

In-vivo Analyse von Spinedynamiken in Cnr1^{-/-}-Mäusen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Sophia Marie Kaptain

aus Olpe

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Valentin Stein
2. Gutachter: Prof. Dr. Tobias Rose

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.09.2025

Aus dem Institut für Physiologie II

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1 Dendritische Spines	9
1.1.1 Dynamik dendritischer Spines	10
1.1.2 Rolle dendritischer Spines im Alterungsprozess	12
1.2 Endocannabinoidsystem	13
1.2.1 Rolle des Endocannabinoidsystem im Alterungsprozess	15
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Chemikalien	17
2.2 Perfusionen	18
2.3 Genotypisierungen	19
2.4 Medikamente, Arbeitslösungen	20
2.5 Verbrauchsmaterialien	22
2.6 Mauslinie	23
2.6.1 In-vivo-Imaging-Experiment	23
2.6.2 Skilled-Forelimb-Reaching-Experiment	24
2.7 Genotypisierung	24
2.7.1 DNA-Isolation	25
2.7.2 DNA-Amplifikation	25
2.7.3 Gel-Elektrophorese	26
2.8 Cranial Window Implantation, 2-Photonon-Imaging, Spine-Analyse	27

2.8.1 Cranial Window Implantation	27
2.8.2 2-Photonen-Imaging	29
2.8.3 Spine-Analyse	30
2.9 Nestbau	33
2.10 Skilled-Forelimb-Reaching-Test	33
2.11 Transkardiale Perfusion	34
2.12 Statistische Analyse	35
3. Ergebnisse	36
3.1 In-vivo-Imaging Experiment	36
3.1.1 Versuchsaufbau	36
3.1.2 In die Arbeit eingehende Analysen	38
3.1.3 Veränderung der Spinedichte	43
3.1.4 Dichte verlorener und gewonnener Spines	46
3.1.5 Dichte dynamischer Spines und Turnover Ratio	49
3.1.6 Weitere Parameter der Spinedynamik	52
3.1.7 Überleben der Spines	56
3.1.8 Zusammenfassung Spinedynamik	58
3.1.9 Beispiel für ein Tier, das in zwei Altersgruppen verwendet wurde	59
3.1.10 Verhaltenstest und Gewichtsveränderung	61
3.2 Skilled-Forelimb-Reaching Experiment	63
4. Diskussion	66
4.1 Diskussion von Material und Methoden	67
4.2 Diskussion der Ergebnisse	69
4.2.1 Das Alter beeinflusst die Spinedynamik	69

4.2.2 Die Deletion des CB1 Rezeptors beeinflusst die Spinedichte	70
4.2.3 Die Deletion des CB1 Rezeptors beeinflusst die Spinedynamik	72
4.2.4 Mechanismus der veränderten Spinedynamik bei Cnr1-Deletion	74
4.2.5 Cnr1 ^{-/-} -Mäuse im Skilled Forelimb Reaching Test	75
4.3 Wissenschaftliche Schlussfolgerung	76
4.4 Klinische Schlussfolgerung	76
5. Zusammenfassung	78
6. Abbildungsverzeichnis	79
7. Tabellenverzeichnis	80
8. Literaturverzeichnis	81
9. Erklärung zum Eigenanteil	92
10. Danksagung	93

Abkürzungsverzeichnis

2-AG: 2-Arachidonoylglycerol

2P: 2-Photon

3M: 3 Monate

6M: 6 Monate

12M: 12 Monate

Abb.: Abbildung

AEA: Anandamid

AMPA: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure

ANOVA (ANalysis Of VAriance): Varianzanalyse

BDNF (Brain-derived neurotrophic factor): neurotropher Wachstumsfaktor

Bp: Basenpaar

cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat

Cnr1^{-/-}: Cnr1 Knockout Maus

CB1R: Cannabinoid Rezeptor 1

Cnr2^{-/-}: Cnr2 Knockout Maus

CB2R: Cannabinoid Rezeptor 2

CV: Coated vesicles

DAGL: Diacylglycerol-Lipase

dNTP: Desoxyribose-Nukleosidtriphosphate

DSE (depolarization-induced suppression of excitation): depolarisationsinduzierte Unterdrückung der Erregung

DSI (depolarization-induced suppression of inhibition): depolarisationsinduzierte Unterdrückung der Hemmung

eCB: Endocannabinoid

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

eGFP (enhanced green fluorescent protein): grün fluoreszierendes Protein

F: Teststatistik einer Varianzanalyse

FW: Forward Primer

GABA: γ -Aminobuttersäure

G_i: inhibitorisches G-Protein

GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor

i.p.: intraperitoneal

kg KG: Kilogramm Körpergewicht

LANUV: Landesamt für für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW

Layer I: Lamina I Stratum molekulare

Layer II: Lamina II Stratum granulosum externum (äußere Körnerschicht)

Layer III: Lamina III Stratum pyramidale externum (äußere Pyramidenzellschicht)

Layer IV: Lamina IV Stratum granulosum internum (innere Körnerschicht)

Layer V: Lamina V Stratum pyramidale internum (innere Pyramidenzellschicht)

LTD: Langzeitdepression

LTP: Langzeitpotenzierung

MAGL: Monoacylglycerol-Lipase

mPFC: medialer präfrontalen Cortex

mRNA: messenger RNA

NAPE: N-Arachidonoyl-phosphatidylethanolamin

NAPE-PLD: N-Arachidonoyl-phosphatidylethanolamin Phospholipase D

NMDA: N-Methyl-D-Aspartat

NST: Nestlet-Shredding-Test

PBS (Phosphate buffered saline): Pufferlösung

PFA: Paraformaldehydlösung

PIP2: Phosphatidylinositolbisphosphat

PSD: postsynaptische Membranregion

RV: Reverse Primer

s.c.: subcutan

SEM (standard error of the mean): Standardfehler

SER: glattes endoplasmatisches Retikulum

Tab.: Tabelle

TEA: Tris-Acetat-EDTA

TE: Tris-EDTA

THC: Tetrahydrocannabinol

Thy1 (Thymocyte differentiation antigen 1): Thymozyten Antigen 1

WT: Wildtyp

WAVE1: Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteinfamilie Verprolin-homologes Protein 1

ZNS: Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Dendritische Spines

Die komplexen Netzwerke des Gehirns zeichnen sich durch ihre bemerkenswerte Fähigkeit aus, sich kontinuierlich an neue Reize und Erfahrungen anzupassen. Eine wichtige Rolle spielen dabei die dendritischen Dornfortsätze (Spines). Dabei handelt es sich um kleine Ausstülpungen an den Dendriten neuronaler Zellen, an denen über 90% aller erregenden Synapsen im Zentralnervensystem (ZNS) enden (Qiao et al., 2016). In der Regel erhalten Spines exzitatorischen Input von Axonen. Es kommt jedoch vor, dass am selben Spine sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Verbindungen vorhanden sind (E. G. Gray, 1959; Harris und Kater, 1994). Spines bestehen aus einem bauchigen Kopf, der über einen schmalen Hals mit dem dendritischen Schaft verbunden ist (Nimchinsky et al., 2002). Im Kopf befindet sich die postsynaptische Membranregion (PSD), eine spezialisierte Region, die verschiedene Gerüstproteine, zytoplasmatische Signalmoleküle und Rezeptormoleküle für die Neurotransmitter der Präsynapse enthält (Sheng und Kim, 2011). Das Volumen der PSD ist zusammen mit der Anzahl der AMPA-Rezeptoren und der Größe der Präsynapse ein Indikator für die Stärke der synaptischen Kontakte (Knott et al., 2006). Darüber hinaus enthalten Spines je nach Region unterschiedliche Organellen. Dazu gehören das glatte endoplasmatische Retikulum (SER), das an der Regulation des Calciumhaushalts beteiligt ist, der Spine-Apparat sowie Polyribosomen (Spacek und Harris, 1996). Das Zytoskelett der Spines besteht hauptsächlich aus Aktinfilamenten, die das Grundgerüst für die Struktur der Spines bilden und für ihre Größe, Form, Beweglichkeit und Stabilität mitverantwortlich sind (Matus et al., 1982; Sheng und Hoogenraad, 2007) (siehe Abb. 1).

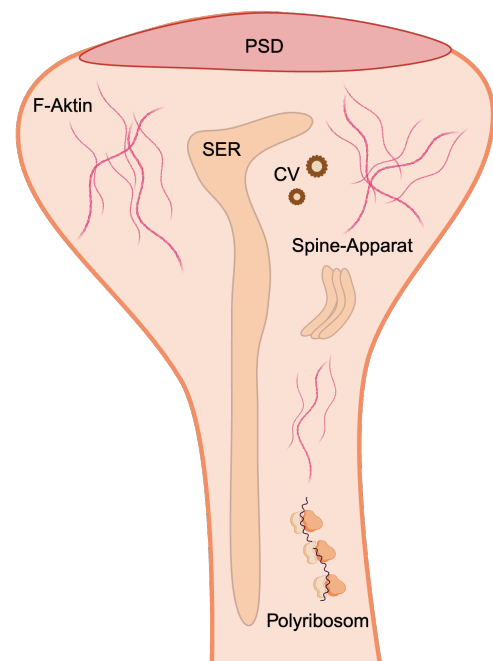


Abb. 1: Struktur dendritischer Spines. Aufbau eines mushroom Spines mit coated vesicles (CV) und anderen Organellen (adaptiert nach Hering und Sheng, 2001).

Aufgrund ihrer Struktur lassen sich Spines grob in vier verschiedene morphologische Kategorien einteilen. Die erste Einteilung erfolgte nach der Entdeckung der Elektronenmikroskopie durch Peters und Kaiserman-Abramof (1970), die die Spines in *mushroom*, *thin* und *stubby* Spines einteilten (siehe Abb. 2). *Mushroom* Spines zeichnen sich durch einen dicken Schaft aus, der in einem großen, schirmähnlichen Kopf endet. Sie gelten als die größten und stabilsten Spines und werden daher auch als „Memory-Spines“ bezeichnet (Bourne und Harris, 2007; Kasai et al., 2003). *Stubby* Spines sind kurz und dick, und ihre funktionelle Rolle ist nicht vollständig geklärt. Nach Tønnesen et al. (2014) könnten sie aktive Formen von *mushroom* Spines darstellen, werden aber aufgrund ihrer begrenzten räumlichen Auflösung im

lichtmikroskopischen Bereich als deutlich überrepräsentiert angesehen. *Thin* Spines hingegen sind lang und schlank. Aufgrund ihrer Fähigkeit, sich schnell an neue, verstärkte oder kürzlich geschwächte Eingänge anzupassen, werden sie als potenzielle „Learning Spines“ betrachtet. (Holtmaat et al., 2005; Zuo et al., 2005a). Später wurde die Klassifikation um die sogenannten *filopodia* erweitert. Sie gelten als hochdynamische Vorläufer der Spines und treten vor allem in frühen Entwicklungsstadien der Tiere auf (Dailey und Smith, 1996; Grutzendler et al., 2002; Ziv, 1996). Die strukturelle Diversität der Spines spiegelt ihre funktionelle Vielfalt wider und ist ein wichtiger Baustein für spezifische Übertragungs- und Integrationsprozesse der synaptischen Plastizität (Bailey et al., 2015).

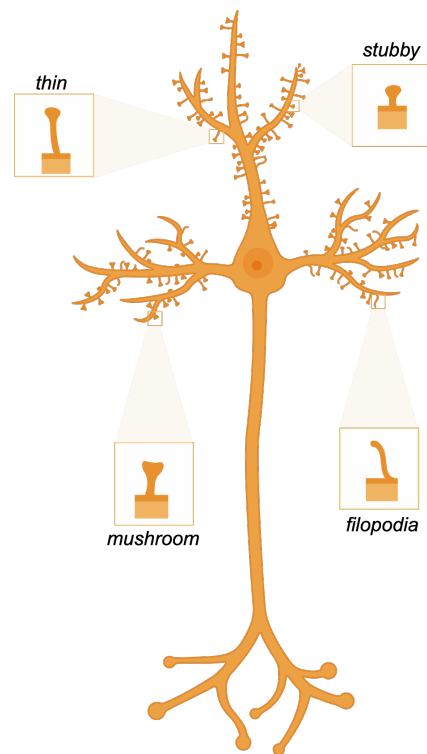


Abb. 2: Repräsentative Darstellung der Morphologie verschiedener Spines.

1.1.1 Dynamik dendritischer Spines

Dendritische Spines sind von zentraler Bedeutung für die synaptische Kommunikation, neuronale Plastizität und kognitive Prozesse. Ihre Dynamik, einschließlich Bildung,

Stabilisierung und Eliminierung, beeinflusst die Fähigkeit des Gehirns, sich neuen Erfahrungen anzupassen und wird als Grundlage von Lern- und Gedächtnisprozessen angesehen (Bailey et al., 2015; Xu et al., 2009). Durch die Einführung der 2-Photonen-Mikroskopie in Kombination mit Methoden zur Markierung einzelner Zellen mit fluoreszierenden Proteinen wurde ein leistungsfähiges Werkzeug geschaffen, um die Dynamik dendritischer Spines in vivo zu beobachten und zu charakterisieren (Feng et al., 2000; Keller-Peck et al., 2001; Trachtenberg et al., 2002; Winifried Denk et al., 1990). Dabei wurde festgestellt, dass Spines neu gebildet oder eliminiert werden können. Das Verhältnis zwischen Gewinn und Verlust beeinflusst den Turnover und kann sich zugunsten einer Seite verändern (Berry und Nedivi, 2017). Die Lebensdauer von Spines lässt sich in zwei Kategorien einteilen: Transiente Spines werden gebildet und in der Regel innerhalb von vier Tagen wieder eliminiert. Persistierende Spines hingegen bleiben meist über Monate bestehen. Während letztere im Allgemeinen langfristige Veränderungen neuronaler Schaltkreise kodieren, dienen transiente Spines dazu, die Plastizität dieser Schaltkreise zu erleichtern (Holtmaat et al., 2005). Diese Dynamik ist erfahrungsabhängig und unterscheidet sich in verschiedenen Hirnregionen (Runge et al., 2020). Der Entzug sensorischer Signale durch das Abschneiden der Schnurrhaare bei Mäusen erhöht beispielsweise die Rate des Spine-Turnovers und reduziert den Verlust von Spines im somatosensorischen Cortex (Trachtenberg et al., 2002; Zuo et al., 2005b). Im Gegensatz dazu erhöht monokulare Deprivation die Spine-Bildung im visuellen Cortex (Hofer et al., 2009). Auch das motorische Lernen geht mit Veränderungen der Spinedynamik einher und führt zur Bildung und anschließenden Stabilisierung von Spines im motorischen Cortex (Xu et al., 2009; Yang et al., 2009). Auch Schlaf, Stress und verschiedene neurodegenerative und neuropsychiatrische Pathologien sind mit einer veränderten Spinedynamik assoziiert (Runge et al., 2020). Der Mechanismus hinter Veränderungen der Spinedynamik ist eng mit dem Konzept der Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) verbunden, die als wichtige Mechanismen der synaptischen Plastizität gelten (Chidambaram et al., 2019). LTP und LTD sind Prozesse, durch die die Stärke der synaptischen Verbindung zwischen Neuronen verstärkt oder abgeschwächt werden kann. Die Grundlage dafür lieferte Hebb mit dem Konzept der „Hebb’schen Regel“. Diese besagt, dass die synaptische Verbindung von zwei Neuronen verstärkt wird, wenn diese wiederholt und gleichzeitig aktiviert werden (Hebb, 1949).

Neuronale Aktivität, die LTP verursacht, kann durch einen von NMDA-Rezeptoren gesteuerten Calciumeinstrom und Aktinpolymerisation das Volumen dendritischer Spines vergrößern. Dies führt zur Stabilisierung neugewonnener Spines und beeinflusst damit die synaptische Effizienz (Lang et al., 2004; Matsuzaki et al., 2004; Nägerl et al., 2004). Andererseits führt LTD zum Abbau und zur Destabilisierung bestehender Spines (Nägerl et al., 2004; Zhou et al., 2004). Dieser Mechanismus trägt zur flexiblen Anpassung synaptischer Verbindungen an die Erfordernisse des Lernens und der Gedächtnisbildung bei.

1.1.2 Rolle dendritischer Spines im Alterungsprozess

Im Kontext der Abnahme kognitiver Funktionen im Alter nimmt die Untersuchung von Veränderungen der dendritischen Spines an Bedeutung zu. Tatsächlich geht der altersbedingte Verlust kognitiver Leistungsfähigkeit nicht mit einem Verlust an Nervenzellen einher, sondern mit Veränderungen der synaptischen Kontakte, an denen die Spines maßgeblich beteiligt sind (Mostany et al., 2013). Diese Veränderungen variieren je nach betrachteter Hirnregion. Im dorsolateralen präfrontalen Cortex (PFC) wurde beispielsweise bei Rhesusaffen eine altersabhängige Abnahme der Spinedichte, insbesondere der *thin* Spines, beobachtet. Gleichzeitig gab es keine signifikante Korrelation zwischen der kognitiven Funktion und Veränderungen der Spinedichte oder -morphologie im primär visuellen Cortex (V1) (Young et al., 2014). Im somatosensorischen Cortex wurde in einer Untersuchung von Mostany et al. (2013) eine höhere Spinedichte bei älteren Mäusen im Vergleich zu jüngeren Altersgruppen festgestellt. Zudem war die Langzeitstabilität und Stabilisierung neu gebildeter Spines bei den älteren Tieren reduziert. Andere Studien zeigen jedoch einen Verlust von Spines im sensorischen Cortex älterer Tiere, welcher mit einer geringeren Spinedichte einhergeht. Im motorischen Cortex dieser Tiere war außerdem die durch motorisches Lernen induzierte Spine-Bildung reduziert (Huang et al., 2020). Dieses Ergebnis widerspricht anderen Studien, die eine erhöhte Spinedichte und -dynamik im primären motorischen Cortex alter Tiere fanden (Davidson et al., 2020). Diese vielfältigen und teilweise widersprüchlichen Befunde unterstreichen die Notwendigkeit weiterer Forschung und Charakterisierung altersbedingter Veränderungen der Spinedynamik. Die Komplexität

dieser Prozesse in verschiedenen Hirnregionen verdeutlicht, wie viel Forschung notwendig ist, um ein objektives Verständnis der altersbedingten neuronalen Veränderungen zu erlangen.

1.2 Endocannabinoidsystem

Im Jahr 1964 gelang erstmals die Isolierung von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), der psychoaktiven Komponente der *Cannabis sativa* Pflanze (Gaoni und Mechoulam, 1964). Dies eröffnete die Frage nach möglichen Bindungsstellen für Cannabinoide im Gehirn. Etwa zwei Jahrzehnte später gelang die Klonierung von Cannabinoidrezeptoren (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993), sowie die Entdeckung endogener Liganden dieser Rezeptoren (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995). Seitdem hat sich das Verständnis des endogenen Cannabinoidsystems (ECS) kontinuierlich weiterentwickelt und ist zu einem wichtigen Forschungsgebiet in der Neurobiologie geworden. Das ECS ist ein komplexes regulatorisches Netzwerk, das eine Schlüsselrolle bei der Modulation neuronaler Funktionen spielt. Während der Entwicklung ist es beteiligt an der Synapsenbildung und beeinflusst die Neurogenese (Harkany et al., 2008). Im erwachsenen Gehirn ist es an der Regulation neuronaler Funktionen beteiligt, einschließlich Kognition, motorisches Lernen, Schmerzempfindung und Essverhalten. Auch bei neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Depression und Angst spielt das ECS eine Rolle (Hill et al., 2011; Mechoulam und Parker, 2013). Es ist erwähnenswert, dass das ECS neben seiner Funktion im ZNS auch periphere Wirkungen entfaltet, beispielsweise im Herz-Kreislauf-System, im Immunsystem, im Verdauungstrakt sowie in Muskeln, Knochen oder der Haut (Maccarrone et al., 2015).

Wesentliche Bestandteile des ECS sind die beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) der $G_{i/o}$ -Familie CB1 und CB2, endogene Liganden wie Anandamid (AEA) und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) sowie Synthese- und Abbauenzyme und Transporter, die die Konzentration der endogenen Cannabinoide (eCB) regulieren (Lu und Mackie, 2021). Der CB1-Rezeptor ist der am häufigsten vorkommende GPCR im Gehirn von Säugetieren und befindet sich dort hauptsächlich in präsynaptischen Terminalen GABAerger (γ -Aminobuttersäure) Interneurone (Bodor et al., 2005; Howlett, 2002). Es wurde jedoch auch eine Expression in einer Vielzahl anderer neuronaler Subpopulationen wie

glutamaterger, cholinерger und serotonerger Neurone beschrieben (Hu und Mackie, 2015). Der CB2-Rezeptor findet sich hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems (Galiègue et al., 1995; Munro et al., 1993). Die wichtigsten Agonisten dieser Rezeptoren sind die Endocannabinoide 2-AG und AEA. Anders als andere Neurotransmitter werden sie nicht in Vesikeln gespeichert, sondern bei Bedarf synthetisiert (Di Marzo et al., 1999). Das führt dazu, dass sie räumlich und zeitlich sehr präzise freigesetzt werden können (Mechoulam und Parker, 2013). 2-AG wird in der Postsynapse von einer Diacylglycerol-Lipase (DAGL) aus Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP2) synthetisiert und nach Aufnahme in die Präsynapse von einer Monoacylglycerol-Lipase (MAGL) hydrolysiert (Blankman et al., 2007; Kohnz und Nomura, 2014). AEA hingegen wird durch Hydrolyse von N-Arachidonoyl-phosphatidylethanolamin (NAPE) durch die NAPE-Phospholipase D (NAPE-PLD) synthetisiert und durch die Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) abgebaut (Cravatt et al., 2001; Di Marzo et al., 1994). Die primäre Funktion der eCB im adulten ZNS ist als retrograder Botenstoff, der verschiedene Formen der eCB-vermittelten synaptischen Plastizität steuert (Ohno-Shosaku und Kano, 2014). Diese kann entweder

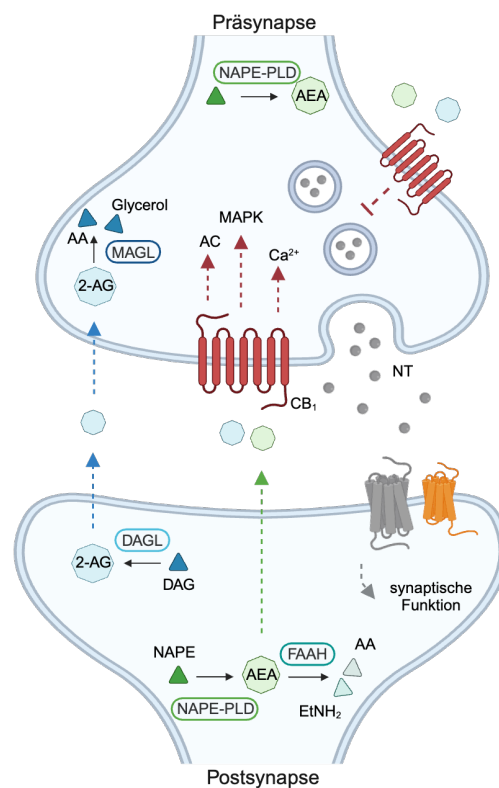


Abb. 3: Übersicht über die Komponenten des eCBs. AA Arachidonsäure, AC Adenylacyclase, AG 2-Acyglycerol, EtNH₂ Ethanolamin, MAPK Mitogen-aktivierte Proteinkinase, NT Neurotransmitter (modifiziert nach Wolfe et Al., 2022).

vorübergehend oder langfristig sein. Im Falle der kurzfristigen eCB-vermittelten synaptischen Plastizität kommt es nach der Depolarisation der Postsynapse zu einer intrazellulären Erhöhung von Ca^{2+} . Dadurch werden spannungsaktivierte Calciumkanäle aktiviert, die die Produktion eines eCB auslösen. Das eCB wird in den synaptischen Spalt sezerniert und bindet an den CB1R der Präsynapse. Je nach Art des präsynaptischen Neurons führt dies entweder zu einer Inhibition der Neurotransmitter-Freisetzung an exzitatorischen oder inhibitorischen Synapsen. Dies wird auch als *depolarization-induced suppression of excitation* (engl. für depolarisationsinduzierte Unterdrückung der Erregung) (DSE) oder *depolarization-induced suppression of inhibition* (engl. für depolarisationsinduzierte Unterdrückung der Hemmung) (DSI) bezeichnet (Kreitzer und Regehr, 2001; Ohno-Shosaku et al., 2002; Wilson und Nicoll, 2002). Bei der eCB-vermittelten LTD hingegen, kommt es nach einer längeren Aktivierung des CB1R über verschiedene Mechanismen zu einer langfristigen Reduktion der Neurotransmitter-Ausschüttung an der Präsynapse (Castillo et al., 2012; Chevaleyre et al., 2006; Gerdeman et al., 2002; Heifets und Castillo, 2009).

1.2.1 Rolle des Endocannabinoidsystem im Alterungsprozess

Das ECS ist an einer Vielzahl von molekularen und zellulären Mechanismen beteiligt, welche die Geschwindigkeit des Alterungsprozesses beeinflussen. Dazu gehören oxidativer Stress, der Abbau geschädigter Makromoleküle, mitochondriale und gliale Aktivität sowie synaptische Plastizität und Neurogenese (Bilkei-Gorzo, 2012). Altersbedingte Veränderungen in der Aktivität des ECS könnten folglich zum Alterungsprozess beitragen. Tatsächlich treten solche Veränderungen im Laufe des Lebens auf. Zum einen wurde festgestellt, dass die Cannabinoidrezeptor-Bindung und die Spiegel der messenger RNA (mRNA) bei älteren Tieren abnehmen (Romero et al., 1998). Diese Veränderungen gehen mit einer reduzierten Kopplung der G-Proteine an die CB1-Rezeptoren einher, was zu einer verringerten Signalübertragung führt (Wang et al., 2002). Auch die 2-AG-Spiegel und DAGL-Expression sinken mit zunehmendem Alter (Piyanova et al., 2015). Andererseits zeigen Tiere, bei denen der CB1-Rezeptor nicht vorhanden ist, Anzeichen eines beschleunigten Alterns. Dazu gehören ein früher Rückgang der kognitiven Funktionen, wie Lernen und Gedächtnis, Veränderungen der Hautstruktur und

verstärkte Anzeichen einer Neuroinflammation im Hippocampus (Albayram et al., 2012; Albayram et al., 2011; Bilkei-Gorzo et al., 2012; Bilkei-Gorzo et al., 2005). Im Gegensatz dazu scheint das Fehlen des CB2-Rezeptors keinen Einfluss auf den Alterungsprozess zu haben (Bilkei-Gorzo, 2012). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation des CB1-Rezeptors dazu beitragen kann, altersbedingte Funktionseinbußen wiederherzustellen. Die Verabreichung des CB1-Agonisten WIN-55212-2 reduzierte die Beeinträchtigung des räumlichen Gedächtnisses sowie die Anzahl aktivierter Mikroglia im Hippocampus von alten Ratten (Marchalant et al., 2008). Die chronische Behandlung von 18 Monate alten Mäusen mit einer niedrigen Dosis THC konnte ihre kognitiven Fähigkeiten auf das Niveau von 2 Monate alten Tieren anheben (Bilkei-Gorzo et al., 2017). Auch auf Ebene der Spines konnte gezeigt werden, dass die Gabe von THC der Alterung entgegenwirkt, indem sie zu einer langfristig erhöhten Spinestabilität im somatosensorischen Cortex 18 Monate alter Mäuse führt (Komorowska-Müller et al., 2023). Insgesamt betonen diese Ergebnisse die Bedeutung des ECS im Alterungsprozess und unterstreichen die Notwendigkeit weiterer Forschung, um es als mögliches therapeutisches Ziel zur Verlangsamung dieser Prozesse zu untersuchen.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Die Rolle dendritischer Spines bei der neuronalen Plastizität und die Funktion des ECS bei der Modulation neuronaler Aktivität sind gut dokumentiert. Es ist jedoch völlig unbekannt, ob und wie das ECS die Dynamik der Synapsenbildung und -eliminierung bei jungen und alten Tieren beeinflusst. Insbesondere der Einfluss des CB1-Rezeptors auf die Spinedynamik im primär motorischen Cortex in verschiedenen Altersstadien wurde bisher nicht untersucht. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, durch die Aufklärung der Rolle des CB1-Rezeptors bei der Modulation der Spinedynamik ein besseres Verständnis der Mechanismen neuronaler Plastizität und des Alterungsprozesses zu erlangen. Die Anwendung longitudinaler in-vivo-Mikroskopie ermöglicht dabei eine zeitlich hochaufgelöste Analyse dieser Dynamik in *Cnr1^{-/-}*-Tieren unterschiedlicher Altersstufen. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten nicht nur das Verständnis der neuronalen Plastizität vertiefen, sondern auch therapeutische Ansatzpunkte im Kontext neurodegenerativer und altersbedingter Erkrankungen liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Tab. 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Firma (Katalog-Nummer)
100 bp DNA-Leiter	Life Technologies (15628-050)
2-Methylbutan	Sigma-Aldrich (320404-1L)
2-Propanol, Isopropanol	Carl Roth (6752.4)
Agarose	Invitrogen (15628050)
dNTP mix	Sigma-Aldrich (D7295)
Ethanol 70%	Otto Fischar (27669)
Ethidium Bromid Lösung	Sigma-Aldrich (46067)
Natriumchlorid (NaCl) Lösung	Carl Roth (9265)
PBS-Tabletten	Gibco (18912024)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich (P6148)
Proteinase K	Thermo Scientific (EO0491)
Taq Polymerase	NEB (M0267X)
Tris-HCl	Carl Roth (9090.3)

2.2 Perfusionen

Tab. 2: Verwendete Lösungen und Puffer für die Perfusionen

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Paraformaldehyde (PFA), 4%	PBS
	4% (w/v) PFA
PBS, pH = 7,4	500 ml MilliQ H ₂ O
	1 PBS Tablette
Sucrose	PBS
	10-30% (w/v) Sucrose

2.3 Genotypisierungen

Tab. 3: Verwendete Lösungen und Puffer für die Genotypisierungen

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Lyse-Puffer	MilliQ H ₂ O
	100 mM Tris/HCl pH = 8,0
	5 mM EDTA
	0,2% (w/v) SDS
	Proteinase K (1 mg/ml)
EtBr-Lösung	TAE-Puffer
	1,5 µg/ml Ethidium-Bromid
Tris-EDTA (TE) Puffer	MilliQ H ₂ O
	10 mM Tris
	1 mM EDTA, pH = 8,0
Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer	MilliQ H ₂ O
	40 mM Tris-Acetat
	1 mM EDTA pH = 8,0

2.4 Medikamente, Arbeitslösungen

Tab. 4: Liste der Bestandslösungen und Hersteller

Medikament	Firma
Atipamezolhydrochlorid (Antisedan®)	Orion Corporation, Espoo, Finland
Buprenorphin	Tensgenic (0,3 mg)
Carprophen (Rimadyl®) Injektionslösung	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
Fentanyl	Janssen-Cilag GmbH
Flumazenil Injektions-/Infusionslösung	Hikma Farmacêutica, Portugal
Ketaminhydrochlorid Injektionslösung	Bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta
Medetomidinhydrochlorid (Cepetor®) Injektionslösung	CP-Pharma, Burgdorf
Midazolam Injektions-/Infusionslösung	PUREN Pharma, München
Naloxonhydrochlorid (Naloxon-ratiopharm®) Injektionslösung	Ratiopharm GmbH, Ulm
Natriumchlorid Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Xylazin (2%)	Bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta

Tab. 5: Verwendete Arbeitslösungen

Lösung	Zusammensetzung	Menge [ml]
Buprenorphin	Buprenorphin	1
	NaCl	5
Carprophen	Carprophen	0,1
	NaCl	0,9
Ketamin/Xylazin	Ketaminhydrochlorid	2
	Xylazin	1
	NaCl	3
MMF-Sleep	Midazolam	2,5
	Medetomidinhydrochlorid	0,5
	Fentanyl	1
	NaCl	6
MMF-Wake	Flumazenil	5
	Atipamezolhydrochlorid	0,5
	Naloxonhydrochlorid	3
	NaCl	1,5
MM-Sleep	Midazolam	2,5
	Medetomidinhydrochlorid	0,5
	NaCl	7
MM-Wake	Flumazenil	5
	Atipamezolhydrochlorid	0,5
	NaCl	4,5

2.5 Verbrauchsmaterialien

Tab. 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Bepanthen® Augensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Cover glass, round, 5 mm	VWR International, Radnor, U.S.A.
Hartmetallbohrer HM1 005	Hager & Meisinger GmbH, Neuss
Hygienische Watteträger meditip CLEAN	Servoprax GmbH, Wesel
Lens Cleaning Tissue	Whatman International Ltd Maidstone England
Microlance™ 3 Kanülen (0,3x13mm)	Betcon, Dickinson and Company, Drogheda, Irland
Paladur® Pulver	Heraeus Kulzer GmbH, Hanau
Paladur® Flüssigkeit	Heraeus Kulzer GmbH, Hanabu
Parafilm® M	American National Can, Greenwich, U.S.A.
Präzisionswischtücher KIMTECH Science*	Kimberly-Clark Global Sales, Mississauga, Kanada
Reinigungsstäbchen	Lens-Aid, München
Sekundenkleber UHU®	UHU GmbH & Co. KG, Bühl
Schutzhandschuhe unsteril (Peha- soft® nitrile)	Paul-Hartmann AG, Heidenheim
Spongostan™ Standard	Ferrosan Medical Devices, Soeborg, Dänemark
Spritzen zu 0,5ml (BD Micro-Fine™ +)	BD Medical, Le Pont-de-Claix Cedex, Frankreich
Spritzen zu 1 ml (Omnifix®-F Luer Solo)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen

Spritzen zu 5 ml (Injekt®)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzen zu 10 ml (Injekt ® Luer Lock Solo)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterican® Kanülen 0,88 x 25 mm	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterican® Kanülen 0,4 x 20 mm	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Terumo Neolus Kanülen 1,2 x 40 mm	Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien
Vaselineum	Fagron GmbH & Co. KG, Barsbüttel
Zellkulturplatte 48-Vertiefungen	Falcon Corning Incorporated, Durham, U.S.A.
Zellkulturschale	Falcon Corning Incorporated, Durham, U.S.A.
Zellstofftupfer (Nobazepf®)	NOBA Verbandmittel Danz GmbH, Wetter

2.6 Mauslinie

2.6.1 In-vivo-Imaging-Experiment

Es wurden *Cnr1^{-/-}*-Mäuse mit der GPF-M Line (Feng et al., 2000), die eGFP unter Kontrolle des Thy1 Promotors exprimieren, gekreuzt, auch bekannt als eGFP-M Linie, um Pyramidenzellen der Schichten II/III und V des Cortex für die in-vivo Bildgebung zu markieren.

Die Mäuse wurden in Gruppen unter standardisierten Laborbedingungen gehalten und hatten einen 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus (Licht von 7:00 Uhr bis 19:00 Uhr) sowie *ad libitum* Zugang zu Futter und Wasser. Alle Experimente wurden gemäß den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes und unter Genehmigung des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW durchgeführt (81-02.04.2018.A027).

2.6.1.1 Experimentelle Gruppen

Für das Experiment wurden insgesamt 8 unabhängige Gruppen verwendet. Darunter 3 Kohorten mit 3 Monate alten Tieren (n = 31), 2 Kohorten mit 6 Monate alten Tieren (n =

20) und 2 Kohorten mit 12 Monate alten Tieren ($n = 27$). Die einzelnen Kohorten wurden für die Analysen jeweils als eine Gruppe ihrer entsprechenden Altersstufe zusammengefasst.

2.6.2 Skilled-Forelimb-Reaching-Experiment

In diesem Experiment wurden männliche $Cnr1^{-/-}$ - und $Cnr1^{+/+}$ -Wurfgeschwister verwendet (Stamm: B6.cg.Cnr1^{tm1}/Zim). Die Mäuse wurden unter standardisierten Laborbedingungen in Gruppen gehalten und hatten einen 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus (Licht von 7:00 Uhr bis 19:00 Uhr) und *ad libitum* Zugang zu Futter und Wasser. Lediglich während des Versuchsablaufs erfolgte eine restriktive Fütterung, um die Greifmotivation der Tiere zu steigern (siehe Kapitel 2.10). Alle Experimente wurden nach den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes und unter Genehmigung des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW durchgeführt (81-02.04.2018.A027).

2.6.2.1 Experimentelle Gruppen

Es wurden 6 unabhängige Gruppen verwendet. Darunter 2 Kohorten mit 3 Monate alten Tieren ($n = 40$), eine Kohorte mit 6 Monate alten Tieren ($n = 28$) und eine Kohorte mit 12 Monate alten Tieren ($n = 30$). Die einzelnen Kohorten wurden für die Analysen jeweils als eine Gruppe ihrer entsprechenden Altersstufe zusammengefasst.

2.7 Genotypisierung

Die Genotypisierungen wurden von Dr. Alessandra Gargano und Dr. Joanna Komorowska-Müller im Institut für Molekulare Psychiatrie, sowie von Dorit Glass im Institut für Physiologie II der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität in Bonn durchgeführt.

2.7.1 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation erfolgte durch Entnahme von Biopsien aus den Schwanzspitzen der Mäuse direkt nach dem Absetzen sowie nach der transkardialen Perfusion. Zur Genotypisierung nach den Perfusionen wurden die Gewebeproben in einen Lysepuffer gelöst, der mit 3-5 µl frisch zugegebener Proteinase K (1 mg/ml) versetzt wurde. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 55° C unter Schütteln bei 550 U/min inkubiert. Für die Genotypisierungen nach dem Absetzen der Tiere erfolgte zusätzlich eine Zentrifugation der Proben bei 13000 x g für 10 Minuten bei 4°C. Danach wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und mit 200 µl Isopropanol versetzt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das gefällte DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 50 - 100 µl TE-Puffer gelöst und bei 4°C gelagert.

2.7.2 DNA-Amplifikation

Die DNA wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Im Folgenden findet sich eine Beschreibung sowie eine Aufstellung der verwendeten Komponenten (siehe Tab. 7-9). Zur Herstellung des PCR-Mastermixes wurden zunächst MilliQ-Wasser, 10-facher ThermoPol-Puffer, Desoxyribose-Nukleosidtriphosphate (dNTPs) und Primer vermischt. Anschließend wurde Taq-Polymerase hinzugefügt und die PCR-Reaktionsmischung auf die PCR-Gefäße verteilt. Zum Abschluss wurde jedem Röhrchen die DNA-Vorlage hinzugefügt.

Tab. 7: Liste verwendeter Primer

Primer	Sequenz
Primer COMM (FW)	CTC CTG GCA CCT CTT TCT CAG TCA
Primer WT (RV)	TGT GTC TTC TGC TGG AAC CAA CGG
Primer KO (RV)	TCT CTC GTG GGA TCA TTG TTT TTC TCT TGA

Tab. 8: PCR-Ansatz für Cnr1^{-/-} nach Absetzen (links) und nach Perfusion (rechts)

Mix	µl	Mix	µl
H2O	15,5	H2O	38
10x Puffer	2	10x Puffer	5
Primer COM	0,5	Primer COM	1
Primer WT	0,3	Primer WT	1
Primer KO	0,7	Primer KO	1
dNTPs	0,5	dNTPs	1,5
Taq pol	0,5	Taq pol	0,25
DNA-Vorlage	1	DNA-Vorlage	2
Total:	21	Total:	49,75

Tab. 9: PCR-Programm für Cnr1^{-/-}

Zyklus	Temperatur	Zeit (min)
1x	94° C	04:00
35x	94° C	00:45
	65° C	00:45
	68° C	01:00
1x	68° C	07:00
1x	4° C	∞

2.7.3 Gel-Elektrophorese

Durch Aufkochen und Auflösen von Agarose in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) wurde das Agarosegel mit einer Konzentration von 1,5 % hergestellt. Anschließend wurde es bei Raumtemperatur für mindestens 45 min. gehärtet und in die mit TAE-Puffer gefüllte

Elektrophoresekammer überführt, wo jedes PCR-Produkt mit der 10-fachen Menge an Ladefarbstoff versetzt wurde.

Alle Proben wurden auf das Gel in die Vertiefungen geladen. In die erste Vertiefung wurden 5 µl einer 100 Basenpaar (bp) DNA-Leiter gegeben, um die Größe des PCR-Produkts bestimmen zu können. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 120 V für 90-100 Minuten durchgeführt, wobei die negativ geladene DNA durch das Gel zur Anode wandert. Kleinere Moleküle bewegen sich dabei schneller durch das Gel als größere, so dass die Moleküle nach ihrer Größe getrennt werden können. Um die Ergebnisse sichtbar zu machen, wurde das Gel anschließend in einem Bad mit dem Farbstoff Ethidiumbromid gefärbt, der sich an die DNA bindet und unter UV-Licht sichtbar wird. Bei den Genotypisierungen, die nach der Perfusion durchgeführt wurden, wurde der Farbstoff bereits bei der Herstellung der Agarosegele zugegeben, so dass dieser Schritt entfiel. Die Visualisierung erfolgte mit dem ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories), wobei die erwartete Bandengröße für homozygote *Cnr1^{-/-}*-Mäuse 334 bp und für homozygote Wildtyp-Mäuse 284 bp betrug.

2.8 Cranial Window Implantation, 2-Photonon-Imaging, Spine-Analyse

2.8.1 Cranial Window Implantation

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von MMF-Sleep (0,1 ml/10 g KG) (siehe Tab. 5) anästhesiert. Die Anästhesietiefe wurde mit einer Pinzette im Zwischenzehenbereich mittels Tiefensensibilität bestimmt. Sobald die gewünschte Anästhesietiefe erreicht war, erfolgte eine subcutane (s.c.) Injektion von Carprophen (0,1 ml/10 g KG). Der Kopf der Maus wurde epiliert und das Tier in Brustlage in einem stereotaktischen Rahmen mit darunter liegender Wärmematte fixiert. Dazu wurden die Schneidezähne in eine Bisschiene eingelegt und die Zunge vorgelagert, um eine gute Belüftung der Atemwege zu gewährleisten. Die Fixierung des Kopfes erfolgte in horizontaler Position mittels zweier Stifte, die in den Gehörgang eingeführt wurden, und einer Fixierung der Nase von cranial. Jede Maus erhielt Bepanthen Augensalbe, um die Augen vor Austrocknung zu schützen. Nach der Fixierung wurde die Haut mit Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde die Haut am vorderen Ohransatz tränenförmig

ausgeschnitten und das Periost mit einem Tropfen H_2O_2 entfernt. Verbleibende Reste wurden mit zwei Wattetupfern zur Seite geschoben. Durch leichtes seitliches Kippen des Kopfes wurde die Bohrstelle horizontal ausgerichtet. Anschließend wurde mit einem Bohrkopf eine ca. 2 mm große Craniotomie im Bereich des somatomotorischen Cortex durchgeführt. Um eine Überhitzung zu vermeiden, wurden zwischendurch einige Tropfen gekühlte NaCl-Lösung appliziert. Das ausgeschnittene Knochenstück des Schädeldachs wurde vorsichtig mit einer feinen Pinzette abgehoben, ohne das darunter liegende Hirngewebe zu verletzen. Die Dura wurde durch Auftragen von NaCl-Lösung gekühlt und eventuell auftretende Blutungen durch kurzzeitiges Auflegen eines Stücks Gelschaumschwamm gestillt. Dieser wurde vor der Operation steril mit steriler isotonischer NaCl-Lösung gesättigt und während der Operation auf Eis gekühlt aufbewahrt. Der Knochen außerhalb der Bohrstelle wurde mit Wattetupfern getrocknet. Anschließend wurde ein rundes Glasplättchen von ca. 5 mm Durchmesser in Ethanol gereinigt und mit einem Präzisionstuch getrocknet. Ein Tropfen NaCl-Lösung wurde auf die ausgeschnittene Stelle gegeben und das Glasplättchen darauf positioniert. Mit einer Bohrspitze wurde senkrecht Druck auf das Glasplättchen ausgeübt, um zu verhindern, dass der Sekundenkleber unter das Glas gelangt. Anschließend wurde der Sekundenkleber langsam aufgetragen, zunächst an einigen Punkten um das Plättchen herum, dann kreisförmig um das Plättchen herum. Sobald der Kleber getrocknet und das Glasplättchen in seiner Position fixiert war, wurde der Sekundenkleber auf der gesamten Oberfläche des Schädelknochens verteilt und eine spezielle Kunststoffhalterung seitlich am Rand des freiliegenden Schädelknochens befestigt, die später die Fixierung und Positionierung des Tierkopfes während der 2-Photonen-Imaging-Sessions ermöglichte. Zur weiteren Stabilisierung wurde Dentalzement angerührt und um das Fenster und die Kunststoffhalterung verteilt.

Anschließend erfolgte die postoperative intraperitoneale Injektion von MMF-Wake (0,1 ml/10 g KG). Die Mäuse wurden einzeln in einen abgedeckten Käfig gesetzt und bis zum vollständigen Aufwachen unter einer Wärmelampe beobachtet. In den folgenden sieben postoperativen Tagen erhielten die Tiere täglich eine i.p. Dosis Carprophen (0,1 ml/10 g KG) und Buprenorphin (0,1 mg/10 g KG). Um Entzündungsreaktionen vorzubeugen, wurde die gleiche Dosis Carprophen zusätzlich an den drei Tagen vor Beginn der Bildgebungssitzungen verabreicht. Nach der Operation wurden die Tiere für die Dauer

des Experiments einzeln in Standard-Laborkäfigen in einem 12-stündigen Licht-Dunkel-Zyklus (Licht von 7:00 Uhr bis 19:00 Uhr) gehalten. Während der Rekonvaleszenzphase wurde der Heilungsverlauf durch regelmäßige Gewichts- und Wundkontrolle über den gesamten Zeitraum beobachtet.

2.8.2 2-Photonen-Imaging

Zunächst wurde das Tier durch eine intraperitoneale Injektion von MM-Sleep (0,1 ml/ 10 g KG) anästhesiert (siehe Tab. 5). Die Anästhesietiefe wurde mit einer Pinzette im Zwischenzehnbereich mittels Tiefensensibilität ermittelt. Sobald die gewünschte Sedierung erreicht war, wurde der Mäuseschädel mit der Kunststoffhalterung auf einer in der hauseigenen Werkstatt hergestellten Platte fixiert und Bepanthen Augensalbe aufgetragen. Anschließend wurde das Fenster für die Imaging-Sitzung vorbereitet. Dazu wurde der Kopf der Maus zunächst so ausgerichtet, dass das Fenster in der horizontalen Ebene parallel zum Objektiv orientiert vorlag. Diese Position wurde dokumentiert und für alle folgenden Sitzungen wieder verwendet. Anschließend wurde das Fenster mit einem ethanolbenetzten Wattetupfer gereinigt. Das Fenster wurde kreisförmig mit Vaseline in einem Abstand von 1-2 mm umrandet, um ein seitliches Austreten von Wasser zu verhindern. Nach diesen Vorbereitungen wurde das Tier unter das Mikroskop gelegt. Um eine Hypothermie der Maus zu vermeiden, wurde die Imaging-Platte während der gesamten Sitzung beheizt.

Das verwendete 2-Photonen-Mikroskop wurde in der institutseigenen Werkstatt hergestellt. Die Steuerung erfolgte über die Software ScanImage (Pologruto et al., 2003). Im ersten Schritt wurde ein Objektiv mit vierfacher Vergrößerung verwendet. Unter Verwendung einer cMOS-Kamera (The Imaging Source Europe GmbH) wurde mittels Epifluoreszenz (450 nm) eine Übersicht über den gesamten Fensterbereich erstellt. Dieser wurde durch handgefertigte Zeichnungen und Fotoaufnahmen dokumentiert. Zur Auswahl geeigneter Regionen für die Aufnahme von Z-Bildstapeln (im Folgenden: Z-Stacks) dienten Blutgefäße als Orientierungspunkte, die das Wiederfinden derselben Region in der nächsten Sitzung erleichterten.

Im zweiten Schritt wurden einige Tropfen destilliertes Wasser aufgetragen und ein Wasserimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung verwendet. Unter Verwendung eines Ti:Sapphire-Lasers mit einer Wellenlänge von 910 nm (Chameleon Vision-S, Coherent, Santa Clara, CA) konnte das GFP sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise konnten anschließend Regionen mit dendritischen Segmenten aus der Schicht fünf des Cortex ausgewählt werden. Der Typ eines einzelnen Neurons wurde identifiziert, indem der Hauptdendrit bis zum Soma verfolgt wurde. Pro Tier wurden drei bis vier Aufnahmen aus verschiedenen Regionen im Bereich des Fensters gemacht. Diese wurden als Z-Stacks mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln, einer Bildfrequenz von 0,43 Hertz und einer Pixelverweildauer von 2000 ns aufgenommen. Die Laserleistung wurde so gewählt, dass eine Phototoxizität und Überbelichtung der Neurone vermieden wurden. Der Rahmen des jeweiligen Z-Stacks wurde so gewählt, dass die ausgewählten Neurone mit ihren Dornfortsätzen in ihrer gesamten Länge innerhalb des Bildausschnitts abgebildet wurden. Jedes Bild wurde dabei viermal mit einer Schrittweite von 0,8 μm aufgenommen und gemittelt.

Nach der Aufnahme aller Regionen wurde die Maus von der Platte genommen, durch eine intraperitoneale Injektion von MM-Wake (0,1 ml/ 10 g KG) (siehe Tab. 5) geweckt und bis zum vollständigen Erwachen unter einer Wärmelampe beobachtet.

2.8.3 Spine-Analyse

Für die Analyse der Spines wurde das MATLAB-Skript *Spine Analysis* der Scan Image Software verwendet. Die Z-Stacks aller Imaging-Sessions einer jeweiligen Region eines Tieres wurden aufgerufen und nebeneinander dargestellt. Anschließend wurden die für die Analyse geeigneten dendritischen Segmente identifiziert. Dabei wurden nur solche Dendriten ausgewählt, die in allen Imaging-Sessions eine ausreichende Bildqualität aufwiesen. Weiterhin wurde sichergestellt, dass in jedem Z-Stack dasselbe Segment mit identischer Länge verwendet wurde. Zu diesem Zweck wurden charakteristische Landmarken in der Nähe bestimmter Spines als Markierung für den Anfangs- und Endpunkt des jeweiligen Segments verwendet.

In einem ersten Schritt wurden diese dendritischen Segmente in jeder einzelnen Imaging-Session annotiert. Anschließend folgte die Annotation der Spines des jeweiligen Dendriten. Dazu wurde das Bild innerhalb eines Z-Stacks ausgewählt, in dem dieser Spine am besten zu erkennen war. Die Annotation erfolgte vom Ansatz des Dornfortsatzes am Dendriten bis zu seiner Spitze. Ein Spine wurde dabei als seitliche Ausstülpung eines Dendriten mit einer Mindestlänge von 0,4 μm definiert. Während dieses Prozesses erhielt jeder markierte Spine eine eigene Identifikationsnummer.

Zwischen zwei Bildgebungssitzungen können Veränderungen in der Stabilität der Spines beobachtet werden. Nach der Annotation wurden diese Veränderungen in einem zweiten Schritt korreliert. Ein Spine kann dabei entweder stabil bleiben, d. h. er war in einer vorhergehenden Sitzung vorhanden und bleibt auch in der folgenden Sitzung erhalten; alternativ kann ein Spine verloren gehen, d. h. er war in der vorherigen Sitzung vorhanden, ist aber in der folgenden Sitzung nicht mehr nachweisbar. Es gibt auch die Möglichkeit eines Zugewinns, bei dem ein neuer Spine auftritt, der in der vorhergehenden Sitzung noch nicht vorhanden war. Ein letztes Szenario ist das transiente Verhalten, bei dem ein Spine in einer vorhergehenden Sitzung neu erscheint, aber in der darauffolgenden Sitzung nicht mehr vorhanden ist.

Aus diesem Verhalten der Spines lassen sich verschiedene Parameter der Spinedynamik ableiten (siehe Tab. 10). Diese wurden im letzten Schritt mit Hilfe eines in unserer Gruppe entwickelten Python-Codes ermittelt (verfügbar unter: <https://github.com/danielmk/spinestats>).

Tab. 10: Übersicht über die Parameter der Spinedynamik

Parameter	Beschreibung
Spinedichte	Summe der Spines dividiert durch die Länge der dendritischen Segmente
Dichte dynamischer Spines	Summer der verlorenen und gewonnenen Spines dividiert durch die Länge der dendritischen Segmente
Dichte verlorener Spines	Summer der verlorenen Spines dividiert durch die Länge der dendritischen Segmente
Dichte gewonnener Spines	Summer der gewonnenen Spines dividiert durch die Länge der dendritischen Segmente
Turnover Ratio	Summe der gewonnenen und verlorenen Spines zwischen zwei Sitzungen dividiert durch die Summe der Spines beider Sitzungen
% stabil	Summe der stabilen Spines dividiert durch die Summe aller Spines derselben Sitzung multipliziert mit 100
% verloren	Summe der verlorenen Spines dividiert durch die Summe aller Spines der vorherigen Sitzung multipliziert mit 100
% gewonnen	Summe der gewonnenen Spines dividiert durch die Summe aller Spines derselben Sitzung multipliziert mit 100
% transient	Summe der Spines, die in der vorhergehenden Sitzung gewonnen und in der folgenden Sitzung verloren wurden, dividiert durch die Summe aller Spines derselben Sitzung, multipliziert mit 100
% Überleben	Summe der zu einer bestimmten Sitzung noch vorhandenen Spines dividiert durch die ursprüngliche Summe der Spines multipliziert mit 100

2.9 Nestbau

Wird Mäusen geeignetes Material angeboten, nutzen sie dieses zum Bau eines Nestes. Dieses hat eine Schutzfunktion, dient der Fortpflanzung und als Wärmespeicher (Deacon, 2006). Studien zeigen, dass ein reduziertes Nestbauverhalten mit einem erhöhten Stresslevel einhergeht (Jirkof, 2014). In diesem Experiment wurde das Nestbauverhalten der Tiere mithilfe des Nestlet-Shredding-Tests (NST) überprüft, indem das alte Nest der Mäuse aus dem Käfig entfernt und durch neues Material aus gepresster Wolle ersetzt wurde. Nach 1, 3 und 24 Stunden wurde der nicht verwendete Teil des Materials gewogen und vom ursprünglichen Gewicht abgezogen. Zusätzlich wurde die Form des Nests auf einer Skala von 1 bis 5 bewertet. Anhand dieser Skala und des Anteils (in %) des verbauten Materials, erfolgte eine Bewertung des Nestbauverhaltens und eine entsprechende Einschätzung der Stressbelastung der Tiere.

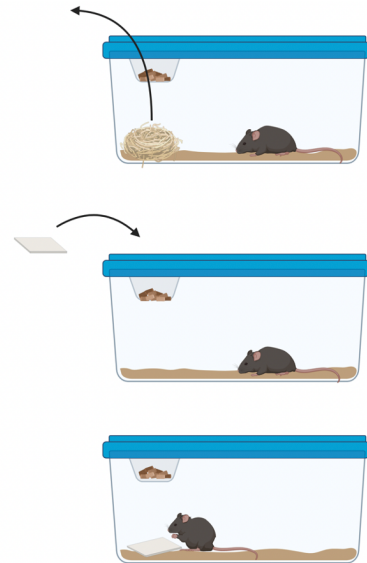


Abb. 4: Aufbau des NST

2.10 Skilled-Forelimb-Reaching-Test

Der Skilled-Forelimb-Reaching-Test ist eine Methode zur Beurteilung der Feinmotorik von Versuchstieren. Dabei lernt das Tier, ein Futterpellet mit der Vorderpfote zu greifen, es durch einen Schlitz im Trainingskäfig zu führen und anschließend zum Mund zu bringen. Zur Durchführung des Versuchs wurden eigens für diesen Test hergestellte Trainingskäfige aus Plexiglas mit einer Höhe von 20 cm, einer Tiefe von 15 cm, einer Breite von 8,5 cm und einer schlitzförmigen Öffnung an der Vorderseite verwendet. Um die Schwierigkeit zu erhöhen, wurde ein ca. 1 mm hoher Holzstab auf dem Boden vor dem Schlitz angebracht, so dass das Tier das Futterpellet über dieses Hindernis heben und durch den Schlitz befördern musste. Die Versuche wurden mithilfe einer GoPro Hero 5 Black Kamera gefilmt.

Nachdem die Tiere mit der Umgebung vertraut gemacht worden waren, folgte als erster Teil des Experiments die Habituationsphase. Hier wurden staubfreie Futterpellets (Dustless Precision Pellets®, 14 mg, Rodent Purified Diet, Bio-Serv) mittig vor der Öffnung der Plexiglasscheibe platziert, so dass das Versuchstier je nach Präferenz sowohl die linke als auch die rechte Pfote zum Greifen des Pellets verwenden konnte. Um die dominante Pfote zu ermitteln, wurde dieser Versuch an fünf aufeinander folgenden Tagen wiederholt. Dabei wurde ein vorzeitiges Training der Tiere durch eine Begrenzung der Versuche pro Tag vermieden. Ab dem zweiten Wiederholungstag wurde zusätzlich eine Futterrestriktion über Nacht für die weitere Versuchsdauer durchgeführt, um einen Gewichtsverlust von ca. 10% und eine höhere Greifmotivation zu erreichen.

An den fünf darauffolgenden Tagen fand die Trainingsperiode statt. Hier wurde das Pellet je nach dominanter Pfote links oder rechts seitlich des Schlitzes platziert. Pro Tag erhielten die Versuchstiere in 4 Trainingsblöcken jeweils 12 Versuche (insgesamt 48 Pellets). Der Lernerfolg wurde als Prozentsatz der erfolgreich gefressenen Pellets nach dem ersten oder zweiten Greifversuch gemessen. Wurde das Pellet entweder nicht erreicht, außerhalb des Käfigs fallen gelassen oder aber erreicht und dann innerhalb des Käfigs fallen gelassen, galt der Versuch als nicht erfolgreich.

Am dritten Tag nach dem letzten Training wurde schließlich ein Recall durchgeführt, um zu beobachten, ob sich die Leistung des Tieres verbessert bzw. verschlechtert hat oder gleichgeblieben war. An diesem letzten Tag erhielten die Tiere insgesamt 12 Versuche in einem Block.

2.11 Transkardiale Perfusion

Vor der transkardialen Perfusion wurden die Tiere zunächst durch intraperitoneale Injektion einer Ketamin/Xylazin-Lösung (siehe Tab. 5) tief narkotisiert (0,05 ml/kg Körpergewicht) und in Rückenlage an allen vier Extremitäten auf einer Platte fixiert. Für weitere Analysen wurden Blutproben und zerebrospinale Flüssigkeit entnommen. Mit einer chirurgischen Pinzette wurde das Fell am Xyphoid angehoben und eingeschnitten, das Peritoneum eröffnet, das Zwerchfell abgelöst und der Thorax seitlich horizontal eingeschnitten und nach cranial gelagert. Von der Herzspitze aus wurde eine Kanüle in

den linken Ventrikel eingeführt und das rechte Herzohr mit einer spitzen Schere eröffnet. Sofort wurde mit der Infusion von PBS unter gleichmäßigem Druck begonnen. Sobald alle Gefäße blutleer waren und eine klare Flüssigkeit aus dem rechten Vorhof floss, wurde das Versuchstier mit 50 ml Paraformaldehyd (PFA) perfundiert. Das Gehirn wurde entnommen und für 24 Stunden in 4 % PFA bei 4°C postfixiert. Anschließend erfolgte die Überführung in eine 20 %ige Saccharoselösung und die Lagerung bei 4°C zur dehydrierenden Kryoprotektion des Gewebes bis zur vollständigen Sättigung des Präparates. Für die Kryokonservierung wurden die Gehirne aus der Saccharoselösung entnommen, mit 2-Methylbutan gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.12 Statistische Analyse

Die Daten wurden mit Microsoft Excel erfasst. Die statistische Analyse und Visualisierung der Daten wurden mit GraphPad Prism (GraphPad) durchgeführt. Die Abbildungen wurden mit Biorender (biorender.com) und Affinity Designer (Serif (Europe) Ltd.) erstellt. Zur Veranschaulichung wurden Abbildungen mit Fiji (ImageJ Version 2.1.0/1.53c) bearbeitet. Die Verteilung der Daten wurde mit dem D'Agostino- und Pearson-Normalitätstest bestimmt. Basierend auf diesem Ergebnis wurde die statistische Signifikanz zwischen zwei unabhängigen Gruppen mit mehreren Variablen (z. B. Alter und Genotyp) mittels der 2-Wege ANOVA (2-Way ANOVA) bestimmt. Für den zeitlichen Effekt wurde eine ANOVA mit wiederholten Messungen (Modell mit gemischten Effekten (REML)) verwendet. Bei mangelnder Sphärizität wurde die ANOVA mittels Greenhouse-Geisser-Korrektur angepasst. Für die Post-hoc-Analyse wurde ein Mehrfachvergleichstest von Sidak (Sidak's multiple comparison) verwendet.

Statistische Signifikanz wurde angegeben, wenn der p-Wert < 0,05 bei einem Konfidenzintervall von 95% betrug. In den Abbildungen werden die p-Werte wie folgt angegeben: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Alle Daten werden mit einem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt, sofern nicht anders angegeben. Die verwendeten statistischen Tests sind für jedes Experiment im Ergebnisteil angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 In-vivo-Imaging Experiment

3.1.1 Versuchsaufbau

Die Veränderungen in der Spinedynamik von $Cnr1^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu $Cnr1^{+/+}$ -Tieren wurden durch eine in-vivo-Imaging Analyse untersucht. Dabei wurde das gleiche dendritische Segment im Bereich des primär motorischen Cortex in-vivo alle 3 Tage über einen Zeitraum von 6 Sitzungen mittels 2-Photonen-Bildgebung durch ein craniales Fenster aufgenommen. Um die Stressbelastung der Tiere während des Experiments beurteilen zu können, wurde ein Nestlet-Shredding-Test an Tag -7, d. h. eine Woche vor Beginn des Experiments, nach der Hälfte der Imaging Sessions an Tag 8, sowie jeweils 2 Tage und 2 Wochen nach Beendigung des Experiments, an Tag 17 und Tag 29, durchgeführt. Um die altersabhängigen Effekte auf die Spinedynamik zu erfassen, wurden Tiere im Alter von 3 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten verwendet und miteinander verglichen. Der detaillierte Versuchsaufbau ist in Abbildung 5A dargestellt.

Nach Abschluss der Imaging-Phase wurden die Daten mit Hilfe der in Kapitel 2.8.3 beschriebenen Spine-Analyse ausgewertet. Damit konnten verschiedene Parameter der Spinedynamik untersucht werden, wie z. B. die Spinedichte und der Anteil verlorener, gewonnener, stabiler und transienter Spines. Zusätzlich konnten die Dichte der verlorenen, gewonnenen und dynamischen Spines, die Turnover Ratio und das Überleben der Spines im Verlauf des Experiments bestimmt werden (siehe Tab. 10).

Idealerweise wären dieselben Tiere zu allen 3 Zeitpunkten (d. h. 3, 6 und 12 Monate) untersucht worden. Einige Störfaktoren machten es jedoch notwendig, für jede Altersgruppe eigene Kohorten zu verwenden. Der wichtigste Einflussfaktor war die Verschlechterung der Bildqualität bei älteren Mäusen. Vor allem nachwachsende Knochen verdeckten das craniale Fenster. Außerdem starben einige Mäuse altersbedingt und schieden vorzeitig aus dem Experiment aus.

In jeder Altersgruppe wurden dieselben dendritischen Segmente in bis zu 6 aufeinanderfolgenden Imaging-Sessions über einen Zeitraum von 15 Tagen erfolgreich aufgenommen. Insgesamt wurden 3082 Spines und 2354 μm dendritische Segmente aus 15 Regionen in 3 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Tieren, 3242 Spines und 1583 μm dendritische

Segmente aus 13 Regionen in 6 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Tieren und 4619 Spines und 3147 μm dendritische Segmente aus 17 Regionen in 12 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Tieren dargestellt. Bei den $Cnr1^{+/+}$ -Mäusen wurden 3745 Spines und 2897 μm dendritische Segmente aus 19 Regionen in 3 Monate alten Mäusen, 1419 Spines und 1333 μm dendritische Segmente aus 9 Regionen in 6 Monate alten Mäusen und 1643 Spines und 1739 μm dendritische Segmente aus 12 Regionen in 12 Monate alten Mäusen dargestellt.

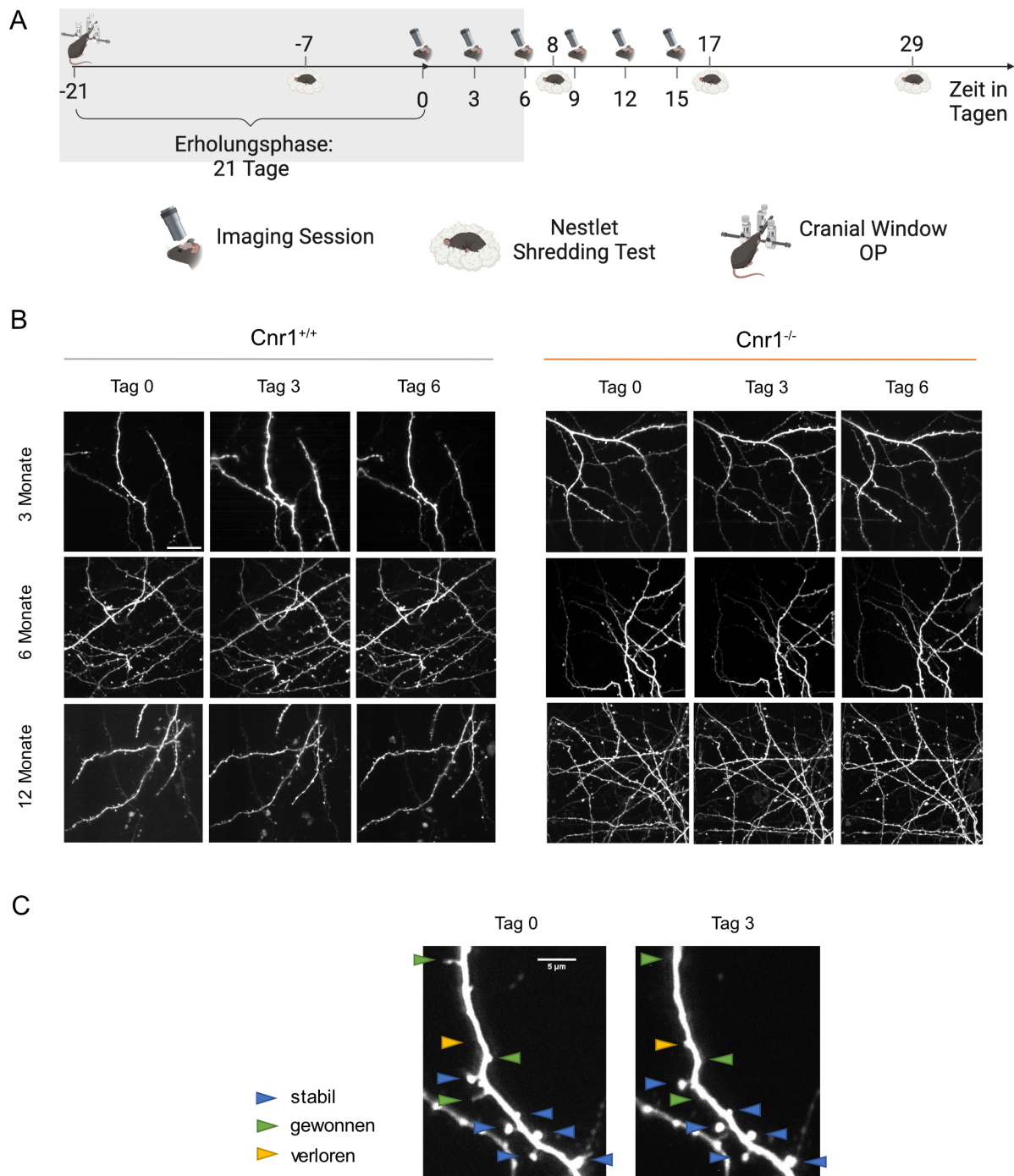


Abb. 5: Versuchsaufbau (A) Zeitachse des Versuchsaufbaus für das in-vivo-Imaging Experiment. Der graue Kasten repräsentiert die Hauptanalysen, auf die sich diese Arbeit bezieht. (B) Exemplarische Darstellung maximaler Z-Projektionen einer Region desselben Tiers für jede Alterskohorte und jeden Genotyp, aufgenommen an Tag 0, Tag 3 und Tag 6 des Experiments. Links $Cnr1^{+/+}$ Tiere, rechts $Cnr1^{-/-}$ Tiere. Von oben nach unten: 3 Monate, 6 Monate, 12 Monate. Maßstab 20 μ m. (C) Repräsentatives Beispiel für dasselbe dendritische Segment an Tag 0 und Tag 3 des in-vivo-Imaging Experiments. Blaue Pfeile zeigen stabile Spines, gelbe Pfeile kennzeichnen hinzugewonnene Spines und rote Pfeile markieren verlorene Spines. Maßstab 5 μ m.

3.1.2 In die Arbeit eingehende Analysen

Ziel dieser Arbeit war es, dieselben dendritischen Segmente mit ihren Spines in 6 aufeinanderfolgenden Imaging-Sitzungen darzustellen. Zu diesem Zweck wurde bis zum letzten Tag der Bildgebungsphase versucht, bei jedem Tier die gleichen Regionen zu finden und aufzunehmen. Im Verlauf des Experiments schieden jedoch ganze Tiere oder einzelne Regionen eines Tieres aus dem Experiment aus. Dies war hauptsächlich auf die abnehmende Bildqualität in den späteren Sitzungen zurückzuführen, die keine zuverlässige Analyse zuließ. Die Tabellen 11 und 12 geben einen Überblick darüber, inwieweit sich die Anzahl der Tiere und der erfolgreich aufgenommenen Stacks aus diesem Grund im Verlauf der Imaging-Sitzungen verringert hat.

In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob die Anzahl der erfolgreichen Imaging-Sessions pro Tier in Wechselbeziehung mit dem NST Score desselben Tiers am achten Versuchstag stand (siehe Abb. 6B). Es konnte keine Korrelation festgestellt werden. Eine höhere Anzahl von Imaging-Sitzungen war also nicht mit einem höheren NST Score verbunden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass verschiedene Aspekte die Datenausbeute beeinflussten. Die Tabellen 11 und 12 und Abbildung 6A zeigen jedoch, dass die Anzahl der Tiere und Stacks erst nach dem sechsten Versuchstag abnahm. In jeder Alterskohorte konnte die Anzahl der Tiere und Stacks über die ersten 3 Sitzungen konstant gehalten werden. Dies ermöglicht eine zuverlässige Analyse über diesen Zeitraum. Darüber hinaus haben frühere Arbeiten gezeigt, dass 3 aufeinander folgende Bildgebungssitzungen ausreichen, um die Baseline-Dynamik der Spines zuverlässig zu beobachten und zu interpretieren (Komorowska-Müller et al., 2023). Aus diesen Gründen beziehen sich die im Folgenden dargestellten Hauptanalysen dieser Arbeit auf die ersten 3 Imaging-Sitzungen von Tag 0 bis Tag 6 des Experiments.

Alle weiteren Imaging-Daten zu späteren Zeitpunkten werden in diesen Analysen nicht berücksichtigt.

Tab. 11: Anzahl der Wildtyp-Stacks und -Tiere pro Imaging-Session und Tag des Experiments

Cnr1 ^{+/+}						
3 Monate (3M)						
Imaging	1	2	3	4	5	6
Tag	0	3	6	9	12	15
Stacks	19	19	19	19	13	10
Tiere	10	10	10	10	7	6
6 Monate (6M)						
Imaging	1	2	3	4	5	6
Tag	0	3	6	9	12	15
Stacks	9	9	9	7	5	3
Tiere	4	4	4	4	3	2
12 Monate (12M)						
Imaging	1	2	3	4	5	6
Tag	0	3	6	9	12	15
Stacks	12	12	12	8	1	0
Tiere	5	5	5	3	1	0

Tab. 12: Anzahl der Knock-Out-Stacks und -Tiere pro Imaging-Session und Tag des Experiments

Cnr1 ^{-/-}						
3M						
Imaging	1	2	3	4	5	6
Tag	0	3	6	9	12	15
Stacks	15	15	15	12	9	7
Tiere	6	6	6	4	4	3
6M						
Imaging	1	2	3	4	5	6
Tag	0	3	6	9	12	15
Stacks	13	13	13	12	12	9
Tiere	5	5	5	4	4	3
12M						
Imaging	1	2	3	4	5	6
Tag	0	3	6	9	12	15
Stacks	17	17	17	12	12	12
Tiere	5	5	5	4	3	3

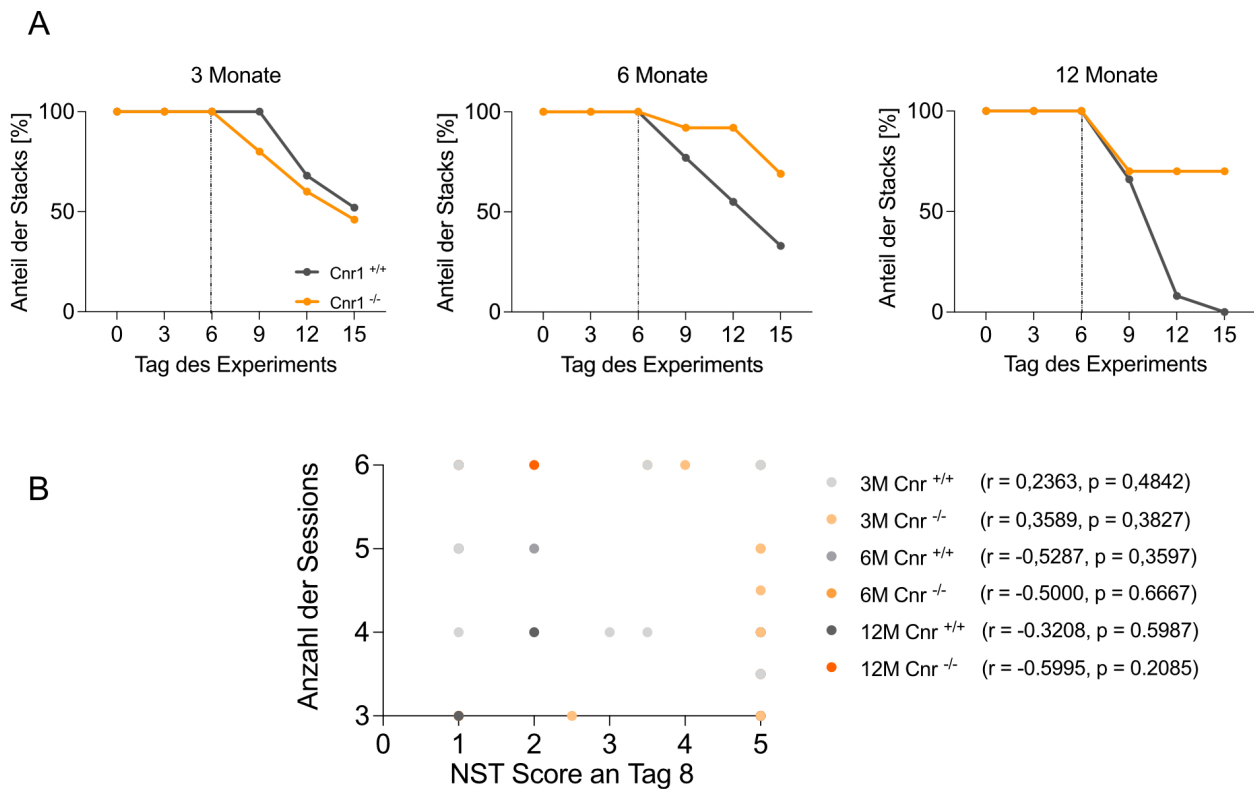


Abb. 6: Die Bildqualität der Stacks reduziert sich nach Tag 6 des Experiments. (A) Anzahl der Stacks für jeden Zeitpunkt. Die Anzahl der Stacks wurde auf den ersten Zeitpunkt normalisiert. (B) Korrelation zwischen Nestlet-Shredding-Test Score an Tag 8 des Experiments und Anzahl der Imaging-Sessions pro Tier. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. 3 Monate alte Tiere (Cnr1^{+/+} $n = 10$, Cnr1^{-/-} $n = 6$), 6 Monate alte Tiere (Cnr1^{+/+} $n = 4$, Cnr1^{-/-} $n = 5$), 12 Monate alte Tiere (Cnr1^{+/+} $n = 5$, Cnr1^{-/-} $n = 5$). Die Daten wurden nach D'Agostino & Pearson auf Normalverteilung geprüft und mittels Pearson Korrelationskoeffizient korreliert. Es zeigt sich keine Korrelation.

3.1.3 Veränderung der Spinedichte

Wie bereits in Kapitel 2.8.3 erläutert, können sich Spines im Verlauf von einer Imaging-Session zur nächsten unterschiedlich verhalten. Um die altersabhängigen Veränderungen der Spinedynamik zu analysieren, wurde dasselbe dendritische Segment über einen Zeitraum von 6 Tagen dargestellt.

Eine Veränderung der Spinedynamik führt häufig zu einer Veränderung der Spinedichte. In Bezug auf die Dichte an Tag 0 des Experiments konnte gezeigt werden, dass der Genotyp ein signifikanter Faktor für den Gruppenunterschied war. Es gab außerdem eine statistisch signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Genotyp und Alter. Mittels Post-hoc-Test gelang der Nachweis, dass die 6 Monate alten Cnr1^{-/-}-Tiere an Tag 0 eine signifikant höhere Spinedichte gegenüber den 3 Monate alten Cnr1^{-/-}-Tieren ($p < 0,0001$) und den 12 Monate alten Cnr1^{-/-}-Tieren aufwiesen ($p = 0,0001$). Darüber hinaus war auch die Spinedichte der 6 Monate alten Cnr1^{-/-}-Mäuse gegenüber den gleichaltrigen Cnr1^{+/+}-Mäusen hochsignifikant erhöht ($p < 0,0001$) (siehe Abb. 7A und 7B). Diese Beobachtung bestätigte sich bei der Betrachtung des Mittelwerts der Spinedichte über den gesamten Zeitraum des in-vivo-Imaging Experiments von Tag 0 bis Tag 6. Hier zeigte sich ein signifikanter Gruppenunterschied bezogen auf die Zeit, den Genotyp und die Interaktion beider Faktoren. In der Post-hoc-Analyse wurde deutlich, dass die Spinedichte der 6 Monate alten Cnr1^{-/-}-Mäuse auch hier im Vergleich zu den 3 Monate alten- ($p < 0,0001$) und 12 Monate alten Cnr1^{-/-}-Tieren ($p = 0,0001$) signifikant anstieg. Auch gegenüber den 6 Monate alten Cnr1^{+/+}-Mäusen zeigte sich eine hochsignifikante Zunahme der Spinedichte ($p < 0,0001$) (siehe Abb. 7C und 7D). Innerhalb der Altersgruppen wurde die Veränderung der Spinedichte im Verlauf von einer Imaging-Sitzung zur nächsten aufgezeichnet. Bei den 3 Monate alten Tieren konnte gezeigt werden, dass die Zeit ein signifikanter Faktor für den Gruppenunterschied war. Der Post-hoc-Test belegte für die Cnr1^{+/+}-Mäuse einen signifikanten Abfall der Spinedichte an Tag 6 gegenüber Tag 0 ($p = 0,0014$). Für die 6 Monate alten Tiere konnte kein Gruppeneffekt nachgewiesen werden. Bei den alten Tieren ergab sich ein signifikanter Genotypen-Effekt ohne signifikante Gruppenunterschiede in der Post-hoc-Analyse (siehe Abb. 7E). Abbildung 7F zeigt, dass

die Zunahme der Spinedichte der 6 Monate alten Knockout-Tiere im Vergleich zu den 3 Monate alten Tieren auch rein visuell wahrnehmbar ist.

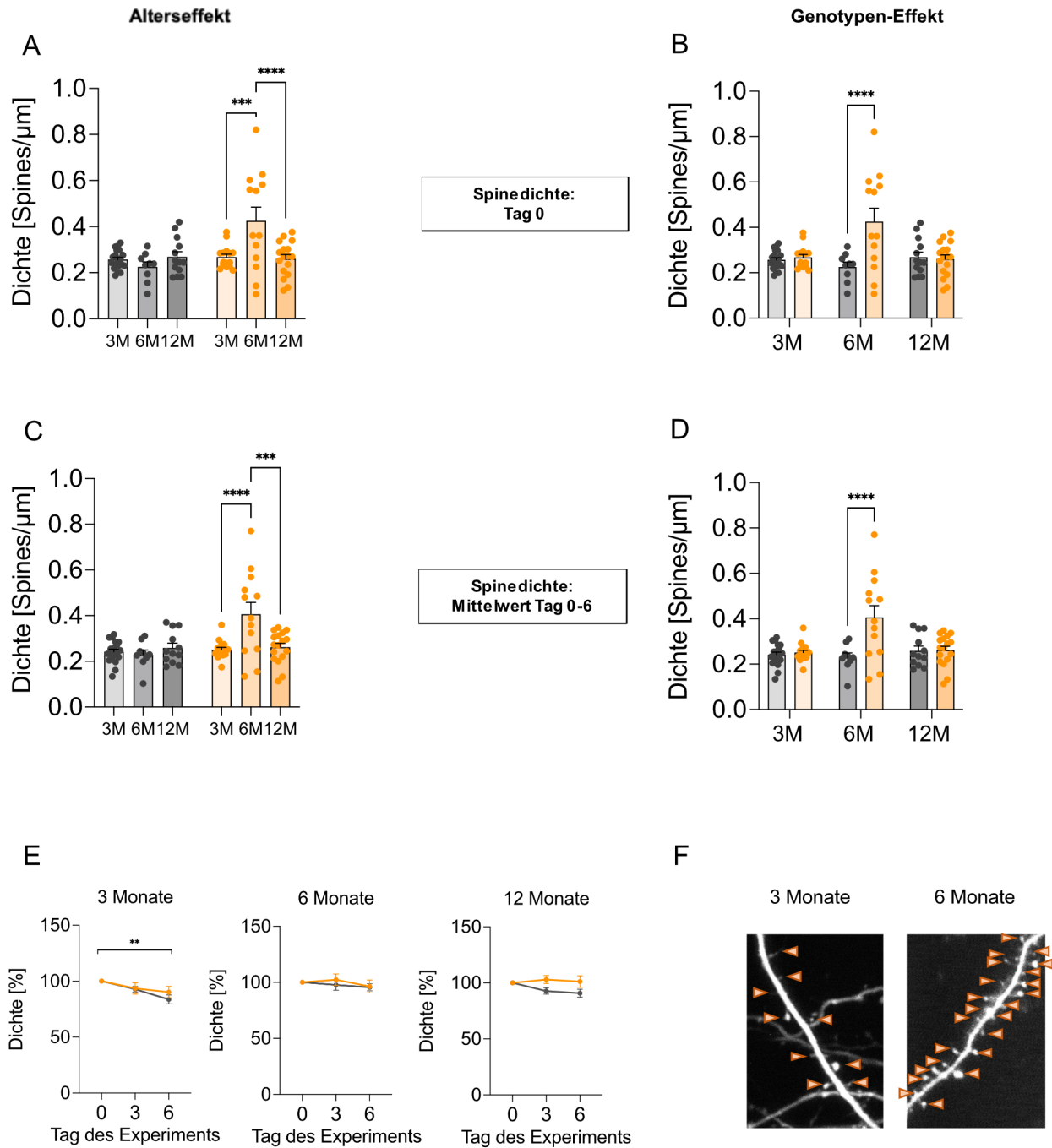


Abb. 7: Die Spinedichte der 6 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Mäuse ist erhöht. (A, B) Dichte der Spines an Tag 0 des Experiments. Die 2-Way ANOVA zeigte einen signifikanten Unterschied der Spinedichte bezogen auf den Genotyp ($F_{1,80} = 9,047$, $p = 0,0035$) und die Interaktion von Alter und Genotyp ($F_{2,80} = 7,642$, $p = 0,0009$), während es keinen signifikanten Gruppenunterschied in Bezug auf das Alter gab ($F_{2,80} = 2,975$, $p = 0,0567$). (C, D) Dichte der Spines als Mittelwert der Tage 0-6. Hier zeigte die 2-Way ANOVA einen signifikanten Unterschied der Spinedichte in Bezug auf das Alter ($F_{2,79} = 4,301$, $p = 0,0169$), den Genotyp ($F_{1,79} = 9,806$, $p = 0,0024$) und die Interaktion beider Faktoren ($F_{2,79} = 7,108$, $p = 0,0014$). (A) und (B) sowie (C) und (D) zeigen jeweils dieselben Daten in unterschiedlicher Gruppierung: links Alterseffekt, rechts Genotypen-Effekt. (E) Entwicklung der Spinedichte in den verschiedenen Alterskohorten als Funktion der Zeit. Die Dichte der Spines wurde auf den ersten Zeitpunkt normalisiert. Die 2-Way ANOVA zeigt einen signifikanten Unterschied für die Spinedichte in Bezug auf die Zeit bei den 3 Monate alten Tieren ($F_{2,96} = 7,411$, $p = 0,0010$), ohne signifikante Gruppenunterschiede für den Genotyp ($F_{1,96} = 0,7769$, $p = 0,3803$) und die Interaktion zwischen Zeit und Genotyp ($F_{2,96} = 0,5637$, $p = 0,5710$). Für die 6 Monate alten Tieren zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede (Zeit: $F_{2,60} = 0,6128$, $p = 0,5452$; Genotyp: $F_{1,60} = 0,2742$, $p = 0,6025$; Interaktion: $F_{2,60} = 0,1704$, $p = 0,8438$). Bei den 12 Monate alten Tieren gab es einen signifikanten Unterschied für den Genotyp ($F_{1,81} = 6,096$, $p = 0,0157$). Ein signifikanter Unterschied für die Zeit ($F_{2,81} = 0,7030$, $p = 0,4981$) oder die Interaktion beider Faktoren konnte nicht nachgewiesen werden ($F_{2,81} = 1,524$, $p = 0,2240$). (F) Exemplarische Darstellung eines dendritischen Segments von einem 3 Monate und einem 6 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Tier. Die orangenen Pfeile markieren die Spines. Es ist erkennbar, dass die Spinedichte bei den 6 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Tieren erhöht ist. Orange: $Cnr1^{-/-}$; Grau: $Cnr1^{+/+}$. 3 Monate alte Mäuse ($Cnr1^{-/-}$ n = 6 Mäuse, n = 15 Regionen; $Cnr1^{+/+}$ n = 10 Mäuse, n = 19 Regionen), 6 Monate alte Mäuse ($Cnr1^{-/-}$ n = 5 Mäuse, n = 13 Regionen; $Cnr1^{+/+}$ n = 4 Mäuse, n = 9 Regionen), 12 Monate alte Mäuse ($Cnr1^{-/-}$ n = 5 Mäuse, n = 17 Regionen; $Cnr1^{+/+}$ n = 5 Mäuse, n = 12 Regionen). Die Anzahl der Tiere und Regionen ist für alle folgenden Ergebnisse identisch, sofern nicht anders angegeben. Die Daten werden als Mittelwert pro Gruppe $\pm$ SEM abgebildet, wurden nach D'Agostino & Pearson auf Normalverteilung geprüft und mittels 2-Way ANOVA, gefolgt von Sidak's multiple comparison Test analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

3.1.4 Dichte verlorener und gewonnener Spines

Um ein besseres Verständnis für die Veränderungen der Spinedichte zu erlangen, wurde eine Analyse der Dichte gewonnener und verlorener Spines durchgeführt. Für die Veränderungen im Verlauf der Imaging-Sitzungen konnte ein signifikanter Genotypen-Effekt für die Dichte verlorener Spines bei den 6 Monate alten Tieren detektiert werden. Zwischen den anderen Gruppen war kein signifikanter Unterschied feststellbar (siehe Abb. 8A, 8B).

Um im Folgenden den Alters- und Genotypen-Effekt näher zu erörtern, wurden die Mittelwerte über die einzelnen Imaging-Sitzungen gebildet und zwischen den Gruppen verglichen. Hier ergab sich für die Dichte gewonnener Spines ein signifikanter Zeit-, Genotypen- und Interaktionseffekt (siehe Abb. 8C, 8E). In der Post-hoc-Analyse zeigte sich eine signifikante Zunahme der Dichte gewonnener Spines bei den 6 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den jüngeren- ($p = 0,0047$) und älteren ($p = 0,0013$) Tieren, sowie den gleichaltrigen $Cnr1^{+/+}$ -Mäusen ($p = 0,0057$).

Für die Dichte verlorener Spines war das Alter ein signifikanter Faktor für den Gruppenunterschied. Außerdem zeigte sich eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Alter und Genotyp. Im Post-hoc-Test stellte sich gleichermaßen zur Dichteerhöhung gewonnener Spines bei den 6 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Mäusen, eine Zunahme der Dichte verlorener Spines dar. Diese war gegenüber den 3 Monate- ($p = 0,0038$) und 12 Monate alten Tieren ($p < 0,0001$), wie auch gegenüber der Kontrollgruppe ($p = 0,0008$) signifikant erhöht (siehe Abb. 8D, 8F).

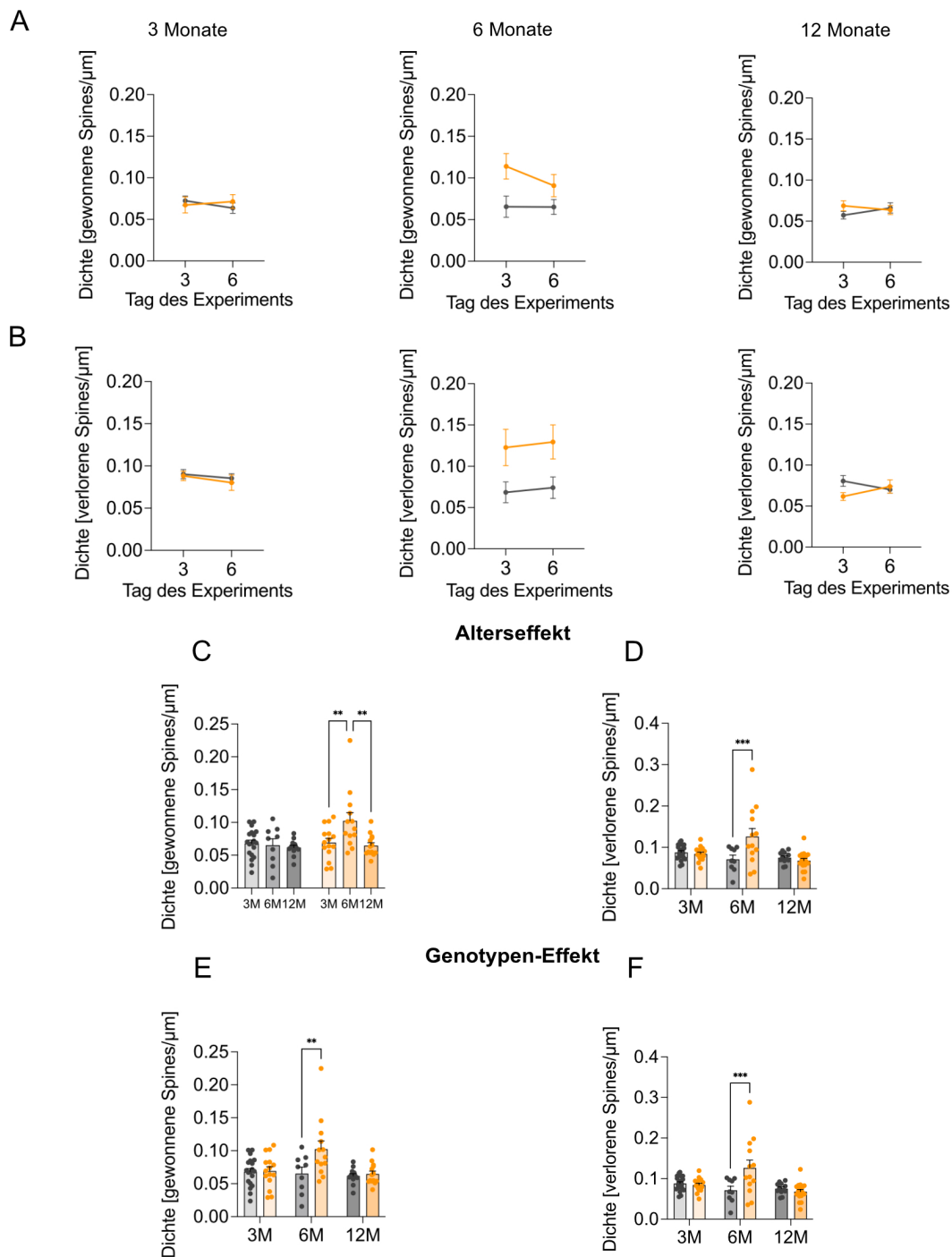


Abb. 8: $Cnr1^{-/-}$ -Mäuse zeigen eine veränderte Spinedynamik.

(A, B) Oben: Dichte der gewonnenen Spines, unten: Dichte der verlorenen Spines für alle Altersgruppen, jeweils als Funktion der Zeit. Bei den 3 Monate alten Mäusen zeigten sich in der 2-Way ANOVA weder für die Dichte gewonnener Spines (Zeit: $F_{1,64} = 0,1051$, $p = 0,7469$; Genotyp: $F_{1,64} = 0,03411$, $p = 0,8541$; Interaktion: $F_{1,64} = 0,7837$, $p = 0,3793$) noch für die Dichte verlorener Spines (Zeit: $F_{1,64} = 1,035$, $p = 0,3128$; Genotyp: $F_{1,64} = 0,3365$, $p = 0,5639$; Interaktion: $F_{1,64} = 0,06326$, $p = 0,8022$) signifikante Gruppenunter-

schiede. Dasselbe gilt für die 12 Monate alten Mäuse (Dichte gewonnener Spines: Zeit: $F_{1,54} = 0,09415$, $p = 0,7602$; Genotyp: $F_{1,54} = 0,5612$, $p = 0,4570$; Interaktion: $F_{1,54} = 1,438$, $p = 0,2357$; Dichte verlorener Spines: Zeit: $F_{1,54} = 0,01485$, $p = 0,9035$; Genotyp: $F_{1,54} = 1,373$, $p = 0,2464$, Interaktion: $F_{1,54} = 3,142$, $p = 0,0819$). (C, E) Dichte der gewonnenen Spines als Mittelwert der Tage 3-6. Die 2-Way ANOVA zeigte signifikante Gruppenunterschiede sowohl für den Genotyp ($F_{1,76} = 5,251$, $p = 0,0247$), als auch für das Alter ($F_{2,76} = 3,739$, $p = 0,0283$) und die Interaktion der beiden Faktoren ($F_{2,76} = 3,413$, $p = 0,0381$). (D, F) Dichte der verlorenen Spines als Mittelwert der Tage 3-6. Hier ergaben sich in der 2-Way ANOVA keine signifikanten Gruppenunterschiede für den Genotyp ($F_{1,79} = 3,873$, $p = 0,0526$), jedoch zeigte sich eine signifikant höhere Dichte verlorener Spines bezogen auf das Alter ($F_{2,79} = 4,151$, $p = 0,0193$) und die Interaktion zwischen Alter und Genotyp ($F_{2,79} = 6,597$, $p = 0,0022$). (C) und (E) sowie (D) und (F) zeigen dieselben Daten in verschiedener Gruppierung: obere Panels: Alterseffekt untere Panels: Genotypen-Effekt. Orange: Cnr1^{-/-}; Grau: Cnr1^{+/+}. Die Daten werden als Mittelwert pro Gruppe $\pm$ SEM abgebildet und wurden mittels 2-Way ANOVA, gefolgt von Sidak's multiple comparison Test analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

3.1.5 Dichte dynamischer Spines und Turnover Ratio

Zur weiteren Differenzierung der Spinedichte wurde das Verhältnis gewonnener und verlorener Spines pro μm Dendrit als Dichte dynamischer Spines, und die Turnover Ratio als Zahl der gewonnen und verlorenen Spines im Verhältnis zur Gesamtsumme aller Spines zu einem Zeitpunkt, betrachtet (siehe Abb. 9). Dabei konnte ein signifikanter Genotypen-Effekt für die Dichte dynamischer Spines bei den 6 Monate alten Tieren gezeigt werden. In der Post-hoc-Analyse war die Dichte dieser Spines bei den $\text{Cnr1}^{-/-}$ -Mäusen an Tag 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht signifikant erhöht ($p = 0,0389$) (siehe Abb. 9A).

Wie aufgrund der vorherigen Ergebnisse zu erwarten war, zeigte der Vergleich der Mittelwerte von Tag 3 bis Tag 6 einen signifikanten Unterschied in der Dichte dynamischer Spines bezogen auf das Alter, den Genotyp und die Interaktion beider Faktoren. Auch hier zeigte der Post-hoc-Test eine signifikante Zunahme bei den 6 Monate alten $\text{Cnr1}^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,0001$) und den anderen Altersgruppen (siehe Abb. 9C, 9E). Die Zunahme der Dichte dynamischer Spines zwischen diesen und den 3 Monate alten Tieren war weniger signifikant ($p = 0,0013$) als die nachfolgende Abnahme zwischen den 6 Monate alten und 12 Monate alten Tieren ($p < 0,0001$) (siehe Abb. 9C). Keine signifikanten Gruppenunterschiede konnten bei der Turnover Ratio festgestellt werden (siehe Abb. 9B, 9D, 9F).

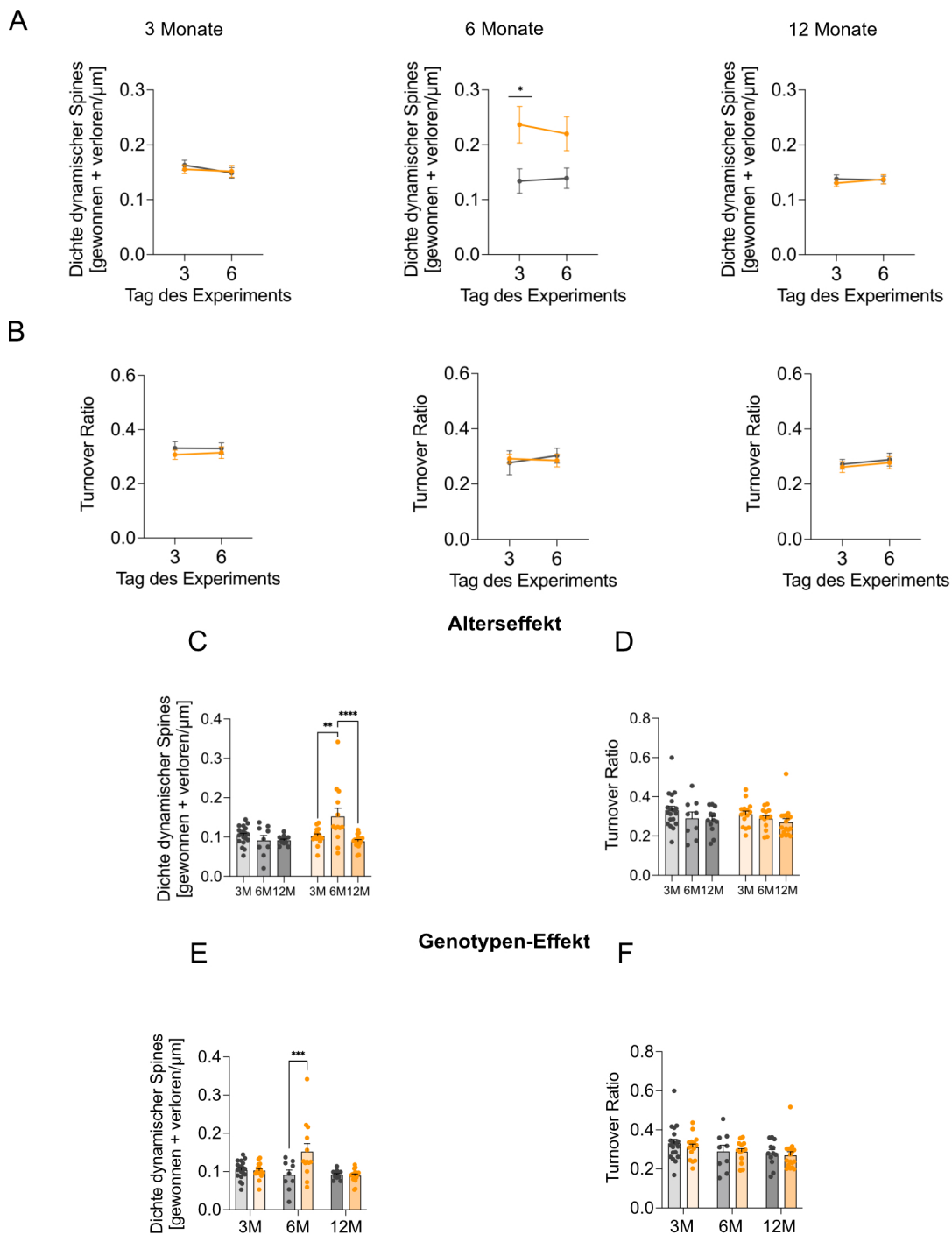


Abb. 9: Die Dichte dynamischer Spines steigt bei 6 Monate alten *Cnr1*^{-/-}-Mäusen.

(A) Dichte dynamischer Spines als Summe der verlorenen und gewonnen Spines zu einem Zeitpunkt, dividiert durch die Länge des dendritischen Segments. Bei den 3 Monate alten und 12 Monate alten Tieren konnten in der 2-Way ANOVA keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (3 Monate: Zeit: $F_{1,64} = 0,8658$, $p = 0,3556$; Genotyp: $F_{1,64} = 0,05894$, $p = 0,8090$; Interaktion: $F_{1,64} = 0,2721$, $p = 0,6037$; 12 Monate: Zeit: $F_{1,54} = 0,1172$, $p = 0,7334$; Genotyp: $F_{1,54} = 0,1693$, $p = 0,6823$; Interaktion: $F_{1,54} = 0,3262$,

$p = 0,5703$). Die 6 Monate alten Tiere wiesen in der 2-Way ANOVA einen signifikanten Gruppenunterschied in Bezug auf den Genotyp auf ($F_{1,40} = 9,455$, $p = 0,0038$) ohne Unterschiede in der Zeit ($F_{1,40} = 0,03556$, $p = 0,8514$) und der Interaktion ($F_{1,40} = 0,1317$, $p = 0,7186$). (B) Turnover Ratio als Zahl der gewonnen und verlorenen Spines zwischen zwei Zeitpunkten, dividiert durch die Gesamtsumme aller Spines zu beiden Zeitpunkten. In der 2-Way ANOVA konnte in keiner der Altersgruppen ein signifikanter Gruppenunterschied nachgewiesen werden (3 Monate: Zeit: $F_{1,64} = 0,02237$, $p = 0,8816$; Genotyp: $F_{1,64} = 0,8173$, $p = 0,3694$; Interaktion: $F_{1,64} = 0,03959$, $p = 0,8429$; 6 Monate: Zeit: $F_{1,40} = 0,1262$, $p = 0,7243$; Genotyp: $F_{1,40} = 0,003402$, $p = 0,9538$; Interaktion: $F_{1,40} = 0,3567$, $p = 0,5537$; 12 Monate: Zeit: $F_{1,54} = 0,5602$, $p = 0,4574$; Genotyp: $F_{1,54} = 0,25112$, $p = 0,6182$; Interaktion: $F_{1,54} = 0,0004033$, $p = 0,9841$). (C, E) Dichte dynamischer Spines als Mittelwert der Tage 3 bis 6. Es konnten mittels 2-Way ANOVA signifikante Gruppenunterschiede für das Alter ($F_{2,79} = 4,608$, $p = 0,0128$), den Genotyp ($F_{1,79} = 5,715$, $p = 0,0192$) und die Interaktion von Alter und Genotyp ($F_{2,79} = 6,076$, $p = 0,0035$) erwiesen werden. (D, F) Turnover Ratio als Mittelwerte der Tage 3 bis 6. Es gab in der 2-Way ANOVA keine signifikanten Gruppenunterschiede für das Alter ($F_{2,79} = 2,898$, $p = 0,0610$), den Genotyp ($F_{1,79} = 0,3876$, $p = 0,5354$) oder die Interaktion von Alter und Genotyp ($F_{2,79} = 0,09139$, $p = 0,9128$). (C) und (E) sowie (D) und (F) zeigen dieselben Daten in verschiedener Gruppierung: obere Panels: Alterseffekt, untere Panels: Genotypen-Effekt. Orange: Cnr1^{-/-}; Grau: Cnr1^{+/+}. Die Daten werden als Mittelwert pro Gruppe $\pm$ SEM abgebildet und wurden mittels 2-Way ANOVA, gefolgt von Sidak's multiple comparison Test analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

3.1.6 Weitere Parameter der Spinedynamik

Zur genaueren Beurteilung der alters- und genotypabhängigen Veränderungen wurden weitere Parameter der Spinedynamik analysiert. Dazu wurden die prozentualen Veränderungen von Gewinn, Verlust, Stabilität und Transienz der Spines über die Versuchsdauer betrachtet.

Der prozentuale Anteil an verlorenen, gewonnenen und stabilen Spines zeigte in keiner Altersgruppe signifikante Gruppenunterschiede im Verlauf der Imaging-Sessions (siehe Abb. 10A, 10B, 11A).

Betrachtet man die Mittelwerte der einzelnen Altersgruppen über den Versuchszeitraum, so ergab die Varianzanalyse einen signifikanten Alterseffekt sowohl für den Verlust als auch für die Stabilität der Spines (siehe Abb. 10D, 10F, 11B, 11D). Die Post-hoc-Analyse zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied. Hinsichtlich des Anteils gewonnener Spines konnte kein signifikanter Gruppenunterschied nachgewiesen werden (siehe Abb. 10C, 10E).

Ein Spine wird als transient bezeichnet, wenn er von einer Imaging-Sitzung zur nächsten gewonnen wird, aber in der darauffolgenden Sitzung wieder verloren geht. Die Hauptanalysen dieser Arbeit beziehen sich auf insgesamt 3 aufeinanderfolgende Imaging-Sitzungen, die jeweils 3 Tage auseinander lagen. Es ist daher nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob ein am sechsten Tag erschienener Spine am neunten Tag wieder verloren gegangen ist. Eine Aussage über die Transienz der Spines kann daher nur für die zweite Aufnahme am dritten Tag getroffen werden. Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (siehe Abb. 11C, 11E).

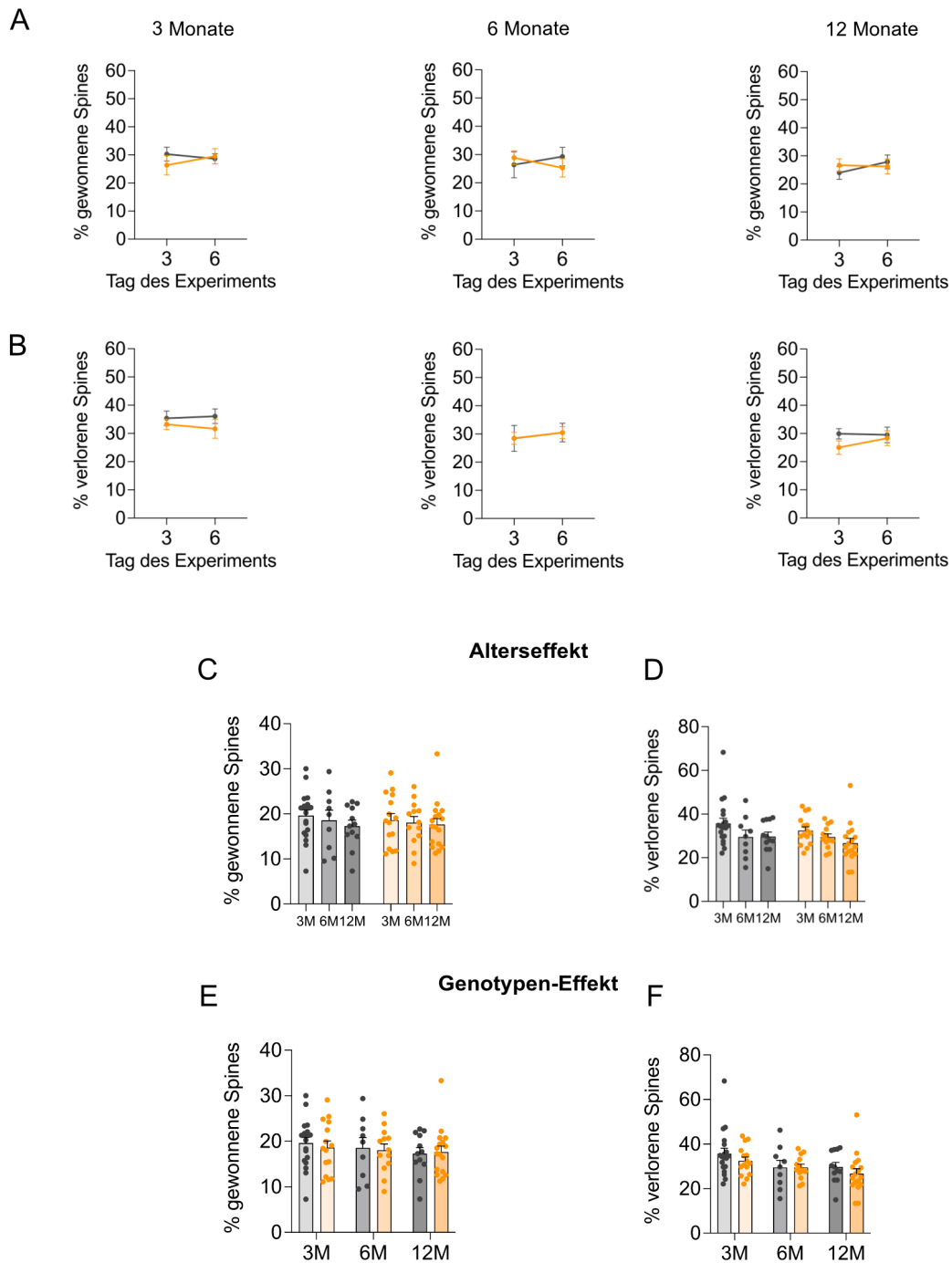


Abb. 10: Dynamische Spines als Fraktion im Vergleich zwischen $Cnr1^{-/-}$ und $Cnr1^{+/+}$ - Mäusen. (A) Anteil gewonnener Spines als Fraktion in Prozent aller Spines zum jeweiligen Zeitpunkt. Es zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede in der 2-Way ANOVA (3 Monate: Zeit: $F_{1,64} = 0,08579$, $p = 0,7705$; Genotyp: $F_{1,64} = 0,3402$, $p = 0,5618$; Interaktion: $F_{1,64} = 0,8708$, $p = 0,3542$; 6 Monate: Zeit: $F_{1,40} = 0,01028$, $p = 0,9197$; Genotyp: $F_{1,40} = 0,04630$, $p = 0,8307$; Interaktion $F_{1,40} = 0,9145$, $p = 0,3447$; 12 Monate: Zeit: $F_{1,54} = 0,4811$, $p = 0,4909$; Genotyp: $F_{1,54} = 0,04944$, $p = 0,8249$; Interaktion: $F_{1,54} = 0,7540$, $p = 0,3891$) (B) Anteil verlorener Spines als Fraktion in Prozent

aller Spines zum jeweiligen Zeitpunkt. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Gruppenunterschied (3 Monate: Zeit: $F_{1,64} = 0,02623$, $p = 0,8718$; Genotyp: $F_{1,64} = 1,537$, $p = 0,2195$; Interaktion: $F_{1,64} = 0,1897$, $p = 0,6646$; 6 Monate: Zeit: $F_{1,40} = 0,4666$, $p = 0,4985$; Genotyp: $F_{1,40} = 2,272 \times 10^{-5}$, $p = 0,9962$; Interaktion: $F_{1,40} = 0,0001346$, $p = 0,9908$; 12 Monate Zeit: $F_{1,54} = 0,3255$, $p = 0,5707$; Genotyp: $F_{1,54} = 1,414$, $p = 0,2396$; Interaktion: $F_{1,54} = 0,5324$, $p = 0,4688$) (C, E) Anteil gewonnener Spines in Prozent als Mittelwert der Tage 3 bis 6. Der Anteil unterscheidet sich in der 2-Way ANOVA nicht signifikant zwischen den Gruppen (Alter: $F_{2,79} = 0,7229$, $p = 0,4885$; Genotyp: $F_{1,79} = 0,09581$, $p = 0,7577$; Interaktion: $F_{2,79} = 0,1246$, $p = 0,8831$). (D, F) Anteil verlorener Spines als Mittelwert der Tage 3 bis 6. Mit Bezug auf das Alter konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden ($F_{2,79} = 4,205$, $p = 0,0184$), wohingegen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Genotyps ($F_{1,79} = 1,263$, $p = 0,2646$) bzw. der Interaktion beider Faktoren ($F_{2,79} = 0,2888$, $p = 0,7499$) fand. (C) und (E) sowie (D) und (F) zeigen dieselben Daten in verschiedener Gruppierung: obere Panels: Alterseffekt, untere Panels: Genotypen-Effekt. Orange: Cnr1^{-/-}; Grau: Cnr1^{+/+}. Die Daten werden als Mittelwert pro Gruppe $\pm$ SEM abgebildet und wurden mittels 2-Way ANOVA, gefolgt von Sidak's multiple comparison Test analysiert. * $p < 0,05$.

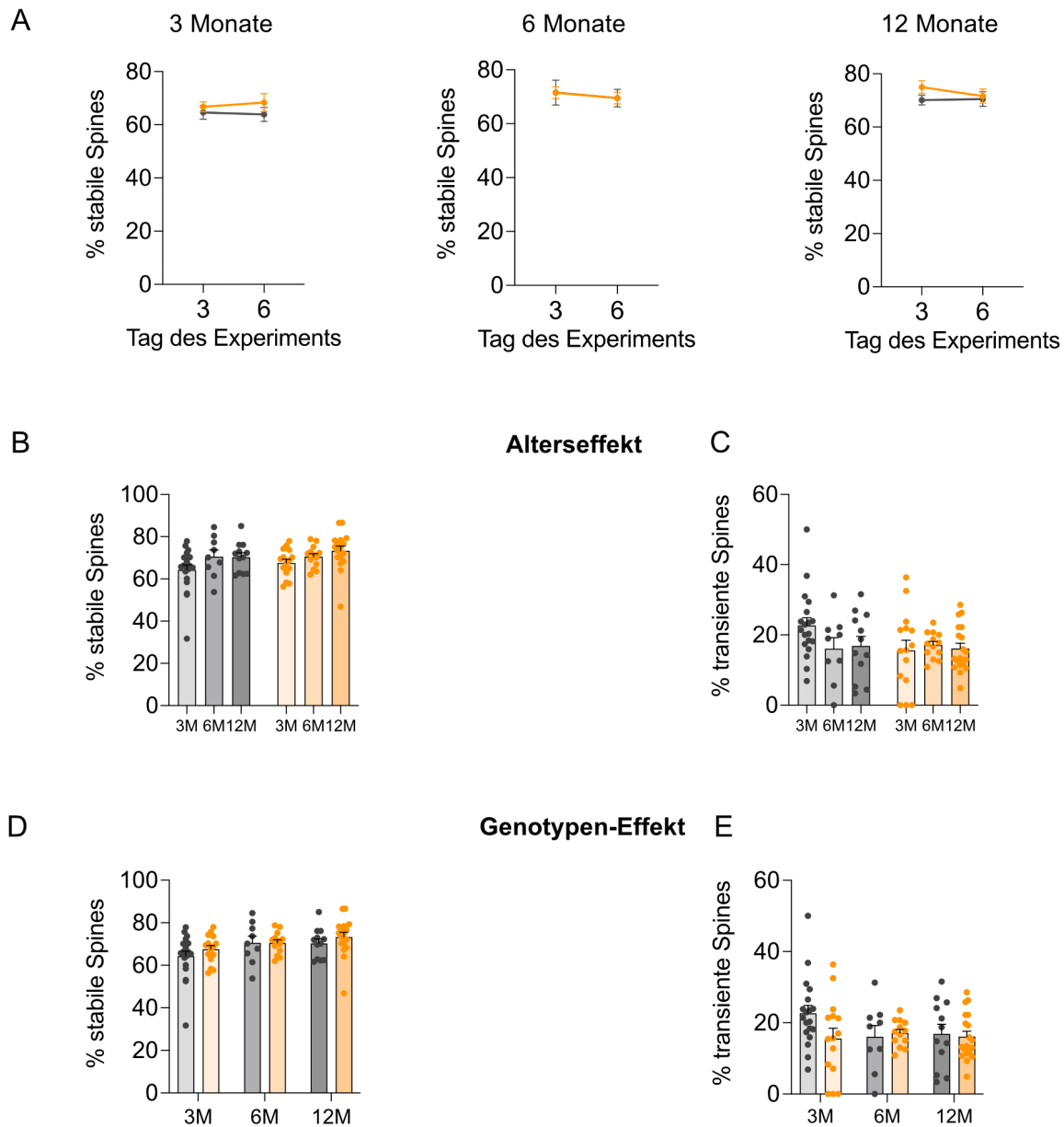


Abb. 11: Transiente und stabile Spines als Fraktion im Vergleich zwischen $Cnr1^{-/-}$ und $Cnr1^{+/+}$ -Mäusen. (A) Anteil stabiler Spines als Fraktion in Prozent aller Spines zum jeweiligen Zeitpunkt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Stabilität der Spines zwischen den verschiedenen Gruppen. (3 Monate: Zeit: $F_{1,64} = 0,02623$, $p = 0,8718$; Genotyp: $F_{1,64} = 1,5537$, $p = 0,2195$; Interaktion: $F_{1,64} = 0,1897$, $p = 0,6646$; 6 Monate: Zeit: $F_{1,40} = 0,4666$, $p = 0,4985$; Genotyp: $F_{1,40} = 2,272 \times 10^{-5}$, $p = 0,9962$; Interaktion: $F_{1,40} = 0,0001346$, $p = 0,9908$; 12 Monate: Zeit: $F_{1,54} = 0,3255$, $p = 0,5707$; Genotyp: $F_{1,54} = 1,414$, $p = 0,2396$; Interaktion: $F_{1,54} = 0,5324$, $p = 0,4688$) (C, E) Anteil transienter Spines an der Summe aller Spines an Tag 3 in Prozent. Ein Spine gilt als transient, wenn er an Tag 3 des Experiments hinzugewonnen wurde und an Tag 6 wieder verloren gegangen ist. Es konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede in der Transienz der Spines festgestellt werden. (Genotyp: $F_{1,81} = 1,388$, $p = 0,2422$; Alter $F_{2,81} = 0,9078$, $p = 0,4075$, Interaktion: $F_{2,81} = 1,767$, $p = 0,1773$). (B, D) Anteil stabiler Spines als Mittelwert der Tage 3 bis 6. Die Stabilität der Spines unterschied sich

signifikant bezüglich des Alters ($F_{2,79} = 4,205$, $p = 0,0184$) nicht jedoch in Bezug auf den Genotyp ($F_{1,79} = 1,263$, $p = 0,2646$) und die Interaktion ($F_{2,79} = 0,2888$, $p = 0,7499$) beider Faktoren. (C) und (E) sowie (B) und (D) zeigen dieselben Daten in verschiedener Gruppierung: obere Panels: Alterseffekt untere Panels: Genotypen-Effekt. Orange: Cnr1^{-/-}; Grau: Cnr1^{+/+}. Die Daten werden als Mittelwert pro Gruppe $\pm$ SEM abgebildet und wurden mittels 2-Way ANOVA, gefolgt von Sidak's multiple comparison Test analysiert. * $p < 0,05$.

3.1.7 Überleben der Spines

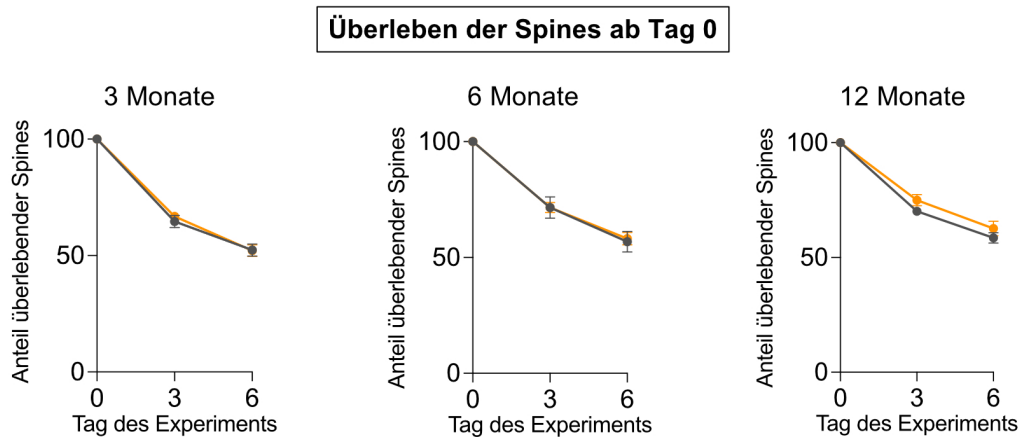
Im nächsten Schritt wurde die Stabilität aller Spines zwischen den Genotypen der jeweiligen Altersgruppe verglichen. Dazu wurde das Überleben der an Tag 0 des Versuches vorhandenen Spines betrachtet.

In allen Altersgruppen erwies sich die Zeit als signifikanter Faktor für das Überleben der Spines ab Tag 0 (siehe Abb. 12A).

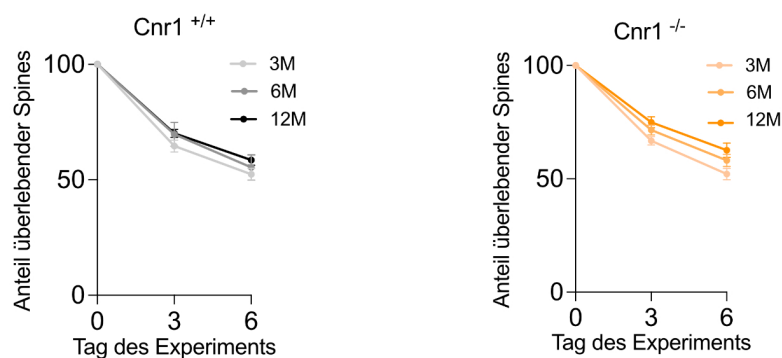
Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Altersgruppen innerhalb der Genotypen stellte sich bei den Cnr1^{-/-}-Mäusen zusätzlich zum Faktor Zeit auch das Alter als signifikanter Faktor für den Gruppenunterschied heraus. Hier zeigte die Post-hoc-Analyse, dass der Anteil der Spines, die an Tag 0 vorhanden waren und bis Tag 6 überlebten, bei den 3 Monate alten Tieren signifikant geringer war, als bei ihren 12 Monate alten genotypidentischen Artgenossen ($p = 0,0007$) (siehe Abb. 12B).

Anschließend wurde das Überleben der am dritten Versuchstag neu hinzugewonnen Spines untersucht. Bei den 3 Monate alten Tieren konnte der Genotyp als signifikanter Faktor für das Überleben der Spines nachgewiesen werden. Die Post-hoc-Analyse ergab, dass an Tag 3 hinzugewonnene Spines bei den 3 Monate alten Cnr1^{-/-}-Mäusen ein signifikant höheres Überleben gegenüber der gleichaltrigen Kontrollgruppe aufwiesen ($p = 0,0086$) (siehe Abb. 12C).

A



B



C

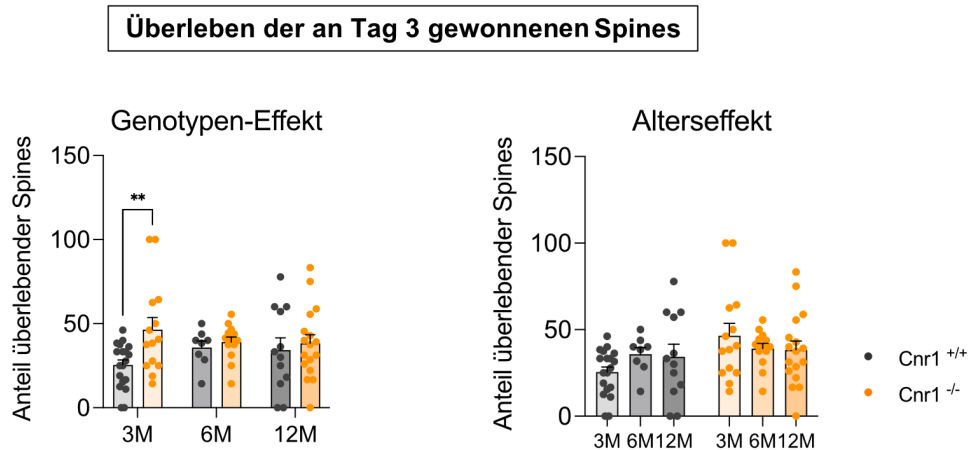


Abb. 12: Spines überleben bei älteren Cnr1^{-/-}-Mäusen eher als bei jungen Tieren. Neu gewonnene Spines werden in jungen Cnr1^{-/-}-Mäusen eher stabilisiert. (A) Fraktion der überlebenden Spines ab Tag 0 des Experiments. Für alle Altersgruppen zeigten sich signifikante Gruppenunterschiede für das Überleben der Spines ab Tag 0 bezüglich der Zeit (3 Monate: $F_{2,96} = 239,1$, $p < 0,0001$; 6 Monate: $F_{2,60} = 125,4$, $p < 0,0001$; 12 Monate: $F_{2,81} = 172,3$, $p < 0,0001$). Das Überleben der Spines ab Tag 0 wies jedoch keinen signifikanten Unterschied in einer der Altersgruppen in Bezug auf den Genotyp (3 Monate: $F_{1,96} = 0,1537$, $p = 0,6959$; 6 Monate: $F_{1,60} = 0,03649$, $p = 0,8492$; 12 Monate: $F_{1,81} = 2,803$, $p = 0,0979$) oder die Interaktion von Genotyp und Zeit auf (3 Monate: $F_{2,96} = 0,2025$, $p = 0,8170$; 6 Monate: $F_{2,60} = 0,04081$, $p = 0,8492$; 12 Monate:

$F_{2,81} = 0,7176$, $p = 0,4910$). (B) Anteil der überlebenden Spines ab Tag 0 des Experiments, dargestellt als Vergleich der Altersgruppen innerhalb eines Genotyps. Links: $Cnr1^{+/+}$ -Mäuse, rechts: $Cnr1^{-/-}$ -Mäuse. Die 2-Way ANOVA zeigte innerhalb beider Genotypen einen signifikanten Gruppenunterschied bezüglich der Zeit ($Cnr1^{+/+}$: $F_{2,111} = 215,6$, $p < 0,0001$; $Cnr1^{-/-}$: $F_{2,126} = 322,5$, $p < 0,0001$). Darüber hinaus war das Überleben der Spines bei den 3 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Tieren gegenüber den 12 Monate alten Tieren signifikant erhöht (Alter: $F_{2,126} = 7,169$, $p = 0,0011$). Bei den Wildtyp-Tieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Alters ($F_{2,111} = 2,041$, $p = 0,1348$). Die Interaktion beider Faktoren unterschied sich weder bei den $Cnr1^{+/+}$ - noch bei den $Cnr1^{-/-}$ -Tieren ($Cnr1^{+/+}$: $F_{4,111} = 0,5711$, $p = 0,6481$; $Cnr1^{-/-}$: $F_{4,126} = 1,873$, $p = 0,1193$). (C) Anteil überlebender Spines, die an Tag 3 des Experiments gewonnen wurden. Die 2-Way ANOVA zeigte einen signifikanten Unterschied bezüglich des Genotyps ($F_{1,177} = 4,487$, $p = 0,0374$). Das Überleben der an Tag 3 gewonnen Spines unterschied sich nicht signifikant in Bezug auf das Alter ($F_{2,177} = 0,03853$, $p = 0,9622$) und die Interaktion von Alter und Genotyp ($F_{2,177} = 1,949$, $p = 0,14939$). Links: Genotypen-Effekt, rechts: Alterseffekt. Orange: $Cnr1^{-/-}$; Grau: $Cnr1^{+/+}$. Die Daten werden als Mittelwert pro Gruppe $\pm$ SEM abgebildet und wurden mittels 2-Way ANOVA, gefolgt von Sidak's multiple comparison Test analysiert. * $p < 0,05$.

3.1.8 Zusammenfassung Spinedynamik

Zusammenfassend zeigte sich bei den $Cnr1^{-/-}$ -Mäusen eine veränderte Spinedynamik im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Insbesondere bei den 6 Monate alten Knockout-Tieren ergab sich eine signifikante Erhöhung der Spinedichte im Vergleich zur jüngeren Altersgruppe. Bei den 12 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Mäusen nahm die Spinedichte hingegen wieder ab. Dieser Anstieg der Spinedichte der Knockout-Tiere in der mittleren Alterskohorte ging mit einem Anstieg der Dichte dynamischer Spines einher. Sowohl die Dichte gewonnener als auch die Dichte verlorener Spines zeigte eine signifikante Zunahme. Die Turnover Ratio zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede.

Darüber hinaus zeigte sich ein Alterseffekt für den Anteil verlorener und stabiler Spines. Es ließ sich hier ein spiegelbildliches Verhalten beobachten. Während der mittlere Anteil stabiler Spines bei den $Cnr1^{-/-}$ -Tieren von ca. 67% bei den 3 Monate alten Tieren, auf ca. 73% bei den 12 Monate alten Mäusen anstieg, sank der Anteil verlorener Spines von ca. 32% bei den 3 Monate alten Tieren auf ca. 26% bei der ältesten Gruppe.

Bei der differenzierten Betrachtung der Spine Stabilität wurde zudem deutlich, dass die am Tag 0 vorhandenen Spines bei den 12 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Tieren signifikant besser überlebten als bei den 3 Monate alten Tieren. Die am Tag 3 neu hinzugewonnenen Spines

konnten dagegen in der jüngsten Altersgruppe signifikant besser stabilisiert werden als in den gleichaltrigen Wildtyp-Tieren.

3.1.9 Beispiel für ein Tier, das in zwei Altersgruppen verwendet wurde

Wie eingangs erwähnt, war es das ursprüngliche Ziel, dieselben Tiere, die im Alter von 3 Monaten mittels 2-Photonen-Mikroskopie abgebildet wurden, auch im Alter von 6 Monaten und 12 Monaten zu verwenden. Dies erwies sich jedoch aufgrund mehrerer Störfaktoren als besondere Herausforderung. Neben dem natürlichen Ausscheiden einiger Tiere während des Alterungsprozesses, kam es insbesondere zu einer nachlassenden Bildqualität durch das craniale Fenster, wodurch dasselbe dendritische Segment oft Monate später nicht mehr dargestellt werden konnte.

Erfreulicherweise zeigte eines der $Cnr1^{-/-}$ -Tiere eine ausgezeichnete Qualität aller Regionen, die auch nach 3 Monaten nicht nachließ. Dadurch war es möglich, dieselben dendritischen Segmente dieses Tieres sowohl im Alter von 3 Monaten als auch im Alter von 6 Monaten darzustellen.

Dies ermöglichte den isolierten Vergleich dieses Knockout-Tieres in zwei Altersgruppen mit den oben dargestellten Resultaten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13B zusammengefasst. Es ist zu beachten, dass die statistische Aussagekraft aufgrund der geringen Stichprobengröße stark eingeschränkt ist und diese Darstellung in erster Linie der Veranschaulichung dient. Dennoch zeigen sich im Vergleich zu den zuvor analysierten Spinedynamiken die gleichen Trends, was die Zuverlässigkeit dieser Ergebnisse untermauert. Es wird deutlich, dass insbesondere die Spinedichte bei den 6 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Tieren zugenommen hat. Dies ging einher mit einem Anstieg der Dichte verlorener und gewonnener Spines sowie der Dichte dynamischer Spines bei den Knockout-Tieren dieser Altersgruppe. Der Vergleich mit den Ergebnissen der anderen $Cnr1^{-/-}$ -Mäuse bestätigte diesen Trend (siehe Abb. 13C). Auch die bereits beschriebene höhere Stabilität der ab Tag 0 vorhandenen Spines bei den älteren Tieren im Vergleich zu den jüngeren Altersgruppen konnte bei diesem $Cnr1^{-/-}$ -Tier eindeutig nachgewiesen werden.

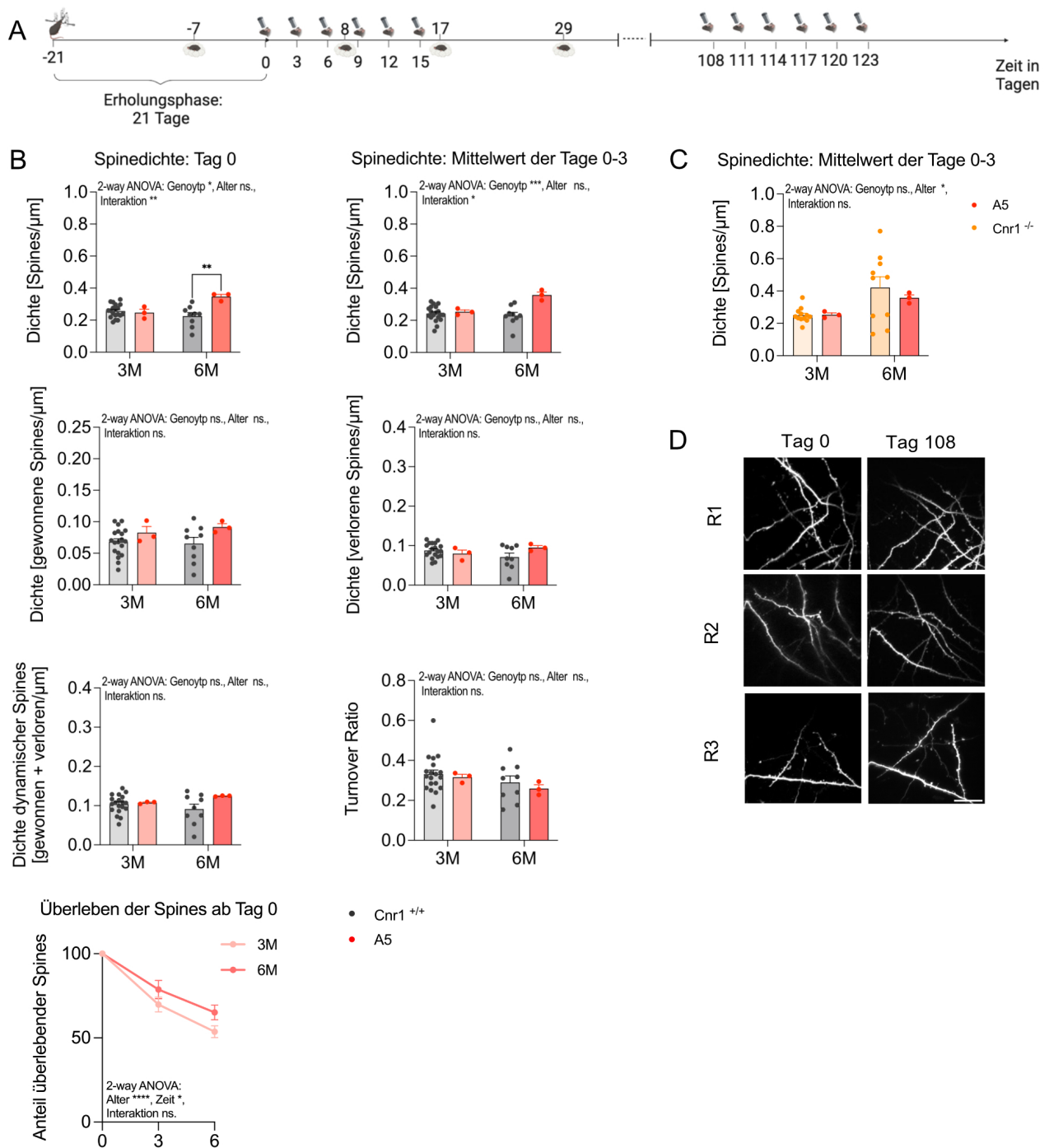


Abb. 13: A5 als Beispiel für ein Tier, das in zwei Altersstufen verwendet wurde. (A) Zeitachse des Experiments in Bezug auf A5 als Beispiel für ein Cnr1^{-/-}-Tier, das sowohl im Alter von 3 Monaten als auch im Alter von 6 Monaten verwendet werden konnte. (B) Spinedynamik der A5 Maus. (C) Vergleich der Spinedichte als Mittelwert der Tage 0-3 zwischen A5 als Cnr1^{-/-}-Maus und allen anderen Cnr1^{-/-}-Mäusen, die im Experiment in der jeweiligen Altersgruppe verwendet wurden. (D) Exemplarische Bilder der Regionen R1-3 des A5 Tiers, die sowohl an Tag 0, als auch an Tag 108 aufgenommen werden konnten. Rot: A5 (n = 3 Regionen). Grau: Alle Cnr1^{+/+}-Tiere, die im Experiment in der entsprechenden Altersgruppe verwendet wurden (3 Monate: n = 10 Tiere, n = 19 Regionen; 6 Monate n = 4 Tiere, n = 9 Regionen). Orange: Alle Cnr1^{-/-} Tiere, die im

Experiment in der entsprechenden Altersgruppe verwendet wurden (Cnr1^{-/-} n = 6 Mäuse, n = 15 Regionen; 6 Monate n = 5 Tiere, n = 13 Regionen). Die Daten werden als Mittelwert pro Gruppe $\pm$ SEM abgebildet und wurden mittels 2-Way ANOVA, gefolgt von Sidak's multiple comparison Test analysiert. * p < 0,05; ** p < 0.01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

3.1.10 Verhaltenstest und Gewichtsveränderung

Um festzustellen, ob Unterschiede im Selbstfürsorgeverhalten und Veränderungen im Stressniveau die Ergebnisse beeinflusst haben könnten, wurde bei allen Altersgruppen zu vier verschiedenen Zeitpunkten ein Nestlet-Shredding-Test durchgeführt. Bei den 3 Monate alten Tieren war der Genotyp ein Faktor für einen schwach signifikanten Gruppenunterschied. In der Post-hoc-Analyse konnte kein signifikanter Gruppenunterschied festgestellt werden. Für die anderen Altersgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 14A).

Zudem wurde das Gewicht der Mäuse während des gesamten Versuchs wiederholt gemessen. Bei allen Tieren trat ein physiologischer postoperativer Gewichtsverlust auf, der sich bis zum Beginn der Imaging-Phase normalisierte.

Die Varianzanalyse ergab für die 3 Monate alten Tiere signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich des Genotyps und der Zeit. Die Interaktion der beiden Faktoren wurde als nicht signifikant bewertet. Während bei den 6 Monate alten Tieren kein signifikanter Gruppenunterschied festgestellt wurde, erwies sich der Genotyp bei den 12 Monate alten Tieren erneut als hochsignifikanter Faktor für den Gruppenunterschied (siehe Abb. 14B).

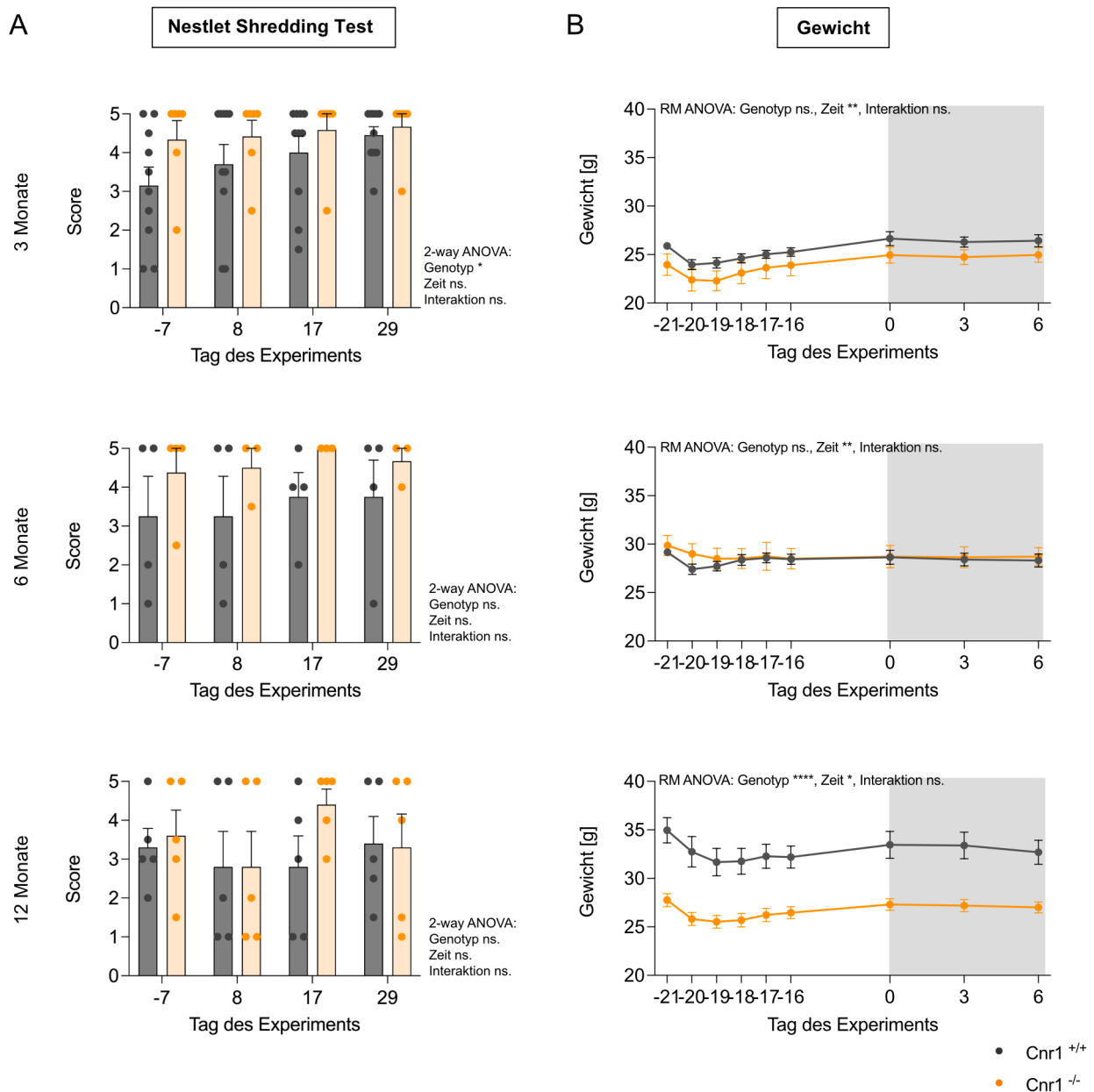


Abb. 14: Verhaltenstest und Gewichtsveränderung. (A) Ergebnisse der Nestlet-Shredding-Tests, die im Verlauf des Experiments durchgeführt wurden. Von oben nach unten: 3 Monate alte Tiere (Cnr1^{-/-}: n = 6, Cnr1^{+/+}: n = 10), 6 Monate alte Tiere (Cnr1^{-/-}: n = 4, Cnr1^{+/+}: n = 4), 12 Monate alte Tiere (Cnr1^{-/-}: n = 5, Cnr1^{+/+}: n = 5). Die 2-Way ANOVA zeigte einen signifikanten Unterschied für den Genotypen bei den 3 Monate alten Tieren ($F_{1,32} = 0,7397$, $p = 0,3961$). Zeit und Interaktion zwischen beiden Faktoren waren nicht signifikant (Zeit: $F_{3,32} = 0,4444$, $p = 0,7229$; Interaktion $F_{3,32} = 0,5632$, $p = 0,6432$). Möglicher Score 1-5. (B) Absolute Gewichtsveränderung im Verlauf des Experiments. Der graue Kasten gibt die Dauer des in-vivo-Imaging Zeitraums an. Das Gewicht unterschied sich signifikant bezüglich der Zeit in allen Altersgruppen (3 Monate: $F_{1,272;17,81} = 12,70$, $p = 0,0013$; 6 Monate: $F_{3,31;19,86} = 5,016$, $p = 0,0081$; 12 Monate: $F_{1,329;13,29} = 6,474$, $p = 0,018$). Darüber hinaus zeigte sich ein signifikanter Genotypen-Effekt bei den 12 Monate alten Tieren ($F_{1,10} = 21,69$, $p = 0,009$).

Bei den 3 Monate und 6 Monate alten Tieren gab es keinen signifikanten Genotypen-Effekt (3 Monate: $F_{1,14} = 3,310$, $p = 0,0903$; 6 Monate: $F_{1,6} = 0,1423$, $p = 0,7190$). Es konnte in keiner der Altersgruppen eine signifikante Interaktion zwischen Zeit und Genotyp festgestellt werden. (3 Monate: $F_{8,112} = 0,1259$, $p = 0,9981$; 6 Monate: $F_{8,48} = 1,949$, $p = 0,0739$; 12 Monate: $F_{8,80} = 0,5260$, $p = 0,8337$). Orange: Cnr1^{-/-}; Grau: Cnr1^{+/+}. Die Daten sind als Mittelwert pro Gruppe $\pm$ SEM angegeben und wurden mittels 2-Way ANOVA, gefolgt von Sidak's multiple comparison Test analysiert. Für die statistische Analyse der Gewichtsveränderung wurde eine ANOVA mit Messwiederholungen (Repeated Measures ANOVA (RM)) verwendet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

3.2 Skilled-Forelimb-Reaching Experiment

Um das Lernverhalten von Cnr1^{-/-}-Tieren besser zu verstehen, wurde der Skilled-Forelimb-Reaching-Test durchgeführt (siehe Abb. 15A). Aufgrund testspezifischer Ausschlusskriterien (siehe Kapitel 2.10) wurde der Test mit reduzierter Anzahl an Tieren durchgeführt (3 Monate alte Tiere: Cnr1^{+/+}: $n = 20$, Cnr1^{-/-}: $n = 12$, 6 Monate alte Tiere: Cnr1^{+/+}: $n = 15$, Cnr1^{-/-}: $n = 10$, 12 Monate alte Tiere: Cnr1^{+/+}: $n = 18$, Cnr1^{-/-}: $n = 10$).

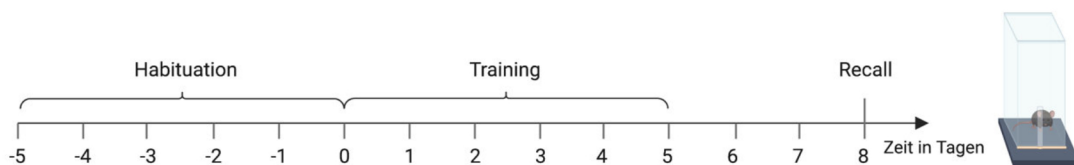
In keiner Altersgruppe konnte der Genotyp als signifikanter Faktor für den Gruppenunterschied nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich bei den 3 Monate alten Tieren eine signifikante Interaktion zwischen Zeit und Genotyp. Außerdem wurde ein signifikanter Unterschied für den Faktor Zeit bei den 3 und 6 Monate alten Gruppen festgestellt. Die einzelnen Zeiteffekte, die sich aus der Post-hoc-Analyse ergaben, wurden in Abbildung 15 nicht gesondert eingezeichnet. Jedoch ergaben sich relevante Ergebnisse für die 3 Monate alten Tiere an Tag 4 und 5 (Cnr1^{+/+}: Tag 4 $p = 0,0144$, Tag 5 $p = 0,0001$; Cnr1^{-/-}: Tag 4 $p = 0,0253$, Tag 5 $p = 0,006$). Bei den 12 Monate alten Tieren konnte kein Gruppenunterschied festgestellt werden (siehe Abb. 15B).

Während des Experiments wurden wiederholt Krampfanfälle bei den Tieren beobachtet. Besonders bei den 6 Monate alten Cnr1^{-/-}-Tieren lag der Anteil bei 41%. Es ist auffällig, dass diese Anfälle bei keinem der Wildtyp-Tiere beobachtet wurden. Auch bei den 3 Monate alten Knockout-Tieren trat dieses Ereignis nicht auf. Bei den 12 Monate alten Cnr1^{-/-}-Tieren wurden Anfälle bei 36% der Tiere festgestellt. Daraus ergibt sich, dass insgesamt ein Fünftel aller Knockout-Tiere einen Krampfanfall erlitten, während keine der Wildtyp-Mäuse betroffen war (siehe Abb. 15C).

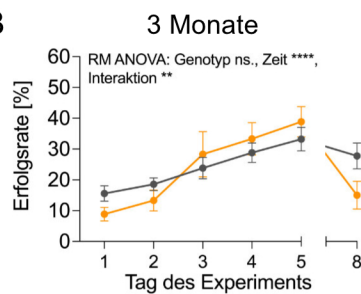
Einige Tiere schieden vorzeitig aus dem Experiment aus, da sie während der Habituationphase drei Greifversuche nicht erfolgreich durchführen konnten.

Es wurde beobachtet, dass bei den 3 Monate alten Tieren des jeweiligen Genotyps die Drop-Out-Rate am höchsten war. Bei den $Cnr1^{+/+}$ -Mäusen schieden ca. 9% der Tiere vorzeitig aus dem Experiment aus, während dieser Anteil bei den $Cnr1^{-/-}$ mit 33,3% fast viermal so hoch war. In den anderen Altersgruppen der Wildtyp-Tiere gab es keine Ausschlüsse. Bei den 6 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Tieren lag der Anteil bei etwa 16,7% und bei den 12 Monate alten Tieren etwas niedriger bei etwa 9,1%. Insgesamt ergab sich damit eine sechsmal höhere Ausschlussrate bei den $Cnr1^{-/-}$ -Mäusen (siehe Abb. 15D).

A

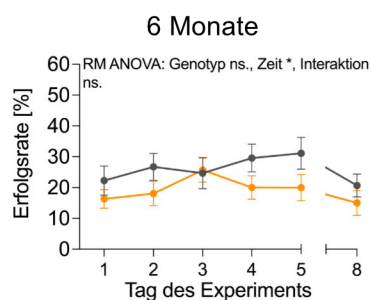


B



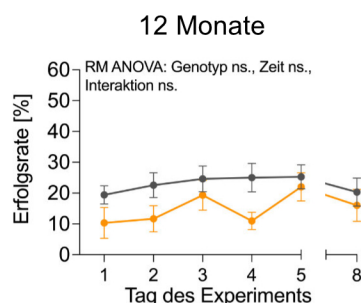
C

	Tiere mit Anfällen [%]	
	$Cnr1^{+/+}$	$Cnr1^{-/-}$
3M	0	0
6M	0	41,67
12M	0	36,36
Total	0	21,95



D

	Dropout Tiere [%]	
	$Cnr1^{+/+}$	$Cnr1^{-/-}$
3M	9,09	33,33
6M	0	16,67
12M	0	9,09
Total	3,63	21,95



- $Cnr1^{+/+}$
- $Cnr1^{-/-}$

Abb. 15: Reachingversuch (A) Zeitachse des Versuchsaufbaus (siehe Kapitel 2.10). (B) Rate erfolgreicher Greifversuche in Prozent als Funktion der Zeit. Es zeigte sich ein signifikanter Gruppenunterschied bei den 3 Monate alten Tieren, bezogen auf die Zeit ($F_{3,612;112} = 20,1$, $p < 0,0001$), nicht jedoch bezüglich des Genotyps ($F_{1,31} = 0,1482$, $p < 0,7029$). Es existierte eine signifikante Interaktion zwischen Zeit und Genotyp ($F_{5,155} = 3,564$, $p = 0,0044$). Bei den 6 Monate alten Tieren war die Zeit ein signifikanter Faktor für den Gruppenunterschied ($F_{3,735; 85,91} = 2,609$, $p = 0,0447$), anders als der Genotyp ($F_{1,23} = 1,556$, $p = 0,2249$) und die Interaktion beider Faktoren ($F_{5,115} = 1,123$, $p = 0,3521$). Die 12 Monate alten Tiere wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Genotyp: $F_{1,26} = 2,42$, $p = 0,1319$; Zeit: $F_{3,695;96,07} = 2,146$, $p = 0,0861$; Interaktion: $F_{5,130} = 0,9061$, $p = 0,4793$). (C) Anteil der beobachteten Krampfanfälle von $Cnr1^{-/-}$ - und $Cnr1^{+/+}$ -Mäusen der verschiedenen Altersgruppen im Verlauf des Experiments. Bei den $Cnr1^{-/-}$ -Tieren erlitten 21% der Mäuse Krampfanfälle. (D) Rate der $Cnr1^{-/-}$ - und $Cnr1^{+/+}$ Tiere der verschiedenen Altersgruppen, die im Verlauf des Experiments ausgeschieden sind. Bei den Knockout-Mäusen war die Wahrscheinlichkeit, dass sie das Training vorzeitig abbrachen, 6-mal höher. Die Daten sind als Mittelwert pro Gruppe $\pm$ SEM angegeben und wurden mit einer ANOVA mit Messwiederholungen (Repeated Measures ANOVA (RM)), gefolgt von Sidak's multiple comparison Test analysiert. 3 Monate alte Tiere ($Cnr1^{+/+}$ n = 20, $Cnr1^{-/-}$ n = 12), 6 Monate alte Tiere ($Cnr1^{+/+}$ n = 15, $Cnr1^{-/-}$ n = 10), 12 Monate alte Tiere ($Cnr1^{+/+}$ n = 18, $Cnr1^{-/-}$ n = 10). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4. Diskussion

Das ECS ist ein bedeutender Bestandteil der Lern- und Gedächtnisfunktionen. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass sich die endogene Cannabinoid-Konzentration im Laufe des Lebens verändert (Bilkei-Gorzo, 2012; Di Marzo et al., 2015; Piyanova et al., 2015). Diese Veränderungen scheinen für den Alterungsprozess von Bedeutung zu sein, da Mäuse, bei denen die CB1-Rezeptoren fehlen, Symptome einer beschleunigten Alterung zeigen, darunter Veränderungen der Hautstruktur und kognitive Defizite (Bilkei-Gorzo et al., 2012). Studien legen nahe, dass durch die Verabreichung von geringen Dosen THC, die die CB1-Rezeptoren aktivieren, die kognitive Funktion bei alten Mäusen wiederhergestellt werden kann. Dies scheint auf eine veränderte Spinedynamik zurückzuführen zu sein (Bilkei-Gorzo et al., 2017; Komorowska-Müller et al., 2023). Der genaue Mechanismus, durch den der CB1-Rezeptor an diesen Prozessen beteiligt ist, bleibt allerdings weitgehend unerforscht. Bisher wurde nicht untersucht, welchen Einfluss ein Knockout des CB1-Rezeptors auf die Spinedynamik im primären motorischen Cortex hat. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss des CB1-Rezeptors auf die Spinedynamik in verschiedenen Altersstufen zu untersuchen. Dabei konnten altersabhängige Veränderungen in der Spinedynamik bei den $Cnr1^{-/-}$ -Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren nachgewiesen werden. Bei den 6 Monate alten Knockout-Mäusen wurde eine signifikante Zunahme der Spinedichte festgestellt, während bei den 12 Monate alten Mäusen eine Abnahme der Spinedichte beobachtet wurde. Diese Zunahme der Spinedichte bei den Knockout-Tieren war mit einer Zunahme der Dichte der dynamischen Spines verbunden, sowohl bei den gewonnenen als auch bei den verlorenen Spines. Es wurde auch ein Alterseffekt für den Anteil an verlorenen und stabilen Spines beobachtet. Der Anteil stabiler Spines nahm mit dem Alter der $Cnr1^{-/-}$ -Mäuse zu, während der Anteil verlorener Spines abnahm. Außerdem wurde festgestellt, dass vorhandene Spines bei älteren Knockout-Tieren eine höhere Überlebensrate aufwiesen als bei jüngeren Tieren. In der jüngeren Altersgruppe wurde neu hinzugewonnene Spines besser stabilisiert als bei gleichaltrigen Wildtyp-Tieren.

Im Folgenden wird eine umfassende Bewertung der Grenzen und möglichen Verzerrungen der verwendeten Methoden durchgeführt, um die Robustheit und

Zuverlässigkeit der erzielten Ergebnisse darzustellen. Anschließend werden diese Ergebnisse diskutiert und in den Kontext aktueller Forschungsergebnisse gestellt.

4.1 Diskussion von Material und Methoden

Die Erzeugung von Cnr1-Knockout-Mäusen stellt ein ausgezeichnetes Werkzeug dar, um die Neurophysiologie des Endocannabinoidsystems besser zu verstehen (Valverde et al., 2005). In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich der Verlust des CB1-Rezeptors auf die Dynamik dendritischer Spines auswirkt. Die gezielte Inaktivierung des Cnr1-Gens bei den Knockout-Tieren ermöglicht diese Beobachtung, jedoch geht sie auch mit anderen Eigenschaften der Mäuse einher, die die Ergebnisse dieses Experiments beeinflusst haben. Frühere Studien belegen, dass Cnr1^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Mortalitätsrate aufweisen, welche mit einer erhöhten Anzahl unklarer spontaner Todesfälle einhergeht, ohne dass die Tiere vorher klinische Anzeichen von Einschränkungen oder anderen Auffälligkeiten zeigen (Zimmer et al., 1999). Die exakten Ursachen für diese Tendenz sowie andere phänotypische Veränderungen wie verminderte Schmerzempfindlichkeit und Hypoaktivität sind Gegenstand weiterer Untersuchungen. In unserem Experiment führten diese Variablen dazu, dass einige Tiere vorzeitig aus dem Versuch ausgeschieden sind. Darunter befanden sich drei Knockout-Tiere, bei denen ohne ersichtlichen Grund eine spontane Todesursache in ihren Käfigen festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus wurde in der Literatur festgehalten, dass eine globale genetische Deletion des CB1-Rezeptors zu einer intensiveren Ausprägung von Angstzuständen führt und mit einer erhöhten Stressanfälligkeit der Tiere einhergeht (Beins et al., 2021; Haller et al., 2002; Hill et al., 2011; Martin et al., 2002; Valverde et al., 2005). Auf molekularer Ebene geht diese erhöhte Stresssensitivität mit einer veränderten Stresshormonsignalisierung in den Mikroglia einher, was dazu führt, dass die Tiere schon bei geringfügig belastenden Bedingungen stressempfindlich werden (Beins et al., 2021). Diese neurophysiologischen Veränderungen können sich unter anderem auf die dendritische Verzweigung und die Komplexität der Pyramidenneurone im motorischen Cortex und im medialen präfrontalen Cortex (mPFC) auswirken, was auf eine entwicklungsbedingte Veränderung der synaptischen Architektur dieser Neurone hindeuten könnte (Hill et al., 2011). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Eingriffe in dieser Versuchsanordnung zu einer

erhöhten Stressbelastung der Mäuse geführt haben könnten, was wiederum einen Einfluss auf die beobachteten Ergebnisse gehabt haben könnte. Um sicherzustellen, dass die Tiere nicht durch Krankheit oder die experimentellen Eingriffe erhöhtem Stress ausgesetzt waren, wurden der Allgemeinzustand und der Stresspegel der Tiere sorgfältig überwacht. Dazu wurde das Nestbauverhalten der Mäuse als Indikator für Veränderungen im Selbstfürsorgeverhalten und Stressniveau beobachtet (Beins et al., 2021; Jirkof, 2014). Zusätzlich wurden die Tiere regelmäßig gewogen, da plötzliche Gewichtsveränderungen oft auf eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes hinweisen. Jedoch konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (siehe Kapitel 3.1.10). Es ist daher nicht zu erwarten, dass die beobachteten Ergebnisse in Folge von Stress oder Krankheit beeinflusst wurden.

Die Entwicklung fluoreszierender Reporterlinien ermöglichte erstmals die Visualisierung einzelner Dendriten mittels in-vivo Bildgebung durch 2-Photonen-Mikroskopie im lebenden Organismus (Grutzendler et al., 2002; Mizrahi und Katz, 2003; Trachtenberg et al., 2002). Diese Technik erlaubt die nicht-invasive Abbildung neuronaler Strukturen tief im intakten Gehirn und liefert wertvolle Einblicke in die dynamischen Prozesse, welche auf der Ebene der synaptischen Verbindungen ablaufen. Bisher wurden keine Studien zur Untersuchung der Spinedynamik von *Cnr1*^{-/-}-Tieren in-vivo in Kombination mit 2-Photonen-Imaging durchgeführt. Daher ist es wichtig, die spezifische Umsetzung dieser Methode im Rahmen dieser Arbeit zu diskutieren, da es verschiedene Ansätze mit jeweiligen Vor- und Nachteilen gibt. Zu den etablierten in-vivo-Bildgebungsverfahren gehören die offene Schädelchirurgie (Open-Skull) und die dünne Schädelchirurgie (Thin-Skull) (Balazs Lendvai et al., 2000; Grutzendler et al., 2002; Hofer et al., 2009; Holtmaat et al., 2009; Keck et al., 2008; Knott und Holtmaat, 2008; Trachtenberg et al., 2002; Zuo et al., 2005b). Die Thin-Skull Technik ist weniger invasiv und führt zu einer geringeren Entzündungsreaktion. Allerdings geht sie mit Gewebeschäden einher und erfordert wiederholte mechanische Manipulationen vor jeder Bildgebungssitzung, was zu einer variablen Bildqualität führen kann. Zudem ist die Eindringtiefe des Mikroskops ein limitierender Faktor (Drew et al., 2010; Holtmaat et al., 2009; Shih et al., 2012; Yang et al., 2010; Zuo et al., 2005b). Im Gegensatz dazu ermöglicht die Open-Skull-Methode eine Abbildung tieferer Hirnstrukturen und einen größeren Bildausschnitt, was die Bildgebung in Mauslinien mit spärlichen Expressionsmustern, wie der GFP-M-Linie, ermöglicht

(Holtmaat et al., 2009). Allerdings gilt die offene Schädelchirurgie als invasiver und der Erfolg des Eingriffs hängt stark von der Kompetenz des Operateurs ab (Crowe und Ellis-Davies, 2014). Eine weitere Einschränkung ist die bereits erwähnte Opazität des Fensters, die durch die entstehende Entzündungsreaktion aufgrund der Invasivität entsteht (Holtmaat et al., 2008, 2009; Zuo et al., 2005). Dies war die größte Herausforderung dieser Studie, da es die Qualität des Fensters beeinträchtigte und dazu führte, dass einige Tiere aus dem Experiment ausgeschlossen werden mussten. Um dem entgegenzuwirken, wurde den Tieren in regelmäßigen Abständen Carprophen verabreicht (Crowe und Ellis-Davies, 2014). Des Weiteren wurden während und nach den Operationen mögliche Fehlerquellen identifiziert und ausgeschlossen. Um Störfaktoren zu minimieren, erhielten die Tiere ausreichend Erholungszeit (Holtmaat et al., 2009). Es sei darauf hingewiesen, dass in der Literatur diskutiert wird, in welchem Ausmaß die gewählten Techniken die Dynamik der Spines beeinflussen können. Insgesamt ist dieses Thema umstritten und bedarf weiterer Untersuchungen (Chow et al., 2009; Hofer et al., 2009; Holtmaat et al., 2009; Keck et al., 2008; Livneh et al., 2009; Xu et al., 2007).

Die 2-Photonen-Mikroskopie bleibt trotz der damit verbundenen Einschränkungen das leistungsfähigste verfügbare Instrument zur Untersuchung der Dynamik dendritischer Spines im lebenden Organismus und liefert wertvolle Erkenntnisse zur synaptischen Plastizität und neuronalen Funktion.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Das Alter beeinflusst die Spinedynamik

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass sich die Dynamik der dendritischen Spines während des Alterungsprozesses verändert. Wie in Kapitel 1.1.2 erwähnt, sind bereits die Auswirkungen des physiologischen Alterns auf die dendritischen Spines im gesamten Cortex komplex und vielfältig und unterscheiden sich je nach betrachteter Hirnregion.

Um den Einfluss des Genotyps auf die altersabhängigen Veränderungen der Spinedynamik näher zu charakterisieren, wird zunächst die Kontrollgruppe betrachtet. Im vorliegenden Experiment wurden die Spines des primären motorischen Cortex untersucht. Hier zeigten sich keine signifikanten Alterseffekte zwischen den 3, 6 und 12

Monate alten Tieren der Kontrollgruppe. Davidson et al. (2020) haben ebenfalls die Auswirkungen des natürlichen Alterns auf die Spinedynamiken des primär motorischen Cortex untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit stellten sie fest, dass die Spinedichte mit dem Alter zunahm und mit einer erhöhten Dichte an gewonnenen und verlorenen Spines einherging. Dies ging einher mit einem geringeren Anteil überlebender Spines an der Gesamtzahl in der älteren Population, was möglicherweise durch eine verstärkte Stabilisierung neu gewonnener Spines kompensiert wurde. An dieser Stelle ist es jedoch wichtig, den Zeitpunkt zu diskutieren, zu dem die Veränderungen in der Spinedynamik der Tiere untersucht wurden. Davidson et al. nutzten Tiere im Alter von 3-5 Monaten für die junge Kohorte und Tiere im Alter von 20-23 Monaten für die alte Kohorte. In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen bei Tieren im Alter von 3, 6 und 12 Monaten analysiert. Obwohl bei älteren Tieren möglicherweise stärkere Effekte zu erwarten wären, wurden diese Altersgruppen aufgrund des spezifischen Phänotyps der $Cnr1^{-/-}$ -Mäuse ausgewählt. Wie bereits erwähnt, zeigen $Cnr1^{-/-}$ -Mäuse Anzeichen einer beschleunigten Alterung (Bilkei-Gorzo et al., 2005). Da aus der Literatur bekannt ist, dass mögliche Veränderungen bereits im Alter von 4-6 Monaten auftreten und im Alter von 12 Monaten noch ausgeprägter vorliegen (Bilkei-Gorzo et al., 2012), wurden diese Altersgruppen als sinnvoll erachtet. Darüber hinaus erschien eine Festlegung auf 12 Monate auch aus tierethischer Perspektive angemessen. Mit dieser Entscheidung wurde sichergestellt, dass die Tiere den Versuchsbedingungen standhalten und den Versuchsstress bewältigen können. Außerdem wurde so die erforderliche Primärzahl an Zuchttieren begrenzt und gesundheitliche Risiken für ältere Tiere minimiert.

Um eine angemessene Vergleichbarkeit zwischen den Untersuchungen zu gewährleisten, wurde die Auswahl der Tiere in der Kontrollgruppe an das Alter der $Cnr1^{-/-}$ -Mäuse angepasst.

4.2.2 Die Deletion des CB1 Rezeptors beeinflusst die Spinedichte

Es wurde beobachtet, dass die Deletion des CB1-Rezeptors bei den 6 Monate alten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Zunahme der Spinedichte führte. Veränderungen in der Anzahl, Größe und Stabilität dendritischer Spines sowie synaptische Dysfunktionen werden häufig bei verschiedenen neurologischen und

psychiatrischen Störungen sowie anderen neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet (Fiala et al., 2002; Qiao et al., 2016). Es wird angenommen, dass diese Veränderungen zu den kognitiven Defiziten beitragen können, die bei solchen Störungen auftreten (Chidambaram et al., 2019). Während eine erhöhte Spinedichte und eine verbesserte synaptische Konnektivität des motorischen Cortex in einigen Studien mit einer verbesserten Lern- und Gedächtnisleistung assoziiert ist (Eilam-Stock et al., 2012; Monfils et al., 2004; Yang et al., 2009; Yu und Zuo, 2011), konnte andererseits gezeigt werden, dass bestimmte soziale Defizite und niedrigere kognitive Funktionsniveaus, beispielsweise im Rahmen von Autismus-Spektrum-Störungen oder des fragilen X-Syndroms, mit einer erhöhten Spinedichte von pyramidalen Neuronen im Cortex einhergehen (Berman et al., 2012; Hutsler und Zhang, 2010; Irwin et al., 2000; Kim et al., 2017; Zhan et al., 2014). Die Zunahme der Spinedichte bei den 6 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Mäusen könnte daher als Korrelat der bereits in diesem Alter auftretenden kognitiven Funktionsbeeinträchtigungen auf Verhaltensebene betrachtet werden (Bilkei-Gorzo et al., 2005).

Darüber hinaus ist es denkbar, dass die erhöhte Spinedichte im Alter von 6 Monaten eine Manifestation des beschleunigten Alterungsphänomens der $Cnr1^{-/-}$ -Mäuse darstellt, das mit einem vorzeitigen Rückgang kognitiver Funktionen und Neuroinflammation einhergeht (Albayram et al., 2012; Albayram et al., 2011; Bilkei-Gorzo et al., 2012; Bilkei-Gorzo et al., 2005). Während laut Davidson et al. (2020) die erhöhte Spinedichte im physiologischen Alterungsprozess des motorischen Cortex erst ab einem Alter von 20-23 Monaten auftritt, könnte ein früheres Auftreten dieses Prozesses als Hinweis auf eine beschleunigte Alterung interpretiert werden. Es ist anzumerken, dass in anderen Studien eine altersabhängige Abnahme der Spinedichte beobachtet wurde. Bei diesen Arbeiten lag jedoch der Fokus nicht wie bei Davidson et al. auf dem primär motorischen Cortex (Dumitriu et al., 2010).

Auffallend ist, dass die bei den 6 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Mäusen beobachtete Zunahme der Spinedichte bei den 12 Monate alten Tieren nicht mehr feststellbar war. Stattdessen gab es in dieser Altersgruppe eine signifikante Abnahme der Dichte auf das Niveau der 3 Monate alten Knockout-Tiere. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, das auf den ersten Blick nicht mit den Beobachtungen von Bilkei-Gorzo et al. (2005) übereinstimmt. Dort

wurde gezeigt, dass die Defizite der $Cnr1^{-/-}$ -Mäuse im Alter von 12 Monaten noch deutlich ausgeprägter waren als in den jüngeren Altersgruppen. Dementsprechend wurde erwartet, dass die beobachteten Veränderungen bei den 6 Monate alten Tieren bei den 12 Monate alten Tieren noch ausgeprägter sein würden. Eine mögliche Erklärung für dieses abweichende Ergebnis könnte jedoch in der Entwicklungsgeschichte des Knockout-Modells begründet liegen. In diesem Experiment wurde ein konstitutiver Knockout-Ansatz verwendet, um das $Cnr1$ -Gen bei den Tieren auszuschalten. Da die Gendeletion während der Embryogenese wirksam ist, besteht die Möglichkeit, dass die Tiere adaptive Kompensationsmechanismen entwickeln, um den Verlust des $Cnr1$ -Gens auszugleichen. Wie von Zimmer et al. (1999) berichtet, weisen $Cnr1^{-/-}$ -Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate auf. Diese erhöhte Sterblichkeit manifestiert sich bereits im Alter von 2 Monaten und zeigt einen deutlichen Anstieg bis zum Alter von 6 Monaten. Obwohl Zimmer et al. keine Beobachtungen zur Mortalität nach der 24. Woche gemacht haben, bestätigen die Beobachtungen dieses Experiments eine vermehrte Spontansterblichkeit der Knockout-Tiere, auch nach dem 6. Monat. Eine Hypothese könnte sein, dass Tiere mit einem ausgeprägteren Phänotyp früher sterben. Dies könnte bedeuten, dass zum Zeitpunkt der Beobachtungen im 6. Monat noch ein breiteres Spektrum an Phänotypen vorhanden war, welches sich im Verlauf des Versuchszeitraums stetig verringert hat, so dass zum Zeitpunkt der 12-monatigen Beobachtungen in diesem Experiment nur noch Tiere mit der geringsten Phänotyp-Ausprägung bzw. einer besseren Anpassung an das Fehlen des $Cnr1$ -Gens vorhanden waren. Bislang gibt es jedoch keine Daten, die diese Annahme bestätigen, so dass weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet erforderlich sind.

4.2.3 Die Deletion des CB1 Rezeptors beeinflusst die Spinedynamik

Nach der Identifizierung signifikanter Veränderungen in der Spinedichte sollte untersucht werden, ob auch andere Parameter der Spinedynamik verändert sind. Bei Betrachtung der Anzahl der gewonnenen und verlorenen Spines pro μm Dendrit zeigt sich eine Zunahme dieser dynamischen Spines bei den 6 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Tieren, die mit der Zunahme der Spinedichte in dieser Altersgruppe übereinstimmt. Untersucht man jedoch die Turnover-Ratio als Anzahl der gewonnenen und verlorenen Spines zwischen zwei

Zeitpunkten im Verhältnis zur Gesamtzahl aller Spines zu beiden Zeitpunkten, wird deutlich, dass der erhöhte Turnover dynamischer Spines einfach als Folge der erhöhten Anzahl von Spines pro Dendritenlänge erklärt werden kann. In diesem Zusammenhang kann diskutiert werden, inwieweit das gewählte Zeitintervall zwischen den Imaging-Sitzungen die Turnover-Ergebnisse beeinflusst. In verschiedenen Studien wurden sowohl tägliche Imaging-Sessions als auch Intervalle von 2, 3 oder 4 Tagen verwendet (Davidson et al., 2020; Holtmaat et al., 2008; Huang et al., 2020; Komorowska-Müller et al., 2023; Mostany et al., 2013; Trachtenberg et al., 2002). Während kürzere Intervalle dynamische Veränderungen besser erfassen, ermöglichen längere Abstände eine klare Trennung zwischen Fluktuationen und strukturellen Veränderungen. In diesem Experiment wurde daher bewusst ein Intervall von 3 Tagen gewählt, um ein ausgewogenes Verhältnis zwischen zeitnaher Erfassung der Dynamik und der Unterscheidung signifikanter Veränderungen zu gewährleisten.

Neben den Beobachtungen zum Spine-Turnover wurden auch bemerkenswerte Auffälligkeiten in der Spine-Stabilität festgestellt. Neu gewonnene Spines können entweder stabilisiert werden oder transient sein, d. h. in der nächsten Sitzung wieder verloren gehen. Während es keine signifikanten Unterschiede in der Transienz der Spines zwischen den Altersgruppen gab, zeigten die 3 Monate alten *Cnr1^{-/-}*-Tiere eine signifikant bessere Stabilisierung der neuen Spines im Vergleich zur Kontrollgruppe. Interessanterweise war jedoch die Stabilität aller Spines, die bereits am Tag 0 vorhanden waren, bei den 3 Monate alten Tieren signifikant reduziert. Dieses gegensätzliche Verhalten könnte einerseits darauf hindeuten, dass eine verbesserte Stabilisierung neuer Spines das verminderte Überleben aller Spines auszugleichen versucht. Andererseits wird eine verbesserte Stabilisierung der Spines in der Literatur als Korrelat von Lernen und Gedächtnis angesehen (Xu et al., 2007; Yang et al., 2009). Dies könnte ein Mechanismus sein, der das bessere Lernverhalten junger *Cnr1^{-/-}*-Mäuse erklärt (Albayram et al., 2012).

Diese Interpretation wird durch Studien von Komorowska-Müller et al. (2023) gestützt, die den Einfluss von THC in niedriger Dosis auf die Spinedynamik untersucht haben. In ihren Ergebnissen zeigt sich ein umgekehrtes Muster im Vergleich zu den Befunden dieser Studie bei jüngeren Tieren: Eine Langzeitanwendung von THC führte zu einer erhöhten

Spine-Instabilität bei 3 Monate alten Mäusen, während bei älteren Mäusen eine gesteigerte Spinestabilisierung festgestellt wurde. Dies entspricht der Beobachtung von Bilkei-Gorzo et al. (2017), dass THC in der Lage ist, die kognitiven Funktionen alter Mäuse wiederherzustellen. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der Verlust des CB1-Rezeptors, das gegenteilige Verhalten der Spinedynamik im Vergleich zur Aktivierung des Rezeptors durch THC bewirken kann.

Allerdings ist zu beachten, dass in dieser Arbeit keine Untersuchungen zur Spinemorphologie durchgeführt wurden. Es wäre im Kontext der Spinestabilität junger Tiere interessant gewesen zu wissen, um welche Art von Spine es sich handelt, um Einblicke in die funktionale Bedeutung dieser Veränderungen zu gewinnen. Da derartige Analysen jedoch komplex sind und damit den Rahmen der vorliegenden Studie übersteigen, sind weitere Untersuchungen nötig, um die Veränderungen in der Spinestabilität spezifischer zu charakterisieren. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Spinemorphologie, wie in Kapitel 1.1 erläutert, von einer Vielzahl von Einflussfaktoren geprägt wird, weshalb allein aus dieser Information keine abschließenden Schlüsse auf das Alter der Spines gezogen werden können.

4.2.4 Mechanismus der veränderten Spinedynamik bei Cnr1-Deletion

Basierend auf den bekannten Mechanismen der Interaktion des CB1-Rezeptors mit dem Wiskott-Aldrich Syndrom Proteinfamilie Verprolin-homologes Protein 1 (WAVE1) / SCAR1 Komplex, könnte die Deletion des Cnr1-Gens zu einer gestörten Regulation von Komponenten führen, die für die strukturelle Plastizität über die Aktinpolymerisation verantwortlich sind (Njoo et al., 2015). Da der CB1-Rezeptor an der Signalgebung des WAVE1-Komplexes beteiligt ist, könnte dessen Abwesenheit zu Veränderungen der Aktindynamik und somit der Spinemorphologie führen. Weiterhin ist bekannt, dass der Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) über die Aktivierung des Tropomyosin-Rezeptor-Kinase B (TrkB) an Prozessen der synaptischen Plastizität und Spinestabilisierung beteiligt ist (De Chiara et al., 2010; Huang und Reichardt, 2001; Koleske, 2013; Maison et al., 2009; Zhao et al., 2015; Zhao und Levine, 2014). Während die Expression von BDNF in Wildtypen durch die Gabe von THC erhöht wird (Butovsky et al., 2005), zeigen Cnr1^{-/-}-Mäuse niedrigere BDNF-Spiegel (Aso et al., 2008). Eine

Beeinflussung der BDNF-Spiegel könnte somit die Interaktion zwischen dem CB1-Rezeptor und TrkB stören, was wiederum die Stabilität und Dynamik der Spines beeinflusst. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist notwendig, um die Grundlagen der altersbedingten Veränderungen der Spinedynamik zu verstehen.

4.2.5 Cnr1^{-/-}-Mäuse im Skilled Forelimb Reaching Test

Wie bereits diskutiert, zeigen Cnr1^{-/-}-Mäuse veränderte Spinedynamiken im motorischen Cortex, die mit veränderten Lern- und Gedächtnisfunktionen einhergehen. Im motorischen System wird der Erwerb von neuen motorischen Fähigkeiten durch Übung häufig als motorisches Lernen bezeichnet, während die Aufrechterhaltung zuvor erlernter motorischer Fähigkeiten als motorisches Gedächtnis betrachtet wird (Halsband und Freund, 1993). Motorisches Lernen induziert und erfordert neuronale Plastizität im primären motorischen Cortex, wie durch die Dynamik dendritischer Spines nachgewiesen wurde, die mit motorischer Lernleistung korreliert (Xu et al., 2009; Yang et al., 2009). Es ist möglich, feinmotorische Fähigkeiten bei Mäusen zu trainieren und zu evaluieren. Um einen tieferen Einblick in das Lernverhalten von Cnr1^{-/-}-Mäusen unterschiedlichen Alters zu gewinnen, wurde ein Skilled-Forelimb-Reaching-Test eingesetzt, ein vergleichsweise neues Paradigma, das bislang noch nicht mit Cnr1^{-/-}-Tieren durchgeführt wurde. Obwohl keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen der 3, 6 und 12 Monate alten Tiere gefunden wurden, wurde eine andere bemerkenswerte Beobachtung gemacht: Über die Dauer des Experiments traten bei den Knockout-Tieren wiederholt Krampfanfälle auf. Auffällig war, dass diese vor allem bei den 6 Monate alten Cnr1^{-/-}-Mäusen auftraten, nicht aber bei den 3 Monate alten Knockout-Tieren und auch nicht bei den Wildtyp-Tieren. Es ist bekannt, dass die Deletion des Cnr1-Gens zu einer höheren Suszeptibilität für Krampfanfälle führt (Alger, 2004; Díaz-Alonso et al., 2017; Karlócai et al., 2011; Remmers et al., 2017; Wallace et al., 2003). CB1-Agonisten hingegen weisen antiepileptische Eigenschaften auf (Karler et al., 1974). Neu ist lediglich, dass die Anfälle altersspezifisch auftreten. Das Ausbleiben gehäufte Anfälle im Zusammenhang mit dem Experiment zur Spinedynamik könnte auf die wiederholte Verabreichung des Benzodiazepins Midazolam im Rahmen der 2-Photonen-Mikroskopie zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass diese Substanz antikonvulsive Eigenschaften besitzt und in der Epilepsiebehandlung eingesetzt

wird (Diviney et al., 2015; Lahat et al., 1992; Tong et al., 2022). Angesichts der signifikanten Ergebnisse bezüglich der Spinedynamik von 6 Monate alten $Cnr1^{-/-}$ -Tieren lassen die Beobachtungen in diesem Experiment eine potenzielle kritische Phase im Alterungsprozess von $Cnr1^{-/-}$ -Mäusen vermuten, die weiter erforscht werden sollte.

4.3 Wissenschaftliche Schlussfolgerung

Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, zeigen erstmalig, dass ein Knockout des CB1-Rezeptors einen altersabhängigen Einfluss auf die Spinedynamik hat. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese Ergebnisse besser nachvollziehen zu können. Zukünftige Studien könnten gezielt die zugrundeliegenden neurobiologischen Mechanismen untersuchen, die zu den beobachteten Veränderungen der Spinedynamik führen. Die Analyse neurochemischer Marker könnte dazu beitragen, die komplexen Zusammenhänge zwischen dem CB1-Rezeptor, der Spinedynamik und dem Alterungsprozess besser zu verstehen. Des Weiteren könnten zusätzliche Verhaltensexperimente durchgeführt werden, um die kognitiven Funktionen in verschiedenen Altersgruppen weiter zu charakterisieren und ihre Beziehung zur Spinedynamik zu untersuchen. Insgesamt bietet diese Studie neue und unerwartete Erkenntnisse über Veränderungen der Spinedynamik bei $Cnr1^{-/-}$ -Mäusen im Alterungsprozess und legt somit den Grundstein für weitere Forschungen auf diesem Gebiet.

4.4 Klinische Schlussfolgerung

Die vorliegende Forschung erweitert darüber hinaus das Wissen über die Bedeutung des Endocannabinoidsystems für die neuronale Gesundheit. Die beobachteten Veränderungen der Spinedynamik könnten darauf hindeuten, dass Dysregulationen im ECS zu Beeinträchtigungen der synaptischen Plastizität führen und somit zu neurologischen oder psychiatrischen Störungen beitragen könnten. Diese Erkenntnisse könnten in Zukunft therapeutische Ansätze für Erkrankungen wie Alzheimer, Schizophrenie oder Depression ermöglichen, bei denen synaptische Verbindungen gestört sind. Die gezielte Modulation des ECS mit spezifischen Agonisten und

Antagonisten des CB1-Rezeptors könnte ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien sein. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die komplexen molekularen Mechanismen, die diesen Effekten zugrunde liegen, vollständig zu verstehen und die Wirksamkeit potenzieller Therapien sicherzustellen.

5. Zusammenfassung

Zu verstehen, wie das Gehirn Informationen speichert und sich an eine sich ständig verändernde Umwelt anpasst, ist die zentrale Frage der Neurowissenschaften. Dendritische Spines gelten als Schlüsselstrukturen für synaptische Kommunikation und neuronale Plastizität und sind essenziell für Lern- und Gedächtnisprozesse. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf das Endocannabinoidsystem als komplexes neuromodulatorisches Netzwerk und untersucht die Bedeutung der Spinedynamik im Kontext des Alterungsprozesses. Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, ob ein Verlust des CB1-Rezeptors die Spinedynamik beeinflusst und ob dieser Effekt altersabhängig ist. Dazu wurde mittels longitudinaler in-vivo-Mikroskopie über einen Zeitraum von 9 Tagen, alle drei Tage dasselbe dendritische Segment im Bereich des primär motorischen Cortex aufgenommen. Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass der CB1-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Modulation der Spinedynamik im primär motorischen Cortex spielt. Insbesondere in der Altersgruppe der 6 Monate alten *Cnr1^{-/-}*-Mäuse wurden bemerkenswerte Veränderungen in der Spinedichte festgestellt. Es wurde eine signifikante Zunahme der Spinedichte und der Dichte der dynamischen Spines beobachtet, die bei den 12 Monate alten Knockout-Tieren nicht mehr nachweisbar war. Des Weiteren konnten Unterschiede in der Stabilität der Spines festgestellt werden. Während vorhandene Spines in älteren Knockout-Tieren besser überlebten als in jüngeren Tieren, konnten neu hinzugewonnene Spines in den jüngeren *Cnr1^{-/-}*-Mäusen besser stabilisiert werden als in gleichaltrigen Wildtyp-Tieren. Diese Erkenntnisse können zum Verständnis neurodegenerativer Erkrankungen und altersbedingten kognitiven Beeinträchtigungen beitragen. Die gezielte Modulation des ECS ermöglicht die Beeinflussung der Spinedynamik und eröffnet potenzielle therapeutische Ansatzpunkte, um den kognitiven Abbau im Alter zu verlangsamen. Dies könnte zur Entwicklung von Behandlungsstrategien führen, die das Fortschreiten altersbedingter neurologischer Störungen verringern könnten. Offen bleibt die Frage nach den genauen molekularen und zellulären Mechanismen, über die der CB1-Rezeptor die Spinedynamik beeinflusst. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Signalkaskaden und Regulationsprozesse genauer zu charakterisieren.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur dendritischer Spines.....	9
Abbildung 2: Repräsentative Darstellung der Morphologie verschiedener Spines.....	10
Abbildung 3: Übersicht über die Komponenten des eCBs.....	14
Abbildung 4: Aufbau des NST.....	33
Abbildung 5: Versuchsaufbau.....	38
Abbildung 6: Die Bildqualität der Stacks reduziert sich nach Tag 6 des Experiments.....	42
Abbildung 7: Die Spinedichte der 6 Monate alten Cnr1 ^{-/-} -Mäuse ist erhöht.....	44
Abbildung 8: Cnr1 ^{-/-} -Mäuse zeigen eine veränderte Spinedynamik.....	47
Abbildung 9: Die Dichte dynamischer Spines steigt bei 6 Monate alten Cnr1 ^{-/-} -Mäusen	50
Abbildung 10: Dynamische Spines als Fraktion im Vergleich zwischen Cnr1 ^{-/-} - und Cnr1 ^{+/+} - Mäusen	53
Abbildung 11: Transiente und stabile Spines als Fraktion im Vergleich zwischen Cnr1 ^{-/-} - und Cnr1 ^{+/+} -Mäusen.....	55
Abbildung 12: Spines überleben bei älteren Cnr1 ^{-/-} -Mäusen eher als bei jungen Tieren. Neu hinzugewonnene Spines werden in jungen Cnr1 ^{-/-} -Mäusen eher stabilisiert	57
Abbildung 13: A5 als Beispiel für ein Tier, das in zwei Altersstufen verwendet wurde.....	60
Abbildung 14: Verhaltenstest und Gewichtsveränderung.....	62
Abbildung 15: Reachingversuch.....	64

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	17
Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Puffer für die Perfusionen	18
Tabelle 3: Verwendete Lösungen und Puffer für die Genotypisierungen	19
Tabelle 4: Liste der Bestandslösungen und Hersteller	20
Tabelle 5: Verwendete Arbeitslösungen	21
Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 7: Liste verwendeter Primer	25
Tabelle 8: PCR-Ansatz für Cnr1 ^{-/-} nach Absetzen (links) und nach Perfusion (rechts) ..	26
Tabelle 9: PCR-Programm für Cnr1 ^{-/-}	26
Tabelle 10: Übersicht über die Parameter der Spinedynamik	32
Tabelle 11: Anzahl der Wildtyp-Stacks und -Tiere pro Imaging-Session und Tag des Experiments.....	40
Tabelle 12: Anzahl der Knock-Out-Stacks und -Tiere pro Imaging-Session und Tag des Experiments.....	41

8. Literaturverzeichnis

- Albayram O, Alferink J, Pitsch J, et al. Role of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic neurons in brain aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011; 108: 11256–11261
- Albayram O, Bilkei-Gorzo A, Zimmer A. Loss of CB1 receptors leads to differential age-related changes in reward-driven learning and memory. *Front Aging Neurosci*, 2012; 4: 1–8.
- Alger BE. Endocannabinoids and Their Implications for Epilepsy. *Epilepsy Curr*, 2004; 4: 169–173.
- Aso E, Ozaita A, Valdizán EM, et al. BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. *J Neurochem*, 2008; 105: 565–572.
- Bailey CH, Kandel ER, Harris KM. Structural components of synaptic plasticity and memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015; 7: 1–29.
- Balazs Lendvai, Edward A. Stern, Brian Chen, Karel Svoboda. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature*, 2000; 404: 876–881.
- Beins EC, Beiert T, Jenniches I, et al. Cannabinoid receptor 1 signalling modulates stress susceptibility and microglial responses to chronic social defeat stress. *Transl Psychiatry*, 2021; 11: s41398-021-01283-0
- Berman RF, Murray KD, Arque G, Hunsaker MR, Wenzel HJ. Abnormal dendrite and spine morphology in primary visual cortex in the CGG knock-in mouse model of the fragile X premutation. *Epilepsia*, 2012; 53: 150–160.
- Berry KP, Nedivi E. Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron*, 2017; 96: 43–55.
- Bilkei-Gorzo A. The endocannabinoid system in normal and pathological brain ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012; 367: 3326–3341.
- Bilkei-Gorzo A, Albayram O, Draffehn A, et al. A chronic low dose of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) restores cognitive function in old mice. *Nat Med*, 2017; 23: 782–787.

Bilkei-Gorzo A, Drews E, Albayram Ö, et al. Early onset of aging-like changes is restricted to cognitive abilities and skin structure in *Cnr1*^{-/-} mice. *Neurobiol Aging*, 2012; 33: 200.e11-200.e22.

Bilkei-Gorzo A, Racz I, Valverde O, et al. Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005; 102: 15670–15675.

Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Chem Biol*, 2007; 14: 1347–1356.

Bodor ÁL, Katona I, Nyíri G, et al. Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: Laminar differences and involvement of specific interneuron types. *J Neurosci*, 2005; 25: 6845–6856.

Bourne J, Harris KM. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol*, 2007; 17: 381–386.

Butovsky E, Juknat A, Goncharov I, et al. In vivo up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in specific brain areas by chronic exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *J Neurochem*, 2005; 93: 802–811.

Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, Hashimoto Y. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. *Neuron*, 2012; 76: 70–81.

Chevalleyre V, Takahashi KA, Castillo PE. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*, 2006; 29: 37–76.

De Chiara V, Angelucci F, Rossi S, et al. Brain-derived neurotrophic factor controls cannabinoid CB1 receptor function in the striatum. *J Neurosci*, 2010; 30: 8127–8137.

Chidambaram SB, Rathipriya AG, Bolla SR, et al. Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2019; 92: 161–193.

Chow DK, Groszer M, Pribadi M, et al. Laminar and compartmental regulation of dendritic growth in mature cortex. *Nat Neurosci*, 2009; 12: 116–118.

Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, et al. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; 98: 9371–9376.

- Crowe SE, Ellis-Davies GCR. Longitudinal in vivo two-photon fluorescence imaging. *J Comp Neurol*, 2014; 522: 1708–1727.
- Dailey ME, Smith SJ. The Dynamics of Dendritic Structure in Developing Hippocampal Slices. *J Neurosci*, 1996; 16: 2983–2994.
- Davidson AM, Mejiá-Gómez H, Jacobowitz M, Mostany R. Dendritic Spine Density and Dynamics of Layer 5 Pyramidal Neurons of the Primary Motor Cortex Are Elevated with Aging. *Cereb Cortex*, 2020; 30: 767–777.
- Deacon RMJ. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc*, 2006; 1: 1117–1119.
- Devane W, Hanus L, Breuer A, et al. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science* (1979), 1992; 258: 1946–1949.
- Díaz-Alonso J, De Salas-Quiroga A, Paraíso-Luna J, et al. Loss of Cannabinoid CB1 Receptors Induces Cortical Migration Malformations and Increases Seizure Susceptibility. *Cereb Cortex*, 2017; 27: 5303–5317.
- Diviney M, Reynolds JP, Henshall DC. Comparison of short-term effects of midazolam and lorazepam in the intra-amygdala kainic acid model of status epilepticus in mice. *Epilepsy Behav*, 2015; 51: 191–198.
- Drew PJ, Shih AY, Driscoll JD, et al. Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull. *Nat Methods*, 2010; 7: 981–984.
- Dumitriu D, Hao J, Hara Y, et al. Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *J Neurosci*, 2010; 30: 7507–7515.
- E. G. Gray. Electron Microscopy of Synaptic Contacts on Dendrite Spines of the Cerebral Cortex. *Nature*, 1959; 183: 1592–1593.
- Eilam-Stock T, Serrano P, Frankfurt M, Luine V. Bisphenol-A impairs memory and reduces dendritic spine density in adult male rats. *Behav Neurosci*, 2012; 126: 175–185.
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, et al. Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. *Neuron*, 2000; 28: 41–51.
- Fiala JC, Spacek J, Harris KM. Dendritic Spine Pathology: Cause or Consequence of Neurological Disorders? *Brain Res Rev*, 2002; 39: 29–54.

- Galiègue S, Mary S, Marchand J, et al. Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. *Eur J Biochem*, 1995; 232: 54–61.
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci*, 2002; 5: 446–451.
- Grutzendler J, Kasthuri N, Gan W-B. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, 2002; 420: 810–812.
- Haller J, Bakos N, Szirmay M, Ledent C, Freund TF. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci*, 2002; 16: 1395–1398.
- Halsband U, Freund H-J. Motor learning. *Curr Opin Neurobiol*, 1993; 3: 940–949.
- Harkany T, Keimpema E, Barabás K, Mulder J. Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Mol Cell Endocrinol*, 2008; 286: 10.
- Harris KM, Kater SB. Dendritic Spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci*, 1994; 17: 341–71.
- Hebb D. *The Organization of Behavior: a neuropsychological theory*. John Wiley and Sons, Inc., New York , 1949.
- Heifets BD, Castillo PE. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, 2009; 71: 283–306.
- Hering H, Sheng M. Dendritic Spines: structure, dynamics and regulation. *Nature*, 2001; 2: 880–888.
- Hill MN, Hillard CJ, McEwen BS. Alterations in corticolimbic dendritic morphology and emotional behavior in cannabinoid CB 1 receptor-deficient mice parallel the effects of chronic stress. *Cereb Cortex*, 2011; 21: 2056–2064.
- Hofer SB, Mrsic-Flogel TD, Bonhoeffer T, Hübener M. Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature*, 2009; 457: 313–317.
- Holtmaat A, Bonhoeffer T, Chow DK, et al. Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nat Protoc*, 2009; 4: 1128–1144.

- Holtmaat A, De Paola V, Wilbrecht L, Knott GW. Imaging of experience-dependent structural plasticity in the mouse neocortex in vivo. *Behavioural Brain Research*, 2008; 192: 20–25.
- Holtmaat AJGD, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, et al. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*, 2005; 45: 279–291.
- Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002; 619–631.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 2001; 24: 677–736.
- Huang L, Zhou H, Chen K, Chen X, Yang G. Learning-Dependent Dendritic Spine Plasticity Is Reduced in the Aged Mouse Cortex. *Front Neural Circuits*, 2020; 14:.
- Hutsler JJ, Zhang H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res*, 2010; 1309: 83–94.
- Irwin S, Galvez R, Greenough W. Dendritic Spine Structural Anomalies in Fragile-X Mental Retardation Syndrome. *Cereb Cortex*, 2000; 10: 1038–1044.
- Jirkof P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J Neurosci Methods*, 2014; 234: 139–146.
- Karler R, Cely W, Turkanis SA. Anticonvulsant properties of delta 9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids. *Life Sci*, 1974; 15: 931–947.
- Karlócai MR, Tóth K, Watanabe M, et al. Redistribution of CB1 cannabinoid receptors in the acute and chronic phases of pilocarpine-induced epilepsy. *PLoS One*, 2011; 6: e27196
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*, 2003; 26: 360–368.
- Keck T, Mrsic-Flogel TD, Vaz Afonso M, Eysel UT, Bonhoeffer T, Hübener M. Massive restructuring of neuronal circuits during functional reorganization of adult visual cortex. *Nat Neurosci*, 2008; 11: 1162–1167.
- Keller-Peck CR, Walsh MK, Gan W-B, Feng G, Sanes JR, Lichtman JW. Asynchronous Synapse Elimination in Neonatal Motor Units: Studies Using GFP Transgenic Mice. *Neuron*, 2001; 31: 381–394.

Kim HJ, Cho MH, Shim WH, et al. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Mol Psychiatry*, 2017; 22: 1576–1584.

Knott G, Holtmaat A. Dendritic spine plasticity-Current understanding from in vivo studies. *Brain Res Rev*, 2008; 58: 282–289.

Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, Svoboda K. Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci*, 2006; 9: 1117–1124.

Kohnz RA, Nomura DK. Chemical approaches to therapeutically target the metabolism and signaling of the endocannabinoid 2-AG and eicosanoids. *Chem Soc Rev*, 2014; 43: 6859–6869.

Koleske AJ. Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nat Rev Neurosci*, 2013; 14: 536–550.

Komorowska-Müller JA, Gellner A-K, Ravichandran KA, Bilkei-Gorzo A, Zimmer A, Stein V. Chronic low-dose Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) treatment stabilizes dendritic spines in 18-month-old mice. *Sci Rep*, 2023; 13: s41598-022-27146-2

Kreitzer AC, Regehr WG. Retrograde Inhibition of Presynaptic Calcium Influx by Endogenous Cannabinoids at Excitatory Synapses onto Purkinje Cells. *Neuron*, 2001; 29: 717–727.

Lahat E, Aladjem M, Eshel G, Bistrizter T, Katz Y. Midazolam in Treatment of Epileptic Seizures. *Pediatr Neurol*, 1992; 215–216.

Lang C, Barco A, Zablow L, Kandel ER, Siegelbaum SA, Zakharenko SS. Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; 16665–16670.

Livneh Y, Feinstein N, Klein M, Mizrahi A. Sensory input enhances synaptogenesis of adult-born neurons. *J Neurosci*, 2009; 29: 86–97.

Lu HC, Mackie K. Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*, 2021; 6: 607–615.

Maccarrone M, Bab I, Bíró T, et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci*, 2015; 36: 277–296.

Maison P, Walker DJ, Walsh FS, Williams G, Doherty P. BDNF regulates neuronal sensitivity to endocannabinoids. *Neurosci Lett*, 2009; 467: 90–94.

Marchalant Y, Cerbai F, Brothers HM, Wenk GL. Cannabinoid receptor stimulation is anti-inflammatory and improves memory in old rats. *Neurobiol Aging*, 2008; 29: 1894–1901.

Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl)*, 2002; 159: 379–387.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 1994; 372: 686–691.

Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T, Melck D. Metabolism of Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol: An Historical Overview and Some Recent Developments. *Lipids*, 1999; 34: 319–325.

Di Marzo V, Stella N, Zimmer A. Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nat Rev Neurosci*, 2015; 16: 30–42.

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.

Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 2004; 429: 761–766.

Matus A, Ackermann M, Pehling G, Byerst HR, Fujiwarat K. High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982; 79: 7590–7594.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 1995; 50: 83–90.

Mechoulam R, Parker LA. The endocannabinoid system and the brain. *Annu Rev Psychol*, 2013; 64: 21–47.

Mizrahi A, Katz LC. Dendritic stability in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci*, 2003; 6: 1201–1207.

Monfils MH, VandenBerg PM, Kleim JA, Teskey GC. Long-term Potentiation Induces Expanded Movement Representations and Dendritic Hypertrophy in Layer V of Rat Sensorimotor Neocortex. *Cereb Cortex*, 2004; 14: 586–593.

Mostany R, Anstey JE, Crump KL, Maco B, Knott G, Portera-Cailliau C. Altered synaptic dynamics during normal brain aging. *J Neurosci*, 2013; 33: 4094–4104.

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

Nägerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*, 2004; 44: 759–767.

Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol*, 2002; 64: 313–353.

Njoo C, Agarwal N, Lutz B, Kuner R. The Cannabinoid Receptor CB1 Interacts with the WAVE1 Complex and Plays a Role in Actin Dynamics and Structural Plasticity in Neurons. *PLoS Biol*, 2015; 13: 1–36.

Ohno-Shosaku T, Kano M. Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol*, 2014; 29: 1–8.

Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Mizushima I, Yoneda N, Zimmer A, Kano M. Presynaptic Cannabinoid Sensitivity Is a Major Determinant of Depolarization-Induced Retrograde Suppression at Hippocampal Synapses. *J Neurosci*, 2002; 22: 3864–3872.

Peters A, Kaiserman-Abramof IR. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *J Anat*, 1970; 127: 321–355.

Piyanova A, Lomazzo E, Bindila L, et al. Age-related changes in the endocannabinoid system in the mouse hippocampus. *Mech Ageing Dev*, 2015; 150: 55–64.

Pologruto TA, Sabatini BL, Svoboda K. ScanImage: Flexible software for operating laser scanning microscopes. *Biomed Eng Online*, 2003; 13: 1475-925X-2-13

Qiao H, Li MX, Xu C, Chen H Bin, An SC, Ma XM. Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural Plast*, 2016; 2016: 8056370

- Remmers F, Lange MD, Hamann M, Ruehle S, Pape HC, Lutz B. Addressing sufficiency of the CB1 receptor for endocannabinoid-mediated functions through conditional genetic rescue in forebrain GABAergic neurons. *Brain Struct Funct*, 2017; 222: 3431–3452.
- Romero J, Berrendero F, Garcia-Gil L, et al. Loss of cannabinoid receptor binding and messenger RNA levels and cannabinoid agonist-stimulated [35s]guanylyl-5'-O-(thio)-triphosphate binding in the basal ganglia of aged rats. *Neuroscience*, 1998; 84: 1075–1083.
- Runge K, Cardoso C, de Chevigny A. Dendritic Spine Plasticity: Function and Mechanisms. *Front Synaptic Neurosci*, 2020; 2020: 00036
- Sheng M, Hoogenraad CC. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: A more quantitative view. *Annu Rev Biochem*, 2007; 76: 823–847.
- Sheng M, Kim E. The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011; 3:a005678
- Shih AY, Mateo C, Drew PJ, Tsai PS, Kleinfeld D. A polished and reinforced thinned-skull window for long-term imaging of the mouse brain. *J Vis Exp*, 2012; 2012: 3742
- Shu-Jung Hu S, Mackie K. Distribution of the endocannabinoid system in the central nervous system. *Handbook of Experimental Pharmacology*. pp. 59–93. Springer New York LLC (2015).
- Spacek J, Harris KM. Three-Dimensional Organization of Smooth Endoplasmic Reticulum in Hippocampal CA1 Dendrites and Dendritic Spines of the Immature and Mature Rat. *J Neurosci*, 1996; 190–203.
- Tong X, Zhang Z, Zhu J, et al. A Comparison of Epileptogenic Effect of Status Epilepticus Treated With Diazepam, Midazolam, and Pentobarbital in the Mouse Pilocarpine Model of Epilepsy. *Front Neurol*, 2022; 13: 821917
- Tønnesen J, Katona G, Rózsa B, Nägerl UV. Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nat Neurosci*, 2014; 17: 678–685.
- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, et al. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, 2002; 420: 788–794.

- Valverde O, Karsak M, Zimmer A. Analysis of the Endocannabinoid System by Using CB 1 Cannabinoid Receptor Knockout Mice. *Handb Exp Pharmacol*, 2005; 168: 117–145.
- Wallace MJ, Blair RE, Falenski KW, Martin BR, DeLorenzo RJ. The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003; 307: 129–137.
- Wang L, Liu J, Harvey-White J, Zimmer A, Kunos G. Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age-dependent decline in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; 100: 1393–1398.
- Wilson RI, Nicoll RA. Neuroscience: Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* (1979), 2002; 296: 678–682.
- Winifried Denk, James H. Strickler, Watt W. Webb. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science* (1979), 1990; 248: 73–76.
- Xu HT, Pan F, Yang G, Gan WB. Choice of cranial window type for in vivo imaging affects dendritic spine turnover in the cortex. *Nat Neurosci*, 2007; 10: 549–551.
- Xu T, Yu X, Perlik AJ, et al. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature*, 2009; 462: 915–919.
- Y. Gaoni and R. Mechoulam. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*, 1964; 86: 1646–1647.
- Yang G, Pan F, Gan WB. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*, 2009; 462: 920–924.
- Yang G, Pan F, Parkhurst CN, Grutzendler J, Gan WB. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat Protoc*, 2010; 5: 213–220.
- Young ME, Ohm DT, Dumitriu D, Rapp PR, Morrison JH. Differential effects of aging on dendritic spines in visual cortex and prefrontal cortex of the rhesus monkey. *Neuroscience*, 2014; 274: 33–43.
- Yu X, Zuo Y. Spine plasticity in the motor cortex. *Curr Opin Neurobiol*, 2011; 21: 169–174.
- Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci*, 2014; 17: 400–406.

- Zhao L, Levine ES. BDNF-endocannabinoid interactions at neocortical inhibitory synapses require phospholipase C signaling. *J Neurophysiol*, 2014; 111: 1008–1015.
- Zhao L, Yeh MLW, Levine ES. Role for endogenous BDNF in endocannabinoid-mediated long-term depression at neocortical inhibitory synapses. *eNeuro*, 2015; 2: 00029-14.2015
- Zhou Q, Homma KJ, Poo MM. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 2004; 44: 749–757.
- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96: 5780–5785.
- Ziv NE. Evidence for a Role of Dendritic Filopodia in Synaptogenesis and Spine Formation. *Neuron*, 1996; 17: 91–102.
- Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron*, 2005a; 46: 181–189.
- Zuo Y, Yang G, Kwon E, Gan WB. Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature*, 2005b; 436: 261–265.

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die wissenschaftliche Fragestellung und das Studienkonzept wurden von Prof. Dr. Valentin Stein und Prof. Dr. Andreas Zimmer geplant. Die Feinabstimmung der experimentellen Protokolle erfolgte in enger Absprache mit meinem Betreuer. Nach Einarbeitung durch Dr. Joanna Komorowska-Müller und Dr. Anne-Kathrin Gellner habe ich die folgenden Arbeiten eigenständig durchgeführt: chirurgische Eingriffe/Operationen, Tierversorgung inkl. postoperativer Betreuung, Nestlet-Shredding-Tests, Zwei-Photonen-Mikroskopie (Aufnahme und Datenerhebung).

Die Genotypisierungen wurden von Dorit Glass durchgeführt. Die Perfusionen habe ich gemeinsam mit Dorit Glass durchgeführt. Den Greifversuch (Skilled Forelimb Reaching) habe ich gemeinsam mit Dr. Anne-Kathrin Gellner, Isabell Blameuser, Victoria Schuckel und Dr. Joanna Komorowska-Müller durchgeführt (Training, Testdurchführung und Dokumentation). Die Datenaufbereitung, sowie die statistische Auswertung und Interpretation habe ich eigenständig mit GraphPad Prism vorgenommen (Auswahl der Tests, Signifikanzanalyse, Grafikerstellung). Rückfragen wurden bei Bedarf mit meinem Betreuer geklärt. Zur Grammatik- und Stilprüfung einzelner Textpassagen sowie für Formulierungsvorschläge habe ich ChatGPT und DeepL verwendet. Den dabei generierten Output habe ich stets sorgfältig geprüft, fachlich bewertet und angepasst, bevor ich Textteile in das Manuskript übernommen habe. Eine inhaltliche Generierung von Daten, Resultaten, Auswertungen oder Interpretationen durch KI-Tools fand nicht statt. Ich versichere, dass ich das Manuskript selbstständig (nach fachlicher Anleitung durch Professor Dr. Valentin Stein) verfasst habe. Alle von anderen Personen erbrachten Beiträge sind oben benannt. Es wurden keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet; wörtliche oder sinngemäße Übernahmen sind als solche kenntlich gemacht. Datenerhebung, -verarbeitung und -analyse erfolgten nach bestem Wissen redlich und nachvollziehbar.

10. Danksagung

Zunächst gilt mein größter Dank meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Valentin Stein, der mich in die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens und der experimentellen Forschung eingeführt hat. Ich möchte mich für die jahrelange hervorragende Betreuung während der Versuche und der Abfassung dieser Dissertation bedanken.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an Frau Dr. Anne-Kathrin Gellner und PD Joanna Komorowska-Müller. Sie haben mir nicht nur alles beigebracht, was ich über 2-Photonen-Imaging und Cranial Window Operationen wissen musste, sondern mich auch bei allen anderen Fragen stets unterstützt. Ihre Begeisterung für die Forschung und ihre ständige Bereitschaft, ihr Wissen zu teilen, haben mich tief beeindruckt und motiviert.

Auch all meinen Kolleginnen und Kollegen in der Arbeitsgruppe Stein möchte ich für die großartige Zusammenarbeit und ihre wertvolle Unterstützung danken, insbesondere Isabelle Blameuser und Dorit Glass für ihre unermüdliche technische Hilfe sowie Dr. Michael Döngi für seine Unterstützung bei allem, was das 2-Photonen Mikroskop betraf.

Ich bin dem Bonner Promotionskolleg „NeuroImmunology“ zutiefst dankbar für das Promotionsstipendium und die damit verbundenen Freisemester, die es mir ermöglicht haben, ein Jahr lang meine ganze Aufmerksamkeit auf die Forschung im Labor zu richten.

Ein besonderer Dank gilt außerdem meinem Freund Christopher für seine Geduld, wertvollen Ratschläge und seine Unterstützung während der anstrengenden Phasen dieser Arbeit.

Meiner Cousine Carolin Gnacke möchte ich herzlich für das sorgfältige Korrekturlesen und die Verbesserungsvorschläge danken.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern für ihre liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung. Sie haben mir mein Studium und die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht.