

**Pharmakologische und epigenetische Beeinflussung des  
Cannabinoid CB<sub>1</sub>-Rezeptors und Wechselwirkung mit  
präsynaptischen Auto- und Heterorezeptoren**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Bernd Jergas**  
aus Köln  
2014

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. E. Schlicker
2. Gutachter: PD Dr. A. Bilkei-Gorzo

Datum der Mündlichen Prüfung: 17. April 2014

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Direktor: Prof. Dr. A. Pfeiffer

Für meinen Bruder,  
meine Eltern  
und Monika.



## Inhaltsverzeichnis

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b> .....  | 7  |
| 1.1       | Cannabis und Cannabinoide .....  | 7  |
| 1.1.1     | Cannabis .....   | 7  |
| 1.1.2     | Cannabinoide .....   | 7  |
| 1.2       | Cannabinoid-Rezeptor-1 (CB <sub>1</sub> -Rezeptor) .....   | 9  |
| 1.3       | Endogener Tonus am CB <sub>1</sub> -Rezeptor .....   | 11 |
| 1.4       | Epigenetische Beeinflussung des CB <sub>1</sub> -Rezeptors? .....  | 12 |
| 1.5       | Ziele dieser Arbeit .....  | 14 |
| <br>      |  |    |
| <b>2.</b> | <b>Material und Methoden</b> .....   | 15 |
| 2.1       | Versuchsanordnung .....  | 15 |
| 2.2       | Berechnung und Statistik .....   | 16 |
| 2.2.1     | Berechnung der basalen und stimulierten Tritiumfreisetzung .....   | 16 |
| 2.2.2     | Berechnung pharmakologischer Wirkstärken .....   | 17 |
| 2.2.3     | Statistik .....  | 18 |
| 2.3       | Verwendete Substanzen .....  | 19 |
| 2.4       | Verwendete Geräte und Materialien .....  | 21 |
| <br>      |  |    |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b> .....  | 22 |
| 3.1       | Allgemeines .....  | 22 |
| 3.2       | Vergleich des inversen Agonisten Rimonabant und des neutralen Antagonisten O-2050 .....                        | 22 |
| 3.2.1     | Ermittlung der antagonistischen Wirkstärke von O-2050 .....  | 22 |
| 3.2.2     | Vergleich von Rimonabant und O-2050 bei alleiniger Gabe .....  | 25 |
| 3.3       | Epigenetische Beeinflussung: Wirkung auf präsynaptische CB <sub>1</sub> -Rezeptoren ..                         | 26 |
| 3.4       | Wechselwirkung zwischen präsynaptischem CB <sub>1</sub> -Rezeptor und Muscarinrezeptor (M <sub>2</sub> ) ..... | 30 |
| 3.4.1     | Interaktion von Oxotremorin und Rimonabant .....   | 30 |
| 3.4.2     | Interaktion von Oxotremorin und WIN 55,212-2 .....   | 34 |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.5       | Charakterisierung inhibitorischer präsynaptischer Heterorezeptoren .....  | 38        |
| 3.5.1     | DPDPE .....   | 41        |
| 3.5.2     | R-PIA.....  | 43        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion</b> .....   | <b>44</b> |
| 4.1       | Versuchsbedingungen.....  | 44        |
| 4.2       | O-2050: Neutraler Antagonist oder inverser Agonist? .....   | 46        |
| 4.2.1     | Rimonabant .....  | 46        |
| 4.2.2     | O-2050 .....  | 49        |
| 4.3       | Epigenetische Beeinflussung: Wirkung auf präsynaptische CB <sub>1</sub> -Rezeptoren? .....                        | 51        |
| 4.4       | Wechselwirkung zwischen präsynaptischem CB <sub>1</sub> -Rezeptor und<br>Muscarinrezeptor (M <sub>2</sub> ) ..... | 57        |
| 4.4.1     | Blockade des CB <sub>1</sub> -Rezeptors durch Rimonabant .....  | 59        |
| 4.4.2     | Aktivierung des CB <sub>1</sub> -Rezeptors durch WIN 55,212-2 .....   | 60        |
| 4.4.3     | Versuche mit Knock-out (CB <sub>1</sub> <sup>-/-</sup> )-Mäusen.....  | 61        |
| 4.5       | Inhibitorische Heterorezeptoren am cholinergen Neuron .....   | 62        |
| 4.5.1     | δ-Opioid-Rezeptor .....   | 64        |
| 4.5.2     | Adenosin A <sub>1</sub> -Rezeptor .....   | 65        |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung</b> .....  | <b>67</b> |
| <b>6.</b> | <b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....  | <b>69</b> |
| <b>7.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b> .....   | <b>71</b> |
| <b>8.</b> | <b>Danksagung</b> .....   | <b>78</b> |

# 1. Einleitung

## 1.1 Cannabis und Cannabinoide

### 1.1.1 Cannabis

Cannabis ist nicht nur in Deutschland die am häufigsten gebrauchte und gehandelte Droge, sondern weltweit. In frühen historischen Aufzeichnungen findet sich Cannabis als die erste in menschlichem Gebrauch befindliche Droge. Bereits 300 n. Chr. beschrieben chinesische Geschichtsschreiber die medizinischen Eigenschaften der Extrakte der Hanfpflanze (*Cannabis sativa*) als schmerz- und krampflösende Substanz. Auch in Indien waren schon vor mehr als 3000 Jahren die angstlösenden Eigenschaften von Cannabis bekannt (Pacher et al., 2006). Der Gebrauch von Cannabis als psychoaktive Substanz erreichte Europa und Amerika über die arabische Welt im 19. Jahrhundert. Als nach und nach die Gefahren und Nebenwirkungen (inkl. Missbrauchspotenzial) der bis dahin in breitem medizinischen Einsatz befindlichen Substanz bekannt wurden, war zunächst ab 1937 der weitere Gebrauch untersagt (Pacher et al., 2006).

Als besonders schwere Nebenwirkung fielen immer häufiger cannabisinduzierte Psychosen auf. Bis heute gibt es eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die die Prävalenz und Pathologie dieser Psychosen untersucht haben. Cannabis kann ein breites Spektrum von Psychosen auslösen, die aber keinesfalls einem cannabistypischen Bild entsprechen (Mathers und Ghodse, 1992), sondern überwiegend als schizophreniform klassifiziert werden (Thornicroft, 1990). Das Psychoserisiko steigt progredient mit der Häufigkeit des Cannabiskonsums (Andréasson et al., 1987).

### 1.1.2 Cannabinoide

Cannabis ist der Oberbegriff für verschiedene Produkte aus der Hanfpflanze. Die getrockneten und zerkleinerten harzhaltigen Pflanzenteile werden als Marihuana oder Cannabiskraut bezeichnet. Das aus den Blüten und Blättern gewonnene Harz nennt man Haschisch oder Cannabisharz. Die Wirkstoffe der Cannabispflanze sind die Cannabinoide, insbesondere das (-)- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC) (Robert-Koch-Institut, 2013). In einem weiteren Sinne wird der Begriff „Cannabinoide“ auch für Stoffe gebraucht, die Cannabinoid-Rezeptoren aktivieren, ohne aus der Cannabis-Pflanze gewonnen zu werden (Pertwee, 2005 a).

Lange Zeit war der Wirkmechanismus der Cannabinoide unklar. Die Fachwelt hielt unspezifische Membranwirkungen für die Effekte der Cannabinoide verantwortlich. 1988 konnte diese Theorie widerlegt werden. Mit der Entwicklung der Radioligand-Bindungsstudien zeigten Devane et al. (1988), dass die Wirkungen der Cannabinoide via spezifischer Cannabinoid-Rezeptoren vermittelt werden. Diese Tatsache konnte mit der Klonierung zweier Cannabinoid-Rezeptoren bewiesen werden. Hierbei handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Rhodopsin-Familie mit sieben transmembranären Helices, extrazellulärem N- und intrazellulärem C-Terminus. 1990 konnte der spätere CB<sub>1</sub>-Rezeptor kloniert werden. Dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor wird im Gehirn in hoher Dichte exprimiert (Matsuda et al., 1990). In deutlich geringerer Dichte findet sich der CB<sub>1</sub>-Rezeptor allerdings auch in diversen peripheren Geweben und Zellen (Pacher et al., 2006).

Ein zweiter Cannabinoid-Rezeptor, der CB<sub>2</sub>-Rezeptor, konnte von Munro et al. (1993) kloniert werden. Dieser ist im Gegensatz zum CB<sub>1</sub>-Rezeptor überwiegend in der Peripherie lokalisiert. Er findet sich in Zellen des Immunsystems und des hämatopoetischen Systems, also Milz, Thymus, Knochenmark, Tonsillen und Lymphknoten (Munro et al., 1993). In immunohistochemischen Studien konnten CB<sub>2</sub>-Rezeptoren aber auch in perivaskulären Mikrogliazellen des zentralen Nervensystems (ZNS) nachgewiesen werden (Nunez et al., 2004).

Nachdem zwei Rezeptoren charakterisiert waren, kam die Frage nach endogenen Liganden auf. Eine positive Antwort brachte die Isolation von Anandamid aus Schweinehirn, welches ebenfalls an den Cannabinoid-Rezeptor im Gehirn bindet und gleiche Effekte wie THC hervorruft (Devane et al., 1992). Drei Jahre später konnte mit 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) ein weiteres endogenes Cannabinoid beschrieben werden (Sugiura et al., 1995). Endogene Cannabinoide, die eine hohe Lipophilie besitzen, werden nicht wie klassische Neurotransmitter in Vesikeln gespeichert, sondern „bei Bedarf“ gebildet und direkt freigesetzt (De Petrocellis et al., 2004). Die Wirkdauer ist durch die rasche Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt in die Zellen und dem anschließenden Abbau begrenzt (Di Marzo et al., 1994). Der Rücktransport in die Zellen



erfolgt vermutlich über einen erleichterten Kotransport mit Natrium (De Petrocellis et al., 2004).

Insgesamt bietet die genaue Erforschung der pharmakologischen Effekte der Cannabinoide und Interaktion an den Cannabinoid-Rezeptoren auf zellulärer Ebene neue molekulare Ansätze in der Pharmakotherapie. Diese neuen Ansätze ermöglichen eine deutlich genauere Steuerung im therapeutischen Einsatz der Cannabinoide im Vergleich zum historischen Gebrauch von Phytocannabinoiden der Hanfpflanze. So ist Sativex<sup>®</sup> (Nabiximols: Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol) in der Behandlung mäßiger und schwerer Spastiken aufgrund einer Multiplen Sklerose (MS) auch in Deutschland zugelassen. Die MOVE-2-Studie (MObility ImproVEments with Spasticity in Multiple Sclerosis) konnte die Wirksamkeit und Sicherheit von Sativex<sup>®</sup> in der täglichen klinischen Praxis belegen: die Studiendaten konnten nachweisen, dass 41 % der Patienten, die mit Sativex<sup>®</sup> behandelt wurden und auf andere Therapie nicht ansprachen, bereits nach drei Monaten eine klinisch relevante Wirkung zeigten (Novotna et al., 2011).

Ein ähnlich vielversprechender Ansatz zeigte sich auch in ersten Studien zur Behandlung der Adipositas mit Acomplia<sup>®</sup> (Rimonabant: inverser Agonist am CB<sub>1</sub>-Rezeptor). Doch bereits zwei Jahre nach der Zulassung 2006 musste Acomplia<sup>®</sup> aufgrund des Nebenwirkungsprofils wieder vom Markt genommen werden (siehe weiter unten, 1.3 Endogener Tonus).

## **1.2 Cannabinoid-Rezeptor-1 (CB<sub>1</sub>-Rezeptor)**

Der CB<sub>1</sub>-Rezeptor ist überwiegend präsynaptisch lokalisiert. Die Effekte einer Beeinflussung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors wirken sich intrazellulär über rezeptorgekoppelte G<sub>i/o</sub>-Proteine aus (van Diepen et al., 2008). Die Signaltransduktionskaskade des CB<sub>1</sub>-Rezeptors ist außerordentlich komplex und umfasst mindestens vier Wege (nach Pacher et al., 2006):

- (1) Die Hemmung der Adenylatzyklase führt zur Abnahme des cAMP-Spiegels.

- (2) Die Hemmung spannungabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom N- und P/Q-Typ führt zu einem reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom.
- (3) Die Aktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle vom A-Typ und spannungsunabhängiger Kaliumkanäle vom GIRK-Typ führt zu erhöhtem Kaliumausstrom und somit zu einer Hyperpolarisation.
- (4) Die Aktivierung von Rezeptorproteinkinasen, wie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase), und die Bildung von Ceramid spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation und der Apoptose.

Die Aktivierung des  $\text{CB}_1$ -Rezeptors führt zu einer Inhibition der Freisetzung verschiedenster Neurotransmitter, d. h. dieser Rezeptor fungiert als präsynaptischer inhibitorischer Rezeptor. Dies wurde an noradrenergen Neuronen besonders intensiv untersucht. Solche inhibitorischen präsynaptischen Rezeptoren gibt es auch für andere Mediatoren (oder Überträgerstoffe) als die Cannabinode, etwa für Opioide, die über Opioid-Rezeptoren  $\delta$  ( $\text{OP}_1$ ),  $\kappa$  ( $\text{OP}_2$ ) und  $\mu$  ( $\text{OP}_3$ ) wirken (Trendelenburg et al., 2000), für Prostaglandin- $\text{E}_2$ , das über den  $\text{EP}_3$ -Rezeptor wirkt (Günther et al., 2010), und für Noradrenalin, welches über  $\alpha_2$ -Rezeptoren wirkt (Schlicker et al., 1994). Der letztgenannte Rezeptor wird als präsynaptischer Autorezeptor bezeichnet, während es sich bei den davor genannten Rezeptoren um präsynaptische Heterorezeptoren handelt (Starke, 1977). Darüber hinaus konnte am noradrenergen Neuron auch gezeigt werden, dass diese präsynaptischen Rezeptoren ihre Effekte nicht unabhängig voneinander vermitteln, sondern sich gegenseitig beeinflussen. So ist eine Wechselwirkung zwischen dem  $\alpha_2$ -Autorezeptor und dem  $\text{A}_1$ -Rezeptor (Allgaier et al., 1991),  $\text{CB}_1$ -Rezeptor (Schlicker und Göthert, 1998),  $\text{OP}_1$ -Rezeptor (Ramme et al., 1986),  $5\text{-HT}_{1\text{B}}$ -Rezeptor (Molderings und Göthert, 1990) sowie  $\text{M}_2$ -Rezeptor (Loiacono et al., 1985) nachgewiesen worden.

Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen präsynaptisch lokalisierten Rezeptoren auch am cholinergen Neuron sind in der Literatur beschrieben (siehe Diskussion). Allerdings gibt es bislang keine Untersuchungen dazu, ob konkret zwischen dem  $\text{M}_2$ -

Rezeptor und dem CB<sub>1</sub>-Rezeptor eine Wechselwirkung am cholinergen Neuron im Hippocampus besteht. Ferner finden sich in der Literatur keine Hinweise darauf, ob es neben dem M<sub>2</sub>- und CB<sub>1</sub>-Rezeptor noch weitere inhibitorische Rezeptoren an der präsynaptischen Membran des cholinergen Neurons im Hippocampus gibt.

### 1.3 Endogener Tonus am CB<sub>1</sub>-Rezeptor

Abgesehen von der Bedeutung von exogen zugeführten Cannabinoiden zeigte sich, dass den endogenen Cannabinoiden eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen zugeschrieben werden kann (van Diepen et al., 2008). Die endogenen Cannabinoide, die beiden gesicherten Cannabinoid-Rezeptoren sowie die zur Biosynthese, zur Wiederaufnahme und zum Abbau benötigten Proteine und Enzyme bezeichnet man zusammen als Endocannabinoid-System (De Petrocellis et al., 2004). Viele Arbeiten in den letzten Jahrzehnten zeigten, dass sich die Modulation des Endocannabinoid-Systems als weitreichendes therapeutisches Ziel verschiedenster Erkrankungen eignet. Unter anderem fand man eine positive Beeinflussung der pathologischen Prozesse bei Angststörungen, motorischen Störungen (z.B. Morbus Parkinson und Chorea Huntington), neuropathischen Schmerzprozessen, Multipler Sklerose und Arteriosklerose (Gray et al., 2012).

Diese Untersuchungen führten neben der Entwicklung verschiedenster Agonisten vor allem zur Synthese mehrerer Antagonisten. Per definitionem ist ein neutraler Antagonist ein Ligand, der an den Rezeptor in allen existierenden Konformationen bindet, ohne die basale Antwort des Rezeptors zu beeinflussen (Giraldo, 2010). Im Gegensatz hierzu ist ein Agonist ein Ligand, der an den Rezeptor bindet und dessen konsekutive Signaltransduktion aktiviert. Agonisten können abhängig von der Konformation des Rezeptors diesen unterschiedlich stark aktivieren. Inverse Agonisten sind Liganden, die an einen konstitutiven, d. h. ständig aktiven, Rezeptor binden, dessen basale Antwort herabsetzen und somit einen Effekt hervorrufen, der dem eines Agonisten entgegengesetzt ist (Kenakin, 2001).

Ein Beispiel für einen inversen Agonisten am CB<sub>1</sub>-Rezeptor ist Rimonabant (Landsman et al., 1997; Pan et al., 1998). Dieses Pharmakon mit dem Handelsnamen Acomplia®

erhielt am 19. Juni 2006 die Zulassung in der gesamten Europäischen Union zur Behandlung der Adipositas (BMI > 30) und zur Behandlung von Übergewichtigen (BMI > 27) mit zusätzlichen Risikofaktoren wie Diabetes mellitus Typ II oder Dyslipidämie. Im Durchschnitt verloren die Patienten 4,55 kg in 12 Monaten (Gray et al., 2012). Bereits im Oktober 2008 empfahl die EMA (European Medicines Agency), Rimonabant wieder vom Markt zu nehmen, nachdem gehäuft Fälle von schweren Depressionen durch die Einnahme von Rimonabant aufgefallen waren.

Geht man davon aus, dass die unerwünschten Nebenwirkungen von Rimonabant als Medikament zur Behandlung der Adipositas auf die Wirkung als inverser Agonist zurückzuführen sind, macht es unter diesem Aspekt Sinn, nach neutralen Antagonisten zu suchen (Giraldo, 2010).

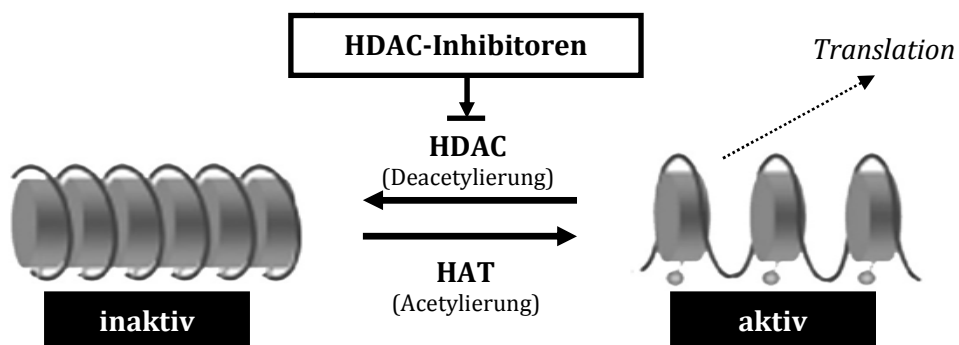
#### **1.4 Epigenetische Beeinflussung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors?**

Die Genexpression wird nicht nur durch die DNA reguliert, sondern auch durch nicht in der DNA kodierte sog. epigenetische Phänomene. Letztere können auf Tochterzellen vererbt werden. Epigenetische Phänomene spielen eine Rolle in der Ontogenese: bekanntermaßen exprimieren verschiedene Zelltypen ganz unterschiedliche Sätze von Genen, während in allen somatischen Zellen der vollständige DNA-Satz enthalten ist. Gene können demnach aktiv oder inaktiv sein und bestimmen so maßgeblich den Phänotyp einer Zelle. Rein mechanistisch handelt es sich hier um microRNA sowie die Methylierung von Cytosin-Resten der DNA und die Modifikation von Histonproteinen. Histonproteine können beispielsweise durch Methylierung und Acetylierung von Aminosäure-Resten modifiziert werden (Hoshino und Matsubara, 2010; vgl. Abb. 1).

Ein höherer Acetylierungsgrad etwa führt dazu, dass die dichte Packung des Chromatins aufgelockert wird und dadurch bestimmte Gene besser abgelesen werden können. Das betrifft keinesfalls alle, sondern maximal 10 % der Gene. Der Organismus reagiert auf veränderte Umweltbedingungen mit veränderter Genexpression. Insbesondere Nervenzellen zeichnen sich durch eine sehr hohe Plastizität aus. Der Acetylierungsgrad der Histonproteine wird durch gegensinnig wirkende Enzymsysteme,

nämlich Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC), reguliert (Sananbenesi und Fischer, 2009).

Bislang gibt es kaum Studien zur Frage, ob eine gezielte Manipulation des Acetylierungsgrades die Funktion von Rezeptoren (z.B. des CB<sub>1</sub>-Rezeptors) beeinflusst.



**Abb. 1: Regulation der Genexpression durch Histondeacetylasen (HDAC) und Histonacetyltransferasen (HAT).** Die DNA (als Spirale dargestellt) ist um das Chromatin (als grauer Zylinder dargestellt) gepackt. Im inaktiven Zustand (links) ist das Chromatin sehr dicht gepackt. Eine Translation ist in diesem Zustand nicht möglich. Durch die HAT wird das Chromatin acetyliert, die Histone verlieren die positive Ladung und das Chromatin wird aufgelockert (rechts). In diesem Zustand ist auch die DNA nicht mehr so dicht gepackt und eine Transkription kann stattfinden. Dieser Zustand kann durch HDAC wieder rückgängig gemacht werden (Abb. modifiziert nach Hoshino und Matsubara, 2010)

## 1.5 Ziele dieser Arbeit

Im Mittelpunkt der hier vorgelegten Arbeit steht der präsynaptische CB<sub>1</sub>-Rezeptor, dessen Aktivierung durch geeignete Pharmaka zu einer Hemmung der Noradrenalin- oder Acetylcholinfreisetzung in isoliertem Hirngewebe von Mäusen und Meerschweinchen führt.

- (1) Der inverse Agonist Rimonabant führt zu einer Steigerung der Noradrenalinfreisetzung in Hippocampuspräparaten des Meerschweins. Hier soll geprüft werden, ob der neutrale Antagonist O-2050 ebenfalls steigernd wirkt oder aber keine modulierende Wirkung aufweist.
- (2) Desweiteren soll geklärt werden, ob eine gezielte Manipulation des Acetylierungsgrades der Histone die CB<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelte Hemmung der Transmitterfreisetzung im Gehirn beeinflusst. In dieser Versuchsserie werden Hippocampuspräparate des Meerschweins einer mehrstündigen in vitro HDAC-Inhibitor-Behandlung unterzogen und dann die Noradrenalinfreisetzung vermessen.
- (3) Untersuchungen zu Wechselwirkungen des in dieser Arbeit im Fokus stehenden CB<sub>1</sub>-Rezeptors mit dem präsynaptischen Muscarinrezeptor M<sub>2</sub> am cholinergen Neuron fehlen bislang. Ziel dieser Arbeit ist es daher, eine mögliche Wechselwirkung zwischen dem präsynaptischen CB<sub>1</sub>- und dem Muscarinrezeptor M<sub>2</sub> nachzuweisen. In dieser Versuchsserie an Hippocampuspräparaten des Nagers soll die Auswirkung einer Blockade bzw. Aktivierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors auf den durch den M<sub>2</sub>-Rezeptor hervorgerufenen Hemmeffekt untersucht werden.
- (4) In der letzten Versuchsserie dieser Arbeit sollen inhibitorische Heterorezeptoren an der präsynaptischen Membran cholinergischer Neurone in Hippocampuspräparaten der Maus gefunden werden. Diese Serie ist Voraussetzung für eine in der Zukunft geplante Studie zur Wechselwirkung zwischen dem CB<sub>1</sub>-Rezeptor und präsynaptischen Heterorezeptoren am cholinergen Neuron.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchsanordnung

Männliche Dunkin-Hartley Meerschweinchen (220 - 750 g), männliche NMRI-Mäuse (20 - 27 g) sowie männliche Wistar-Ratten (210 - 460 g) wurden dekapitiert und das Gehirn entnommen. Nach Freilegen des Hippocampus und Trennung von den anderen Hirnteilen wurde dieser in 0,3 mm dünne Schichten geschnitten und hieraus Gewebstanzen mit einem Durchmesser von 2 mm angefertigt. Die Gewebstanzen wurden anschließend 30 bzw. 60 Minuten bei 37°C in physiologischer Kochsalzlösung (PSL; entspricht modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung, siehe Tab. 1) unter Zusatz von 0,1 µM [<sup>3</sup>H]-Cholin (spezifische Aktivität: 80,6 Ci / mmol) oder 0,025 µM [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin (spezifische Aktivität: 53,0 Ci / mmol) und ständiger Zufuhr von Carbogen (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert.

**Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten physiologischen Kochsalzlösung**

|                   |  |                                  |      |                                    |      |
|-------------------|--|----------------------------------|------|------------------------------------|------|
| NaCl              | 118                                    | NaHCO <sub>3</sub>               | 25   | KCl                                | 4,8  |
| CaCl <sub>2</sub> | 1,3 <sup>1)</sup> / 3,25 <sup>2)</sup> | KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,2  | MgSO <sub>4</sub>                  | 1,2  |
| Glucose           | 10                                     | Ascorbinsäure                    | 0,06 | Na <sub>2</sub> EDTA <sup>3)</sup> | 0,03 |

Alle Angaben in mM; 1) Inkubationsmedium aller Versuche sowie Superfusionslösung bei Inkubation mit [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin, 2) Superfusionslösung bei Inkubation mit [<sup>3</sup>H]-Cholin, 3) Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz

Nach der Inkubation wurden die Gewebstanzen in den Superfusionskammern auf Polypropylnetzen zwischen zwei Platinelektroden platziert und die Superfusion gestartet. Die Superfusion erfolgte bei 37°C und einem Durchlauf von 1 ml / min sowie ebenfalls ständiger Begasung mit Carbogen.

Ab der 35. bzw. 55. Minute wurden 5-Minuten-Fractionen des Superfusates gesammelt und mit 1,2 Volumenanteilen Lumagel Safe®, einem Szintillationsmittel mit hoher Wasseraufnahmekapazität, gemischt. Unmittelbar nach Versuchsende erfolgte auch die Auflösung der Gewebstanzen in 0,5 ml Soluene® und die Beimischung eines selbst

hergestellten Szintillationscocktails, 6 mg PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 100 µg POPOP (1,4-Bis-[5-phenyl-2-oxazolyl]-benzol) in 1 ml Toluol, mit geringer Wasseraufnahmekapazität. Anschließend wurde durch einen Flüssigkeitsszintillationszähler der Tritiumgehalt der aufgefangenen Superfusatfraktionen und der aufgelösten Gewebsstanzen bestimmt.

Die Zusammensetzung der Superfusionslösungen variierte je nach Fragestellung. Während Desipramin (1 µM) und Rauwolscin (1 µM) bei den Versuchen mit [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin inkubiertem Gewebe (Meerschwein) als Hilfspharmaka enthalten waren, enthielt die Superfusionslösung bei Versuchen mit [<sup>3</sup>H]-Cholin inkubiertem Gewebe (Maus und Ratte) Hemicholinium-3 (10 µM) und teils TEA 3,2 mM (Tetraethylammoniumchlorid). Alle Hilfspharmaka waren während der gesamten Superfusionsdauer in der Lösung enthalten. Bei den Versuchen zur epigenetischen Fragestellung wurde das Gewebe erst 240 Minuten bei 37°C entweder gegenüber Valproat (1 mM) oder Na-Butyrat (1 mM) exponiert und anschließend für weitere 60 Minuten unter Zusatz von 0,025 µM [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin inkubiert. Die zur Untersuchung anstehenden Agonisten, inversen Agonisten und Antagonisten wurden dem Medium so zugesetzt, wie es unter „Ergebnisse“ beschrieben ist.

Die Tritiumabgabe wurde durch Rechteckimpulse während zwei 2-minütiger Reizperioden ( $S_1$  und  $S_2$ ) stimuliert. Die genauen Stimulationsparameter, der Zeitpunkt der Stimulation, die Gesamtversuchsdauer und die Zugabe der zu untersuchenden Pharmaka unterscheiden sich in den Versuchsreihen und werden in der Darstellung der Ergebnisse erläutert.

## **2.2 Berechnung und Statistik**

### **2.2.1 Berechnung der basalen und stimulierten Tritiumfreisetzung**

Die Tritiumfreisetzung (Efflux) wurde als Anteil des Tritiums, welches zu Beginn der entsprechenden Sammelperiode im Gewebe vorhanden war, berechnet.

Die spontan, d.h. ohne elektrische Stimulation, freigesetzte Menge an Tritium (basaler Efflux) wurde jeweils in der 5-Minuten Sammelperiode der 15. - 20. Minute ( $t_1$ ) nach dem ersten Reiz ( $S_1$ ) und in der 5-Minuten Sammelperiode ( $t_2$ ) direkt vor dem zweiten Reiz



( $S_2$ ) bestimmt. Der Quotient  $t_2 / t_1$  ist somit ein Maß für den Einfluss der beim Pharmakonwechsel eingeleiteten zu untersuchenden Substanz auf die basale Tritiumfreisetzung. Um den Einfluss eines von Anfang an im Medium enthaltenen Pharmakons auf die basale Tritiumfreisetzung zu ermitteln, wurde der  $t_1$ -Wert in An- und Abwesenheit des entsprechenden Pharmakons verglichen.

Die stimulierte Tritiumfreisetzung wurde als Differenz zwischen der basalen und totalen Tritiumfreisetzung während der 2-minütigen Reizperiode und den folgenden 13 Minuten berechnet. Hierbei wurde ein linearer Abfall der basalen Tritiumfreisetzung zwischen der 5-Minuten-Sammelperiode direkt vor der Reizperiode und der Sammelperiode von der 15. bis zur 20. Minute nach der Reizung angenommen. Die stimulierte Tritiumfreisetzung wurde in Prozent des Gesamtgehaltes an Tritium im Gewebe angegeben.

Zur Quantifizierung des Effektes des zu untersuchenden Pharmakons auf die stimulierte Tritiumfreisetzung wurde der Quotient  $S_2 / S_1$  mit den entsprechenden Quotienten der Kontrolle verglichen. Um den Einfluss eines von Anfang im Medium enthaltenen Pharmakons auf die stimulierte Tritiumfreisetzung zu bestimmen, wurde der  $S_1$ -Wert in An- und Abwesenheit des entsprechenden Pharmakons verglichen.

### **2.2.2 Berechnung pharmakologischer Wirkstärken**

Die Wirkstärke eines Agonisten wird mit dem  $pEC_{50}$ -Wert charakterisiert. Dieser ist definiert als negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration, die eine halbmaximale Wirkung hervorruft.

Die Wirkstärke eines Antagonisten wird durch den  $pA_2$ -Wert charakterisiert. Der  $pA_2$ -Wert entspricht dem negativ dekadischen Logarithmus der Konzentration eines Antagonisten, die eine Verdoppelung der Konzentration des Agonisten nötig macht, um den gleichen Effekt wie bei Abwesenheit des Antagonisten zu erreichen. Somit wird die Konzentrations-Wirkungs-Kurve eines Agonisten in Anwesenheit eines Antagonisten um den Faktor zwei nach rechts verschoben.

Zur Bestimmung des antagonistischen Effekts wurde nur eine Antagonistenkonzentration herangezogen. Der Berechnung dieses „scheinbaren“  $pA_2$ -wertes dient die Formel nach Furchgott (1972):

$$pA_2 = \log\left(\frac{[E']}{[E]} - 1\right) - \log[B]$$

**Gleichung 1:** [E']: Konzentration des Agonisten in Anwesenheit des Antagonisten  
 [E]: Konzentration des Agonisten in Abwesenheit des Antagonisten  
 [B]: Konzentration des Antagonisten

### 2.2.3 Statistik

Die Ergebnisse sind angegeben als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) aus n Experimenten, wobei sich n auf die Anzahl der Versuche bezieht. Das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ) ist wie folgt definiert:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \textbf{Gleichung 2:} \quad x_i: \text{ Einzelmesswerte, } n: \text{ Anzahl der Messwerte}$$

Die Standardabweichung (s) wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \textbf{Gleichung 3:} \quad x_i \text{ (s.o.)}, n \text{ (s.o.)}, \bar{x}: \text{ Mittelwert}$$

Die Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnen sich aus dem Quotienten der Standardabweichung und der Wurzel aus der Anzahl der Versuche.

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \textbf{Gleichung 4:} \quad s: \text{ Standardabweichung, } n: \text{ Anzahl der Messwerte}$$

Der t-Test bei unverbundenen Stichproben wurde zum Vergleich der Mittelwerte herangezogen. Bei dem Vergleich von zwei oder mehr Versuchsserien mit derselben Kontrollserie wurde die Bonferroni-Korrektur des t-Tests durchgeführt.

Ein signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  war. Dabei wurden in den grafischen Darstellungen folgende Visualisierungen gewählt:  $0,05 > p \geq 0,01$ : \*,  $0,01 > p \geq 0,001$ : \*\*,  $p < 0,001$ : \*\*\*.

### 2.3 Verwendete Substanzen

Lösungen von Pharmaka wurden je nach Löslichkeit und Versuchsbedingung in destilliertem Wasser (Aqua demineralisata), Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Ethanol gelöst. Bei Verwendung von in organischen Lösungsmitteln gelösten Pharmaka enthielten alle Superfusionskammern die gleiche Lösungsmittelkonzentration. Die organischen Lösungsmittel selbst (Endkonzentration von Ethanol oder DMSO bis 0,3 %) beeinflussten die Tritiumabgabe nicht.

Calciumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt (D)

[<sup>3</sup>H]-Cholinchlorid, Perkin Elmer, Waltham, MA (USA)

DAMGO ([D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-Enkephalin), Bachem Holding, Heidelberg (D)

Desipramin, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim (D)

D(+)-Glucose, AppliChem GmbH, Darmstadt (D)

DMSO (Dimethylsulfoxid), Merck KGaA, Darmstadt (D)

DPDPE ([D-Pen<sup>2,5</sup>]-Enkephalin), Bachem Holding, Heidelberg (D)

Ethanol absolut, KMF Laborchemie, Lohmar (D)

Hemicholinium-3, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim (D)

Kaliumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt (D)

Kaliumhydrogenphosphat, Merck KGaA, Darmstadt (D)

L(+)-Ascorbinsäure, Merck KGaA, Darmstadt (D)

L(-)-Noradrenalin, Hoechst AG, Frankfurt (D)

Lumagel Safe®, Lumac, Groningen (NL)

Magnesiumsulfat, Merck KGaA, Darmstadt (D)

N-Acetyl-[Leu<sup>28</sup>, Leu<sup>31</sup>] Neuropeptid Y (24-26), PolyPeptid Group, Strasbourg (F)

Naltrindol, Tocris, Ellisville, MO (USA)

Natrium-Butyrat, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim (D)

Natriumchlorid, KMF Laborchemie, Lohmar (D)

Natrium-EDTA, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim (D)

Natriumhydrogencarbonat, KMF Laborchemie, Lohmar (D)

Natrium-Valproat, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim (D)

[<sup>3</sup>H]-Noradrenalin, Perkin Elmer, Waltham, MA (USA)

O-2050, Tocris, Ellisville, MO (USA)

Oxotremorin, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim (D)

POPOP ( 1,4-Bis-[5-phenyl-2-oxazolyl]-benzol), Acros Organics, Fair Lawn, NJ (USA)

PPO (2,5-Diphenyloxazol), Acros Organics, Fair Lawn, NJ (USA)

R-PIA (N<sup>6</sup>-[L-2-Phenylisopropyl]-adenosine), Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim (D)

Rauwolscin, Carl Roth, Karlsruhe (D)

Rimonabant (SR141716), Sanofi Recherche, Montpellier (F)

Sulproston, Bayer-Schering Pharma, Berlin (D)

Soluene® 6003038, Packard, Meriden, CT (USA)

TEA (Tetraethylammoniumchlorid), Sigma Aldrich Chemie, Steinheim (D)

Toluol, Merck KGaA, Darmstadt (D)

U-69,593, ICN Biomedicals, Aurora, OH (USA)

WIN 55,212-2, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim (D)

Die Pharmaka L(-)-Noradrenalin, Rimonabant und Sulproston wurden uns von den Herstellern in dankenswerter Weise unentgeltlich überlassen.

## **2.4 Verwendete Geräte und Materialien**

Analysenwaage Sartorius 2004, MP6, Sartorius, Göttingen (D)

Flüssigkeitsszintillationszähler Beckman LS 6000 TA, Beckman Coulter, Fullerton, CA (USA)

Flüssigkeitsszintillationszähler TriCarb 2910 TR, Perkin Elmer, Waltham, MA (USA)

Laborwaage L610D, Sartorius, Göttingen (D)

Magnetrührer RH 464995, IKA, Staufen i. Br. (D)

Mikroliterpipette Eppendorf Nr. 4780, Eppendorf, Hamburg (D)

Mini Poly-Q-Vials Nr. 592928, Beckman, München (D)

Pipettenspitzen Eppendorf Nr. 0030063.619 und 627, Eppendorf, Hamburg (D)

Stimulator 215/II, Hugo Sachs, March-Hugstetten (D)

Superfusionsanlage, Eigenbau der Werkstatt des Pharmakologischen Instituts der Universität Bonn (D)

Thermostat Typ MD, Julabo, Seelbach (D)

Wasserbad Typ 1083, GFL, Burgwedel (D)

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Allgemeines**

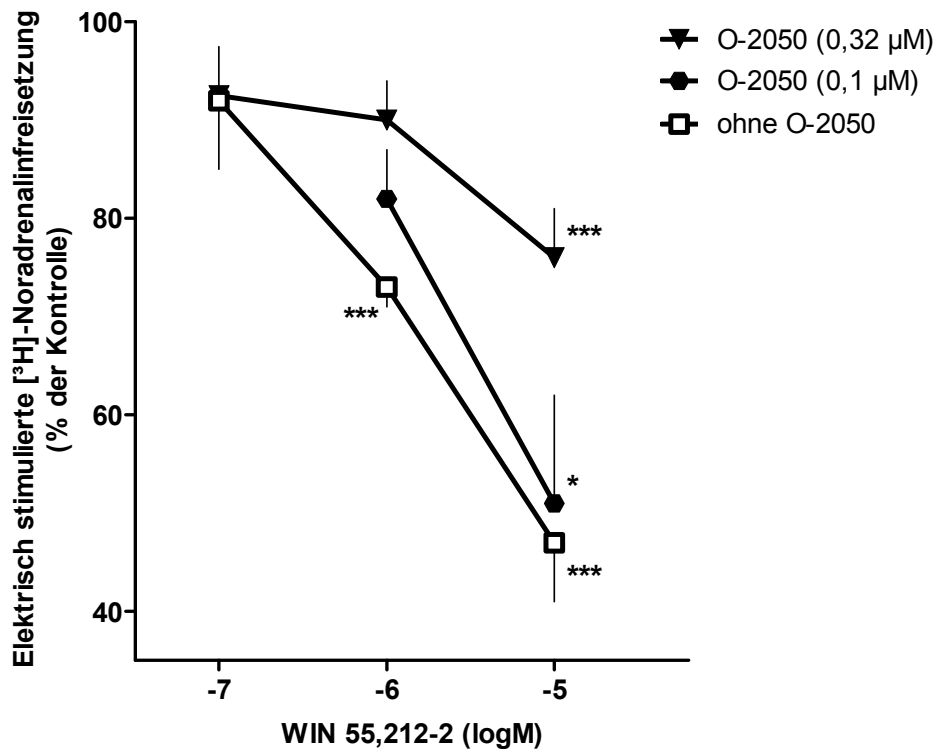
Ganz im Vordergrund steht die Quantifizierung des Effektes der beim Pharmakonwechsel ins Medium eingeleiteten Substanz auf die stimulierte Tritiumfreisetzung ( $S_2 / S_1$ ). Auch die Quantifizierung des Einflusses der beim Pharmakonwechsel eingeleiteten Substanz auf die basale Tritiumfreisetzung ( $t_2 / t_1$ ) wird hier besprochen. Zusätzlich wird dargestellt, ob die basale Tritiumfreisetzung ( $t_1$ ) und die Freisetzung zum Zeitpunkt der ersten Stimulation ( $S_1$ ) durch bereits bei Beginn der Superfusion im Medium enthaltene Pharmaka beeinflusst wurde.

#### **3.2 Vergleich des inversen Agonisten Rimonabant und des neutralen Antagonisten O-2050**

Im Rahmen dieser Fragestellung wurden die Versuche an Hippocampuspräparaten des Meerschweins durchgeführt. Diese wurden 60 Minuten unter Zusatz von [ $^3$ H]-Noradrenalin vorinkubiert (siehe Methodenteil). Die elektrische Stimulation erfolgte in der ersten Versuchsreihe mit O-2050 und WIN 55,212-2 (Abschnitt 3.2.1) mittels Rechteckimpulsen (0,3 Hz, 50 mA, 2 ms) zur 60. Minute ( $S_1$ ) und zur 100. Minute ( $S_2$ ), jeweils für zwei Minuten. In der Versuchsreihe mit O-2050 und Rimonabant (Abschnitt 3.2.2) wurde zur 60. Minute ( $S_1$ ) und zur 140. Minute ( $S_2$ ) mit folgenden Parametern gereizt: 0,3 Hz, 200 mA, 2 ms. Desipramin 1  $\mu$ M und Rauwolscin 1  $\mu$ M waren während der gesamten Versuchsdauer als Hilfspharmaka im Superfusionsmedium enthalten.

##### **3.2.1 Ermittlung der antagonistischen Wirkstärke von O-2050**

Die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung wurde in Anwesenheit des CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten WIN 55,212-2 konzentrationsabhängig gehemmt. Die Konzentrationswirkungskurve zeigte eine Hemmwirkung von etwa 53 % bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M für WIN 55,212-2 (Abb. 2). Zur Bestimmung der Wirkstärke von WIN 55,212-2 wurde der negativ dekadische Logarithmus der Konzentration ermittelt, der zu einer Hemmung um 30 % führt, also etwa den halbmaximalen Effekt hervorruft. Der so ermittelte pEC<sub>50</sub>-Wert betrug 6,13.



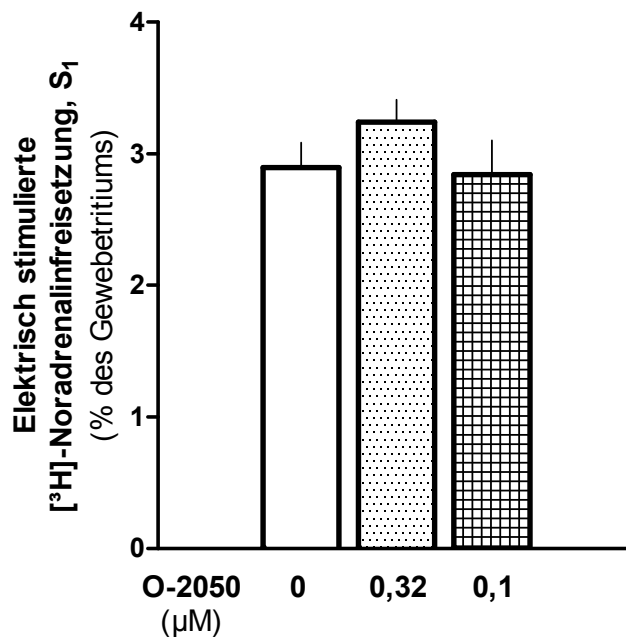
**Abb. 2: Effekt von WIN 55,212-2 auf die Tritiumfreisetzung und Interaktion mit O-2050** Konzentrationsabhängiger Effekt von WIN 55,212-2 auf die elektrisch stimulierte (0,3 Hz) Tritiumfreisetzung im [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin-vorinkubierten und superfundierten Meerschwein-Hippocampus und Interaktion mit O-2050 0,32 µM sowie 0,1 µM. O-2050 war von Beginn an im Superfusionsmedium enthalten, WIN 55,212-2 wurde in den jeweiligen Konzentrationen ab der 80. Minute hinzugefügt. Ergebnisse hier dargestellt als Prozent (%) der Kontrolle. Mittelwerte ± SEM aus 4 - 14 Experimenten, \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001 im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (nicht im Bild gezeigt)

**Tab. 2: Einfluss von O-2050 auf die basale Tritiumfreisetzung ( $t_1$  sowie  $t_2 / t_1$ ), sowie vergleichend die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung ohne zusätzliches Pharmakon ( $S_2 / S_1$ ) in [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin-vorinkubiertem und superfundiertem Meerschwein-Hippocampus. O-2050 0,1 µM oder 0,32 µM waren während der gesamten Superfusionsdauer im Medium enthalten. Mittelwerte ± SEM aus 4 - 14 Experimenten**

| Reizparameter   |                   | Basaler Tritiumefflux                                    |             | Elektrisch stimuliert |
|---|-------------------|--|-------------|-----------------------|
|   |                   | $t_1$ (anteilige Tritiumfreisetzung; min <sup>-1</sup> ) | $t_2/t_1$   | $S_2/S_1$             |
| 0,3 Hz / 50 mA<br><br>S <sub>1</sub> : 60. min<br>S <sub>2</sub> : 100. min | ohne Zusatz       | 0,0014 ± 0,0001  | 0,94 ± 0,05 | 0,95 ± 0,03           |
|   | O-2050<br>0,1 µM  | 0,0015 ± 0,0001  | 0,94 ± 0,04 | 1,03 ± 0,07           |
|   | O-2050<br>0,32 µM | 0,0014 ± 0,0001  | 0,93 ± 0,04 | 0,99 ± 0,03           |

Der neutrale CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist O-2050 0,1 µM (während der gesamten Superfusionsdauer im Medium enthalten) verschiebt die Konzentrationswirkungskurve von WIN 55,212-2 nach rechts. Eine Steigerung der Konzentration von O-2050 auf 0,32 µM schwächt die Hemmwirkung von WIN 55,212-2 noch stärker ab und sorgt ebenfalls für eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve (Abb. 2). Für die Rechtsverschiebung durch O-2050 0,1 µM und 0,32 µM errechnet sich ein scheinbarer pA<sub>2</sub>-Wert von 7,01 bzw. 7,52 (Mittelwert 7,27).

Betrachtet man den isolierten Effekt von O-2050 auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung zum Zeitpunkt des ersten Reizes (S<sub>1</sub>), lässt sich feststellen, dass sich in Anwesenheit von O-2050 0,1 µM oder 0,32 µM kein signifikanter Effekt ergibt (Abb. 3). Auch die basale Tritiumfreisetzung wurde durch O-2050 nicht beeinflusst (Tab. 2).



**Abb. 3: Effekt von O-2050 auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung (erster Reiz)** Isolierter Effekt von O-2050 0,32 µM und 0,1 µM auf die elektrisch stimulierte (0,3 Hz) Tritiumfreisetzung im [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin-vorinkubierten und superfundierten Meerschwein-Hippocampus zum Zeitpunkt des ersten Reizes (S<sub>1</sub>). Ergebnisse hier dargestellt als Prozent (%) des Gesamtgewebetritiums. Mittelwerte ± SEM aus 4 - 14 Experimenten



### 3.2.2 Vergleich von Rimonabant und O-2050 bei alleiniger Gabe

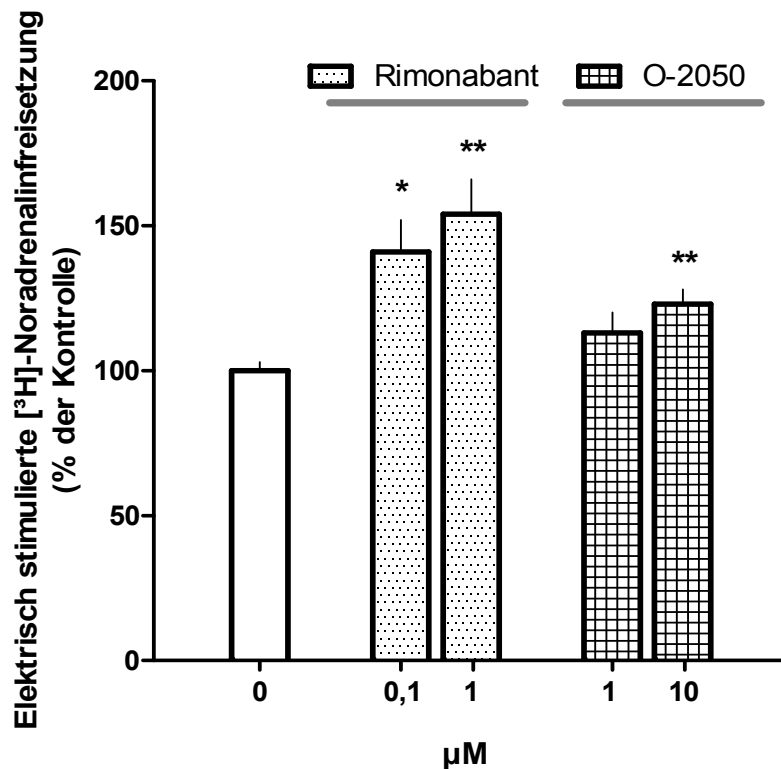
In dieser Versuchsreihe wurde der Effekt von O-2050 (bei alleiniger Gabe) auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung untersucht. Parallel wurden zusätzlich Versuche mit Rimonabant durchgeführt. O-2050 wurde in einer zehnmal höheren Konzentration als Rimonabant eingesetzt, da zu einem früheren Zeitpunkt in unserem Labor durchgeführte Experimente ergeben hatten, dass Rimonabant eine etwa zehnmal höhere Wirkstärke (scheinbarer  $pA_2$  8,2) als O-2050 (scheinbarer  $pA_2$  7,3) besitzt.

O-2050 1  $\mu$ M führte zu einer nicht signifikanten Steigerung der elektrisch stimulierten Tritiumfreisetzung um 13 %. O-2050 10  $\mu$ M bewirkte eine deutliche und signifikante Steigerung der elektrisch stimulierten Tritiumfreisetzung um 23 %. Für Rimonabant 0,1  $\mu$ M bzw. 1  $\mu$ M zeigten sich in dieser Versuchsreihe Steigerungen der Tritiumfreisetzung um 41 % bzw. 54 % (Abb. 4). Die absoluten Werte hierzu sind in Tab. 3 dargestellt.

Sowohl O-2050 1  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M als auch Rimonabant (SR 141716) 0,1  $\mu$ M bzw. 1  $\mu$ M beeinflussten die basale Tritiumfreisetzung nicht (Tab. 3).

**Tab. 3: Einfluss von O-2050 und Rimonabant (SR 141716) auf die basale Tritiumfreisetzung ( $t_1$  und  $t_2/t_1$ ) sowie auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung ( $S_2 / S_1$ ) im [ $^3$ H]-Noradrenalin-vorinkubierten und superfundierten Meerschwein-Hippocampus; hier in Bezug auf die entsprechenden Kontrollen. O-2050 und Rimonabant waren in den jeweiligen Konzentrationen ab der 80. Minute im Superfusionsmedium enthalten. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 8 - 11 Experimenten, \* $p < 0,05$  bzw. \*\* $p < 0,01$  im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle**

| Reizparameter   |                         | Basaler Tritiumefflux                                    |                 | Elektrisch stimuliert |
|---|-------------------------|--|-----------------|-----------------------|
|   |                         | $t_1$ (anteilige Tritiumfreisetzung; $\text{min}^{-1}$ ) | $t_2/t_1$       | $S_2/S_1$             |
| 0,3 Hz /<br>200 mA<br><br>S <sub>1</sub> : 60. min<br>S <sub>2</sub> : 140. min | Kontrolle               | 0,0018 $\pm$ 0,0001                                      | 0,85 $\pm$ 0,03 | 0,89 $\pm$ 0,05       |
|   | O-2050 1 $\mu$ M        | 0,0018 $\pm$ 0,0001                                      | 0,86 $\pm$ 0,03 | 1,01 $\pm$ 0,05       |
|   | O-2050 10 $\mu$ M       | 0,0017 $\pm$ 0,0001                                      | 0,85 $\pm$ 0,03 | 1,09 $\pm$ 0,06**     |
|   | SR141716<br>0,1 $\mu$ M | 0,0017 $\pm$ 0,0002                                      | 0,85 $\pm$ 0,03 | 1,25 $\pm$ 0,08*      |
|   | SR141716<br>1 $\mu$ M   | 0,0018 $\pm$ 0,0002                                      | 0,85 $\pm$ 0,02 | 1,37 $\pm$ 0,09**     |



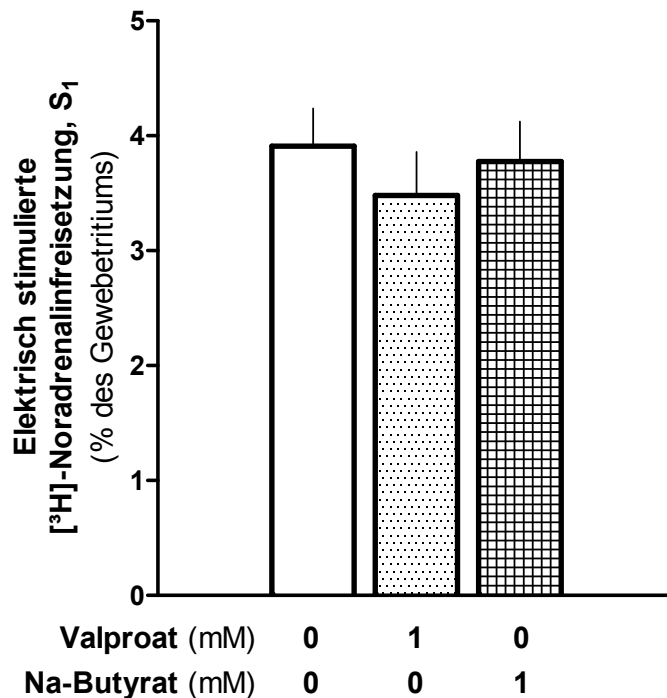
**Abb. 4: Einfluss von O-2050 auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung** Einfluss von O-2050 1 µM und 10 µM auf die elektrisch stimulierte (0,3 Hz) Tritiumfreisetzung im [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin-vorinkubierten und superfundierten Meerschwein-Hippocampus, hier im Vergleich zum Einfluss von Rimonabant 0,1 µM und 1 µM. O-2050 und Rimonabant waren in den entsprechenden Konzentrationen ab der 80. Minute im Superfusionsmedium enthalten. Ergebnisse dargestellt als Prozent (%) der Kontrolle. Mittelwerte ± SEM aus 8 - 11 Experimenten, \*p < 0,05 bzw. \*\*p < 0,01 im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle

### 3.3 Epigenetische Beeinflussung: Wirkung auf präsynaptische CB<sub>1</sub>-Rezeptoren

Die Wirkung der epigenetisch wirksamen Pharmaka Valproat und Na-Butyrat wurde ebenfalls an Hippocampuspräparaten des Meerschweins untersucht. Hierfür wurden die Präparate für 240 Minuten in einem Medium entweder mit Valproat (VPA) 1 mM, Na-Butyrat (NaB) 1 mM oder zur Kontrolle ohne Zusatz inkubiert. Zum Zeitpunkt der Einleitung der Pharmaka VPA und NaB änderte sich der pH-Wert des Inkubationsmediums nicht. Hiernach folgte eine 60-minütige Inkubation aller Präparate in einem neuen Medium unter Zusatz von [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin (siehe Methodenteil). Die elektrische Stimulation erfolgte mittels Rechteckimpulsen (0,3 Hz, 200 mA, 2 ms) zur 60. Minute

(S<sub>1</sub>) und zur 100. Minute (S<sub>2</sub>), jeweils für zwei Minuten. Desipramin 1 µM und Rauwolscin 1 µM waren während der gesamten Versuchsdauer als Hilfspharmaka im Superfusionsmedium enthalten.

Hier wurde zunächst untersucht, ob Valproat oder Na-Butyrat eine Wirkung auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung besitzt. Abb. 5 zeigt, dass dies nicht der Fall ist: Die elektrisch stimulierte Freisetzung bei S<sub>1</sub> unterscheidet sich in Gegenwart und Abwesenheit der beiden Pharmaka nicht.



**Abb. 5: Isolierter Effekt von Valproat 1 mM und Na-Butyrat 1 mM auf die elektrisch stimulierte (0,3 Hz) Tritiumfreisetzung** im superfundierten Meerschwein-Hippocampus zum Zeitpunkt des ersten Reizes (S<sub>1</sub>). Valproat 1 mM oder Na-Butyrat 1 mM waren für 240 Minuten vor Versuchsbeginn im Inkubationsmedium enthalten. Ergebnisse hier dargestellt als Prozent (%) des Gesamtgewebetritiums. Mittelwerte ± SEM aus 6 - 8 Experimenten

Ferner wurde untersucht, ob der Hemmeffekt des Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten WIN 55,212-2 auf die elektrisch stimulierte Freisetzung (S<sub>2</sub> / S<sub>1</sub>) durch die beiden Pharmaka modifiziert wird (Abb. 6).

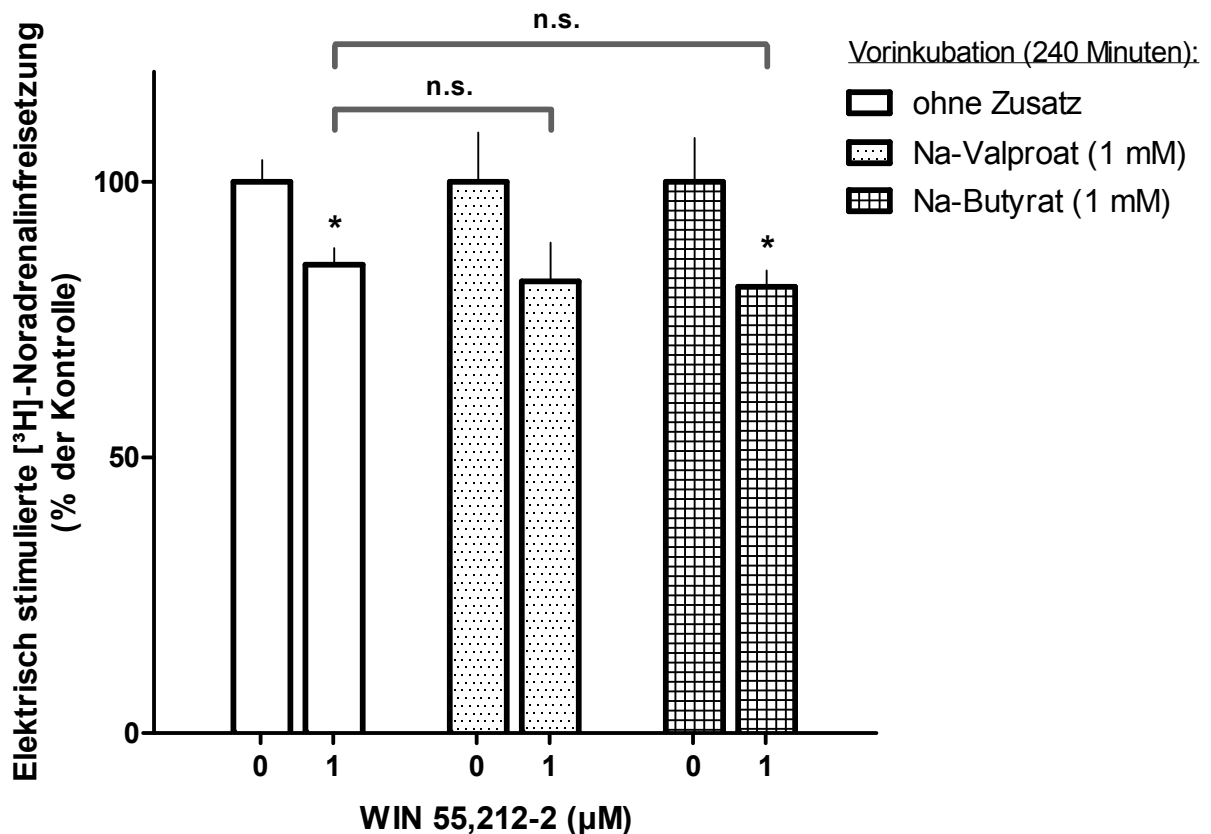
Für WIN 55,212-2 zeigte sich eine signifikante Hemmwirkung ( $p < 0,05$ ) von etwa 15 % unter Kontrollbedingungen, eine ebenfalls signifikante Hemmung ( $p < 0,05$ ) von etwa 19 % bei Vorinkubation mit Na-Butyrat und ein Hemmeffekt von etwa 18 % bei Vorinkubation mit Valproat. Allerdings wurde im Fall von Valproat das Signifikanzniveau nicht erreicht.

Um den Hemmeffekt von WIN 55,212-2 in Gegenwart von Valproat oder Na-Butyrat mit demjenigen in der Kontrolle zu vergleichen, wurden jeweils die Prozentwerte für die stimulierte Freisetzung in Ab- und Anwesenheit von WIN 55,212-2 gebildet. Abb. 6 zeigt, dass sich dieser Prozentsatz durch die Behandlung mit Valproat oder Na-Butyrat nicht signifikant veränderte.

Die basale Tritiumfreisetzung ( $t_1$ ) wurde weder durch Na-Butyrat noch durch Valproat beeinflusst (Tab. 4). Auch die Wirkung von WIN 55,212-2 auf die basale Tritiumfreisetzung ( $t_2 / t_1$ ) unterschied sich nicht bei den ohne sowie bei den mit den beiden Pharmaka durchgeführten Versuchsgruppen (Tab. 4).

**Tab. 4: Einfluss von Valproat und Na-Butyrat auf die basale Tritiumfreisetzung ( $t_1$  sowie  $t_2/t_1$ ), sowie vergleichend die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung ohne zusätzliches Pharmakon ( $S_2/S_1$ ) im superfundierten Meerschwein-Hippocampus. Valproat 1 mM oder Na-Butyrat 1 mM waren für 240 Minuten vor Versuchsbeginn im Inkubationsmedium enthalten. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 6-8 Experimenten**

| Reizparameter  |                 | Basaler Tritiumefflux                                    |                             |  |
|--|-----------------|--|-----------------------------|--|
|  |                 | $t_1$ (anteilige Tritiumfreisetzung; $\text{min}^{-1}$ ) | $t_2/t_1$ ohne WIN 55,212-2 | $t_2/t_1$ mit 1 $\mu\text{M}$ WIN 55,212-2 |
| 0,3 Hz / 200 mA<br>S <sub>1</sub> : 60. min<br>S <sub>2</sub> : 100. min | ohne Zusatz     | 0,0029 $\pm$ 0,0001                                      | 0,87 $\pm$ 0,04             | 0,70 $\pm$ 0,10                            |
|  | Valproat 1 mM   | 0,0027 $\pm$ 0,0001                                      | 0,86 $\pm$ 0,04             | 0,71 $\pm$ 0,09                            |
|  | Na-Butyrat 1 mM | 0,0028 $\pm$ 0,0001                                      | 0,87 $\pm$ 0,02             | 0,70 $\pm$ 0,09                            |
| Reizparameter  |                 | Elektrisch stimuliert                                    |                             |  |
|  |                 | $S_2/S_1$ ohne WIN 55,212-2                              |                             |  |
| 0,3 Hz / 200 mA<br>S <sub>1</sub> : 60. min<br>S <sub>2</sub> : 100. min | ohne Zusatz     | 0,96 $\pm$ 0,04  |                             |  |
|  | Valproat 1 mM   | 0,95 $\pm$ 0,09  |                             |  |
|  | Na-Butyrat 1 mM | 1,01 $\pm$ 0,10  |                             |  |



**Abb. 6: Einfluss von Valproat und Na-Butyrat auf die Wirkung von WIN 55,212-2**  
 Effekt der epigenetisch wirksamen Pharmaka Valproat und Na-Butyrat auf die Modulation der elektrisch stimulierten (0,3 Hz) Tritiumfreisetzung durch WIN 55,212-2 1 µM im superfundierten Meerschwein-Hippocampus. Gewebe jeweils für 240 Minuten vor Versuchsbeginn mit Valproat, Na-Butyrat oder ohne Zusatz (Kontrolle) inkubiert. Nach der Vorinkubation wurden die Schnitte 60 Minuten lang mit [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin inkubiert und dann superfundiert. WIN 55,212-2 wurde ab der 80. Versuchsminute hinzugefügt. Ergebnisse dargestellt als Prozent (%) der Kontrolle. Die Ergebnisse wurden in zweifacher Weise statistisch ausgewertet: Zum einen wurde die Wirkung von WIN 55,212-2 mit dem entsprechenden Wert ohne WIN 55,212-2 verglichen. Zum anderen wurde das Ausmaß der Wirkung von WIN 55,212-2 in den beiden Pharmakon-behandelten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe verglichen (zweites und drittes Säulenpaar verglichen mit dem ersten Säulenpaar). Die Absolutwerte der S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>-Werte in den drei WIN 55,212-2-freien Experimenten (jeweils linke Säule) sind in Tab. 4 aufgelistet. Mittelwerte ± SEM aus 6 - 8 Experimenten, \*p < 0,05 im Vergleich zum Wert ohne WIN 55,212-2, n.s.: nicht signifikant

### 3.4 Wechselwirkung zwischen präsynaptischem CB<sub>1</sub>-Rezeptor und Muscarinrezeptor (M<sub>2</sub>)

Die Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen dem präsynaptischen CB<sub>1</sub>- und Muscarinrezeptor (M<sub>2</sub>) wurden sowohl an Hippocampuspräparaten der Ratte und / oder der Maus durchgeführt. In zwei Versuchsserien wurde untersucht, wie die durch Aktivierung von M<sub>2</sub>-Rezeptoren erzielte Hemmung der Acetylcholin-Freisetzung durch gleichzeitige Blockade (Absatz 3.4.1) oder Aktivierung (Absatz 3.4.2) des CB<sub>1</sub>-Rezeptors beeinflusst wird. In beiden Versuchsreihen wurden die Präparate unter Zusatz von [<sup>3</sup>H]-Cholinchlorid vorinkubiert (siehe Methodenteil) und zur 40. Minute und 90. Minute jeweils für zwei Minuten elektrisch stimuliert (Rechteckimpulse: 3 Hz, 200 mA, 2 ms). Hemicholinium 10 µM war als Hilfspharmakon bei allen Versuchen im Superfusionsmedium enthalten, wohingegen die Versuche mit WIN 55,212-2 und Oxotremorin (Absatz 3.4.2) noch Tetraethylammoniumchlorid (TEA) 3,2 mM als Zusatzpharmakon enthielten.

#### 3.4.1 Interaktion von Oxotremorin und Rimonabant

In Anwesenheit von Oxotremorin lässt sich bei Hippocampus-Schnitten der Ratte ein konzentrationsabhängiger Hemmeffekt der elektrisch stimulierten Tritiumfreisetzung beobachten. Die Konzentrationswirkungskurve zeigt für Oxotremorin 0,1 µM und 1 µM eine signifikante Hemmwirkung von 23 % bzw. 65 %. Die Zugabe von Rimonabant 1 µM beeinflusste die Hemmwirkung dieser Konzentrationen nicht. Für Oxotremorin 10 µM lässt sich unter Zugabe von Rimonabant 1 µM jedoch eine signifikante ( $p=0,002$ ) Steigerung der Hemmwirkung von 73 % (ohne Rimonabant) auf 81 % (mit Rimonabant) beobachten (Abb. 7 und Abb. 8B). Betrachtet man den isolierten Effekt von Rimonabant auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung zum Zeitpunkt des ersten Reizes (S<sub>1</sub>), so lässt sich eine deutliche Steigerung beobachten. In Anwesenheit von Rimonabant steigt die Tritiumfreisetzung signifikant von  $1,96 \pm 0,165$  auf  $2,63 \pm 0,173$  (alle S<sub>1</sub>, Mittelwerte  $\pm$  SEM, % des Gewebetritiums) an (vgl. Abb. 8A).

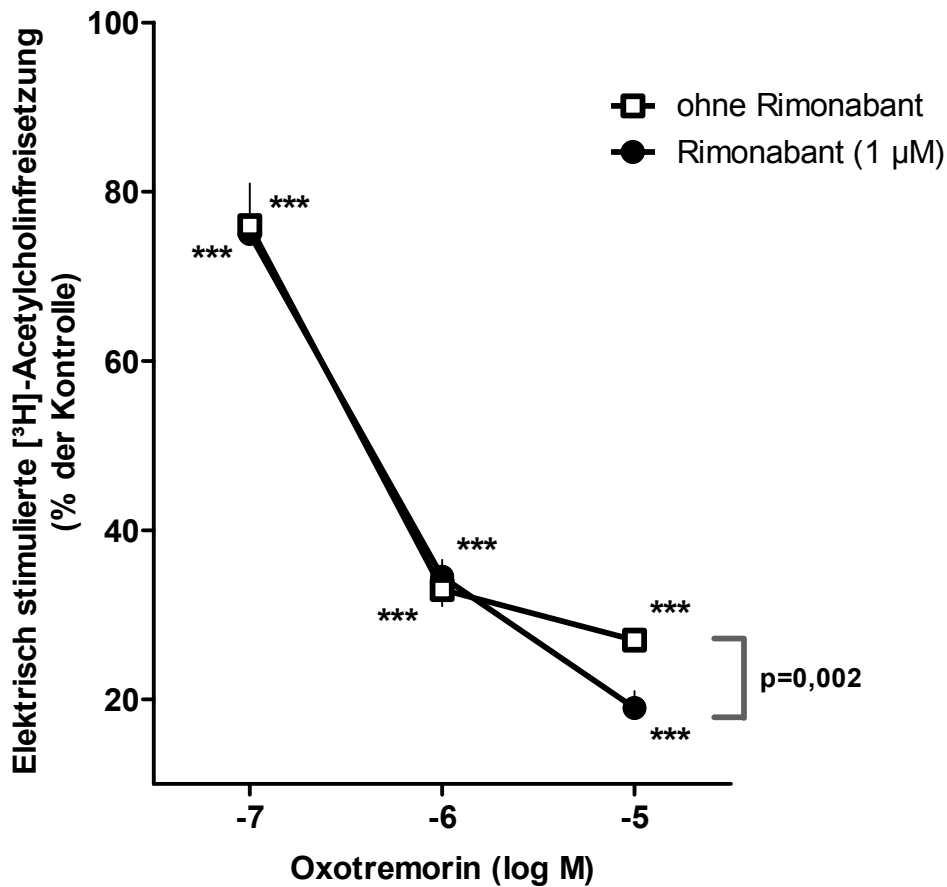
Da, wie oben gezeigt, Rimonabant zu einer signifikanten Verstärkung der Hemmwirkung von Oxotremorin 10 µM führt, könnte man nun davon ausgehen, dass diese durch die per se gesteigerte Tritiumfreisetzung durch Rimonabant entsteht; sprich, „wo mehr freigesetzt wird, kann auch mehr gehemmt werden“. Betrachtet man in diesem

Zusammenhang aber nur jene  $S_1$ -Werte für Rimonabant, die unterhalb des Mittelwertes, also  $< 2,6 \%$ , liegen, erhält man eine Tritiumfreisetzung von  $1,90 \pm 0,12$  ( $S_1 < 2,6 \%$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, % des Gewebetritiums), welche nahezu exakt auf dem Niveau der Tritiumfreisetzung ohne Rimonabant liegt (Abb. 8A). Die Hemmung der Tritiumfreisetzung durch Oxotremorin  $10 \mu\text{M}$  war in diesem Falle  $83 \%$ : Ein Unterschied zur Hemmung der nicht selektierten  $S_1$ -Werte ( $81 \%$  für alle  $S_1$ ) zeigt sich nicht (Abb. 8B).

Die basale Tritiumfreisetzung wird durch Rimonabant nicht beeinflusst (absolute Werte siehe Tab. 5). Ebenso wurde die basale Tritiumfreisetzung ( $t_2/t_1$ -Werte in den Kontrollen, siehe Tab. 5) durch Oxotremorin nicht beeinflusst (nicht gezeigt).

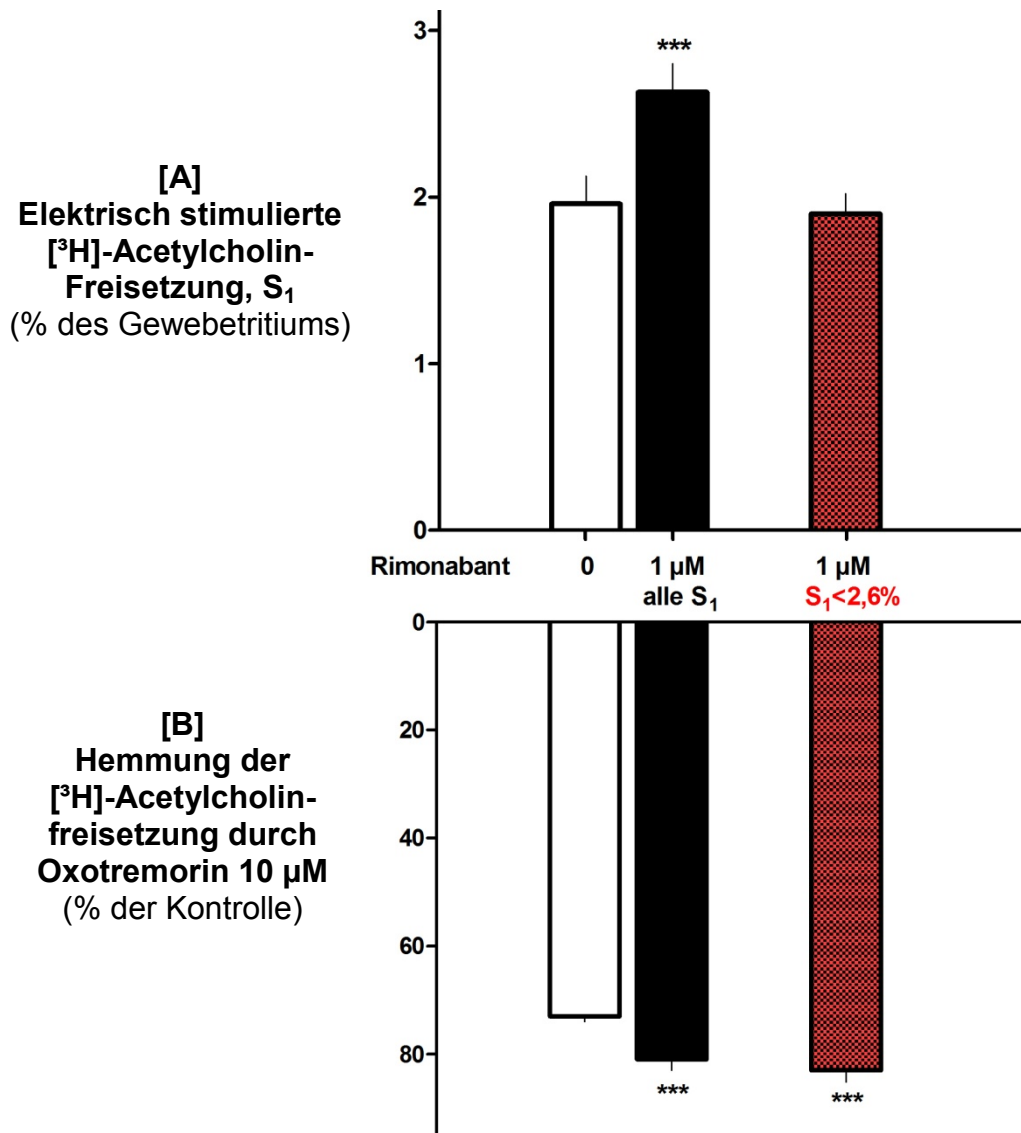
**Tab. 5: Einfluss von Rimonabant auf die basale Tritiumfreisetzung** ( $t_1$  sowie  $t_2 / t_1$ ) im superfundierten Hippocampus der Ratte. Rimonabant  $1 \mu\text{M}$  war während der gesamten Versuchsdauer im Superfusionsmedium enthalten. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 34 Experimenten. Hier ebenfalls aufgeführt: Reizparameter der entsprechenden Versuche, sowie die absoluten Werte der Kontrollen (ausgedrückt als  $S_2 / S_1$ ) nach elektrischer Stimulation

| Reizparameter                                       |                            | Basale Tritiumfreisetzung                                |                 | Elektrisch stimuliert   |
|---|----------------------------|--|-----------------|-------------------------|
|   |                            | $t_1$ (anteilige Tritiumfreisetzung; $\text{min}^{-1}$ ) | $t_2/t_1$       | Kontrolle ( $S_2/S_1$ ) |
| 3 Hz / 200 mA<br>$S_1$ : 40. min<br>$S_2$ : 90. min | ohne Zusatz                | $0,0021 \pm 0,0001$                                      | $0,56 \pm 0,04$ | $0,87 \pm 0,04$         |
|   | Rimonabant $1 \mu\text{M}$ | $0,0020 \pm 0,0001$                                      | $0,55 \pm 0,04$ | $0,89 \pm 0,04$         |



**Abb. 7: Effekt von Oxotremorin auf die Tritiumfreisetzung und Interaktion mit Rimonabant** Konzentrationsabhängiger Effekt von Oxotremorin auf die elektrisch stimulierte (3 Hz) Tritiumfreisetzung im superfundierten Hippocampus der Ratte und Interaktion mit Rimonabant 1  $\mu\text{M}$ . Rimonabant 1  $\mu\text{M}$  war von Beginn an im Superfusionsmedium enthalten, Oxotremorin wurde in den jeweiligen Konzentrationen ab der 60. Minute hinzugefügt. Ergebnisse hier dargestellt als Prozent (%) der Kontrolle ( $S_2 / S_1$ , nicht im Bild gezeigt; Absolutwerte: siehe Tab. 5). Auch hier erfolgte – ähnlich wie in Abb. 6 – eine zweifache statistische Auswertung: Zum einen wurde der Wert für Oxotremorin mit dem entsprechenden (im Bild nicht gezeigten) Oxotremorin-freien Wert verglichen (Sternchen). Zum anderen wurde das Ausmaß der Hemmung in An- und Abwesenheit von Rimonabant verglichen. Falls vorhanden, ist der Unterschied im Bild numerisch angegeben. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 18 - 30 Experimenten, \*\*\* $p < 0,001$



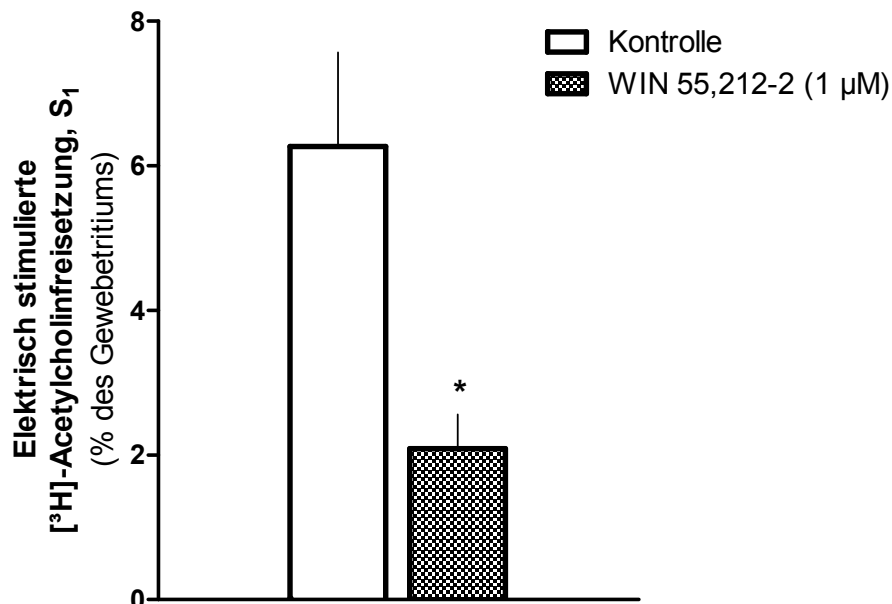


**Abb. 8: [A] Isolierter Effekt von Rimonabant 1 μM auf die elektrisch stimulierte (3 Hz) Tritiumfreisetzung** im superfundierten Hippocampus der Ratte zum Zeitpunkt des ersten Reizes (S<sub>1</sub>). Rimonabant war während der gesamten Versuchsdauer im Superfusionsmedium enthalten. *Weißer* Balken: Kontrolle ohne Rimonabant, *schwarzer* Balken: alle S<sub>1</sub>-Werte mit Rimonabant. In *rot* dargestellt: S<sub>1</sub>-Werte < 2,6 %, eine Auswahl der Hälfte aller S<sub>1</sub>-Werte mit geringerer Tritiumfreisetzung durch Rimonabant. Ergebnisse hier dargestellt als Prozent (%) des Gesamtgewebetritiums. Mittelwerte ± SEM aus 34 Experimenten, \*\*\*p < 0,001 im Vergleich zu Versuchen ohne Rimonabant

**[B] Hemmung der Tritiumfreisetzung durch Oxotremorin** Rimonabant war während der gesamten Versuchsdauer im Superfusionsmedium enthalten, Oxotremorin 10 μM entsprechend ab der 60. Minute. *Weißer* Balken: Hemmung von Oxotremorin ohne Rimonabant; *schwarzer* Balken: Hemmung durch Oxotremorin in Anwesenheit von Rimonabant (alle S<sub>1</sub>-Werte). *Roter* Balken: Hemmung durch Oxotremorin in Anwesenheit von Rimonabant entsprechend der in [A] getroffenen Selektion nach S<sub>1</sub>-Werten < 2,6 %. Ergebnisse hier dargestellt in Prozent (%) der Hemmung durch Oxotremorin (% der Kontrollen). Mittelwerte ± SEM aus 34 Experimenten, \*\*\*p < 0,001 im Vergleich zu Versuchen ohne Rimonabant

### 3.4.2 Interaktion von Oxotremorin und WIN 55,212-2

Betrachtet man zunächst den isolierten Effekt von WIN 55,212-2 auf die elektrisch stimulierte Transmitterfreisetzung in Hippocampus-Schnitten der Maus zum Zeitpunkt des ersten Reizes ( $S_1$ ), so lässt sich eine deutliche Hemmung der Tritiumfreisetzung durch WIN 55,212-2 beobachten (Abb. 9). In Anwesenheit von WIN 55,212-2 sinkt die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung von 6 % auf 2 % des Gewebetritiums. WIN 55,212-2 beeinflusst die basale Tritiumfreisetzung hingegen nicht (Tab. 6).



**Abb. 9: Isolierter Effekt von WIN 55,212-2 1  $\mu\text{M}$  auf die elektrisch stimulierte (3 Hz) Tritiumfreisetzung** im superfundierten Hippocampus der Maus zum Zeitpunkt des ersten Reizes ( $S_1$ ). Ergebnisse hier dargestellt als Prozent (%) des Gesamtgewebetritiums. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 6 - 8 Experimenten, \* $p < 0,05$  im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle

Eine solch starke Beeinflussung der Transmitterfreisetzung ( $S_1$ ) durch WIN 55,212-2 würde grundsätzlich eine Quantifizierung weiterer Ergebnisse unmöglich machen. Daher wurden alle weiteren Untersuchungen in Anwesenheit des  $\text{K}^+$ -Kanal-Blockers Tetraethylammoniumchlorid (TEA) durchgeführt.

**Tab. 6: Einfluss von WIN 55,212-2 auf die basale Tritiumfreisetzung** ( $t_1$  sowie  $t_2 / t_1$ ) im superfundierten Hippocampus der Maus. WIN 55,212-2 1  $\mu\text{M}$  war während der gesamten Versuchsdauer im Superfusionsmedium enthalten. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 6 - 8 Experimenten. Der Vollständigkeit halber ebenfalls aufgeführt: Reizparameter der entsprechenden Versuche sowie die absoluten Werte der Kontrollen (ausgedrückt als  $S_2 / S_1$ ) nach elektrischer Stimulation

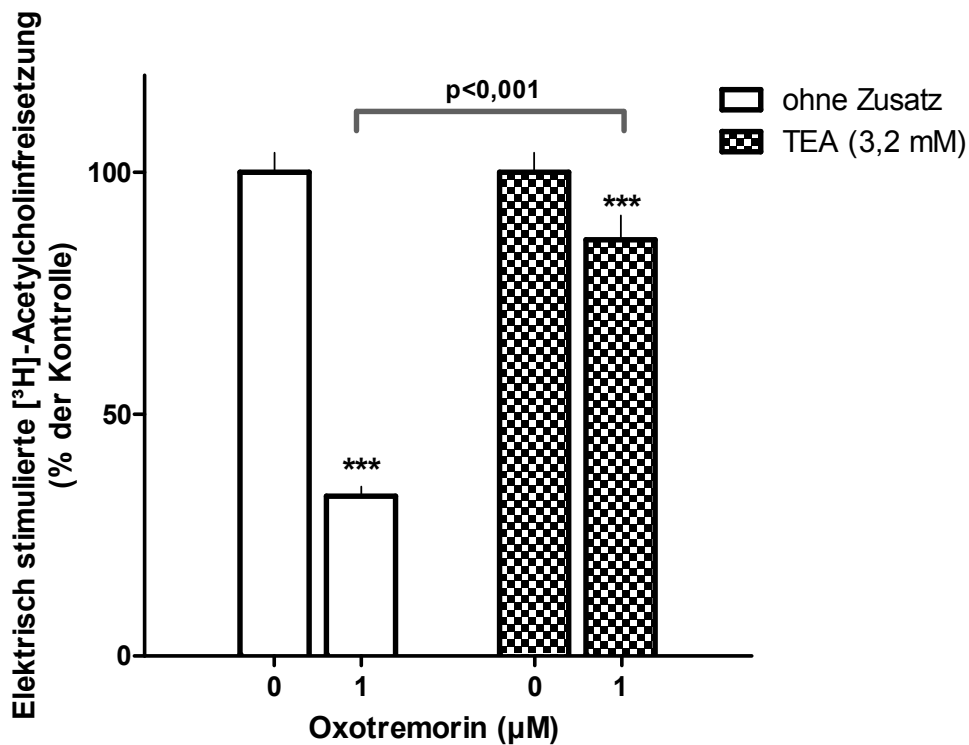
| Reizparameter                                       |                                 | Basaler Tritiumefflux                                    |                 | Elektrisch stimuliert |
|---|---------------------------------|--|-----------------|-----------------------|
|   |                                 | $t_1$ (anteilige Tritiumfreisetzung; $\text{min}^{-1}$ ) | $t_2/t_1$       | $S_2/S_1$             |
| 3 Hz / 200 mA<br>$S_1$ : 40. min<br>$S_2$ : 90. min | ohne Zusatz                     | 0,0021 $\pm$ 0,0011                                      | 0,47 $\pm$ 0,03 | 1,06 $\pm$ 0,05       |
|   | WIN 55,212-2<br>1 $\mu\text{M}$ | 0,0020 $\pm$ 0,0014                                      | 0,46 $\pm$ 0,03 | 1,09 $\pm$ 0,06       |

Da TEA entsprechend von Beginn der Superfusion im Medium enthalten war, wurde auch die Interaktion von TEA und WIN55,212-2, sowie der isolierte Effekt von TEA auf die basale und die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung zum Zeitpunkt des ersten Reizes untersucht. Der Hemmeffekt von Oxotremorin ist in Anwesenheit von TEA (3,2 mM) um 53 % ( $p < 0,001$ ) deutlich geringer ausgeprägt, als ohne Zusatz vom TEA (Abb. 10). Betrachtet man den isolierten Effekt von TEA zum Zeitpunkt des ersten Reizes ( $S_1$ ), so ist eine deutliche Steigerung der elektrisch stimulierten Tritiumfreisetzung von 4,65 % auf 8,16 % zu beobachten (Abb. 11).

TEA beeinflusst die basale Tritiumfreisetzung nicht (Tab. 7).

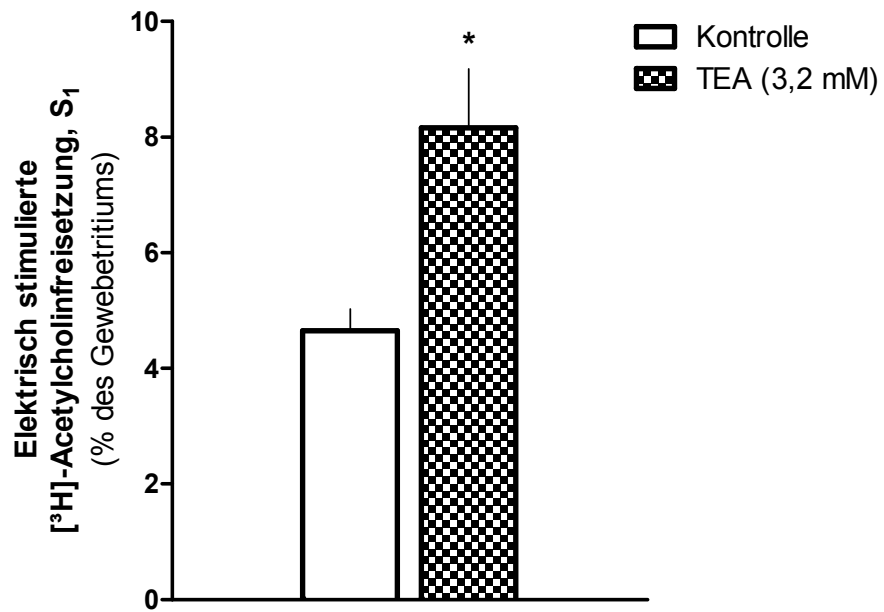
**Tab. 7: Einfluss von TEA auf die basale Tritiumfreisetzung** ( $t_1$  sowie  $t_2 / t_1$ ) im Hippocampus der Maus. TEA 3,2 mM war während der gesamten Versuchsdauer im Superfusionsmedium enthalten. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 - 7 Experimenten. Der Vollständigkeit halber ebenfalls aufgeführt: Reizparameter der entsprechenden Versuche sowie die absoluten Werte der Kontrollen (ausgedrückt als  $S_2 / S_1$ ) nach elektrischer Stimulation

| Reizparameter                                       |             | Basaler Tritiumefflux                                    |                 | Elektrisch stimuliert |
|---|-------------|--|-----------------|-----------------------|
|   |             | $t_1$ (anteilige Tritiumfreisetzung; $\text{min}^{-1}$ ) | $t_2/t_1$       | $S_2/S_1$             |
| 3 Hz / 200 mA<br>$S_1$ : 40. min<br>$S_2$ : 90. min | ohne Zusatz | 0,0012 $\pm$ 0,0004                                      | 0,75 $\pm$ 0,03 | 0,95 $\pm$ 0,03       |
|   | TEA 3,2 mM  | 0,0015 $\pm$ 0,0001                                      | 0,69 $\pm$ 0,02 | 0,99 $\pm$ 0,03       |

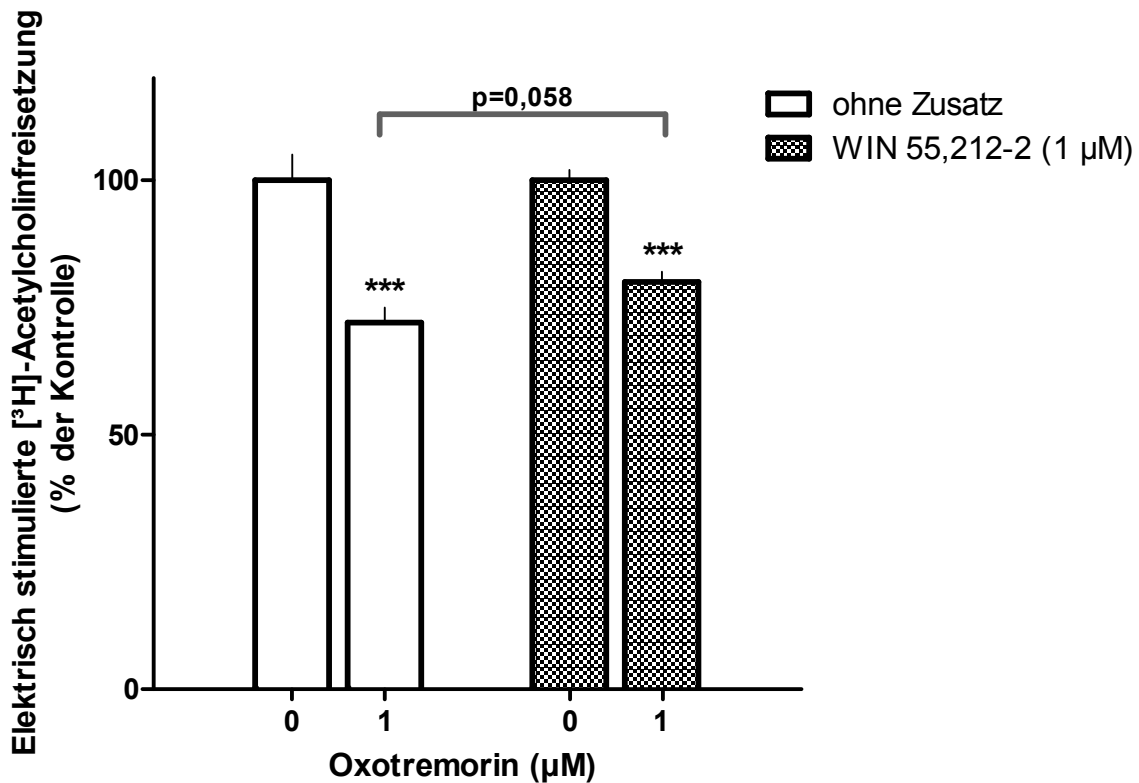


**Abb. 10: Effekt von Oxotremorin auf die Tritiumfreisetzung und Interaktion mit TEA** Effekt von Oxotremorin auf die elektrisch stimulierte (3 Hz) Tritiumfreisetzung im superfundierten Hippocampus der Maus und Interaktion mit TEA 3,2 mM. TEA 3,2 mM war von Beginn an im Superfusionsmedium enthalten, Oxotremorin 1 μM wurde ab der 60. Minute hinzugefügt. Ergebnisse hier dargestellt als Prozent (%) der Kontrolle (Absolutwerte: Tab. 7). Auch hier erfolgte eine zweifache statistische Testung: Wert für Oxotremorin im Vergleich zum Wert ohne das Pharmakon (Sternchen); Hemmeffekt von Oxotremorin in An- und Abwesenheit von TEA (Ergebnis der statistischen Testung numerisch dargestellt). Mittelwerte ± SEM aus 9 - 11 Experimenten, \*\*\*p < 0,001

Die Versuche zur Wechselwirkung zwischen Oxotremorin und WIN 55,212-2 wurden, wie oben ausgeführt, in Gegenwart von TEA durchgeführt (Abb. 12). In Anwesenheit von WIN 55,212-2 zeigte sich eine Verringerung des hemmenden Effektes von Oxotremorin auf die Transmitterfreisetzung um 8 %, welche annähernd Signifikanzniveau ( $p = 0,058$ ) erreicht (Abb. 12).



**Abb. 11: Isolierter Effekt von TEA 3,2 mM auf die elektrisch stimulierte (3 Hz) Tritiumfreisetzung** im superfundierten Hippocampus der Maus zum Zeitpunkt des ersten Reizes (S<sub>1</sub>). Ergebnisse hier dargestellt als Prozent (%) des Gesamtgewebetritiums. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 9 - 11 Experimenten, \*p < 0,05

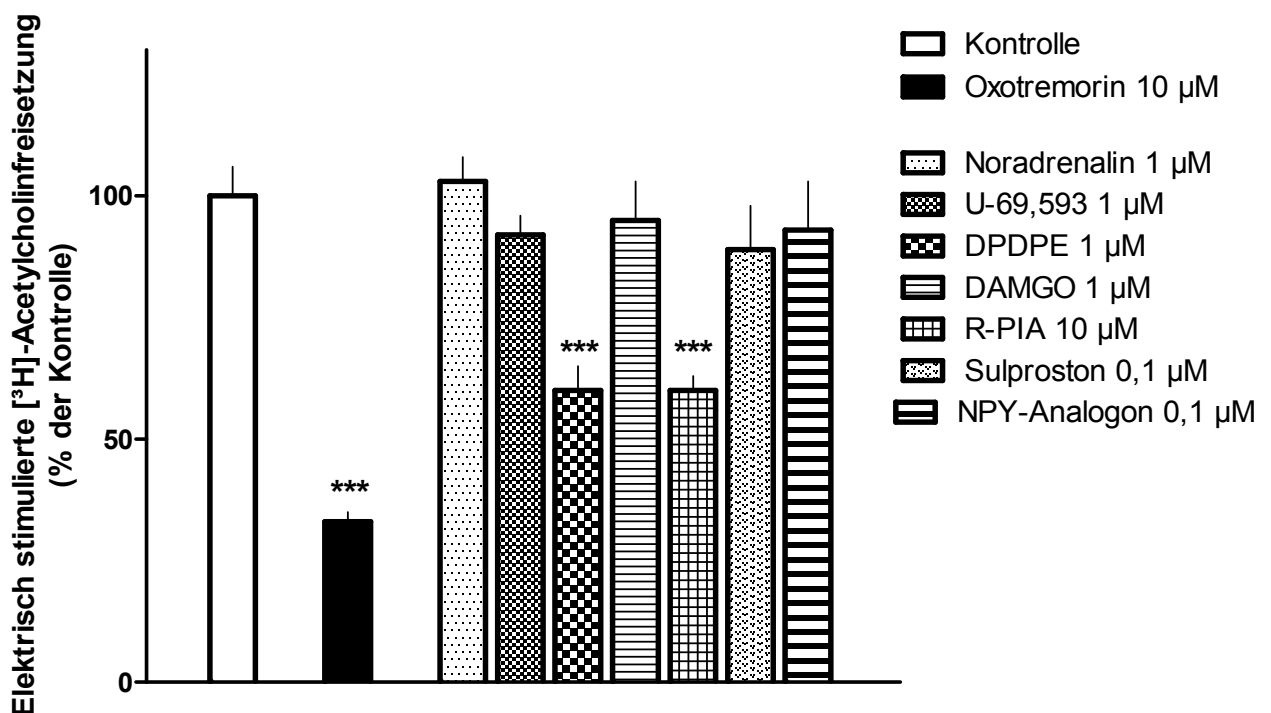


**Abb. 12: Effekt von Oxotremorin auf die Tritiumfreisetzung und Interaktion mit WIN 55,212-2** Effekt von Oxotremorin auf die elektrisch stimulierte (3 Hz) Tritiumfreisetzung im superfundierten Hippocampus der Maus und Interaktion mit WIN 55,212-2 1 μM. TEA 3,2 mM war in allen und WIN 55,212-2 1 μM in einem Teil der Versuche von Beginn an im Superfusionsmedium enthalten. Oxotremorin 1 μM wurde ab der 60. Minute hinzugefügt. Ergebnisse hier dargestellt als Prozent (%) der Kontrolle. Es erfolgte eine zweifache statistische Analyse: 1. Oxotremorin versus Oxotremorin-frei (Sternchen); 2. Hemmeffekt von Oxotremorin in An- und Abwesenheit von WIN 55,212-2 (statistische Auswertung numerisch dargestellt). Mittelwerte ± SEM aus 4 - 7 Experimenten, \*\*\*p < 0,001 im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle bzw. p = 0,058 im direkten Vergleich des Effekts von Oxotremorin mit und ohne WIN 55,212-2 1 μM

### 3.5 Charakterisierung inhibitorischer präsynaptischer Heterorezeptoren

Die Untersuchungen zur Charakterisierung geeigneter inhibitorischer präsynaptischer Heterorezeptoren wurden an Hippocampuspräparaten der Maus durchgeführt. In den Versuchsreihen wurden die Präparate unter Zusatz von [<sup>3</sup>H]-Cholinchlorid vorinkubiert (siehe Methodenteil) und zur 40. Minute und 90. Minute jeweils für zwei Minuten elektrisch stimuliert (Rechteckimpulse: 3 Hz, 200 mA, 2 ms). Hemicholinium 10 μM war als Hilfspharmakon bei allen Versuchen im Superfusionsmedium enthalten.

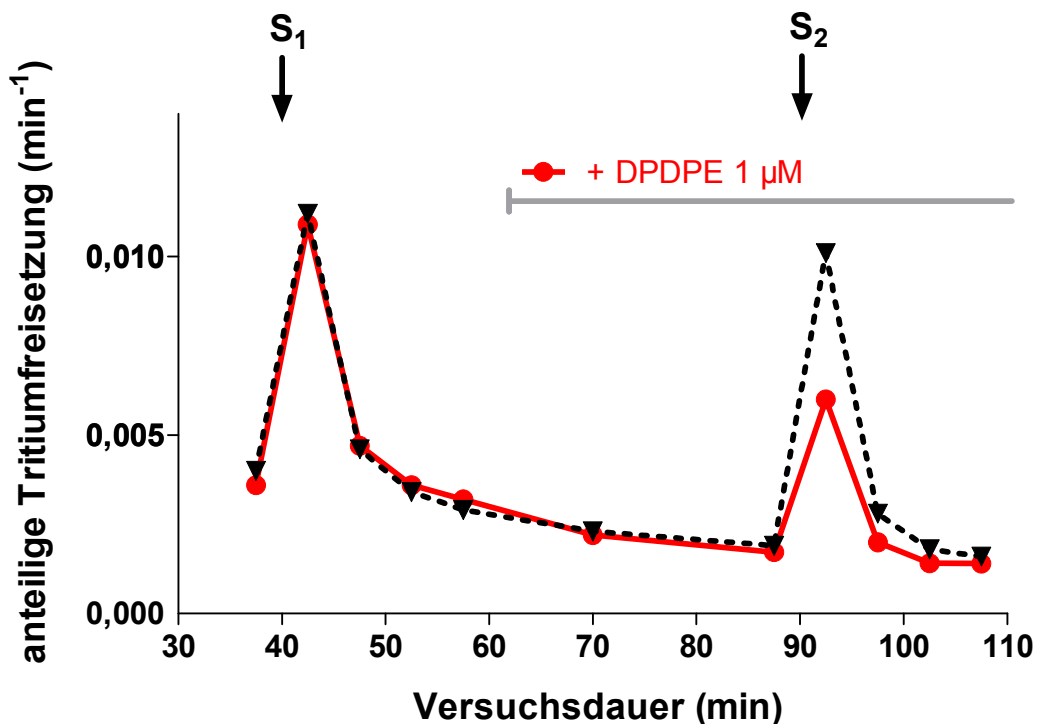
Auch in dieser Versuchsreihe zeigte sich die erwartete deutliche Hemmung der Transmitterfreisetzung durch Oxotremorin (um 67 %) im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle. Zur Identifikation weiterer inhibitorischer Rezeptoren an der Präsynapse wurden Versuche mit sieben Agonisten an verschiedenen Rezeptoren durchgeführt. Lediglich für DPDPE 1  $\mu\text{M}$  und R-PIA 10  $\mu\text{M}$  zeigte sich ebenfalls eine signifikante Hemmung der Transmitterfreisetzung, jeweils um 40 % (Abb. 13).



**Abb. 13: Effekt verschiedener Agonisten auf die Tritiumfreisetzung im Vergleich zum Effekt von Oxotremorin** Einfluss verschiedener Agonisten auf die elektrisch stimulierte (3 Hz) Tritiumfreisetzung im superfundierten Hippocampus der Maus, hier im Vergleich zum inhibitorischen Effekt von Oxotremorin (schwarzer Balken). Die verschiedenen Agonisten waren in den entsprechenden Konzentrationen ab der 60. Minute im Superfusionsmedium enthalten. Ergebnisse dargestellt als Prozent (%) der Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 - 9 Experimenten, \*\*\* $p < 0,001$  im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle

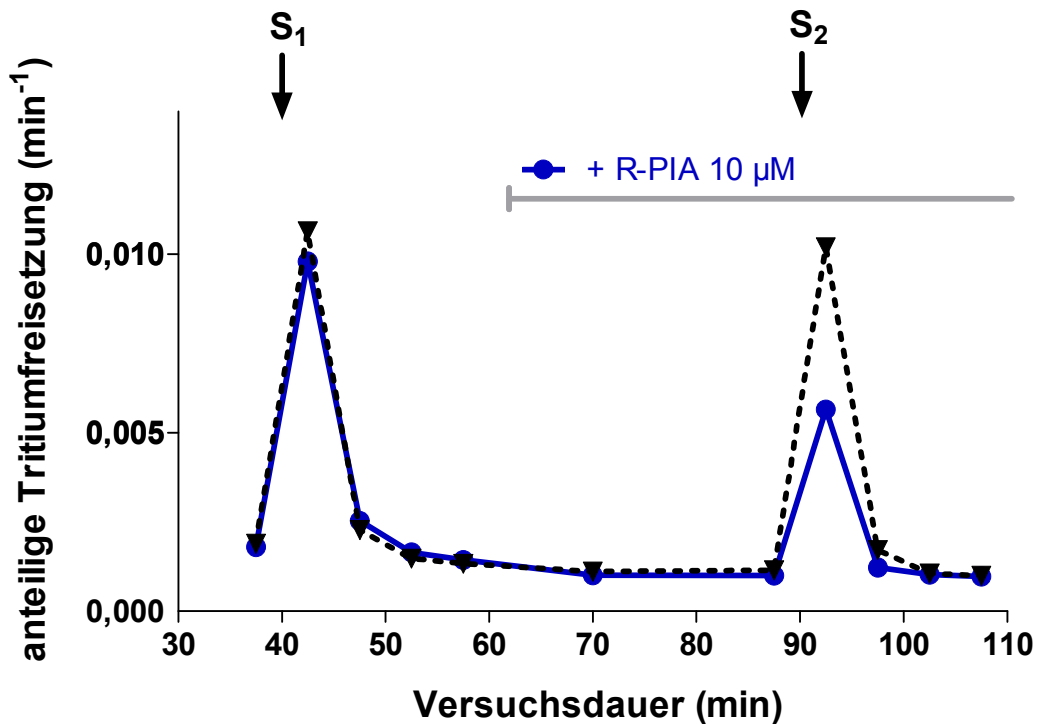
Die in dieser Versuchsreihe gefundenen inhibitorischen Eigenschaften von DPDPE und R-PIA waren Anlass, beide Substanzen genauer zu untersuchen (Abb. 14 bis Abb. 17).

Die Abb. 14 und Abb. 15 zeigen den Zeitverlauf typischer Einzelexperimente: Bei den Kontrollen (gestrichelt) kommt es bei beiden Reizen zu einem etwa gleich hohen Anstieg der Tritiumfreisetzung. Der zweite Reiz ( $S_2$ ) fällt hingegen viel niedriger aus, wenn DPDPE 1  $\mu\text{M}$  (Abb. 14) oder R-PIA 10  $\mu\text{M}$  (Abb. 15) ab der 60. Minute ins Superfusionsmedium eingeleitet wird (durchgezogene Linie).



**Abb. 14: Anteilige Tritiumfreisetzung über die Zeit in superfundiertem Hippocampus der Maus (+ DPDPE 1  $\mu\text{M}$ )** nach Vorinkubation mit [ $^3\text{H}$ ]-Cholin. Elektrische Reize (3 Hz, 200 mA, 2 ms) erfolgten für 120 Sekunden nach 40 ( $S_1$ ) und 90 ( $S_2$ ) Versuchsminuten, Änderung des Superfusionsmediums (Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  DPDPE) zur 60. Minute. Darstellung am Beispiel der anteiligen Tritiumfreisetzung einer einzelnen Gewebsstanze mit DPDPE (rote Kurve) und ohne Zusatz (Kontrolle, gestrichelte Kurve)



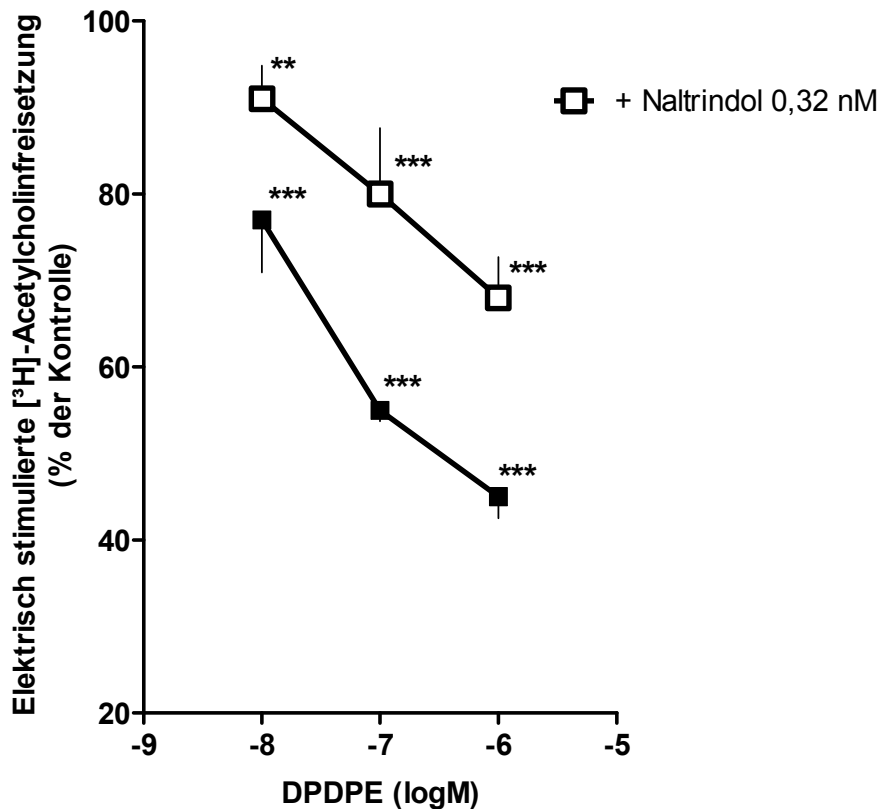


**Abb. 15: Anteilige Tritiumfreisetzung über die Zeit in superfundiertem Hippocampus der Maus (+ R-PIA 10  $\mu\text{M}$ )** nach Vorinkubation mit [ $^3\text{H}$ ]-Cholin. Elektrische Reize (3 Hz, 200 mA, 2 ms) erfolgten für 120 Sekunden nach 40 ( $S_1$ ) und 90 ( $S_2$ ) Versuchsminuten, Änderung des Superfusionsmediums (Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  R-PIA) zur 60. Minute. Darstellung am Beispiel der anteiligen Tritiumfreisetzung einer einzelnen Gewebsstanze mit R-PIA (blaue Kurve) und ohne Zusatz (Kontrolle, gestrichelte Kurve)

### 3.5.1 DPDPE

Der  $\delta$ -Opioid-Rezeptor-Agonist DPDPE hemmt die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung konzentrationsabhängig (Abb. 16). Die Konzentrationswirkungskurve zeigt eine Hemmwirkung von 55 % bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  für DPDPE. Zur Definition der Wirkstärke von DPDPE wurde der negative dekadische Logarithmus der Konzentration mit halbmaximalem Effekt (30 %) herangezogen. Der so ermittelte  $\text{pEC}_{50}$ -Wert betrug 7,8. Der  $\delta$ -Opioid-Rezeptor Antagonist Naltrindol 0,32 nM verschiebt die Konzentrationswirkungskurve nach rechts. Die Rechtsverschiebung durch Naltrindol 0,32 nM ergibt einen scheinbaren  $\text{pA}_2$ -Wert von 10,7 (Abb. 16).

Die basale Tritiumfreisetzung wurde durch DPDPE oder Naltrindol nicht beeinflusst (Tab. 8).



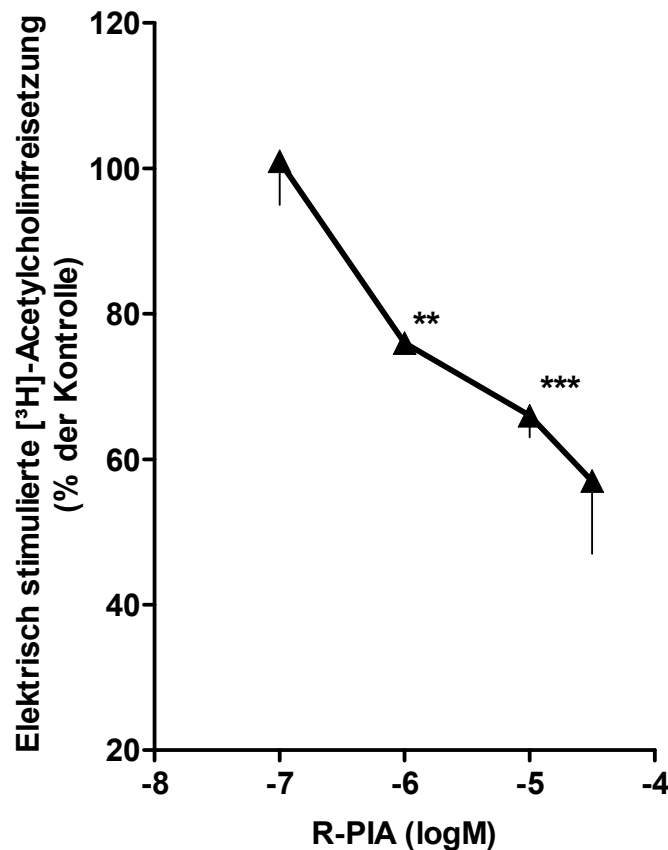
**Abb. 16: Effekt von DPDPE auf die Tritiumfreisetzung und Interaktion mit Naltrindol** Konzentrationsabhängiger Effekt von DPDPE auf die elektrisch stimulierte (3 Hz) Tritiumfreisetzung im superfundierten Hippocampus der Maus und Interaktion mit Naltrindol 0,32 nM. Naltrindol 0,32 nM war von Beginn an im Superfusionsmedium enthalten, DPDPE wurde in den jeweiligen Konzentrationen ab der 60. Minute hinzugefügt. Ergebnisse hier dargestellt als Prozent (%) der Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3-5 Experimenten, \*\* $p < 0,01$  bzw. \*\*\* $p < 0,001$  im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (nicht im Bild gezeigt; der entsprechende  $S_2 / S_1$ -Wert ist aus Tab. 8 ersichtlich)

**Tab. 8: Einfluss von Naltrindol auf die basale Tritiumfreisetzung ( $t_1$  sowie  $t_2 / t_1$ ) im Hippocampus der Maus.** Naltrindol 0,32 nM war während der gesamten Versuchsdauer im Superfusionsmedium enthalten. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 - 5 Experimenten. Der Vollständigkeit halber ebenfalls aufgeführt: Reizparameter der entsprechenden Versuche sowie die absoluten Werte der Kontrollen (ausgedrückt als  $S_2 / S_1$ ) nach elektrischer Stimulation

| Reizparameter                                       |                    | Basaler Tritiumefflux                                    |                 | Elektrisch stimuliert |
|---|--------------------|--|-----------------|-----------------------|
|   |                    | $t_1$ (anteilige Tritiumfreisetzung; $\text{min}^{-1}$ ) | $t_2/t_1$       | $S_2/S_1$             |
| 3 Hz / 200 mA<br>$S_1$ : 40. min<br>$S_2$ : 90. min | ohne Zusatz        | $0,0033 \pm 0,0010$                                      | $0,50 \pm 0,03$ | $0,87 \pm 0,08$       |
|   | Naltrindol 0,32 nM | $0,0027 \pm 0,0006$                                      | $0,53 \pm 0,03$ | $0,85 \pm 0,07$       |

### 3.5.2 R-PIA

Auch der Adenosin-Rezeptor-Agonist R-PIA hemmt die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung konzentrationsabhängig (Abb. 17). Die Konzentrationswirkungskurve zeigt eine maximale Hemmwirkung von 43 % bei einer Konzentration von 32  $\mu\text{M}$  für R-PIA. Zur Definition der Wirkstärke von R-PIA wurde der negative dekadische Logarithmus der Konzentration mit halbmaximalem Effekt (20 %) herangezogen. Der so ermittelte  $\text{pEC}_{50}$ -Wert betrug 6,1. Die basale Tritiumfreisetzung wurde durch R-PIA nicht beeinflusst (nicht gezeigt).



**Abb. 17: Konzentrationsabhängiger Effekt von R-PIA auf die elektrisch stimulierte (3 Hz) Tritiumfreisetzung im superfundierten Hippocampus der Maus.** R-PIA wurde in den jeweiligen Konzentrationen ab der 60. Minute hinzugefügt. Ergebnisse hier dargestellt als Prozent (%) der Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 - 8 Experimenten, \*\* $p < 0,01$  bzw. \*\*\* $p < 0,001$  im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (nicht im Bild gezeigt; der entsprechende  $S_2 / S_1$ -Wert ist aus Tab. 8 ersichtlich)

## 4. Diskussion

### 4.1 Versuchsbedingungen

Ein vesikulär gespeicherter Neurotransmitter, wie z. B. Noradrenalin oder Acetylcholin, wird bei Depolarisation der präsynaptischen Membran  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig exozytotisch, d. h. durch energieabhängige Fusionierung der Vesikel mit der Zellmembran, in den synaptischen Spalt freigesetzt. Hier kann der Neurotransmitter über prä- oder postsynaptische Rezeptoren wirken. Zur Quantifizierung der präsynaptischen Modulation der Transmitterfreisetzung werden Superfusionsversuche als in-vitro-Methode gewählt. Dabei werden Gewebsschnitte mit einer relativ geringen Konzentration des mit Tritium markierten Transmitters ( $^3\text{H}$ -Noradrenalin) oder seiner Vorstufe ( $^3\text{H}$ -Cholin) vorinkubiert. Der Transmitter oder seine Vorstufe gelangt über hochaffine neuronale Transportmechanismen in die entsprechenden Neuronen und wird durch elektrische oder chemische Stimulation (zusammen mit dem endogen vorhandenen Transmitter) präsynaptisch freigesetzt (im Falle von  $^3\text{H}$ -Cholin wird das in der Präsynapse gebildete  $^3\text{H}$ -Acetylcholin freigesetzt). Die Wirkung von im Extrazellulärraum anwesenden Pharmaka kann anhand der Messung der im Superfusat, nach Passieren des Gewebes, vorhandenen Menge an markiertem Transmitter quantifiziert werden.

Bei allen zur Superfusion verwendeten Gewebetypen ist in Vorversuchen nachzuweisen, dass die elektrische Reizung durch von außen angelegte Elektroden dem quasi-physiologischen Zustand entspricht, also zur Reizweiterleitung durch Änderung des Membranpotentials und anschließender Neurotransmitterfreisetzung führt.

Durch Zugabe von Tetrodotoxin (1  $\mu\text{M}$ ) oder durch Entzug von Kalziumionen im Medium wird eine (nahezu vollständige) Hemmung der elektrisch stimulierten Tritiumabgabe in  $^3\text{H}$ -Noradrenalin-vorinkubierten Hippocampuspräparaten des Meerschweins (Schlicker et al., 1997) und in  $^3\text{H}$ -Cholin-vorinkubierten Hippocampuspräparaten von Maus und Ratte erzielt (Starke, 1977; Starke et al., 1989). Tetrodotoxin ist ein in der Leber und den Gonaden des Kugelfisches gebildetes Gift, welches die spannungsabhängigen Natriumkanäle hemmt und somit eine Fortleitung des Aktionspotenzials entlang der Membran des Neurons unmöglich macht.

Ein ankommendes Aktionspotenzial öffnet üblicherweise spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Das einströmende  $\text{Ca}^{2+}$  verknüpft die elektrische Erregung der Membran mit der Exocytose.  $\text{Ca}^{2+}$  ist somit ein essentielles Ion für die Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran und anschließender Freisetzung der Neurotransmitter. Entzieht man dem Medium  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, ist die Kopplung des Aktionspotenzials mit der Exocytose aufgehoben.

Zur Erhöhung der absoluten Transmitterausschüttung und z. T. zur Verbesserung des Ausmaßes der Rezeptor-vermittelten Modulation wurden in den Versuchen an noradrenergen Synapsen während der gesamten Versuchsdauer Hilfspharmaka mitgeführt:

- (1) Desipramin blockiert den neuronalen Monoamintransporter für Noradrenalin. Hiermit soll nicht nur eine Interaktion der Testpharmaka mit dem Transporter unterbunden werden, sondern auch eine Steigerung der Freisetzung durch Blockierung der Wiederaufnahme bewirkt werden.
- (2) Rauwolscin, als Antagonist am  $\alpha_2$ -Autorezeptor, blockiert eine Wechselwirkung der Testpharmaka mit diesem Autorezeptor und verhindert so auch eine Rückkopplungshemmung durch den eigenen freigesetzten Transmitter. Ferner verstärkt dieser Antagonist das Ausmaß der über  $G_{i/o}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren erzielten Hemmung (Schlicker und Göthert, 1998).

In den Versuchen an  $[\text{H}^3]$ -Cholin-vorinkubierten Schnitten wurde Hemicholinium als Hilfspharmakon mitgeführt. Diese Substanz verhindert die Interaktion der Testpharmaka mit dem Transportmechanismus für Cholin und steigert die Tritiumfreisetzung.

Die nun folgende Besprechung der Befunde dieser Arbeit bezieht sich immer auf die elektrisch stimulierte Noradrenalin- oder Acetylcholin-Freisetzung, selbst wenn der Passus „elektrisch stimulierte“ häufig weggelassen wurde. Wie oben ausgeführt wurde, entspricht die elektrisch stimulierte Noradrenalin- bzw. Acetylcholin-Freisetzung der unter physiologischen Bedingungen erfolgenden Transmitterfreisetzung weitgehend. Im Ergebnis-Teil wurde auch die Wirkung der Pharmaka auf die basale Tritiumfreisetzung

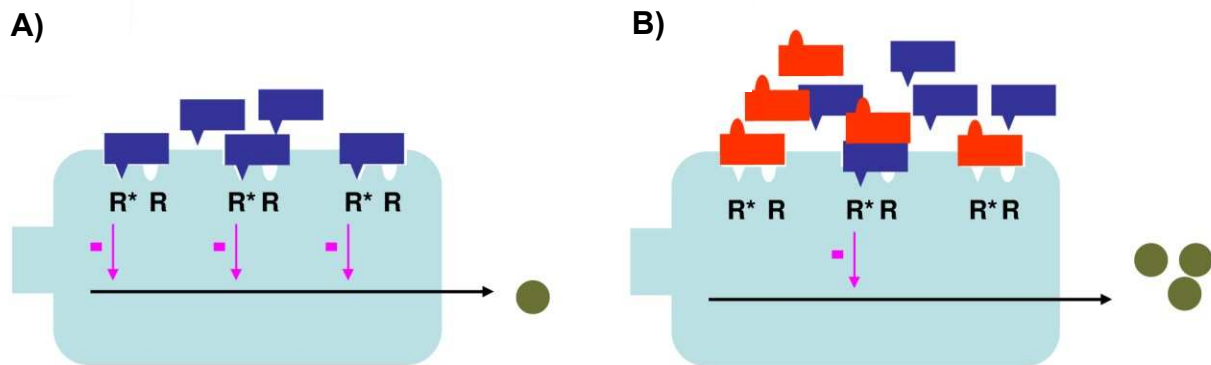
dargestellt. Hierbei handelt es sich um den passiven Efflux von Metaboliten der Neurotransmitter aus den Neuronen, dem keine physiologische Bedeutung zukommt. Allerdings ist von manchen Pharmaka (vor allem bei Verwendung hoher Konzentrationen) bekannt, dass sie zu einer Erhöhung des basalen Effluxes führen, was die Beurteilung der elektrisch stimulierten Transmitterfreisetzung stört. Erfreulicherweise kam es in den hier berichteten Experimenten zu keinen Veränderungen des basalen Effluxes.

## **4.2 O-2050: Neutraler Antagonist oder inverser Agonist?**

### **4.2.1 Rimonabant**

Die Entdeckung des „Endocannabinoid-Systems“ sowie der CB<sub>1</sub>- und CB<sub>2</sub>-Rezeptoren führte neben der Entwicklung verschiedener Agonisten auch zur Synthese antagonistisch wirksamer Substanzen. Als erster selektiver CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist wurde Rimonabant (SR 141716) beschrieben (Rinaldi-Carmona et al., 1994). Mit diesem Antagonisten-Prototyp erhoffte man sich die vollständige Evaluation der Pharmakologie des CB<sub>1</sub>-Rezeptors. In vitro ließ sich beispielsweise eine Steigerung sowohl der Noradrenalin- (Kathmann et al., 1999) als auch der Acetylcholinfreisetzung (Kathmann et al., 2001) im Hippocampus hervorrufen. In vivo beeindruckte vor allem die durch Rimonabant induzierte Reduzierung der Nahrungsaufnahme (Verty et al., 2004).

Die Frage, warum Rimonabant in zahlreichen Modellen die gegensätzliche Wirkung eines Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten zeigt, ist nicht trivial. Die klassische Erklärung (Erklärung I in Abb. 18A) ist die, dass sich unter den gewählten in-vitro- oder in-vivo-Bedingungen endogen gebildete Cannabinoide ansammeln (Abb. 18A, links) und dass Rimonabant deren Wirkung antagonisiert (Abb. 18A, rechts) und deshalb zu einem Effekt führt, der demjenigen eines Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten entgegengesetzt ist.

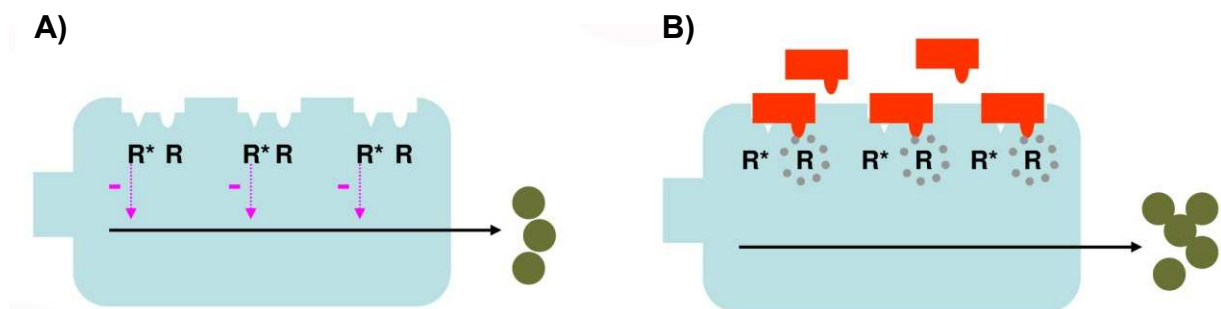


**Abb. 18A: Erklärung I für den steigernden Effekt von Rimonabant (rote Symbole) auf die Transmitterfreisetzung** (A) Endocannabinoide (blaue Symbole) akkumulieren in der Biophasse des Rezeptors. Durch die Bindung der Endocannabinoide am Rezeptor wird die Transmitterfreisetzung gehemmt. (B) Nach Zugabe von Rimonabant konkurriert dieses mit den Endocannabinoiden um die Bindung am Rezeptor. Dieser Antagonismus bedingt eine geringere Hemmung der Endocannabinoide und somit eine Steigerung der Transmitterfreisetzung (Abb. modifiziert nach van Diepen et al., 2008)

Es gibt aber noch eine ganz andere Erklärung (Erklärung II in Abb. 18B), die nur unter sehr speziellen Versuchsbedingungen studiert werden kann, d. h. unter Bedingungen, bei denen eine Aktivierung der Cannabinoid-Rezeptoren durch endogen gebildete Cannabinoide ausgeschlossen werden kann, etwa in Versuchsmodellen mit Zellen oder Membranen. Es gibt Rezeptoren – und der Cannabinoid-CB<sub>1</sub>-Rezeptor ist hierfür ein besonders gutes Beispiel –, die konstitutiv aktiv sind, d. h. sie „wirken“, ohne dass es der Aktivierung durch einen endogenen oder exogenen Agonisten bedarf (Abb. 18B, links). Diese spontane Wirkung kann durch einen inversen Agonisten „abgeschaltet“ werden (Abb. 18B, rechts).

Die Frage, ob Rimonabant ein inverser Agonist oder aber ein neutraler Antagonist an CB<sub>1</sub>-Rezeptoren ist, ist zu Gunsten eines inversen Agonisten zu beantworten: In der Tat sind einige Effekte von Rimonabant in vollständiger Abwesenheit von endogenen Cannabinoiden zu beobachten (Pertwee, 2005; Pertwee, 2006). Eine Erklärung auf Grundlage des Mechanismus in Abb. 18A erscheint in diesem Fall wenig plausibel. Zur weiteren Aufklärung entwickelten Pan et al. (1998) eine hCB<sub>1</sub>-Rezeptor-Variante (K192A, d. h. in der Aminosäuresequenz des Rezeptors ist in Position 192 das Lysin (K) durch ein Alanin (A) ersetzt), an welcher Rimonabant als mutmaßlicher Antagonist allein

keine invers-agonistische Wirkung mehr erzielen konnte, die Wirkung von Agonisten am  $CB_1$ -Rezeptor jedoch weiterhin antagonisierte. Im Gegensatz hierzu erzeugte Rimonabant am entsprechenden Wild-Typ- $hCB_1$ -Rezeptor weiterhin, auch ohne Agonisten, invers-agonistische Effekte. Alles in allem wirkt Rimonabant nicht als neutraler Antagonist, sondern als inverser Agonist am  $CB_1$ -Rezeptor (Landsman et al., 1997; Pan et al., 1998).



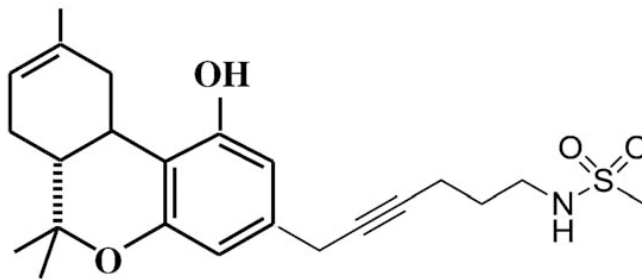
**Abb. 18B: Erklärung II für den steigernden Effekt von Rimonabant (rote Symbole) auf die Transmitterfreisetzung** (A) Der Rezeptor ist konstitutiv aktiv und befindet sich in einem aktiven Zustand ( $R^*$ ). (B) Zugabe von Rimonabant als inverser Agonist führt zu einer Isomerisierung des Rezeptors. Hiermit geht die Hemmung der Transmitterfreisetzung verloren und ein steigernder Effekt von Rimonabant auf die Transmitterfreisetzung ist zu beobachten (Abb. modifiziert nach van Diepen et al., 2008)

Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, zwischen den möglichen Erklärungen für den Effekt von Rimonabant zu differenzieren. Hierfür ist die Untersuchung der Wirkung eines neutralen Antagonisten am  $CB_1$ -Rezeptor notwendig. Ein neutraler Antagonist blockiert nach der Definition sowohl die Wirkung eines Agonisten als auch diejenige eines inversen Agonisten. Man würde also eine Eigenwirkung eines neutralen Antagonisten nur dann erwarten, wenn Erklärung I vorliegt (Abb. 18A; Interaktion zwischen endogenem Cannabinoid und dem exogen zugeführten neutralen Antagonisten). Wenn Erklärung II zutrifft, würde ein neutraler Antagonist keine Wirkung haben (Abb. 18B; keine Interaktionsmöglichkeit). Bis dato sind einige Substanzen beschrieben worden, die sich wie neutrale Antagonisten verhalten. Als Beispiele finden sich VCHSR (Hurst et al., 2002) und NESS 0327 (Ruiu et al., 2003), aber auch 0-2050 (Pertwee, 2005), welches bislang in Bezug auf die Neurotransmitterfreisetzung nicht untersucht wurde.



#### 4.2.2 O-2050

O-2050 ist ein Struktur analogon von  $\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol. Lediglich in Position C3 wurde die Pentyl-Seitenkette durch einen Acetylenrest mit einer terminalen Sulfonamid-Gruppe ausgetauscht (Abb. 19).



**Abb. 19: Strukturformel des Cannabinoid  $CB_1$ -Rezeptor-Antagonisten O-2050**  
Struktur analogon von  $\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol. Die Pentyl-Seitenkette von  $\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol wurde bei O-2050 durch einen Acetylenrest mit einer terminalen Sulfonamidgruppe ausgetauscht

Der Effekt von O-2050 auf die Modulation der Neurotransmitterfreisetzung wurde in diesem Fall an hippocampalem Hirngewebe des Meerschweins untersucht. Den entsprechenden Versuchen mussten zwei Experimentalserien vorgelagert werden. Erstens war zu untersuchen, wie stark die antagonistische Wirkung von O-2050 im Vergleich zu Rimonabant ist, damit beim Vergleich mit Letzterem die geeigneten Konzentrationen verwendet werden können. Zweitens war zu untersuchen, ob O-2050 im Meerschwein-Hippocampus tatsächlich ein neutraler Antagonist ist. Da bei den hier verwendeten Superfusionsexperimenten an Gewebsschnitten eine Ansammlung von endogenen Cannabinoiden möglich ist, wurde hierfür eine andere Methode an Membranen des Meerschwein-Hippocampus gewählt.

Zunächst konnte in Hirnschnitten des Meerschweins gezeigt werden, dass die Noradrenalinfreisetzung durch den  $CB_1$ -Agonisten WIN 55,212-2 (Pertwee, 2005 b) konzentrationsabhängig gehemmt wurde. Die hieraus ermittelte Wirkstärke  $pEC_{50}$  für WIN 55,212-2 betrug 6,1. Die Konzentrationswirkungskurve wurde durch O-2050 nach rechts

verschoben. Der scheinbare  $pA_2$ -Wert für O-2050 liegt bei 7,3. Hiermit konnte gezeigt werden, dass O-2050 antagonistisch am  $CB_1$ -Rezeptor wirkt (Abb. 2). Durch die Verwendung der Hilfspharmaka Desipramin und Rauwolscin konnte gleichzeitig eine Modulation der Noradrenalinfreisetzung durch O-2050 über den Noradrenalintransporter oder den  $\alpha_2$ -Rezeptor ausgeschlossen werden. Unter exakt identischen Versuchsbedingungen war von unserer Arbeitsgruppe der scheinbare  $pA_2$ -Wert für Rimonabant mit 8,2 ermittelt worden (Schlicker et al., 1997).

Die Frage, ob O-2050 ein neutraler Antagonist ist, wurde mithilfe von [ $^{35}S$ ]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien geklärt. Parameter ist hier nicht die Transmitterfreisetzung, sondern die G-Protein-Aktivierung. Wie erwartet, steigerte der Antagonist WIN 55,212-2 die [ $^{35}S$ ]GTP $\gamma$ S-Bindung, während der inverse Antagonist Rimonabant eine Hemmung bewirkte. O-2050 beeinflusste die [ $^{35}S$ ]GTP $\gamma$ S-Bindung bei alleiniger Gabe überhaupt nicht, was dafür spricht, dass hier ein neutraler Antagonist vorliegt (Schulte und Schlicker, unpubliziert).

Nach Klärung der antagonistischen Wirkstärke von O-2050 und seines neutralen Antagonismus konnte nun der Vergleich mit Rimonabant bezüglich der Transmitterfreisetzung in Meerschweinchen-Hippocampuschnitten angestellt werden. O-2050, das aufgrund seiner ca. 10-fach schwächeren Wirkungsstärke in 10-mal höherer Konzentration als Rimonabant eingesetzt wurde, zeigte eine deutliche Steigerung der elektrisch stimulierten Noradrenalinfreisetzung. Im direkten Vergleich zu Rimonabant zeigte sich eine schwächere Wirkung (Abb. 4). Dieser Unterschied ist eventuell auf den zusätzlichen Effekt des inversen Agonismus von Rimonabant zurückzuführen. Es bleibt aber festzuhalten, dass Erklärung I (Abb. 18A) qualitativ ausreichend ist, um den steigernden Effekt von Rimonabant auf die Noradrenalinfreisetzung zu erklären.

Neuere Veröffentlichungen kommen zu dem Schluss, dass eine Klassifizierung von O-2050 als neutraler Antagonist ungenau sei (Wiley et al., 2011). In [ $^{35}H$ ]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien und Versuchen am Vas deferens der Maus zeigten sich eindeutig antagonistische Eigenschaften, wohingegen im Rahmen von Versuchen zur Forskolin-induzierten Stimulation der zyklischen AMP-Produktion partiell agonistische Eigenschaften auftraten (Wiley et al., 2011). Die in vitro Ergebnisse deuten mehrheitlich auf

einen neutralen Antagonismus von O-2050 hin. Die in vivo Ergebnisse widersprechen hingegen größtenteils der Annahme, dass O-2050 ein neutraler Antagonist ist. So ruft O-2050 in vivo eine signifikante und dosisabhängige Hemmung der Nahrungsaufnahme hervor (Wiley et al., 2011). Hier zeigt sich eine eindruckliche Parallele zu Rimonabant.

Rimonabant führte ebenfalls zu einer Reduzierung der Nahrungszufuhr (Verty et al., 2004). Geht man davon aus, dass die unerwünschten Nebenwirkungen von Rimonabant als Medikament zur Behandlung der Adipositas auf die Wirkung als inverser Agonist zurückzuführen sind, macht es auch unter diesem Aspekt Sinn, nach neutralen Antagonisten zu suchen (Giraldo, 2010). Allerdings stellte sich bereits in der Vergangenheit eine Zuordnung von Substanzen in die Klasse der neutralen Antagonisten häufig als falsch heraus, da sie, während des Versuchs einer funktionellen Bestimmung der Wirkweise, plötzlich Eigenschaften eines inversen Agonisten zeigten. In diesem Zusammenhang postuliert Giraldo (2010), dass es keine neutralen Antagonisten gibt, da bei entsprechenden Konzentrationen kein Antagonist neutral bleibt. Es sollte bei der Klassifikation von Antagonisten besser eine qualitative denn eine zwanghafte quantitative Einteilung eben dieser stattfinden, also bei der Untersuchung neuer Substanzen ein relativer Bezug zur Wirkstärke von Rimonabant hergestellt werden (Giraldo, 2010).

Insgesamt deuten die Untersuchungen darauf hin, dass O-2050 in vitro ein neutraler Antagonist ist. Die Ergebnisse von Wiley et al. (2011) lassen anklingen, dass weitere Untersuchungen nötig sind, um den Effekt von O-2050 noch genauer zu identifizieren.

#### **4.3 Epigenetische Beeinflussung: Wirkung auf präsynaptische CB<sub>1</sub>-Rezeptoren?**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Aktivierung des präsynaptischen CB<sub>1</sub>-Rezeptors als auch eine pharmakologische Blockade desselben eine veränderte Transmitterfreisetzung nach sich zieht. Darüber hinaus wirkt sich eine pharmakologische Beeinflussung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors auch auf andere präsynaptische Rezeptoren aus (z.B. den Muscarinrezeptor M<sub>2</sub>). Auch das Fehlen des CB<sub>1</sub>-Rezeptors moduliert den Effekt anderer Rezeptoren (Schulte et al., 2012).

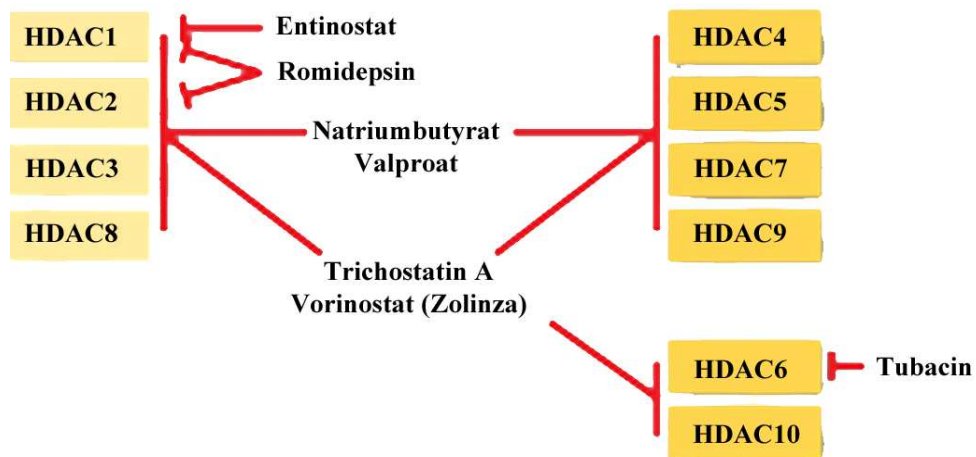
Ferner ist die Beeinflussung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors durch epigenetische Prozesse und damit eine Manipulation an den Chromosomen bzw. des Phänotyps denkbar. Eine Manipulation epigenetischer Prozesse ließe die DNA-Sequenzen unverändert. Neben der Aktivität von Transkriptionsfaktoren hat die dreidimensionale Struktur des Chromatins einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität von Genen. Veränderungen des Chromatins können daher als Signaturen verstanden werden, die definierte Bereiche des Genoms markieren und Gene an- oder abschalten (Strahl und Allis, 2000). Die Struktur des Chromatins wird im Wesentlichen durch den Acetylungsgrad der Histonproteine bestimmt. Dieser wird durch gegensinnig wirkende Enzymsysteme reguliert (Abb. 1). Ob eine solche Manipulation des Acetylungsgrades der Histonproteine auch einen Einfluss auf Rezeptoraktivitäten hat, wurde bislang kaum untersucht. Ein solcher Einfluss ist durchaus plausibel, da beschrieben wurde, dass in Gliedmaßen von Maus-Embryonen mit einem Alter von 10,5 Tagen der p300-Enhancer (eine Histonacetyltransferase) mit der verminderten Expression des CNR1 (CB<sub>1</sub>-Rezeptor)-Gens korreliert (Visel et al., 2009).

Neuere Arbeiten an Nagern deuten darauf hin, dass die Chromatin-Plastizität wesentlich zur Gedächtniskonsolidierung beiträgt. Die Histon-Acetylierung wurde dabei durch die Verabreichung von HDAC-Inhibitoren (HDAC-I) erreicht. Die Gabe von HDAC-I führte im Vergleich zur Placebo-behandelten Gruppe auch in Wildtyp-Mäusen und Ratten zu einer deutlich verbesserten Gedächtniskonsolidierung (Fischer, 2010). Teilweise haben HDAC-Is bereits das Stadium des Einsatzes am Menschen erreicht. So entwickeln sie sich in jüngster Zeit zu einer neuen Klasse in der Therapie bestimmter Karzinome. Auf der Suche nach selektiveren Medikamenten und somit einer effizienteren Therapie erscheinen die HDAC-Is als eine vielversprechende Therapieoption (Walkinshaw und Yang, 2008). So wird spekuliert, dass normale Zellen die kritischen Effekte der HDAC-Inhibitoren zum Teil rückgängig machen können und damit im Gegensatz zu den malignen Zellen eine relative Resistenz gegenüber HDAC-Is aufweisen (Zirlik et al., 2010). Der erste von der FDA (Food and Drug Administration, USA) 2006 zugelassene HDAC-Inhibitor war Vorinostat (Zolinza<sup>®</sup>). Vorinostat erhielt die Zulassung als Drittlinientherapie bei Patienten mit kutanen T-Zell-Lymphomen. Erst kürzlich wurde Romidepsin (Istodax<sup>®</sup>) als weiteres Medikament zur Behandlung der kutanen T-Zell-

Lymphome von der FDA zugelassen. Beide Substanzen erhielten im europäischen Raum keine Zulassung (Zirlik et al., 2010).

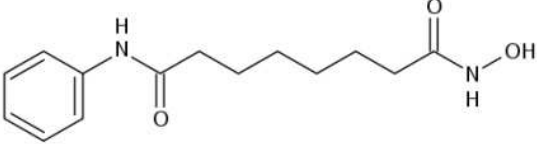
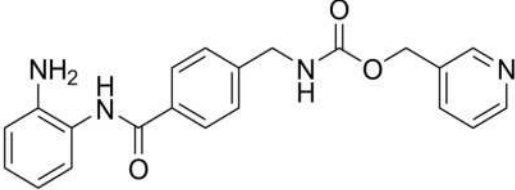
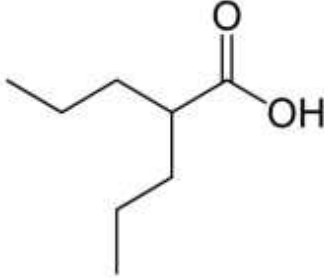
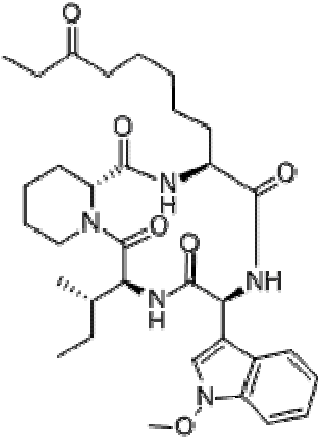
Es gibt elf HDAC-Proteine, die aufgrund ihrer Homologien in mehrere Klassen eingeteilt werden. Die Klasse I HDACs (HDAC 1, 2 und 8) sind hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, wohingegen die Klasse-II-HDACs (HDAC 5, 6, 7, 9 und 10) durch zusätzliche regulatorische Domänen deutlich größer sind und sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu finden sind. HDAC 11 ist bisher der einzige Vertreter der Klasse-IV-HDACs. HDACs der Klassen I, II und IV benötigen Zink als Cofaktor. Daneben gibt es noch sieben, als Sirtuine bezeichnete Klasse-III-HDACs, die  $\text{NAD}^+$  als Cofaktor brauchen (Fischer, 2010).

Die HDAC-Inhibitoren lassen sich in vier strukturelle Gruppen einteilen (Tab. 9) und repräsentieren ein breites Spektrum chemischer Substanzen (Walkinshaw und Yang, 2008). Die meisten derzeit zur Verfügung stehenden Substanzen inhibieren die HDACs relativ unselektiv (Abb. 20).



**Abb. 20: HDAC-Inhibitoren.** Das Schema zeigt die Spezifität von HDAC-Inhibitoren. Dieses Schema stammt aus dem Kontext der experimentellen Testung von HDAC-Inhibitoren im Rahmen neuronaler Krankheiten (Schema modifiziert nach Fischer, 2010)

**Tab. 9: Einteilung der HDAC-Inhibitoren** mit Substanzbeispielen für die einzelnen Klassen

|   | Klasse                        | Substanzen                              | Struktur  |
|---|-------------------------------|---|---|
| 1 | <u>Hydroxamate</u>            | SAHA<br>(Vorinostat, Zolinza®)          |     |
| 2 | <u>Benzamid-Derivate</u>      | MS-275 (Entinostat)                     |    |
| 3 | <u>kurzkettige Fettsäuren</u> | Valproat (VPA),<br>Natriumbutyrat (NaB) |   |
| 4 | <u>zyklische Tetrapeptide</u> | Apicidin                                |  |

Im Rahmen unserer Versuchsreihe testeten wir die beiden HDAC-Is Natriumbutyrat (NaB) und Valproat (VPA). Beide Substanzen gehören der Substanzklasse III (kurzkettige Fettsäuren) an und inhibieren relativ unselektiv HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC8 und HDAC9 (Abb. 20). Mittlerweile konnte in verschiedenen Mausmodellen für Morbus Alzheimer gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren wie NaB und VPA neuroprotektiv wirken und auch neuroregenerative Eigenschaften aufweisen, gleiches gilt für die Behandlung von Morbus Parkinson (Fischer, 2010).

Valproat ist ein gut untersuchtes Medikament, welches seit langer Zeit aus der Behandlung verschiedenster Formen der Epilepsie bekannt ist. Der exakte anti-epileptische Wirkmechanismus ist unbekannt, wobei folgende Möglichkeiten diskutiert werden:

- (1) Erhöhung der GABA-Konzentration durch Förderung der GABA-Synthese bzw. Hemmung des GABA-Abbaus sowie vermehrte GABA-Freisetzung in den synaptischen Spalt;
- (2) verminderte Bildung und Freisetzung von Aspartat;
- (3) Hemmung schnell feuender Natriumkanäle;
- (4) Hemmung von T-Typ Kalziumkanälen im hohen Konzentrationsbereich (Rowan, 1997).

Darüber hinaus wurde VPA bereits 1999 in die klinische Testung zur anti-Tumor-Therapie eingesetzt und wird bis heute in vielen verschiedenen Studien getestet (Hoshino und Matsubara, 2010).

In unserer Versuchsreihe ließ sich bestenfalls eine dezente Verstärkung des Hemmeffekts von WIN 55,212-2 bei Vorinkubation mit VPA und NaB beobachten. Dieser Effekt verfehlte jedoch das Signifikanzniveau. Es ist kritisch anzumerken, dass die Anzahl der Versuche mit 6 - 8 Experimenten relativ gering ist. Um auch ein statistisch valides Ergebnis zu erhalten, sind sicherlich weitere Testreihen nötig. Ein weiterer Punkt, der kritisch diskutiert werden muss, ist die Frage der Expositionsdauer der Hippocampus-

Schnitte gegenüber NaB oder VPA. Die hier gewählte mehrstündige Exposition (und die gewählten Konzentrationen) führten bei Zellen zu epigenetischen Veränderungen. Die Frage, ob dieses Prozedere auf Hirnschnitte übertragen werden kann, muss gestellt werden. Insbesondere ist zu überlegen, ob eine mehrwöchige Vorbehandlung der Tiere mit dem jeweiligen Pharmakon einen signifikanteren Effekt erzielen würde. Darüber hinaus ist anzustreben, dass die chemische Veränderung der Histonproteine, d. h. die Acetylierung bestimmter Lysin-Reste mithilfe geeigneter Detektions-Verfahren (z. B. Western Blots) bewiesen wird.

Möglicherweise wäre ein besserer Effekt zu erwarten, wenn man andere HDAC-Is als VPA und NaB testen würde. So werden beispielsweise die HDAC6 und HDAC10 nicht von VPA oder NaB inhibiert. Es zeigte sich aber in Untersuchungen zur Therapie der Chorea Huntington, dass HDAC-Inhibitoren wie Entinostat oder 4-Phenylbutyrat, die nicht die HDAC6 hemmen, eben keinen protektiven Effekt haben. Analog hierzu könnte man folgern, dass bei der epigenetischen Beeinflussung des Gewebes mit VPA und NaB kein Effekt auf den CB<sub>1</sub>-Rezeptor beobachtet wird, weil nicht alle HDAC inhibiert wurden. Eine genauere Aufklärung, welche Subtypen der HDACs einen Effekt auf den CB<sub>1</sub>-Rezeptor haben, ist sinnvoll.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich allenfalls ein marginaler Effekt der epigenetisch wirksamen Pharmaka VPA und NaB beobachten lässt. Zunächst sollte untersucht werden, ob die Vorbehandlung der Tiere in vivo statt lediglich isolierter in vitro Behandlung der Hirnschnitte einen Unterschied zeigt. Zweitens sollte eine Überprüfung der Effizienz der Behandlung mithilfe der Untersuchung der Acetylierung von Lysin-Resten stattfinden und letztens sollte eine Untersuchung zur Inhibition der verschiedenen Subgruppen der HDACs durchgeführt werden.



#### 4.4 Wechselwirkung zwischen präsynaptischem CB<sub>1</sub>-Rezeptor und Muscarinrezeptor (M<sub>2</sub>)

Der CB<sub>1</sub>-Rezeptor ist üblicherweise an terminalen Axonen zu finden und dort präsynaptisch lokalisiert. Agonisten am CB<sub>1</sub>-Rezeptor (z.B. WIN 55,212-2) führen zu einer Hemmung der Transmitterfreisetzung und antagonistisch wirkende Substanzen (z.B. Rimonabant) führen entsprechend zu einer Steigerung. Effekte einer Beeinflussung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors wirken sich intrazellulär über rezeptorgekoppelte G<sub>i/o</sub>-Proteine aus (van Diepen et al., 2008). Ein Neuron ist mit mehreren präsynaptischen Rezeptoren ausgestattet, und bislang sind viele verschiedene andere Rezeptoren beschrieben worden, die, wie der CB<sub>1</sub>-Rezeptor, ihre Wirkung präsynaptisch G<sub>i/o</sub>-Protein gekoppelt vermitteln (Kubista und Boehm, 2006). Die Funktion eines Neurons wird durch diese verschiedenen Rezeptoren beeinflusst. Da Rezeptoren nicht unabhängig voneinander arbeiten, hat die Aktivierung eines ersten Rezeptors möglicherweise einen Einfluss auf den durch einen zweiten Rezeptor vermittelten Effekt (Schlicker und Göthert, 1998). Eine solche Interaktion konnte schon vielfach für präsynaptische Rezeptoren an noradrenergen Neuronen gezeigt werden (siehe Tab. 10).

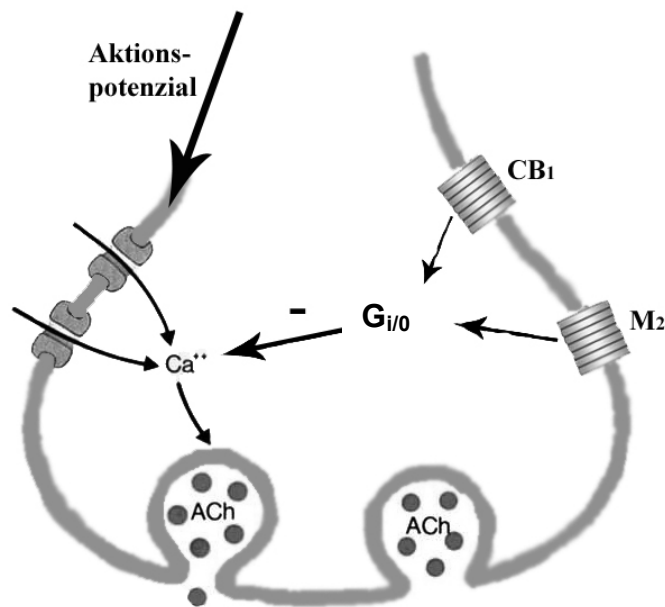
**Tab. 10: Interaktion verschiedener Heterorezeptoren mit dem  $\alpha_2$ -Autorezeptor** Der durch die genannten Heterorezeptoren erzielte Effekt wurde bei gleichzeitiger Aktivierung oder Blockade des  $\alpha_2$ -Autorezeptor abgeschwächt bzw. verstärkt

| <i>Rezeptor</i>             | <i>endogener Ligand</i>                   | <i>Interaktion mit dem <math>\alpha_2</math>-Autorezeptor</i> | <i>Literaturstelle</i>          |
|-----------------------------|---|---|---------------------------------|
| A <sub>1</sub>              | Adenosin                                  | ja  | Allgaier et al., 1991           |
| CB <sub>1</sub>             | Anandamid,<br>2-Arachidonoyl-<br>glycerol | ja  | Schlicker und Göthert, 1998     |
| $\delta$ (OP <sub>1</sub> ) | Enkephalin                                | ja  | Ramme et al., 1986              |
| 5-HAT <sub>1B</sub>         | 5-Hydroxytryptamin<br>(Serotonin)         | ja  | Molderings und Göthert,<br>1990 |
| M <sub>2</sub>              | Acetylcholin                              | ja  | Loiacono et al., 1985           |

Eine solche Interaktion scheint es auch an cholinergen Neuronen zu geben. Bei Untersuchungen an der motorischen Endplatte des Frosches konnte eine Wechselwirkung des präsynaptischen A<sub>1</sub>-Rezeptors und des ebenfalls präsynaptisch lokalisierten M<sub>2</sub>-Autorezeptors nachgewiesen werden (Shakirzyanova et al., 2006). Ähnliches zeigte sich auch an der motorischen Endplatte der Ratte (Oliveira et al., 2002). Shakirzyanova et al. (2006) zeigen für die Wechselwirkung von A<sub>1</sub>- und M<sub>2</sub>-Rezeptor konvergierende intrazelluläre Signalwege, denn die Aktivierung beider Rezeptoren führt, über einen gemeinsamen Effektor, zur Reduktion des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms an der Präsynapse. Studien am Hippocampus der Ratte deuten darauf hin, dass es auch hier eine Wechselwirkung zwischen Muscarinrezeptoren und κ-Opioid-Rezeptoren gibt (Hiramatsu et al., 1998).

Wechselwirkungen mit anderen präsynaptischen Rezeptoren im Hippocampus, vor allem der Maus, sind bislang nicht beschrieben. Untersuchungen zur Wechselwirkung des in dieser Arbeit im Fokus stehenden CB<sub>1</sub>-Rezeptors mit präsynaptischen Muscarinrezeptoren am cholinergen Neuron fehlen ebenfalls. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen präsynaptischem CB<sub>1</sub>-Rezeptor und dem Muscarinrezeptor im Hippocampus der Ratte und Maus, genauer, ob eine Blockade oder Aktivierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors den durch den muscarinischen Autorezeptor M<sub>2</sub> hervorgerufenen Effekt beeinflusst.

Von dem muscarinischen Autorezeptor ist bekannt, dass dieser den Gehalt an Acetylcholin im synaptischen Spalt durch Inhibition der Ach-Freisetzung reguliert (Zhang et al., 2002). Diese Autoinhibition wird im Hippocampus vornehmlich durch den M<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt (Zhang et al., 2002). Der M<sub>2</sub>-Rezeptor führt G-Protein-gekoppelt zu einer Reduktion der Öffnungswahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen, also des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms als Antwort auf ein Aktionspotenzial (Caulfield, 1993). Ein geringerer Ca<sup>2+</sup>-Einstrom bedingt eine Verminderung der Transmitterfreisetzung (Abb. 21).



**Abb. 21: Schematische Darstellung der präsynaptischen Membran einer Nervenendigung** Das eintreffende Aktionspotenzial führt zur Öffnung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Nachfolgend führt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zur Fusion der Vesikel mit der synaptischen Membran und zur Freisetzung des Neurotransmitters, in diesem Fall Acetylcholin (ACh). Die Transmitterfreisetzung wird durch verschiedene präsynaptische Rezeptoren,  $\text{G}_{i/o}$ -Protein gekoppelt, inhibitorisch moduliert; hier gezeigt sind der Cannabinoid- $\text{CB}_1$ - und der Muscarin- $\text{M}_2$ -Rezeptor. Die verschiedenen Typen von Rezeptoren der Präsynapse beeinflussen sich gegenseitig. In dieser Arbeit soll der Effekt a) einer Blockade oder b) einer Aktivierung des  $\text{CB}_1$ -Rezeptors auf die durch den  $\text{M}_2$ -Rezeptor hervorgerufene Inhibition der Transmitterfreisetzung untersucht werden

#### 4.4.1 Blockade des $\text{CB}_1$ -Rezeptors durch Rimonabant

Oxotremorin selbst zeigt, wie zu erwarten, eine konzentrationsabhängige Inhibition der ACh-Freisetzung in Hippocampus-Schnitten der Ratte. Unter Zugabe von Rimonabant, also gleichzeitiger Blockade des  $\text{CB}_1$ -Rezeptors, zeigt sich für Oxotremorin  $10 \mu\text{M}$  eine signifikante ( $p = 0,002$ ) Verstärkung des hemmenden Effekts. Rimonabant hat selbst einen deutlich steigernden Effekt auf die elektrisch stimulierte Transmitterfreisetzung zum Zeitpunkt des ersten Reizes ( $\text{S}_1$ ). Deshalb könnte man nun denken, dass diese Transmitterfreisetzung selbst eine über  $\text{M}_2$ -Autorezeptoren vermittelte Inhibition hervorruft und somit die Verstärkung des hemmenden Effekts von Oxotremorin überlagert. Somit wäre eine klare Differenzierung einer möglichen Wechselwirkung von  $\text{CB}_1$ - und  $\text{M}_2$ -Autorezeptor nicht möglich.

Um diesem Problem entsprechend zu begegnen, wurden aus allen Versuchen mit Rimonabant-Freisetzung von (2,63 %  $\pm$  0,17 %) jene herausgesucht, bei denen das Niveau der Acetylcholin-Freisetzung sehr niedrig ist. Für diese Versuche allein ergibt sich eine mittlere Transmitterfreisetzung von 1,90 %  $\pm$  0,12 %, welche nahezu auf dem Niveau aller Rimonabant-freien Kontrollen liegt (1,96 %  $\pm$  0,17 %). Den steigernden Effekt durch Rimonabant somit ausgeschlossen, konnte gezeigt werden, dass auch für diese Versuche der hemmende Effekt von Oxotremorin durch Rimonabant signifikant ( $p < 0,001$ ) verstärkt wurde (Abb. 8[B], roter Balken).

#### **4.4.2 Aktivierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors durch WIN 55,212-2**

Zunächst ist bei diesen Versuchen an Hippocampus-Schnitten der Maus festzustellen, dass WIN 55,212-2 selbst einen deutlich ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf die ACh-Freisetzung hat. Da unter dieser Voraussetzung eine weitere Quantifizierung der Effekte auf die Transmitterfreisetzung unmöglich wäre, wurden alle weiteren Versuche in Anwesenheit von Tetraethylammoniumchlorid (TEA) weitergeführt. Bei Versuchen an noradrenergen Neuronen steigerte TEA signifikant die Noradrenalinfreisetzung (Nakamura et al., 2004). TEA blockiert spannungsabhängige K<sup>+</sup>-Kanäle (Baranowska-Kuczko et al., 2012), was zu einer Steigerung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt und somit eine gesteigerte Transmitterfreisetzung bedingt (Schulte et al., 2010). TEA führt zum Zeitpunkt des ersten Reizes zu einer deutlichen Steigerung der elektrisch stimulierten ACh-Freisetzung, bedingt jedoch eine deutliche Abschwächung des Hemmeffekts von Oxotremorin um 53 %. Das letztgenannte Phänomen erklärt sich so, dass eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in der Nervenendigung und dem Ausmaß der Modulierbarkeit der Transmitterfreisetzung besteht (Starke, 1977).

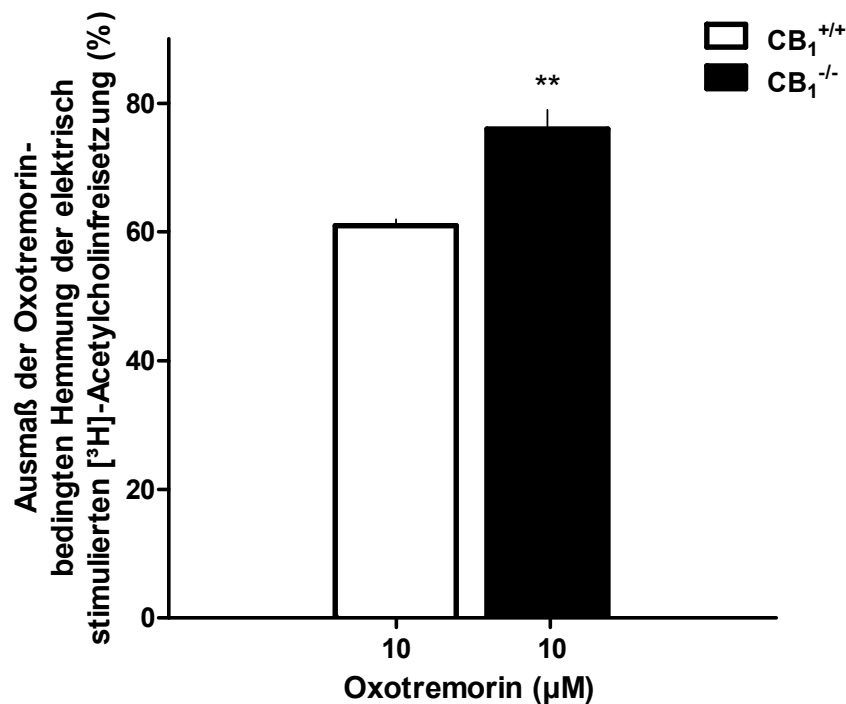
In den Versuchen zur Wechselwirkung von CB<sub>1</sub>- und M<sub>2</sub>-Rezeptor zeigt sich bei Aktivierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors durch WIN 55,212-2 eine Verringerung der Hemmwirkung durch Oxotremorin 1  $\mu$ M nahezu auf Signifikanzniveau ( $p = 0,058$ ). So wird deutlich, dass eine Wechselwirkung zwischen präsynaptischem CB<sub>1</sub>- und M<sub>2</sub>-Rezeptor besteht. Durch pharmakologische Beeinflussung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors, zum einen durch Blockade und zum anderen durch Aktivierung, lässt sich der Effekt durch

Aktivierung des  $M_2$ -Autorezeptors gegenläufig beeinflussen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der gegenläufigen Effekte von Rimonabant und WIN 55,212-2 zu erzielen, wären jeweils Versuche mit Hippocampus von Mäusen (Rimonabant) bzw. Ratten (WIN 55,212-2) durchzuführen.

#### 4.4.3 Versuche mit Knock-out ( $CB_1^{-/-}$ )-Mäusen

Zum Problem der Wechselwirkung zwischen  $CB_1$ - und  $M_2$ -Rezeptor wurde in einer Studie unserer Arbeitsgruppe noch eine andere Vorgehensweise gewählt. Es zeigte sich, dass auch ein Fehlen des  $CB_1$ -Rezeptors in Knock-out ( $CB_1^{-/-}$ )-Mäusen den Effekt des  $M_2$ -Rezeptors moduliert. So ist der hemmende Effekt von Oxotremorin im Hippocampus der Knock-out ( $CB_1^{-/-}$ )-Mäuse stärker ausgeprägt als bei Wild-Typ ( $CB_1^{+/+}$ )-Mäusen (Schulte et al., 2012 und Abb. 22). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass dies weder auf einem gesteigerten Gehalt an  $M_2$ -Rezeptoren beruht, noch durch eine Vermehrung der Endocannabinoide hervorgerufen wird, sondern am ehesten auf eine gesteigerte Verfügbarkeit der  $G_{i/o}$ -Proteine zurückzuführen ist (Schulte et al., 2012). Tatsächlich konnte in der Studie von Schulte et al. (2012) eine leichte Vermehrung von  $G_{i/o}$ -Protein in isolierten Nervenendigungen der Knock-out-Mäuse nachgewiesen werden. Mechanistisch könnte dies so zu deuten sein, dass den  $M_2$ -Rezeptoren mehr  $G_{i/o}$ -Proteine zur Verfügung steht und dementsprechend der Effekt (d. h. die Hemmung der Acetylcholinfreisetzung) verstärkt ist (Abb. 21).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es Wechselwirkungen zwischen präsynaptischem  $CB_1$ -Rezeptor und Muscarinrezeptor ( $M_2$ ) gibt. Der genaue Mechanismus bleibt nachwievor unklar, jedoch erscheint es plausibel, dass beide Rezeptoren ihren Effekt über eine gemeinsame Endstrecke vermitteln. Ein Zusammenhang der Effekte beider Rezeptoren scheint in der gesteigerten oder verminderten Verfügbarkeit der  $G_{i/o}$ -Proteine zu bestehen.



**Abb. 22: Effekt von Oxotremorin 10 µM auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung** im superfundierten Hippocampus von CB<sub>1</sub><sup>+/+</sup> (Wild-Typ)-Mäusen und CB<sub>1</sub><sup>-/-</sup> (Knock-out)-Mäusen. \*\*p < 0,01 im Vergleich zur Wild-Typ-Maus. Mittelwerte ± SEM aus 7 - 20 Experimenten, (Abb. modifiziert nach Schulte et al., 2012)

#### 4.5 Inhibitorische Heterorezeptoren am cholinergen Neuron

Eben wurde die Wechselwirkung zwischen dem präsynaptischen CB<sub>1</sub>- und dem muscarinergen Autorezeptor (M<sub>2</sub>) am cholinergen Neuron diskutiert. Hier stellt sich die Frage, ob es eine entsprechende Wechselwirkung auch dann gibt, wenn statt des M<sub>2</sub>-ein anderer präsynaptischer inhibitorischer Rezeptor betrachtet wird. Insgesamt finden sich in der Literatur kaum Hinweise zum Vorkommen von präsynaptisch lokalisierten inhibitorisch wirkenden Heterorezeptoren am cholinergen Neuron. Insbesondere ihr Vorkommen im Hippocampus der Maus ist bislang nicht beschrieben. Ziel ist es daher, geeignete Rezeptoren am cholinergen Neuron im Hippocampus der Maus zu identifizieren.

Wissenschaftliche Arbeiten zu präsynaptischen Heterorezeptoren am noradrenergen Neuron bieten einen guten Anhalt für die Untersuchung möglicher inhibitorischer Heterorezeptoren am cholinergen Neuron. Tab. 11 zeigt bereits am noradrenergen bzw.

serotoninerger Neuron der Maus nachgewiesene inhibitorische Heterorezeptoren mit den entsprechenden Agonisten.

Ein weiterer in Frage kommender präsynaptischer Heterorezeptor ist der Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor, für welchen ein inhibitorischer Effekt auf die ACh-Freisetzung an der motorischen Endplatte der Ratte nachgewiesen wurde (Oliveira et al., 2009). Als Agonist wurde hier R-PIA 10 µM beschrieben.

**Tab. 11: Präsynaptisch lokalisierte inhibitorische Heterorezeptoren an Neuronen der Maus** in verschiedenen Geweben und verschiedenen Transmittersystemen. Die Tabelle zeigt den jeweiligen Heterorezeptor mit entsprechendem Agonisten in der Konzentration, die zum maximalen oder nahezu maximalen Effekt führt. Zusätzlich wird dargestellt, an welchem Neuron der Heterorezeptor identifiziert wurde

| <i>Rezeptor</i>               | <i>Agonist</i>       | <i>Neuron</i>  | <i>Literaturstelle</i>       |
|-------------------------------|----------------------|----------------|------------------------------|
| δ (OP <sub>1</sub> )          | DPDPE 1 µM           | noradrenerg    | Trendelenburg et al., 2000   |
| κ (OP <sub>2</sub> )          | U-69,593 1 µM        | noradrenerg    |                              |
| µ (OP <sub>3</sub> )          | DAMGO 1 µM           | noradrenerg    |                              |
| α <sub>2</sub>                | Noradrenalin 1 µM    | noradrenerg    | Schlicker et al., 1994       |
| Prostaglandin EP <sub>3</sub> | Sulproston 0,1 µM    | noradrenerg    | Günther et al., 2010         |
| Neuropeptid Y <sub>2</sub>    | Neuropeptid Y 0,1 µM | serotoninerger | Schlicker und Kathmann, 2008 |

Unter den sieben hier untersuchten Rezeptoren zeigt sich in dieser Arbeit lediglich für zwei Rezeptoren eine inhibitorische Wirkung. Aktivierung des δ-Opioid-Rezeptors mittels DPDPE 1 µM und des Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptors mittels R-PIA 10 µM führten zu einer signifikanten Hemmung der ACh-Freisetzung im Hippocampus der Maus (Abb. 13).

#### 4.5.1 $\delta$ -Opioid-Rezeptor

DPDPE hemmte die elektrisch stimulierte Acetylcholinfreisetzung konzentrationsabhängig. Zur Definition der Wirkstärke von DPDPE wurde der negativ dekadische Logarithmus der Konzentration mit halbmaximalem Effekt herangezogen. Der so ermittelte  $pEC_{50}$ -Wert beträgt 7,8. Der  $\delta$ -Opioid-Rezeptor Antagonist Naltrindol 0,32 nM verschiebt die Konzentrationswirkungskurve nach rechts. Hierfür errechnet sich ein scheinbarer  $pA_2$ -Wert von 10,7 (Abb. 16).

Der  $\delta$ -Opioid-Rezeptor findet sich nahezu in allen Teilen des autonomen Nervensystems und an vielen Stellen im zentralen Nervensystem. Untersuchungen hierzu wurden speziesübergreifend durchgeführt. Die Freisetzung von verschiedensten Transmittern kann durch eine Aktivierung des  $\delta$ -Opioid-Rezeptors inhibitorisch moduliert werden (vgl. Tab. 12; Schlicker und Kathmann, 2008). Wie auch die anderen Opioid-Rezeptoren ist der  $\delta$ -Opioid-Rezeptor  $G_{i/o}$ -Protein gekoppelt (Alexander et al., 2006). Es scheint wahrscheinlich, dass der  $\delta$ -Opioid-Rezeptor in manchen Modellen einem endogenen Tonus unterliegt. So konnte mit dem Opioid-Rezeptor-Antagonisten Naloxon bei alleiniger Gabe eine Steigerung der Transmitterfreisetzung, also der gegensätzliche Effekt eines Agonisten (z.B. DPDPE), erzeugt werden. Jener Effekt zeigte sich beispielsweise für die Freisetzung von Substanz P im Rückenmark der Katze (Go und Yaksh, 1987), für die Freisetzung von Acetylcholin im parasymphathischen Ganglion des Colons der Katze (Kennedy und Krier, 1987) oder im Striatum der Ratte (Sándor et al., 1991). Im hier untersuchten Modell ist ein endogener Tonus allerdings unwahrscheinlich, denn der  $\delta$ -Opioid-Rezeptor Antagonist zeigte keinen Eigeneffekt auf die Acetylcholinfreisetzung. Da es gelungen ist, mit dem  $\delta$ -Opioid-Rezeptor einen weiteren inhibitorisch präsynaptischen Rezeptor in dem vorliegenden Modell zu identifizieren, wurde auch dessen Wechselwirkung mit dem  $CB_1$ -Rezeptor untersucht. In einer Publikation unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Wechselwirkung in der Tat auftritt, d. h. bei fehlendem  $CB_1$ -Rezeptor ist das Ausmaß der  $\delta$ -Opioid-Rezeptor-vermittelten Hemmung der Acetylcholinfreisetzung im Hippocampus der Maus verstärkt (Schulte et al., 2012).



**Tab. 12: Synopsis einiger präsynaptisch lokalisierter inhibitorischer  $\delta$ -Opioid-Rezeptoren**

|                   | <i>Ort</i>            | <i>Transmitter</i> | <i>Spezies</i> | <i>Literaturstelle</i>       |
|-------------------|-----------------------|--------------------|----------------|------------------------------|
| ZNS               | Kortex                | Noradrenalin       | Mensch         | Berger et al., 2006          |
|                   | Striatum              | Dopamin            | Ratte          | Schlosser et al., 1995       |
|                   | Hippocampus           | Serotonin          | Ratte          | Mulder und Schoffemeer, 1993 |
|                   | Striatum              | Acetylcholin       | Ratte          |                              |
|                   | Kortex                | Glutamat           | Ratte          | Ostermeier et al., 2000      |
|                   | Nucleus subthalamicus | GABA               | Ratte          | Shen und Johnson, 2002       |
| Para-symphathikus | Ileum                 | Acetylcholin       | Maus           | Illes, 1989                  |
|                   | Colon                 | Acetylcholin       | Katze          |                              |
|                   | Herz                  | Acetylcholin       | Kaninchen      |                              |

#### 4.5.2 Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor

R-PIA hemmt die elektrisch stimulierte Acetylcholinfreisetzung konzentrationsabhängig. Der für R-PIA ermittelte pEC<sub>50</sub>-Wert betrug 6,1. Ein geeigneter Antagonist wurde nicht untersucht. DPCPX ist allerdings in der Literatur als geeigneter Antagonist am Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor beschrieben (Rivkees et al., 1999) und soll in künftigen Experimenten zur weiteren Charakterisierung des A<sub>1</sub>-Rezeptors verwendet werden.

Der Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor ist sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem zu finden (vgl. Tab. 13). Die inhibitorischen Rezeptoren sind häufig präsynaptisch lokalisiert (Fredholm et al., 2005). Der Effekt einer Aktivierung des Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor ist G<sub>i/o</sub>-gekoppelt (Dunwiddie und Masino, 2001). Adenosin ist als endogener Ligand am Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor beschrieben (Dunwiddie, 1980). Als Quelle für das extrazelluläre endogene Adenosin werden zwei mögliche Quellen diskutiert: zum einen gibt es Hinweise auf eine Freisetzung von Adenosin als solches und zum anderen wird eine extrazelluläre Bildung aus freigesetzten Adenosinnukleotiden diskutiert (Cunha, 2008).

**Tab. 13: Synopsis einiger präsynaptisch lokalisierter inhibitorischer Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoren**

|     | <i>Ort</i>   | <i>Transmitter</i> | <i>Spezies</i> | <i>Literaturstelle</i> |
|-----|--------------|--------------------|----------------|------------------------|
| ZNS | Hypothalamus | GABA               | Maus           | Xia et al., 2012       |
|     | Hippocampus  | GABA               | Ratte          | Skov et al., 2011      |
|     |              | Acetylcholin       | Ratte          | Rodrigues et al., 2008 |
|     | Rückenmark   | Adenosin           | Ratte          | Tian et al., 2010      |
|     | Striatum     | Dopamin            | Ratte          | O'Neill et al., 2007   |
|     | Cerebellum   | GABA               | Ratte          | Courjaret et al., 2009 |
| PNS | N. phrenicus | Acetylcholin       | Ratte          | Bornia et al., 2009    |
|     | N. femoralis | Acetylcholin       | Frosch         | Adámek et al., 2010    |

## 5. Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur Rimonabant (SR 141716), ein inverser Agonist am CB<sub>1</sub>-Rezeptor, sondern auch der neutrale CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist O-2050 die Noradrenalinfreisetzung in Hippocampus-Schnitten des Meerschweins erhöht. Diese Befunde können so gedeutet werden, dass die steigernde Wirkung von Rimonabant (und O-2050) darauf zurückzuführen ist, dass es zur Unterbrechung der Noradrenalinfreisetzung durch endogen gebildete Cannabinoide kommt.

Wenige Informationen gibt es bisher zu der Frage, ob über CB<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelte Effekte einer epigenetischen Modulation unterliegen. Zu diesem Zweck wurden Valproat (VPA) und Natriumbutyrat (NaB) eingesetzt, die in hoher Konzentration die Acetylierung von Lysin-Resten in Histon-Proteinen erhöhen. In Versuchsreihen an Hippocampus-Schnitten des Meerschweins ließ sich eine dezente Verstärkung des Hemmeffekts des Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten WIN 55,212-2 auf die Noradrenalinfreisetzung nach mehrstündiger Vorinkubation mit VPA und NaB beobachten. Allerdings blieben die Ergebnisse unterhalb des Signifikanzniveaus. Somit finden sich erste Hinweise darauf, dass durch epigenetisch wirksame Pharmaka die CB<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelte Hemmung der Transmitterfreisetzung beeinflusst werden könnte.

Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen präsynaptischem CB<sub>1</sub>- und M<sub>2</sub>-Autorezeptor am cholinergen Neuron fehlten bislang. Die Versuchsserien dieser Arbeit an Hippocampus-Gewebe des Nagers konnten eine Wechselwirkung zwischen dem präsynaptischen CB<sub>1</sub>- und dem M<sub>2</sub>-Autorezeptor nachweisen. Durch Blockade und Aktivierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors lässt sich der Effekt des M<sub>2</sub>-Autorezeptors gegenläufig beeinflussen, d. h. es kommt zu einer Verstärkung bzw. Abschwächung des M<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelten Effekts. Ein Zusammenhang der Effekte beider Rezeptoren scheint in der gesteigerten oder verminderten Verfügbarkeit der G<sub>i/o</sub>-Proteine zu bestehen.

Für das cholinerge Neuron im Hippocampus der Maus sind bislang außer dem CB<sub>1</sub>-Rezeptor keine inhibitorische Heterorezeptoren beschrieben. Mit dem δ-Opioid-Rezeptor

und dem Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor konnten in dieser Arbeit zwei weitere inhibitorische Heterorezeptoren identifiziert werden.

## 6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

|            | <u>Titel</u>   | <u>Seite</u> |
|------------|--|--------------|
| Abb. 1:    | Regulation der Genexpression durch Histondeacetylasen (HDAC) und Histonacetyltransferasen (HAT)                    | 13           |
| Abb. 2:    | Effekt von WIN 55,212-2 auf die Tritiumfreisetzung und Interaktion mit O-2050                                      | 23           |
| Abb. 3:    | Effekt von O-2050 auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung (erster Reiz)                                  | 24           |
| Abb. 4:    | Einfluss von O-2050 auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung  | 26           |
| Abb. 5:    | Isolierter Effekt von Valproat 1 mM und Na-Butyrat 1 mM auf die elektrisch stimulierte (0,3 Hz) Tritiumfreisetzung | 27           |
| Abb. 6:    | Einfluss von Valproat und Na-Butyrat auf die Wirkung von WIN 55,212-2  | 29           |
| Abb. 7:    | Effekt von Oxotremorin auf die Tritiumfreisetzung und Interaktion mit Rimonabant                                   | 32           |
| Abb. 8[A]: | Isolierter Effekt von Rimonabant 1 $\mu$ M auf die elektrisch stimulierte (3 Hz) Tritiumfreisetzung                | 33           |
| Abb. 8[B]: | Hemmung der Tritiumfreisetzung durch Oxotremorin   | 33           |
| Abb. 9:    | Isolierter Effekt von WIN 55,212-2 1 $\mu$ M auf die elektrisch stimulierte (3 Hz) Tritiumfreisetzung              | 34           |
| Abb. 10:   | Effekt von Oxotremorin auf die Tritiumfreisetzung und Interaktion mit TEA  | 36           |
| Abb. 11:   | Isolierter Effekt von TEA 3,2 mM auf die elektrisch stimulierte (3 Hz) Tritiumfreisetzung                          | 37           |
| Abb. 12:   | Effekt von Oxotremorin auf die Tritiumfreisetzung und Interaktion mit WIN 55,212-2                                 | 38           |
| Abb. 13:   | Effekt verschiedener Agonisten auf die Tritiumfreisetzung im Vergleich zum Effekt von Oxotremorin                  | 39           |
| Abb. 14:   | Anteilige Tritiumfreisetzung über die Zeit in superfundiertem Hippocampus der Maus (+ DPDPE 1 $\mu$ M)             | 40           |
| Abb. 15:   | Anteilige Tritiumfreisetzung über die Zeit in superfundiertem Hippocampus der Maus (+ R-PIA 10 $\mu$ M)            | 41           |
| Abb. 16:   | Effekt von DPDPE auf die Tritiumfreisetzung und Interaktion mit Naltrindol   | 42           |
| Abb. 17:   | Konzentrationsabhängiger Effekt von R-PIA auf die elektrisch stimulierte (3 Hz) Tritiumfreisetzung                 | 43           |

|           | <u>Titel</u>   | <u>Seite</u> |
|-----------|--|--------------|
| Abb. 18A: | Erklärung I für den steigernden Effekt von Rimonabant (rote Symbole) auf die Transmitterfreisetzung  | 47           |
| Abb. 18B: | Erklärung II für den steigernden Effekt von Rimonabant (rote Symbole) auf die Transmitterfreisetzung | 48           |
| Abb. 19:  | Strukturformel des Cannabinoid CB <sub>1</sub> -Rezeptor-Antagonist O-2050                           | 49           |
| Abb. 20:  | HDAC-Inhibitoren   | 53           |
| Abb. 21:  | Schematische Darstellung einer präsynaptischen Membran einer Nervenendigung                          | 59           |
| Abb. 22:  | Effekt von Oxotremorin 10 µM auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung                       | 62           |
| Tab. 1:   | Zusammensetzung der verwendeten physiologischen Kochsalzlösung                                       | 15           |
| Tab. 2:   | Einfluss von O-2050 auf die basale Tritiumfreisetzung  | 23           |
| Tab. 3:   | Einfluss von O-2050 und Rimonabant (SR 141716) auf die basale Tritiumfreisetzung                     | 25           |
| Tab. 4:   | Einfluss von Valproat und Na-Butyrat auf die basale Tritiumfreisetzung                               | 28           |
| Tab. 5:   | Einfluss von Rimonabant auf die basale Tritiumfreisetzung  | 31           |
| Tab. 6:   | Einfluss von WIN 55,212-2 auf die basale Tritiumfreisetzung  | 35           |
| Tab. 7:   | Einfluss von TEA auf die basale Tritiumfreisetzung   | 35           |
| Tab. 8:   | Einfluss von Naltrindol auf die basale Tritiumfreisetzung  | 42           |
| Tab. 9:   | Einteilung der HDAC-Inhibitoren  | 54           |
| Tab. 10:  | Interaktion verschiedener Heterorezeptoren mit dem α <sub>2</sub> -Autorezeptor                      | 57           |
| Tab. 11:  | Präsynaptisch lokalisierte inhibitorische Heterorezeptoren an Neuronen der Maus                      | 63           |
| Tab.12:   | Synopsis einiger präsynaptisch lokalisierter inhibitorischer δ-Opioid-Rezeptoren.                    | 65           |
| Tab. 13:  | Synopsis einiger präsynaptisch lokalisierter inhibitorischer Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptoren     | 66           |

## 7. Literaturverzeichnis

- Adámek S, Shakirzyanova AV, Malomouzh AI, Naumenko NV, Vyskočil F. Interaction of glutamate- and adenosine-induced decrease of acetylcholine quantal release at frog neuromuscular junction. *Physiol Res* 2010; 59: 803-810
- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to receptors and channels, 2nd edition. *Br J Pharmacol* 2006; 147 (Suppl 3): 1-180
- Allgaier C, Greber R, Hertting G. Studies on the interaction between presynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptors and adenosine  $A_1$  receptors located on noradrenergic nerve terminals. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1991; 344: 187-192
- Andréasson S, Allebeck P, Engström A, Rydberg U. Cannabis and schizophrenia. A longitudinal study of Swedish conscripts. *Lancet* 1987; 2: 1483-1486
- Baranowska-Kuczko M, Maclean MR, Kozłowska H, Malinowska B. Endothelium-dependent mechanisms of the vasodilatory effect of the endocannabinoid, anandamide, in the rat pulmonary artery. *Pharmacol Res* 2012; 66: 251-259
- Berger B, Rothmaier AK, Wedekind F. Berger B, Rothmaier AK, Wedekind F, Zentner J, Feuerstein TJ, Jackisch R. Presynaptic opioid receptors on noradrenergic and serotonergic neurons in the human as compared to the rat neocortex. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 795-806
- Bornia EC, Bando E, Machinski M Jr, Pereira MW, Alves-Do-Prado W. Presynaptic M1, M2, and A1 receptors play roles in tetanic fade induced by pancuronium or cisatracurium. *J Anesth* 2009; 23: 513-519
- Caulfield MP. Muscarinic receptors - characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 1993; 58: 319-379
- Courjaret R, Tröger M, Deitmer JW. Suppression of GABA input by A1-adenosine receptor activation in rat cerebellar granule cells. *Neuroscience* 2009; 162: 946-958
- Cunha RA. Different cellular sources and different roles of adenosine: A1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A2a receptor-mediated facilitation of plasticity. *Neurochem Int* 2008; 52: 65-72
- De Petrocellis LD, Cascio MG, Di Marzo V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 765-774
- Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin MS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988; 34: 605-613

- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258: 1946-1949
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 1994; 372: 686-691
- Dunwiddie TV. Endogenously released adenosine regulates excitability in the in vitro hippocampus. *Epilepsia* 1980; 21: 31-55
- Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 31-55
- Fischer A. HDAC-inhibitors as therapy for neural disorder. Discovery of a new therapy. *Pharm unserer Zeit* 2010; 39: 204-209
- Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* 2005; 63: 191-270
- Furchgott RF. The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. In: Blaschko H, Muscholl E (Hrsg.). *Handbook of experimental pharmacology*, vol. 33. Springer, Berlin – Heidelberg – New York: S. 283-335
- Giraldo J. How inverse can a neutral antagonist be? Strategic questions after the rimonabant issue. *Drug Discov Today* 2010; 15: 411-415
- Go VLW, Yaksh TL. Release of substance P from the cat spinal cord. *J Physiol* 1997; 391: 141-167
- Gray LJ, Cooper N, Dunkley A, Warren FC, Ara R, Abrams K, Davies MJ, Khunti K, Sutton A. A systematic review and mixed treatment comparison of pharmacological interventions for the treatment of obesity. *Obes Rev* 2012; 13: 483-498
- Günther J, Schulte K, Wenzel D, Malinowska B, Schlicker E. Prostaglandins of the E series inhibit monoamine release via EP<sub>3</sub> receptors: proof with the competitive EP<sub>3</sub> receptor antagonist L-826,266. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2010; 381: 21-31
- Hiramatsu M, Murasawa H, Mori H, Kameyama T. Reversion of muscarinic autoreceptor agonist-induced acetylcholine decrease and learning impairment by dynorphin A (1-13), an endogenous mu-opioid receptor agonist. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 920-926
- Hoshino I, Matsubara H. Recent advances in histone deacetylase targeted cancer therapy. *Surg Today* 2010; 40: 809-815



- Hurst DP, Lynch DL, Barnett-Norris J, Hyatt SM, Seltzman HH, Zhong M, Song ZH, Nie J, Lewis D, Reggio PH. N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (SR141716A) interaction with LYS 3.28(192) is crucial for its inverse agonism at the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1274-1287
- Illes P. Modulation of transmitter and hormone release by opiates and opioid receptors. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1989; 112: 141-233
- Kathmann M, Bauer U, Schlicker E, Göthert M. Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999; 359: 466-470
- Kathmann M, Weber B, Schlicker E. Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor-mediated inhibition of acetylcholine release in the brain of NMRI, CD-1 and C57BL/6J mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2001; 363: 50-56
- Kenakin T. Inverse, protean and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J*: 2001; 15: 598-611
- Kennedy C, Krier J.  $\delta$ -Opioid receptors mediate inhibition of fast excitatory postsynaptic potentials in cat parasympathetic colonic ganglia. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 437-443
- Kubista H, Boehm S. Molecular mechanisms underlying the modulation of exocytotic noradrenaline release via presynaptic receptors. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 213-242
- Landsman RS, Burkey TH, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI. SR141716A is an inverse agonist at the human cannabinoid receptor. *Eur J Pharmacol* 1997; 334: R1-R2
- Loiacono RE, Rand MJ, Story DF. Interaction between the inhibitory action of acetylcholine and the  $\alpha$ -adrenoceptor autoinhibitory feedback system on release of [<sup>3</sup>H]-noradrenaline from rat atria and rabbit ear artery. *Br J Pharmacol* 1985; 84: 697-705
- Mathers DC, Ghodse AH. Cannabis and psychotic illness. *Br J Psychiatry* 1992; 161: 648-653.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561-564
- Molderings GJ, Göthert M. Mutual interaction between presynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptors and 5-HT<sub>1B</sub> receptors on the sympathetic nerve terminals of the rat inferior vena cava. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1990; 341: 391-397

- Mulder AH, Schoffelmeer ANM. Multiple opioid receptors and presynaptic modulation of neurotransmitter release in the brain. In: Herz A, ed., *Opioids I, Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol 104/I. Berlin: Springer, 1993: 125-144
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61-65
- Nakamura K, Okada S, Yamaguchi N, Shimizu T, Yokotani K, Yokotani K. Role of K<sup>+</sup> channels in M2 muscarinic receptor-mediated inhibition of noradrenaline release from the rat stomach. *J Pharmacol Sci* 2004; 96: 286-292
- Novotna A, Mares J, Ratcliffe S, Novakova I, Vachova M, Zapletalova O, Gasperini C, Pozzilli C, Cefaro L, Comi G, Rossi P, Ambler Z, Stelmasiak Z, Erdmann A, Montalban X, Klimek A, Davies P; Sativex Spasticity Study Group. A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, enriched-design study of nabiximols (Sativex®), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused by multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2011; 18: 1122-1131
- Nunez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, Gonzalez S, Tolon RM, Romero J. Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 2004; 53: 208-213
- Oliveira L, Timóteo MA, Correia-de-Sá P. Modulation by adenosine of both muscarinic M1-facilitation and M2-inhibition of [<sup>3</sup>H]-acetylcholine release from the rat moter nerve terminals. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 1728-1736
- Oliveira L, Timóteo MA, Correia-de-Sá P. Negative crosstalk between M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> muscarinic autoreceptors involves endogenous adenosine activating A<sub>1</sub> receptors at the rat motor endplate. *Neurosci Lett* 2009; 459: 127-131
- O'Neill C, Nolan BJ, Macari A, O'Boyle KM, O'Connor JJ. Adenosine A1 receptor-mediated inhibition of dopamine release from rat striatal slices is modulated by D1 dopamine receptors. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 3421-3428
- Ostermeier AM, Schlosser B, Schwender D, Sutor B. Activation of mu- and delta-opioid receptor causes presynaptic inhibition of glutamatergic excitation in neocortical neurons. *Anesthesiology* 2000; 93: 1053-1063
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 389-462
- Pan X, Ikead SR, Lewis DL. SR141716A acts as an inverse agonist to increase neuronal voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents by reversal of tonic CB1 cannabinoid receptor activity. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 1064-1072
- Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 2005a; 168: 1-51

- Pertwee RG. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptor. *Life Sci* 2005b; 76: 1307-1324
- Pertwee RG. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 13-18
- Ramme D, Illes P, Späth L, Starke K. Blockade of  $\alpha_2$ -adrenoceptors permits the operation of otherwise silent opioid  $\kappa$ -receptors at the sympathetic axons of rabbit jejunal arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1986; 334: 48-55
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, Ferrara P, Soubrié P, Brelière JC, Le Fur G. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 1994; 350: 240-244
- Rivkees SA, Barbhuiya H, Ijzerman AP. Identification of the adenine binding site of the human A1 adenosine receptor. *J Biol Chem* 1999; 274: 3617-3621
- Robert-Koch-Institut, 2013: Gesundheitsberichterstattung des Bundes. [http://www.gbe-bund.de/gbe10/abrechnung.prc\\_abr\\_test\\_logon?p\\_uid=gastg&p\\_aid=&p\\_knoten=FID&p\\_sprache=D&p\\_suchstring=3323::LSD](http://www.gbe-bund.de/gbe10/abrechnung.prc_abr_test_logon?p_uid=gastg&p_aid=&p_knoten=FID&p_sprache=D&p_suchstring=3323::LSD) (18.01.2013)
- Rodrigues RJ, Canas PM, Lopes LV, Oliveira CR, Cunha RA. Modification of adenosine modulation of acetylcholine release in the hippocampus of aged rats. *Neurobiol Aging* 2008; 29: 1597-1601
- Rowan AJ. Valproate. In: Engel Jr J, Pedley TA, eds. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Philadelphia: Lippincott Raven Press, 1997: 1599-1607
- Ruiu S, Pinna GA, Marchese G, Mussinu JM, Saba P, Tambaro S, Casti P, Vargiu R, Pani L. Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 363-370
- Sananbenesi F, Fischer A. The epigenetic bottleneck of neurodegenerative and psychiatric diseases. *Biol Chem* 2009; 390: 1145-1153
- Sándor NT, Kiss J, Sándor A, Lendvai B, Vizi ES. Naloxone enhances the release of acetylcholine from cholinergic interneurons of the striatum if the dopaminergic input is impaired. *Brain Res* 1991; 552: 343-345
- Schlicker E, Göthert M. Interactions between the presynaptic  $\alpha_2$ -autoreceptor and presynaptic inhibitory heteroreceptors on noradrenergic neurons. *Brain Res Bull* 1998; 47: 129-132
- Schlicker E, Kathmann M. Presynaptic neuropeptide receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 184: 409-434

- Schlicker E, Kathmann M, Exner HJ, Detzner M, Göthert M. The 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist 1-(m-chlorophenyl)-biguanide facilitates noradrenaline release by blockade of  $\alpha_2$ -adrenoceptors in the mouse brain cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1994; 349: 20-24
- Schlicker E, Timm J, Zentner J, Göthert M. Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997; 356: 583-589
- Schlosser B, Kudernatsch MB, Sutor B, ten Bruggencate G. Delta, mu and kappa opioid receptor agonists inhibit dopamine overflow in rat neostriatal slices. *Neurosci Lett* 1995; 191: 126-130
- Schulte K, Kumar M, Zajac JM, Schlicker E. Noradrenaline release in rodent tissues is inhibited by interleukin-1 $\beta$  but is not affected by urotensin II, MCH, NPW and NPF. *Pharmacol Rep* 2010; 63: 102-111
- Schulte K, Steingrüber N, Jergas B, Redmer A, Kurz CM, Buchalla R, Lutz B, Zimmer A, Schlicker E. Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor activation, pharmacological blockade or genetic ablation affects the function of the muscarinic auto- and heteroreceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2012; 385: 385-396
- Shakirzyanova AV, Bukharaeva EA, Nikolsky EE, Giniatullin RA. Negative cross-talk between presynaptic adenosine and acetylcholine receptors. *Eur J Neurosci* 2006; 24: 105-115
- Shen KZ, Johnson SW. Presynaptic modulation of synaptic transmission by opioid receptor in rat subthalamic nucleus in vivo. *J Physiol* 2002; 541: 219-230
- Skov J, Andreasen M, Hablitz JJ, Nedergaard S. Baclofen and adenosine inhibition of synaptic transmission at CA3-CA1 synapses display differential sensitivity to K<sup>+</sup> channel blockade. *Cell Mol Neurobiol* 2011; 31: 587-596
- Starke K. Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1977; 77: 1-124
- Starke K, Göthert M, Kilbinger H. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev* 1989; 69: 864-989
- Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modification. *Nature* 2000; 403: 41-45
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2 Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215: 89-97
- Thornicroft G. Cannabis and psychosis. Is there epidemiological evidence for an association? *Br J Psychiatry* 1990; 157: 25-33

- Tian L, Ji G, Wang C, Bai X, Lu Y, Xiong L. Excitatory synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa is under an inhibitory tone of endogenous adenosine. *Neurosci Lett* 2010; 477: 28-32
- Trendelenburg AU, Cox SL, Schelb V, Klebroff W, Khairallah L, Starke K. Modulation of <sup>3</sup>H-noradrenaline release by presynaptic opioid, cannabinoid and bradykinin receptors and  $\beta$ -adrenoceptors in mouse tissues. *Brit J Pharmacol* 2000; 130: 321-330
- Van Diepen H, Schlicker E, Michel MC. Prejunctional and peripheral effects of the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor inverse agonist rimonabant (SR 141716). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2008; 378: 345-369
- Verty ANA, McGregor IS, Mallet PE. Consumption of high carbohydrate, high fat and normal chow is equally suppressed by a cannabinoid receptor antagonist in non-deprived rats. *Neurosci Lett* 2004; 354: 217-220
- Visel A, Blow MJ, Li Z, Zhang T, Akiyama JA, Holt A, Plajzer-Frick I, Shoukry M, Wright C, Chen F, Afzal V, Ren B, Rubin EM, Pennacchio LA. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature* 2009; 457: 854-858
- Walkinshaw DR, Yang XJ. Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics. *Curr Oncol* 2008; 15: 237-243
- Wiley JL, Breivogel CS, Mahadevan A, Pertwee RG, Gascio MG, Bolognini D, Huffman JW, Valentiny DM, Vann RE, Razdan RK, Martin BR. Structural and pharmacological analysis of O-2050, a putative neutral cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 2011; 651: 96-105
- Xia JX, Xiong JX, Wang HK, Duan SM, Ye JN, Hu ZA. Presynaptic inhibition of GABAergic synaptic transmission by adenosine in mouse hypothalamic hypocretin neurons. *Neuroscience* 2012; 201: 46-56
- Zhang W, Basile AS, Gomeza J, Volpicelli LA, Levey AI, Wess J. Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *J Neurosci* 2002; 22: 1709-1717
- Zirlik K, Nashan D, Veelken H. Vorinostat in the treatment of cutaneous T-cell-lymphomas. Treatment with deacetylases inhibitors. *Pharm unserer Zeit* 2010; 39: 190-196

## 8. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Eberhard Schlicker für die Überlassung der Themen, die außerordentlich intensive Betreuung sowie seine Unterstützung in jeglichen Fragen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. Alexander Pfeiffer danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes an dem von ihm geleiteten Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Bonn.

Für die Unterstützung und das sehr angenehme Arbeitsklima im Labor (und darüber hinaus) danke ich Frau Dr. Kirsten Schulte und Frau Doris Petri. Auch danke ich allen anderen Mitarbeitern des gesamten Instituts für die stetige Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Frau Monika Schewell für das geduldige Korrekturlesen und die allzeit positive Unterstützung, die in besonderer Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.