Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Neuroprotektive Effekte und Modulation von glialer Inflammation durch abnormal Cannabidiol

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Julian Cardinal von Widdern
geboren am 18.09.1990 in Düsseldorf

Betreuer:	Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani
Zweitbetreuer:	Prof. Dr. med. Fritz Markwardt
Gutachter:	Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani
	Prof. Dr. med Gabrielle Rune (Hamburg)
	Prof. Dr. med Julian Prell
	03.12.2019
	17.06.2020

Referat

Akute zentralnervöse Läsionen, wie Schädel-Hirn-Traumata (SHT), stellen eine häufige Ursache motorischer und sensibler Defizite sowie dauerhafter Behinderung, gerade auch bei jungen Patienten, dar. So ist die Suche nach neuroprotektiven Substanzen und Mechanismen von besonderem Interesse. In Folge einer akuten Läsion des zentralen Nervensystems (ZNS) kommt es zur Akkumulation schädigender Mediatoren, welche eine Sekundärschädigung auslösen können. Substanzen aus der Gruppe der endo- und exogenen Cannabinoide wurde in verschiedenen Modellen der akuten neuronalen Läsion neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben. So werden Prozesse des inflammatorisch geprägten Sekundärschadens, wie zum Beispiel die Exzitotoxizität, durch Cannabinoide begrenzt. Auch abnormal Cannabidiol (abn-CBD), ein synthetisches Cannabinoid ohne Affinität zu den klassischen Cannabinoidrezeptoren 1 und 2 (CB1- und CB2-Rezeptor), verbesserte das Überleben von Nervenzellen nach einer Läsion. Abn-CBD entfaltet seine Wirkung über den bislang nicht klonierten, aber pharmakologisch adressierbaren, abnormal Cannabidiol-sensitiven Rezeptor, wobei weitere Targets beteiligt sein könnten. Der neuroprotektive Effekt scheint von einer Modulierung mikrogliärer Aktivität getragen, da er *in vitro* durch die Depletion von Mikrogliazellen aufgehoben wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von abn-CBD auf Mikrogliazellen und Astrozyten in Zellkulturexperimenten mit dem Ziel charakterisiert, weitere Erkenntnisse über die beteiligten molekularen und zellulären Mechanismen zu erlangen. Im Modell des Scratch-Wound Assays bewirkte die Behandlung mit abn-CBD eine Verzögerung des astrozytären Wundschlusses nach mechanischer Schädigung. Dieser Effekt war abhängig von der Anwesenheit von Mikrogliazellen. Abn-CBD hemmte die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Tumornekrosefaktor-α (TNFα) in astrozytär-mikrogliären Mischkulturen nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS), wohingegen die LPS-induzierte Produktion von Interleukin-6 (IL6) nicht beeinflusst wurde. Interessanterweise wurden aber auch Mikroglia-unabhängige Effekte in isolierten Astrozytenkulturen beobachtet. Abn-CBD beeinflusst somit *in vitro* die entzündliche Reaktion von Gliazellen, welcher auch im Rahmen des Sekundärschadens nach akuten zentralnervösen Läsionen eine tragende Rolle zukommt. Diese Befunde liefern neue Erklärungsansätze für die beschriebene neuroprotektive Wirkung von abn-CBD.

Cardinal von Widdern, Julian: Neuroprotektive Effekte und Modulation von glialer Inflammation durch abnormal Cannabidiol, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 80 Seiten, 2020

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III
Abbildungsverzeichnis V
Tabellenverzeichnis V

1 Einleitung 1
1.1 Endocannabinoidsystem 1
1.2 Abnormal Cannabidiol 3
1.2.1 Evidenz für einen abnormal Cannabidiol-sensitiven Rezeptor 4
1.2.2 GPR18 und GPR55 als potentielle neue Cannabinoidrezeptoren 5
1.3 Neuronale Läsion 6
1.3.1 Exzitotoxizität 8
1.4 Mikroglia 9
1.4.1 Überblick 9
1.4.2 Herkunft 10
1.4.3 Aktivierung und Bedeutung bei neuronaler Läsion 11
1.5 Astrozyten 17
1.5.1 Überblick 17
1.5.2 Reaktive Astrogliose 18
1.6 Cannabinoide im Kontext der neuronalen Läsion 20
1.6.1 Abnomal Cannabidiol-vermittelte Neuroprotektion 22
2 Zielstellung und Fragestellung 24
3 Material und Methodik 25
3.1 Materialien, Chemikalien und Lösungen 25
3.1.1 Reagenzien für die Stickstoffmonoxid-Messung 27
3.1.2 Reagenzien und Antikörper für das Enzyme-linked Immunosorbent Assay 27
3.2 Versuchstiere 27
3.3 Primärkulturen von Mikroglia und Astrozyten 28
3.3.1 Medium zur Kultivierung von primären Mikrogliazellen und Astrozyten 28
3.3.2 Gewinnung und Kultivierung einer astrozytär-mikrogliären Mischkultur 28
3.3.3 Passagieren der primären Mischkultur 29
3.3.4 Gewinnung einer isolierten Astrozytenkultur 29
3.4 Scratch-Wound Assay 29
3.4.1 Vorbereitung der Zellen für die Scratch-Wound Untersuchung 29
3.4.2 Behandlung der Zellen für die Scratch-Wound Untersuchung 30
3.4.3 Lebendzellmikroskopie der Scratch-Heilung 30

3.4.4 Datenerhebung und statistische Auswertung 31
3.5 Messung der Stickstoffmonoxid-, Tumornekrosefaktor-α- und Interleukin-6-Sekretion 32
3.5.1 Vorbereitung der Zellen 32
3.5.2 Behandlung der Zellen 32
3.5.3 Durchführung der Stickstoffmonoxid-Messung 33
3.5.4 Auswertung und statistische Analyse der Stickstoffmonoxid-Messung 33
3.5.5 Durchführung der Tumornekrosefaktor-α- und Interleukin-6-Messung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay 34
3.5.6 Auswertung und statistische Analyse des Enzyme-linked Immunosorbent Assay 35
4 Ergebnisse 36
4.1 Einflüsse von abnormal Cannabidiol auf den astrozytären Wundschluss 36
4.2 Einfluss von abnormal Cannabidiol auf die LPS-induzierte Produktion von Stickstoffmonoxid in astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen 38
4.3 Einfluss von abnormal Cannabidiol auf die LPS-induzierte Produktion von Tumornekrosefaktor-α in astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen 40
4.4 Einfluss von abnormal Cannabidiol auf die LPS-induzierte Interleukin-6-Produktion in astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen 42
5 Diskussion 44
5.1 Allgemeine Stärken und Limitationen der gewählten *in vitro* Modelle 44
5.2 Einflüsse von abnormal Cannabidiol auf die astrozytäre Wundheilung 47
5.3 Stimulation der glialen Zytokinproduktion durch Lipopolysaccharide 49
5.3.1 Beeinflussung der Stickstoffmonoxid-, Tumornekrosefaktor-α- und Interleukin-6-Produktion durch abnormal Cannabidiol 52
5.3.2 Einflüsse des Cannabinoidrezeptor-2-Knockouts auf die Zytokinproduktion und Effekte von abnormal Cannabidiol 56
6 Zusammenfassung und Ausblick 59
7 Literaturverzeichnis 61
8 Thesen 80

Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonylglycerol
abn-CBD	Abnormal Cannabidiol
ACPA	Arachidonylcyclopropylamid
AEA	Arachidonylethanolamid, Anandamid
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ANOVA	*Analysis of Variance*; Varianzanalyse
ARA-S	N-Arachidonyl-L-Serin
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Caspase	Cysteinyl-Aspartat-spezifische Protease
CB1	Cannabinoidrezeptor 1
CB2	Cannabinoidrezeptor 2
CD14	*Cluster of differentiation 14;* Differenzierungscluster 14
CTL	*Control*; Kontrolle
DAGL	Diacylglycerol-Lipase
DAMPs	*Danger-associated molecular patterns;* Gefahr-assoziierte molekulare Muster
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's medium*; Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DNA	*Desoxyribonukleinacid*; Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonukleinase
ECBS	Endocannabinoidsystem
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	*Epidermal growth factor receptor,* Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
FAAH	*Fatty acid amid hydrolase;* Fettsäureamid-Hydrolase
FBS	*Fetal bovine serum;* Fetales Kälberserum
FGF	*Fibroblast growth factor*; Fibroblasten Wachstumsfaktor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GDNF	*Glial cell-derived neurotrophic factor*; Glia-produzierter neurotrophischer Faktor
GFAP	*Glial fibrillary acidic protein;* saures Gliafaserprotein
GM-CSF	*Granulocyte macrophage colony-stimulating* factor; Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GPR18	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 18
GPR55	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 55
GTPγS	Guanosin 5'-O-[gamma-thio]-Triphosphat
HBSS	*Hanks' balanced salt solution;* Hanks ausgeglichene Salzlösung
HMGB1	*High mobility group box protein 1*
HRP	*Horseradish Peroxidase*; Meerrettichperoxidase
HSP60	*60-kDa-Heat shock protein;* 60kDa-Hitzeschockprotein
IFNγ	Interferon γ
IL6	Interleukin-6
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IRF3	*Interferon regulatory factor 3*; Interferon-Regulations-Faktor 3

LPS	Lipopolysaccharide
M-CSF	*Macrophage colony-stimulating factor*; Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MAGL	Monoacylglycerol-Lipase
MAP	*Mitogen-activated protein*; Mitogen-aktiviertes Protein
MATLAB	*Matrix Laboratory*
MHC	*Major histocompatibility complex;* Haupthistokompatibilitäts-Komplex
mRNA	*Messenger ribonucleic acid;* Boten Ribonukleinsäure
MyD88	*Myeloid differentiation primary response protein 88;* myeloides Protein der Differenzierung und Primär-Reaktion 88
NAGly	N-Arachidonyl-Glycin
NF-κB	*Nuclear factor kappa-light-chain-enhacer of activated B-cells*; Nukleärer in aktivierten B-Zellen Kappa-Leichtketten-erhöhender Faktor
NGF	*Nerve growth factor;* Nervenwachstumsfaktor
NLR	*Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor*; Nukleotid-bindender Oligomerisationsdomänen-artiger Rezeptor
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NO	*Nitric-Oxide*; Stickstoffmonoxid
OHSC	*Organotypic hippocampal slice cultures*; organotypische hippocampale Schnittkultur
PAMPs	*Pathogen-associated molecular patterns;* Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	*Phosphate buffered saline;* Phosphatgepufferte Salzlösung
PI3K/Akt	Phophoinositid-3-Kinase/Proteinkinase-B
PLL	Poly-L-Lysin
PRRs	*Pattern-recognition receptors*; Mustererkennungs-Rezeptoren
RLR	*Retinoic acid-inductible gene-I (RIG-I)-like receptor;* Retinsäure-induzierbarer Gen-1-artiger Rezeptor
SEM	*Standard error of the mean;* Standardfehler
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
siRNA	*Small interfering ribonucleic acid;* Kleine eingreifende Ribonukleinsäure
TIR-Domäne	*Toll/Interleukin-1 receptor domain;* Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TIRAP	*TIR domain containing adaptor protein*; TIR-Domäne beinhaltendes Adapter-Protein
TLR	*Toll-like receptor*; Toll-artiger Rezeptor
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
TRAM	*TRIF-related adaptor molecule*; TRIF-bezogenes Adapter-Molekül
TRIF	*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*; TIR-Domäne beinhaltender Interferon-β induzierender Adapter
TRPV1	*Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1;* Transienter Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie vanilloid, Subtyp 1
ZNS	Zentrales Nervensystem
Δ9-THC	Δ9-Tetrahydrocannabinol

Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
01	Strukturformel von Cannabidiol und abnormal Cannabidiol	04
02	Mechanismen der zentralnervösen Sekundärschädigung	08
03	Herkunft der Mikroglia	11
04	Morphologische Stadien der Mikroglia-Aktivierung	12
05	Signaltransduktion von Toll-like Rezeptor 4	15
06	Versuchsanordnung für die Scratch-Wound Untersuchung	30
07	Auswahl der Positionen für die Lebendzellmikroskopie	31
08	Protokoll des Scratch-Wound Assays	31
09	Protokoll der Stickstoffmonoxid- und Zytokin-Messungen	33
10	Schematische Darstellung der Griess-Reaktion	33
11	Modell der vierparametrischen logistischen Regression und exemplarische Standardkurve	35
12	Effekte der Mikroglia-Depletion auf den Wundschluss	36
13	Einfluss von abnormal Cannabidiol auf den Wundschluss in den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen	37
14	Einfluss von abnormal Cannabidiol auf den Wundschluss in den isolierten Astrozytenkulturen	37
15	Zeitliche Dynamik der Wundheilung	38
16	Effekte von abn-CBD auf die NO-Produktion in Wildtyp-Kulturen	39
17	Effekte von abn-CBD auf die NO-Produktion in CB2-Knockout-Kulturen	39
18	Effekte von abn-CBD auf die TNFα-Produktion in Wildtyp-Kulturen	41
19	Effekte von abn-CBD auf die TNFα-Produktion in CB2-Knockout-Kulturen	41
20	Effekte von abn-CBD auf die IL6-Produktion Wildtyp-Kulturen	42
21	Effekte von abn-CBD auf die IL6-Produktion in CB2-Knockout-Kulturen	43

Tabellenverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
01	Materialien	25
02	Medien und Zusätze für Zellkultur und Präparation	25
03	Substanzen für die Behandlungen	25
04	Substanzen für die Stickstoffmonoxid-Messungen	26
05	Substanzen für die Enzyme-linked Immunosorbent Assays	26
06	Geräte	26
07	Software	27
08	Behandlung Stickstoffmonoxid- und Zytokin-Messungen	32

1 Einleitung

1.1 Endocannabinoidsystem

Die Pflanze Cannabis sativa wird seit vielen Jahrhunderten als Heilpflanze und Droge eingesetzt. Allerdings hat die systematische Erforschung ihrer Inhaltsstoffe eine relativ junge Geschichte. Sie begann mit der Isolierung und Identifizierung der molekularen Strukturen der pharmakologisch wirksamen Substanzen Cannabidiol und Δ9-Tetrahydrocannabinol (Δ9-THC) in den 1960er Jahren (Mechoulam und Shvo 1963; Gaoni und Mechoulam 1964; Mechoulam und Gaoni 1967; Mechoulam et al. 1970; Gaoni et al. 1971). Während für die psychotrope Wirkung der Pflanze Cannabis sativa vor allem Δ9-THC verantwortlich ist, sind die in den nächsten Jahren entdeckten überwiegend nicht-psychotropen Phytocannabinoide keinesfalls pharmakologisch inaktiv (Burstein 2015). Zunächst wurde aufgrund der starken Lipophilie der Phytocannabinoide angenommen, sie wirkten über unspezifische Interaktionen mit der Zellmembran (Paton 1975; Mechoulam und Hanuš 2000). Es stellte sich jedoch heraus, dass Cannabinoide ihre Wirkung vor allem über spezifische Rezeptoren entfalten. Mit Hilfe von Tritium-markiertem CP-55,940, einem synthetischen Cannabinoid, konnte schließlich ein erster Rezeptor im Gehirn von Ratten charakterisiert werden, welcher später CB1-Rezeptor genannt wurde (Devane et al. 1988). 1990 wurde der CB1-Rezeptor der Ratte und ein Jahr später auch der des Menschen kloniert (Matsuda et al. 1990; Gérard et al. 1991). Kurz darauf wurde der CB2-Rezeptor als zweiter Rezeptor kloniert (Munro et al. 1993). Die beiden Rezeptoren zeigen eine Homologie ihrer Aminosäuresequenzen von 44 % und unterscheiden sich bezüglich ihres pharmakologischen Profils und der Verteilung im Organismus (Munro et al. 1993; Felder et al. 1995; Galiegue et al. 1995). Während der CB1-Rezeptor vor allem auf neuronalem Gewebe zu finden ist, ist der CB2-Rezeptor überwiegend peripher und auf Zellen des Immunsystems lokalisiert (Galiegue et al. 1995; Tsou et al. 1998; Howlett et al. 2002). Im ZNS befinden sich CB2-Rezeptoren vor allem auf Mikrogliazellen, welche diesen Rezeptor bei Aktivierung hochregulieren (Carlisle et al. 2002; Núñez et al. 2004; Maresz et al. 2005; Cabral und Marciano‐Cabral 2005). Die beiden klassischen Cannabinoidrezeptoren sind Guanosintriphosphat-bindendes Protein (G-Protein)-gekoppelt, wobei der CB1-Rezeptor G-Proteine vom inhibitorischen Subtyp G_i und G_o bindet, während der CB2-Rezeptor nur mit G_i interagiert (Glass und Northup 1999). Sie vermitteln so eine Hemmung der Adenylatzyklase mit konsekutiver Reduktion der intrazellulären Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (Howlett et al. 1986; Devane et al. 1988; Felder et al. 1995; Glass und Northup 1999). Im Rahmen der weiteren Signaltransduktion kommt es zu einer Beeinflussung des mitogen-activated

protein (MAP)-Kinase-Weges (Wartmann et al. 1995; Davis et al. 2003). Neben den beiden klassischen Rezeptoren CB1 und CB2 werden auch Natrium-Kanäle, transiente Rezeptor-Potential-Kationenkanäle der Unterfamilie vanilloid, Subtyp 1 (TRPV1), transiente T-Typ Calcium-Kanäle, spannungsabhängige Kalium-Kanäle und α7-nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren durch Cannabinoide beeinflusst (Howlett et al. 2002; Van Der Stelt und Di Marzo 2005). Zusätzlich gibt es Evidenz für die Involvierung mindestens eines weiteren G-Protein-gekoppelten Rezeptors im Kontext Cannabinoid-vermittelter Signaltransduktion (Di Marzo et al. 2000; Breivogel et al. 2001). Arachidonylethanolamid (AEA) konnte als erster endogener Ligand des CB1-Rezeptors aus Schweinegehirn isoliert werden und wurde Anandamid getauft (Devane et al. 1992). Kurz darauf wurde eine zweite endogene Substanz, 2-Arachidonylglycerol (2-AG), entdeckt, welche Cannabinoidrezeptoren aktivieren kann (Mechoulam et al. 1995; Sugiura et al. 1995). Bei den endogenen Liganden handelt es sich, anders als bei den Phytocannabinoiden, um Eicosanoide, welche bei Bedarf aus Vorläufermolekülen der Plasmamembran gebildet werden. Mit der Identifizierung endogener Liganden, den Endocannabinoiden, entstand der Begriff Endocannabinoidsystem (ECBS), zu dem heute auch die Endocannabinoid synthetisierenden und degradierenden Enzyme, insbesondere die Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH), Monoacylglycerol-Lipase (MAGL) und Diacylglycerol-Lipase (DAGL), gehören (Piomelli 2003). Die Inaktivierung der Endocannabinoide beginnt mit der zellulären Aufnahme, bevor die Hydrolyse durch FAAH und MAGL erfolgt (Deutsch und Chin 1993; Di Marzo et al. 1994; Dinh et al. 2002; Bisogno et al. 2003). Über die beteiligten Transportmechanismen ist wenig bekannt. Es gibt jedoch Hinweise auf spezifische transmembranäre und intrazelluläre Transportproteine (Ortar et al. 2003; Kaczocha et al. 2009; Elmes et al. 2015). Im ZNS können Endocannabinoide als retrograde Transmitter wirken, die bei Depolarisation postsynaptisch aus Vorstufen in der Membran abgespalten werden und präsynaptisch via CB1-Rezeptor und spannungsabhängiger Calcium-Kanäle eine Hyperpolarisation und somit Reduktion der Neurotransmitterausschüttung bewirken (Wilson und Nicoll 2001; Schlicker und Kathmann 2001; Katona et al. 2006). Dies kann als endogener Schutzmechanismus der neuronalen Netzwerke vor Übererregung verstanden werden. Auf funktioneller Ebene ist das ECBS im ZNS an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt und beeinflusst Lernprozesse, Kognition und Affektivität (Mechoulam und Parker 2013). Im Immunsystem modulieren endogene und exogene Cannabinoide auf unterschiedlichen Ebenen die Antwort auf proinflammatorische Reize *in vivo* und *in vitro* (Klein et al. 2003). Darüber hinaus führt die Stimulation von Leukozyten zu einer vermehrten Synthese von Endocannabinoiden und weiteren Bestandteilen des ECBS (Carlisle et

al. 2002). Dementsprechend scheint eine Involvierung in die physiologische Regulation von Entzündungsvorgängen wahrscheinlich (Berdyshev 2000; Klein et al. 2003; Maresz et al. 2005; Juknat et al. 2013). Das Vorhandensein des ECBS ist jedoch keinesfalls auf das ZNS und das Immunsystem beschränkt. In nahezu jedem Organsystem lassen sich Bestandteile des ECBS nachweisen (Galiegue et al. 1995). Insgesamt konnte eine Beeinflussung von vielfältigen Pathologien unterschiedlichster Organsysteme festgestellt werden. So werden durch Endocannabinoide beispielsweise auch der Knochen- und Fettstoffwechsel beeinflusst (Bab und Zimmer 2008; Pagano et al. 2008). Inzwischen gelten Cannabinoide als vielversprechende therapeutische Option, beispielsweise für die Behandlung von chronischen Schmerzen, Übergewicht, Depression, Bluthochdruck sowie akuten und chronischen Läsionen des ZNS (Bahr et al. 2006; Pacher et al. 2006; Whiting et al. 2015).

1.2 Abnormal Cannabidiol

Abn-CBD (IUPAC Bezeichnung: 4-[(1S,6R)-3-methyl-6-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol) ist ein synthetisches Regioisomer des Cannabidiols ohne psychotrope Wirkung und mit keiner relevanten Wirkung an den klassischen Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 (Adams et al. 1977; Showalter et al. 1996; Járai et al. 1999; Offertáler et al. 2003). Strukturell unterscheidet sich abn-CBD vom Phytocannabinoid Cannabidiol nur durch die vertauschten Positionen der Hydroxy- und Pentylgruppe am Phenolring (Abbildung 01). Im Vergleich zu Cannabidiol hat es im Radioliganden-Bindungsassay eine mehr als 4 Zehnerpotenzen niedrigere Affinität an CB1- und CB2-Rezeptoren (Showalter et al. 1996). Abn-CBD wurde erstmals in den 1970er Jahren im Rahmen der Erforschung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Phytocannabinoide synthetisiert (Razdan et al. 1974). In Hunden bewirkte die neue Substanz eine ausgeprägte Hypotension ohne Beeinflussung der Herzfrequenz oder Anhalt für Verhaltensauffälligkeiten (Adams et al. 1977). Neben den vaskulären Effekten konnte abn-CBD mit neuroprotektiven und antiinflammatorischen Mechanismen in Verbindung gebracht werden, wobei eine vollständige Charakterisierung dieser noch ausstehend ist (Mishima et al. 2005; Milman et al. 2006; Kreutz et al. 2009; Janefjord et al. 2014; Krohn et al. 2016).

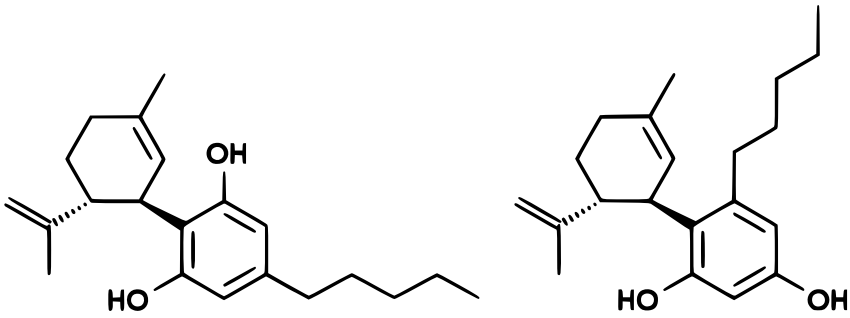


Abbildung 01: Strukturformel von Cannabidiol und abnormal Cannabidiol
Abn-CBD (rechts) unterscheidet sich strukturell von dem Phytocannabinoid Cannabidiol (links) durch die vertauschten Positionen der Hydroxy- und Pentylgruppe am Phenolring.

1.2.1 Evidenz für einen abnormal Cannabidiol-sensitiven Rezeptor

Bei der Untersuchung der Wirkung des Endocannabinoids AEA auf den Tonus von Blutgefäßen wurde deutlich, dass ein Teil der beobachteten vasodilatativen Effekte nicht durch pharmakologische Blockade bzw. Knockout von CB1- und CB2-Rezeptor aufgehoben, wohl aber durch abn-CBD ausgelöst werden konnte (Wagner et al. 1999; Járai et al. 1999; Offertáler et al. 2003). Die synthetische Substanz O-1918 (IUPAC Bezeichnung: 1,3-dimethoxy-5-methyl-2-[(1R,6R)-3-methyl-6-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-yl]benzene) konnte in diversen Experimenten die vaskulären Wirkungen von abn-CBD vollständig antagonisieren (Begg et al. 2003; Offertáler et al. 2003; Su und Vo 2007). Im ZNS der Maus wurde festgestellt, dass das Vorkommen von Endocannabinoiden sowie von deren inaktivierenden Enzymen nur teilweise mit der Distribution der klassischen Cannabinoidrezeptoren korrelierte. Durch AEA, nicht jedoch durch Δ9-THC, konnte eine vermehrte Bindung von Guanosin 5‘-O-[gamma-thio]-Triphosphat (GTPγS) in neuronalen Zellmembranen aus homozygoten CB1-Knockout-Mäusen ausgelöst werden. Die Cannabinoid-vermittelte Membranbindung von GTPγS war überdies nicht durch spezifische CB1- und CB2-Antagonisten beeinflussbar und konnte den Regionen Hirnstamm, Kortex, Hippocampus, Diencephalon und Mesencephalon zugeordnet werden (Di Marzo et al. 2000; Breivogel et al. 2001). In murinen hippocampalen Schnittkulturen wurde die glutamaterge Neurotransmission auch in CB1-defizitären Kulturen durch das synthetische Cannabinoid WIN55,212-2 gehemmt (Hájos et al. 2001). In der Zusammenschau dieser Befunde verdichteten sich die Hinweise, dass mindestens ein weiterer vaskulär und zentralnervös lokalisierter G-Protein-gekoppelter Rezeptor an der Signaltransduktion des ECBS beteiligt zu sein scheint (Járai et al. 1999; Di Marzo et al. 2000; Breivogel et al. 2001; Kunos et al. 2002; Mackie und Stella 2006). Auf diesen putativen Rezeptor wurde in der Literatur mit fortschreitender Charakterisierung

zunehmend unter der Bezeichnung abn-CBD-sensitiver Rezeptor Bezug genommen. Da die vaskulären Effekte durch Pertussis-Toxin, einen Inhibitor von $G_{i/o}$-Proteinen, aufgehoben wurden, lag die Schlussfolgerung nahe, es handele sich bei dem gesuchten Rezeptor, analog zu den klassischen Cannabinoidrezeptoren, um einen $G_{i/o}$-gekoppelten Rezeptor (Begg et al. 2003; Offertáler et al. 2003; Su und Vo 2007). Als molekulare Mechanismen abn-CBD-sensitiver Rezeptor-vermittelter Signaltransduktion konnten außerdem der Phophoinositid-3-Kinase/Proteinkinase-B-(PI3K/Akt)-Signalweg, die p44/42 MAP-Kinase, Calcium-sensitive Kalium-Kanäle und die Proteinkinase G identifiziert werden (Begg et al. 2003; Offertáler et al. 2003; Ho und Hiley 2003; Milman et al. 2006; Su und Vo 2007).

N-Arachidonyl-L-Serin (ARA-S), ein dem AEA verwandtes Lipid mit äußerst geringer Affinität zu CB1- und CB2-Rezeptoren, wurde aus bovinem Gehirn isoliert und als potentieller endogener Agonist des putativen Rezeptors vorgeschlagen. ARA-S hat zu abn-CBD analoge Effekte auf den Tonus von Blutgefäßen und kann die LPS-induzierte Produktion proinflammatorischer Mediatoren in Makrophagen hemmen (Milman et al. 2006). Eine phylogenetische Untersuchung der beiden bekannten Rezeptoren konnte die evolutionäre Beziehung von CB1- und CB2-Rezeptor klären, jedoch keinen dritten homologen Rezeptor ausfindig machen. Das gesuchte Target scheint also phylogenetisch nicht der CB1-/CB2-Linie zu entstammen (Anday und Mercier 2005). *In vitro* Untersuchungen der Beeinflussung mikrogliärer Migration durch Cannabinoide erbrachte pharmakologische Evidenz für das Vorhandensein des putativen Rezeptors auf Mikrogliazellen. Seine Aktivierung führte zu einer gesteigerten Migration immortalisierter BV2-Mikrogliazellen (Walter et al. 2003; Franklin und Stella 2003).

Trotz der bisher nicht eindeutigen Identifizierung eines klonierten Rezeptors konnten die durch den putativen abn-CBD-sensitiven Rezeptor vermittelten Effekte pharmakologisch umfangreich charakterisiert werden. Neben abn-CBD wurden pharmakologisch die synthetische Substanz O-1602 (IUPAC Bezeichnung: 5-methyl-4-[(1R,6R)-3-methyl-6-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-yl]benzene-1,3-diol) als Agonist und Cannabidiol sowie O-1918 als Antagonisten des putativen Rezeptors identifiziert. (Járai et al. 1999; Begg et al. 2003; Offertáler et al. 2003; Walter et al. 2003; Su und Vo 2007; Kreutz et al. 2009; Ashton 2012).

1.2.2 GPR18 und GPR55 als potentielle neue Cannabinoidrezeptoren

Bei Untersuchungen des Genoms wurden verschiedene „orphan“ G-Protein-gekoppelte Rezeptoren identifiziert, welche als potentielle Endocannabinoidrezeptoren

diskutiert werden. Hier ist vor allem auf die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren 18 und 55 (GPR18, GPR55) hinzuweisen. GPR18 wurde 1996 in der Maus und ein Jahr später im Menschen kloniert (Samuelson et al. 1996; Gantz et al. 1997). Es wurde die Hypothese aufgestellt, es handele sich, insbesondere im Hinblick auf die abn-CBD-vermittelte Beeinflussung mikrogliärer Migration, um den gesuchten abn-CBD-sensitiven Rezeptor (McHugh et al. 2010, 2012). N-Arachidonyl-Glycin (NAGly), ein Metabolit von AEA, wurde als potentieller endogener Agonist des Rezeptors vorgeschlagen und auch abn-CBD schien ihn aktivieren zu können (Kohno et al. 2006; McHugh et al. 2010). Beide Substanzen steigerten sowohl in immortalisierten BV2-Mikrogliazellen, als auch in GPR18-transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen die Migration im Boyden-Kammer-Assay. Die Effekte ließen sich durch den abn-CBD-sensitiven Rezeptor-Antagonisten O-1918 und Pertussis-Toxin aufheben (McHugh et al. 2010). Demgegenüber stehen Untersuchungen, welche implizieren, dass NAGly und auch abn-CBD nicht an GPR18 binden bzw. ihn aktivieren (Yin et al. 2009; Lu et al. 2013; Finlay et al. 2016). Als mögliche Erklärung für diese Diskrepanzen wird eine indirekte Beeinflussung der CB2-abhängigen Signaltransduktion durch die Bildung eines Heterorezeptor-Komplexes zwischen CB2-Rezeptor und GPR18 diskutiert (Reyes-Resina et al. 2018).

GPR55 wurde 1999 kloniert (Sawzdargo et al. 1999) und später als neuer Endocannabinoidrezeptor postuliert (Baker et al. 2006). Diverse Cannabinoide binden an den Rezeptor und der Lipidmediator Lysophosphatidylinositol wurde als potentieller endogener Ligand diskutiert (Oka et al. 2007; Lauckner et al. 2008; Ryberg et al. 2009). Die vaskulären Effekte von Endocannabinoiden und abn-CBD blieben jedoch von einem GPR55-Knockout unbeeinflusst (Johns et al. 2009). Es konnte keine MAP-Kinasen-Phosphorylierung ausgelöst werden und auch im β-Arrestin-Assay war keine Aktivierung des Rezeptors durch abn-CBD messbar (Oka et al. 2007; Yin et al. 2009). Darüber hinaus vermittelt GPR55 seine Effekte über G_{13} und nicht über G_i (Ryberg et al. 2009).

Die Datenlage bezüglich der Rolle von GPR18 und GPR55 im ECBS und ihrer Bedeutung bei der Vermittlung der Effekte von abn-CBD muss aktuell noch als uneinheitlich bewertet werden.

1.3 Neuronale Läsion

Akute Läsionen des ZNS, wie zum Beispiel Schädel-Hirn-Traumata (SHT), stellen eine häufige Ursache von bleibenden sensomotorischen Ausfällen, kognitiven Defiziten und

Behinderung mit Einschränkung der Aktivität und Partizipation dar. Sie zeichnen sich, abhängig vom Schweregrad, durch eine hohe Letalität und komplikative Verläufe aus (McGarry et al. 2002; Dutton und McCunn 2003). Während des akuten Ereignisses kommt es zur irreversiblen Destruktion von neuronalen und glialen Bestandteilen des ZNS, was unter dem Begriff der Primärschädigung subsumiert wird. Mechanismen der Primärschädigung im Falle eines SHT sind beispielsweise Kontusion, Hämorrhagie und axonale Ruptur (Smith 2003; Perel et al. 2009). Die weitere Reaktion des zentralnervösen Gewebes ist gekennzeichnet von komplex ineinandergreifenden inflammatorischen und metabolischen Kaskaden, welche nachträglich den neuronalen Schaden ausweiten können (Abbildung 02). Diese unterschiedlichen Mechanismen lassen sich als Sekundärschädigung zusammenfassen und sind vor allem an Modellen des ischämischen Schlaganfalls und des SHT detailliert beschrieben (Dirnagl et al. 1999; Werner und Engelhard 2007; Kunz et al. 2010). Die Sekundärschädigung ist unter anderem getragen von den Mechanismen der sterilen Neuroinflammation, der Exzitotoxizität und des oxidativen Stresses (Arundine und Tymianski 2004; Dong et al. 2009; Kunz et al. 2010). Die inflammatorische Reaktion ist dabei initial vor allem durch die Aktivierung ortsansässiger Mikrogliazellen und Astrozyten determiniert (Lees 1993; Kreutzberg 1996; Ridet et al. 1997; Pekny und Pekna 2014; Donat et al. 2017). Im weiteren Verlauf kommt es zur Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke und zur Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut, was den inflammatorischen Status weiter verstärken kann. (Dirnagl et al. 1999; Campanella et al. 2002; Kunz et al. 2010). Der sekundäre neuronale Schaden entsteht, abhängig vom Ausmaß der Primärschädigung, durch Apoptose und Nekrose und kann sich subakut oder prolongiert bis chronisch entwickeln. Währenddessen kommt es auch zur Initiierung antiinflammatorischer und reparativer Prozesse (Sheng et al. 1995; Chen und Trapp 2016). Die zentralnervöse Narbenbildung und Neuorganisation neuronaler Netzwerke um irreversibel geschädigte Bereiche unterliegt insbesondere der astrozytären Kontrolle (Ridet et al. 1997; Pekny und Pekna 2014). Seit vielen Jahren gibt es verstärkte Anstrengungen, das Outcome der Patienten durch pharmakologische Beeinflussung der Sekundärschädigung zu verbessern, ohne dass es bislang zu einem Durchbruch gekommen ist (Beauchamp und Mutlak 2008). Dennoch steigt das Verständnis von den zugrunde liegenden Mechanismen. Dieser Abschnitt soll einen orientierenden Überblick über die beteiligten Prozesse geben, während die astrozytäre und mikrogliäre Reaktion im Kontext der zentralnervösen Schädigung dezidiert in den jeweiligen Abschnitten dieser Arbeit beleuchtet wird (Kapitel 1.4.3 und 1.5.2). In diversen Modellen der akuten Hirnschädigung wurde ein modulierender Effekt von Cannabinoiden auf die Mechanismen der Exzitotoxizität und Neuroinflammation

beschrieben, der sich in der Konsequenz neuroprotektiv auswirken kann (Shohami et al. 2011).

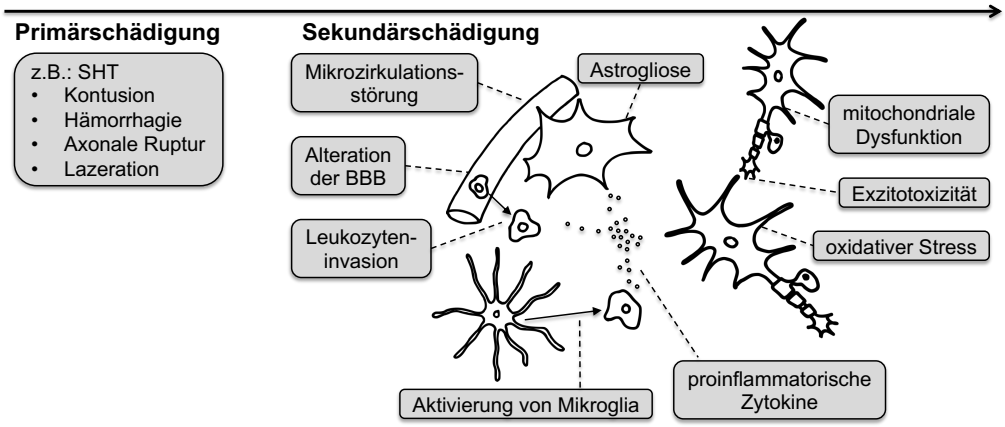


Abbildung 02: Mechanismen der zentralnervösen Sekundärschädigung
(BBB: Blut-Hirn-Schranke, SHT: Schädel-Hirn-Trauma)

1.3.1 Exzitotoxizität

Das exzitatorische System des ZNS wird hauptsächlich durch glutamaterge Neurone gestellt (Greenamyre und Porter 1994). Der Begriff Exzitotoxizität bezeichnet einen Prozess, bei dem geschädigte exzitatorische Neurone exzessiv Neurotransmitter ausschütten, was zu neuronaler Dysfunktion bis hin zum Zelltod führen kann. Exzitotoxizität tritt universell bei diversen akuten und chronisch-neurodegenerativen Pathologien des ZNS auf und ist ein wesentlicher Mechanismus der neuronalen Sekundärschädigung (Arundine und Tymianski 2004; Dong et al. 2009). Glutamat aktiviert postsynaptisch mehrere Klassen ionotroper und metabotroper Rezeptoren (Reiner und Levitz 2018), wobei den ionotropen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- und α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptoren im Kontext der Exzitotoxizität eine vorrangige Rolle zukommt (Sattler und Tymianski 2001). Beide Rezeptoren sind unselektive Kationenkanäle (Reiner und Levitz 2018). Im Rahmen der exzessiven Glutamat-Ausschüttung kommt es so zu einem akuten Calcium-Einstrom mit Depolarisation der postsynaptischen Membran (Berdichevsky et al. 1983; Choi 1985). Dieser Calcium-Einstrom kann derart massiv ausfallen, dass es durch einen konsekutiven Natrium- und Wasser-Einstrom zum Anschwellen und direkten Absterben der beteiligten Neurone kommt (Choi 1987). Außerdem kann der Zelltod auch indirekt über die Calcium-abhängige Aktivierung kataboler Enzyme wie Proteasen, Phospholipasen und Nukleasen ausgelöst werden (Berliocchi et al. 2005). Es kommt zur vermehrten Produktion von NO und freien Radikalen sowie zur mitochondrialen Dysfunktion der Neurone (Chan et al. 1990; Nicholls 2004). Dies kann verzögert zur

Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schädigung und Apoptoseinduktion führen (Arundine und Tymianski 2004; Dong et al. 2009). Auch wenn es sich bei der Exzitotoxizität in erster Linie um einen neuronalen Prozess handelt, wird das Ausmaß der Schädigung wesentlich durch Astrozyten und Mikrogliazellen determiniert. Zum einen wird Exzitotoxizität durch das Mikroglia-bedingte inflammatorische Mikromilieu unterhalten, zum anderen können Astrozyten die synaptischen Transmitterkonzentrationen durch Aufnahme der Transmitter begrenzen (Schousboe und Waagepetersen 2005; Olmos und Lladó 2014). Der Schädigungsmechanismus wurde vielfach am Modell der exzitotoxisch geschädigten organotypischen hippocampalen Schnittkultur (OHSC) untersucht. Hier wurde gezeigt, dass die exzitotoxische Schädigung mittels NMDA auch zur Aktivierung und Akkumulation lokaler Mikrogliazellen in den Schnitten führt (Kreutz et al. 2007). Exzitotoxizität trägt also indirekt auch zur inflammatorischen Aktivierung der ortsansässigen Glia bei, was den sekundären Schaden weiter verstärken kann (Kapitel 1.4.3).

1.4 Mikroglia

1.4.1 Überblick

Pio del Rio-Hortega führte das Konzept von Mikroglia als definiertem Bestandteil des ZNS in den 1930er Jahren des letzten Jahrhunderts ein. Viele seiner damaligen Hypothesen haben bis heute Gültigkeit (Sierra et al. 2016). Mikrogliazellen stellen als residente Protagonisten des unspezifischen Immunsystems im ZNS von Säugetieren etwa 10 % der Gesamtpopulation aller Gliazellen. Hohe Dichten von Mikrogliazellen finden sich vor allem in Hippocampus, olfaktorischem Telencephalon, Basalganglien sowie der Substantia nigra (Lawson et al. 1990). Ihre Vorläuferzellen besiedeln während der frühen Embryonalentwicklung das ZNS. Es können grob drei verschiedene Funktionszustände unterschieden werden: ramifiziert, aktiviert und phagozytierend (Abbildung 04). Im gesunden Gehirn eines Erwachsenen herrscht der ramifizierte Zustand vor. In diesem Zustand überwacht eine einzelne Mikrogliazelle mit ihren beweglichen feinen Ausläufern den Zustand des Gewebes eines definierten Areals. Dabei überschneiden sich die von zwei benachbarten Mikrogliazellen kontrollierten Bereiche nicht (Davalos et al. 2005; Fetler und Amigorena 2005). Im ramifizierten Zustand weisen sie ein sehr niedriges Expressionsniveau immunologisch relevanter Moleküle auf. Im gesunden ZNS unterstützt Mikroglia die synaptische Plastizität, die Aufrechterhaltung der Homöostase und das Immunprivileg des ZNS durch Sekretion antiinflammatorischer Zytokine (Kettenmann et al. 2011). *In vivo* Untersuchungen mittels Multiphotonenmikroskopie zeigen, dass der Begriff „ruhend“, wie ramifizierte Mikroglia früher bezeichnet wurde, dem physiologischen Zustand der

Mikroglia im gesunden ZNS keineswegs gerecht wird. Vielmehr handelt es sich um einen hochdynamischen Prozess der aktiven Zustandsüberwachung des umliegenden Gewebes. Diese Mikroarchitektur ermöglicht eine schnelle Reaktion auf Gewebeschäden und Infektionen (Nimmerjahn et al. 2005; Davalos et al. 2005; Fetler und Amigorena 2005). Mikrogliazellen kommt sowohl im Rahmen der physiologischen Entwicklung des ZNS, aber auch im Kontext diverser pathologischer Zustände eine tragende Rolle zu. Bei neurodegenerativen Erkrankungen und akuten ZNS-Läsionen ist ohne Ausnahme eine Alteration der mikrogliären Morphologie und Funktion detektierbar (Kreutzberg 1996; Kettenmann et al. 2011).

1.4.2 Herkunft

Im Gegensatz zum neuroektodermalen Ursprung aller anderen Gliazellen stammt Mikroglia aus dem embryonalen Dottersack. Während die nahe Verwandtschaft von Mikrogliazellen zu Makrophagen seit langem offensichtlich scheint, war die Frage, ob zirkulierende Monozyten bzw. deren Vorläuferzellen im gesunden ZNS eines Erwachsenen im Austausch mit der Mikroglia-Population stehen, Inhalt jahrzehntelanger Debatte. Zumindest bei Mäusen scheint diese Frage inzwischen eindeutig geklärt: Mikroglia-Progenitorzellen werden während der frühen Embryonalentwicklung, genau wie die restliche myeloische Reihe, im Dottersack gebildet und migrieren in die Anlage des ZNS. Während der weiteren embryologischen Entwicklung wird die Produktion von Makrophagen erst durch die fetale Leber und dann durch das Knochenmark übernommen. Diese später produzierten Makrophagen ersetzen zumindest teilweise früher gebildete Makrophagen in den jeweiligen Zielkompartimenten. Im Gegensatz hierzu erneuert sich die Mikroglia-Population ausschließlich aus sich selbst bzw. aus ortsansässigen Vorläuferzellen (Abbildung 03). Mikroglia bildet also unter physiologischen Bedingungen beim Erwachsenen eine von der myeloischen Hämatopoese weitgehend unabhängige Population (Saijo und Glass 2011; Ginhoux et al. 2013). Zwar konnte in Mäusen nach chimärer Knochenmarktransplantation eine begrenzte zentralnervöse Rekrutierung von Monozyten mit anschließender Mikroglia-artiger Differenzierung festgestellt werden (Priller et al. 2001; Mildner et al. 2007). Untersuchungen an chimären parabiotischen Tieren mit gemeinsamen Blutkreislauf implizieren jedoch, dass es sich dabei, auch unter pathologischen Bedingungen, um ein äußerst seltenes Ereignis handelt (Ajami et al. 2007). Nur unter spezifischen pathologischen Konditionen mit geschädigter Blut-Hirn-Schranke scheinen auch zirkulierende Monozyten in das ZNS migrieren zu können. Aktuell ist nicht abschließend geklärt, ob diese dort permanent Mikroglia-artig differenziert verbleiben, oder ob es sich dabei um einen temporären Besuch in dem

abgeschirmten Kompartiment handelt (Lassmann et al. 1993; Priller et al. 2001; Mildner et al. 2007).

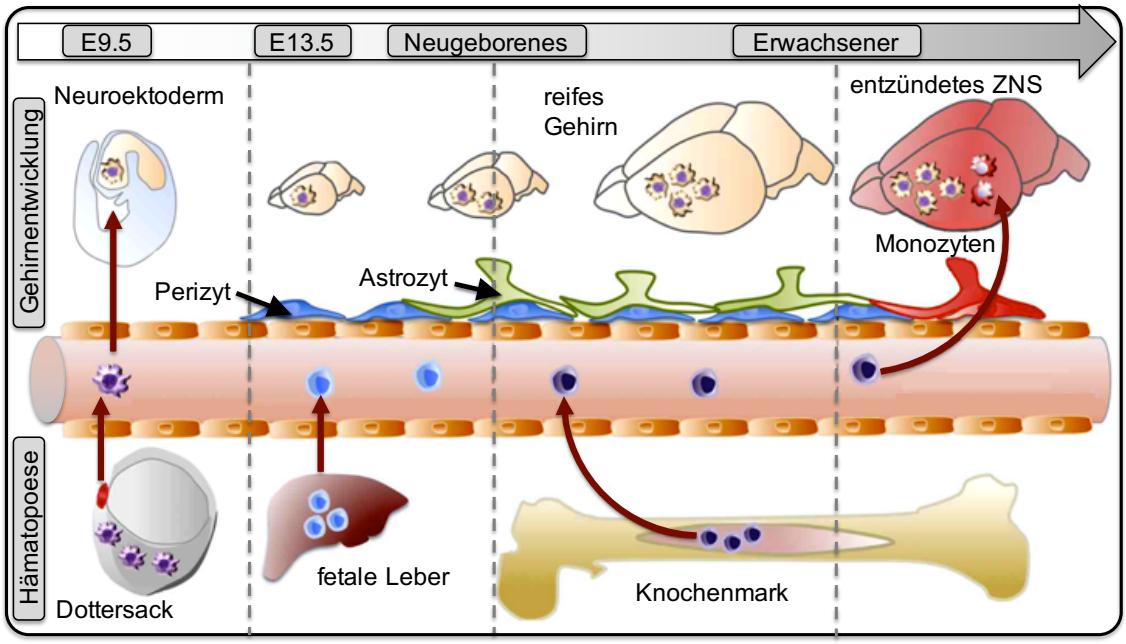


Abbildung 03: Herkunft der Mikroglia
Mikroglia entwickelt sich aus frühen Monozyten des Dottersacks. Im Gehirn des Erwachsenen stellt Mikroglia eine von der myeloischen Hämatopoese unabhängige Population. Im Rahmen von Entzündungen kann es zur Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut kommen. Verändert nach (Ginhoux et al. 2013)

1.4.3 Aktivierung und Bedeutung bei neuronaler Läsion

Mikrogliazellen verfügen über eine Vielzahl von Oberflächenstrukturen, welche es ihnen ermöglichen, den Zustand des umliegenden Gewebes zu erfassen. Auf den Zellen befinden sich Strukturen für die Detektion von Veränderungen des pH-Haushaltes und der Elektrolythomöostase, sowie Neurotransmitter- und Zytokinrezeptoren. Zusätzlich können sie auch auf mit Gewebeschaden oder mikrobieller Infektion assoziierte Moleküle, die danger-associated molecular patterns (DAMPs) und pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), reagieren (Kettenmann et al. 2011). Durch die primäre Hirnschädigung werden solche DAMPs aus geschädigten Neuronen und Gliazellen freigesetzt (Yang et al. 2010). Prinzipiell werden hierdurch unterschiedliche Rezeptoren, die pattern-recogniton Rezeptoren (PRRs), aktiviert (Lehnardt 2010). Zu den PRRs gehört neben den nucleotide-binding oligomerizationdomain (NOD)-like Rezeptoren (NLR), den retinoic acid-inductible gene-I (RIG-I)-like Rezeptoren (RLR) und den C-Typ-Lektin-Rezeptoren auch die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR). Die meisten Säugetiere verfügen über mehr als zehn TLR-Subtypen, wobei die jeweiligen Subtypen bevorzugt unterschiedliche

Moleküle binden und sich teilweise bezüglich ihrer intrazellulären Signalkaskaden unterscheiden (Takeuchi und Akira 2010). Dies ermöglicht eine differenzierte Reaktion auf unterschiedliche Schädigungsmechanismen. Im ZNS befinden sich TLR vor allem auf Mikrogliazellen, aber auch auf Astrozyten und Neuronen (Bsibsi et al. 2002; Olson und Miller 2004; Kettenmann et al. 2011).

Detektieren Mikrogliazellen Moleküle, die mit einem Gewebeschaden assoziiert sind, werden sie aktiviert. Dies geht mit tiefgreifenden Veränderungen von Expressionsmuster und Funktion einher. Die Zellen verlassen ihren ramifizierten Zustand, proliferieren und durchlaufen charakteristische morphologische Veränderung (Kreutzberg 1996; Davalos et al. 2005). Bei moderater zerebraler Läsion wird die lokale Mikroglia in einen hyperramifizierten Übergangszustand versetzt, während durch eine manifeste Schädigung eine zelluläre Metamorphose initiiert wird (Streit et al. 1988). Zunächst hypertrophieren die Somata der Mikrogliazellen. Ihre Ausläufer werden kürzer und plumper. Sie werden amöboid und bewegen sich aktiv in den Bereich der Läsion (Davalos et al. 2005; Trapp et al. 2007). Durch Proliferation und Chemotaxis kommt es zur Akkumulation der Mikroglia im geschädigten Areal. Bei fortbestehenden aktivierenden Stimuli entwickeln sie die Fähigkeit zur Phagozytose. Die dann rundlichen Zellen gleichen phänotypisch einem Makrophagen.

Abbildung 04: Morphologische Stadien der Mikroglia-Aktivierung
Bei Aktivierung von Mikroglia kommt es zunächst zu einer Hyperramifizierung. Im Verlauf kann die Metamorphose zu einer amöboid-phagozytierenden Zelle erfolgen. Die Prozesse sind prinzipiell reversibel. Verändert nach (Kreutzberg 1996)

Im Rahmen der Aktivierung greift Mikroglia durch die Bildung von Zytokinen para- und autokrin in das weitere Entzündungsgeschehen ein. Aktivierte Mikroglia bildet diverse

immunmodulierende Mediatoren und reaktive Moleküle wie TNFα, IL6 und NO. Dies triggert die weitere Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen und kann den sekundären neuronalen Schaden aggravieren (Sawada et al. 1989, 1992; Olson und Miller 2004; Olmos und Lladó 2014). Diese Form der Aktivierung per TLR ist besonders ausführlich für bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) beschrieben, da sie in der Vergangenheit häufig für die experimentelle Stimulation von Mikrogliazellen verwendet wurden. Anzumerken ist jedoch, dass bislang nicht alle Schritte dieser vor allem in Makrophagen gut charakterisierten Signalkaskade auch separat in Mikrogliazellen untersucht wurden. *In vivo* ist LPS vor allem im Rahmen von septischen Infektionen mit gramnegativen Bakterien relevant. LPS aktiviert den transmembranären TLR4 auf Mikrogliazellen (Bsibsi et al. 2002; Olson und Miller 2004). Im Falle einer zentralnervösen Läsion kommt es ebenfalls zur Aktivierung von TLR4 durch aus sterbenden Neuronen freigesetzte Moleküle wie dem high mobility group box 1 Protein (HMGB1) oder 60-kDa-Hitzeschockprotein (HSP60) (Yang et al. 2010; Rosenberger et al. 2015). Die Bindung von LPS an TLR4 kann durch das LPS-bindende Protein, welches als Akute-Phase-Protein in der Leber gebildet wird, erleichtert werden (Schumann et al. 1990). Für die optimale Aktivierung des Rezeptors sind die Proteine cluster of differentiation 14 (CD14) und MD-2 (alternative Bezeichnung: Lymphozyten-Antigen 96) notwendig. CD14 bindet LPS und präsentiert es dem Komplex aus homodimerem TLR4 und MD-2. Während trotz CD14-Knockout eine abgeschwächte Reaktion auf LPS möglich ist, ist die Funktion von MD-2 für die TLR4-Dimerisierung und Aktivierung essentiell (Haziot et al. 1996; Schromm et al. 2001; Visintin et al. 2001). MD-2 vermittelt als Adapter-Protein die Bindung von LPS an TLR4 und ermöglicht so die Erkennung des Moleküls (Nagai et al. 2002; Akashi et al. 2003). Es bildet sich ein Komplex aus homodimerem TLR4, CD14 und MD-2. Für die weitere Signaltransduktion bedient sich dieser Komplex intrazellulärer Adapter-Moleküle, wobei die Bindung dieser klassischerweise über eine Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne erfolgt. Intrazelluläre Adapter-Moleküle von TLR4 sind TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β (TRIF), TRIF-related adaptor molecule (TRAM), TIR domain containing adaptor protein (TIRAP) und myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88) (Abbildung 05). MyD88 bindet über TIRAP den Komplex und ist vor allem für die frühe Reaktion auf LPS notwendig. Der MyD88-abhängige Weg aktiviert über weitere Zwischenschritte den MAP-Kinase- und PI3K/Akt-Signalweg sowie die Transkriptionsfaktoren AP-1 und nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF-$_{\kappa}$B) (Kawai et al. 1999; Ma et al. 2011). Während alle TLR, mit Ausnahme von TLR3, MyD88 für die Signaltransduktion benötigen, können per TLR4 zusätzlich TRAM- und TRIF-abhängige Kaskaden

aktiviert werden. TRAM vermittelt dabei die Bindung von TRIF an den Rezeptorkomplex (Yamamoto et al. 2003; Miguel et al. 2007). Die späte Reaktion auf LPS verläuft so MyD88-unabhängig und aktiviert insbesondere die Produktion von Interferonen. Darüber hinaus kommt es zur Translokation von interferon-regulatory factor 3 (IRF3) in den Zellkern. Im Rahmen der weiteren Signaltransduktion kommt es zusätzlich zu einer nicht-apoptotischen Erhöhung der Cysteinyl-Aspartat-spezifischer Protease (Caspase) 8, 3 und 7 (Burguillos et al. 2011). In der Konsequenz werden induzierbare NO-Synthasen (iNOS) induziert und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNFα und IL6, gesteigert (Sawada et al. 1989; Zielasek et al. 1992; Pålsson-McDermott und O'Neill 2004). Es kommt jedoch auch zur Induktion antiinflammatorischer Zytokine wie Interleukin 10, welche einer ungebremsten zeitlichen und räumlichen Ausbreitung des inflammatorischen Status entgegenwirken (Sheng et al. 1995). TNFα wird im Kontext der Sekundärschädigung überwiegend neurotoxische Eigenschaften zugeschrieben (Barone et al. 1997; Medina et al. 2002; Neumann et al. 2002).

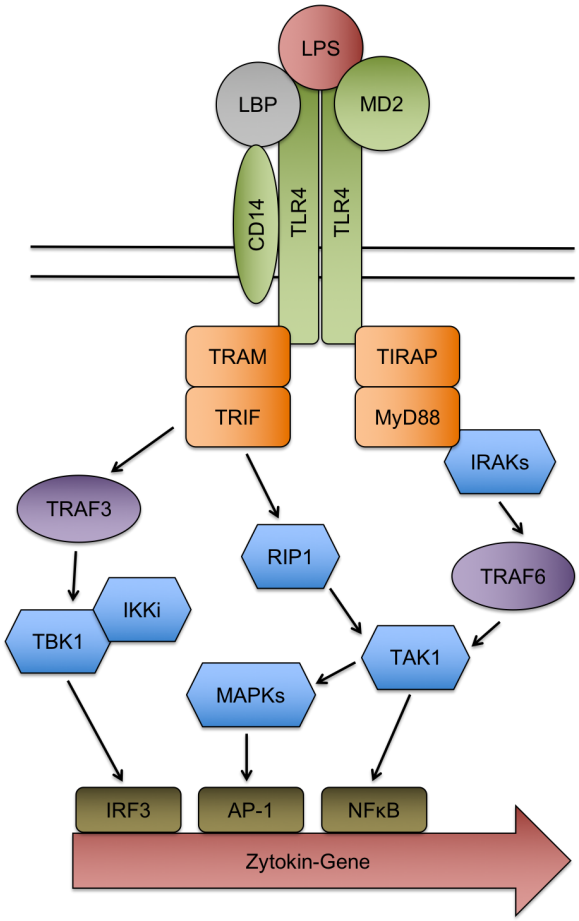


Abbildung 05: Signaltransduktion von Toll-like Rezeptor 4
Durch die Bindung von LPS an den Komplex aus CD14, MD-2 und TLR4 kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Kaskaden über diverse Adaptermoleküle, welche in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der Produktion proinflammatorischer Zytokine münden. Verändert nach (McCoy 2016)

Ähnlich wie Makrophagen können Mikrogliazellen im Rahmen ihrer Aktivierung iNOS exprimieren (Zielasek et al. 1992; Fiebich et al. 1998; Solà et al. 2002). Im menschlichen Körper sind neben den iNOS der Immunabwehr zwei weitere Isoformen des Enzyms auf Neuronen und Endothelzellen bekannt, welche konstitutiv exprimiert werden (Knowles und Moncada 1994). NO-Synthasen katalysieren die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin (Bredt und Snyder 1990). NO wird durch die iNOS des Immunsystems in großen Mengen gebildet, um Erreger und krankhafte Zellen abzutöten (Hibbs Jr. et al. 1987). NO hat im Organismus eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden und kann mit Hyperoxid-Anionen zum ebenfalls hochreaktiven Peroxinitrit reagieren (Kelm 1999; Mikkelsen und Wardman 2003). Klassische Stimulatoren der iNOS-Expression sind bakterielle Toxine wie LPS aber auch proinflammatorische Zytokine wie TNFα (Zielasek et al. 1992; Anderson et al. 1995; Fiebich et al. 1998). Einmal aktiviert kommt es zur starken und langanhaltenden NO-Produktion durch die iNOS, welche vielfach höher ausfallen kann als die der konstitutiv

exprimierten NO-Synthase-Isoformen (Park und Murphy 1994). In der Folge können lokal zytotoxische Effekte und Apoptoseinduktion, sowie *in vivo* hämodynamische Dysregulationen auftreten. Die Induktion der iNOS in Mikrogliazellen wird mit einer Ausweitung des neuronalen Untergangs im Rahmen der Sekundärschädigung in Verbindung gebracht (Boje und Arora 1992; Chao et al. 1992; Brown 2007). Neben der direkten Neurotoxizität scheint NO die Vulnerabilität der Neurone gegenüber einer exzitotoxischen Schädigung zu erhöhen (Zhao et al. 2004).

Die Aktivierung von Mikroglia erfolgt im engen Zusammenspiel mit den Astrozyten. Auf der einen Seite zeigten Einzelzell- und Mischkulturexperimente, dass der direkte Kontakt zu Astrozyten und astrozytär sezernierte Faktoren essentiell für die Begrenzung mikrogliärer Aktivierung ist (Becher und Antel 1996; Wilms et al. 1997; Hailer et al. 2001; Schilling et al. 2001), auf der anderen Seite kann es in Folge von Zell-Zell-Kommunikation zu einer Amplifizierung der inflammatorischen Reaktion kommen (Solà et al. 2002; Saijo et al. 2009; Kirkley et al. 2017). Mikrogliär sezernierter TNFα aktiviert *in vitro* Astrozyten und beeinträchtigt ihre Fähigkeit zur Unterstützung des neuronalen Überlebens und des Aussprossens von Neuriten (Abd-El-Basse 2013). Die morphologischen und immunphänotypischen Veränderungen, die Mikrogliazellen im Rahmen ihrer Aktivierung durchlaufen, sind prinzipiell reversibel. Die Zellen können durch entsprechende Signale aus dem umliegenden Gewebe wieder in einen inaktiven Zustand überführt werden (Wilms et al. 1997; Schilling et al. 2001). Während die erste Welle der inflammatorischen Sekundärschädigung so durch die ortsansässigen Zellen getragen ist, kommt es im weiteren Verlauf durch die sezernierten Zytokine zur Alteration der Integrität der Blut-Hirn-Schranke und Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut. Die Mikrogliazellen beginnen im Rahmen der Aktivierung verstärkt major histocompatibility complex (MHC)-Moleküle der Klasse 2 zu exprimieren, sodass die Aktivierung von T-Zellen erreicht werden kann (O'Keefe et al. 2002). Mikroglia bildet also im ZNS das verbindende Element zwischen unspezifischer und spezifischer Immunreaktion.

In der Vergangenheit wurde häufig ein destruktives, rein proinflammatorisches und Progressions-förderndes Bild von Mikroglia gezeichnet. Jedoch ist dieser „klassische" Weg der Mikroglia-Aktivierung nur ein Ausschnitt der möglichen Funktionszustände. In den letzten Jahren entwickelte sich ein differenzierteres Bild der mikrogliären Aktivitätszustände. So wurden analog zu der Aktivierung von Makrophagen zwei Phänotypen unterschieden: Während der M1-Phänotyp mit proinflammatorischen und zytotoxischen Effekten assoziiert ist, stehen beim M2-Phänoyp antiinflammatorische

und reparative Mechanismen im Vordergrund (Gordon 2003; Cherry et al. 2014). Auch wenn dieses Paradigma in Bezug auf Mikroglia aktuell wieder angezweifelt wird, steht heute außer Frage, dass es sich bei der mikrogliären Aktivierung um einen hochdynamischen und heterogenen Prozess mit situativ bzw. zeitlich ambivalenter Konsequenz für das Gewebe des ZNS nach einer Läsion handelt (Lees 1993; Cherry et al. 2014; Martinez und Gordon 2014). Ob der mikrogliären Aktivierung nach einer neuronalen Läsion eine schädigende oder protektive Rolle zukommt, lässt sich dementsprechend nicht pauschal beantworten. Zweifelsohne nehmen diese Mechanismen jedoch sowohl in den Prozessen der sekundären Schädigung, als auch in der Initiierung von Reparation und Regeneration eine Schlüsselposition ein (Kreutzberg 1996; Chen und Trapp 2016).

1.5 Astrozyten

1.5.1 Überblick

Astrozyten stellen mit ca. 80 % der Gliazellpopulation den größten Anteil von Gliazellen im Gehirn und damit auch den größten Anteil von Zellen im ZNS. Im Gegensatz zu Mikrogliazellen, welche erst im Laufe der embryologischen Entwicklung das ZNS besiedeln, entstammen die Astrozyten den Glioblasten, welche sich aus dem Neuroektoderm entwickeln. Dabei handelt es sich allerdings keineswegs um eine homogene Masse einfacher Stützzellen, wie lange angenommen, sondern um eine orts- und situationsspezifisch sehr heterogene Zellpopulation, die durch ihre vielfältigen Funktionen die Integrität des ZNS maßgeblich determiniert (Matyash und Kettenmann 2010). Morphologisch werden protoplasmatische von fibrösen Astrozyten unterschieden. Während die protoplasmatischen Astrozyten mit ihren vergleichsweise kurzen Ausläufern in direktem Kontakt mit den Somata der Neurone in der grauen Substanz stehen, folgen die langen Ausläufer der fibrösen Astrozyten den Axonen der weißen Substanz (Kettenmann und Verkhratsky 2008). Beiden Formen ist gemein, dass sie das notwendige Mikromilieu schaffen, um neuronale Aktivität zu ermöglichen. Des Weiteren separieren sie die strukturellen und funktionellen Domänen des ZNS (Bushong et al. 2002). Durch die Sekretion trophischer Faktoren nehmen sie Einfluss auf das Überleben und die Differenzierung der Neurone (Furukawa et al. 1986; Yoshida und Gage 1992). Die Astrozyten sind dabei als überzelluläre Einheit zu verstehen. Ihre Zytoplasmata stehen durch Gap-Junctions in direkter Verbindung, sodass metabolische Aufgaben nicht in erster Linie durch einzelne Zellen, sondern vielmehr durch regionale astrozytäre Einheiten übernommen werden (Tabernero et al. 2006; Kang et al. 2008). Es gibt Hinweise, dass diese Verbindungen auch zur Signaltransduktion verwendet werden, wobei es wechselseitige Schnittstellen zu

neuronalen Netzwerken gibt (Kettenmann et al. 1984; Cornell-Bell et al. 1990; Bazargani und Attwell 2016). Zwischen den Spezies unterscheidet sich die morphologische Komplexität der Astroglia maßgeblich, wobei die integrative Leistungsfähigkeit neuronaler Netzwerke direkt von dieser abhängig zu sein scheint (Oberheim et al. 2009). So entwickelten Mäuse, denen humane astrozytäre Progenitorzellen transplantiert wurden, die Fähigkeit der astrozytären schnellen Weiterleitung von Calciumsignalen, was mit einer verbesserten Lern- und Gedächtnisfähigkeit einherging (Han et al. 2013). Astrozyten grenzen das privilegierte Kompartiment des ZNS sowohl nach außen (Membrana limitans gliae superficialis) als auch gegen den Blutstrom (Membrana limitans gliae perivascularis) ab. Die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke hängt von astrozytär sezernierten Faktoren ab (Alvarez et al. 2013). Andererseits bilden diese Zellen auch das verbindende Element zwischen Energieträgern im Blut und den energiehungrigen Neuronen des Gehirns (Tsacopoulos und Magistretti 1996). Es wurde gezeigt, dass Astrozyten auch direkten regulatorischen Einfluss auf die zerebrale Mikrozirkulation nehmen (Zonta et al. 2003). Astrozyten sind also maßgeblich an der Induktion und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke sowie der Energieversorgung der Neurone beteiligt. Durch ihre Stoffwechselleistung und enge Verknüpfung ermöglichen sie die Homöostase des ZNS. Astrozyten beeinflussen aber auch direkt die synaptische Transmission neuronaler Netzwerke. So ermöglicht ihnen ihr direkter örtlicher Kontakt zu den Synapsen die Aufnahme und Modifizierung von Neurotransmittern (Chung et al. 2015). Die Spaltprodukte werden dann wieder an Neurone zurückgegeben, um der erneuten Transmitter-Synthese zugeführt zu werden. In diesem Kontext wird ihre Rolle im Rahmen der Exzitotoxizität deutlich (Schousboe und Waagepetersen 2005; Tzingounis und Wadiche 2007).

1.5.2 Reaktive Astrogliose

Reaktive Astrogliose ist definiert als die mit Hypertrophie und Proliferation einhergehende Antwort von Astrozyten auf eine zerebrale Läsion. Sie wird regelhaft von morphologischen Veränderungen und einer deutlich vermehrten Expression des Intermediärfilaments saures Gliafaserprotein (GFAP) begleitet (Eng und Ghirnikar 1994; Brahmachari et al. 2006; Sofroniew 2009). Der Begriff stellt die Antwort von Astrozyten in den Mittelpunkt, wobei dieser komplexe Mechanismus vielmehr durch die Interaktion von Astrozyten mit anderen Zellen des ZNS, insbesondere mit Mikrogliazellen, getragen wird (Solà et al. 2002; Nakazawa et al. 2007; Kirkley et al. 2017). Die Aktivierung der Astrozyten kann durch mikrogliär sezernierte proinflammatorische Mediatoren und Zytokine wie TNFα oder NO erfolgen

(Brahmachari et al. 2006; Abd-El-Basse 2013; Liddelow et al. 2017; Shinozaki et al. 2017). Zellkulturexperimente zeigen, dass andersherum auch die mikrogliäre Aktivierung der Kontrolle astrozytär sezernierter Faktoren unterliegt (Hailer et al. 2001). Die Reaktion aktivierter Astrozyten ist partiell unabhängig von der Art der zugrunde liegenden Schädigung, wobei andererseits auch läsionsspezifische Veränderungen der Genexpression detektierbar sind (Zamanian et al. 2012). Insgesamt handelt es sich bei der reaktiven Astrogliose um eine spezielle Form der Wundheilung bzw. Narbenbildung mit dem Ziel, die geschädigte Region metabolisch von gesundem Gewebe zu isolieren, die Blut-Hirn-Schranke zu rekonstruieren und neuronale Verbindungen um die Läsion herum neu zu organisieren. Reaktive Astrogliose geht jedoch auch mit der Produktion diverser proinflammatorischer Zytokine einher, was den inflammatorischen Zustand nach einer akuten Läsion temporär aggravieren kann (Sawada et al. 1989, 1992; Codeluppi et al. 2014).

Während reaktive Astrogliose jahrzehntelang als wesentliches Hindernis axonaler Regeneration angesehen wurde, begründen jüngere Erkenntnisse ein deutlich differenzierteres Bild. Grundsätzlich lässt sich die anisomorphe von der isomorphen Astrogliose unterscheiden. Die anisomorphe Astrogliose findet im Zentrum der Läsion statt und führt durch ausgeprägte Proliferation der Astrozyten zu einer Glianarbe, welche die ursprüngliche Gewebe-Architektur substituiert. Das erneute Einwachsen von Axonen wird durch die epidermal growth factor receptor (EGFR)-induzierte Produktion von Chondroitin-Sulfat und Keratin aktiv gehemmt, sodass es zu einem räumlichen und funktionellen Ausschluss der Region aus der Integrität des ZNS kommt (Wilhelmsson et al. 2004; Koprivica et al. 2005; Bradbury und Carter 2011). Diese Barriere scheint jedoch auch perivaskulär die Leukozyteninvasion und damit eine überschießende Neuroinflammation vermindern zu können (Voskuhl et al. 2009). In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von Astrozyten mit dem proinflammatorischen Zytokin TNFα mit einer verminderten Fähigkeit der Zellen einhergeht, das neuronale Überleben und Auswachsen von Neuriten zu unterstützen (Abd-El-Basse 2013). Ganz anders verhalten sich die Astrozyten weiter entfernt vom Kern der Läsion: Hier werden Wachstumsfaktoren und Zytokine wie glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), nerve growth factor (NGF) und fibroblast growth factor (FGF) produziert, welche eine Rekonstitution der neuralen Architektur ermöglichen (Appel et al. 1997; Goss et al. 1998; Kitagawa et al. 1999). Geschädigte Neurone werden vor einem sekundären Absterben geschützt und das Wachstum von Neuriten sowie die Synaptogenese unterstützt (Faulkner et al. 2004; Li et al. 2008). Dementsprechend wird zwar einerseits die Restitution schwer geschädigter

Gewebeabschnitte verhindert, während andererseits die Leukozyteninvasion vermindert, die Regeneration umliegender Bereiche unterstützt und die Integrität der Blut-Hirn-Schranke stabilisiert wird. Bei experimenteller Elimination sich teilender GFAP-positiver Zellen nach akuter Hirnschädigung kam es zu einer verstärkten Alteration der Blut-Hirn-Schranke mit Leukozyteninvasion und zu einer verstärkten Neurodegeneration bei verstärktem lokalen Aussprossen von Neuriten (Bush et al. 1999). Eine einheitliche Interpretation im Sinne eines protektiven oder schädigenden Mechanismus wird diesen Befunden folglich nicht gerecht. Vielmehr handelt es sich um eine notwendige und komplexe Reaktion, deren Konsequenzen für die Integrität des ZNS differenzierter Betrachtung bezüglich Zeit und Ort bedarf (Pekny et al. 2014). Das zunehmende Verständnis von den zugrunde liegenden Mechanismen führt zur Entdeckung vielfältiger potentieller pharmakologischer Angriffspunkte zur Behandlung der neuronalen Sekundärschädigung (Kimelberg und Nedergaard 2010).

1.6 Cannabinoide im Kontext der neuronalen Läsion

Im Kontext akuter zentralnervöser Läsionen und neurodegenerativer Erkrankungen kommt es zu einer ausgeprägten Stimulation der Bildung von Endocannabinoiden (Panikashvili et al. 2001; Hansen et al. 2001; Maccarrone et al. 2003; Marsicano et al. 2003; Hohmann et al. 2005; Kallendrusch et al. 2012). Die vermehrte Bildung von 2-AG und AEA im Rahmen von zentralnervösen Pathologien konnte mit neuroprotektiven Effekten in Verbindung gebracht werden und es gibt Evidenz dafür, dass es sich dabei um einen intrinsischen Kompensationsmechanismus zur Begrenzung der Sekundärschädigung handelt (Panikashvili et al. 2001; Marsicano et al. 2003; Kallendrusch et al. 2012). In den letzten Jahren haben sich zwei unterschiedliche molekulare Mechanismen Cannabinoid-vermittelter Neuroprotektion herauskristallisiert. Einerseits wird die überschießende glutamaterge Transmission im Rahmen der Exzitotoxizität reduziert und andererseits die inflammatorische Komponente der Sekundärschädigung beeinflusst.

Wie bereits dargelegt, können Endocannabinoide als retrograde Transmitter wirken, die bei postsynaptischer Depolarisation aus Vorstufen in der Membran abgespalten und freigesetzt werden und präsynaptisch via CB1-Rezeptor eine Hyperpolarisation und somit Reduktion der Neurotransmitterausschüttung bewirken (Wilson und Nicoll 2001; Schlicker und Kathmann 2001; Katona et al. 2006). Über diesen neuronalen Mechanismus kann die verstärkte Glutamat-Ausschüttung CB1-abhängig vermindert und die exzitotoxische Sekundärschädigung vermindert werden (Marsicano et al. 2003). Im Schlaganfallmodell der Maus führte ein Knockout des CB1-Rezeptors zu

größeren Läsionen und konsekutiv reduziertem neurologischen Outcome (Parmentier-Batteur et al. 2002).

Als weiterer Mechanismus Endocannabinoid-vermittelter Neuroprotektion wurde die Beeinflussung mikrogliärer Aktivierung charakterisiert. Mikrogliazellen sind prinzipiell in der Lage, den CB2-Rezeptor zu exprimieren. (Núñez et al. 2004). Darüber hinaus gibt es pharmakologische Evidenz für das Vorhandensein des putativen abn-CBD-sensitiven Rezeptors auf Mikroglia (Walter et al. 2003; Franklin und Stella 2003). Im gesunden ZNS mit ramifizierter Mikroglia lässt sich allenfalls eine minimale Rezeptorexpression feststellen, sodass wiederholt das Vorkommen von CB2-Rezeptoren auf Mikroglia angezweifelt wurde (Munro et al. 1993; Galiegue et al. 1995; Griffin et al. 1999). An Mikrogliazellen wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass diese den Rezeptor erst im Rahmen der Aktivierung hochregulieren, sodass das ursprüngliche Paradigma einer ausschließlich peripheren Distribution des Rezeptors revidiert werden musste. Die Expression des CB2-Rezeptors unterliegt dabei einer Pathogen- bzw. Zytokin-spezifischen Regulation. So führt beispielsweise eine Behandlung mit LPS zu einer reduzierten Expression, während eine Behandlung mit granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) plus Interferon γ (IFNγ) zu einer gesteigerten Rezeptorexpression führt (Carlisle et al. 2002; Maresz et al. 2005; Cabral und Marciano - Cabral 2005). CB1-Rezeptoren werden ebenfalls, wenn auch auf deutlich niedrigerem Niveau, gebildet (Carlisle et al. 2002). Interessanterweise scheint das Ausmaß der mikrogliären CB2-Rezeptorexpression auch *in vivo* abhängig von der zugrunde liegenden Neuropathologie zu sein (Zhang et al. 2003). Durch eine Behandlung von Mikrogliazellen mit Cannabinoiden können vielfältige Teilaspekte des mikrogliären Funktionszustandes beeinflusst werden. So konnte gezeigt werden, dass 2-AG und die synthetische Substanz Arachidonylcyclopropylamid (ACPA) die gerichtete Migration von immortalisierten BV2-Mikrogliazellen im Boyden-Kammer-Assay steigert, wobei der Effekt durch die pharmakologische Blockade von CB2- und abn-CBD-sensitivem Rezeptor aufgehoben werden konnte (Walter et al. 2003; Franklin und Stella 2003). 2-AG bewirkt in der Zellkultur eine CB2-abhängige Steigerung der Proliferation von Mikrogliazellen (Carrier et al. 2004). Im Modell der exzitotoxisch geschädigten OHSC konnte Exzitotoxizität durch endogene und exogene Cannabinoide begrenzt werden. Der neuroprotektive Effekt von 2-AG war dabei abhängig von der Anwesenheit von Mikrogliazellen (Kreutz et al. 2007, 2009). Am gleichen Modell wurde auch durch AEA das Überleben von Neuronen nach exzitotoxischer Schädigung durch eine Beeinflussung der mikrogliären Aktivität verbessert (Eljaschewitsch et al. 2006). Außerdem konnte die mikrogliäre

Produktion proinflammatorischer Zytokine und reaktiver Sauerstoffspezies durch Cannabinoide reduziert werden (Ehrhart et al. 2005; Eljaschewitsch et al. 2006; Martin-Moreno et al. 2011; Ma et al. 2015). Die mikrogliäre Produktion von TNFα auf einen proinflammatorischen Reiz wurde *in vitro* durch 2-AG und synthetische Cannabinoide jedoch auch unabhängig von einer pharmakologischen Blockade der Rezeptoren CB1 und CB2 gehemmt (Puffenbarger et al. 2000; Facchinetti et al. 2003). Im *in vivo* Modell der traumatischen Hirnschädigung führte sowohl die pharmakologische Blockade des CB2-Rezeptors als auch der genetische Knockout zu einer Exazerbation der TNFα- und NO-Produktion (Amenta et al. 2014). Im Mausmodell des ischämischen Schlaganfalls konnten CB2-Agonisten das Outcome der Tiere verbessern und die Produktion proinflammatorischer Proteine reduzieren (Zarruk et al. 2012). Der Effekt wurde durch pharmakologische Blockade und genetischen Knockout aufgehoben. Interessanterweise war jedoch durch den Knockout des CB2-Rezeptors selbst nur im Modell der temporären Ischämie, nicht jedoch bei permanentem Verschluss der Arteria cerebri media, das Outcome der Tiere gegenüber den Wildtyp-Tieren verändert (Zhang et al. 2007, 2009; Zarruk et al. 2012). Sowohl im Mausmodell des ischämischen Schlaganfalles, als auch im Modell der traumatischen Hirnschädigung wurde die reduzierte Neuroinflammation und Leukozyteninvasion als Mechanismus der CB2-vermittelten Neuroprotektion identifiziert (Murikinati et al. 2010; Zarruk et al. 2012; Amenta et al. 2014). Auch in einem Mausmodell der Subarachnoidalblutung wurde die zerebrale Leukozyteninvasion CB2-abhängig vermindert (Fujii et al. 2014). Es wird deutlich, dass viele der neuroprotektiven Effekte über die CB1-abhängige Beeinflussung synaptischer Transmission und CB2-abhängige antiinflammatorische Wirkung des ECBS vermittelt werden. Es besteht jedoch auch Evidenz für die Beteiligung CB1- und CB2-unabhängiger Mechanismen an Cannabinoid-vermittelter Neuroprotektion.

1.6.1 Abnomal Cannabidiol-vermittelte Neuroprotektion

Bei der Untersuchung des neuroprotektiven Potentials endogener und exogener Cannabinoide am Modell der exzitotoxisch geschädigten OHSC verbesserte 2-AG das Überleben der Nervenzellen und beeinflusste die Migration und Proliferation von Mikrogliazellen (Kreutz et al. 2007). Zunächst wurde der CB2-Rezeptor für die 2-AG-vermittelte Neuroprotektion verantwortlich gemacht. Überraschenderweise zeigte sich jedoch, dass auch nach pharmakologischer Blockade des CB2-Rezeptors das Überleben der Nervenzellen durch 2-AG verbessert wurde (Kreutz et al. 2007, 2009). Der neuroprotektive Effekt von 2-AG wurde allerdings durch eine Behandlung mit O-1918 oder Cannabidiol antagonisiert. Darüber hinaus wirkte abn-CBD ebenfalls O-

1918- und Cannabidiol-sensitiv neuroprotektiv. Die Effekte konnten durch Depletion der Mikrogliazellen aus den Kulturen aufgehoben werden (Kreutz et al. 2009). In der Mainzer Arbeitsgruppe von Dr. Alessandri wurde in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe abn-CBD in einem *in vivo* Modell der traumatischen Hirnschädigung an Ratten untersucht. Abn-CBD akkumulierte nach subkutaner Applikation im ZNS und verbesserte ohne Beeinflussung des systemischen Blutdrucks die zerebrale Perfusion. Nach 14 Tagen waren die Läsionen signifikant kleiner als bei unbehandelten Tieren, was sich auch in signifikant besseren Ergebnissen in neurologischen Scores wiederspiegelte. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass der Ramifikationsindex, ein mikroskopischer Parameter für mikrogliäre Aktivierung, nach drei Tagen signifikant niedriger ausfiel (Ulrich 2012). Auch im Mausmodell des ischämischen Schlaganfalls wurde der zerebrale Blutfluss durch eine Behandlung mit abn-CBD erhöht und das Volumen der Läsion signifikant reduziert (Mishima et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass 2-AG und synthetische Cannabinoide *in vitro* die mikrogliäre Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNFα CB1- und CB2-unabhängig hemmen können (Puffenbarger et al. 2000; Facchinetti et al. 2003). Die Neurotoxizität von konditioniertem Medium, welches aus Kulturen LPS-aktivierter BV2-Mikroglia stammte, wurde durch eine Behandlung mit abn-CBD herabgesetzt (Janefjord et al. 2014). Der abn-CBD-sensitive Rezeptor konnte pharmakologisch auf Mikrogliazellen anhand seiner Beeinflussung der Migration charakterisiert werden (Walter et al. 2003; Franklin und Stella 2003). Abn-CBD scheint also über eine gemeinsame Zielstruktur mit Endocannabinoiden durch die Beeinflussung mikrogliärer Funktion und der zerebralen Perfusion neuroprotektiv zu wirken. In diesem Zusammenhang stellt der putative mikrogliäre abn-CBD-sensitive Rezeptor eine schlüssige Arbeitshypothese dar, auch wenn seine genetische Identität bis heute ungewiss ist.

2 Zielstellung und Fragestellung

Ziel der Arbeit ist es, anhand von *in vitro* Modellen die Modulation von glialen Entzündungs- und Reparaturprozessen durch abn-CBD zu beleuchten und so sein neuroprotektives Potential weiter zu charakterisieren. Gewählt wurde ein Modell für reaktive Astrogliose und ein Modell der entzündlichen Astrozyten- und Mikroglia-Aktivierung. Dass Cannabinoide auf Ebene der Sekundärschädigung nach akuter Hirnschädigung das Überleben von Nervenzellen beeinflussen gilt inzwischen als gut untersuchte Tatsache (Kapitel 1.6). Auch die synthetische Substanz abn-CBD beeinflusste in unterschiedlichen Modellen das Ausmaß der neuronalen Schädigung. Jedoch herrscht bis heute eine gewisse Unklarheit darüber, welche Zielstrukturen durch abn-CBD beeinflusst werden und auf welchem Zellsubtyp diese zu finden sind (Kapitel 1.6.1). Zwar konnten in der Vergangenheit eine Wirkung auf Mikrogliazellen und die zerebrale Blutversorgung gezeigt und verschiedene Rezeptoren als potentielle Targets identifiziert werden, dennoch bleibt das Bild der Pharmakodynamik von abn-CBD inkomplett. Die Charakterisierung der Wirkung auf Mikrogliazellen beschränkt sich bislang auf wenige Untersuchungen. Keiner der klonierten Rezeptoren kann aktuell das komplette Wirkungsprofil erklären und eine potentielle direkte Wirkung auf Astrozyten wurde bislang nicht untersucht. Aus dieser Situation ergibt sich das Ziel, beteiligte Strukturen und Zelltypen über die Identifikation beeinflusster Signalkaskaden weiter einzukreisen.

Im Kontext der Sekundärschädigung kommt der reaktiven Astrogliose und astrozytären Narbenbildung eine Schlüsselposition zu (Kapitel 1.5.2). Die Befunde aus den OHSC implizieren eine direkte Beeinflussung der ortsansässigen Glia durch abn-CBD (Kreutz et al. 2009). Es stellen sich also folgende Fragen:

1.: Wird die astrozytäre Narbenbildung durch eine Behandlung mit abn-CBD beeinflusst?

2.: Sind die potentiellen Effekte abhängig von der Anwesenheit von Mikrogliazellen?

Die Sekundärschädigung ist durch inflammatorische Kaskaden gekennzeichnet (Kapitel 1.4.3 und 1.5.2). Die Substanz abn-CBD wurde bereits mit antiinflammatorischen Effekten in Verbindung gebracht. In diesem Zusammenhang soll eruiert werden:

3.: Wie beeinflusst abn-CBD die Bildung und Freisetzung von NO und den proinflammatorischen Zytokinen TNFα und IL6 aus LPS-aktivierten Gliazellen?

4.: Differieren potentielle Effekte durch einen Knockout des CB2-Rezeptors bzw. durch die Anwesenheit von Mikrogliazellen?

3 Material und Methodik

3.1 Materialien, Chemikalien und Lösungen

Tabelle 01: Materialen

Artikel	Hersteller, Firmensitz
1,5 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
15 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
24-Well-Platte	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
6-Well-Platte	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
96-Well-Platte	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
96-Well-Platte für ELISA	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Einmalspritzen 20 ml	B.Braun, Melsungen (Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim (Deutschland)
Pasteur Glaspipette	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Petrischalen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Präparierbesteck	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Sterilfilter	Sarstedt AG, Nümbrecht (Deutschland)
Sterilfilter-Flaschen (250 ml, 500 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht (Deutschland)
Zellkulturflasche	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)

Tabelle 02: Medien und Zusätze für Zellkultur und Präparation

Artikel	Hersteller, Firmensitz
Aqua bidest.	Fresenius, Bad Homburg (Deutschland)
Clodronat	Bayer, Leverkusen (Deutschland)
DMEM	Gibco BRL Life Technologies, Carlsbad (USA)
DNAse	Worthington Biochemical, Lakewood (USA)
FBS	Gibco BRL Life Technologies, Carlsbad (USA)
HBSS mit Mg^{2+} und Ca^{2+}	Gibco BRL Life Technologies, Carlsbad (USA)
HBSS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}	Gibco BRL Life Technologies, Carlsbad (USA)
Natriumbikarbonat	Invitrogen, Carlsbad (USA)
PBS	Gibco BRL Life Technologies, Carlsbad (USA)
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL Life Technologies, Carlsbad (USA)
PLL	Biochrom, Berlin (Deutschland)
Salzsäure	AppleChem, Darmstadt (Deutschland)
Trypsin	Gibco BRL Life Technologies, Carlsbad (USA)
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin (Deutschland)
Vitamin C	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)

Tabelle 03: Substanzen für die Behandlungen

Artikel	Hersteller, Firmensitz
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Methylacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Abnormal Cannabidiol (abn-CBD)	Tocris Bioscience, Bristol (UK)

Tabelle 04: Substanzen für die Stickstoffmonoxid-Messungen

Artikel	**Hersteller, Firmensitz**
Natrium-Nitrit	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Griess-Reagenz (modified)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Tabelle 05: Substanzen für die Enzyme-linked Immunosorbent Assays

Artikel	**Hersteller, Firmensitz**
Goat anti-mouse TNFα Capture Antikörper	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Biotynilierter goat anti-mouse TNFα Detection Antikörper	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Rekombinanter mouse TNFα Standard	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Streptavidin-HRP	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Rat anti-mouse IL6 Capture Antikörper	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Biotynilierter goat anti-mouse IL6 Detection Antikörper	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Rekombinanter mouse IL6 Standard	R&D Systems, Minneapolis (USA)
PBS	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Waschpuffer	R&D Systems, Minneapolis (USA)
BSA (Reagent Diluent)	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Color Reagent A (H_2O_2)	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Color Reagent B (Tetramethylbenzidin)	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Stop Solution (2N H_2SO_4)	R&D Systems, Minneapolis (USA)

Tabelle 06: Geräte

Artikel	**Hersteller, Firmensitz**
Auto-Washer	Bio-Rad, Hercules (USA)
Elektronische Pipettierhilfe	Hirschmann, Eberstadt (Deutschland)
Feinwaage	OHAUS, Parsippany-Troy Hills (USA)
Inkubator	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Lebendzell-Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar (Deutschland)
Manuelle Mikrotiterpipette	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Microplate-Reader	BioTek Instruments, Winooski (USA)
PH-Meter	Mettler-Toledo, Columbus (USA)
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Jena (Deutschland)
Sterilbank	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Vortexer	Janke & Kunkel, Köln (Deutschland)
Wasserbad	Varialux, Arnsdorf (Deutschland)
Zentrifugen	Heraeus, Hanau (Deutschland)

Tabelle 07: Software

Artikel	**Hersteller, Firmensitz**
Excel for Mac 2011	Microsoft, Redmond (USA)
Gen5	BioTek Instruments, Winooski (USA)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla (USA)
LASX V. 1.0.9	Leica Microsystems, Wetzlar (Deutschland)
PowerPoint for Mac 2011	Microsoft, Redmond (USA)
Tscratch V.1.0	ETH Zürich, unkommerziell (Schweiz)
Word for Mac 2011	Microsoft, Redmond (USA)

3.1.1 Reagenzien für die Stickstoffmonoxid-Messung

Für die NO-Messungen wurde ein auf die Verwendung an Zellkulturüberständen optimiertes Griess-Reagenz verwendet (Griess-Reagenz modified, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). Bei der Verwendung wurden die Angaben des Herstellers beachtet (Kapitel 3.5.3).

3.1.2 Reagenzien und Antikörper für das Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Für die durchgeführten Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) wurden kommerziell erhältliche und für die Verwendung an Zellkulturüberständen optimierte ELISA-Kits verwendet (DuoSet ELISA Development System Mouse TNFα und DuoSet ELISA Development System Mouse IL6, R&D Systems, Minneapolis, USA). Alle weiteren benötigten Materialien und Lösungen wurden ebenfalls im Set über den Hersteller bezogen (DuoSet Ancillary Reagent Kit 2, R&D Systems, Minneapolis, USA). Bei der Verdünnung der Antikörper und Reagenzien auf ihre Zielkonzentrationen sowie der Durchführung des Assays wurden die Empfehlungen des Herstellers beachtet (Kapitel 3.5.5).

3.2 Versuchstiere

Das Material für die primären Zellkulturen wurde aus Mäusen (C57BL/6) und korrespondierenden CB2-Rezeptor-Knockout-Tieren gewonnen. Der CB2-Knockout besteht dabei in der Elimination der dritten intrazellulären Schleife, der transmembranären Domänen sechs und sieben, sowie des Carboxy-Terminus des Rezeptors (Buckley et al. 2000; Buckley 2008). Die Haltung und Zucht erfolgte im Zentrum für angewandte medizinische humanbiologische Forschung (ZAMED) Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Jungtiere wurden am Tag ihrer Geburt oder am ersten postnatalen Tag durch Dekapitation für die Präparation getötet.

3.3 Primärkulturen von Mikroglia und Astrozyten

3.3.1 Medium zur Kultivierung von primären Mikrogliazellen und Astrozyten

Zur Kultivierung der astrozytär-mikrogliären Mischkultur sowie der isolierten Astrozyten kam Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 4,5 g/L Glukose, welchem 10 % (v/v) fetales Kälberserum (fetal bovine serum, FBS), 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin und 0,1 % (v/v) Vitamin C zugesetzt wurden, zur Verwendung. Vor der Benutzung wurde das Medium erwärmt, der pH mit Hilfe von Bikarbonat und Salzsäure auf 7,4 eingestellt und anschließend steril filtriert.

3.3.2 Gewinnung und Kultivierung einer astrozytär-mikrogliären Mischkultur

Um Primärkulturen von Astrozyten bzw. Mikroglia zu gewinnen, wurde zunächst eine Mischkultur dieser Zellen erstellt. Dazu wurden Wildtyp C57BL/6-Mäuse beziehungsweise korrespondierende CB2-Knockout-Tiere am Tag ihrer Geburt oder am darauffolgenden Tag (p0-p1) unter sterilen Bedingungen dekapitiert und präpariert. Die Kopfhaut und anschließend die Schädelkalotte wurden sagittal eröffnet, nach lateral mobilisiert und entfernt. Die Gehirne wurden mit einer gebogenen Pinzette entnommen und in eine gekühlte Petrischale mit Ca^{2+}- und Mg^{2+}-haltiger Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) überführt. Unter stereomikroskopischer Sicht wurden die Meningen, Bulbi olfactorii und das Cerebellum samt Hirnstamm entfernt. Die so präparierten Gehirne wurden zunächst dreimal kurz mit HBSS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} gespült, um dann zu jeweils vier Stück für fünf Minuten in 1 ml einer Lösung aus 3 ml HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}, 2 ml Trypsin und 0,5 ml Desoxyribonukleinase (DNAse) in einem 15 ml-Röhrchen bei 37 °C anverdaut zu werden. Nach einmaligem Waschen mit HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} erfolgte eine Behandlung mit 100 µl DNAse, woraufhin sich die Gehirne mit Hilfe einer Pasteurpipette suspendieren ließen. Der Verdau wurde durch Hinzugabe von 10 ml HBSS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gestoppt und die so entstandene Suspension für zehn Minuten bei 133 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension in eine zuvor mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtete Kulturflasche gegeben. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 37 °C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Nach zwei Tagen wurde der Zelldetritus mittels HBSS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} aus der Kultur gewaschen, gefolgt von der Zugabe von frischem Kulturmedium. Anschließend erfolgte alle zwei Tage ein Wechsel des Kulturmediums. Durch das eingesetzte Kulturmedium kam es zum raschen Absterben von Neuronen und Oligodendrozyten, sodass nach wenigen Tagen eine Mischkultur aus Astrozyten und Mikrogliazellen entstand. Nach einer Woche entwickelten die Kulturen ein für mehrere Tage stabiles Verhältnis von Astrozyten zu

Mikrogliazellen, welches etwa bei 10:1 lag (Hansson et al. 1980; Hansson 1984; Saura 2007).

3.3.3 Passagieren der primären Mischkultur

Nachdem die Zellen in der Kulturflasche Konfluenz erreichten, wurden sie nach zweimaligem Waschen der Kultur mit phosphate buffered saline (PBS) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit Hilfe von 3 ml Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (0,05 %/0,02 % w/v in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) über fünf Minuten aus der Adhärenz gelöst. Die Reaktion wurde mit Kulturmedium gestoppt und die so gewonnene Zellsuspension bei 133 g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet resuspendiert und in je 10 ml Medium auf zwei neue mit PLL beschichtete Kulturflaschen passagiert.

3.3.4 Gewinnung einer isolierten Astrozytenkultur

Zur Herstellung reiner Astrozytenkulturen aus der Mischkultur wurden die Mikrogliazellen durch Zusatz von 10 µg/ml Clodronat in das Kulturmedium abgetötet. Die Prozedur wurde dreimal in Verbindung mit den regulären Wechseln des Kulturmediums durchgeführt, um möglichst alle Mikrogliazellen zu erfassen. Anschließend erfolgten im Rahmen der weiteren Kultivierung Mediumwechsel ohne den Zusatz von Clodronat (Kohl et al. 2003; Kumamaru et al. 2012).

3.4 Scratch-Wound Assay

Um die Einflüsse von abn-CBD und der Anwesenheit von Mikrogliazellen auf die Migration und Proliferation von Astrozyten nach einer mechanischen Läsion zu untersuchen, wurde ein Scratch-Wound Assay als *in vitro* Modell für reaktive Astrogliose bzw. astrozytäre Narbenbildung gewählt.

3.4.1 Vorbereitung der Zellen für die Scratch-Wound Untersuchung

Scratch-Wound Assays wurden sowohl an isolierten Astrozytenkulturen, als auch an astrozytär-mikrogliären Mischkulturen durchgeführt (Kapitel 3.3). Bei konfluentem Wachstum in der Kulturflasche und nach einer Kultivierungszeit von 10 bis 20 Tagen wurde analog zum Prozedere bei Passagieren der Zellen vorgegangen (Kapitel 3.3.3). Dabei wurden die Zellen in der Suspension mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und nach entsprechender Verdünnung jeweils 500000 Zellen in 3 ml Medium in die Vertiefungen einer 6-Well-Platte gegeben, welche zuvor mit PLL beschichtet wurden. Es wurden je drei Wells mit astrozytär-mikrogliärer Mischkultur und die drei verbleibenden Wells mit reiner Astrozytenkultur besiedelt. Anschließend wurden die

Kulturen über mindestens 24 Stunden bis zum Erreichen von Adhärenz und Konfluenz inkubiert. Eine mittige, vertikale und gerade Risswunde wurde mit Hilfe einer 10 µl-Pipettenspitze gesetzt, das verbrauchte Zellkulturmedium wurde abgesaugt und durch frisches mit laut Protokoll zugesetzten Substanzen ersetzt (Abbildung 06).

3.4.2 Behandlung der Zellen für die Scratch-Wound Untersuchung

Die Zellen wurden mit abn-CBD in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM behandelt. Den korrespondierenden Kontrollen (CTL) wurde 0,66 µl Methylacetat pro ml Medium entsprechend der Menge Lösungsmittel bei der Behandlung mit abn-CBD zugesetzt.

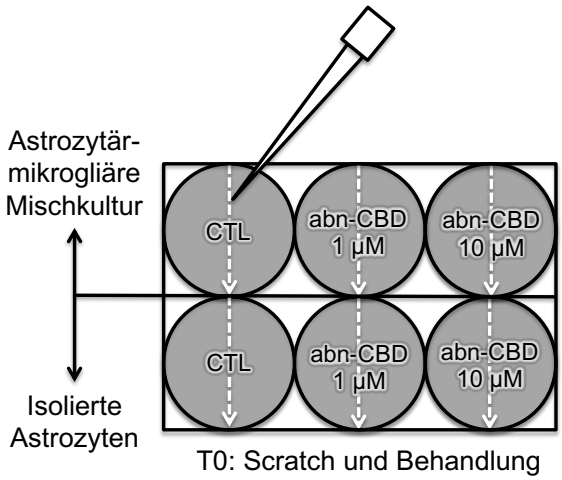


Abbildung 06: Versuchsanordnung für die Scratch-Wound Untersuchung

3.4.3 Lebendzellmikroskopie der Scratch-Heilung

Die Beobachtung der so präparierten Zellen erfolgte in einem Mikroskop der Marke Leica mit einem den Objekttisch umgebenden Inkubator. Es wurde ein 20-fach Objektiv mit Phasenkontrast verwendet, wobei die Zellen konstant bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert wurden. Die untersuchten Positionen wurden so definiert, dass jeweils drei überschneidungsfreie Ausschnitte aus dem zentralen Bereich des Scratches abgebildet wurden. Ferner wurde ein zusätzlicher repräsentativer Ausschnitt 4 mm vom Wundrand entfernt im Bereich des Zell-Monolayers gewählt, um die Vergleichbarkeit der Zelldichte zu bestätigen (Abbildung 07). Die Software des Mikroskops wurde so konfiguriert, dass alle fünf Minuten eine digitale Aufnahme der definierten Positionen entstand und die Beobachtung wurde über 30 Stunden fortgesetzt (Abbildung 08).

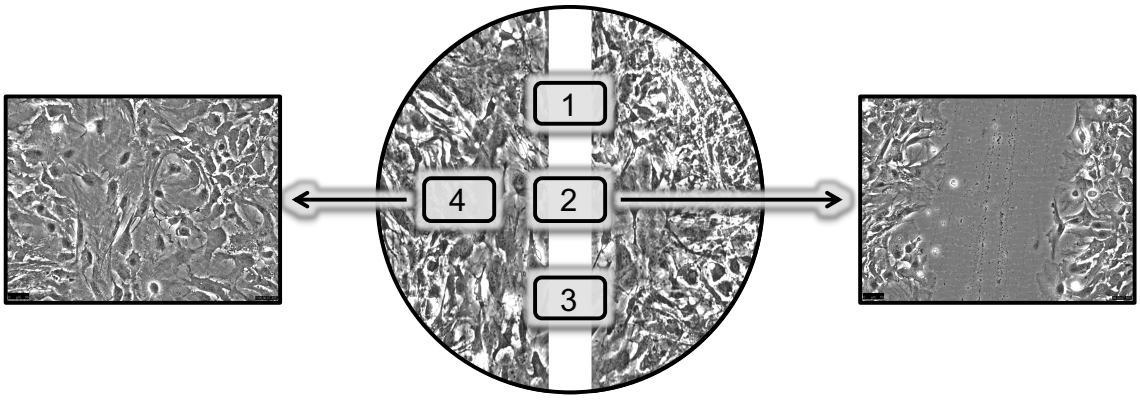


Abbildung 07: Auswahl der Positionen für die Lebendzellmikroskopie

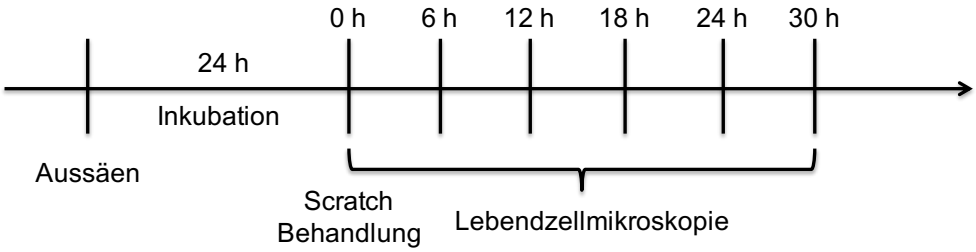


Abbildung 08: Protokoll des Scratch-Wound Assays

3.4.4 Datenerhebung und statistische Auswertung

Es wurden insgesamt 10 unabhängige Experimente durchgeführt, wobei vereinzelt Positionen wegen nicht vollständig einsehbarer Wundränder aus der Analyse ausgeschlossen werden mussten. In jeder Behandlungsgruppe konnten jedoch die Bilder aus mindestens 8 unabhängigen Experimenten ausgewertet werden. Die nicht von Zellen bedeckte Bildfläche der Aufnahmen aus dem Bereich der Risswunde wurde mit dem Matrix Laboratory (MATLAB)-Skript TScratch für die Zeitpunkte 0, 6, 12, 18, 24 und 30 Stunden bestimmt und in Prozent der gesamt-Bildfläche angegeben (Gebäck et al. 2009). Da die automatische Kantendetektion des Algorithmus bei den vorliegenden Bildern äußerst unzuverlässig arbeitete, wurde jedes Bild manuell nachbearbeitet. Durch den erheblichen Mehraufwand konnte die ursprünglich gewählte zeitliche Auflösung von 5-Minuten-Intervallen nicht beibehalten werden. Positionen an denen die Wundränder initial oder zu einem späteren Zeitpunkt nicht komplett einsehbar waren, wurden für alle Zeitpunkte aus der Analyse ausgeschlossen. Aus den so ermittelten 2-3 Werten pro Well und Zeitpunkt wurden die Mittelwerte gebildet. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5. Die fortschreitende Wundheilung wurde über die kumulative Änderung der freien Bildfläche zu den betrachteten Zeitpunkten gegenüber der Scratch-Breite zum Zeitpunkt Null im jeweiligen Well quantifiziert. Zusätzlich wurden die jeweiligen Veränderungen der

Scratch-Breiten in den 6-Stunden-Intervallen 0 h-6 h, 6 h-12 h, 12 h-18 h und 18 h-24 h als Ausdruck der Geschwindigkeit der Wundheilung zwischen den Behandlungen miteinander verglichen, um die zeitliche Dynamik der Beeinflussung zu charakterisieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller Analysis of Variance (ANOVA) und Bonferronis Post-Test. Ein p von unter 0,05 wurde als signifikant gewertet.

3.5 Messung der Stickstoffmonoxid-, Tumornekrosefaktor-α- und Interleukin-6-Sekretion

Alle Messungen wurden an primären astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und an isolierten Astrozytenkulturen durchgeführt. Die Untersuchungen wurden an Zellen aus C57BL/6-Wildtyp-Tieren und aus den korrespondierenden CB2-Knockout-Tieren durchgeführt. Pro Zellkultur und analysierter Substanz wurden mindestens vier unabhängige Experimente durchgeführt.

3.5.1 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden analog zum Vorgehen bei Passagieren durch Trypsin-EDTA Lösung aus ihrem adhärenten Wachstum gelöst und zu jeweils 50000 Zellen in 1 ml Medium in die Kompartimente einer 24-Well-Platte überführt (Kapitel 3.3.3). Dabei wurde die Anzahl der Zellen durch Zählen der Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer vor entsprechender Verdünnung gewährleistet. Nach 24 Stunden bekamen die so entstandenen Kulturen frisches Medium, welchem die jeweiligen Behandlungen laut Protokoll zugesetzt waren.

3.5.2 Behandlung der Zellen

Die Zellen wurden für 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 mit der jeweiligen Behandlung inkubiert. Anschließend wurde der Überstand des Zellkulturmediums abpipettiert und bis zur Auswertung bei -20 °C gelagert.

Die Behandlung der Zellen erfolgte in folgenden Gruppen:

Tabelle 08: Behandlung Stickstoffmonoxid- und Zytokin-Messungen

Gruppe	**Substanzen**
1	CTL + Methylacetat (0,66 µl/ml*)
2	abn-CBD (1 µM)
3	abn-CBD (10 µM)
4	LPS (10 ng/ml)
5	LPS (10 ng/ml) + abn-CBD (1 µM)
6	LPS (10 ng/ml) + abn-CBD (10 µM)

*Entsprechend 10 µM abn-CBD

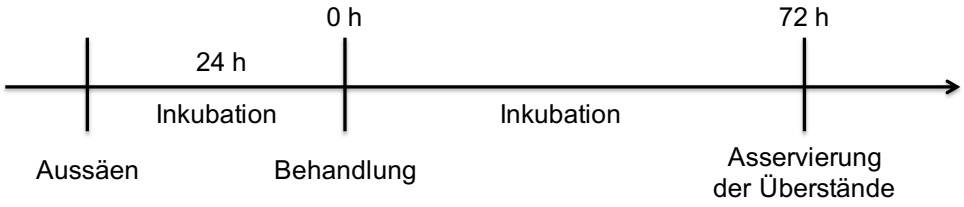


Abbildung 09: Protokoll der Stickstoffmonoxid- und Zytokin-Messungen

3.5.3 Durchführung der Stickstoffmonoxid-Messung

Da NO in wässriger Lösung eine Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden hat, bevor es weiter zu Nitrit und Nitrat reagiert, fiel die Wahl auf die Griess-Reaktion, welche Nitrit als stabiles Reaktionsprodukt nachweist (Griess 1864; Kelm 1999). Bei der Reaktion von Griess-Reagenz (0,2 % Naphtthylethylenediamin dihydrochlorid, 2 % Sulphanilamid, 5 % Phosphorsäure) mit Nitrit kommt es zum Farbumschlag der Lösung, welcher mittels photometrischer Extinktionsmessung quantifizierbar ist (Griess 1864; Green et al. 1982).

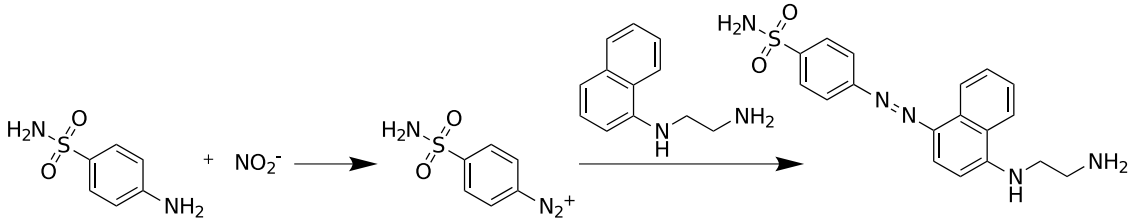


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Griess-Reaktion

Vor der Messung wurden Standardkonzentrationen als Verdünnungsreihe einer 100 µM Lösung aus Natrium-Nitrit in Zellkulturmedium mit den Konzentrationen 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM, 1,5625 µM und 0 µM angefertigt. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Proben sowie der Standardkonzentrationen in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte überführt und mit der gleichen Menge Griess-Reagenz behandelt. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmung. Nach 15 Minuten wurden die Extinktionen bei 540 nm per Microplate-Reader photometrisch quantifiziert.

3.5.4 Auswertung und statistische Analyse der Stickstoffmonoxid-Messung

Nach Bildung der Mittelwerte aus den jeweils zwei vorliegenden Messungen wurde eine Standardkurve mittels linearer Regression erstellt und die unbekannten Werte per Interpolation auf die vorliegenden Nitrit-Konzentrationen zurückgerechnet. Da bei jeder Standardkurve ein R^2 von über 0,98 erreicht wurde, bestätigte sich die lineare Regression als adäquate Grundlage der Berechnungen. Die errechneten Nitrit-

Konzentrationen wurden den jeweiligen Gruppen zugeordnet und die Gruppen mit einer einfaktoriellen ANOVA und anschließendem Bonferronis Post-Test auf Unterschiede analysiert. Für die lineare Regression, Interpolation und statistische Analyse wurde die Software GraphPad Prism 5 verwendet. Ein p von unter 0,05 wurde als signifikant gewertet.

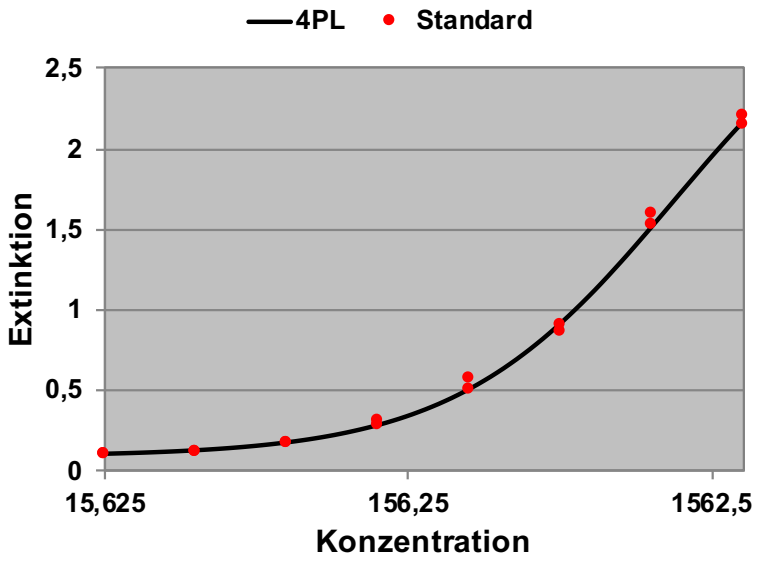
3.5.5 Durchführung der Tumornekrosefaktor-α- und Interleukin-6-Messung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die durchgeführten Messungen erfolgten durch ein sogenanntes Sandwich-ELISA. Dabei wird eine Substanz durch Antigen-Antikörper-Bindung aus einer Lösung fixiert und anschließend mit Hilfe einer enzymatischen Färbereaktion quantifiziert (Engvall und Perlmann 1971). Zunächst wurden Antikörper gegen murines IL6 bzw. murinen TNFα in PBS auf ihre Zielkonzentrationen verdünnt und die Vertiefungen einer 96-Well-Platte durch 24-stündige Inkubation mit jeweils 100 µl der Lösung beschichtet. Während der Inkubation, wie auch während aller folgenden Inkubationsschritte, wurden die Platten bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert und mit selbstklebender Folie verschlossen. Die Vertiefungen wurden dreimal mit Hilfe eines automatisierten Waschgerätes und je 400 µl Waschpuffer (0,05 % Tween in PBS) pro Wiederholung und Vertiefung gewaschen. Dieses Vorgehen wurde bei allen folgenden Waschschritten beibehalten. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation mit jeweils 300 µl einer Lösung von 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS blockiert. Sobald die Proben aufgetaut und die Standardkonzentrationen vorbereitet waren, erfolgte ein weiterer Waschschritt. Standardkonzentrationen wurden durch Anfertigung einer Verdünnungsreihe von rekombinantem murinem TNFα bzw. IL6 in Reagenz-Lösung (1 % BSA in PBS) mit den Konzentrationen 2000 pg/ml (nur TNFα), 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml und 7,8 pg/ml (nur IL6) vorbereitet. Anschließend wurden 100 µl der Proben und der Standardkonzentrationen jeweils zweimal in die Vertiefungen der Platte pipettiert und zwei Stunden inkubiert. Da sich in den Vorversuchen gezeigt hatte, dass die IL6-Konzentrationen in den Überständen oberhalb der Standardkurve und damit des Messbereiches lagen, wurden die Proben 1:10 in Medium verdünnt. Ein zweiter biotynilierter Antikörper gegen TNFα bzw. IL6 wurde auf seine jeweilige Zielkonzentration in einer Lösung von 1 % BSA in PBS verdünnt und die Platten nach abermaligem Waschen für weitere zwei Stunden mit je 100 µl dieser Lösung pro Well inkubiert. Nach Fixierung der Zielmoleküle bindet der zweite Antikörper den Komplex. Nach einem weiteren Waschschritt und einer 20-minütigen Inkubation mit jeweils 100 µl Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP) erfolgte nach erneutem Waschen

die Zugabe von 100 µl einer 1:1 Mischung aus H_2O_2 und Tetramethylbenzidin. Diese Lösung stellt das Substrat der HRP dar und wird unter Bildung eines blauen Reaktionsprodukts umgesetzt, wobei die Geschwindigkeit der Reaktion von der Menge der gebundenen HRP abhängt. Nach weiteren 20 Minuten wurde die Reaktion durch Hinzugeben von jeweils 50 µl $2NH_2SO_4$ (Stop-Lösung) gestoppt und unmittelbar die Extinktionen bei 450 nm und 540 nm photometrisch am Microplate-Reader gemessen.

3.5.6 Auswertung und statistische Analyse des Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Um optische Fehler der 96-Well-Platte zu korrigieren wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers zunächst die gemessenen Werte bei 540 nm von den Werten bei 450 nm subtrahiert. Aus den doppelten Messungen wurden Mittelwerte gebildet. Anhand der gemessenen Standardkonzentrationen wurde die bestmögliche Standardkurve mittels vierparametrischer logistischer Regression ermittelt und die unbekannten Werte interpoliert. Die Werte der IL6-Messungen wurden entsprechend der Verdünnung von 1:10 mit 10 multipliziert. Die Regression der Standardkurven und Interpolation der unbekannten Werte erfolgte mit einem MATLAB-Skript, die statistische Analyse erfolgte, wie bei den NO-Messungen mittels GraphPad Prism 5 und einer einfaktoriellen ANOVA mit Bonferronis Post-Test. Ein p von unter 0,05 wurde als signifikant gewertet.



$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

a	0,08514
b	1,212
c	1170
d	3,277
R^2	0,9981

Abbildung 11: Modell der vierparametrischen logistischen Regression und exemplarische Standardkurve, dabei ist:
a: Minimalwert
d: Maximalwert
c: Umschlagpunkt
b: Anstieg

4 Ergebnisse

4.1 Einflüsse von abnormal Cannabidiol auf den astrozytären Wundschluss

Bei der Betrachtung der ermittelten Werte der Kontrollen von isolierter Astrozytenkultur und astrozytär-mikrogliären Mischkultur zeigte sich ein über den Beobachtungszeitraum nahezu identisch ablaufender Wundschluss (Abbildung 12). Dementsprechend unterschieden sich die Veränderungen der freien Bildfläche gegenüber der initialen Wundfläche zu keinem Zeitpunkt zwischen den Vehikel-behandelten Kontrollen. Die Anwesenheit von Mikrogliazellen in der Kultur hatte folglich keinen Einfluss auf den astrozytären Wundschluss. Die Veränderung der freien Bildfläche gegenüber der initialen Wundfläche wurde jedoch in den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen durch 10 µM abn-CBD nach 6, 12 und 24 Stunden signifikant reduziert (Abbildung 13). Bei den mit 1 µM abn-CBD behandelten Mischkulturen war dieser Effekt nicht nachweisbar. In den isolierten Astrozytenkulturen wurde keine signifikante Beeinflussung durch die Behandlung mit abn-CBD erzielt (Abbildung 14). Abn-CBD verlangsamte in einer Dosis von 10 µM folglich die astrozytäre Wundheilung im vorliegenden Modell, vorausgesetzt, dass Mikrogliazellen in der Kultur anwesend waren.

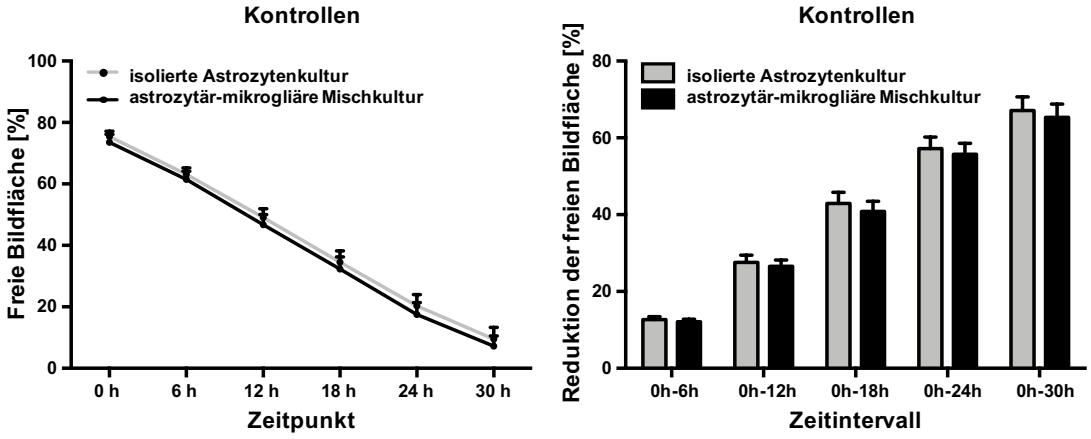


Abbildung 12: Effekte der Mikroglia-Depletion auf den Wundschluss
Offene Bildfläche über die Zeit (links) und Reduktion gegenüber Zeitpunkt 0 (rechts) der Kontrollen von isolierten Astrozyten und astrozytär-mikrogliärer Mischkultur (Mittelwerte mit Standardfehler (SEM), N=8): Die Depletion von Mikroglia hat keinen Einfluss auf die Wundheilung.

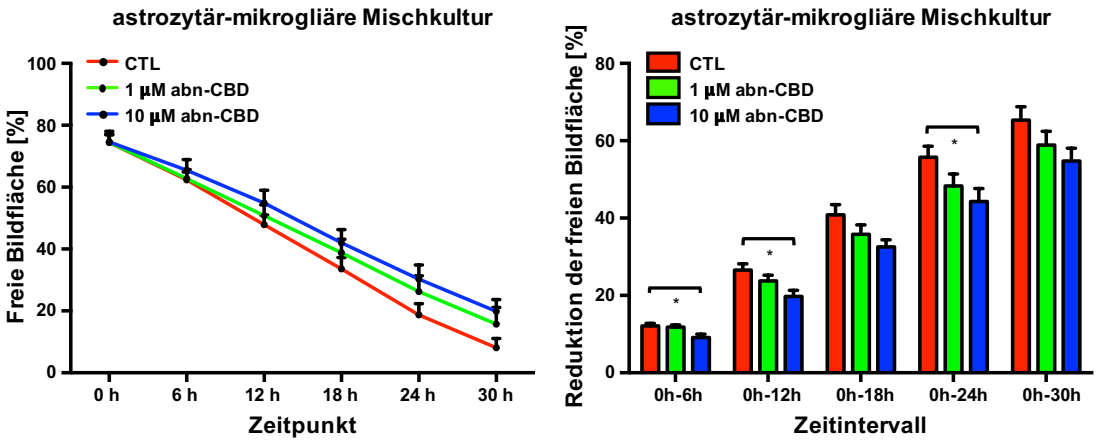


Abbildung 13: Einfluss von abnormal Cannabidiol auf den Wundschluss in den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen
Offene Bildfläche über die Zeit (links) und Reduktion gegenüber Zeitpunkt 0 (rechts) der astrozytär-mikrogliären Mischkulturen (Mittelwerte mit SEM, N=8): Der Schluss der Wunde wird durch 10 µM abn-CBD signifikant verlangsamt.

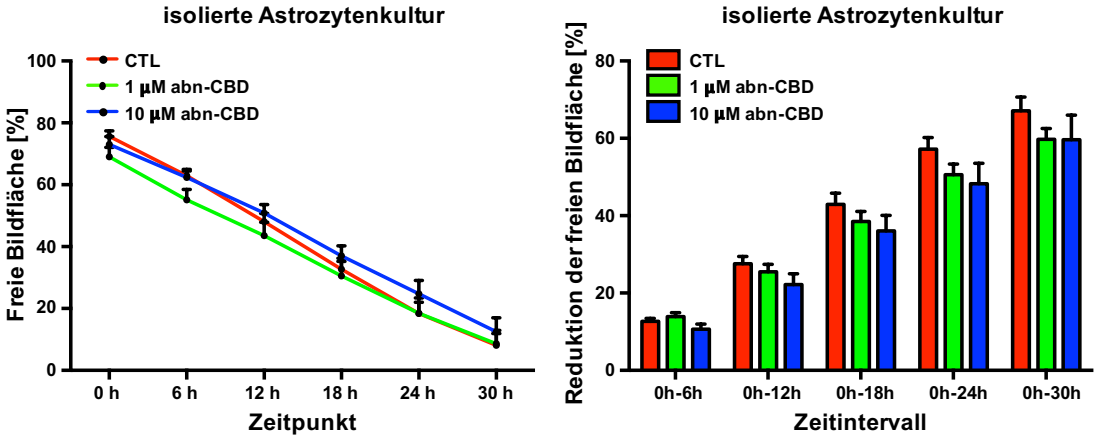


Abbildung 14: Einfluss von abnormal Cannabidiol auf den Wundschluss in den isolierten Astrozytenkulturen
Offene Bildfläche über die Zeit (links) und Reduktion gegenüber Zeitpunkt 0 (rechts) der isolierten Astrozytenkulturen (Mittelwerte mit SEM, N=8): Der Schluss der Wunde wird durch abn-CBD nicht signifikant beeinflusst.

Um die zeitliche Dynamik der beobachteten Verzögerung der Wundheilung näher zu charakterisieren, erfolgte eine Analyse der Veränderung der freien Bildfläche in jedem der beobachteten 6-Stunden-Intervalle als Ausdruck der Geschwindigkeit des Wundschlusses. In den mit 10 µM abn-CBD behandelten astrozytär-mikrogliären Mischkulturen zeigte sich in den ersten beiden 6-Stunden-Intervallen eine signifikante Reduktion des Wundschlusses (Abbildung 15). In den darauffolgenden Intervallen war kein Unterschied feststellbar. 1 µM abn-CBD konnte diesen Effekt nicht auslösen. Die detektierte Verzögerung der Wundheilung durch 10 µM abn-CBD in astrozytär-mikrogliären Mischkulturen resultiert folglich aus einem Effekt innerhalb der ersten zwölf Stunden nach Schädigung. Analog zu den absoluten Werten und der Reduktion

der offenen Bildfläche zeigten sich bei den isolierten Astrozytenkulturen keine signifikante Beeinflussung der Wundheilung durch abn-CBD.

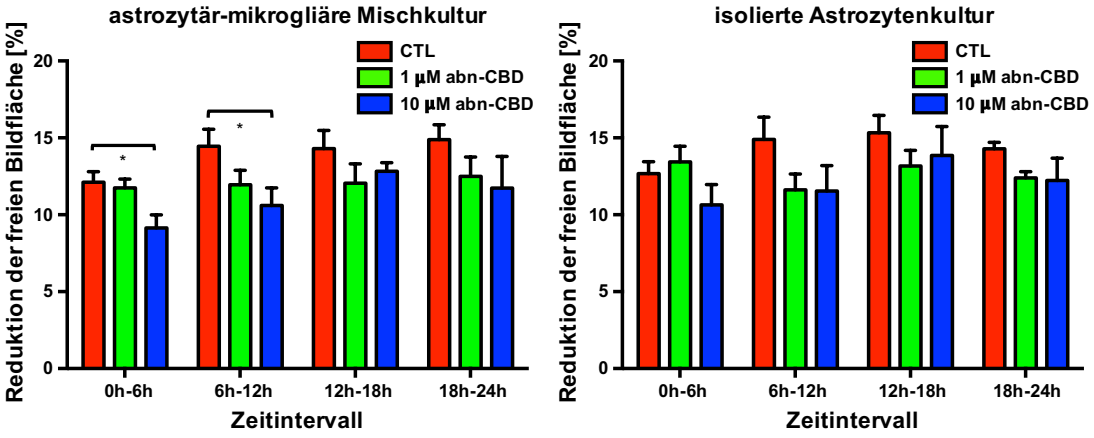


Abbildung 15: Zeitliche Dynamik der Wundheilung
Änderung der offenen Bildfläche in 6-Stunden-Intervallen in astrozytär-mikrogliären Mischkulturen (links) und isolierten Astrozytenkulturen (Mittelwerte mit SEM, N=8): Die Verzögerung der Wundheilung durch abn-CBD in den Mischkulturen wird in den ersten beiden Intervallen verursacht. Keine signifikanten Veränderungen in den isolierten Astrozytenkulturen.

4.2 Einfluss von abnormal Cannabidiol auf die LPS-induzierte Produktion von Stickstoffmonoxid in astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen

In den Kontrollen aller untersuchten Kulturen waren allenfalls äußerst niedrige bis nicht messbare Konzentrationen von Nitrit nachweisbar. Die Behandlung mit abn-CBD allein führte in beiden Konzentrationen zu keiner signifikanten Beeinflussung der basalen NO-Produktion. Die Stimulation mit LPS führte in den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen aus Wildtyp-Tieren zu einer signifikant vermehrten Sekretion von NO. Die isolierten Wildtyp-Astrozytenkulturen ließen sich deutlich schwächer, jedoch ebenfalls signifikant stimulieren (Abbildung 16). In den LPS-stimulierten Wildtyp-Mischkulturen führte die Behandlung mit abn-CBD zu einer dosisabhängigen Reduktion der NO-Produktion. Bei Betrachtung der isolierten Astrozytenkulturen aus Wildtyp-Tieren konnte keine signifikante Reduktion der LPS-induzierten NO-Produktion durch abn-CBD ausgelöst werden (Abbildung 16). Dabei ist allerdings anzumerken, dass die Stimulation dieser Zellen nur zu einer äußerst geringen Nitrit-Menge am unteren Rand des Messbereiches geführt hatte. Die Kulturen aus Tieren mit CB2-Knockout zeigten eine gegenüber dem Wildtyp deutlich abgeschwächte Reaktion auf LPS. Bei den isolierten Astrozyten aus Tieren mit CB2-Knockout gelang keine signifikante Stimulation durch LPS (Abbildung 17). In den CB2-Knockout astrozytär-

mikrogliären Mischkulturen reduzierte abn-CBD die LPS-stimulierte NO-Produktion dosisabhängig.

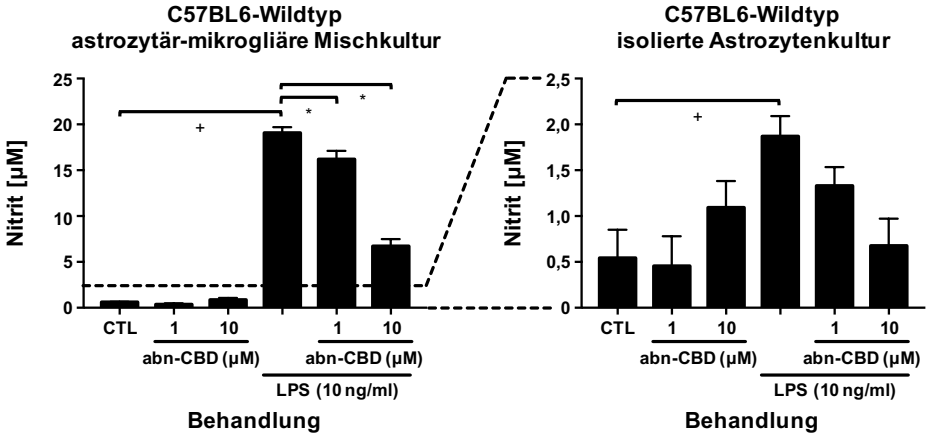


Abbildung 16: Effekte von abn-CBD auf die NO-Produktion in Wildtyp-Kulturen
Nitrit im Überstand der Wildtyp astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen (Mittelwerte mit SEM, N=12): Durch LPS erfolgte eine statistisch signifikante Stimulation (+) der NO-Produktion in beiden Kulturen. Die LPS-induzierte NO-Produktion fiel in den isolierten Astrozytenkulturen geringer aus. Abn-CBD reduzierte die LPS-induzierte NO-Produktion in den Mischkulturen (*). Man beachte die differierende Graduierung der Y-Achsen.

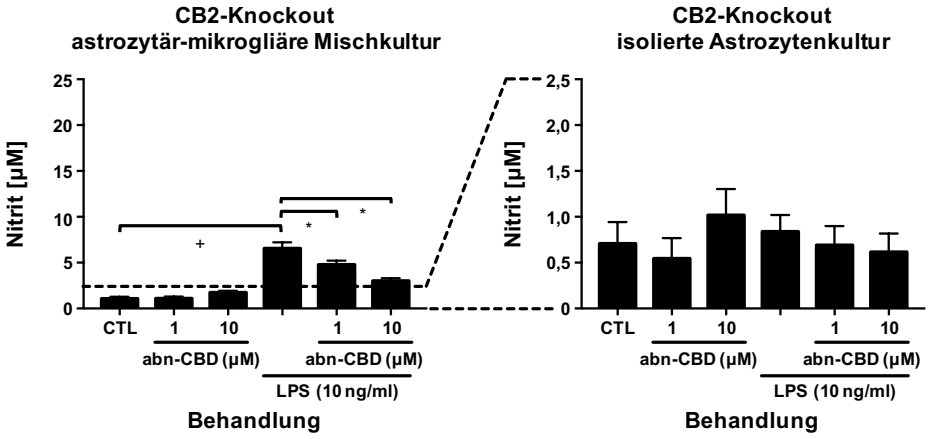


Abbildung 17: Effekte von abn-CBD auf die NO-Produktion in CB2-Knockout-Kulturen
Nitrit im Überstand der CB2-Knockout astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen (Mittelwerte mit SEM, N=12): Durch LPS konnten nur die Mischkulturen stimuliert werden (+). Abn-CBD reduzierte die LPS-induzierte NO-Produktion in den Mischkulturen (*). Gegenüber den Wildtyp-Zellen fiel die LPS-induzierte NO-Produktion in den Mischkulturen schwächer aus. Man beachte die differierende Graduierung der Y-Achsen.

4.3 Einfluss von abnormal Cannabidiol auf die LPS-induzierte Produktion von Tumornekrosefaktor-α in astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen

In den Kontrollen aller untersuchten Kulturen waren allenfalls äußerst niedrige bis nicht messbare Konzentrationen von TNFα nachweisbar. Die Behandlung mit abn-CBD allein führte in beiden Konzentrationen zu keiner signifikanten Beeinflussung der basalen TNFα-Produktion. Die Stimulation mit LPS führte in den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen aus Wildtyp-Tieren zu einer signifikant vermehrten Sekretion von TNFα. Die isolierten Wildtyp-Astrozytenkulturen ließen sich deutlich schwächer, jedoch signifikant stimulieren (Abbildung 18). In den LPS-stimulierten Wildtyp-Mischkulturen führte die Behandlung mit abn-CBD zu einer dosisabhängigen Reduktion der TNFα-Produktion. In den isolierten Astrozytenkulturen aus Wildtyp-Tieren bewirkte abn-CBD nur in der Dosis von 10 µM eine signifikante Reduktion der LPS-induzierten TNFα-Produktion (Abbildung 18). Auch hier zeigten die Kulturen aus Tieren mit CB2-Knockout eine gegenüber dem Wildtyp deutlich abgeschwächte Reaktion auf LPS (Abbildung 19). In den CB2-Knockout astrozytär-mikrogliären Mischkulturen reduzierte abn-CBD die LPS-stimulierte TNFα-Produktion dosisabhängig. Bei den isolierten Astrozytenkulturen aus Tieren mit CB2-Knockout wurde die LPS-induzierte TNFα-Produktion nicht durch abn-CBD beeinflusst, wobei anzumerken ist, dass hier alle Werte am unteren Rand der Standardkurve und damit des Messbereiches lagen. Insgesamt zeigte sich ein zu den NO-Messungen weitgehend analoges Bild.

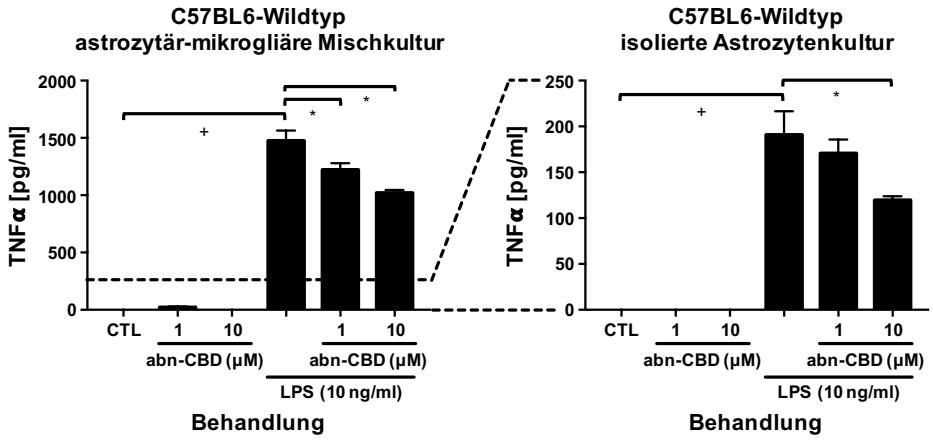


Abbildung 18: Effekte von abn-CBD auf die TNFα-Produktion in Wildtyp-Kulturen
TNFα im Überstand der Wildtyp astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen (Mittelwerte mit SEM, N=8): Durch LPS erfolgte eine statistisch signifikante Stimulation (+) der TNFα-Produktion in beiden Kulturen. Die LPS-induzierte TNFα-Produktion fiel in den isolierten Astrozytenkulturen geringer aus. Abn-CBD reduzierte die LPS-induzierte TNFα-Sekretion in den Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen (*). Man beachte die differierende Graduierung der Y-Achsen.

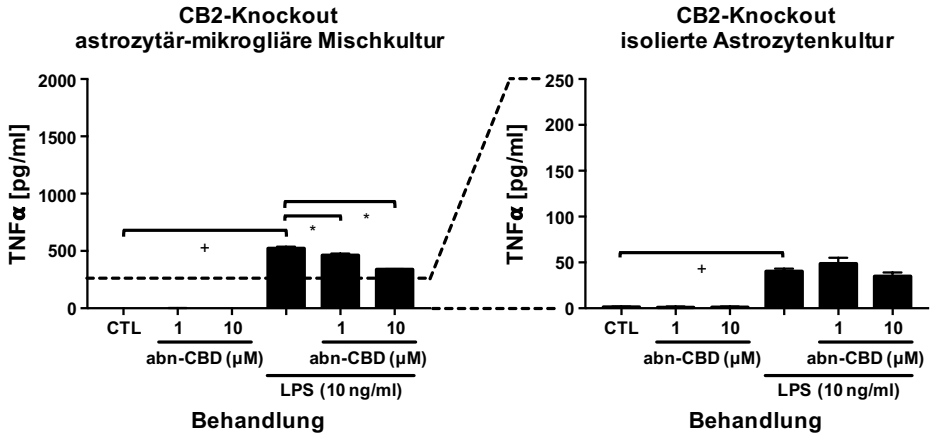


Abbildung 19: Effekte von abn-CBD auf die TNFα-Produktion in CB2-Knockout-Kulturen
TNFα im Überstand der CB2-Knockout astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen (Mittelwerte mit SEM, N=8); Durch LPS erfolgte eine statistisch signifikante Stimulation (+) der TNFα-Produktion in beiden Kulturen. Die LPS-induzierte TNFα-Produktion fiel in den isolierten Astrozytenkulturen geringer aus. Abn-CBD reduzierte die LPS-induzierte TNFα-Sekretion in den Mischkulturen (*). Gegenüber den Wildtyp-Zellen fiel die LPS-induzierte TNFα-Produktion in beiden Kulturen schwächer aus. Man beachte die differierende Graduierung der Y-Achsen.

4.4 Einfluss von abnormal Cannabidiol auf die LPS-induzierte Interleukin-6-Produktion in astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen

In den Kontrollen aller untersuchten Kulturen waren allenfalls äußerst niedrige bis nicht messbare Konzentrationen von IL6 nachweisbar. Die Behandlung mit abn-CBD allein führte in beiden Konzentrationen zu keiner signifikanten Beeinflussung der basalen IL6-Produktion. Die Stimulation mit LPS führte in den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen aus Wildtyp-Tieren zu einer signifikant vermehrten Sekretion von IL6. Die isolierten Wildtyp-Astrozytenkulturen ließen sich deutlich schwächer, jedoch ebenfalls signifikant stimulieren (Abbildung 20). Der Unterschied zwischen Wildtyp-Mischkultur und isolierter Astrozytenkultur fiel jedoch geringer aus als bei den NO- und TNFα-Messungen. So unterschieden sich die IL6-Werten der astrozytär-mikrogliären Mischkulturen gegenüber den isolierten Astrozytenkulturen etwa um den Faktor 2, im Gegensatz zu Faktor 10 bei den TNFα- und NO-Werten. In beiden LPS-stimulierten Wildtyp-Kulturen beeinflusste die Behandlung mit abn-CBD die IL6-Produktion nicht. Die Kulturen aus Tieren mit CB2-Knockout zeigten gegenüber dem Wildtyp keine veränderte Reaktion auf LPS. Auch in den beiden CB2-Knockout-Kulturen beeinflusste abn-CBD die LPS-stimulierte IL6-Produktion nicht (Abbildung 21). Insgesamt zeigte die Messung der IL6-Sekretion also ein teilweise zu den TNFα- und NO-Messungen konträres Bild.

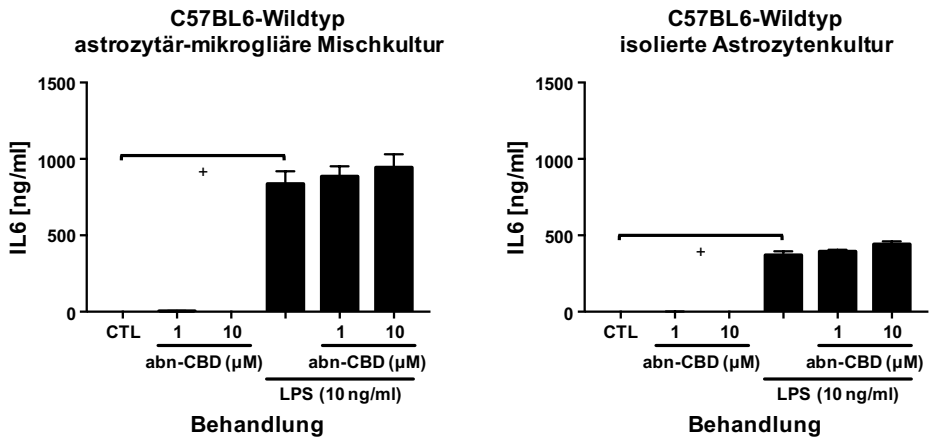


Abbildung 20: Effekte von abn-CBD auf die IL6-Produktion Wildtyp-Kulturen
IL6 im Überstand der Wildtyp astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen (Mittelwerte mit SEM, N=12 bzw. 4); Durch LPS erfolgte eine statistisch signifikante Stimulation (+) der IL6-Produktion in beiden Kulturen. Die LPS-induzierte IL6-Produktion fiel in den isolierten Astrozytenkulturen geringer aus. Abn-CBD beeinflusste die LPS-induzierte IL6-Produktion nicht.

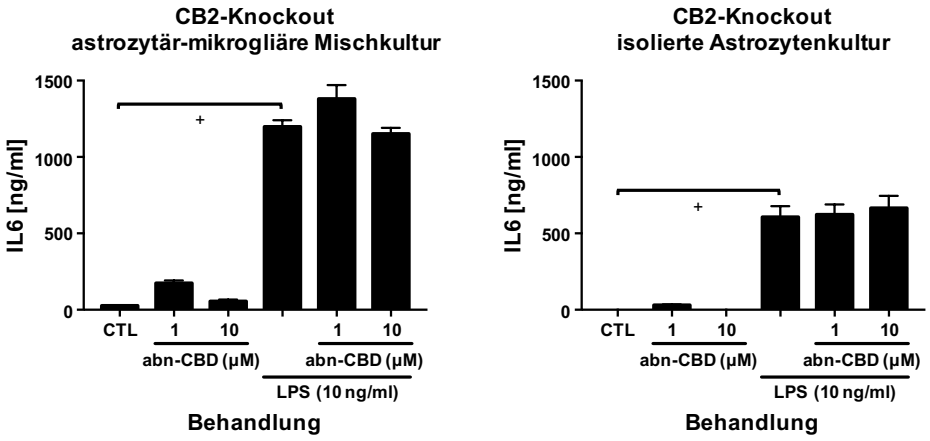


Abbildung 21: Effekte von abn-CBD auf die IL6-Produktion in CB2-Knockout-Kulturen IL6 im Überstand der CB2-Knockout astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen (Mittelwerte mit SEM, N=4); Durch LPS erfolgte eine statistisch signifikante Stimulation (+) der IL6-Produktion in beiden Kulturen. Die LPS-induzierte IL6-Produktion fiel in den isolierten Astrozytenkulturen geringer aus. Abn-CBD beeinflusste die LPS-induzierte IL6-Produktion nicht. Gegenüber den Wildtyp-Zellen fiel die LPS-induzierte IL6-Produktion in beiden Kulturen unverändert aus.

5 Diskussion

Nach einer akuten Hirnschädigung kommt es nach dem initialen irreversiblen Ereignis zu neuroinflammatorisch geprägten Kaskaden, welche den neuronalen Schaden im Rahmen der so genannten Sekundärschädigung ausweiten können. Diese Sekundärschädigung sowie die Reorganisation zentralnervösen Gewebes nach einer Läsion werden maßgeblich durch gliale Prozesse determiniert. Endo- und exogene Cannabinoide wurden in der Vergangenheit mit neuroprotektiven Effekten auf Ebene der Sekundärschädigung in Verbindung gebracht. Des Weiteren ist das ECBS an der intrinsischen Regulation der lokalen Reaktion auf eine neuronale Läsion beteiligt. Neben direkten neuronalen Einflüssen entfalten Cannabinoide ihr neuroprotektives Potential insbesondere über Interaktion mit den residenten Astrozyten und Mikrogliazellen. So waren die neuroprotektiven Effekte diverser Cannabinoide in Modellschädigungen abhängig von der Anwesenheit von Mikrogliazellen. Eine Behandlung mit abn-CBD führte in *in vivo* Modellen der akuten Hirnschädigung ohne Beeinflussung der klassischen Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 zu verringerten Läsionsgrößen und einem verbesserten neurologischen Outcome behandelter Tiere. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zelluläre und molekulare Mechanismen abn-CBD-vermittelter Neuroprotektion beleuchtet werden.

5.1 Allgemeine Stärken und Limitationen der gewählten *in vitro* Modelle

Die vorliegenden *in vitro* Modelle bilden Teilaspekte der Reaktion bestimmter Gliazell-Subpopulationen auf einen definierten Reiz bzw. eine Behandlung ab. Insbesondere die Beteiligung nicht ZNS-ortsansässiger Immunzellen ist in den vorliegenden Modellen ausgeschlossen. Auch hämodynamische bzw. die zerebrale Perfusion beeinflussende Effekte der bekanntermaßen vasoaktiven Substanz abn-CBD, welche in der Vergangenheit als Erklärungsansatz für dessen neuroprotektives Potential vorgeschlagen wurden, werden in den vorliegenden Modellen ausgeblendet (Mishima et al. 2005; Ulrich 2012). Allgemein kann dies dazu führen, dass sich die gemessenen Effekte *in vivo* als nicht reproduzierbar oder relevant herausstellen. Im Gegenzug ermöglichen solche Zellkulturmodelle auf Grund ihrer Reduktion die Beurteilung einzelner zellspezifischer Mechanismen, welche die Bausteine der komplexen Prozesse der Sekundärschädigung darstellen. Im Modell der OHSC wurde eine direkte neuroprotektive Wirkung von abn-CBD auf die ortsansässigen Zellen gezeigt, wobei bezüglich der zellulären bzw. molekularen Mechanismen weitgehend Unklarheit herrscht (Kreutz et al. 2009). Die Wahl der Modelle erfolgte dementsprechend mit dem Ziel, die beteiligten Zelltypen zu identifizieren und dem Verdacht der Beeinflussung mikrogliärer Aktivität weiter nachzugehen.

Das Ausmaß der Sekundärschädigung wird maßgeblich durch die Astrogliose und die Neuroinflammation determiniert, sodass die Wahl auf ein Modell der astrozytären Wundheilung und ein Modell astrozytär-mikrogliärer Inflammation fiel. Das Scratch-Wound Assay kann in diesem Zusammenhang als stark reduziertes Modell der reaktiven Astrogliose bzw. der astrozytären Narbenbildung gesehen werden. So wird die Reaktion der Astrozyten auf eine mechanische Läsion des Monolayers abgebildet, wobei der Wundschluss durch Polarisierung, Hypertrophie, Migration und Proliferation erfolgt (Ebrahimi et al. 2012; Shinozaki et al. 2017). Diese Mechanismen treten auch *in vivo* im Kontext der reaktiven Astrogliose auf (Sofroniew 2009; Pekny und Pekna 2014). Durch Einsatz der astrozytär-mikrogliären Mischkulturen wird die auch *in vivo* hochrelevante interzelluläre Kommunikation der beiden Zelltypen ermöglicht. Mikrogliazellen werden im Kontext der neuronalen Läsion sowohl mit inflammatorisch-destruktiven als auch mit reparativ-protektiven Mechanismen in Verbindung gebracht (Kapitel 1.4.3). Beide Zelltypen sind in der Lage, proinflammatorische Zytokine zu bilden, wobei die Mikrogliazellen bezüglich der Menge einen größeren Einfluss auf das Zytokin-Mikromilieu entfalten zu scheinen als Astrozyten (Sawada et al. 1989; Solà et al. 2002). Zwar spielt die Substanz LPS selbst nach der akuten Hirnschädigung durch ein SHT oder einen Apoplex keine direkte Rolle, es gibt jedoch Evidenz dafür, dass die Aktivierung und proinflammatorische Reaktion der Gliazellen im Rahmen der Sekundärschädigung ebenfalls anteilig über TLR vermittelt wird und somit insgesamt große Parallelen zu der Reaktion auf LPS aufweist (Thomas et al. 2006). So aktiviert im Rahmen der zentralnervösen Läsion das von sterbenden Neuronen freigesetzte HMGB1 oder HSP60 analog zu LPS den auf Mikrogliazellen befindlichen TLR4 (Yang et al. 2010; Rosenberger et al. 2015). Die Modellschädigung bietet den Vorteil, dass ihr Ausmaß durch die Dosis gut definierbar und die zugrundeliegenden Mechanismen gut untersucht sind.

Auf die Verwendung isolierter primärer Mikroglia wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zugunsten der astrozytär-mikrogliären Mischkultur verzichtet. Der Vorteil dieses Konzeptes ist, dass die Zell-Zell Interaktion der beiden Zelltypen, welche die inflammatorischen Prozesse maßgeblich prägen, mit abgebildet wird. Außerdem zeigen Zellkulturexperimente, dass die Mikrogliazellen durch fehlenden Kontakt zu Astrozyten einer Aktivierung unterlaufen, die nach wenigen Tagen zum Untergang der Zellen führt. Dieser Mechanismus kann nur partiell durch die Verwendung von Astrozyten-konditioniertem Medium begrenzt werden (Wilms et al. 1997; Hailer et al. 2001; Schilling et al. 2001).

Zur Isolierung der astrozytären Kulturen wurde Clodronat verwendet. Das Bisphosphonat wird klinisch in der Behandlung von ossären Metastasen und der Osteoporose eingesetzt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Clodronat selektiv monozytäre Phagozyten eliminiert. Am Modell der astrozytär-mikrogliären Mischkultur ist belegt, dass die repetitive Behandlung mit einer Dosis von 10 ng/ml zur vollständigen Elimination der Mikroglia führt, ohne die Aktivität oder Proliferation von Astrozyten zu beeinflussen (Kohl et al. 2003; Kumamaru et al. 2012). Die Methode ist somit deutlich effektiver als das alternativ praktizierte Abschütteln der Zellen. Der genaue Mechanismus der Phagozyten-spezifischen Apoptoseinduktion ist nicht bekannt. Daten aus RAW 264 Makrophagen suggerieren jedoch, dass es nach der Aufnahme zur Phagozyten-spezifischen Akkumulation des toxischen Metaboliten Adenosin 5′-(β,γ-dichloromethylen) triphosphat (AppCCl2p) im Sinne eines Prodrug-Mechanimus kommt (Mönkkönen et al. 2001; Frith et al. 2001).

In der Vergangenheit wurde der CB2-Rezeptor vielfach mit der Modulation inflammatorischer Prozesse und mikrogliärer Aktivität im ZNS in Verbindung gebracht. Die Substanz abn-CBD wurde in der Literatur umfassend pharmakologisch charakterisiert, wobei es keine Hinweise auf eine direkte Affektion der klassischen Cannabinoidrezeptoren gibt. Es gibt jedoch Evidenz für die Hypothese, dass der als abn-CBD-sensitiver Rezeptor diskutierte GPR18 Heterorezeptor-Komplexe mit CB2-Rezeptoren auf Mikrogliazellen bildet und so indirekt die CB2-abhängige Signaltransduktion beeinflussen kann (Reyes-Resina et al. 2018). Um einen potentiellen direkten oder indirekten Einfluss des CB2-Rezeptors zu erfassen bzw. auszuschließen, wurden die Zytokin-Messungen auch an Kulturen aus CB2-defizitären Tieren durchgeführt. Der CB2-Knockout besteht bei den hier verwendeten Tieren in der Elimination der dritten intrazellulären Schleife, der transmembranären Domänen sechs und sieben, sowie des Carboxy-Terminus des Rezeptors. Dies führt dazu, dass pharmakologisch als spezifische CB2-Agonisten charakterisierte Substanzen den Rezeptor nicht mehr binden und aktivieren können (Buckley et al. 2000; Buckley 2008). Bei der Verwendung von Knockout-Organismen gilt als allgemeine Limitation, dass beobachtete Veränderungen immer sowohl durch den Gendefekt direkt, als auch indirekt durch prä- und postnatale Adaptationsvorgänge an diesen bestimmt werden (El-Brolosy und Stainier 2017).

Es gibt Hinweise, dass die astrozytäre Reaktion auf eine Stimulation mit LPS auch geschlechtsspezifisch und Testosteron-abhängig differiert (Arnold et al. 2008; Santos-Galindo et al. 2011). Ein potentieller Einfluss des Geschlechtes der Neonaten wurde

bei den Experimenten dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Allerdings scheint eine Beeinflussung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der zufälligen Verteilung von je vier Gehirnen pro Kultur und die direkt postpartale Dekapitation im Rahmen der Präparationen eher unwahrscheinlich.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der gewählten Modelle eine zelltypspezifische Wirkung von abn-CBD auf Mikrogliazellen bestätigt werden, wobei sich auch Hinweise auf eine direkte Wirkung auf isolierte Astrozyten ergaben.

5.2 Einflüsse von abnormal Cannabidiol auf die astrozytäre Wundheilung

Das Scratch-Wound Assay wurde als *in vitro* Modell der reaktiven Astrogliose und astrozytären Narbenbildung gewählt. Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit eines Scratch-Wound Assays ist insbesondere die Konfluenz und eine vergleichbare Zelldichte der untersuchten Kulturen (Jin et al. 2016). Dies wurde durch Zählen der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer und entsprechender Verdünnung beim Aussäen in die 6-Well-Platten sichergestellt. Nach 24 Stunden zeigten die Zellen ein konfluentes und adhärentes Wachstum in den jeweiligen Kompartimenten der Platte. Die Läsion besteht im vorliegenden Modell in der Disruption von Zell-Zell-Kontakten sowie der Verletzung von Zellen im Bereich der Wunde. Konsekutive Signale erreichen periphere Zellen aufgrund der synzytiumartigen Vernetzung der Astrozyten mittels Gap-Junctions und der parakrinen Sekretion von Zytokinen (Sawada et al. 1989, 1992; Lin et al. 1998; Sofroniew 2009). Nach der Verletzung unterlaufen die Riss-nahen Astrozyten analog zur Aktivierung *in vivo* charakteristische Veränderungen im Sinne einer Polarisierung, Hypertrophie, GFAP-Hochregulation, Migration und Proliferation (Ebrahimi et al. 2012; Shinozaki et al. 2017). Im Rahmen der Auswertung der aktuellen Untersuchungen wurde die Rissbreite als nicht von Zellen bedeckte Bildfläche in Prozent erhoben. Die Werte zum Zeitpunkt 0 unterlagen keinen signifikanten Schwankungen, sodass die Reproduzierbarkeit der Verletzung mittels steriler Pipettenspitze als gegeben angesehen werden kann.

Bezüglich des Vergleichs der Wundheilung von isolierten Astrozytenkulturen und astrozytär-mikrogliären Mischkulturen zeigten sich keine Veränderungen zu den untersuchten Zeitpunkten. Im vorliegenden Modell scheint der Wundschluss der Astrozyten also nicht a priori durch die Anwesenheit der Mikrogliazellen in den Kulturen beeinflusst zu werden. Bei der Betrachtung der absoluten kumulativen Änderung der offenen Bildfläche gegenüber dem Zeitpunkt 0 zeigte sich in den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen nach der Behandlung mit 10 µM abn-CBD signifikante

Veränderungen nach 6, 12 und 24 Stunden im Sinne eines verzögerten Wundschlusses. 1 µM abn-CBD konnte diesen Effekt nicht auslösen, es zeigten sich jedoch parallele Tendenzen. In den isolierten Astrozytenkulturen war kein signifikanter Effekt durch abn-CBD detektierbar, wobei sich tendenziell ein kongruentes Muster zeigte.

Abn-CBD scheint also über die Beeinflussung mikrogliärer Aktivität sekundär die Reaktion der Astrozyten zu beeinflussen, ohne dass die Anwesenheit der Mikroglia per se den Wundschluss beeinflusst. In diesem Zusammenhang kann eine Veränderung der mikrogliären Zytokinproduktion durch abn-CBD ein Erklärungsansatz sein. Diese Hypothese wird durch Experimente gestützt, in denen das Auswachsen astrozytärer Fortsätze im Scratch-Wound Assay durch blockierende Antikörper gegen TNFα und IL6 gehemmt wurde (Shinozaki et al. 2017). Auch *in vivo* unterliegt die reaktive Astrozytose der mikrogliären Kontrolle (Liddelow et al. 2017). Die Mikroglia-Abhängigkeit des Effektes macht deutlich, dass die *in vivo* hochrelevante mikrogliäre Modulation der reaktiven Astrogliose auch *in vitro* abgebildet werden kann. Klassischerweise wurden astrozytäre Scratch-Wound Assays überwiegend an isolierten Astrozytenkulturen durchgeführt, sodass potentielle Effekte möglicherweise übersehen wurden.

Die Quantifizierung von Scratch-Wound Assays erfolgt häufig per mikroskopischer Messung zu einem definierten Zeitpunkt (Etienne-Manneville und Hall 2001; Etienne-Manneville 2006; Ebrahimi et al. 2012; Wang et al. 2017). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Protokoll unter Nutzung der Möglichkeiten der Lebendzellmikroskopie erarbeitet. Dies ermöglicht eine hohe zeitliche Auflösung der zugrundeliegenden Dynamiken, wobei diese zum Zeitpunkt der Durchführung durch die Notwendigkeit der manuellen Datenerhebung wieder erheblich eingeschränkt wurde. Insgesamt verdeutlichen die vorliegenden Daten die Vorzüge des hier erarbeiteten Protokolls unter Nutzung der Lebendzellmikroskopie gegenüber dem klassischen Vorgehen. So wäre der Effekt nach 18 oder 30 Stunden übersehen worden und eine zeitliche Einordnung der zugrunde liegenden Dynamiken nicht möglich gewesen.

Die Datenlage zur Cannabinoid-bedingten Beeinflussung der astrozytären Narbenbildung ist bislang fragmentarisch und eine direkte Beeinflussung des astrozytären Wundschlusses durch abn-CBD wurde noch nicht untersucht. Allerdings wurde im *in vivo* Modell der traumatischen Hirnschädigung der Ratte

immunhistochemisch keine wesentliche Alteration der astrozytären Narbenbildung durch abn-CBD ausgelöst (Ulrich 2012). Hier wurde jedoch lediglich die GFAP-Immunreaktivität der Schnitte zugrunde gelegt. Möglicherweise beeinflusst abn-CBD also die Migration oder Proliferation der Astrozyten ohne die Schädigungs-induzierte GFAP-Hochregulation zu beeinflussen. Abgesehen von Unterschieden in Modell und Spezies könnten die differierenden beobachteten Zeiträume einen alternativen Erklärungsansatz liefern. So wurde die abn-CBD-bedingte Verlangsamung des Wundschlusses in den Experimenten dieser Arbeit bereits innerhalb der ersten beiden 6-Stunden-Intervalle verursacht, während die ersten Tiere im in vivo Modell erst nach 24 Stunden evaluiert wurden.

Eine allgemeine Einordnung des Effektes in ein neuroprotektives bzw. neurodestruktives Geschehen erlauben die vorliegenden Daten nicht. Verzögerungen der astrozytären Narbenbildung könnten im Organismus in Abhängigkeit von Zeit und Ort sowohl mit einer verbesserten Reorganisation neuronaler Netzwerke als auch mit zunehmender Alteration der Blut-Hirn-Schranke und sekundärer Ausweitung der Läsion einhergehen (Kapitel 1.5.2). Dennoch liefern die Befunde eine potentielle Erklärung für die reduzierte Läsionsgröße im *in vivo* Modell.

5.3 Stimulation der glialen Zytokinproduktion durch Lipopolysaccharide

Sowohl Astrozyten als auch Mikrogliazellen exprimieren TLR4 und können durch LPS in einen aktivierten Zustand überführt werden (Bsibsi et al. 2002). Die Aktivierung von TLR4 durch LPS ist inklusive der intrazellulären Kaskaden gut charakterisiert und weist Parallelen zur glialen Aktivierung im Rahmen der Sekundärschädigung auf, welche ebenfalls anteilig TLR4-vermittelt stattfindet (Olson und Miller 2004; Yang et al. 2010; Rosenberger et al. 2015).

Durch die Expression von iNOS können Mikrogliazellen im Rahmen ihrer Aktivierung große Mengen von NO bilden (Zielasek et al. 1992; Fiebich et al. 1998). Auch in den Experimenten dieser Arbeit konnte in den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen eine signifikante Stimulation der NO-Produktion durch die Behandlung mit LPS ausgelöst werden. Ob Astrozyten in der Lage sind iNOS zu exprimieren, wird kontrovers diskutiert (Saura 2007). Zellkulturexperimente und immunzytochemische Färbungen suggerieren, dass Astrozyten selbst nicht durch die Induktion von iNOS nach einer Stimulation mit LPS NO produzieren, jedoch die mikrogliäre NO-Produktion durch Zell-Zell-Interaktion amplifizieren können (Solà et al. 2002). In den isolierten Wildtyp-Astrozytenkulturen konnte LPS eine geringe, jedoch statistisch signifikante Stimulation

der NO-Produktion erzielen. Dies steht im Widerspruch zu den o.g. Untersuchungen (Solà et al. 2002). Die Möglichkeit einer geringen mikrogliären Kontamination der isolierten Astrozytenkulturen muss in diesem Zusammenhang als Erklärung der diskrepanten Befunde in der Literatur in Betracht gezogen werden (Saura 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung der Astrozyten jedoch durch Clodronat, und nicht durch das häufig praktizierte Abschütteln erreicht. Wegen der hohen Effektivität der Methode kann die Möglichkeit der iNOS-Expression durch eine Subgruppe der Astrozyten postuliert werden. Die Induktion der iNOS in Mikrogliazellen und die konsekutive Produktion von NO konnte im Kontext der zentralnervösen Läsion mit neurotoxischen Effekten in Verbindung gebracht werden, während eine pharmakologische Hemmung der iNOS mit neuroprotektiven Effekten in Schädigungsmodellen einherging (Boje und Arora 1992; Chao et al. 1992; Nakanishi et al. 2001; Brown 2007). Die exzessive gliale NO Produktion kann die neuronale Zellatmung beeinträchtigen und durch Induktion der neuronalen und astrozytären Glutamat-Freisetzung zur Exzitotoxizität führen (Zhao et al. 2004; Brown 2007).

Im ZNS sind vor allem Astrozyten und Mikrogliazellen in der Lage, im Rahmen ihrer Aktivierung TNFα zu bilden, wobei die im ZNS quantitativ seltener vorkommenden Mikrogliazellen den größeren Anteil des Zytokins bilden (Sawada et al. 1989; Chung und Benveniste 1990; Olmos und Lladó 2014). Die Experimente dieser Arbeit stützen die vorrangige TNFα-Produktion durch die Mikrogliazellen, so wurde in den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen nach der Stimulation etwa um den Faktor 10 mehr TNFα gebildet als in den isolierten Astrozytenkulturen. TNFα wirkt über zwei spezifische membranständige Rezeptoren und kann in Folge der weiteren intrazellulären Signaltransduktion über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose sowie per NF-$_{\kappa}$B die weitere Produktion proinflammatorischer Zytokine auslösen (Olmos und Lladó 2014). Im Rahmen der Sekundärschädigung greift TNFα in das weitere inflammatorische Geschehen ein und kann Astrozyten zur Produktion von IL6 stimulieren (Sawada et al. 1992). Es wurde gezeigt, dass Astrozyten *in vitro* durch eine Aktivierung mit TNFα bezüglich ihrer Fähigkeit, neuronales Überleben und das Auswachsen von Neuriten zu unterstützen, beeinträchtigt werden (Abd-El-Basse 2013). TNFα kann im Kontext der Sekundärschädigung proapototisch auf Neurone wirken und das reparative Aussprossen von Neuriten hemmen (Medina et al. 2002; Neumann et al. 2002). Erhöhte TNFα-Konzentrationen im Rahmen einer ischämischen zentralnervösen Läsion aggravierten das Ausmaß der Schädigung über einen vermutlich primär nicht-neuronalen Mechanismus (Barone et al. 1997). Auch wenn die Rolle von TNFα als proinflammatorisch und neurotoxisch wirkendes Zytokin

weitgehend akzeptiert ist, implizieren einige Untersuchungen, dass mikrogliär sezernierter TNFα Neurone vor Glutamat-induzierter Neurotoxizität schützen kann (Suzuki 2004; Dolga et al. 2008). Die mikrogliäre Produktion von TNFα scheint insgesamt auch zur Begrenzung der Sekundärschädigung nach einer akuten neuronalen Läsion notwendig zu sein. So ging ein vollständiger TNFα-Knockout im Schlaganfallmodell der Maus mit einer vergrößerten Läsion und signifikant eingeschränktem neurologischem Outcome einher (Lambertsen et al. 2009). Eine hemmende Modulierung von TNFα im Rahmen der akuten Hirnschädigung konnte jedoch eindeutig mit neuroprotektiven Effekten assoziiert werden (Dawson et al. 1996; Barone et al. 1997; Hosomi et al. 2005).

IL6 tritt im Immunsystem vor allem als Regulator der B-Zell-Differenzierung und Akute-Phase-Protein in Erscheinung (Heinrich et al. 2003). Im ZNS beeinflusst es unter physiologischen Bedingungen die neuronale Differenzierung und Funktion (Fann und Patterson 1994; März et al. 1997). Während unter physiologischen Bedingungen niedrige IL6-Spiegel im ZNS vorherrschen, kommt es bei einer Schädigung zur raschen Hochregulation des Zytokins (Van Wagoner und Benveniste 1999; Codeluppi et al. 2014). Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen eine niedrige basale IL6-Produktion, sowie die Schädigungs-assoziierte Hochregulation. IL6 wird im Kontext der zentralnervösen Läsion sowohl von Astrozyten und Mikrogliazellen, aber auch von Neuronen gebildet (Codeluppi et al. 2014). Das Zytokin vermittelt seine Wirkung über den sowohl löslich als auch membrangebunden vorkommenden IL6-Rezeptor, wobei in beiden Fällen das ubiquitär vorkommende Glykoprotein 130 für die Signaltransduktion essentiell ist. Intrazellulär bewirkt es die Aktivierung von Januskinasen- und MAP-Kinase-Kaskaden (Heinrich et al. 2003). Im Kontext der ZNS-Läsion wird IL6 eine ambivalente Rolle zuteil. IL6 wurde im Schlaganfallmodell der Ratte mit neuroprotektiven Effekten in Verbindung gebracht und es gibt Evidenz, dass IL6 nach einem SHT die astrozytäre NGF-Produktion stimuliert (Kossmann et al. 1996; Loddick et al. 1998). Eine zentralnervöse Überexpression von IL6 im Mausmodell führte jedoch zu einer verstärkten Astrogliose, Neurodegeneration und zerebralen Produktion proinflammatorischer Zytokine (Campbell et al. 1993; Di Santo et al. 1996). Diese Diskrepanz zeigt, dass die Bedeutung von IL6 im Kontext der zentralnervösen Läsion stark vom Zeitfenster und dem jeweiligen Ort der Bildung abhängt. Zweifelsohne ist also die bedarfsgerechte engmaschige Regulation des Zytokins sowohl für die physiologische Funktion des ZNS als auch für die adäquate Reaktion auf eine zentralnervöse Läsion essentiell. Im Rahmen der Experimente dieser Arbeit konnte LPS sowohl in den astrozytären-mikrogliären Mischkulturen, als auch in den isolierten

Astrozytenkulturen eine signifikante Stimulation der IL6-Produktion erzielen. Nach Stimulation der astrozytär-mikrogliären Mischkulturen fiel die IL6-Produktion etwa um den Faktor 2 stärker aus als in den isolierten Astrozytenkulturen. Demgegenüber differierten die Ergebnisse der TNFα-Messungen zwischen den Kulturen etwa um den Faktor 10. Die Diskrepanz der Unterschiede der IL6- und TNFα-Produktion zwischen den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen könnte durch einen relativ erhöhten Anteil der astrozytären Beteiligung an der IL6-Bildung erklärt werden. Letztendlich erlaubt das vorliegende Modell jedoch im Umkehrschluss keine saubere Diskrimination der isolierten mikrogliären Aktivität. Es erscheint ebenfalls denkbar, dass die erhöhten Zytokin-Konzentrationen in den Mischkulturen nicht direkt durch die Mikroglia selbst, sondern durch die Astrozyten in Reaktion auf mikrogliäre Signale generiert werden. Es ist bekannt, dass der direkte Kontakt von Astrozyten und Mikrogliazellen durch bislang weitgehend undefinierte interzelluläre Kommunikation die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen amplifizieren kann. So kann die in Mischkulturen produzierte Menge die Summe der Menge in vergleichbaren isolierten Astrozyten- und Mikroglia-Kulturen übersteigen (Solà et al. 2002; Kirkley et al. 2017). Zellkulturexperimente zeigen, dass LPS sowohl in Astrozyten als auch in Mikrogliazellen die IL6-Produktion stimuliert, während TNFα in Astrozyten, nicht aber in Mikrogliazellen, zu einer verstärkten IL6-Bildung führt (Sawada et al. 1992). Eine sekundäre zusätzliche Stimulation der astrozytären IL6-Sekretion durch die vorwiegend mikrogliäre TNFα-Produktion könnte ein Erklärungsansatz für die vorliegenden Daten sein.

Allen drei untersuchten Substanzen ist also gemein, dass sie mit einem inflammatorisch aktivierten Phänotyp der Zellen assoziiert sind und mit zytotoxischen bzw. neurotoxischen Effekten im Rahmen der Sekundärschädigung in Verbindung gebracht werden. Die Alteration der Produktion von NO, TNFα und IL6 könnte sich im Umkehrschluss also potentiell benefiziell auf das Überleben zentralnervöser Strukturen nach einer Schädigung auswirken.

5.3.1 Beeinflussung der Stickstoffmonoxid-, Tumornekrosefaktor-α- und Interleukin-6-Produktion durch abnormal Cannabidiol

Die basale Bildung von NO, TNFα und IL6 fiel in allen untersuchten Kulturen niedrig bis nicht messbar aus und wurde nicht durch abn-CBD beeinflusst. In den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen konnte abn-CBD dosisabhängig die Produktion von NO und TNFα nach einer Stimulation mit LPS reduzieren. Dieser Effekt ist von einem CB2-Knockout unbeeinflusst. Abn-CBD scheint im vorliegenden Modell also, kongruent zur

einleitend dargestellten Evidenz für den putativen abn-CBD-sensitiven Rezeptor, über ein Target jenseits des CB2-Rezeptors zu wirken (Kapitel 1.2.1).

In den isolierten Wildtyp-Astrozytenkulturen konnte eine Reduktion der LPS-induzierten TNFα-Produktion durch 10 µM abn-CBD erzielt werden. Dies suggeriert, dass das Target von abn-CBD ebenfalls auf Astrozyten zu finden ist. Ein Effekt auf die TNFα-Produktion der Astrozyten aus CB2-Knockout-Tieren konnte nicht gemessen werden. Dabei ist allerdings anzumerken, dass die gemessenen Werte am unteren Rand der Standardkurve und damit des Messbereiches lagen. Ein potentiell vorhandener Effekt mit dem prozentualen Ausmaß wie bei den Wildtyp-Zellen könnte also auch Methoden-bedingt übersehen worden sein. Die abn-CBD-bedingte Reduktion der LPS-induzierten TNFα-Produktion steht im Einklang mit Untersuchungen, in denen abn-CBD die TNFα-Produktion in isolierten Astrozyten und Mikrogliazellen aus Ratten hemmte (Kreutz 2007).

Die IL6-Produktion wurde in keiner der untersuchten Kulturen durch eine Behandlung mit abn-CBD beeinflusst. Abn-CBD führt also in den untersuchten Kulturen zu einer diskrepanten Beeinflussung der LPS-induzierten NO- und TNFα-Produktion einerseits und IL6-Produktion andererseits. Die beobachtete Diskrepanz der Beeinflussung der TNFα- und NO-Produktion bei fehlender Reduktion der IL6-Produktion lässt sich auf den ersten Blick nur schwer in Einklang mit der vorliegenden Literatur bringen, denn klassischerweise werden TNFα und IL6 durch eine Beeinflussung der TLR4-Kaskade über den MAP-Kinase- und PI3K/Akt-Signalweg sowie nukleäre Faktoren wie NF-κB und AP-1 gleichsinnig beeinflusst (Ma et al. 2011; Codeluppi et al. 2014). Die zugrundeliegenden Daten stammen jedoch überwiegend nicht von Gliazellen. Bei *in vitro* Untersuchungen der Beeinflussung mikrogliärer Zytokinproduktion durch niedrigdosiertes Clodronat hatte sich gezeigt, dass sowohl LPS, als auch macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) die Produktion von NO, TNFα, Interleukin-1β und IL6 stimulieren können. Die Produktion von TNFα, NO und Interleukin-1β war unabhängig vom verwendeten Stimulanz durch die Behandlung attenuiert worden, wohingegen die Produktion von IL6 nur reduziert wurde, wenn sie durch M-CSF, nicht aber wenn sie durch LPS ausgelöst worden war (Dehghani et al. 2004). Diese Befunde legen im Einklang mit den Daten dieser Arbeit nahe, dass der glialen LPS-induzierten IL6-Sekretion möglicherweise zum Teil differierende intrazelluläre Signalkaskaden zugrunde liegen.

In den vorliegenden Modellen muss neben einer möglichen direkten Alteration der TLR4-Kaskade auch die Modulation der interzellulären Kommunikation hinsichtlich der vorrangig in den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen messbaren NO- und TNFα-Reduktion durch abn-CBD in Betracht gezogen werden. Es ist bekannt, dass über weitgehend unbekannte Mechanismen der direkte Kontakt von Astrozyten zu Mikrogliazellen die inflammatorische Antwort auf eine definierte Stimulation beeinflussen kann (Solà et al. 2002; Saijo et al. 2009; Kirkley et al. 2017). Eine Beeinflussung dieser Zell-Zell-Kommunikation könnte also sekundär TLR4-unabhängig die veränderte Zytokinproduktion verursachen. Sowohl IL6 als auch TNFα greifen zusammen mit weiteren LPS-induzierten Zytokinen selbst indirekt in die Regulation der inflammatorischen Reaktion ein. Eine Alteration der Zytokinproduktion könnte also auch jenseits der TLR4-Kaskaden durch Beeinflussung dieser sekundären Signalwege erreicht werden. Im Rahmen der Aktivierung durch LPS oder TNFα bilden Mikrogliazellen beispielweise auch antiinflammatorische Zytokine wie Interleukin 10 und transforming growth factor β, welche auto- und parakrin die weitere inflammatorische Reaktion regulieren (Ledeboer et al. 2000). Interleukin 10 wiederum hat einen auto- und parakrinen hemmenden Effekt auf die mikrogliäre TNFα- und IL6-Produktion (Sheng et al. 1995). Dass im Vergleich zu den Mischkulturen anteilig deutlich mehr IL6 als TNFα und NO in den isolierten Astrozytenkulturen gebildet wurde, könnte in diesem Zusammenhang als Hinweis gedeutet werden, dass im vorliegenden Modell die iNOS-Expression und TNFα-Produktion stärker als die IL6-Produktion durch diese sekundären, potentiell durch abn-CBD beeinflussten, Mechanismen bedingt wird. Letztendlich könnte auch eine spezifische posttransskriptionale Beeinflussung von iNOS-Expression und TNFα-Produktion auf messenger Ribonukleinsäure (mRNA)- bzw. Proteinebene die vorliegenden Befunde erklären. Regulationsmechanismen, welche eine vermehrte Transkription von der finalen Synthese des jeweiligen Proteins entkoppeln, sind für jedes der untersuchten Produkte beschrieben (Dumitru et al. 2000; Codeluppi et al. 2014). In primären humanen Monozyten unterliegt beispielsweise die LPS-induzierte Produktion von TNFα, im Gegensatz zur IL6-Produktion, einer Brutons'-Tyrosinkinase- und p38-MAP-Kinase-abhängigen Regulation über die Beeinflussung der Stabilität der TNFα-mRNA (Horwood et al. 2006).

In astrozytären Zellkulturen verminderte AEA die LPS- oder Theilers murines Enzephalomyelitis Virus-induzierte NO- und TNFα-Produktion, wohingegen die IL6-Produktion nicht reduziert wurde (Molina-Holgado et al. 1997, 1998, 2002). Diese Daten lassen die Hypothese zu, dass abn-CBD seine Wirkung über ein gemeinsames

Ziel mit Endocannabinoiden entfaltet. Zellkulturexperimente konnten zeigen, dass diverse endogene und exogene Cannabinoide die Produktion von TNFα in Mikrogliazellen hemmen können, wobei der Effekt einiger der Substanzen unabhängig von einer pharmakologischen Blockade der klassischen Cannabinoidrezeptoren war (Facchinetti et al. 2003). Auch auf mRNA-Ebene konnte eine CB1- und CB2-unabhängige Beeinflussung der mikrogliären Zytokinproduktion festgestellt werden (Puffenbarger et al. 2000). Analoge Effekte waren auch durch die synthetische Substanz WIN55, 212-2 in astrozytären Kulturen messbar (Sheng et al. 2005). Der putative abn-CBD-sensitive Rezeptor stellt in diesem Zusammenhang eine potentielle gemeinsame Zielstruktur von abn-CBD und anderen exogenen sowie endogenen Cannabinoiden dar. Der putative Rezeptor konnte in der Literatur auf Mikrogliazellen bereits pharmakologisch charakterisiert werden (Franklin et al. 2003; Walter et al. 2003). Bezüglich einer potentiellen Expression auf Astrozyten liegen bislang keine eindeutigen Daten vor. Zellkulturexperimente belegen jedoch, dass AEA und als CB1-spezifisch geltende Cannabinoide in Astrozyten die cAMP-Konzentration über einen G_i-gekoppelten Rezeptor unabhängig vom CB1-Rezeptors reduzieren (Sagan et al. 1999). Dies kann als indirekter Hinweis auf das Vorhandensein astrozytärer abn-CBD-sensitiver Rezeptoren gedeutet werden.

Der putative abn-CBD-Rezeptor wurde bezüglich seiner vaskulären Effekte als $G_{i/o}$-gekoppelter Rezeptor charakterisiert (Begg et al. 2003; Offertáler et al. 2003; Su und Vo 2007). In unterschiedlichen Zellkultur-Modellen wurde eine vermehrte cAMP-Bildung als Mechanismus der Hemmung der LPS-induzierten Zytokinproduktion identifiziert (Pahan et al. 1997; Wall et al. 2009; Park et al. 2016; Zhou und Zhu 2019). Dies legt nahe, dass die Beeinflussung der Zytokinproduktion in den vorliegenden Experimenten nicht durch eine $G_{i/o}$-induzierte Hemmung der Adenylatzyklase vermittelt wurde.

In Zellkulturexperimenten wurde die Neurotoxizität von konditioniertem Medium, welches aus Kulturen LPS-aktivierter BV2-Mikroglia stammte, durch eine Behandlung mit abn-CBD herabgesetzt (Janefjord et al. 2014). Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Reduktion der mikrogliären NO- und TNFα-Produktion kann die verminderte Neurotoxizität plausibel erklären. In *in vivo* Untersuchungen an Mäusen hatte abn-CBD die Plasma-TNFα-Spiegel nach systemischer LPS-Applikation CB1- und CB2-unabhängig reduziert (Milman et al. 2006). Möglicherweise sind die Befunde der vorliegenden Arbeit bezüglich der Beeinflussung der mikrogliären TNFα-Produktion also teilweise auch übertragbar auf periphere Leukozyten. Die in den vorliegenden

Experimenten gemessenen antiinflammatorischen Effekte von abn-CBD auf Mikrogliazellen können auch die Befunde aus exzitotoxisch geschädigten OHSC, in denen die neuroprotektiven Effekte von abn-CBD abhängig von der Anwesenheit von Mikrogliazellen waren, begründen (Kreutz et al. 2009). Im *in vivo* Modell der traumatischen Hirnschädigung an Ratten hatte eine Behandlung mit abn-CBD neuroprotektiv gewirkt und die Größe der Läsionen reduziert (Ulrich 2012). Der bei der immunhistochemischen Aufarbeitung der Gehirne entstandene Verdacht einer ursächlichen Beeinflussung mikrogliärer Aktivität wird durch die vorliegenden Daten gestützt, außerdem kann diese Beeinflussung auf der Ursachen-Seite verortet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen also eine Beeinflussung der mikrogliären Zytokinproduktion als einen zellulären Mechanismus abn-CBD-vermittelter Neuroprotektion nahe.

5.3.2 Einflüsse des Cannabinoidrezeptor-2-Knockouts auf die Zytokinproduktion und Effekte von abnormal Cannabidiol

Die Verwendung der CB2-defizitären Zellen erfolgte mit dem Ziel, die direkte oder indirekte Beteiligung des CB2-Rezeptors an abn-CBD-vermittelten Effekten zu prüfen. Die LPS-induzierte NO und TNFα-Produktion wurde in den Mischkulturen mit CB2-Knockout auf vergleichbarem Niveau wie in den Wildtyp-Kulturen durch abn-CBD reduziert. Diese Befunde sprechen dagegen, dass im vorliegenden Modell die Effekte von abn-CBD über eine indirekte Beeinflussung des CB2-Rezeptors durch Komplexbildung mit GPR18 vermittelt werden (Reyes-Resina et al. 2018). Es wurde jedoch eine insgesamt veränderte NO- bzw. Zytokinproduktion der Kulturen aus CB2-Knockout-Tieren beobachtet. Die basalen NO-, TNFα- und IL6-Spiegel waren sowohl in den isolierten Astrozytenkulturen als auch in den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen auf vergleichbar niedrigem Niveau und unterschieden sich nicht zwischen den Kulturen aus CB2-Knockout- und Wildtyp-Tieren. Sowohl in den isolierten Astrozytenkulturen, als auch in den astrozytär-mikrogliären Mischkulturen, fiel die LPS-stimulierte Produktion von TNFα und NO jedoch deutlich geringer aus, wohingegen die IL6-Produktion nicht wesentlich verändert war. Die Zellen mit CB2-Knockout zeigten gegenüber den Wildtyp-Zellen also eine abgeschwächte Reaktion auf LPS.

Es gilt als akzeptiert, dass Mikrogliazellen CB2-Rezeptoren in Abhängigkeit von ihrer Aktivierung exprimieren können (Kapitel 1.6). Die mikrogliäre Expression des CB2-Rezeptors unterliegt dabei *in vitro* einer Pathogen- bzw. Zytokin-spezifischen Regulation. So führt beispielsweise eine Behandlung mit LPS zu einer reduzierten,

während eine Behandlung mit GM-CSF plus IFNγ zu einer gesteigerten Rezeptorexpression führt (Carlisle et al. 2002; Maresz et al. 2005; Cabral und Marciano‐Cabral 2005). Das Vorkommen des CB2-Rezeptors auf Astrozyten wird kontrovers diskutiert (Carlisle et al. 2002; Núñez et al. 2004; Sheng et al. 2005). Die verminderte NO- und TNFα-Produktion der isolierten Astrozytenkulturen aus Tieren mit CB2-Knockout gegenüber den Kulturen aus Wildtyp-Zellen in den Experimenten dieser Arbeit legt jedoch die Involvierung des CB2-Rezeptors in der Regulation astrozytärer Aktivierung nahe. In der Literatur finden sich vielfältige Belege, dass die Aktivierung des CB2-Rezeptors mit einer veränderten mikrogliären Aktivierung einhergeht (Kapitel 1.6). Die mikrogliäre Produktion proinflammatorischer Zytokine und reaktiver Sauerstoffspezies *in vitro* kann durch Cannabinoide CB2-abhängig reduziert werden, wobei die Proliferation und Migration stimuliert wird (Walter et al. 2003; Carrier et al. 2004; Ehrhart et al. 2005; Eljaschewitsch et al. 2006; Martin-Moreno et al. 2011). Insgesamt wurde die Aktivierung des CB2-Rezeptors im Rahmen der Schädigung mit einem weniger neurotoxischen Phänotyp der Mikrogliazellen assoziiert (Klegeris et al. 2003; Zarruk et al. 2012). Die Beobachtung, dass CB2-Agonisten die Produktion von proinflammatorischen Substanzen reduzieren können, scheint zunächst im Widerspruch zu der verminderten LPS-stimulierten Produktion von NO und TNFα in den CB2-Knockout-Zellen gegenüber den Wildtyp-Zellen zu stehen (Ehrhart et al. 2005). Jedoch wurde in diesen Experimenten die Stimulation mit IFNγ und CD40-Ligand erreicht. Außerdem stammten die Zellen aus einer anderen Mauslinie und es waren keine Astrozyten in den Kulturen anwesend (Ehrhart et al. 2005). Die oben genannten Befunde machen deutlich, dass die Aktivierung des CB2-Rezeptors differenziell einzelne Kaskaden der glialen Inflammation verstärken oder blockieren kann. Auch in *in vivo* Modellen der akuten Hirnschädigung wurden antiinflammatorische und neuroprotektive Effekte von CB2-Agonisten herausgestellt. Im *in vivo* Modell der traumatischen Hirnschädigung führten sowohl die pharmakologische Blockade des CB2-Rezeptors als auch der genetische Knockout zu eine Exazerbation der TNFα- und NO-Produktion (Amenta et al. 2014). Im Mausmodell des ischämischen Schlaganfalls konnten CB2-Agonisten das Outcome der Tiere verbessern und die Produktion proinflammatorischer Proteine reduzieren (Zarruk et al. 2012). Der Effekt wurde durch pharmakologische Blockade und genetischen Knockout aufgehoben. Der Effekt eines CB2-Knockouts auf das Outcome der Tiere war jedoch abhängig vom zugrundeliegenden Modell (Zhang et al. 2007, 2009; Zarruk et al. 2012). Gegenüber den *in vivo* Modellen könnte die in den vorliegenden Zellkulturexperimenten fehlende Beteiligung von Leukozyten aus dem Blut die Diskrepanz erklären.

Letztendlich ist ein Rezeptor-Knockout keinesfalls mit einer pharmakologischen Inhibierung gleichzusetzen (Borowska-Fielding et al. 2018). Knockout-Organismen leben ab der ersten Zellteilung mit einem Gendefekt, sodass sich schon im Rahmen der Embryonalentwicklung Adaptationsmechanismen entwickeln, welche den Defekt kompensieren (El-Brolosy und Stainier 2017). Bemerkenswert ist, dass in immortalisierten Mikrogliazellen der Knockdown des CB2-Rezeptors mittels small interfering RNA (siRNA) zu einer Aufhebung des Effektes der CB2-Agonisten, nicht jedoch zu einer Veränderung über das Ausgangsniveau der IFNγ-induzierten TNFα-Produktion hinaus führte (Ehrhart et al. 2005). Dies könnte als Hinweis darauf gedeutet werden, dass das veränderte Zytokinprofil, welches in dieser Arbeit detektiert wurde, aus Adaptationsmechanismen in Folge des Gendefektes und nicht aus der direkten Involvierung des Rezeptors resultiert. Die Auswirkung eines CB2-Knockouts auf Entzündungsprozesse ist jedoch keinesfalls rein proinflammatorisch, sondern hängt stark vom untersuchten Zelltyp und zugrundeliegenden Modell ab. So wurde eine verminderte LPS-induzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNFα in CB2-defizitären Makrophagen und Dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark gemessen (Alferink et al. 2016). Zusammenfassend bleibt das Bild spezifischer CB2-bedingter Mechanismen im Kontext glialer Entzündung zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch inkomplett, auch wenn eine allgemeine Involvierung des Rezeptors in die Regulation inflammatorischer Prozesse evident ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Notwendigkeit der Zurückhaltung, aus globalen Befunden von CB2-Knockout-Tieren auf molekulare Mechanismen zu schließen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Akute neuronale Läsionen wie das SHT stellen eine häufige Ursache motorischer und sensibler Defizite sowie dauerhafter Behinderung, gerade auch bei jungen Patienten, dar. Der neuronale Schaden entsteht dabei sowohl durch die irreversible Primärschädigung, als auch durch die neuroinflammatorisch geprägten Mechanismen der Sekundärschädigung. In diesem Zusammenhang steht die Charakterisierung und pharmakologische Beeinflussung der Sekundärschädigung im Fokus von Forschungsanstrengungen, ohne dass bislang ein Durchbruch gelungen ist. Es gibt Evidenz dafür, dass das Endocannabinoidsystem im ZNS die Rolle eines intrinsischen protektiven Systems zur Begrenzung der Sekundärschädigung einnimmt. So konnten endogene, pflanzliche und synthetische Substanzen aus der breit gefächerten Gruppe der Cannabinoide mit neuroprotektiven Effekten im Kontext akuter neuronaler Läsionen in Verbindung gebracht werden. Abn-CBD, ein nicht psychotropes synthetisches Cannabinoid ohne relevante Affinität zu den beiden klassischen Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2, verbesserte *in vitro* und *in vivo* das neuronale Überleben bzw. neurologische Outcome in Schädigungsmodellen. Bislang herrschte weitgehende Unklarheit über seine Zielstruktur, sowie die beteiligten zellulären und molekularen Mechanismen. In der vorliegenden Arbeit wurden neue zelluläre Mechanismen abn-CBD-vermittelter Neuroprotektion charakterisiert. Im Scratch-Wound Assay wurde gezeigt, dass abn-CBD Mikroglia-abhängig die astrozytäre Migration beeinflussen kann. Weiter wurde herausgestellt, dass die Substanz die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Mikrogliazellen und Astrozyten attenuieren kann. So wurde die Produktion von NO nach einer inflammatorischen Stimulation mit LPS in primären astrozytär-mikrogliären Mischkulturen gehemmt. Die Produktion von TNFα wurde sowohl in den Mischkulturen als auch in isolierten Astrozytenkulturen verringert, während die IL6-Bildung unbeeinflusst blieb. Die gemessenen Effekte waren unabhängig von der Funktionsfähigkeit des CB2-Rezeptors. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen also, dass abn-CBD modulierend auf gliale Inflammation und die astrozytäre Reorganisation nach mechanischer Schädigung wirkt. Da entsprechende Effekte von endogenen und exogenen Cannabinoiden in der Literatur teilweise ebenfalls als unabhängig von den klassischen Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 charakterisiert wurden, stellt der putative abn-CBD-sensitive Rezeptor auf Mikrogliazellen und Astrozyten eine potentielle gemeinsame Zielstruktur von abn-CBD mit diesen Substanzen im Kontext Cannabinoid-vermittelter Neuroprotektion dar. Zur Klärung der den beobachteten Effekten zugrunde liegenden intrazellulären Kaskaden sind weitere Experimente notwendig. Ein zielführender Ansatz ist die gezielte Untersuchung einzelner Abschnitte

der durch LPS aktivierten Kaskaden mittels proteomischer Methoden oder gezielter Antagonisierung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Erklärungsansätze für das neuroprotektive Potential einer für die pharmakologische Nutzung vielversprechenden Substanz. Für eine potentielle pharmakologische Nutzung hat abn-CBD, soweit aus der vorliegenden Literatur beurteilbar, ein insgesamt günstiges pharmokodynamisches und pharmakokinetisches Profil. So gibt es im Gegensatz zu anderen Cannabinoiden keine psychotrope Wirkung und in der Ratte konnte eine Akkumulation im ZNS nach subkutaner Injektion festgestellt werden. Von einer ausreichenden Distribution über die Blut-Hirn-Schranke kann folglich auch bei niedrigen systemischen Dosen ausgegangen werden. Die vollständige Aufklärung der molekularen Mechanismen wird außerdem zum weiteren Verständnis des Endocannabinoidsystems und der neuroinflammatorischen Kaskaden im Rahmen der Sekundärschädigung beitragen.

In Zukunft kann das weitere Verständnis der Mechanismen der Sekundärschädigung und deren zeitlicher Dynamik die Grundlage einer differenzierten und phasengerechten pharmakologischen Therapie akuter Hirnschädigungen bilden, mit dem Ziel, das neurologische Outcome der Patienten zu verbessern.

7 Literaturverzeichnis

Abd-El-Basse EM (2013) Pro-inflammatory cytokine; tumor-necrosis factor-alpha (TNF-α) inhibits astrocytic support of neuronal survival and neurites outgrowth. Adv Biosci Biotechnol 04:73–80

Adams MD, Earnhardt JT, Martin BR, Harris LS, Dewey WL, Razdan RK (1977) A cannabinoid with cardiovascular activity but no overt behavioral effects. Experientia 33:1204–1205

Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. Nat Neurosci 10:1538–1543

Akashi S, Saitoh S, Wakabayashi Y, Kikuchi T, Takamura N, Nagai Y, Kusumoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Adachi Y, Kosugi A, Miyake K (2003) Lipopolysaccharide Interaction with Cell Surface Toll-like Receptor 4-MD-2. J Exp Med 198:1035–1042

Alferink J, Specht S, Arends H, Schumak B, Schmidt K, Ruland C, Lundt R, Kemter A, Dlugos A, Kuepper JM, Poppensieker K, Findeiss M, Albayram N, Otte DM, Marazzi J, Gertsch J, Förster I, Maier W, Scheu S, Hoerauf A, Zimmer A (2016) Cannabinoid receptor 2 modulates susceptibility to experimental cerebral malaria through a CCL17-dependent Mechanism. J Biol Chem 291:19517–19531

Alvarez JI, Katayama T, Prat A (2013) Glial influence on the blood brain barrier. Glia 61:1939–1958

Amenta PS, Jallo JI, Tuma RF, Craig Hooper D, Elliott MB (2014) Cannabinoid receptor type-2 stimulation, blockade, and deletion alter the vascular inflammatory responses to traumatic brain injury. J Neuroinflammation 11:1–10

Anday JK, Mercier RW (2005) Gene ancestry of the cannabinoid receptor family. Pharmacol Res 52:463–466

Anderson WR, Martella A, Drake ZM, Hu S, Peterson PK, Chao CC (1995) Correlative transmission and scanning electron microscopy study of microglia activated by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in vitro. Pathol Res Pract 191:1016–1022

Appel E, Kolman O, Kazimirsky G, Blumberg PM, Brodie C (1997) Regulation of GDNF expression in cultured astrocytes by inflammatory stimuli. Neuroreport 8:3309–3312

Arnold S, de Araújo GW, Beyer C (2008) Gender-specific regulation of mitochondrial fusion and fission gene transcription and viability of cortical astrocytes by steroid hormones. J Mol Endocrinol 41:289–300

Arundine M, Tymianski M (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. Cell Mol Life Sci 61:657–668

Ashton JC (2012) The atypical cannabinoid O-1602: targets, actions, and the central nervous system. Cent Nerv Syst Agents Med Chem 12:233–239

Bab I, Zimmer A (2008) Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. Br J Pharmacol 153:182–188

Bahr BA, Karanian DA, Makanji SS, Makriyannis A (2006) Targeting the endocannabinoid system in treating brain disorders. Expert Opin Investig Drugs 15:351–365

Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR (2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. Trends Pharmacol. Sci. 27:1–4

Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ (1997) Tumor necrosis factor-α: A mediator of focal ischemic brain injury. Stroke 28:1233–1244

Bazargani N, Attwell D (2016) Astrocyte calcium signaling: the third wave. Nat Neurosci 19:182–189

Beauchamp K, Mutlak H (2008) Pharmacology of Traumatic Brain Injury: Where Is the "Golden Bullet"? Mol Med 14:731–740

Becher B, Antel JP (1996) Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. Glia 18:1–10

Begg M, Mo FM, Offertaler L, Bátkai S, Pacher P, Razdan RK, Lovinger DM, Kunos G (2003) G protein-coupled endothelial receptor for atypical cannabinoid ligands modulates a Ca2+-dependent K+ current. J Biol Chem 278:46188–46194

Berdichevsky E, Riveros N, Sánchez-Armáss S, Orrego F (1983) Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. Neurosci Lett 36:75–80

Berdyshev E (2000) Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. Chem Phys Lipids 108:169–190

Berliocchi L, Bano D, Nicotera P (2005) Ca2+signals and death programmes in neurons. In: Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. The Royal Society, S 2255–2258

Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadbaran U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. J Cell Biol 163:463–468

Boje KM, Arora PK (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. Brain Res 587:250–256

Borowska-Fielding J, Murataeva N, Smith B, Szczesniak AM, Leishman E, Daily L, Toguri JT, Hillard CJ, Romero J, Bradshaw H, Kelly MEM, Straiker A (2018) Revisiting cannabinoid receptor 2 expression and function in murine retina. Neuropharmacology 141:21–31

Bradbury EJ, Carter LM (2011) Manipulating the glial scar: Chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. Brain Res Bull 84:306–316

Brahmachari S, Fung YK, Pahan K (2006) Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. J Neurosci 26:4930–4939

Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. Proc Natl Acad Sci 87:682–685

Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR (2001) Evidence for a New G Protein-Coupled Cannabinoid Receptor in Mouse Brain. Mol Pharmacol 60:155–163

Brown GC (2007) Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. Biochem Soc Trans 35:1119–1121

Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. J Neuropathol Exp Neurol 61:1013–1021

Buckley NE (2008) The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: An update. Br J Pharmacol 153:309–318

Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M, Zimmer A (2000) Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. Eur J Pharmacol 396:141–149

Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, Garcia-Quintanilla A, Cano J, Brundin P, Englund E, Venero JL, Joseph B (2011) Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. Nature 472:319–324

Burstein S (2015) Cannabidiol (CBD) and its analogs: A review of their effects on inflammation. Bioorganic Med Chem 23:1377–1385

Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew M V (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. Neuron 23:297–308

Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. J Neurosci 22:183–192

Cabral GA, Marciano-Cabral F (2005) Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. J Leukoc Biol 78:1192–1197

Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, Beltramo M (2002) Flow Cytometric Analysis of Inflammatory Cells in Ischemic Rat Brain. Stroke 33:586–592

Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, Mucke L (1993) Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. Proc Natl Acad Sci 90:10061–10065

Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA (2002) Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. Int Immunopharmacol 2:69–82

Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ (2004) Cultured Rat Microglial Cells Synthesize the Endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol, Which Increases Proliferation via a CB 2 Receptor-Dependent Mechanism. Mol Pharmacol 65:999–1007

Chan PH, Chu L, Chen SF, Carlson EJ, Epstein CJ (1990) Attenuation of glutamate-induced neuronal swelling and toxicity in transgenic mice overexpressing human CuZn-superoxide dismutase. Acta Neurochir Suppl 51:245–247

Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. J Immunol 149:2736–2741

Chen Z, Trapp BD (2016) Microglia and neuroprotection. J Neurochem 136:10–17

Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK (2014) Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed. J Neuroinflammation 11:1–15

Choi DW (1985) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. Neurosci Lett 58:293–297

Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. J Neurosci 7:369–379

Chung IY, Benveniste EN (1990) Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. J Immunol 144:2999–3007

Chung WS, Allen NJ, Eroglu C (2015) Astrocytes control synapse formation, function, and elimination. Cold Spring Harb Perspect Biol 7:a020370

Codeluppi S, Fernandez-Zafra T, Sandor K, Kjell J, Liu Q, Abrams M, Olson L, Gray NS, Svensson CI, Uhlén P (2014) Interleukin-6 Secretion by Astrocytes Is Dynamically Regulated by PI3K-mTOR-Calcium Signaling. PLoS One 9:e92649

Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: Long-range glial signaling. Science 247:470–473

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J V, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan W-BB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat Neurosci 8:752–758

Davis MI, Ronesi J, Lovinger DM (2003) A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. J Biol Chem 278:48973–48980

Dawson DA, Martin D, Hallenbeck JM (1996) Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces focal cerebral ischemic injury in the spontaneously hypertensive rat. Neurosci Lett 218:41–44

Dehghani F, Conrad A, Kohl A, Korf HW, Hailer NP (2004) Clodronate inhibits the secretion of proinflammatory cytokines and NO by isolated microglial cells and reduces the number of proliferating glial cells in excitotoxically injured organotypic hippocampal slice cultures. Exp Neurol 189:241–251

Deutsch DG, Chin SA (1993) Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. Biochem Pharmacol 46:791–796

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

Devane WA, Dysarz III FA, Johnson MRR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and Characterization of a Cannabinoid Receptor in Rat Brain. Mol Pharmacol 34:605–613

Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR (2000) Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: Evidence for non-CB1, non-CB2 receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. J Neurochem 75:2434–2444

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

Di Santo E, Alonzi T, Fattori E, Poli V, Ciliberto G, Sironi M, Gnocchi P, Ricciardi-Castagnoli P, Ghezzi P (1996) Overexpression of interleukin-6 in the central nervous system of transgenic mice increases central but not systemic proinflammatory cytokine production. Brain Res 740:239–244

Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. Proc Natl Acad Sci 99:10819–10824

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz M (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends Neurosci 22:391–397

Dolga AM, Granic I, Blank T, Knaus HG, Spiess J, Luiten PGM, Eisel ULM, Nijholt IM (2008) TNF-α-mediates neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity via NF-κB-dependent up-regulation of KCa2.2 channels. J Neurochem 107:1158–1167

Donat CK, Scott G, Gentleman SM, Sastre M (2017) Microglial Activation in Traumatic Brain Injury. Front Aging Neurosci 9:208

Dong XX, Wang Y, Qin ZH (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. Acta Pharmacol Sin 30:379–387

Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, Patriotis C, Jenkins NA, Copeland NG, Kollias G, Tsichlis PN (2000) TNF-α induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. Cell 103:1071–1083

Dutton RP, McCunn M (2003) Traumatic brain injury. Curr Opin Crit Care 9:503–509

Ebrahimi F, Koch M, Pieroh P, Ghadban C, Hobusch C, Bechmann I, Dehghani F (2012) Time dependent neuroprotection of mycophenolate mofetil: effects on temporal dynamics in glial proliferation, apoptosis, and scar formation. J Neuroinflammation 9:89

Ehrhart J, Obregon D, Mori T, Hou H, Sun N, Bai Y, Klein T, Fernandez F, Tan J, Shytle D (2005) Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. J Neuroinflammation 2:1–13

El-Brolosy MA, Stainier DYR (2017) Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. PLoS Genet. 13:e1006780

Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, Hoertnagl H, Raine CS, Schneider-Stock R, Nitsch R, Ullrich O (2006) The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. Neuron 49:67–79

Elmes MW, Kaczocha M, Berger WT, Leung K, Ralph BP, Wang L, Sweeney JM, Miyauchi JT, Tsirka SE, Ojima I, Deutsch DG (2015) Fatty Acid Binding Proteins (FABPs) are Intracellular Carriers for delta9-Tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabidiol (CBD). J Biol Chem 290:8711–8721

Eng LF, Ghirnikar RS (1994) GFAP and Astrogliosis. In: Brain Pathology. S 229–237

Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 8:871–874

Etienne-Manneville S (2006) In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. Methods Enzymol. 406:565–578

Etienne-Manneville S, Hall A (2001) Integrin-Mediated Activation of Cdc42 Controls Cell Polarity in Migrating Astrocytes through PKCζ. Cell 106:489–498

Facchinetti F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A (2003) Cannabinoids ablate release of TNFα in rat microglial cells stimulated with lypopolysaccharide. Glia 41:161–168

Fann MJ, Patterson PH (1994) Neuropoietic cytokines and activin A differentially regulate the phenotype of cultured sympathetic neurons. Proc Natl Acad Sci 91:43–47

Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew M V (2004) Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. J Neurosci 24:2143–2155

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. Mol Pharmacol 48:443–450

Fetler L, Amigorena S (2005) Brain under surveillance: The microglia patrol. Science 309:392–393

Fiebich BLL, Butcher RDD, Gebicke-Haerter PJJ (1998) Protein kinase C-mediated regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cultured microglial cells. J Neuroimmunol 92:170–178

Finlay DB, Joseph WR, Grimsey NL, Glass M (2016) GPR18 undergoes a high degree of constitutive trafficking but is unresponsive to N-Arachidonoyl Glycine. PeerJ 4:e1835

Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, Greenberg D, Stella N (2003) Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. J Neurosci 23:7767–7775

Franklin A, Stella N (2003) Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB2 and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors. Eur J Pharmacol 474:195–198

Frith JC, Mönkkönen J, Auriola S, Mönkkönen H, Rogers MJ (2001) The Molecular Mechanism of Action of the Antiresorptive and Antiinflammatory Drug Clodronate: Evidence for the Formation in Vivo of a Metabolite That Inhibits Bone Resorption and Causes Osteoclast and Macrophage Apoptosis. Arthritis Rheum 44:2201–2210

Fujii M, Sherchan P, Krafft PR, Rolland WB, Soejima Y, Zhang JH (2014) Cannabinoid type 2 receptor stimulation attenuates brain edema by reducing cerebral leukocyte infiltration following subarachnoid hemorrhage in rats. J Neurol Sci 342:101–106

Furukawa S, Furukawa Y, Satoyoshi E, Hayashi K (1986) Synthesis and secretion of nerve growth factor by mouse astroglial cells in culture. Biochem Biophys Res Commun 136:57–63

Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Fur G, Casellas P (1995) Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. Eur J Biochem 232:54–61

Gantz I, Muraoka A, Yang YK, Samuelson LC, Zimmerman EM, Cook H, Yamada T (1997) Cloning and chromosomal localization of a gene (GPR18) encoding a novel seven transmembrane receptor highly expressed in spleen and testis. Genomics 42:462–466

Gaoni Y, Mechoulam R (1964) Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. J Am Chem Soc 86:1646–1647

Gaoni Y, Mechoulam R, Gaoni Y, Mechoulam R (1971) The Isolation and Structure of Δ-Tetrahydrocannabinol and Other Neutral Cannabinoids from Hashish. J Am Chem Soc 93:217–224

Gebäck T, Schulz MMP, Koumoutsakos P, Detmar M (2009) TScratch: A novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. Biotechniques 46:265–274

Gérard CM, 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

Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013) Origin and differentiation of microglia. Front Cell Neurosci 7:1–14

Glass M, Northup JK (1999) Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. Mol Pharmacol 56:1362–1369

Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. Nat. Rev. Immunol. 3:23–35

Goss JR, O'Malley ME, Zou L, Styren SD, Kochanek PM, Dekosky ST (1998) Astrocytes are the major source of nerve growth factor upregulation following traumatic brain injury in the rat. Exp Neurol 149:301–309

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem 126:131–138

Greenamyre JT, Porter RH (1994) Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. Neurology 44:S7-13

Griess P (1864) XVIII. On a new series of bodies in which nitrogen substituted for hydrogen. Philos Trans R Soc London 154:667–731

Griffin G, Wray EJ, Tao Q, McAllister SD, Rorrer WK, Aung M, Martin BR, Abood ME (1999) Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: Further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. Eur J Pharmacol 377:117–125

Hailer NP, Wirjatijasa F, Roser N, Hischebeth GTR, Korf HW, Dehghani F (2001) Astrocytic factors protect neuronal integrity and reduce microglial activation in an in vitro model of N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxic injury in organotypic hippocampal slice cultures. Eur J Neurosci 14:315–326

Hájos N, Ledent C, Freund TF (2001) Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. Neuroscience 106:1–4

Han X, Chen M, Wang F, Windrem M, Wang S, Shanz S, Xu Q, Oberheim NA, Bekar L, Betstadt S, Silva AJ, Takano T, Goldman SA, Nedergaard M (2013) Forebrain Engraftment by Human Glial Progenitor Cells Enhances Synaptic Plasticity and Learning in Adult Mice. Cell Stem Cell 12:342–353

Hansen HH, Schmid PC, Bittigau P, Lastres-Becker I, Berrendero F, Manzanares J, Ikonomidou C, Schmid HHO, Javier Fernández-Ruiz J, Hansen HS (2001) Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. J Neurochem 78:1415–1427

Hansson E (1984) Cellular composition of a cerebral hemisphere primary culture. Neurochem Res 9:153–172

Hansson E, Sellström A, Persson LI, Rönnbäck L (1980) Brain primary culture — a characterization. Brain Res 188:233–246

Haziot A, Ferrero E, Köntgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL, Goyert SM (1996) Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. Immunity 4:407–414

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J 374:1–20

Hibbs Jr. JB, Vavrin Z, Taintor RR (1987) L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. J Immunol 138:550–565

Ho WS, Hiley CR (2003) Vasodilator actions of abnormal-cannabidiol in rat isolated small mesenteric artery. Br J Pharmacol 138:1320–1332

Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes P V., Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D (2005) An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. Nature 435:1108–1112

Horwood NJ, Page TH, McDaid JP, Palmer CD, Campbell J, Mahon T, Brennan FM, Webster D, Foxwell BMJ (2006) Bruton's Tyrosine Kinase Is Required for TLR2 and TLR4-Induced TNF, but Not IL-6, Production. J Immunol 176:3635–3641

Hosomi N, Ban CR, Naya T, Takahashi T, Guo P, Song XYR, Kohno M (2005) Tumor necrosis factor-α neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 25:959–967

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, Qualy JM, Khachatrian LL (1986) Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. Mol Pharmacol 29:307–313

Janefjord E, Mååg JL V, Harvey BS, Smid SD (2014) Cannabinoid effects on β amyloid fibril and aggregate formation, neuronal and microglial-activated neurotoxicity in vitro. Cell Mol Neurobiol 34:31–42

Járai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer AM, Kunos G (1999) Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 96:14136–14141

Jin W, Shah ET, Penington CJ, McCue SW, Chopin LK, Simpson MJ (2016) Reproducibility of scratch assays is affected by the initial degree of confluence: Experiments, modelling and model selection. J Theor Biol 390:136–45

Johns DG, Behm DJ, Walker DJ, Ao Z, Shapland EM, Daniels DA, Riddick M, Dowell S, Staton PC, Green P, Shabon U, Bao W, Aiyar N, Yue T-L, Brown AJ, Morrison AD, Douglas SA (2009) The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. Br J Pharmacol 152:825–831

Juknat A, Pietr M, Kozela E, Rimmerman N, Levy R, Gao F, Coppola G, Geschwind D, Vogel Z (2013) Microarray and Pathway Analysis Reveal Distinct Mechanisms Underlying Cannabinoid-Mediated Modulation of LPS-Induced Activation of BV-2 Microglial Cells. PLoS One 8:e61462

Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG (2009) Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. Proc Natl Acad Sci U S A 106:6375–6380

Kallendrusch S, Hobusch C, Ehrlich A, Nowicki M, Ziebell S, Bechmann I, Geisslinger G, Koch M, Dehghani F (2012) Intrinsic up-regulation of 2-AG favors an area specific neuronal survival in different in vitro models of neuronal damage. PLoS One 7:e51208

Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, Nedergaard M (2008) Connexin 43 Hemichannels Are Permeable to ATP. J Neurosci 28:4702–4711

Katona I, Urbán GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF (2006) Molecular Composition of the Endocannabinoid System at Glutamatergic Synapses. J Neurosci 26:5628–5637

Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999) Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin. Immunity 11:115–122

Kelm M (1999) Nitric oxide metabolism and breakdown. Biochim Biophys Acta - Bioenerg 1411:273–289

Kettenmann H, Backus KH, Schachner M (1984) Aspartate, glutamate and γ-aminobutyric acid depolarize cultured astrocytes. Neurosci Lett 25–29

Kettenmann H, Hanisch U, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of Microglia. Physiol Rev 91:461–553

Kettenmann H, Verkhratsky A (2008) Neuroglia: the 150 years after. Trends Neurosci. 31:653–659

Kimelberg HK, Nedergaard M (2010) Functions of Astrocytes and their Potential As Therapeutic Targets. Neurotherapeutics 7:338–353

Kirkley KS, Popichak KA, Afzali MF, Legare ME, Tjalkens RB (2017) Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity. J Neuroinflammation 14:99

Kitagawa H, Sasaki C, Zhang WR, Sakai K, Shiro Y, Warita H, Mitsumoto Y, Mori T, Abe K (1999) Induction of glial cell line-derived neurotrophic factor receptor proteins in cerebral cortex and striatum after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. Brain Res 834:190–195

Klegeris A, Bissonnette CJ, McGeer PL (2003) Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. Br J Pharmacol 139:775–786

Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H (2003) The cannabinoid system and immune modulation. J Leukoc Biol 74:486–496

Knowles RG, Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J 298:249–258

Kohl A, Dehghani F, Korf HW, Hailer NP (2003) The bisphosphonate clodronate depletes microglial cells in excitotoxically injured organotypic hippocampal slice cultures. Exp Neurol 181:1–11

Kohno M, Hasegawa H, Inoue A, Muraoka M, Miyazaki T, Oka K, Yasukawa M (2006) Identification of N-arachidonylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18. Biochem Biophys Res Commun 347:827–832

Koprivica V, Cho KS, Park JB, Yiu G, Atwal J, Gore B, Kim JA, Lin E, Tessier-Lavigne M, Chen DF, He Z (2005) Neuroscience: EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans. Science 310:106–110

Kossmann T, Hans V, Imhof HG, Trentz O, Morganti-Kossmann MC (1996) Interleukin-6 released in human cerebrospinal fluid following traumatic brain injury may trigger nerve growth factor production in astrocytes. Brain Res 713:143–152

Kreutz S (2007) Einfluss des Cannabinoidsystems auf die exzitotoxische neuronale Schädigung : Untersuchungen am Modellsystem NMDA geschädigter organotypischer hippokampaler Schnittkulturen (OHSC) der Ratte [Dissertation]. Johann Wolfgang Goethe-Universität

Kreutz S, Koch M, Böttger C, Ghadban C, Korf HW, Dehghani F (2009) 2-Arachidonoylglycerol elicits neuroprotective effects on excitotoxically lesioned dentate gyrus granule cells via abnormal-cannabidiol-sensitive receptors on microglial cells. Glia 57:286–294

Kreutz S, Koch M, Ghadban C, Korf HW, Dehghani F (2007) Cannabinoids and neuronal damage: Differential effects of THC, AEA and 2-AG on activated microglial cells and degenerating neurons in excitotoxically lesioned rat organotypic hippocampal slice cultures. Exp Neurol 203:246–257

Kreutzberg GW (1996) Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19:312–318

Krohn RM, Parsons SA, Fichna J, Patel KD, Yates RM, Sharkey KA, Storr MA (2016) Abnormal cannabidiol attenuates experimental colitis in mice, promotes wound healing and inhibits neutrophil recruitment. J Inflamm (United Kingdom) 13:21

Kumamaru H, Saiwai H, Kobayakawa K, Kubota K, van Rooijen N, Inoue K, Iwamoto Y, Okada S (2012) Liposomal clodronate selectively eliminates microglia from primary astrocyte cultures. J Neuroinflammation 9:116

Kunos G, Bátkai S, Offertáler L, Mo F, Liu J, Karcher J, Harvey-White J (2002) The quest for a vascular endothelial cannabinoid receptor. Chem Phys Lipids 121:45–56

Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P (2010) Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol. 24:495–509

Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R, Fenger C, Nielsen HH, Haugaard LS, Wirenfeldt M, Nielsen M, Dagnaes-Hansen F, Bluethmann H, Faergeman NJ, Meldgaard M, Deierborg T, Finsen B (2009) Microglia Protect Neurons against Ischemia by Synthesis of Tumor Necrosis Factor. J Neurosci 29:1319–1330

Lassmann H, Schmied M, Vass K, Hickey WF (1993) Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. Glia 7:19–24

Lauckner JE, Jensen JB, Chen H-Y, Lu H-C, Hille B, Mackie K (2008) GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. Proc Natl Acad Sci 105:2699–2704

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. Neuroscience 39:151–170

Ledeboer A, Brevé JJP, Poole S, Tilders FJH, Van Dam AM (2000) Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-β differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. Glia 30:134–142

Lees GJ (1993) The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. J Neurol Sci 114:119–122

Lehnardt S (2010) Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in toll-like receptor-mediated neuronal injury. Glia 58:253–263

Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, Nodin C, Ståhlberg A, Aprico K, Larsson K, Yabe T, Moons L, Fotheringham A, Davies I, Carmeliet P, Schwartz JP, Pekna M, Kubista M, Blomstrand F, Maragakis N, Nilsson M, Pekny M (2008) Protective Role of Reactive Astrocytes in Brain Ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 28:468–481

Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung W-S, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature 541:481–487

Lin JHC, Weigel H, Cotrina ML, Liu S, Bueno E, Hansen AJ, Hansen TW, Goldman S, Nedergaard M (1998) Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. Nat Neurosci 1:494–500

Loddick SA, Turnbull A, Rothwell NJ (1998) Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab 18:176–179

Lu VB, Puhl HL, Ikeda SR (2013) N-Arachidonyl glycine does not activate G protein-coupled receptor 18 signaling via canonical pathways. Mol Pharmacol 83:267–282

Ma L, Jia J, Liu X, Bai F, Wang Q, Xiong L (2015) Activation of murine microglial N9 cells is attenuated through cannabinoid receptor CB2 signaling. Biochem Biophys Res Commun 458:92–97

Ma P, Liu HT, Wei P, Xu QS, Bai XF, Du YG, Yu C (2011) Chitosan oligosaccharides inhibit LPS-induced over-expression of IL-6 and TNF-α in RAW264.7 macrophage cells through blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K/Akt signaling pathways. Carbohydr Polym 84:1391–1398

Maccarrone M, Gubellini P, Bari M, Picconi B, Battista N, Centonze D, Bernardi G, Finazzi-Agrò A, Calabresi P (2003) Levodopa treatment reverses endocannabinoid system abnormalities in experimental parkinsonism. J Neurochem 85:1018–1025

Mackie K, Stella N (2006) Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Evidence for New Players. AAPS J 08:E298–E306

Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN (2005) Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. J Neurochem 95:437–445

Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Ortega-Gutiérrez S, Van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. Science 302:84–88

Martin-Moreno AM, Reigada D, Ramirez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, de Ceballos ML (2011) Cannabidiol and Other Cannabinoids Reduce Microglial Activation In Vitro and In Vivo: Relevance to Alzheimer's Disease. Mol Pharmacol 79:964–973

Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep 6:13

März P, Herget T, Lang E, Otten U, Rose-John S (1997) Activation of gp130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation. Eur J Neurosci 9:2765–2773

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

Matyash V, Kettenmann H (2010) Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. Brain Res Rev 63:2–10

McCoy KL (2016) Interaction between Cannabinoid System and Toll-Like Receptors Controls Inflammation. Mediators Inflamm 2016:1–18

McGarry LJ, Thompson D, Millham FH, Cowell L, Snyder PJ, Lenderking WR, Weinstein MC (2002) Outcomes and costs of acute treatment of traumatic brain injury. J Trauma 53:1152–1159

McHugh D, Hu SS, Rimmerman N, Juknat A, Vogel Z, Walker JM, Bradshaw HB (2010) N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. BMC Neurosci 11:44

McHugh D, Wager-Miller J, Page J, Bradshaw HB (2012) siRNA knockdown of GPR18 receptors in BV-2 microglia attenuates N-arachidonoyl glycine-induced cell migration. J Mol Signal 7:10

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (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

Mechoulam R, Hanuš L (2000) A historical overview of chemical research on cannabinoids. Chem Phys Lipids 108:1–13

Mechoulam R, Parker L a. (2013) The Endocannabinoid System and the Brain. Annu Rev Psychol 64:21–47

Mechoulam R, Shani A, Edery H, Grunfeld Y (1970) Chemical Basis of Hashish Activity. Science 169:611–612

Mechoulam R, Shvo Y (1963) The Structure of Cannabidiol. Tetrahedron 19:2073–2078

Medina S, Martínez M, Hernanz A (2002) Antioxidants Inhibit the Human Cortical Neuron Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide, Tumor Necrosis Factor Alpha, Dopamine and Beta-amyloid Peptide 1-42. Free Radic Res 36:1179–1184

Miguel RN, Wong J, Westoll JF, Brooks HJ, O'Neill LAJ, Gay NJ, Bryant CE, Monie TP (2007) A dimer of the toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. PLoS One 2:e788

Mikkelsen RB, Wardman P (2003) Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. Oncogene 22:5734–5754

Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, Heikenwalder M, Brück W, Priller J, Prinz M (2007) Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. Nat Neurosci 10:1544–1553

Milman G, Maor Y, Abu-Lafi S, Horowitz M, Gallily R, Batkai S, Mo F-M, Offertaler L, Pacher P, Kunos G, Mechoulam R (2006) N-arachidonoyl L-serine, an endocannabinoid-like brain constituent with vasodilatory properties. Proc Natl Acad Sci U S A 103:2428–2433

Mishima K, Hayakawa K, Abe K, Ikeda T, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M (2005) Cannabidiol Prevents Cerebral Infarction Via a Serotonergic 5-Hydroxytryptamine1A Receptor-Dependent Mechanism. Stroke 36:1071–1076

Molina-Holgado F, Lledó A, Guaza C (1997) Anandamide suppresses nitric oxide and TNF-α responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. Neuroreport 8:1929–1933

Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C (1998) The endogenous cannabinoid anandamide potentiates interleukin-6 production by astrocytes infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus by a receptor-mediated pathway. FEBS Lett 433:139–142

Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C, Rothwell NJ (2002) Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures. J Neurosci Res 67:829–836

Mönkkönen H, Rogers MJ, Makkonen N, Niva S, Auriola S, Mönkkönen J (2001) The cellular uptake and metabolism of clodronate in RAW 264 macrophages. Pharm Res 18:1550–1555

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

Murikinati S, Juttler E, Keinert T, Ridder DA, Muhammad S, Waibler Z, Ledent C, Zimmer A, Kalinke U, Schwaninger M (2010) Activation of cannabinoid 2 receptors protects against cerebral ischemia by inhibiting neutrophil recruitment. FASEB J 24:788–798

Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. Nat Immunol 3:667–672

Nakanishi H, Zhang J, Koike M, Nishioku T, Okamoto Y, Kominami E, Von Figura K, Peters C, Yamamoto K, Saftig P, Uchiyama Y (2001) Involvement of nitric oxide released from microglia-macrophages in pathological changes of cathepsin D-deficient mice. J Neurosci 21:7526–7533

Nakazawa T, Takeda M, Lewis GP, Cho K-S, Jiao J, Wilhelmsson U, Fisher SK, Pekny M, Chen DF, Miller JW (2007) Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin. Invest Ophthalmol Vis Sci 48:2760–2768

Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde YA (2002) Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism. J Neurosci 22:854–862

Nicholls DG (2004) Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. Curr Mol Med 4:149–177

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science 308:1314–1318

Núñez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, González S, Tolón RM, Romero J (2004) Cannabinoid CB 2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: An immunohistochemical study. Synapse 53:208–213

O'Keefe GM, Nguyen VT, Benveniste EN (2002) Regulation and function of class II major histocompatibility complex, CD40, and B7 expression in macrophages and microglia: Implications in neurological diseases. J. Neurovirol. 8:496–512

Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JHC, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M (2009) Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. J Neurosci 29:3276–3287

Offertáler L, Mo FM, Bátkai S, Liu J, Begg M, Razdan RK, Martin BR, Bukoski RD, Kunos G (2003) Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. Mol Pharmacol 63:699–705

Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T (2007) Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. Biochem Biophys Res Commun 362:928–934

Olmos G, Lladó J (2014) Review Article Tumor Necrosis Factor Alpha : A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity. Mediators Inflamm 2014:861231

Olson JK, Miller SD (2004) Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. J Immunol 173:3916–3924

Ortar G, Ligresti A, De Petrocellis L, Morera E, Di Marzo V (2003) Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake. Biochem Pharmacol 65:1473–1481

Pacher P, Bátkai S, Kunos G (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacol Rev 58:389–462

Pagano C, Rossato M, Vettor R (2008) Endocannabinoids, Adipose Tissue and Lipid Metabolism. J Neuroendocrinol 20:124–129

Pahan K, Namboodiri AMS, Sheikh FG, Smith BT, Singh I (1997) Increasing cAMP attenuates induction of inducible nitric-oxide synthase in rat primary astrocytes. J Biol Chem 272:7786–7791

Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. Immunology 113:153–162

Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanuš L, Breuer A, Mechoulam R, Shohami E (2001) An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. Nature 413:527–531

Park SK, Murphy S (1994) Duration of expression of inducible nitric oxide synthase in glial cells. J Neurosci Res 39:405–411

Park T, Chen H, Kevala K, Lee J-W, Kim H-Y (2016) N-Docosahexaenoylethanolamine ameliorates LPS-induced neuroinflammation via cAMP/PKA-dependent signaling. J Neuroinflammation 13:284

Parmentier-Batteur S, Jin K, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice. J Neurosci 22:9771–9775

Paton WDM (1975) Pharmacology of marijuana. Annu Rev Pharmacol 15:191–220

Pekny M, Pekna M (2014) Astrocyte Reactivity and Reactive Astrogliosis: Costs and Benefits. Physiol Rev 94:1077–1098

Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M (2014) The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. Neurosci Lett 565:30–38

Perel P, Roberts I, Bouamra O, Woodford M, Mooney J, Lecky F (2009) Intracranial bleeding in patients with traumatic brain injury: A prognostic study. BMC Emerg Med 9:15

Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. Nat Rev Neurosci 4:873–884

Priller J, Flügel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernández-Klett F, Prass K, Bechmann I, De Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U (2001) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. Nat Med 7:1356–1361

Puffenbarger RA, Boothe AC, Cabral GA (2000) Cannabinoids inhibit LPS-inducible cytokine mRNA expression in rat microglial cells. Glia 29:58–69

Razdan RK, Dalzell HC, Handrick GR (1974) Hashish. X. A Simple One-Step Synthesis of (-)-Δ1-Tetrahydrocannabinol (THC) from p-Mentha-2,8-dien-1-ol and Olivetol. J Am Chem Soc 96:5860–5865

Reiner A, Levitz J (2018) Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. Neuron 98:1080–1098

Reyes-Resina I, Navarro G, Aguinaga D, Canela EI, Schoeder CT, Załuski M, Kieć-Kononowicz K, Saura CA, Müller CE, Franco R (2018) Molecular and functional interaction between GPR18 and cannabinoid CB2 G-protein-coupled receptors. Relevance in neurodegenerative diseases. Biochem Pharmacol 157:169–179

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function. Trends Neurosci 20:570–577

Rosenberger K, Dembny P, Derkow K, Engel O, Krüger C, Wolf SA, Kettenmann H, Schott E, Meisel A, Lehnardt S (2015) Intrathecal heat shock protein 60 mediates neurodegeneration and demyelination in the CNS through a TLR4- and MyD88-dependent pathway. Mol Neurodegener 10:5

Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson N-O, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2009) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. Br J Pharmacol 152:1092–1101

Sagan S, Venance L, Torrens Y, Cordier J, Glowinski J, Giaume C (1999) Anandamide and WIN 55212-2 inhibit cyclic AMP formation through G-protein-coupled receptors distinct from CB1 cannabinoid receptors in cultured astrocytes. Eur J Neurosci 11:691–699

Saijo K, Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. Nat Rev Immunol 11:775–787

Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH, Glass CK (2009) A Nurr1/CoREST Pathway in Microglia and Astrocytes Protects Dopaminergic Neurons from Inflammation-Induced Death. Cell 137:47–59

Samuelson LC, Swanberg LJ, Gantz I (1996) Mapping of the novel G protein-coupled receptor Gprl8 to distal mouse chromosome 14. Mamm Genome 7:920–921

Santos-Galindo M, Acaz-Fonseca E, Bellini MJ, Garcia-Segura LM (2011) Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide. Biol Sex Differ 2:7

Sattler R, Tymianski M (2001) Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. Mol Neurobiol 24:107–129

Saura J (2007) Microglial cells in astroglial cultures: A cautionary note. J Neuroinflammation 4:1–11

Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T (1989) Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. Brain Res 491:394–397

Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T (1992) TNFα induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. Brain Res 583:296–299

Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HHQ, George SR, O'Dowd BF (1999) Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, ΨGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. Mol Brain Res 64:193–198

Schilling T, Nitsch R, Heinemann U, Haas D, Eder C (2001) Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K+channel expression in microglia via distinct signalling pathways. Eur J Neurosci 14:463–473

Schlicker E, Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. Trends Pharmacol Sci 22:565–572

Schousboe A, Waagepetersen HS (2005) Role of astrocytes in glutamate homeostasis: Implications for excitotoxicity. Neurotox Res 8:221–225

Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT (2001) Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. J Exp Med 194:79–88

Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. Science 249:1429–1431

Sheng W, Hu S, Kravitz F (1995) Tumor necrosis factor alpha upregulates human microglial cell production of interleukin-10 in vitro. Clin Diagn Lab Immunol 2:604–608

Sheng WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson PK (2005) Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1β-stimulated human astrocytes. Glia 49:211–219

Shinozaki Y, Shibata K, Yoshida K, Shigetomi E, Gachet C, Ikenaka K, Tanaka KF, Koizumi S (2017) Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y1 Receptor Downregulation. Cell Rep 19:1151–1164

Shohami E, Cohen-Yeshurun A, Magid L, Algali M, Mechoulam R (2011) Endocannabinoids and traumatic brain injury. Br J Pharmacol 163:1402–1410

Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME (1996) Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. J Pharmacol Exp Ther 278:969–999

Sierra A, de Castro F, del Río-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H (2016) The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. Glia 64:1801–1840

Smith M (2003) Diffuse axonal injury in adults. Trauma 5:227–234

Sofroniew M V (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. Trends Neurosci. 32:638–647

Solà C, Casal C, Tusell JM, Serratosa J (2002) Astrocytes enhance lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by microglial cells. Eur J Neurosci 16:1275–1283

Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988) Functional plasticity of microglia: A review. Glia 1:301–307

Su JY, Vo AC (2007) 2-Arachidonylglyceryl ether and abnormal cannabidiol-induced vascular smooth muscle relaxation in rabbit pulmonary arteries via receptor-pertussis toxin sensitive G proteins-ERK1/2 signaling. Eur J Pharmacol 559:189–195

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

Suzuki T (2004) Production and Release of Neuroprotective Tumor Necrosis Factor by P2X7 Receptor-Activated Microglia. J Neurosci 24:1–7

Tabernero A, Medina JM, Giaume C (2006) Glucose metabolism and proliferation in glia: Role of astrocytic gap junctions. J. Neurochem. 99:1049–1061

Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. Cell 140:805–820

Thomas DM, Francescutti-Verbeem DM, Kuhn DM (2006) Gene expression profile of activated microglia under conditions associated with dopamine neuronal damage. FASEB J 20:515–517

Trapp BD, Wujek JR, Criste GA, Jalabi W, Yin X, Kidd GJ, Stohlman S, Ransohoff R (2007) Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. Glia 55:360–368

Tsacopoulos M, Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. J Neurosci 16:877–885

Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. Neuroscience 83:393–411

Tzingounis A, Wadiche J (2007) Glutamate transporters: Confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. Nat. Rev. Neurosci. 8:935–947

Ulrich MS (2012) Einfluss des Endocannabinoid Analogons abnormal Cannabidiol auf die Schadensentwicklung und funktionelle Erholung nach kontrollierter kortikaler Kontusion bei der Ratte [Dissertation]. Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Van Der Stelt M, Di Marzo V (2005) Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. In: Prostaglandins and Other Lipid Mediators. S 111–122

Van Wagoner NJ, Benveniste EN (1999) Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. J. Neuroimmunol. 100:124–139

Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JA, Segal DM (2001) Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. Proc Natl Acad Sci 98:12156–12161

Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LBJ, Tiwari-Woodruff S, Sofroniew M V. (2009) Reactive Astrocytes Form Scar-Like Perivascular Barriers to Leukocytes during Adaptive Immune Inflammation of the CNS. J Neurosci 29:11511–11522

Wagner JA, Varga K, Járai Z, Kunos G, Jarai Z, Kunos G (1999) Mesenteric Vasodilation Mediated by Endothelial Anandamide Receptors. Hypertension 33:429–434

Wall EA, Zavzavadjian JR, Mi CS, Randhawa B, Zhu X, Hsueh RC, Liu J, Driver A, Bao XR, Sternweis PC, Simon MI, Fraser IDC (2009) Suppression of LPS-induced TNF-α production in macrophages by cAMP Is mediated by PKA-AKAP95-p105. Sci Signal 2:ra28

Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. J Neurosci 23:1398–1405

Wang N, Yao F, Li K, Zhang L, Yin G, Du M, Wu B (2017) Fisetin regulates astrocyte migration and proliferation in vitro. Int J Mol Med 39:783–790

Wartmann M, Campbell D, Subramanian A, Burstein SH, Davis RJ (1995) The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. FEBS Lett 359:133–136

Werner C, Engelhard K (2007) Pathophysiology of traumatic brain injury. Br J Anaesth 99:4–9

Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di Nisio M, Duffy S, Hernandez A V., Keurentjes JC, Lang S, Misso K, Ryder S, Schmidlkofer S, Westwood M, Kleijnen J (2015) Cannabinoids for medical use: A systematic review and meta-analysis. JAMA - J. Am. Med. Assoc. 313:2456–2473

Wilhelmsson U, Li L, Pekna M, Berthold C-H, Blom S, Eliasson C, Renner O, Bushong E, Ellisman M, Morgan TE, Pekny M (2004) Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. J Neurosci 24:5016–5021

Wilms H, Hartmann D, Sievers J (1997) Ramification of microglia, monocytes and macrophages in vitro: Influences of various epithelial and mesenchymal cells and their conditioned media. Cell Tissue Res 287:447–458

Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. Nature 410:588–592

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. Science 301:640–643

Yang QW, Xiang J, Zhou Y, Zhong Q, Li JC (2010) Targeting HMGB1/TLR4 signaling as a novel approach to treatment of cerebral ischemia. Front Biosci (Schol Ed) 2:1081–1091

Yin H, Chu A, Li W, Wang B, Shelton F, Otero F, Nguyen DG, Caldwell JS, Chen YA (2009) Lipid G Protein-coupled Receptor Ligand Identification Using β-Arrestin PathHunter™ Assay. J Biol Chem 284:12328–12338

Yoshida K, Gage FH (1992) Cooperative regulation of nerve growth factor synthesis and secretion in fibroblasts and astrocytes by fibroblast growth factor and other cytokines. Brain Res 569:14–25

Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis. J Neurosci 32:6391–6410

Zarruk JG, Fernández-López D, García-Yébenes I, García-Gutiérrez MS, Vivancos J, Nombela F, Torres M, Burguete MC, Manzanares J, Lizasoain I, Moro MA (2012) Cannabinoid type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection. Stroke 43:211–219

Zhang J, Hoffert C, Vu HK, Groblewski T, Ahmad S, O'Donnell D (2003) Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. Eur J Neurosci 17:2750–2754

Zhang M, Adler MW, Abood ME, Ganea D, Jallo J, Tuma RF (2009) CB2 receptor activation attenuates microcirculatory dysfunction during cerebral ischemic/reperfusion injury. Microvasc Res 78:86–94

Zhang M, Martin BR, Adler MW, Razdan RK, Jallo JI, Tuma RF (2007) Cannabinoid CB 2 Receptor Activation Decreases Cerebral Infarction in a Mouse Focal Ischemia/Reperfusion Model. J Cereb Blood Flow Metab 27:1387–1396

Zhao W, Xie W, Le W, Beers DR, He Y, Henkel JS, Simpson EP, Yen AA, Xiao Q, Appel SH (2004) Activated microglia initiate motor neuron injury by a nitric oxide and glutamate-mediated mechanism. J Neuropathol Exp Neurol 63:964–977

Zhou T, Zhu Y (2019) Cascade Signals of Papaverine Inhibiting LPS-Induced Retinal Microglial Activation. J Mol Neurosci 68:111–119

Zielasek J, Tausch M, Toyka K V, Hartung HP (1992) Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/ brain macrophages. Cell Immunol 141:111–120

Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. Nat Neurosci 6:43–50

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Thesen der Dissertation:

Neuroprotektive Effekte und Modulation von glialer Inflammation durch abnormal Cannabidiol

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Julian Cardinal von Widdern
geboren am 18.09.1990 in Düsseldorf

8 Thesen

1. Abnomal Cannabidiol verzögert im Scratch-Wound Assay den Wundschluss bei Anwesenheit von Mikrogliazellen.
2. Abnomal Cannabidiol reduziert die Produktion von Stickstoffmonoxid in astrozytär-mikrogliären Mischkulturen nach einer Stimulation mit Lipopolysacchariden.
3. Abnomal Cannabidiol reduziert die Produktion von Tumornekrosefaktor-α in astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen nach einer Stimulation mit Lipopolysacchariden.
4. Die Beeinflussung der Stickstoffmonoxid- und Tumornekrosefaktor-α-Produktion durch abnormal Cannabidiol ist unabhängig von der Funktionsfähigkeit des Cannabinoidrezeptors 2.
5. Abnormal Cannabidiol hat keinen Einfluss auf die Interleukin-6-Produktion in mit Lipopolysacchariden stimulierten astrozytär-mikrogliären Mischkulturen und isolierten Astrozytenkulturen.
6. Ein Knockout des Cannabinoidrezeptors 2 geht mit einer veränderten Zytokin- und Stickstoffmonoxid-Produktion von Astrozyten und Mikrogliazellen nach einer Stimulation mit Lipopolysacchariden einher.
7. Die oben genannten Punkte liefern Erklärungsansätze für die neuroprotektive Wirkung von abnormal Cannabidiol im *in vivo* Modell der traumatischen Hirnschädigung.

Erklärungen

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater und andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle, den 18.06.2020

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Faramarz Dehghani für die exzellente Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Lieber Faramarz vielen Dank für deine stets konstruktive Kritik, deine Bereitschaft jederzeit wissenschaftliche und auch weniger wissenschaftliche Themen mit mir zu diskutieren, sowie das große Vertrauen, welches du mir von Anfang an entgegenbrachtest.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Markwardt, der bereitwillig die Zweitbetreuung meiner Arbeit übernahm, sich detailliert mit meinen Ergebnissen auseinandersetzte und konstruktive Hinweise gab.

Vielen Dank an Chalid Ghadban, der meine ersten Gehversuche im Labor betreute, mir mit unendlicher Geduld die methodischen Grundlagen beibrachte und mir auch im weiteren Verlauf immer hilfsbereit zur Seite stand.

Ich möchte mich besonders herzlich bei Urszula und Tim Hohmann bedanken, die meine Arbeit inhaltlich begleitet haben und mich freundschaftlich in die Arbeitsgruppe aufnahmen. Vielen Dank für die Unterstützung und die vielen lustigen Momente.

Vielen Dank an Philip Pieroh, Kerstin Feese, Carolin Vogel, Marc Kolbe, Miriam Schmidt, Joshua Kleine, Markus Pelzer, Sebastian Laabs, Christoph Walsleben und alle anderen die ich jetzt vergessen habe. Ihr alle habt zur kollegialen und freundschaftlichen Atmosphäre in der Arbeitsgruppe beigetragen.