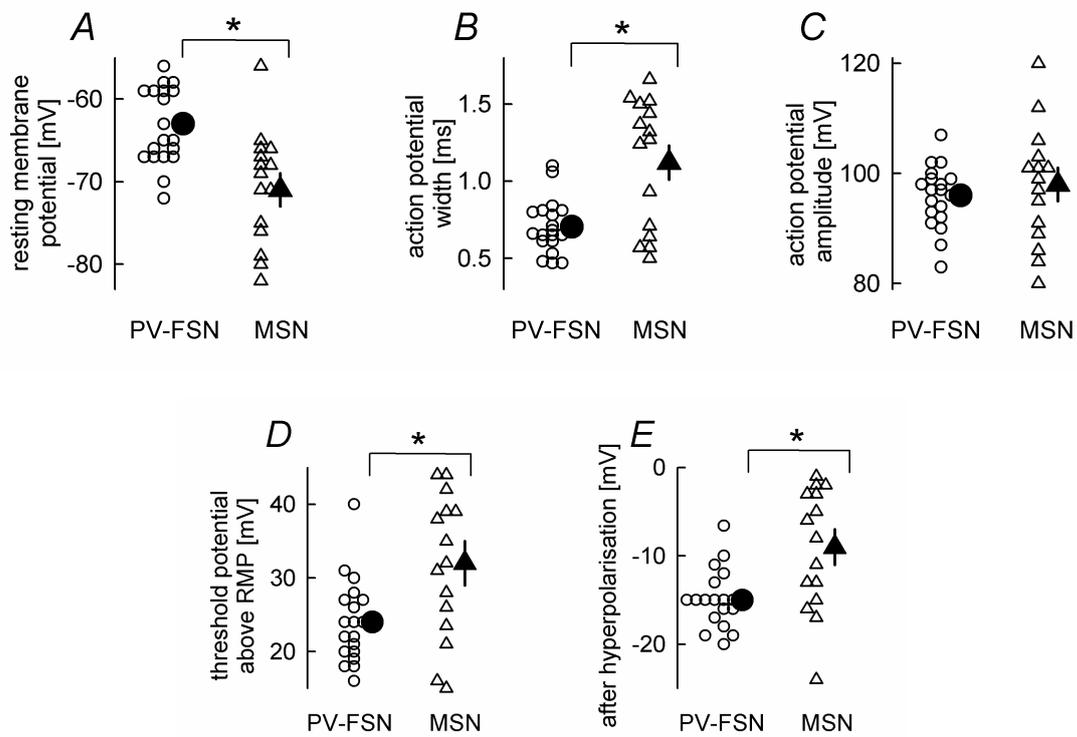
#### 3.1 Charakterisierungen von PV-FSN und MSN

Ein PV-FSN wurde auf Grund seiner grünen Fluoreszenz identifiziert und gepatcht (Abb. 2.7 A-C). Ein mittelgroßes Neuron ohne Fluoreszenz in der Nähe des PV-FSN wurde als MSN angesehen und ebenfalls gepatcht (Abb. 2.7 A, C). In den ersten Experimenten hatten wir die elektrischen Eigenschaften von 19 PV-FSN und 15 MSN ermittelt (Abb.3.1). Im Current-Clamp-Modus, bei einem Haltestrom von 0 pA, waren beide Neuronentypen still. Sie feuerten keine Aktionspotentiale. Das Ruhemembranpotential der MSN war negativer als das der PV-FSN (PV-FSN  $-63 \pm 1$  mV; MSN:  $-71 \pm 2$  mV;  $P < 0.05$ ). Depolarisierende Strominjektionen verursachten Aktionspotentialsalven (Abb.3.1). Der Schwellenwert des Aktionspotentials war bei beiden Neuronentypen gleich (PV-FSN:  $-39 \pm 1$  mV; MSN:  $-39 \pm 2$  mV;  $P = 0.577$ ). Die Amplituden der Aktionspotentiale waren in beiden Populationen sehr ähnlich (PV-FSN:  $96 \pm 1$  mV; MSN:  $98 \pm 2$  mV;  $P = 0.521$ ). Die Afterhyperpolarisation, welche auf das Aktionspotential folgte, war bei den PV-FSN größer als bei den MSN (PV-FSN:  $-15 \pm 1$  mV; MSN:  $-9 \pm 2$  mV;  $P < 0.05$ ) (Abb.3.1). Die Breite des Aktionspotentials wurde bei der Hälfte der Amplitude ermittelt. Die Aktionspotentiale der PV-FSN waren schmaler (PV-FSN:  $0.70 \pm 0.04$  ms; MSN:  $1.12 \pm 0.11$  ms;  $P < 0.05$ ) (Abb.3.1 A, B). Steigende depolarisierenden Strominjektionen (150 - 600 pA) führten zu einem Anstieg der Feuerfrequenz bei beiden Neuronentypen. Die PV-FSN waren in der Lage mit einer höheren Frequenz als die MSN zu feuern (Abb.3.1. C). Der Eingangswiderstand war bei beiden Neuronentypen ähnlich (PV-FSN:  $273 \pm 29$  M $\Omega$ ; MSN:  $272 \pm 42$  M $\Omega$ ;  $P = 0.535$ ).

Die beiden Neuronenpopulationen unterschieden sich also in vier Merkmalen: Ruhemembranpotential, Afterhyperpolarisation, Aktionspotentialbreite und Feuerfrequenz. Wir untersuchten die Streubreite der einzelnen Werte dieser Merkmale (Abb 3.2), wobei sich zeigte, dass es erhebliche Überlappungen in der Streubreite der einzelnen Parameter gab. Eine zuverlässige Identifikation, ausschließlich auf den elektrophysiologischen Eigenschaften beruhend, war bei unserern Hirnschnitten also nicht möglich.



**Abbildung 3.1. Charakterisierung von PV-FSN und MSN.** A) Antwort eines PV-FSN. B) Antwort eines MSN. Das Membranpotential wurde im Whole-Cell-Modus und im Current-Clamp-Modus aufgezeichnet. Die Pipetten enthielten einen Puffer auf Kaliumgluconat-Basis. Ohne Strominjektion (0 pA) waren beide Neurone still. Sie feuerten keine Aktionspotentiale. Das Ruhemembranpotential (RMP) war stabil. 300 ms lange Strominjektionen (150 pA, 300 pA, 450 pA, 600 pA) depolarisierten das Neuron und lösten Aktionspotentialsalven aus. Die Aktionspotentiale, die mit \* und # markiert sind, sind auf einer vergrößerten Zeitskala zu sehen. C) Statistische Darstellung der Feuerfrequenz. Die Feuerfrequenz wurde aus dem Abstand der ersten beiden Aktionspotentiale der Aktionspotentialsalven berechnet. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von 19 (PV-FSN) und 15 (MSN) (Der Standardfehler ist vereinzelt kleiner als das darstellende Symbol) Signifikanter Unterschied zu MSN: \* $P < 0.05$ .



**Abb 3.2. Streubreite der elektrophysiologischen Eigenschaften von PV-FSN und MSN.** A) Ruhemembranpotential, aufgezeichnet im Current-Clamp-Modus. B) Breite der Aktionspotentiale, ermittelt bei der Hälfte der Amplitude. C) Amplitude der Aktionspotentiale. D) Schwellenwert der Aktionspotentiale E) Afterhyperpolarisation.

## 3.2 Synaptische Transmission zwischen PV-FSN und MSN

### 3.2.1. Charakterisierung der synaptischen Transmission

Von 173 PV-FSN → MSN Neuronenpaaren waren 35 synaptisch miteinander verbunden, wovon 15 Verbindungen stabil genug waren, um langandauernde Experimente mit Solvent oder Cannabinoiden durchzuführen. Tabelle 3.1 zeigt die Parameter der synaptischen Transmission dieser 15 Paare, die in der initialen Referenz-Periode (PRE) bestimmt wurden. Die präsynaptischen PV-FSN wurden alle 15 s (0.0067 Hz) stimuliert, worauf ein Aktionspotential folgte. Dieses wiederum verursachte ein postsynaptisches Ereignis in den MSN (Abb. 2.7 D). Postsynaptische Ereignisse traten mit einer Latenzzeit von 1.8 ms auf. Die Success-Rate der synaptischen Transmission lag bei 86%. Die durchschnittliche Amplitude der erfolgreichen, an das Aktionspotential gekoppelten postsynaptischen Ereignisse, war 66 pA. Die durchschnittliche Amplitude von allen an das Aktionspotential gekoppelten postsynaptischen Ereignissen (einschließlich Successes und Failiures) war 63 pA (etwas niedriger als die Amplitude der Successes, da die Success-Rate 86% war).

**Tabelle 3.1. Parameter der PV-FSN → MSN und der MSN → MSN- Transmission**

Durchschnitt ± S.E.M (Standardfehler) - aufgenommen während der initialen Referenzperiode (PRE; bevor Solvent oder Substanzen verabreicht wurden).

\* Signifikante Unterschiede zwischen PV-FSN → MSN und MSN → MSN Transmission:  $P < 0.05$ .

	PV-FSN → MSN	MSN → MSN
1) Coupling ratio % <sup>a</sup>	20 (35/173)	12 (29/251)
2) Number of experiments	$n = 15$	$n = 7$
3) Stimulation rate (Hz)	0.067	0.33
4) Latency (ms) <sup>b</sup>	$1.8 \pm 0.1$	$2.6 \pm 0.2^*$
5) Success-Rate (%) <sup>c</sup>	$86 \pm 4$	$18 \pm 9^*$
6) Amplitude of successes (pA)	$66 \pm 17$	$(13 \pm 4) 39 \pm 12^d$
7) Conductance of successes (pS)	$922 \pm 24$	$(412 \pm 139) 1236 \pm 417^d$
8) Amplitude of all events (pA) <sup>f</sup>	$63 \pm 18$	$(2 \pm 1) 6 \pm 3^{d*}$
9) S.D./mean (coefficient of variation)	$0.66 \pm 0.066$	$3.44 \pm 0.70^*$
10) $\text{Mean}^2/\text{S.D.}^2$	$4.0 \pm 1.0$	$0.35 \pm 0.25^*$

<sup>a</sup> Anteil der synaptisch verbindenden Neuronenpaare. (35 PV-FSN → MSN Paare von 173 getesteten waren gekoppelt. 29 MSN → MSN Paare von 251 getesteten waren gekoppelt.) Nur 15 der 35 (PV-FSN → MSN) und 7 der 29 (MSN → MSN) gekoppelten Paare wurden in die statistische Auswertung genommen, da bei den übrigen die Verbindung nicht stabil genug war, um langandauernde Experimente durchzuführen.

<sup>b</sup> Intervall zwischen Beginn des präsynaptischen Aktionspotentials und Beginn der postsynaptischen Antwort.

<sup>c</sup> Anzahl der zu 100 presynaptischen Aktionspotentialen synchron auftretenden erfolgreichen postsynaptischen Antworten.

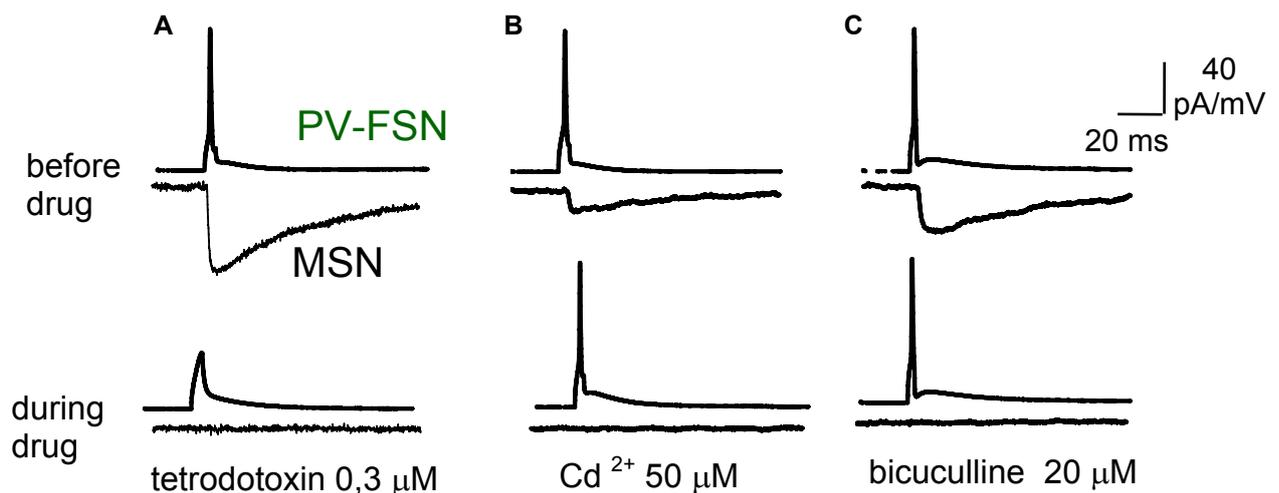
<sup>d</sup> Es wurde zur Untersuchung der MSN → MSN Transmission kein Cäsium in die postsynaptische Pippette gegeben. Dies führt zu einer Verminderung des Stroms und der elektrischen Leitfähigkeit um den Faktor 3 (Koos et al., 2004). Um die PV-FSN → MSN und MSN → MSN Transmission besser miteinander vergleichen zu können, wurden die Durchschnittswerte ( $13 \pm 4$  pA,  $412 \pm 139$ ps,  $2 \pm 1$ pA) mit dem Faktor 3 multipliziert.

<sup>e</sup> Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde die elektrische Leitfähigkeit errechnet (da die Chloridkonzentration und das Haltepotential der postsynaptischen Neurone in den Gruppen unterschiedlich waren).

<sup>f</sup> Durchschnittliche Amplitude aller Ereignisse (sowohl der erfolgreichen als auch der nicht erfolgreichen Übertragungen). Die folgende Gleichung gilt für Einzelexperimente, jedoch nicht für den Durchschnittswert: amplitude of all events = amplitude of successes x success rate/100.

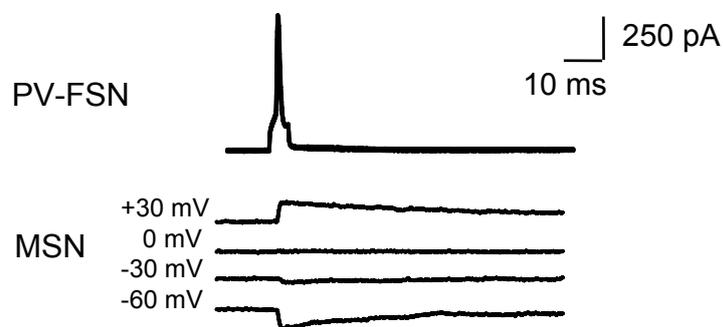
<sup>g</sup> S.D./mean und  $\text{mean}^2/\text{S.D.}^2$  wurden aus der Amplitude aller synaptischen Ereignisse berechnet.

Die synaptische Transmission zwischen PV-FSN und MSN zeigte die typischen Eigenschaften einer durch ein Aktionspotential verursachten GABAergen Neurotransmission. Die synaptische Transmission wurde durch die Gabe von Tetrodotoxin, wodurch die Entwicklung eines Aktionspotentials im PV-FSN verhindert wurde, aufgehoben (Abb. 3.3 A). 10 Minuten nach dem Beginn der Superfusion mit Tetrodotoxin ( $3 \times 10^{-7}$  M) sank die Amplitude des postsynaptischen Ereignisses auf  $3 \pm 2\%$  des initialen Referenzwertes ( $n = 5$ ;  $P < 0.05$ ). Cadmium blockierte ebenfalls die Neurotransmission, indem es durch Blockade spannungsabhängiger Calcium-Kanäle in den präsynaptischen Axonendigungen die Transmitterfreisetzung verhindert. (Abb. 3.3 B). 10 Minuten nach dem Beginn der Superfusion mit Cadmium ( $5 \times 10^{-5}$  M) sank die Amplitude des postsynaptischen Ereignisses auf  $1 \pm 1\%$  des initialen Referenzwertes ( $n = 4$ ;  $P = 0.07$ ). Die Blockade von postsynaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren durch Bicucullin verhinderte ebenfalls die Entstehung eines postsynaptischen Ereignisses (Abb. 3.3 C). 10 Minuten nach dem Beginn der Superfusion mit Bicucullin ( $2 \times 10^{-5}$  M), sank die Amplitude des postsynaptischen Ereignisses auf  $7 \pm 2\%$  des initialen Referenzwertes ( $n=9$ ;  $P < 0.05$ ).



**Abbildung 3.3. Charakterisierung der PV-FSN → MSN- Transmission.** Aufzeichnung der Neurotransmission während der Gabe von TTX (A), Cadmium (B) und Bicucullin (C).

Um zu ermitteln, welche Ionenart die postsynaptischen Ereignisse verursacht, wurde das Umkehrpotential der synaptischen Antwort bestimmt. Dazu wurde schrittweise das Ruhepotential der postsynaptischen Zelle von -60mV auf +30mV verändert und die Amplitude und Richtung der synaptischen Antwort beobachtet. Das Umkehrpotential lag bei +3 mV ( $n = 13$ ) und somit in der Nähe des Gleichgewichtspotentials von Chloridionen unter unseren Bedingungen (+2mV). Daraus schließen wir, dass Chlorid der Hauptladungsträger der postsynaptischen Ströme ist. (Abb. 3.4).



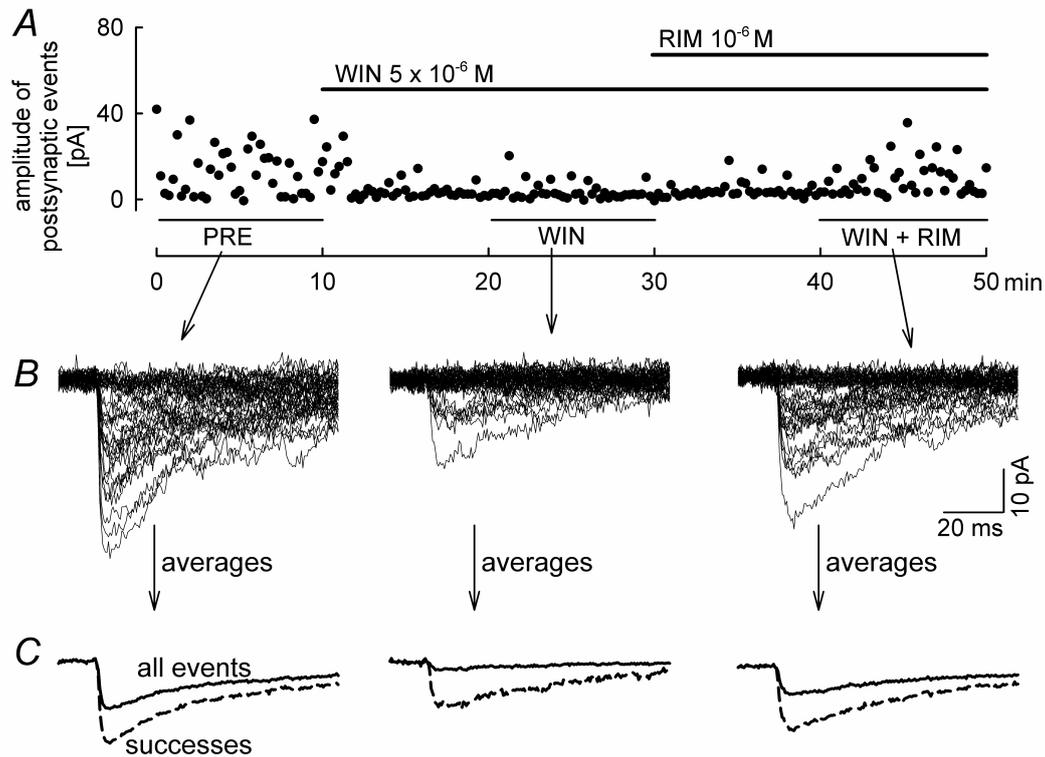
**Abbildung 3.4. Bestimmung des Umkehrpotentials der synaptischen Antwort**

### 3.2.2. Cannabinoide hemmen die synaptische Transmission

Die Auswirkungen des synthetischen CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten WIN55212-2 und des CB<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Rimonabant auf die synaptische Transmission sind in Abb. 3.5 (Originalabbildung) und Abb. 3.6 (statistisch analysiert) dargestellt. WIN55212-2 ( $5 \times 10^{-6}$  M) verringerte die Success-Rate der Neurotransmission (Abb. 3.5 A, B, 3.6 A) und die Amplitude der Successes (Abb. 3.5 A, C, 3.6 B). Folglich nahm die durchschnittliche Amplitude aller Ereignisse – was sowohl die Veränderung der Success-Rate als auch die Veränderung der Amplitude der Successes beinhaltet – stark ab (Abb. 3.5 C, 3.6 C). Der Parameter  $\text{mean}^2/\text{SD}^2$  nahm ebenfalls ab (Abb. 3.6 D). WIN55212-2 verursachte keinerlei Veränderung an den Aktionspotentialen der präsynaptischen PV-FSN. Außerdem hob die Superfusion des Antagonisten Rimonabant ( $10^{-6}$  M) die durch WIN55212-2 verursachten Veränderungen wieder auf (Abb. 3.5 A-C, 3.6 A-D).

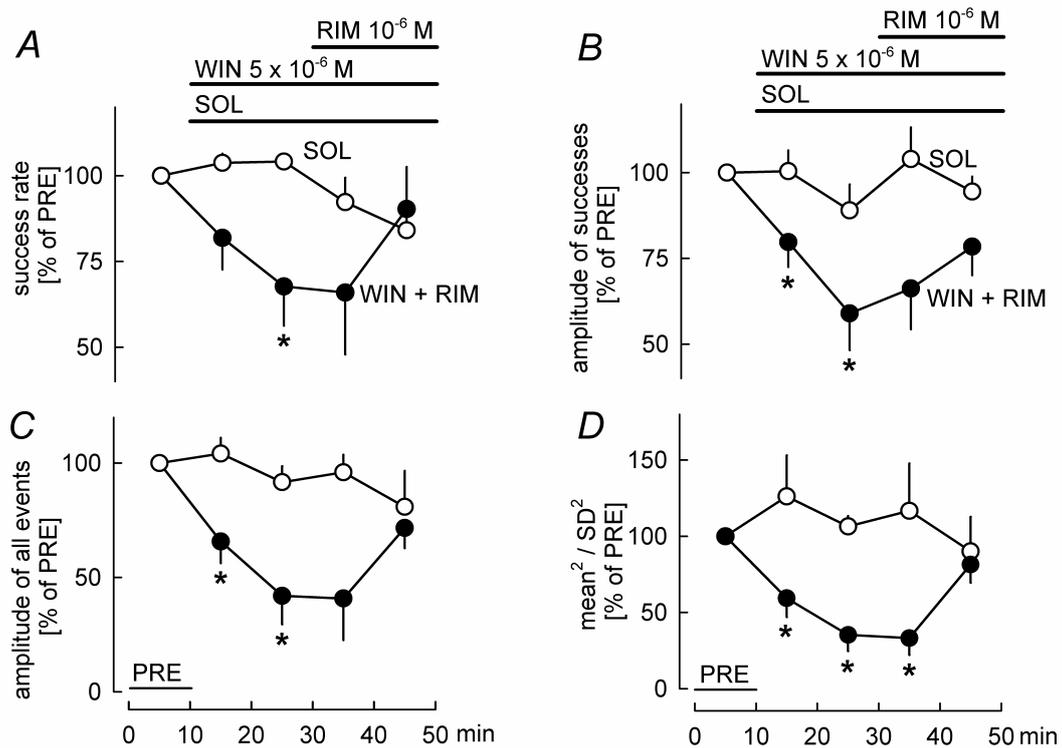
In drei weiteren Experimenten wurde zuerst Rimonabant ( $10^{-6}$  M) superfundiert, im Anschluss daran WIN55212-2 ( $5 \times 10^{-6}$  M) zusammen mit Rimonabant (Abb. 3.7). Während der alleinigen Superfusion von Rimonabant änderten sich die Success-Rate ( $99 \pm 2$  % von PRE,  $n = 3$ ), die Amplitude der Successes ( $93 \pm 5$  % von PRE,  $n = 3$ ), die Amplitude aller synaptischen Ereignisse ( $92 \pm 6$  % von PRE,  $n = 3$ ) und  $\text{mean}^2/\text{SD}^2$  ( $113 \pm 16$  % von PRE,  $n = 3$ ) nicht. Das Fehlen eines Effekts des Antagonisten alleine deutet darauf hin, dass die synaptische Transmission nicht durch Endocannabinoide gehemmt wird.

In der Gegenwart von Rimonabant hatte WIN55212-2 keinen signifikanten Einfluss auf die Success-Rate ( $98 \pm 9$  % des Wertes der vorangegangenen Superfusion vom WIN55212-2;  $n = 3$ ), die Amplitude der Successes ( $78 \pm 18$  % des Wertes der vorangegangenen Superfusion vom WIN55212-2;  $n = 3$ ), die Amplitude aller synaptischen Ereignisse ( $80 \pm 24$  % des Wertes der vorangegangenen Superfusion vom WIN55212-2;  $n = 3$ ) und auf  $\text{mean}^2/\text{S.D.}^2$  ( $116 \pm 42$  % des Wertes der vorangegangenen Superfusion vom WIN55212-2;  $n = 3$ ). Der Antagonismus von Rimonabant auf die Wirkung von WIN55212-2 mit diesem Protokoll und mit dem Protokoll, welches in Abb. 3.5 und 3.6 dargestellt wird, legt nahe, dass CB<sub>1</sub>-Rezeptoren bei der Hemmung durch WIN55212-2 eine Rolle spielen.



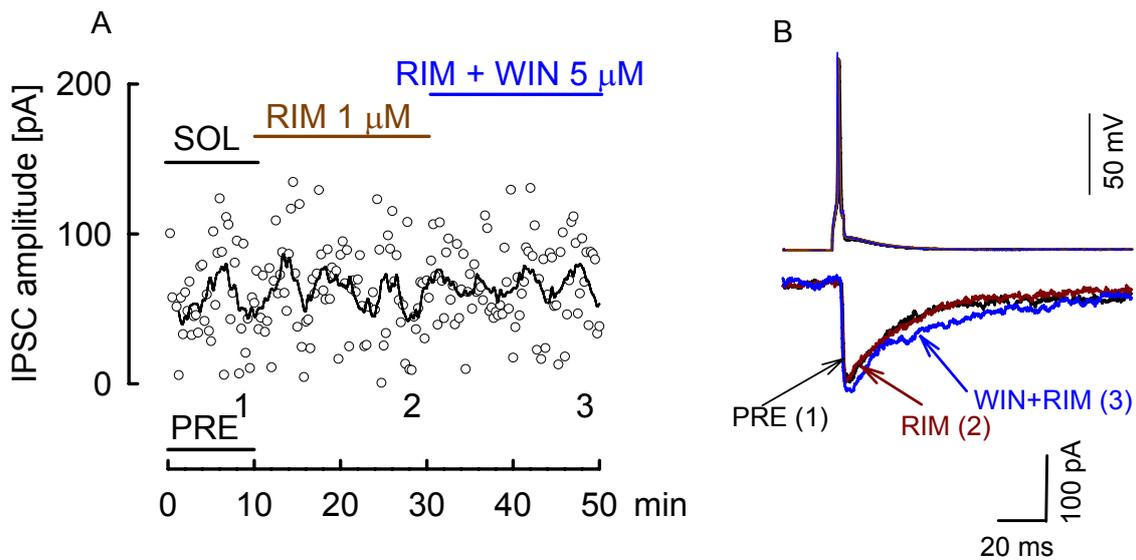
**Abbildung 3.5. Wirkung des synthetischen CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten WIN55212-2 (WIN) und des CB<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Rimonabant (RIM) auf die synaptische Transmission zwischen PV-FSN und MSN: Originalabbildungen.**

Die Aktionspotentiale wurden alle 15 s durch eine depolarisierende Strominjektion hervorgerufen und die darauf folgenden postsynaptischen Ereignisse in den MSN aufgezeichnet. A) Stellt die Amplituden der postsynaptischen Ereignisse dar. B) Vierzig Ereignisse, die während der initialen Referenzperiode (PRE), während der Superfusion mit WIN 55212-2 und während der kombinierten Superfusion mit WIN55212-2 und Rimonabant aufgezeichnet wurden. Die Success-Rate lag bei 60%, 20% und 48% während PRE, WIN und WIN+RIM. C) Mittelwert von Successes und allen Ereignissen von den in B gezeigten Kurven.



**Abbildung 3.6. Wirkung des synthetischen CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten WIN55212-2 (WIN) und des CB<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Rimonabant (RIM) auf die synaptische Transmission zwischen PV-FSN und MSN: statistische Auswertung.**

Die Aktionspotentiale wurden alle 15s durch eine depolarisierende Strominjektion hervorgerufen und die darauf folgenden postsynaptischen Ereignisse in den MSN aufgezeichnet. Die Parameter der synaptischen Transmission wurden für 40 Ereignisse, welche in 10-minütigen Phasen aufgezeichnet wurden, berechnet und in Prozent des initialen Referenzwertes PRE ausgedrückt. Hirnschnitte der Solvent-Gruppe wurden während des ganzen Experiments mit SOL superfundiert. Die andere Gruppe erhielt WIN und RIM wie oben dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von jeweils 6 (WIN+RIM) und 6 (SOL) Experimenten. Signifikanter Unterschied zur SOL-Gruppe: \* $P < 0.05$ .



**Abbildung 3.7. Wirkung des synthetischen CB<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Rimonabant alleine und in Kombination mit WIN55212-2.**

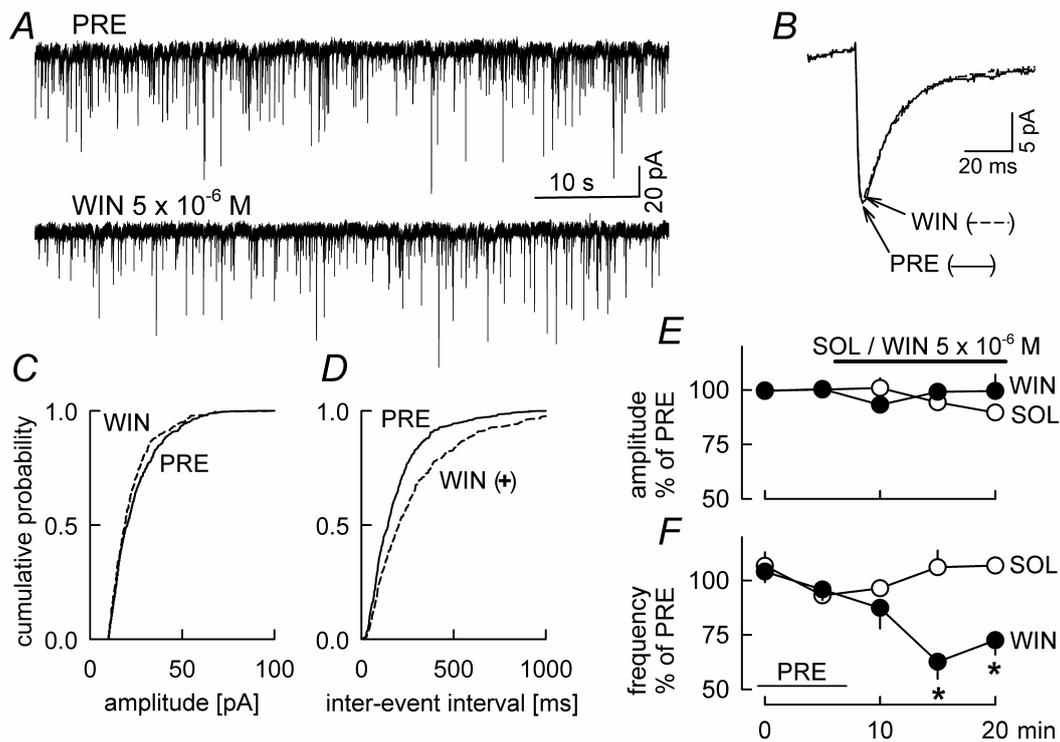
A) Amplitudengröße der postsynaptischen Ereignisse während der initialen Referenzperiode PRE, während der Gabe von Rimonabant und während der Gabe von Rimonabant und WIN55212-2. Die Kreise zeigen jeweils die Amplitude eines Einzelexperimentes zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die durchgehende schwarze Linie zeigt den moving average von jeweils fünf Punkten. B) Übereinander projizierte Originalkurven während der initialen Referenzperiode PRE, während der Gabe von Rimonabant und während der Gabe von Rimonabant und WIN55212-2.

### 3.2.3. Cannabinoide hemmen die synaptische Transmission präsynaptisch

Die Hemmung der Success-Rate und des Parameters  $\text{mean}^2 / \text{SD}^2$  deutet auf eine präsynaptische Form der Hemmung hin. Als Nächstes untersuchten wir mIPSCs, um die präsynaptische Geschehnisse besser deuten zu können.

mIPSCs wurden in der Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $3 \times 10^{-7}$  M) aufgenommen. Während der initialen Referenzperiode (PRE) lag die Amplitude der mIPSCs bei  $28 \pm 3$  pA und die Frequenz bei  $1.2 \pm 0.3$  Hz ( $n = 17$ ). In den mit Solvent superfundierten Hirnschnitten nahm die Amplitude der mIPSCs leicht ab (Abb. 3.8 E); die Frequenz der mIPSCs blieb jedoch konstant (Abb. 3.8 F). Während der Superfusion von WIN55212-2 ( $5 \times 10^{-6}$  M) gab es keine signifikante Änderung der Amplitude (Abb. 3.8 B, C, E); die Frequenz allerdings nahm deutlich ab (Abb. 3.8 A, D, F). Der fehlende Effekt von WIN55212-2 auf die Amplitude der mIPSCs deutet darauf hin, dass WIN55212-2 keinen Einfluss auf die postsynaptische Wirkung von GABA

auf die MSN hat. Der Ausschluss der postsynaptischen Wirkung von WIN55212-2 ist ein indirekter Beweis für die präsynaptische Hemmung der Neurotransmission. Die Abnahme der Frequenz der mIPSCs zeigt, dass WIN55212-2 mit dem vesikulären Freisetzungsmechanismus GABAerger Axonendigungen, welche MSN innervieren, interagiert.



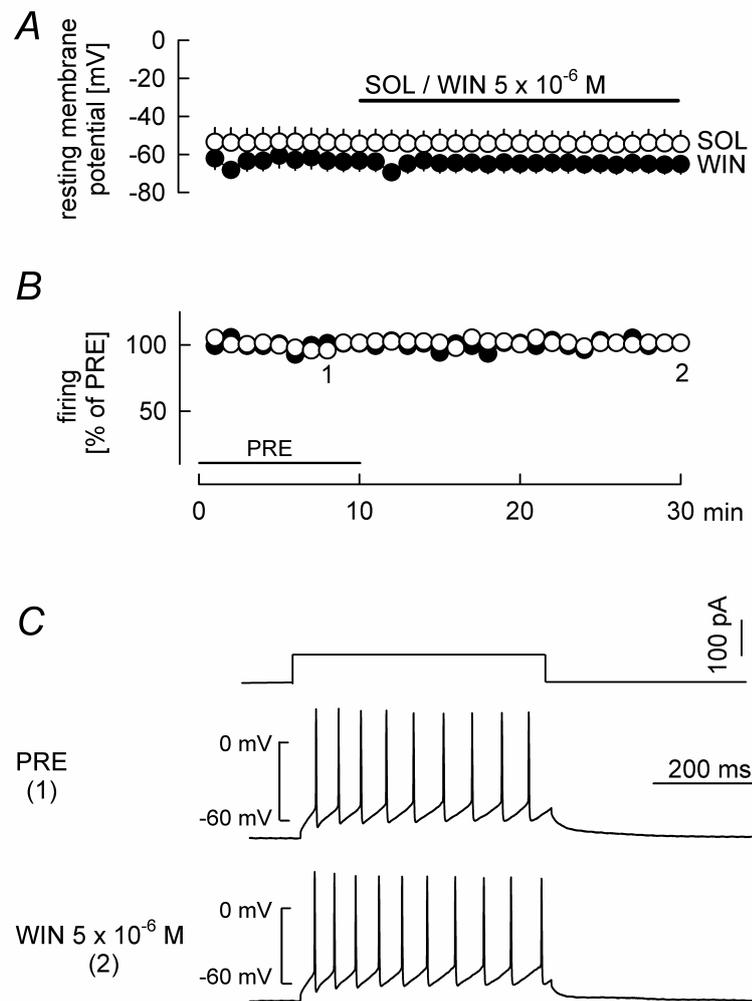
**Abbildung 3.8. Wirkung von WIN55212-2 (WIN) und Solvent (SOL) auf miniature IPSCs (mIPSCs) in MSN in der Gegenwart von Tetrodotoxin ( $3 \times 10^{-7}$  M)**

mIPSCs wurden während der initialen Referenzperiode (PRE) und während der Superfusion von WIN ( $5 \times 10^{-6}$ ) oder Solvent (SOL) aufgezeichnet. A) Originalregistrar eines WIN-Experiments. B) Durchschnitt von mIPSCs eines WIN-Experiments (selbes Experiment wie in A). C) und D) kumulative Wahrscheinlichkeit von Amplitude und interevent Intervall von mIPSCs eines WIN-Experiments (selbes Experiment wie in A). Signifikanter Unterschied in Prozent des initialen Referenzwertes PRE (Kolmogorov-Smirnov test): \*  $P < 0.05$ . E) und F) Amplitude und Frequenz von mIPSCs in Prozent des initialen Referenzwertes PRE ausgedrückt. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von 13 WIN- und 4 SOL-Experimenten. Signifikanter Unterschied zur SOL-Gruppe: \* $P < 0.05$ .

### 3.2.4. Cannabinoide haben keine somatodendritische Wirkung auf PV-FSN

PV-FSN synthetisieren CB<sub>1</sub>-Rezeptoren. Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass Cannabinoide die GABA-Freisetzung hemmen, indem sie mit den CB<sub>1</sub>-Rezeptoren der Axonendigungen der PV-FSN agieren. Das Ziel der nächsten Versuchsreihe war es, die Folge der Aktivierung der CB<sub>1</sub>-Rezeptoren in der somatodendritischen Region der PV-FSN aufzuzeigen. Diese Aufnahmen wurden im Perforated-Patch-Modus durchgeführt. Diese Methode wird verwendet, um das physiologische intrazelluläre Milieu zu erhalten (um zu verhindern, dass während der Ableitung Bestandteile des Cytoplasmas aus dem Neuron in die Patch-Clamp-Pipette diffundieren).

Zunächst wurde das Membranpotential im Current-Clamp-Modus aufgezeichnet. Es wurden 500 ms lange, depolarisierende Stromimpulse angelegt, um Aktionspotentialsalven zu erzielen (Abb. 3.9). Während der initialen Referenzperiode (PRE) lag das Ruhemembranpotential bei  $-60 \pm 4$  mV ( $n = 8$ ). Die durch die Depolarisation verursachten Aktionspotentiale hatten eine Frequenz von  $25 \pm 6$  Hz ( $n = 8$ ). In der Kontrollgruppe blieben sowohl das Membranpotential als auch die Frequenz der Aktionspotentialsalven konstant (Abb. 3.9 A, B). WIN55212-2 ( $5 \times 10^{-6}$  M) veränderte weder das Membranpotential noch die Frequenz der Aktionspotentiale (Abb. 3.9 A-C). Cannabinoide haben somit also keine somatodendritische Wirkung in den PV-FSN.

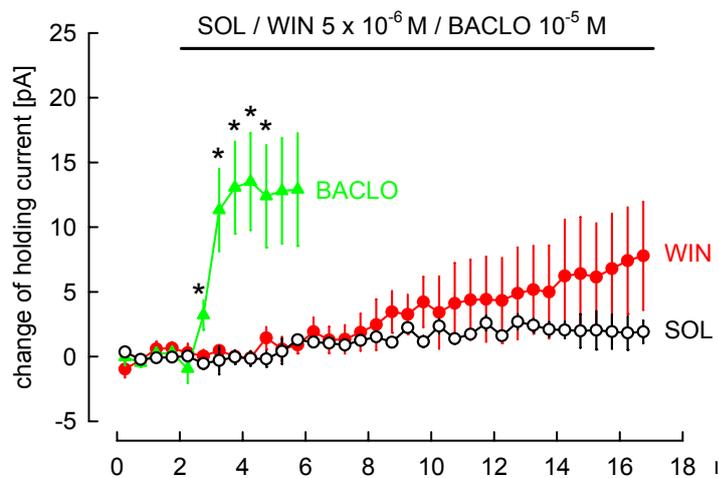


**Abbildung 3.9. Wirkung von WIN55212-2 (WIN) und Solvent (SOL) auf das Ruhemembranpotential und auf die Aktionspotentialfrequenz von PV-FSN.**

Das Membranpotential wurde im Perforated-Patch-Modus aufgezeichnet. Aktionspotentiale wurden einmal pro Minute durch eine 500 ms lange Strominjektion hervorgerufen. Dem Superfusionspuffer wurden AP-5 ( $2.5 \times 10^{-5}$  M), DNQX ( $10^{-5}$  M) und Bicucullin ( $2 \times 10^{-5}$  M) zugesetzt, um glutamaterge und GABAerge synaptische Übertragung zu unterbinden. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von 5 WIN- und 3 SOL-Experimenten.

A) Ruhemembranpotential. B) Die Aktionspotentialfrequenz wurde in Prozent des initialen Referenzwertes PRE angegeben. C) Strominjektion und Aktionspotentiale zu den Zeitpunkten 1 und 2 aus B eines typischen WIN-Experiments.

In der nächsten Versuchsreihe wurde der Haltestrom im Voltage-Clamp-Modus bei einem Haltepotential von  $V_h = -60\text{mV}$  gemessen (Abb. 3.10). Während der 15-minütigen Superfusion von Solvent stieg der Haltestrom nur gering ( $+2 \pm 1 \text{ pA}$ ;  $n = 4$ ). Die Änderung während der 15-minütigen Superfusion von WIN55212-2 ( $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $+4 \pm 1 \text{ pA}$ ;  $n = 6$ ) zur SOL-Gruppe. Im Gegensatz dazu verursacht der GABA<sub>B</sub>-Rezeptoragonist Baclofen ( $10^{-5} \text{ M}$ ) den erwarteten Auswärtsstrom von  $14 \pm 5 \text{ pA}$ . ( $n = 8$ ;  $P < 0.05$ ).



**Abbildung 3.10.** Wirkung von WIN55212-2 (WIN), Solvent (SOL) und Baclofen (BACLO) auf den Membranstrom von PV-FSN.

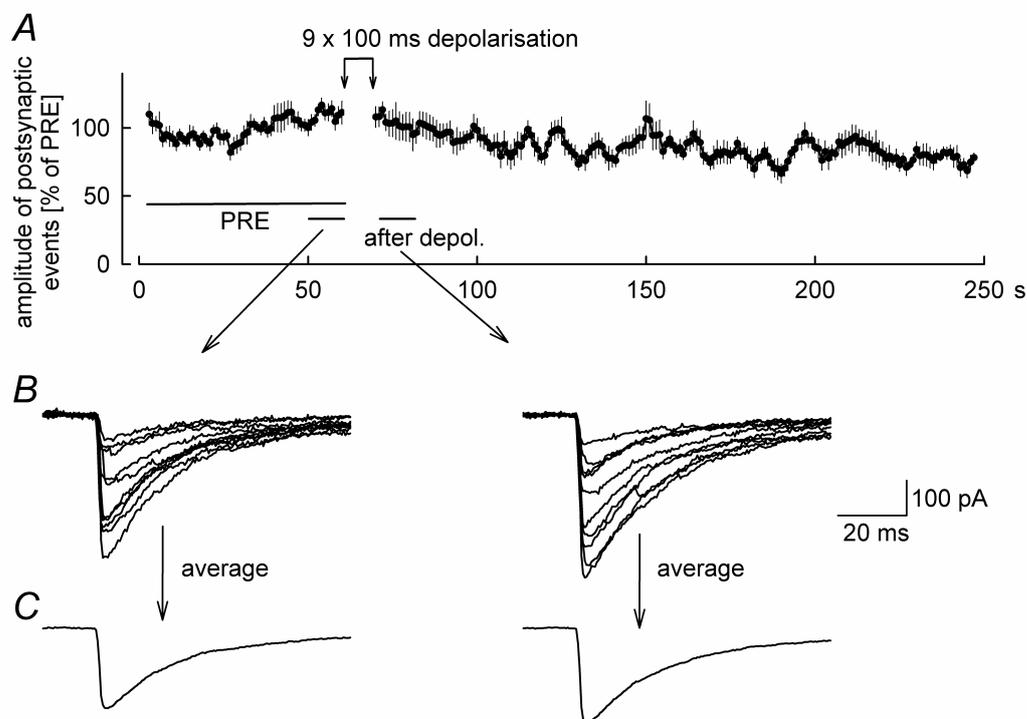
Der Membranstrom wurde im Perforated-Patch-Modus aufgezeichnet. Die grüne Kurve zeigt die Änderung des Membranstroms während der Superfusion von Baclofen ( $10^{-5} \text{ M}$ ). Während der Superfusion von WIN ( $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Membranstroms im Vergleich zur Solventgruppe.

### 3.2.5. Effekt auf die synaptische Transmission durch Depolarisation des postsynaptischen Neurons

An vielen Synapsen führt die Depolarisation des postsynaptischen Neurons zu einer Hemmung der Transmitterfreisetzung aus präsynaptischen Axonterminalen. Diese Form der retrograden Signalübertragung wird im Falle von GABAergen Synapsen als „depolarisation-induced suppression of inhibition“ (DSI), im Falle von glutamatergen Synapsen als „depolarisation-induced suppression of excitation“ (DSE) bezeichnet. DSI und DSE sind häufig endocannabinoidvermittelt. Die Endocannabinoide werden von den depolarisierten postsynaptischen Neuronen synthe-

tisiert und freigesetzt (Wilson & Nicoll 2002; Freund et al. 2003; Diana & Marty 2004). Um eine physiologische Rolle des CB<sub>1</sub>-Rezeptors und der Endocannabinoide bei der PV-FSN → MSN - Synapse zu finden, suchten wir nach DSI an dieser Synapse.

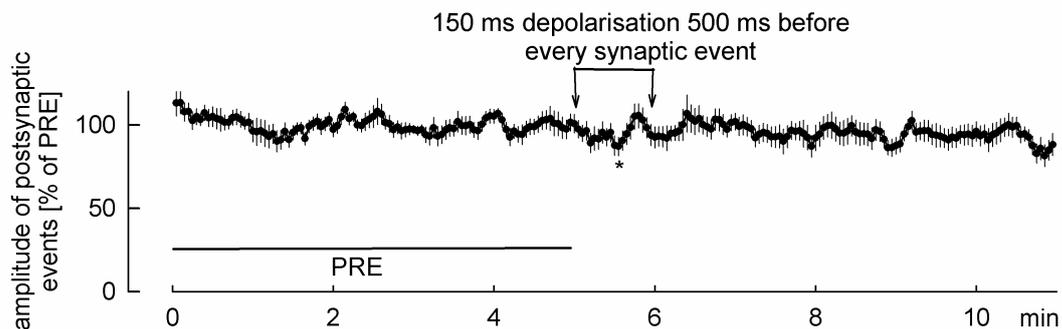
Die PV-FSN → MSN - Transmission wurde jede Sekunde ausgelöst und das postsynaptische MSN 9-mal mit einer Frequenz von 1 Hz für die Dauer von 100 ms von -60 mV auf 0 mV depolarisiert. Diese Depolarisation hatte keinen Einfluss auf die folgenden postsynaptischen Ereignisse (Abb. 3.11)



**Abbildung 3.11. Effekt der Depolarisation von MSN auf die synaptische Transmission zwischen PV-FSN → MSN.**

Aktionspotentiale wurden durch Strominjektion jede Sekunde hervorgerufen und das entstandene postsynaptische Ereignis aufgezeichnet. Nach 60 s (60 Ereignisse) wurden die MSN durch eine Serie von neun Pulsen mit einer Frequenz von 1 Hz depolarisiert (von -60mV auf 0mV für 100ms). A) Die Amplitude der postsynaptischen Ereignisse wurde in Prozent des initialen Referenzwertes PRE ausgedrückt. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von 13 Experimenten in 7 Neuronen. B) 10 postsynaptische Ereignisse, die einmal direkt vor der Strominjektion und einmal direkt nach der Strominjektion aufgezeichnet wurden. C) Mittelwerte der Kurven in B.

In einer weiteren Versuchsreihe verwendeten wir ein anderes Protokoll zur Auslösung von DSI (Trettel & Levine, 2003). Die PV-FSN → MSN – Transmission wurde 11 Minuten lang alle 3 s ausgelöst. Während der sechsten Minute wurde das MSN von -60 mV auf 0 mV depolarisiert. Die Depolarisation begann 650 ms bevor ein synaptisches Ereignis ausgelöst wurde und dauerte 150 ms. Doch auch durch dieses Protokoll wurde kein DSI ausgelöst (Abb 3.12).



**Abbildung 3.12. Effekt der Depolarisation von MSN auf die synaptische Transmission zwischen PV-FSN → MSN.**

11 Minuten lang wurden durch Strominjektion alle 3 Sekunden Aktionspotentiale ausgelöst und das entstandene postsynaptische Ereignis aufgezeichnet. Nach 6 Minuten wurden, 650 ms bevor ein synaptisches Ereignis ausgelöst wurde, die MSN für 150ms von -60mV auf 0mV depolarisiert. Die Amplitude der postsynaptischen Ereignisse wurde in Prozent des initialen Referenzwertes PRE ausgedrückt. ( $n = 17$ ).

### 3.3. Synaptische Transmission zwischen rekurrenten Axonkollateralen von MSN und MSN

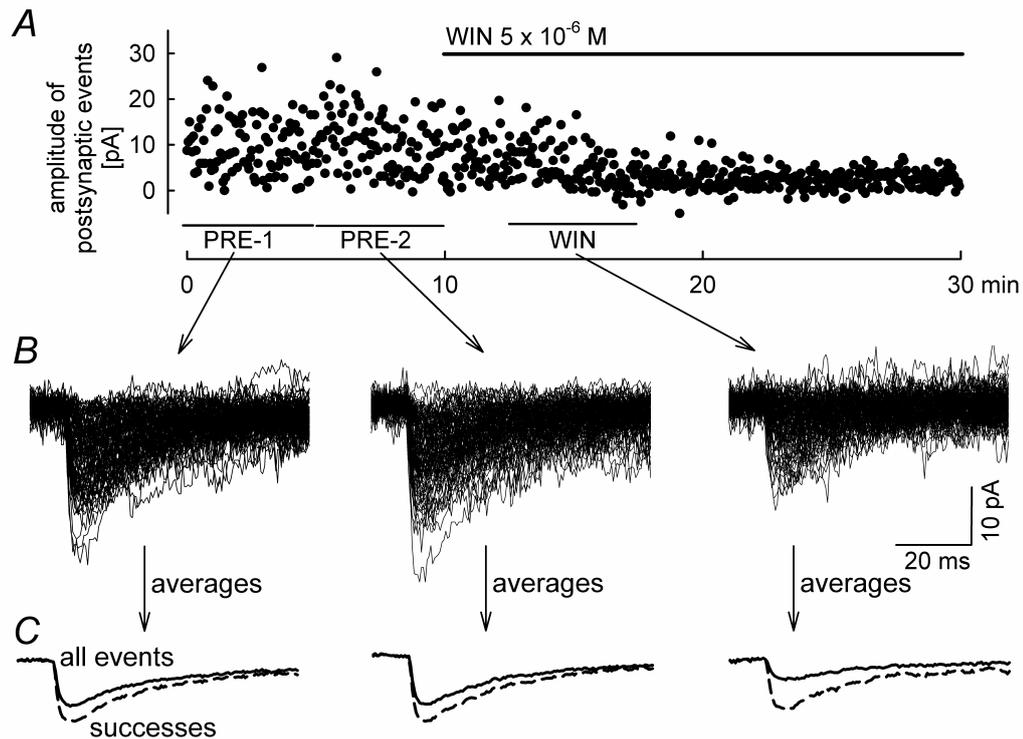
#### 3.3.1. Charakterisierung der synaptischen Transmission

Es wurde davon ausgegangen, dass mittelgroße, nicht grün fluoreszierende Neurone MSN sind. MSN – MSN - Neuronenpaare wurden gepatcht und ihre synaptische Verbindung überprüft (meist in beide Richtungen). Von 251 geprüften Neuronenpaaren waren 29 synaptisch miteinander verbunden. Sieben Verbindungen erwiesen sich als stabil genug, um mit ihnen langandauernde Experimente mit Cannabinoiden durchzuführen. Tabelle 3.1 stellt die Parameter der synaptischen Transmission dieser sieben Paare während der initialen Referenzperiode (PRE) dar. Eine Depolarisation der präsynaptischen MSN alle 3 s (0.33 Hz), verursachte ein Aktionspotential im präsynaptischen MSN und eine synaptische Antwort im postsynaptischen MSN. Die postsynaptischen Ereignisse traten mit einer Latenzzeit von 2.6 ms auf. Die Success-Rate der synaptischen Transmission betrug 18 %. Die durchschnittliche Amplitude der Successes betrug 13 pA und die durchschnittliche Amplitude aller an ein Aktionspotential gekoppelten postsynaptischen Ereignisse (sowohl Successes als auch Failures) lag bei 2 pA, also wesentlich niedriger als die Amplitude der Successes, da die Success-Rate niedrig war. Anhand der Unterschiede in der Häufigkeit der synaptischen Verbindungen, der Success-Rate und der Amplitude aller Ereignisse (Tabelle 3.1) kann man darauf schließen, dass die synaptische Verbindung zwischen MSN schwächer als die PV-FSN → MSN Verbindung ist. Die Aufhebung der postsynaptischen Ereignisse durch Bicucullin deutet darauf hin, dass die synaptische Transmission zwischen den MSN durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vermittelt wird (Abb. 3.15). Die durch Cannabinoide verursachten Änderungen der synaptischen Parameter wurden in Prozent des initialen Referenzwertes PRE ausgedrückt.

#### 3.3.2. Cannabinoide hemmen die synaptische Transmission

Die Wirkung von WIN55212-2 auf die MSN → MSN Transmission ist in Abb. 3.13 (Originalaufzeichnung) und Abb. 3.14 (statistische Auswertung) dargestellt. WIN55212-2 ( $5 \times 10^{-6}$  M) verringerte die Success-Rate der Neurotransmission (Abb. 3.13 A, B, 3.14 A). Die Amplitude der Successes zeigte keine signifikante

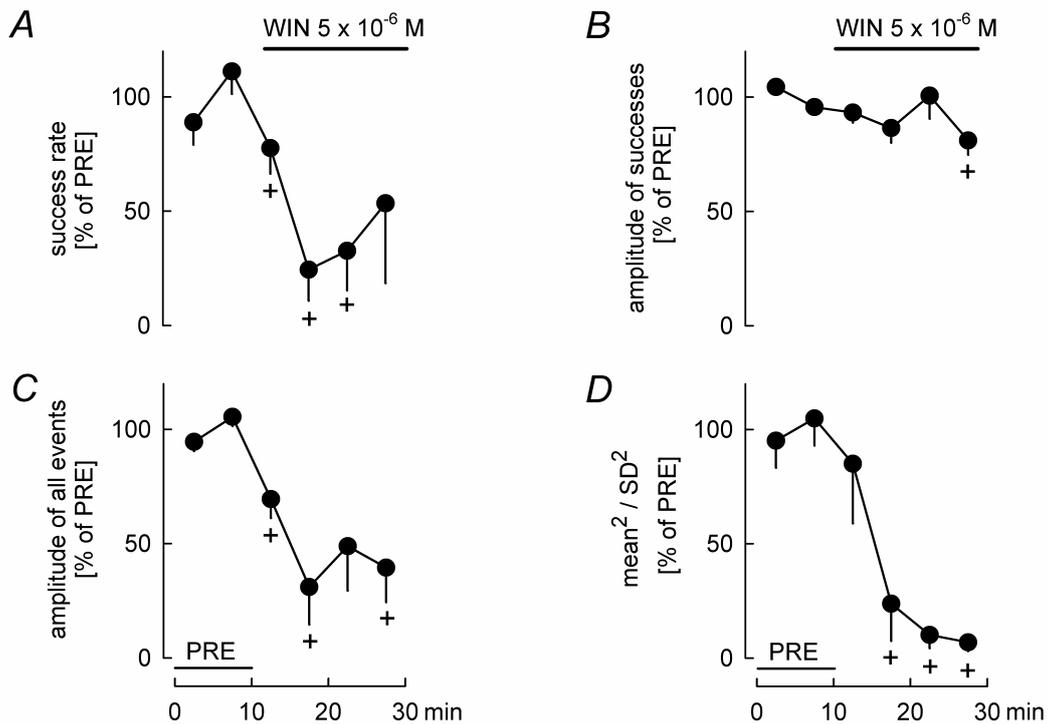
Veränderung (Abb. 3.13 C, 3.14 B). Die Amplitude aller Ereignisse (sowohl Successes als auch Failures) nahm deutlich ab (Abb. 3.13 C, 3.14 C). Dies spiegelt die starke Abnahme der Success-Rate wieder. Auch der Parameter  $\text{mean}^2 / \text{SD}^2$  nahm ab (Abb. 3.14 D). WIN55212-2 hatte jedoch keinen Einfluss auf die Aktionspotentiale der präsynaptischen MSN.



**Abbildung 3.13. Wirkung von WIN55212-2 auf die synaptische Transmission zwischen rekurrenten Axonkollateralen von MSN und MSN: Originalabbildungen.**

Aktionspotentiale wurden in präsynaptischen MSN durch Strominjektionen alle 3 s ausgelöst und die darauf folgenden postsynaptischen Ereignisse in den MSN aufgezeichnet.

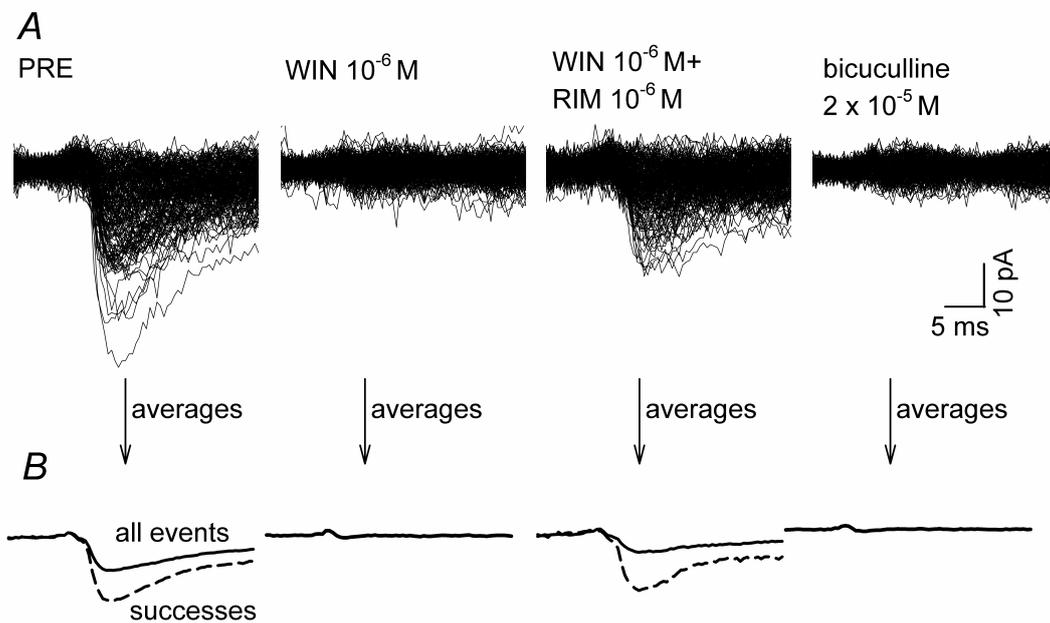
A) Amplituden der postsynaptischen Ereignisse. B) 100 postsynaptische Ereignisse, die während zweier Initialphasen (PRE-1, PRE-2) und während der Superfusion von WIN55212-2 aufgezeichnet wurden. Die Success-Rate betrug 69%, 69% und 31% während PRE-1, PRE-2 und WIN. C) Mittelwerte der Successes und aller Ereignisse von den 100 Ereignissen aus B.



**Abbildung 3.14. Wirkung von WIN55212-2 auf die synaptische Transmission zwischen rekurrenten Axonkollateralen von MSN und MSN: Statistische Auswertung.**

Aktionspotentiale wurden in präsynaptischen MSN durch Strominjektionen alle 3 s ausgelöst und die darauf folgenden postsynaptischen Ereignisse in den MSN aufgezeichnet. Die Parameter der synaptischen Transmission wurden für 100 Ereignisse berechnet und in Prozent des initialen Referenzwertes PRE ausgedrückt. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von 6 Experimenten. Signifikanter Unterschied von PRE: +  $P < 0.05$ .

In einem Experiment wurde zuerst WIN55212-2 ( $10^{-6}$  M) und im Anschluss WIN55212-2 gemeinsam mit dem Antagonisten Rimonabant ( $10^{-6}$  M) superfundiert (Abb. 3.15). WIN55212-2 beseitigte die Successes (Abb. 3.15 A, B), in der Gegenwart von Rimonabant kehrten diese zurück (Abb. 3.15 A, B). Der Antagonismus von Rimonabant deutet auch an dieser Synapse auf eine Beteiligung der CB<sub>1</sub>-Rezeptoren hin.

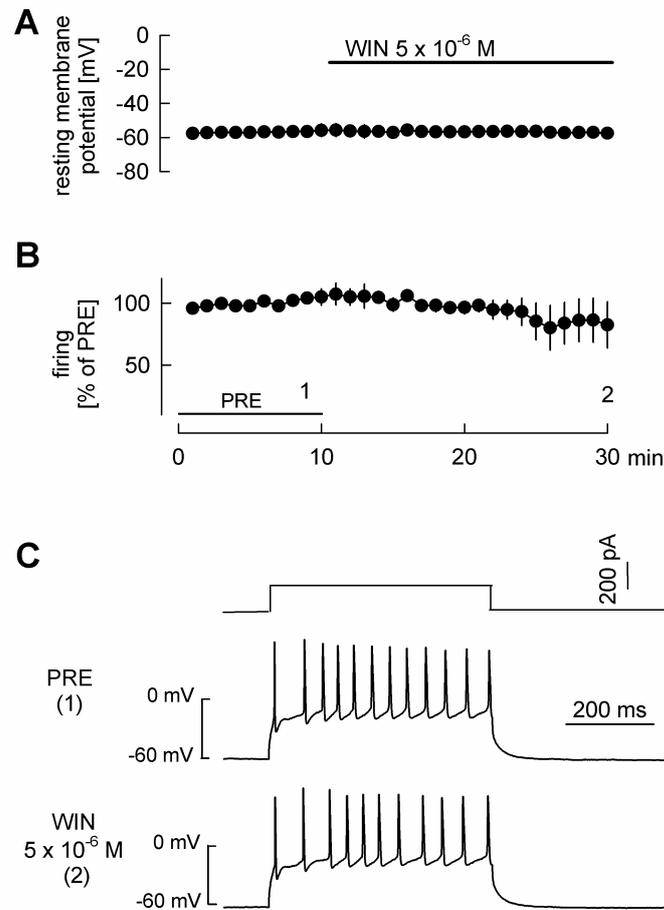


**Abbildung 3.15. Wirkung von WIN55212-2, Rimonabant (RIM) und Bicucullin auf die synaptische Transmission zwischen rekurrenten Axonkollateralen von MSN und MSN: Originalabbildungen.**

In diesem Experiment wurden alle 0.5 s Aktionspotentiale durch einen depolarisierenden Strom ausgelöst und die dadurch verursachten postsynaptischen Ereignisse in MSN aufgezeichnet. A) 200 Ereignisse, die während der Initialphase (PRE), während der Superfusion mit WIN55212-2, während der kombinierten Superfusion von WIN + RIM und während der Superfusion von Bicucullin registriert wurden. B) Mittelwerte der Successes und aller Ereignisse aus A.

### 3.3.3. Cannabinoide haben keine somatodendritische Wirkung auf MSN

Wie bei den PV-FSN suchten wir auch bei den MSN nach somatodendritischen Effekten. Auch diese Experimente wurden im Perforated-Patch-Modus durchgeführt. Das Membranpotential wurde im Current-Clamp-Modus aufgezeichnet. Es wurden 500 ms lange Strominjektionen verabreicht, um Aktionspotentiale auszulösen. Während der initialen Referenzperiode (PRE) lag das Ruhemembranpotential bei  $-57 \pm 3$  mV ( $n = 5$ ). Die durch die Depolarisation verursachten Aktionspotentiale traten mit einer Frequenz von  $21 \pm 1$  Hz ( $n = 5$ ) auf. WIN55212-2 ( $5 \times 10^{-6}$  M) hatte weder einen Einfluss auf das Ruhemembranpotential noch auf die Frequenz der Aktionspotentiale ( $n = 5$ ) (Abb 3.16).



**Abbildung 3.16. Wirkung von WIN55212-2 (WIN) auf das Ruhemembranpotential und auf die Aktionspotentialfrequenz von MSN.**

Das Membranpotential wurde im Perforated-Patch-Modus aufgezeichnet. Aktionspotentiale wurden einmal pro Minute durch eine 500 ms lange Strominjektion hervorgerufen. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n = 5$ )

A) Ruhemembranpotential. B) Die Aktionspotentialfrequenz wurde in Prozent des initialen Referenzwertes PRE ausgedrückt. C) Strominjektion und Aktionspotentiale während der initialen Referenzperiode (PRE) (1) und 20 Minuten nach Beginn der WIN-Superfusion (2).

## 4. Diskussion

Durch die Verwendung transgener Mäuse konnten PV-FSN im Caudato-Putamen eindeutig identifiziert werden. Simultan abgeleitete elektrophysiologische Aufnahmen von identifizierten Neuronenpaaren zeigten, dass eine GABAerge synaptische Transmission zwischen PV-FSN und MSN und zwischen Axonkollateralen von MSN und MSN stattfindet und dass die Aktivierung von CB<sub>1</sub>-Rezeptoren zu einer präsynaptischen Hemmung der Transmission an beiden Synapsen führt.

### 4.1. Synaptische Verbindung zwischen identifizierten Neuronen im Caudato-Putamen

Die Expression von EGFP im Caudato-Putamen ist sehr spezifisch für parvalbumin-positive Neurone in der transgenen Mauslinie, mit der wir arbeiteten (Meyer et al., 2002). Die Nutzung dieser Mäuse in Kombination mit der Fluoreszenztechnik ermöglichte uns eine eindeutige Identifizierung der PV-FSN vor der Aufzeichnung der Experimente. Dies ist im Falle dieser seltenen Neurone (0,7 % der Neurone im Caudato-Putamen; Tepper & Bolam, 2004) ein entscheidender Vorteil. Die PV-FSN unterschieden sich morphologisch in der Infrarot-Video-Mikroskopie, welche für die Patch-Clamp-Technik verwendet wird, nicht wesentlich von der Mehrheit der Neurone im Caudato-Putamen. Diese Art der Identifizierung könnte elektrophysiologische Studien mit PV-FSN in der Zukunft deutlich erleichtern. Da MSN 97 % der Neurone im Caudato-Putamen ausmachen (Tepper & Bolam, 2004), ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß (> 98 %), dass mittelgroße Neurone ohne Fluoreszenz MSN sind (unsere Auswahlkriterien schließen große cholinerge Interneurone aus). Synaptische Verbindungen zwischen PV-FSN und MSN wurden bereits in Hirnschnitten von erwachsenen Ratten untersucht (Koos & Tepper, 1999; 2002; Koos et al., 2004). In diesen Studien wurden PV-FSN basierend auf ihrer Morphologie, ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften und der Anwesenheit von Parvalbumin identifiziert. Erst kürzlich wurde die synaptische Verbindung von Axonkollateralen von MSN und MSN in Rattengehirnen eindeutig durch Ableitung von Neuronenpaaren dargestellt (Tunstall et al., 2002; Czubyko & Plenz, 2002; Koos et al., 2004). Eine Zusammenfassung dieser Studien lässt darauf schließen, dass die synaptische MSN → MSN Verbindung schwächer als die PV-FSN → MSN Verbindung ist.

Dies spiegelt sich in den geringeren Verbindungsraten, den niedrigeren Success-Raten der synaptischen Transmission und der geringeren Anzahl an involvierten Freisetzungstellen wieder (Plenz, 2003; Tepper et al., 2004).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die synaptische Verbindung zwischen PV-FSN und MSN und zwischen rekurrenten Axonkollateralen von MSN und MSN auch in Mäusegehirnen zu finden sind. Wie bei der Ratte war auch hier die synaptische MSN → MSN Verbindung schwächer als die PV-FSN → MSN Verbindung. Einige Unterschiede zwischen unseren Beobachtungen (zum Beispiel war die Success-Rate der MSN → MSN Verbindung in unserer Studie etwas geringer) und den oben erwähnten Studien könnten auf unterschiedliche Bedingungen zurückzuführen sein. So wurden in dieser Studie junge Mäuse verwendet und die Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurden in den meisten der oben erwähnten Studien erwachsene Ratten verwendet und die Experimente bei 32 – 36 °C durchgeführt.

#### 4.2. Aktivierung von CB<sub>1</sub>-Rezeptoren hemmte die synaptische Transmission

In einer vorangegangenen Studie dieser Arbeitsgruppe (Szabo et al., 1998) wurden die GABAergen synaptischen Ströme der MSN durch unselektive Stimulation hervorgerufen. Folglich konnte die Synapse, die durch Cannabinoide gehemmt wird, nicht identifiziert werden. Die jetzige Studie zeigt eindeutig, dass die Aktivierung von CB<sub>1</sub>-Rezeptoren sowohl zu einer Hemmung der synaptischen Transmission zwischen PV-FSN → MSN als auch zur Hemmung der synaptischen Transmission zwischen MSN → MSN führt. Interessant ist, dass Cannabinoide die GABA-Freisetzung an allen Axonendigungen der MSN hemmen: an rekurrenten Axonkollateralen im Caudato-Putamen (wie in der jetzigen Studie gezeigt) und an Axonendigungen in den Projektionsregionen, der Substantia nigra pars reticulata und des Globus pallidus (Wallmichrath & Szabo, 2002; Engler et al., 2006).

Obwohl WIN55212-2 ein synthetischer nicht-selektiver CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> Cannabinoidrezeptoragonist ist (Howlett et al. 2002; Pertwee, 2005), ist es sehr wahrscheinlich, dass die Hemmung durch eine Aktivierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors zustande kommt. Es gibt im Gehirn von Nagern generell nur sehr wenige CB<sub>2</sub>-Rezeptoren (Freund et al., 2003; Mackie, 2005) und die Wirkung von WIN55212-2 wird durch den CB<sub>1</sub>-

selektiven Antagonisten Rimonabant aufgehoben. Außerdem ist WIN55212-2 selektiv für Cannabinoidrezeptoren und besitzt keine Affinität zu anderen Rezeptoren und Ionenkanälen (Kuster et al., 1993).

Die alleinige Verabreichung des CB<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Rimonabant verbesserte nicht die synaptische Transmission zwischen PV-FSN und MSN. Daraus lässt sich schließen, dass unter unseren Bedingungen Endocannabinoide die synaptische Transmission zwischen den beiden Neuronen nicht hemmen (es existierte keine basaler Endocannabinoid-Tonus).

#### 4.3. Die synaptische Transmission wird präsynaptisch gehemmt

Durch den Ausschluss einer postsynaptischen Aktivität sowie durch eine verringerte Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit an präsynaptischen Axonendigungen unterstützen unsere Ergebnisse die Vermutung, dass es sich an beiden Synapsen um eine präsynaptische Hemmung handelt.

Drei der gemachten Beobachtungen deuten darauf hin, dass das Cannabinoid WIN55212-2 nicht an der Aktivierung von postsynaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren der MSN beteiligt ist. Erstens: WIN55212-2 hat keinen Einfluss auf die Amplitude der mIPSCs. Zweitens: In der vorangegangenen Studie wurde gezeigt, dass WIN55212-2 keinen Einfluss auf die durch den GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonisten Muscimol verursachten Ströme in postsynaptischen MSN hat (Szabo et al., 1998). Drittens: Im Falle der MSN – MSN Synapse blieb die Amplitude der Successes konstant, nur die Success-Rate fiel stark ab.

Des Weiteren weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit sowohl an Axonendigungen der PV-FSN als auch an rekurrenten Axonendigungen der MSN herabgesetzt wird. Erstens: Die Success-Rate der Neurotransmission ist in Gegenwart von WIN55212-2 geringer. Zweitens: Die Abnahme des Parameters  $\text{mean}^2 / \text{SD}^2$  ist ebenfalls ein Hinweis für die verringerte Transmitterfreisetzung (Clements, 1990; Koos & Tepper, 2002; Galante & Marty, 2003). Drittens: Die Reduktion der Frequenz der mIPSCs ist ein zusätzlicher Beweis für die Hemmung der Transmitterfreisetzung aus synaptischen Vesikeln (da die MSN GABAerge Signale aus mehreren verschiedenen Bereichen bekommen, ist es leider nicht möglich zu sagen, in welchen der afferenten Axone die Freisetzung gehemmt wird). Die Abnahme der Frequenz der mIPSCs lässt darauf schlie-

ßen, dass WIN55212-2 auch dann die Transmitterfreisetzung hemmt, wenn diese nicht durch den Einstrom von Calcium durch spannungsabhängige Calciumkanäle verursacht wurde: wahrscheinlich durch direkte Interaktion mit dem Freisetzungsmechanismus der Vesikel. Dieser Einfluss auf den Vesikel-Freisetzungsmechanismus wurde schon mehrmals (zum Beispiel, Szabo et al., 2004), aber nicht immer (zum Beispiel, Hoffman & Lupica, 2000) bei Hemmung der Neurotransmission durch Cannabinoide beobachtet (Szabo & Schlicker, 2005).

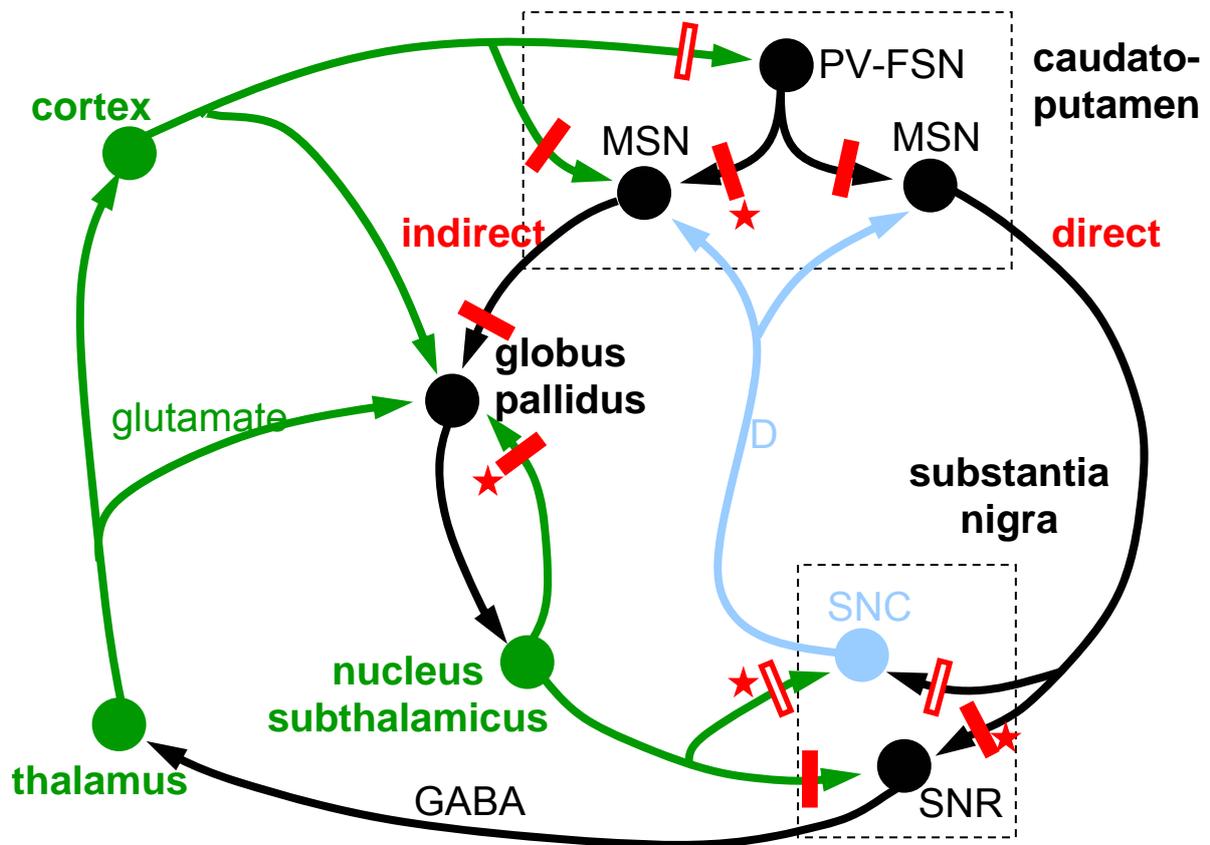
#### 4.4. Selektive präsynaptische Cannabinoidwirkung bei fehlender somatodendritischer Wirkung

Die Stimulation vieler  $G_{\alpha/o}$ -Protein gekoppelter Rezeptoren verursachte einen Kaliumauswärtsstrom, was zu einer Hyperpolarisation führte und somit die Aktivität der Neurone hemmt. Zum Beispiel verringert die Stimulation von Dopamin  $D_2$ -Rezeptoren,  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren und  $GABA_B$ -Rezeptoren die Aktivität von Neuronen (Lacey et al., 1987; Szabo et al., 1996; Than & Szabo, 2002). Unter unseren Bedingungen verursachte der  $GABA_B$ -Rezeptoragonist Baclofen den erwarteten Kaliumauswärtsstrom. Im Gegensatz dazu verursachte WIN55212-2 keinen Kaliumauswärtsstrom und beeinflusste Membranpotential und Aktionspotentialfrequenz nicht. Dies ist erstaunlich, da PV-FSN  $CB_1$ -Rezeptoren synthetisieren und die Aktivierung dieser in den Axonendigungen der PV-FSN zu einer präsynaptischen Hemmung führt. Eine mögliche Erklärung wäre dafür, dass die meisten  $CB_1$ -Rezeptoren nach ihrer Synthese in die Axonendigungen transportiert werden, ähnlich wie bei Neuronen in Zellkulturen (Twitchell et al., 1997; Irving et al., 2000). Bemerkenswerterweise wurde ein ähnliches Fehlen einer somatodendritischen Wirkung im Falle der Korbzellen der Kleinhirnrinde (Szabo et al., 2004) und der subthalamo-pallidalen Projektionsneurone (Freiman & Szabo, 2005) festgestellt. Auch wenn Cannabinoide manchmal somatodendritische Wirkungen haben (Huang et al., 2001; Kreitzer et al., 2002), scheint ihre präsynaptische Aktivität und Selektivität doch die Regel zu sein (Szabo & Schlicker, 2005). Nach neueren Ergebnissen fehlen die somatodendritischen  $CB_1$ -Rezeptoren, weil sie durch Internalisierung kontinuierlich von der Zellmembran entfernt werden (Leterrier et al., 2004, 2006).

#### 4.5. Die Rolle der CB<sub>1</sub>-Rezeptoren in den Basalganglien

Zusammen mit den Ergebnissen dieser Studie lässt sich ein annähernd vollständiges Bild der Lokalisation und der Funktion der CB<sub>1</sub>-Rezeptoren im Caudato-Putamen erstellen. CB<sub>1</sub>-Rezeptoren befinden sich auf Axonendigungen der PV-FSN und den Axonkollateralen der MSN. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einer präsynaptischen Hemmung der Transmission zwischen diesen Neuronen und ihren postsynaptischen Zielzellen, den MSN. Andere Neurone des Caudato-Putamen – Neuropeptid Y/ NOS/ Somatostatin-positive Interneurone, Calretinin-positive Interneurone und cholinerge Interneurone – synthetisieren keine CB<sub>1</sub>-Rezeptoren (Marsicano & Lutz, 1999; Hohmann & Herkenham, 2000). Wie in der Einleitung erwähnt, besitzen glutamaterge afferente Axone aus dem Cortex CB<sub>1</sub>-Rezeptoren, deren Aktivierung zu einer Hemmung der excitatorischen Neurotransmission führt. Dopaminerge afferente Axone aus der Substantia nigra und GABAerge afferente Axone aus dem Globus pallidus besitzen keine CB<sub>1</sub>-Rezeptoren (Herkenham et al., 1991a; Matsuda et al., 1993; Szabo et al., 1999). Eine typische Wirkung von Cannaboniden auf das Bewegungssystem ist Katalepsie (Sanudo-Pena et al. 1999). Es handelt sich dabei um ein Verharren in einer bestimmten Körperhaltung bei erhöhtem Muskeltonus. Die Stellung der Glieder kann durch passive Bewegung von außen verändert werden und bleibt dann in dieser Position.

Die von uns gezeigte Hemmung der synaptischen Transmission zwischen PV-FSN → MSN (MSN-Projektionsneurone zum Globus pallidus) kann Katalepsie hervorrufen. Es ist jedoch zu bedenken, dass Cannabinoide auf viele Synapsen in den Basalganglien wirken (Abb. 4.1). Einige dieser Wirkungen können Katalepsie auslösen (Abb. 4.1)



**Abbildung 4.1. Neuronale Verbindungen innerhalb des extrapyramidal-motorischen Systems und Wirkung von Cannabinoiden.** GABAerge Neurone sind schwarz, glutamaterge grün und dopaminerge blau gezeichnet. Die roten Balken stellen die nachgewiesenen (ausgefüllt) oder sehr naheliegende (leere) Wirkung von Cannabinoiden dar. Durch die Sterne sind die prokateptischen Wirkungen von Cannabinoiden markiert.

## 5. Zusammenfassung

CB<sub>1</sub>-Cannabinoidrezeptoren werden von vielen Neuronen des Caudato-Putamen exprimiert. Es ist jedoch nicht bekannt, wie diese Rezeptoren die synaptische Transmission zwischen verschiedenen Neuronentypen beeinflussen. Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu etablieren, um die synaptische Verbindung zwischen eindeutig identifizierten Neuronen im Caudato-Putamen zu untersuchen und die Wirkung von Cannabinoiden auf die synaptische Übertragung zu testen.

Wir verwendeten transgene Mäuse, bei denen "enhanced green fluorescent protein" (EGFP) in parvalbumin-positiven "fast-spiking"-Interneuronen (PV-FSN) exprimiert wird. Es wurden 300 µm dicke Hirnschnitte hergestellt; in diesen wurden PV-FSN anhand ihrer Fluoreszenz identifiziert. Ein mittelgroßes Neuron ohne Fluoreszenz galt als "medium-spiny"-Neuron (MSN). Die synaptische Transmission wurde durch gleichzeitiges Ableiten von zwei identifizierten Neuronen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik untersucht. An der PV-FSN → MSN-Synapse senkte der synthetische Cannabinoidrezeptoragonist WIN55212-2 die Erfolgsrate der Transmission und die Amplitude der erfolgreichen synaptischen Transmissionsereignissen. Die Auswertung von "miniature inhibitory postsynaptic currents" (mIPSCs) wies auf eine präsynaptische Hemmung der Transmission hin. An vielen Synapsen des Gehirns führt eine Depolarisation des postsynaptischen Neurons zur Freisetzung von Endocannabinoiden, die anschließend die Transmitterfreisetzung aus der präsynaptischen Axonendigung hemmen; solch eine endocannabinoid-vermittelte retrograde Signalübertragung war an der PV-FSN → MSN-Synapse nur schwach (wenn überhaupt) vorhanden. WIN55212-2 hatte keinen somatodentristischen Effekt auf PV-FSN: Membranpotential, Membranstrom und stimuliertes Feuern der Neurone wurde nicht beeinflusst. Ähnlich wie an der PV-FSN → MSN-Synapse hemmte WIN55212-2 die Übertragung an der MSN → MSN-Synapse.

Mit Hilfe transgener Mäuse, deren Zellen mit Parvalbumin zusammen EGFP exprimierten, war es möglich Neurone im Caudato-Putamen eindeutig zu identifizieren. Die Untersuchung der Cannabinoidwirkungen auf die synaptische Übertragung zwischen identifizierten Neuronen ermöglichte eine definitive Klärung der Funktion von CB<sub>1</sub>-Rezeptoren im Caudato-Putamen. Die Aktivierung von CB<sub>1</sub>-Rezeptoren hemmt sowohl die PV-FSN → MSN-Synapse als auch die MSN → MSN-Synapse mit einem präsynaptischen Mechanismus. Im Gegensatz dazu haben Cannabinoide keine somatodentristischen Wirkungen im Caudato-Putamen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alger BE, Pitler TA (1995) Retrograde signaling at GABAA-receptor synapses in the mammalian CNS. *Trends Neurosci* 18:333–340.
- Bartos M, Vida I, Frotscher M, Meyer A, Monyer H, Geiger JRP, Jonas P (2002) Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13222–13227.
- Bell MR, D'Ambra TE, Kumar V, Eissenstat MA, Herrmann JL, Wetzel JR, Rosi D, Phillion RE, Daum SJ, Hlasta DJ, et al. (1991) Antinociceptive (aminoalkyl)indoles. *J Med Chem* 34:1099–1110.
- Bouaboula M, Perrachon S, Milligan L, Canat X, Rinaldi-Carmona M, Portier M, Barth F, Calandra B, Pecceu F, Lupker J, et al. (1997) A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J Biol Chem* 272:22330–22339.
- Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1993) Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem* 214:173–180.
- Caulfield MP, Brown DA (1992) Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol* 106:231–232.
- Chakrabarti A, Onaivi ES, Chaudhuri G (1995) Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. *DNA Sequence* 5:385–388.
- Christopoulos A, Coles P, Lay L, Lew MJ, Angus JA (2001) Pharmacological analysis of cannabinoid receptor activity in the rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 132:1281–1291.
- Clements JD (1990) A statistical test for demonstrating a presynaptic site of action for a modulator of synaptic amplitude. *J Neurosci Meth* 31:75–88.
- Condie R, Herring A, Koh WS, Lee M, Kaminski NE (1996) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase-mediated signal transduction and interleukin 2 (IL-2) expression in the murine T-cell line, EL4.IL-2. *J Biol Chem* 271:13175–13183.
- Consroe P, Tillery W, Rein J, Musty RE (1998) Reported Marijuana effects in patients with spinal cord injury. *Symposium on the Cannabinoids*. Burlington, International Cannabinoid Research Society, p.64.
- Coruzzi G, Adami M, Coppelli G, Frati P, Soldani G (1999) Inhibitory effect of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on pentagastrin-induced gastric acid secretion in the anaesthetized rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360:715–718.
- Czubayko U, Plenz D (2002) Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proc Natl Acad Sci* 99:15764–15769.
- D'Ambra TE, Estep KG, Bell MR, Eissenstat MA, Josef KA, Ward SJ, Haycock DA, Baizman ER, Casiano FM, Beglin NC, et al. (1992) Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *Med Chem* 35:124–135.

- Després J-P, Golay A, Sjöström L (2005) Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med* 353:2121–2134.
- Devane WA, Dysarz FA, 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 (Wash DC)* 258:1946–1949.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T (2005) The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 168:147-85.
- Diana MA, Marty A (2004). Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE). *Br J Pharmacol* 142:9-19.
- Egertova M, Cravatt BF, Elphick MR (2003) Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and CB1 cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience* 119:481-496.
- Egertova M, Elphick MR (2000) Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB1. *J Comp Neurol* 422:159–171.
- Eissenstat MA, Bell MR, D'Ambra TE, Alexander EJ, Daum SJ, Ackerman JH, Gruett MD, Kumar V, Estep KG, Olefirowicz EM, et al. (1995) Aminoalkylindoles: structure-activity relationships of novel cannabinoid mimetics. *J Med Chem* 38:3094–3105.
- Engler B, Freiman I, Urbanski M, Szabo B (2006) Effects of exogenous and endogenous cannabinoids on GABAergic neurotransmission between the caudate-putamen and the globus pallidus in the mouse. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 316:608-17.
- Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A (1995) Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoyl ethanolamide. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3376–3380.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Glass M, Mackie KP, Fahey KJ, Cullinan GJ, Hunden DC, Johnson DW, Chaney MO, et al. (1998) LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J Pharmacol Exp Ther* 284:291–297.
- Freiman I, Szabo B (2005) Cannabinoids depress excitatory neurotransmission between the subthalamic nucleus and the globus pallidus. *Neuroscience* 133:305-313.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017-1066.
- Galante M, Marty A (2003) Presynaptic ryanodine-sensitive calcium stores contribute to evoked neurotransmitter release at the basket cell-Purkinje cell synapse. *J Neurosci* 23:11229-11234.
- Galiégue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrie`re D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, and Casellas P (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232:54–61.
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am*

Chem Soc 86:1646–1647

- Garcia DE, Brown S, Hille B, Mackie K (1998) Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurosci* 18:2834–2841
- Gérard C, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M (1990) Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA. *Nucleic Acids Res* 18:7142.
- Gérard C, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M (1991) Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 279:129–134.
- Gerdeman G, Lovinger DM (2001) CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol* 85:468–471.
- Gerfen CR (1988) Synaptic organisation of the striatum. *J Elec Micro Technique* 10:265–281
- Glass M, Dragunow M, Faull RLM (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77:299–318.
- Griffin G, Atkinson PJ, Showalter VM, Martin BR, Abood ME (1998) Evaluation of cannabinoid receptor agonists and antagonists using the guanosine-5'-O-(3-[<sup>35</sup>S]thio)-triphosphate binding assay in rat cerebellar membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 285:553–560.
- Griffin G, Tao Q, Abood ME (2000) Cloning and pharmacological characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 292:886–894.
- Grotenhermen, F (2004) Cannabis und Cannabinoide; Pharmakologie, Toxikologie und therapeutisches Potential. Hans Huber Verlag, Germany.
- Guzmán M (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 3:745–755.
- Hájos 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.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998) Cannabidiol and (-) $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 795:8268–8273.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3662–3665.
- Heimer L, Zahm DS, Alheid GF (1995) Basal ganglia. In: *The Rat Nervous System* (Paxinos G, ed) 579–628. Academic Press, San Diego.
- Henry DJ, Chavkin C (1995) Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 186:91–94
- Herkenham M, Lynn AB, De Costa BR, Richfield EK (1991a) Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* 547:267–274.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, De Costa BR, Rice KC (1991b) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11:563–583.
- 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 USA* 87:1932–1936.

- Hoffman AF, Lupica CR (2000). Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA<sub>A</sub> synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci* 20:2470-2479.
- Hohmann AG, Briley EM, Herkenham M (1999) Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord. *Brain Res* 822:17–25.
- Hohmann AG, Herkenham M (2000) Localization of cannabinoid CB1 receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse* 37:71-80.
- Holdcroft A, Maze M, Dore C, Tebbs S, Thompson S (2006) A multicenter dose-escalation study of the analgesic and adverse effects of an oral cannabis extract (Cannador) for postoperative pain management. *Anesthesiology* 104:1040-6.
- Holland M, Challiss RAJ, Standen NB, Boyle JP (1999) Cannabinoid CB1 receptors fail to cause relaxation, but couple via Gi/Go to the inhibition of adenylyl cyclase in carotid artery smooth muscle. *Br J Pharmacol* 128:597–604.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54:161-202.
- Howlett AC, Johnson MR, Melvin LS, Milne GM (1988) Non-classical cannabinoid analgetics inhibit adenylyl cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Mol Pharmacol* 33:297–302.
- Huang C-C, Lo S-W, Hsu K-S (2001) Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J Physiol (Lond)* 532:731-748.
- Irving AJ, Coutts AA, Harvey J, Rae MG, Mackie K, Bewick GS, Pertwee RG (2000) Functional expression of cell surface cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors on presynaptic inhibitory terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 98:253-262.
- Jaeger D, Kita H, Wilson CJ (1994) Surround inhibition among projection neurons is weak or nonexistent in the rat striatum. *J Neurophysiol* 72:2555-2558
- Johnson MR, Melvin LS (1986) The discovery of nonclassical cannabinoid analgetics. In: *Cannabinoids As Therapeutic Agents* (Mechoulam R, ed) 121–145, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Kaminski NE, Abood ME, Kessler FK, Martin BR, Schatz AR (1992) Identification of a functionally relevant cannabinoid receptor on mouse spleen cells that is involved in cannabinoid-mediated immune modulation. *Mol Pharmacol* 42:736–742.
- Katona I, Sperl agh B, Magl oczky Z, S antha E, K ofalvi A, Czirj ak S, Mackie K, Vizi ES, Freund TF (2000) GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience* 100:797–804.
- Kawaguchi Y (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterisation of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13:4908-4923
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527-535.
- Khanolkar AD, Abadji V, Lin S, Hill WAG, Taha G, Abouzid K, Meng Z, Fan P, Makriyannis A (1996) Head group analogs of arachidonylethanolamide, the endogenous cannabinoid ligand. *J Med Chem* 39:4515–4519.

- Kita H, Kosaka T, Heizmann CW (1990) Parvalbumin-immunoreaktive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res* 536:1-15
- Koos T, Tepper JM (1999) Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nature Neurosci* 2:467-472.
- Koos T, Tepper JM (2002) Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the striatum. *J Neurosci* 22:529-535.
- Koos T, Tepper JM, Wilson CJ (2004) Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum. *J Neurosci* 24:7916-7922.
- Kreitzer AC, Carter AG, Regehr WG (2002) Inhibition of interneuron firing extends the spread of endocannabinoid signaling in the cerebellum. *Neuron* 34:787-796.
- Kuster JE, Stevenson JI, Ward SJ, D'Ambra TE, Haycock DA (1993) Aminoalkylindole binding in rat cerebellum: selective displacement by natural and synthetic cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther* 264:1352-1363.
- Lacey MG, Mercuri NB, North RA (1987) Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J Physiol* 392:397-416.
- Leterrier C, Bonnard D, Carrel D, Rossier J, Lenkei Z (2004) Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor. *J Biol Chem* 279:36013-21.
- Leterrier C, Lainé J, Darmon M, Boudin H, Rossier J, Lenkei Z (2006) Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *J Neurosci* 26:3141-53.
- Lin SY, Khanolkar AD, Fan P, Goutopoulos A, Qin C, Papahadjis D, Makriyannis A (1998) Novel analogues of arachidonylethanolamide (anandamide): affinities for the CB1 and CB2 cannabinoid receptors and metabolic stability. *J Med Chem* 41:5353-5361.
- Little PJ, Compton DR, Johnson MR, Melvin LS, Martin BR (1988) Pharmacology and stereoselectivity of structurally novel cannabinoids in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 247:1046-1051.
- 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.
- Mackie K (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. In: *Cannabinoids. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 168 (Pertwee RG, ed) 1-51. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Mackie K, Devane WA, Hille B (1993) Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 44:498-503.
- 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. *Journal of Neuroscience* 15:6552-61,
- MacLennan SJ, Reynen PH, Kwan J, Bonhaus DW (1998) Evidence for inverse agonism of SR141716A at human recombinant cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Br J Pharmacol* 124:619-622.
- Mailleux P, Parmentier M, Vanderhaeghen J-J (1992) Distribution of cannabinoid receptor messenger RNA in the human brain: an in situ hybridization histochemistry with oligonucleotides. *Neurosci Lett* 143:200-204.

- Marsicano G, Lutz B (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 11:4213-4225.
- Martin BR, Compton DR, Thomas BF, Prescott WR, Little PJ, Razdan RK, Johnson MR, Melvin LS, Mechoulam R, Ward SJ (1991) Behavioral, biochemical and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol Biochem Behav* 40:471-478.
- Martin BR, Thomas BF, Razdan RK (1995) Structural requirements for cannabinoid receptor probes. In: *Cannabinoid Receptors* (Pertwee RG, ed) 35–85, Academic Press, London.
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993) Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 327:535-550.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564.
- McAllister SD, Griffin G, Satin LS, Abood ME (1999) Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a *Xenopus* oocyte expression system. *J Pharmacol Exp Ther* 291:618-626
- 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 (1967) The absolute configuration of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett* 12:1109-1111.
- Meyer AH, Katona I, Blatow M, Rozov A, Monyer H (2002) In vivo labeling of parvalbumin-positive interneurons and analysis of electrical coupling in identified neurons. *J Neurosci* 22:7055-7064.
- Molderings GJ, Likungu J, Gothert M (1999) Presynaptic cannabinoid and imidazoline receptors in the human heart and their potential relationship. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360:157-164.
- Müller-Vahl KR, Schneider U, Koblenz A, Jobges M, Kolbe H, Daldrup T, Emrich HM (2002) Treatment of Tourette's syndrome with Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC): a randomized crossover trial. *Pharmacopsychiatry* 35:57-61
- Müller-Vahl KR, Schneider U, Kolbe H, Emrich HM (1999) Treatment of Tourette-Syndrome with delta-9-Tetrahydrocannabinol. *American Journal of Psychiatry* 156:495.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61–65.
- Niederhoffer N, Szabo B (2000) Cannabinoid cause central sympathoexcitation and bradycardia in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* 294:707-713.
- Noe SN, Newton C, Widen R, Friedman H, Klein TW (2000) Anti-CD40, anti-CD3 and IL-2 stimulation induce contrasting changes in CB1 mRNA expression in mouse splenocytes. *J Neuroimmunol* 110:161-167.
- Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29:729-738.
- Pacheco M, Childers SR, Arnold R, Casiano F, Ward SJ (1991) Aminoalkylindoles: actions on specific G-protein-linked receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 257:170-183.

- Pan X, Ikeda SR, Lewis DL (1998) SR 141716A acts as an inverse agonist to increase neuronal voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents by reversal of tonic CB1 cannabinoid receptor activity. *Mol Pharmacol* 54:1064-1072.
- Pertwee R (2005). Pharmacological actions of cannabinoids. In: *Cannabinoids. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 168 (Pertwee RG, ed) 1-51. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Pertwee RG (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6:635–664.
- Pertwee RG (2001) Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 63:569–611.
- Pertwee RG (2002) Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol Ther* 95:165–174.
- Pertwee RG, Stevenson LA, Elrick DB, Mechoulam R, Corbett AD (1992) Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse vas deferens and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol* 105:980–984.
- Pettit DA, Anders DL, Harrison MP, Cabral GA (1996) Cannabinoid receptor expression in immune cells. *Adv Exp Med Biol* 402:119-129.
- Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA (1998) Immunohistochemical localisation of the neural cannabinoid receptor in the rat brain. *J Neurosci Res* 51:391-402
- Pitler TA, Alger BE (1992) Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA<sub>A</sub> responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 12:4122–4132.
- Plenz D (2003) When inhibition goes incognito: feedback interaction between spiny projection neurons in striatal function. *Trends Neurosci* 26:436-443.
- Portier M, Rinaldi-Carmona M, Pecceu F, Combes T, Poinot-Chazel C, Calandra B, Barth F, Le Fur G, Casellas P (1999) SR 144528, an antagonist for the peripheral cannabinoid receptor that behaves as an inverse agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 288:582-589.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Ne'liat G, Caput D, Ferrara P, Soubrie' P, Breliere're JC, Le Fur G (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350:240-244.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq J-M, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, et al. (1998) SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 284:644–650.
- Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Shire D, Bouaboula M, Oustric D, Barth F, Casellas P, Ferrara P, Le Fur G (1996) Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* 278:871–878
- Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM (2001) Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor and  $\mu$  opioid receptor in patches of the rat Caudato-Putamen nucleus. *J Neurosci* 21:823-833.
- Ross RA, Gibson TM, Stevenson LA, Saha B, Crocker P, Razdan RK, Pertwee RG (1999) Structural determinants of the partial agonist-inverse agonist properties of 6'-azidohept-2'-yne- $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol at cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 128:735-43.
- Sanudo-Pena CM, Tsou K, Walker MJ (1999) Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life Sci* 65:703-713.

- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 142:278-287.
- Schlicker E, Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22:565-572.
- Shire D, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Oustric D, Pesse`gue B, Bonnin-Cabanne O, Le Fur G, Caput D, Ferrara P (1996) Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta* 1307:132–136.
- Sieradzan KA, Fox SH, Hill M, Dick JP, Crossman AR, Brotchie JM (2001) Cannabinoids reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study. *Neurology* 57:2108-11.
- Sim-Selley LJ, Brunk LK, Selley DE (2001) Inhibitory effects of SR141716A on G-protein activation in rat brain. *Eur J Pharmacol* 414:135-143.
- 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
- Szabo B, Dörner L, Pfreundtner C, Nörenberg W, Starke K (1998) Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience* 85:395-403.
- Szabo B, Fröhlich R, Illes P (1996) No evidence for functional imidazoline receptors on locus coeruleus neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353:557-563.
- Szabo B, Müller T, Koch H (1999) Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. *J Neurochem* 73:1084-1089.
- Szabo B, Schlicker E (2005) Effects of cannabinoids on neurotransmission. In: *Cannabinoids. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 168 (Pertwee RG, ed) 318 –356. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Szabo B, Than M, Wallmichrath I, Thorn D (2004) Analysis of the effects of cannabinoids on synaptic transmission between basket and Purkinje cells in the cerebellar cortex of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 310:915-925.
- Tao Q, Abood ME (1998) Mutation of a highly conserved aspartate residue in the second transmembrane domain of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, disrupts G-protein coupling. *J Pharmacol Exp Ther* 285:651–658.
- Tepper JM, Bolam PJ (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology* 14:685-692.
- Tepper JM, Koos T, Wilson CJ (2004) GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci* 11:662-669.
- Than M, Szabo B (2002) Analysis of the function of GABA<sub>B</sub> receptors on inhibitory afferent neurons of Purkinje cells in the cerebellar cortex of the rat. *Eur J Neurosci* 15:1575-1584.
- Tomida I, Pertwee RG, Azuara-Blanco A (2004) Cannabinoids and glaucoma. *Br J Ophthalmol* 88:708–713.
- Trettel J, Levine ES (2003). Endocannabinoids mediate rapid retrograde signaling at interneuron right-arrow pyramidal neuron synapses of the neocortex. *J Neurophysiol* 89:2334–2338.
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393-411.

- Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A, Wickens JR (2002) Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J Neurophysiol* 88:1263-1269.
- Twitchell W, Brown S, Mackie K (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 78:43-50.
- Valk P, Verbakel S, Vankan Y, Hol S, Mancham S, Ploemacher R, Mayen A, Loewenberg B, Delwel R (1997) Anandamide, a natural ligand for the peripheral cannabinoid receptor is a novel synergistic growth factor for hematopoietic cells. *Blood* 90:1448-1457.
- Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S (2005) Effects of the cannabinoid-1-receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 365:1389-1397.
- Wallmichrath I, Szabo B (2002) Cannabinoids inhibit striatonigral GABAergic neurotransmission in the mouse. *Neuroscience* 113:671-682.
- Wenger T, Ledent C, Csernus V, Gerendai I (2001) The central cannabinoid receptor nactivation suppresses endocrine reproductive functions. *Biochem Biophys Res Commun* 284:363-368.
- Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410: 588-592.
- Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296:678-682.
- Yuan M, Kiertscher SM, Cheng Q, Zoumalan R, Tashkin DP, Roth MD (2002) Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells. *J Neuroimmunol*; 133:124-131.
- Zurier RB, Rossetti RG, Burstein SH, Bidinger B (2003) Suppression of human monocyte interleukin-1beta production by ajulemic acid, a nonpsychoactive cannabinoid. *Biochem Pharmacol* 65:649-655.

## 7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit und die fortwährende Unterstützung und Betreuung möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Bela Szabo bedanken. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen und seiner Erfahrung und vielen fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben und hat stets ein offenes Ohr für alle anfallenden Probleme gehabt.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Ilka Freimann für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor und für die schöne zusammen erlebte Zeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Guido Nikkah möchte ich für die Übernahme der Zweitkorrektur bedanken.

Auch möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten.

Bei Silke und Daniel Jödicke und Heidrun Anton-Rouarch möchte ich mich für das fleißige Korrekturlesen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Vater Helge Anton, der mir nicht nur mein Studium ermöglicht hat sondern mir auch jederzeit mit Rat und Tat zur Seite steht.

## 8. Lebenslauf

### Alexandra Anton

Barbarastraße 12 • 79106 Freiburg im Breisgau

• Tel.: 0761 / 20 85 86 8 • E-Mail: alex.anton@arcor.de

---

#### ■ Persönliche Daten

Name: Alexandra Anton  
Geburtsdatum und -ort: 29. Februar 1980, Freiburg i. Br.  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

#### ■ Schulbildung

1986 - 1990 Kastellbergschule in Waldkirch  
1990 - 1994 Geschwister-Scholl-Gymnasium in Waldkirch  
1994 - 1999 Droste-Hülshoff-Gymnasium in Freiburg i. Br.  
*Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Juni 1999*

#### ■ Studium

1999 - 2000 Studium der Rechtswissenschaften an der Albert-Ludwig-Universität Freiburg i. Br.  
2000 - 2007 Medizinstudium an der Albert-Ludwig-Universität Freiburg i. Br.  
09/2002 Ärztliche Vorprüfung  
09/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
03/2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
05/2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
*Abschluss: Approbation als Ärztin, Mai 2007*

#### ■ Famulaturen und praktisches Jahr

03/2003 Famulatur an der Universitäts-Hautklinik Freiburg i. Br.  
09/2004 Famulatur in der Allgemeinarztpraxis Dr. Frey-Bermeitinger in Schliengen  
03/2005 Famulatur an der Universitäts-Augenklinik Freiburg i. Br.  
09/2005 Famulatur im Gesundheitsamt Freiburg i. Br.  
04/2006 - 02/2007 Praktisches Jahr am Kreiskrankenhaus Emmendingen (Wahlfach: Augenheilkunde, Universitäts-Klinik Freiburg i. Br.)

#### ■ Beruflicher Werdegang

Seit 06/07 Assistenzärztin in Weiterbildung an der Universitäts-Augenklinik Freiburg i. Br.

#### ■ Tätigkeit im Rahmen der Promotion

09/2003 -04/2004 Experimentelle Tätigkeit im Rahmen der Promotion (Analysis of the effects of cannabinoids on identified synaptic connections in the caudate-putamen by paired recordings in transgenic mice) am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Albert-Ludwig-Universität Freiburg i. Br. in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Szabo