

Untersuchungen zur Auswirkung von adoleszenter chronischer
Cannabinoidbehandlung an einem Mausmodell der
Schizophrenie

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

Julia Yvonne Sonja Scharlau geb. Knüppel
aus Luxemburg (Großherzogtum Luxemburg)

2012

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Zimmer
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Wagner

Tag der Mündlichen Prüfung: 26. April 2012

Aus dem Institut für Molekulare Psychiatrie, Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. A. Zimmer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung.....	8
1.1 <i>Schizophrenie</i>	8
1.1.1 Definition und Begriff.....	8
1.1.2 Symptomatik und Diagnostik.....	9
1.1.3 Epidemiologie	11
1.1.4 Ätiologie.....	11
1.1.5 Pathophysiologie der Schizophrenie	12
1.2 <i>Tiermodelle für schizophrene Störungen</i>	14
1.2.1 Das G72-Mausmodell	15
1.3 <i>Cannabinoide</i>	17
1.3.1 Das endogene Cannabinoidsystem – Rezeptoren	17
1.3.2 Das endogene Cannabinoidsystem – endogene Liganden	18
1.3.3 Einfluss des endogenen Cannabinoidsystems auf die Gehirnentwicklung.....	19
1.3.4 Auswirkungen von Cannabiskonsum.....	20
1.3.4.1 Generelle Auswirkungen.....	20
1.3.4.2 Therapeutische Nutzung von Cannabinoiden in der Medizin.....	22
1.3.5 Cannabinoide und Schizophrenie.....	22
1.4 <i>Ziel der Arbeit</i>	24
2 Material und Methoden.....	26
2.1 <i>Materialien</i>	26
2.1.1 Arbeitsgeräte	26
2.1.2 Verbrauchsmaterial	26
2.1.3 Taqman Assays	27
2.1.4 Chemikalien	27
2.1.5 Enzyme und Antikörper	28
2.1.6 Kits	28
2.1.7 Puffer und Lösungen	28
2.1.8 Computersoftware	29
2.2 <i>Versuchstiere</i>	30
2.2.1 Zucht und Haltung der Mäuse.....	30
2.2.2 Pharmaka.....	30
2.2.3 Gewebeentnahme	31
2.3 <i>Experimentelles Design</i>	31
2.3.1 Untersuchung der akuten Δ^9 -THC Empfindlichkeit	31
2.3.2 Untersuchungen zur chronischen Cannabinoidbehandlung.....	32
2.4 <i>Methoden zur Verhaltensanalyse</i>	33
2.4.1 Tests zur Messung der akuten Cannabinoidwirkung	33
2.4.1.1 Zeitplan der Messung der akuten Cannabinoidwirkung	34
2.4.1.2 Messung der Körpertemperatur.....	34

2.4.1.3	Messung der Spontanaktivität – Offenfeld Versuch	34
2.4.1.4	Ring-Katalepsie-Test.....	34
2.4.1.5	Wärmeplatten-Test.....	35
2.4.2	Verhaltensversuche zur chronischen Cannabinoidbehandlung.....	35
2.4.2.1	Drehstab-Versuch (Rota-rod-Versuch)	35
2.4.2.2	Sozialer Interaktionstest	35
2.4.2.3	O-Labyrinth-Test.....	36
2.4.2.4	Y-Labyrinth-Test.....	36
2.4.2.5	Offenfeld-Versuch.....	37
2.4.2.6	PCP-induzierte Hyperlokomotion.....	37
2.4.2.7	Porsolt-Test (<i>Forced swimming test, behavioural despair test</i>)	38
2.5	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	38
2.5.1	Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien	38
2.5.2	Isolation von RNA aus Gewebepräparaten	39
2.5.3	Messung der Nukleinsäuren-Konzentration.....	39
2.5.4	cDNA-Synthese.....	40
2.5.5	Polymerase-Kettenreaktion	40
2.5.5.1	Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR).....	40
2.5.6	Genotypisierung der Mäuse	42
2.5.6.1	Herstellung einer genspezifischen Sonde.....	42
2.5.6.2	Dot blot-Hybridisierung	43
2.5.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.6	<i>Statistische Methoden</i>	44
3	Ergebnisse	45
3.1	<i>Verhaltensversuche</i>	45
3.1.1	Untersuchung der akuten Δ^9 -THC-Empfindlichkeit.....	45
3.1.1.1	Akute Δ^9 -THC-Empfindlichkeit im Alter von 4 Wochen.....	45
3.1.1.2	Akute Δ^9 -THC-Empfindlichkeit im Alter von 8 Wochen.....	48
3.1.2	Ergebnisse der chronischen Cannabinoidbehandlung.....	51
3.1.2.1	Beeinflussung des Körpergewichts durch chronische Cannabinoidbehandlung.....	51
3.1.2.2	Drehstab-Versuch (Rota-rod-Versuch)	53
3.1.2.3	Sozialer Interaktionstest	55
3.1.2.4	Beeinflussung des Angstverhaltens im O-Labyrinth-Versuch.....	58
3.1.2.5	Y-Labyrinth-Versuch	60
3.1.2.6	Lokomotorisches Verhalten im Offenfeld	63
3.1.2.7	PCP-induzierte Hyperlokomotion.....	66
3.1.2.8	Porsolt-Test (<i>Forced swimming test, behavioural despair test</i>)	68
3.1.3	Expressionsanalyse der Hauptbestandteile des Endocannabinoidsystems	69
3.1.3.1	Expression im Cortex	70
3.1.3.2	Expression im Cerebellum	72
3.1.3.3	Expression im Hippocampus	75
4	Diskussion	78
4.1	<i>Verhaltensanalyse</i>	78
4.1.1	Akute Δ^9 -THC-Empfindlichkeit	78
4.1.2	Chronische Cannabinoidbehandlung	79

4.1.2.1	Beeinflussung des Körpergewichts durch chronische Cannabinoidbehandlung	79
4.1.2.2	Drehstab-Versuch (Rota-rod-Versuch)	80
4.1.2.3	Sozialer Interaktionstest	80
4.1.2.4	Beeinflussung des Angstverhaltens im O-Labyrinth-Versuch.....	81
4.1.2.5	Kognitive Defizite im Y-Labyrinth-Versuch	83
4.1.2.6	Lokomotorisches Verhalten im Offenfeld	84
4.1.2.7	PCP-induzierte Hyperlokomotion.....	85
4.1.2.8	Porsolt-Test (<i>Forced swimming test, behavioral despair test</i>)	86
4.1.2.9	Verhaltensanalyse der weiblichen Tiere	87
4.2	<i>Expressionsanalyse der Hauptbestandteile des Endocannabinoidsystems</i>	88
5	Zusammenfassung	90
6	Literaturverzeichnis	92
7	Danksagung	102

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ANOVA	<i>analysis of variance</i> / Varianzanalyse
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCP	1-Bromo-3-chloro-propan
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CB	Cannabinoid
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
cDNA	komplementäre DNA (copy DNA)
Cnr	Gen des entsprechenden Cannabinoidrezeptors
CT-Wert	Detektionsschwellenwert, <i>threshold cycle</i>
DAO	D-Aminosäureoxidase
DAGL	Diacylglycerollipase
DAT	Dopamintransporter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAAH	<i>fatty acid amide hydrolase</i>
G	Guanin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasen
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KO	<i>Knockout</i>
M	Molarität, mol pro Liter

Mgl	Monoglyceridlipase
mg	Milligramm
mRNA	Botennukleinsäure
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCP	Phencyclidin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pd	<i>postnatal day</i> , Tag nach der Geburt
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSC	<i>standard saline citrate</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR
UV	ultraviolett
V	Volt
Veh	Vehikel
WT	Wildtyp
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol

1 Einleitung

1.1 Schizophrenie

1.1.1 Definition und Begriff

Ende des 19. Jahrhunderts fasste Emil Kraepelin mehrere bis dahin eigenständig betrachtete psychiatrische Krankheitsbilder unter dem Begriff der *Dementia praecox* zusammen. Diesen Begriff wählte er in Anlehnung an den im Vergleich zur Altersdemenz untypisch frühen Krankheitsbeginn (*praecox*) und den chronisch verlaufenden kognitiven Verfall (*dementia*).

Eugen Bleuler erkannte Anfang des 20. Jahrhunderts gemeinsame Grundsymptome bei allen Formen der Kraepelinschen *Dementia praecox*, aus denen er dann akzessorische Symptome psychodynamisch ableitete (Tab. 1). Eugen Bleuler stellte fest, dass weder eine Demenz im üblichen Sinne eintritt, noch ein früher Beginn der Erkrankung zwingend ist und prägte stattdessen den heute gebräuchlichen Begriff der Schizophrenie. Der Begriff setzt sich aus dem griechischen „schizo“ (spalten, gespalten) und „phren“ (Geist, Bewusstsein) zusammen und weist auf die Spaltung, die innere Zerrissenheit, der psychischen Basisleistungen, Denken, Fühlen und Handeln, als Charakteristikum der Schizophrenie hin.

Grundsymptome	Akzessorische Symptome
Assoziationsstörungen (Störungen des Gedankengangs, Zerfahrenheit)	Wahn
Störungen der Affektivität (Affektverflachung, Parathymie)	Halluzinationen
Ambivalenz (Denken, Fühlen, Handeln)	Andere, nicht zu den Grundsymptomen gehörende Symptome (z.B. katatone Symptome)
Autismus (Loslösung von der Wirklichkeit)	
Störungen der Person (Depersonalisation)	

Tab. 1. Grundsymptome und akzessorische Symptome der Schizophrenie, modifiziert nach E. Bleuler

Die Grundsymptome nach Bleuler stellen charakteristische und häufige Symptome der Schizophrenie dar, erlauben aber im Gegensatz zu den akzessorischen Symptomen keine Diagnosestellung. Von wesentlicher Bedeutung für eine engere Definition der Schizophrenie war daher die Zusammenstellung von so genannten Symptomen ersten und zweiten Ranges durch Kurt Schneider (Tab. 2).

	Symptom 1. Ranges	Symptom 2. Ranges
Akustische Halluzinationen	Dialogisierende Stimmen Kommentierende Stimmen Gedankenlautwerden	Sonstige akustische Halluzinationen
Leibeshalluzinationen	Leibliche Beeinflussungserlebnisse	Zönasthesien
Halluzinationen auf anderen Sinnesgebieten		Optische, olfaktorische, gustatorische Halluzinationen
Ich-Störungen	Gedankeneingebung Gedankenentzug Gedankenausbreitung Willensbeeinflussung	
Wahn	Wahnwahrnehmung	Wahneinfall, Wahngedanke

Tab. 2. Symptome ersten und zweiten Ranges der Schizophrenie nach K. Schneider

Der heutige Schizophreniebegriff stellt eine Mischung aus den verschiedenen Charakteristika dar. So wurde von Kraepelin übernommen, dass es sich bei der Schizophrenie um eine eher chronische Krankheit handelt, die von affektiven Störungen abgegrenzt werden muss. Die Bedeutung der Grundsymptome wurden von E. Bleuler und die für eine sichere Diagnosestellung erforderlichen Symptome ersten Ranges von K. Schneider übernommen.

1.1.2 Symptomatik und Diagnostik

Schizophrenien können alle psychischen Funktionen verändern; sie zeigen sich im Erscheinungsbild und im Verlauf so vielgestaltig, dass eine allgemeine Definition unmöglich ist (Ebert D, 2005). Gekennzeichnet ist die Schizophrenie durch ein charakteristisches Störungsmuster verschiedener psychischer Bereiche wie Wahrnehmung, Denken, Ich-Funktionen, Affektivität, Antrieb und Psychomotorik.

Die geläufigste Unterteilung der Schizophrenie-Symptomatik erfolgt in Positiv- und Negativsymptome. Positivsymptome sind klassischerweise definiert als Verhaltensweisen, die bei klinisch gesunden Menschen nicht vorhanden sind, aber als Resultat des Krankheitsverlaufs erscheinen. Negativsymptome sind Charakterzüge oder Verhaltensweisen, die normalerweise vorhanden sind, aber durch die Erkrankung reduziert werden oder vollständig abhanden kommen (Ellenbroek und Cools, 2000).

Zu der Positivsymptomatik zählen Wahn, Halluzinationen und Störungen des Ich-Erlebens, also die Symptome ersten und zweiten Ranges nach K. Schneider. Die Negativsymptomatik der Schizophrenie ist nahezu gleichzusetzen mit den von Bleuler definierten Grundsymptomen.

Hierzu gehören Affektverflachung, Alogie, Apathie, Anhedonie, sozialer Rückzug und Aufmerksamkeitsstörungen.

Die klinische Diagnose der Schizophrenie erfolgt heute meist nach einem der gängigen Diagnosemanuale ICD-10 (*international classification of diseases*, World Health Organisation, 2006), welches in der medizinischen Versorgung in Deutschland verbindlich ist, oder DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder*, American Psychiatric Association, 2007). Die diagnostische Leitlinie der Schizophrenie nach ICD-10 zeigt Tabelle 3:

Mindestens ein eindeutiges Symptom (oder zwei, wenn weniger eindeutig) der Gruppe A:	
A	<ul style="list-style-type: none"> - Gedankenlautwerden, Gedankeneingebung, Gedankenentzug, Gedankenausbreitung - Kontrollwahn, Beeinflussungswahn, Gefühl des Gemachten, deutlich bezogen auf Körper- oder Gliederbewegungen oder bestimmte Gedanken, Tätigkeiten oder Empfindungen; Wahnwahrnehmungen - Kommentierende oder dialogische Stimmen - Anhaltender, kulturell unangemessener und völlig unrealistischer Wahn
Oder mindestens zwei Symptome der Gruppe B:	
B	<ul style="list-style-type: none"> - anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität, täglich über Wochen und Monate begleitet von Wahngedanken ohne deutliche affektive Beteiligung - Zerfahrenheit oder Danebenreden (Neologismen, Gedankenabreißen...) - Negativsymptome wie auffällige Apathie, Sprachverarmung, Affektverarmung-, Affektverflachung oder inadäquate Affekte
C	Die Symptome sollen mindestens für 4 Wochen die meiste Zeit bestehen, ansonsten Diagnose einer schizophreniformen Störung
D	Die Symptome können durch keine organische Störung erklärt werden.

Tab. 3. Diagnostische Leitlinien der Schizophrenie, modifiziert nach ICD-10 (Ebert D, Psychiatrie systematisch 6.Auflage, Bremen: UNI-MED, 2005)

Die Fülle der klinischen Symptome legt nahe, dass die Schizophrenie keine homogene Erkrankung darstellt und in verschiedene Subtypen aufgeteilt werden kann. Die Einteilung ist abhängig davon, in welcher Kombination die einzelnen Symptome auftreten und im Verlauf kann es - wenn auch eher selten - zu einem Übergang in einen anderen Typ kommen.

ICD-10 (F20.0-F20.9)	DSM-IV (295.00-295.90)
Paranoide Schizophrenie	Desorganisierter Typus
Hebephrene Schizophrenie	Katatoner Typus
Katatone Schizophrenie	Paranoider Typus
Undifferenzierte Schizophrenie	(Schizophreniforme Störung)
Postschizophrene Depression	Residualer Typus
Schizophreses Residuum	(Schizoaffektive Störung)
Schizophrenia simplex	Undifferenzierter Typus
Sonstige Schizophrenie	
Schizophrenie, nicht näher bezeichnet	

Tab. 4. Subtypen der Schizophrenie nach ICD-10 und DSM-IV

1.1.3 Epidemiologie

Aus den Diagnosekriterien wird klar, dass es sich bei der Schizophrenie um eine Erkrankung handelt, die in Abwesenheit von einem pathognomonischen Symptom und mit den Schwierigkeiten ein vollständig glaubwürdiges Patientenprofil zu konstruieren, äußerst kompliziert zu diagnostizieren ist (Eaton et al., 2007). Zusätzlich ist es problematisch, Fälle (z.B. Personen mit prodromalen Symptomen) auch als solche einzustufen oder sie allgemein identifizieren zu können.

Diese Schwierigkeiten haben dazu beigetragen, dass es große Variationen in den Schätzungen zur Epidemiologie der Schizophrenie gibt. Im Durchschnitt wird die jährliche Inzidenz der Schizophrenie mit 15 Fällen pro 100000 Individuen angegeben. Die Punktprävalenz beträgt 4,5 pro 1000 Einwohner, während das Risiko in seinem Leben an Schizophrenie zu erkranken im Mittel 0,7% beträgt (Saha et al., 2005).

Für lange Zeit wurde angenommen, dass das Erkrankungsrisiko für Männer und Frauen etwa gleich hoch ist. Neuere Studien gehen jedoch von einem 1,4fach erhöhten Erkrankungsrisiko für Männer aus (Aleman et al., 2003; McGrath et al., 2004). Ebenso zeigen Männer einen deutlich früheren Erkrankungsbeginn (15-25, mittleres Erkrankungsalter 22 Jahre) als Frauen (25-35, mittleres Erkrankungsalter 26).

1.1.4 Ätiologie

Lange Zeit wurde nach der einen entscheidenden Ursache für schizophrene Erkrankungen gesucht. Heutige Publikationen teilen dagegen die Auffassung, dass es diese eine Ursache der

Erkrankung nicht gibt, sondern mehrere, teilweise voneinander unabhängige Faktoren an der Entstehung der Schizophrenie beteiligt sind.

Zwillings-, Familien- und Adoptionsstudien haben gezeigt, dass die Schizophrenie eine starke genetische Komponente hat. Obwohl zwei Drittel der Erkrankungsfälle sporadisch auftreten (Tandon et al., 2008), wird das Erkrankungsrisiko durch ein betroffenes Familienmitglied deutlich erhöht, wobei die Morbiditätsrate für schizophrene Störungen mit dem genetischen Verwandtschaftsgrad zu einer bereits erkrankten Person steigt. Zwillingsstudien führten zu dem Ergebnis, dass die Konkordanzrate monozygoter Zwillinge bei lediglich 50%-70% liegt (Gottesman et al., 1987; Sullivan et al., 2003). Diese Beobachtung und die Tatsache, dass bisher kein einzelnes Gen als Ursache identifiziert werden konnte, sprechen für eine Verursachung durch verschiedene genetische Faktoren und Gen-Umwelt-Interaktionen.

Die hohe Vererbbarkeit von bis zu 70% ist dementsprechend nicht nur bedingt durch genetische Einflüsse, sondern wahrscheinlich auch durch epigenetische Faktoren beeinflusst (van Os und Kapur, 2009). Metaanalysen zeigen beispielsweise, dass ein väterliches Alter von über 40 Jahren mit einem höheren Erkrankungsrisiko assoziiert ist (Wohl und Gorwood, 2007). Über die letzten Jahre wurden verschiedenen Umweltfaktoren identifiziert, die das relative Erkrankungsrisiko erhöhen. Hierzu zählen beispielsweise Urbanität (zwei bis dreifach erhöhtes Risiko, (Pedersen und Mortensen, 2001), Migration (zwei bis dreifach erhöhtes Risiko, (Cantor-Graae und Selten, 2005), Geburt in den Wintermonaten (1,1faches Risiko, (Davies et al., 2003), aber auch Cannabiskonsum (zweifaches Risiko, (Moore et al., 2007).

Von großer Bedeutung für die Ätiologie der Schizophrenie ist das Vulnerabilitäts-Stress-Modell („*two-hit*“-Hypothese), welches von Zubin und Spring 1977 eingeführt und von Nüchterlein und Dawson später weiterentwickelt wurde (Nuechterlein und Dawson, 1984; Zubin und Spring, 1977). Die „*two-hit*“-Hypothese geht davon aus, dass frühe prä- oder perinatale Störungen des Entwicklungsprozesses („*first-hit*“) als Risikofaktoren agieren und somit in Konsequenzen resultieren, die reifende Neurone oder Schaltkreise vulnerabel für später folgende zusätzliche pathologische Faktoren („*second-hit*“) hinterlassen, die dann letztlich zum Ausbruch der Krankheit führen (Maynard et al., 2001).

1.1.5 Pathophysiologie der Schizophrenie

Die neurochemische Suche nach der Ursache für schizophrene Symptome wurde vor allem durch zwei Hypothesen dominiert: Die Dopamin- und die Glutamathypothese.

Die **Dopaminhypothese** ist die einflussreichste und am längsten bestehende Hypothese zur neurochemischen Ursache der Schizophrenie (Kapur und Mamo, 2003). Ihren Ursprung hat diese Theorie in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts mit der Entdeckung, dass die D2-Rezeptor-Blockade aller bisher bekannten antipsychotisch wirksamen Substanzen mit der klinischen Potenz dieser Medikamente korrelierte (Seeman und Lee, 1975). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass Schizophrenie durch hyperdopaminerge Zustände bedingt sei (Toda und Abi-Dargham, 2007). Auch neuere antipsychotisch wirksame Substanzen, die so genannten Atypika, entfalten einen Teil ihrer Wirkung über D2-Rezeptoren. Zudem konnten mit Schizophrenie assoziierte psychotische Symptome mit Amphetamin, einer Droge, die zu erhöhter Dopaminfreisetzung im Gehirn führt, reproduziert werden. Weitere Unterstützung erhielt die Dopaminhypothese durch Bildgebungstudien, in denen festgestellt wurde, dass eine Überstimulation der D2-Rezeptoren für positive Symptome verantwortlich ist, während eine D1-Rezeptor-Unterfunktion zu überwiegend negativer Symptomatik führt. Messungen der Dopaminlevel zeigten indes, dass wahrscheinlich ein Ungleichgewicht im Dopaminsystem zu den verschiedenen Ausprägungen der Symptome führt. So wurde nachgewiesen, dass in Patienten mit überwiegend positiver Symptomatik, die Dopaminlevel erhöht, während sie in Patienten mit vorrangig negativer Symptomatik erniedrigt waren (Siever und Davis, 2004).

Da typische Antipsychotika fast ausschließlich auf die Positivsymptomatik der Schizophrenie eine Wirkung erzielen und kaum Effekte auf die Negativsymptomatik entfalten, wurde der Einfluss eines weiteren Neurotransmittersystems in Betracht gezogen. Versuche mit den NMDA-Rezeptorantagonisten Ketamin und Phencyclidin zeigten, dass diese Substanzen zu positiven und negativen Symptomen führen, die mit Schizophrenie assoziiert sind. Diese Erkenntnis führte zu der **Glutamathypothese** der Schizophrenie. In Schizophreniepatienten konnte eine Erniedrigung der Glutamatspiegel festgestellt werden. Auch Nachweise von erhöhten N-Acetylapartylglutamat- und Kynurenatspiegeln in schizophrenen Patienten, welche *in vivo* die NMDA-Rezeptorfunktion reduzieren oder antagonisieren, unterstützen diese Hypothese (Krystal et al., 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit D-Serin und Glycin, beide positive Regulatoren des NMDA-Rezeptors, die Effizienz von verschiedenen Neuroleptika erhöhten (Coyle et al., 2003; Goff und Coyle, 2001).

Eine mögliche Verbindung zwischen den beiden Neurotransmittersystemen in der Genese der Schizophrenie stellt die **NMDA-Rezeptorhypofunktionshypothese** dar. Diese Hypothese geht davon aus, dass genetische Varianten zu einer Dysregulation von verschiedenen Proteinen führen,

die eine wichtige Rolle für die Funktionalität des NMDA-Rezeptors spielen. Die daraus resultierende Hypofunktion führt durch die Reduktion der GABA-Freisetzung zu einer fehlenden Inhibition der mesolimbischen Dopaminfreisetzung. Durch die erhöhten Dopaminspiegel kommt es dann zu Ausbildung der Positivsymptomatik. Andererseits führt die reduzierte Stimulation der mesocorticalen Dopaminfreisetzung zu negativen Symptomen und kognitiven Defiziten (Dawe et al., 2009).

Diese pharmakologischen Hypothesen stellen immer noch wichtige Konzepte in der experimentellen Schizophrenieforschung dar. Das pharmakologische Wirkprofil der oft wirkungsvolleren, atypischen Neuroleptika, welche ihre Wirkung auch über serotonerge, acetylcholinerge und noradrenerge Rezeptoren entfalten, deutet allerdings auf Fehlfunktionen von mehr als den zwei thematisierten Neurotransmittersystemen hin.

1.2 Tiermodelle für schizophrene Störungen

Ein Mausmodell für schizophrene Erkrankungen zu modellieren, gestaltet sich aus verschiedenen Aspekten heraus schwierig. Zum einen ist es nicht einfach die komplexe, weitgehend noch unverstandene Ätiologie aus genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen in ein Tiermodell zu übertragen, zum anderen sind für die Schizophrenie charakteristische Symptome wie Wahn und Halluzinationen in Tieren nicht direkt festzustellen (Ellenbroek und Cools, 2000). In Tiermodellen wird von daher Hyperaktivität, erhöhte lokomotorische Aktivität und stereotypes Verhalten als Positivsymptomatik gewertet, während sozialer Rückzug einen Hinweis auf negative Symptome geben soll (Dawe et al., 2009).

In den letzten Jahren wurden, neben den schon länger bestehenden pharmakologischen Ansätzen, einige Tiermodelle entwickelt, die zumindest Teilaspekte der Schizophrenie modellieren. Wichtige Angriffspunkte stellten die Neurotransmittersysteme für Dopamin und Glutamat dar.

Ein frühes Modell für Schizophrenie stellt die **DAT-Knockout Maus** dar (Giros et al., 1996). DAT (Dopamintransporter) ist essentiell für die Wiederaufnahme von 70-80% des Dopamins, das von den Nervenendigungen freigesetzt wird. DAT-KO Mäuse haben demzufolge stark erhöhte extrazelluläre Dopaminlevel. *DAT-Knockout* Mäuse zeigen einige Schizophrenie-relevante Verhaltensauffälligkeiten, wie z.B. erhöhte Reaktionen in einer neuen Umgebung, Verhaltensstereotypen und Defizite der Präpulsinhibition (Ralph et al., 2001).

Andere Ein-Gen-Mausmodelle basieren auf Veränderungen oder *Knockout* der NMDA-Rezeptoren. Der NMDA-Rezeptor besteht aus mehreren Untereinheiten, der NR₁-Untereinheit

und aus 4 NR₂-Untereinheiten (NR_{2A}-NR_{2D}). So weisen beispielsweise **NR₁-Knockdown Mäuse** hyperaktives Verhalten und Beeinträchtigungen des Sozialverhaltens auf, **NR_{2A}-Knockout Mäuse** zeigen ebenfalls eine erhöhte lokomotorische Aktivität in einer neuen Umgebung (Miyamoto et al., 2001) ohne Beeinflussung der Präpulsinhibition (Takeuchi et al., 2001).

Zusätzlich zu den das Glutamat- und Dopaminsystem beeinflussenden Mutationen wurden viele andere genetische Mutationen mit potentieller Schizophrenierelevanz entdeckt und in transgenen Mausmodellen getestet.

Schizophrenie-verwandte Veränderungen in Tieren konnten ebenfalls durch Modellieren von **Umwelteinflüssen** hervorgerufen werden. So erhöhen z.B. postnatale Hippocampusläsionen, frühe maternale Deprivation und isolierte Haltung die Sensitivität auf dopaminerge Pharmaka und führen zu einem Defizit der Präpulsinhibition (Ellenbroek und Cools, 2000).

Da Schizophrenie aus einer Interaktion von Umwelteinflüssen mit genetischen Faktoren resultiert, wurde auch in Tiermodellen vermehrt versucht diese Situation zu modellieren. So wurden beispielsweise an Rattenstämmen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund die Effekte früher hippocampaler Schädigungen untersucht (Lipska und Weinberger, 1995). Die gleichen Schädigungen führten dabei in drei verschiedenen Rattenstämmen zu völlig anderen Resultaten. Sehr interessante Ergebnisse erzielten auch Schneider und Koch 2005, die im Rahmen des Vulnerabilitäts-Stress Modells die Effekte von chronischer pubertärer Cannabinoidbehandlung auf Ratten mit neonataler corticaler Läsion untersuchten und dabei additive negative Effekte auf soziale Leistungen feststellten (Schneider und Koch, 2005).

1.2.1 Das G72-Mausmodell

In genetischen Studien wurden über 780 Kandidatengene identifiziert, die möglicherweise eine Rolle in der Pathophysiologie der Schizophrenie spielen. Ein seit 2002 immer wieder genanntes Gen ist G72, welches sowohl mit der Schizophrenie als auch mit bipolar affektiven Störungen assoziiert ist (Abou Jamra et al., 2006).

In 24 von 35 Studien wurde eine Assoziation von Mutationen im G72/G30 Gen mit der Schizophrenie gefunden (Allen et al., 2008). G72 und G30 sind überlappende Gene, die von gegenüberliegenden DNA-Strängen auf Chromosom 13q33 transkribiert werden. Allerdings wird nur G72 aktiv translatiert. G72 ist erst spät in der Evolution entstanden und nur im Genom anthropoider Primaten enthalten (Chumakov et al., 2002). Es kodiert für ein Protein, dessen Funktion bisher noch unverstanden ist.

Für G72 wurden verschiedene Splicing-Varianten beschrieben, von welchen vor allem die längste LG72, bisher weiter untersucht wurde. Eine mögliche Hypothese bezüglich der Funktion von G72 ist, dass speziell LG72, für ein mitochondriales Protein kodiert, welches zu einer Fragmentierung der Mitochondrien führt, ohne dabei selbst Apoptose zu induzieren. G72 scheint die Morphologie des Mitochondriennetzwerkes zu verändern und damit indirekt wesentliche mitochondriale Funktionen wie die oxidative Phosphorylierung, die Regulation der Apoptose und des mitochondrialen Transports zu beeinflussen (Kvajo et al., 2008). Neuere Studien gehen davon aus, dass mitochondrialen Dysfunktionen eine Rolle in der Pathogenese der Schizophrenie zukommen könnten (Clay et al., 2010).

Eine weitere Hypothese der G72-Funktion basiert darauf, dass in *Yeast two-hybrid* und biochemischen Experimenten beobachtet werden konnte, dass LG72 die D-Aminosäureoxidase (DAO) bindet. Zumindest *in vitro* konnte eine Aktivierung der DAO durch LG72 nachgewiesen werden (Chumakov et al., 2002; Sacchi et al., 2008). Das Enzym DAO kann D-Aminosäuren, wie beispielsweise D-Serin, oxidieren. D-Serin ist ein endogener Agonist an der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors (Mothet et al., 2000). Somit könnte eine Überproduktion von G72 zu einer Reduktion der NMDA-Rezeptoraktivität führen, welches die jeweiligen Individuen dann im Rahmen der NMDA-Rezeptorhypofunktionshypothese für das Auftreten von schizophrenen Störungen prädisponieren würde. Unterstützt wird diese These durch eine Studie, die eine erhöhte Aktivität der DAO im Cortex schizophrener Patienten nachweisen konnte (Madeira et al., 2008).

Zur funktionellen *in vivo* Untersuchung von G72 wurden in unserem Labor transgene Mäuse generiert. Der humane G72-Locus wurde mittels BAC-Klon, der die humane Gen-Region auf Chromosom 13q33.2 enthält, in CD1 Mäuse eingebracht. Die transgenen Tiere weisen sowohl Expression von G72-Splicevarianten als auch die anderer benachbarter Gene des BAC-Klons auf, so dass alle notwendigen regulatorischen Elemente enthalten sind. Starke G72- Expressionen wurden im Cerebellum, im Hippocampus, Cortex und im Bulbus olfactorius der Tiere festgestellt. G72/G30-transgene Tiere zeigen einen interessanten für die Symptomatik der Schizophrenie relevanten Phänotyp. Dazu gehören Defizite in kognitiven Leistungen, der Motorkoordination, der Diskriminierung olfaktorischer Signale sowie erhöhtes kompulsives Verhalten. Defizite in der Präpulsinhibition sind durch Haloperidol reversibel. Die G72-Mäuse zeigen zudem eine erhöhte Sensitivität gegenüber Phencyclidin, einem NMDA-Rezeptor Antagonisten, der in Menschen die Positivsymptomatik einer Schizophrenie hervorrufen kann (Otte et al., 2009).

1.3 Cannabinoide

Cannabis sativa gehört wegen seiner euphorisierenden und relaxierenden Wirkung zu den ältesten Rauschmitteln der Welt, die Nutzung der Hanfpflanze und ihrer Produkte zu medizinischen und religiösen Zwecken hat eine jahrtausendlange Geschichte. Die beiden Hanfprodukte – Marijuana und Haschisch – sind auch heute noch die am häufigsten konsumierten illegalen Rauschmittel weltweit. Der aktuelle Epidemiologische Suchtsurvey geht davon aus, dass in Deutschland 600000 Personen zwischen 18 und 64 Cannabis entweder missbrauchen (63%) oder sogar davon abhängig sind (37%).

Marijuana besteht aus den getrockneten weiblichen Blütenständen der Hanfpflanze und ist psychoaktiv weniger wirksam als das aus dem Pflanzenharz gewonnene Haschisch oder Haschischöl.

Die wichtigsten Wirkstoffe der Hanfpflanze sind die Cannabinoide, von denen inzwischen mehr als 70 bekannt sind. Das wichtigste psychoaktive Cannabinoid stellt das Δ^9 -THC dar, welches im Jahr 1965 erstmalig isoliert werden konnte (Mechoulam und Gaoni, 1965).

1.3.1 Das endogene Cannabinoidsystem – Rezeptoren

Nach der Entdeckung von Δ^9 -THC dauerte es einige Jahre bis nachgewiesen wurde, dass Cannabinoide ihre Wirkung über eigene Rezeptoren entfalten. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde angenommen, dass die hydrophoben Cannabinoide ihre Wirkung über unspezifische Membranwechselwirkungen hervorrufen. Im Jahre 1988 gelang es Devane et al. durch Radioligand-Bindungsstudien mit dem tritiummarkierten, synthetischen Cannabinoid CP-55,940 eine spezifische Bindungsstelle für Cannabinoide im Gehirn der Ratte nachzuweisen (Devane et al., 1988). Zwei Jahre später konnte durch Matsuda et al. die cDNA des CB1-Rezeptors kloniert werden (Matsuda et al., 1990). Die Charakterisierung des CB2-Rezeptors folgte im Jahr 1993 (Munro et al., 1993). Die Existenz eines dritten Cannabinoidrezeptors, des CB3-Rezeptors, wird weiter diskutiert.

Beide Cannabinoidrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Der CB1-Rezeptor befindet sich zumeist auf präsynaptischen Neuronen und stellt den häufigsten G-Protein-gekoppelten Rezeptor im ZNS dar. Die höchsten Rezeptordichten finden sich in den Basalganglien, dem Cerebellum, dem Hippocampus, der Amygdala und im Cortex (Herkenham et al., 1990), aber auch im peripheren Nervensystem und in vielen peripheren Organen lässt sich der CB1-Rezeptor

nachweisen. Der CB2-Rezeptor dagegen ist vor allem auf Zellen des Immunsystems vertreten (Pertwee, 1997).

1.3.2 Das endogene Cannabinoidsystem – endogene Liganden

Mit der Identifikation des CB1-Rezeptors begann die Suche nach natürlichen Liganden. Bereits 1992 konnte von Devane et al. in Schweinegehirnen eine Substanz nachgewiesen werden, die sich von der chemischen Struktur der aus *Cannabis sativa* extrahierten Cannabinoide unterschied (Devane et al., 1992). Das erste identifizierte Endocannabinoid, das Arachidonsäure-Derivat Arachidonylolethanolamide, wurde als Anandamid bezeichnet. „Ananda“ stammt aus dem Sanskrit und bedeutet grenzenlose Glückseligkeit und ungetrübte Freude.

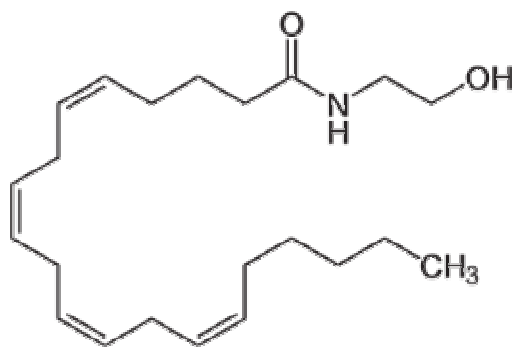


Abb. 1. Strukturformel von Anandamid

Inzwischen wurden weitere Substanzen identifiziert, die an CB-Rezeptoren binden. Ein weiteres wichtiges Endocannabinoid, 2-Arachidonoylglycerol (2-AG), wurde 1995 entdeckt (Mechoulam et al., 1995).

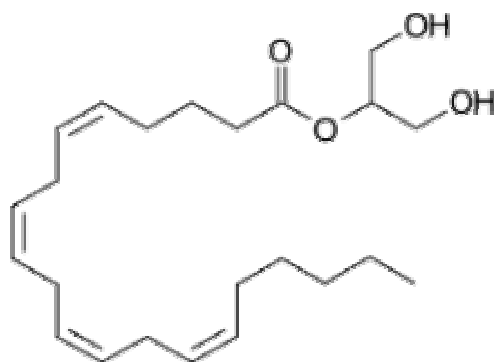


Abb. 2. Strukturformel von 2-AG

Alle bisher identifizierten Endocannabinoide sind Derivate (Amide, Ester oder Ether) von langkettigen, vielfach ungesättigten Fettsäuren, im Speziellen der Arachidonsäure, und zeigen unterschiedliche Selektivität für die beiden Cannabinoidrezeptoren (McAllister und Glass, 2002). Wegen ihrer lipophilen Struktur befinden sich Endocannabinoide nicht in den synaptischen Vesikeln, sondern werden nach Membrandepolarisation und einer Erhöhung der intrazellulären Calciumlevel synthetisiert. Nach der Freisetzung wandern die Endocannabinoide retrograd in den synaptischen Spalt und aktivieren dort die auf den präsynaptischen Nervenendigungen befindlichen CB1-Rezeptoren. Die Synthese von Anandamid erfolgt in zwei enzymatischen Schritten. Zuerst wird aus einem Membran-phospholipid durch die N-Acyltransferase N-Arachidonoylphosphatidylethanolamine (NAPE) gebildet. Durch Hydrolyse wird aus dem Phospholipid NAPE mittels NAPE-spezifischer Phospholipase D dann Anandamid synthetisiert. 2-AG wird vor allem durch Umwandlung von Diacylglycerol durch zwei Ca^{2+} -abhängige *sn*-1-Diacylglycerollipase (DAGL α und DAGL β) synthetisiert. Diacylglycerol wird durch Phospholipase C-vermittelte Hydrolyse von Membranphospholipiden gebildet (Di Marzo et al., 2004).

Nach der raschen Entfernung aus dem synaptischen Spalt wird Anandamid vor allem durch die membrangebundene, intrazelluläre FAAH (*fatty acid amide hydrolase*) gespalten, während 2-AG durch die zytosolische MGL (Monoglyceridlipase) metabolisiert wird (Trezza et al., 2008)

1.3.3 Einfluss des endogenen Cannabinoidsystems auf die Gehirnentwicklung

Das endogene Cannabinoidsystem spielt bei der Gehirnentwicklung sowohl prä- als auch postnatal eine wichtige Rolle. Es wird davon ausgegangen, dass es großen Einfluss bei der Entwicklung weiterer Neurotransmittersysteme hat. Auffällig ist die atypische Lokalisation wichtiger Bestandteile des endogenen Cannabinoidsystems während fetaler und früher postnataler Entwicklungsphasen. In Ratten konnten CB1-Rezeptoren schon an den Gestationstagen 11-14 autoradiographisch und mittels mRNA-Expressionsmessung nachgewiesen werden. Dieser fetale Zeitraum entspricht der Phase, in der sich die meisten Neurotransmittersysteme ausbilden. Zu diesem Zeitpunkt scheinen die Rezeptoren schon voll funktionstüchtig zu sein und finden sich im Gehirn in einer weitaus höheren Dichte als in den Gehirnen erwachsener Ratten (Berrendero et al., 1999). Erstaunlicherweise zeigte sich in fetalen Rattengehirnen eine völlig andere Verteilung der CB1-Rezeptoren als im adulten Gehirn.

Auch beim Menschen konnten CB1-Rezeptoren bereits in der 14. Gestationswoche im Hippocampus und in der 20. Gestationswoche in der Amygdala nachgewiesen werden (Wang et al., 2003). In Übereinstimmung zu der Situation in Tieren konnten auch beim Menschen vor allem in der weißen Substanz hohe pränatale CB1-Rezeptordichten nachgewiesen werden. Regionen, die im Erwachsenenalter praktisch keine CB1-Rezeptoren mehr aufweisen. Diese atypische Rezeptorverteilung wurde als Hinweis auf eine spezifische Rolle des endogenen Cannabinoidsystems in mehreren Entwicklungsprozessen, wie z.B. Zellproliferation und Zellmigration, Synaptogenese und Myelogenese, angesehen. Unterstützt wurde diese Vermutung durch *in vitro* Ergebnisse mit fetalen Gliazellen oder neuronalen Zellen (Fernandez-Ruiz et al., 2000).

Die beiden Endocannabinoide, Anandamid und 2-AG, konnten in fetalen Rattengehirnen am 21. Gestationstag nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise zeigt sich zu diesem Zeitpunkt eine viel höhere Konzentration an 2-AG als an Anandamid und erreicht ein Maximum direkt nach der Geburt. Im Gegensatz dazu steigen Anandamidlevel nach der Geburt stetig an und erreichen ein Maximum im adoleszenten Gehirn (Berrendero et al., 1999). Ebenso erreichen auch CB1-Rezeptoren ihre höchste Dichte im adoleszenten Gehirn (Rodriguez de Fonseca et al., 1993). All dies spricht für eine Reorganisation und Ausreifung des endogenen Cannabinoidsystems erst während der Adoleszenz.

Die Adoleszenz als Zeitspanne zwischen Kindheit und Erwachsensein ist geprägt durch eine Remodelierung der corticalen und limbischen Bahnen, welches zu erwachsenem Verhalten und Handeln führt. Das endogene Cannabinoidsystem spielt auch in dieser kritischen Entwicklungsphase eine wichtige Rolle, indem es die Freisetzung und Aktionen verschiedener Neurotransmittersysteme, wie Dopamin und Glutamat, reguliert und fundamentale Entwicklungsprozesse wie neuronale Zellproliferation, Zellmigration und Zelldifferenzierung sowie Morphogenese und Synaptogenese beeinflusst (Harkany et al., 2008; Realini et al., 2009).

1.3.4 Auswirkungen von Cannabiskonsum

1.3.4.1 Generelle Auswirkungen

Die Wirkungen von Cannabinoiden auf den Organismus sind sehr vielseitig. Am besten bekannt und dokumentiert sind die zentral über den CB1-Rezeptor vermittelten psychoaktiven, antinozizeptiven, motorischen und antikonvulsiven Effekte. Darüber hinaus erzeugen

Cannabinoide aber auch viele verschiedene periphere kardiovaskuläre und vorrangig CB2-Rezeptor vermittelte immunsuppressive Effekte.

Die akuten Auswirkungen von Cannabis können in ihrer Ausprägung in Abhängigkeit von der konsumierten Dosis, dem Weg der Verabreichung, den individuellen Erwartungen und der Vulnerabilität der konsumierenden Personen variieren. Die bekannteste Wirkung von Cannabinoiden ist die nach dem Konsum auftretende Euphorie und Relaxation, die später in einer sedierten Periode mündet.

Die langfristigen Auswirkungen des Cannabiskonsums müssen von den akuten Cannabiswirkungen klar getrennt werden. Zu den körperlichen Folgen des Cannabiskonsums gehört beispielsweise ein erhöhtes Risiko für respiratorische Erkrankungen. Da Cannabis meist in Form von Marijuana zusammen mit Tabak geraucht wird, vermischen sich die negativen Effekte der Cannabinoide und der Tabakinhaltsstoffe. Chronisches starkes Rauchen von Cannabis führt aber in stärkerem Ausmaß als normales Tabakrauchen zu einer verminderten Lungenfunktion und einem erhöhten Malignomrisiko (Hall und Solowij, 1998).

Die neurobiologischen Konsequenzen regelmäßigen Cannabiskonsums sind dagegen noch nicht ausreichend bekannt. Als bleibende Cannabinoidwirkungen werden die Effekte bezeichnet, die lange nachdem die Droge das zentrale Nervensystem verlassen hat, persistieren (Pope et al., 1995).

Menschen, die Cannabis regelmäßig konsumieren, zeigen kognitive Defizite. Ob diese Defizite nach einer längeren Abstinenzphase persistieren ist allerdings noch umstritten (Murray et al., 2007). Ein wichtiger Aspekt scheint der Beginn des Drogenmissbrauchs zu sein. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass regelmäßiger Cannabiskonsum vor Erreichen des 17. Lebensjahres zu anhaltenden Aufmerksamkeitsdefiziten führt. Für Personen, die erst nach diesem Alter mit dem Cannabiskonsum begannen, konnten keine Konsequenzen belegt werden (Ehrenreich et al., 1999). In ähnlicher Weise konnte von Pope et al. gezeigt werden, dass regelmäßiger Missbrauch von Cannabispräparaten vor Erreichen des 18. Lebensjahres mit niedrigeren verbalen Intelligenzwerten einhergeht. Diese Studien liefern einen Hinweis auf die Vulnerabilität für die negativen Cannabiseffekte während bestimmter Entwicklungsphasen (Pope et al., 2003).

Ein weiterer möglicher chronischer Effekt des Cannabiskonsums, die Beeinflussung des Risikos für schizophrene Erkrankungen, wird unter 1.3.5 gesondert behandelt.

1.3.4.2 Therapeutische Nutzung von Cannabinoiden in der Medizin

Obwohl die therapeutischen Effekte von Cannabis seit Tausenden von Jahren bekannt sind, wurden die Cannabinoidrezeptoragonisten erstmalig vor etwa 30 Jahren für medizinische Zwecke als Arzneimittel zugelassen. Eines der ersten Therapeutika war der CB1/CB2-Rezeptoragonist Nabilon, ein synthetisches Δ^9 -THC Analogon, welches 1981 in den USA für die Behandlung von Chemotherapeutika-induziertem Erbrechen und Übelkeit zugelassen wurde. 1985 wurde Dronabinol (Δ^9 -THC) unter dem Handelsnamen Marinol[®] als Antiemetikum und 1992 zur Appetitstimulation und Kachexiebehandlung zugelassen. Im Jahr 2005 folgte die Zulassung eines cannabisbasierten Stoffes namens Sativex[®], welcher zu etwa gleichen Teilen aus THC und Cannabidiol besteht, und Verwendung in der symptomatischen Behandlung von neuropathischen Schmerzen bei Patienten mit multipler Sklerose sowie als Adjuvanz in der Schmerztherapie von Krebspatienten findet.

Seit 1998 darf Dronabinol auch in Deutschland als Zubereitung verordnet werden. Ein zugelassenes Fertigarzneimittel ist aber für Dronabinol bisher noch nicht verfügbar.

Potentielle therapeutische Ziele für Cannabinoidrezeptoragonisten werden derzeit intensiv erforscht. Wichtige Angriffspunkt stellen hier beispielsweise die Behandlung von chronischen Schmerzen, kardiovaskulären Erkrankungen wie der Atherosklerose und die Angiogenese von malignen Erkrankungen dar. Ein wichtiger Aspekt dieser Forschung ist die Entwicklung von effizienteren Substanzen, bzw. eine Verbesserung des Nutzen-Risiko-Aspekts (Pertwee, 2009).

1.3.5 Cannabinoide und Schizophrenie

Cannabiskonsum kann bei gesunden Individuen Symptome hervorrufen, die eine große Ähnlichkeit mit denen von Schizophrenen aufweisen. Diese ähneln sehr stark den Symptomen eines akuten psychotischen Schubs. So kommt es beispielsweise zu Verwirrheitszuständen, Depersonalisation, paranoidem Wahn, Halluzinationen, Angst- und Erregungszuständen (D'Souza et al., 2004; Favrat et al., 2005). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Applikation von THC zu einer Verschlechterung sowohl der Positiv- als auch der Negativsymptomatik bei schizophrenen Patienten führt und dass diese eine erhöhte Sensitivität gegenüber der kognitiven Effekte von THC zeigen (D'Souza et al., 2005).

Es ist bekannt, dass unter den Patienten mit Schizophrenie mehr Cannabiskonsumern sind als in der Normalbevölkerung (Mueser et al., 1990; Regier et al., 1990). So konsumieren 43% der Schizophreniepatienten und 51% der Patienten mit schizophrener Erstepisode regelmäßig

Cannabis (Barnett et al., 2007; Bersani et al., 2002). Chronischer Cannabiskonsum ist bei diesen Patienten mit einer schlechteren Prognose, häufigeren und früheren Rückfällen verbunden (Grech et al., 2005).

Mehrere Metanalysen ergaben, dass Cannabiskonsum das Risiko im Laufe des Lebens an einer schizophrenen Störung zu erkranken verdoppelt (Arseneault et al., 2004; Fergusson et al., 2003; Henquet et al., 2005; Weiser et al., 2002). Überdies konnte eine dosisabhängige Relation zwischen Cannabiskonsum und der Diagnose einer Schizophrenie festgestellt werden. So konnte bereits 1987 in einer großen Kohortenstudie mit einem *Follow-up* von 15 Jahren gezeigt werden, dass sich in der untersuchten Kohorte von 45000 schwedischen Wehrpflichtigen, entsprechend 97% der männlichen Population im Alter von 18-20 Jahren, das Risiko im Laufe des Lebens an Schizophrenie zu erkranken versechsfachte, wenn häufig Marijuana konsumiert wurde (Andreasson et al., 1987; Zammit et al., 2002). Die Tatsache allerdings, dass nur 3% der starken Konsumenten eine Schizophrenie entwickelten, spricht dafür, dass Cannabis nur eine kausale Rolle in der Pathogenese der Schizophrenie bei schon prädisponierten Individuen zukommt. Diese Annahme wird beispielsweise von einer Studie von Caspi et al. von 2005 unterstützt. Hier konnte gezeigt werden, dass ein funktionaler Polymorphismus in dem für die Catechol-O-methyltransferase (COMT) codierenden Gen zusammen mit Cannabis zu einem fünffach erhöhten Schizophrenierisiko führt. Die COMT, ein wichtiges Enzym des Dopaminabbaus im präfrontalen Cortex, scheint somit den Einfluss von adolescentem Cannabiskonsum auf das Risiko einer späteren schizophrenen Erkrankung zu modulieren (Caspi et al., 2005).

Neben der Prädisposition einiger Individuen spielt es vermutlich eine wichtige Rolle, wann der Cannabiskonsum einsetzt. Gerade die Adoleszenz, in der die meisten Menschen ihre ersten Erfahrungen mit Cannabis machen, scheint eine besonders vulnerable Phase darzustellen, in der Cannabiskonsum zu anhaltenden neuronalen Veränderungen (Ehrenreich et al., 1999; Wilson et al., 2000) und einem früheren Auftreten schizophrener Symptome führt.

Heutzutage wird davon ausgegangen, dass die Beziehung zwischen Cannabinoiden und Schizophrenie zwei verschiedene Aspekte hat, welche als endogen und exogen definiert werden könnten. Zum Einen wird angenommen, dass Alterationen im endogenen Cannabinoidsystem den Beginn einer schizophrenen Störung *per se* beeinflussen könnten oder zu Veränderungen in anderen Neurotransmittersystemen führen, die entweder eine Schizophrenie auslösen oder sie aber verstärken können. Zum anderen könnten exogen zugeführte Cannabinoide als Risikofaktor fungieren und eben diese Alterationen im endogenen Cannabinoidsystem herbeiführen

(Fernandez-Espejo et al., 2009). Unterstützung erhält die Cannabinoidhypothese unter anderem durch erhöhte Endocannabinoidkonzentrationen im Liquor und im Blut von unbehandelten schizophrenen Patienten (De Marchi et al., 2003; Leweke et al., 1999). Später konnte gezeigt werden, dass die erhöhten Liquorspiegel von Anandamid durch die Behandlung mit typischen Neuroleptika gesenkt wurden. Es wurde daher vermutet, dass die erhöhten Anandamidspiegel einen kompensatorischen homöostatischen Mechanismus zu der exzessiven Dopaminstimulation darstellen. Tatsächlich konnte eine negative Korrelation zwischen Anandamidliquorspiegel und psychotischen Symptomen nachgewiesen werden (Giuffrida et al., 2004). Leweke et al. gelang es 2007 in Patienten mit einer ersten schizophrenen Episode ohne bisherige antipsychotische Medikation nachzuweisen, dass weniger aktive Cannabiskonsumten eine mehr als zehnfach höhere Anandamidkonzentration im Liquor aufweisen als starke Cannabiskonsumten. Demnach wurde geschlossen, dass häufiger Cannabiskonsum zu einer Reduktion der Anandamidspiegel führt, welches dann mit einem erhöhten Risiko für psychotische Episoden einhergeht (Leweke et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Zusammenhang zwischen Cannabis bzw. Störungen im endogenen Cannabinoidsystem und der Schizophrenie sehr wahrscheinlich ist. Dies bezieht sich sowohl auf die Beeinflussung der Erkrankungswahrscheinlichkeit, des Erkrankungsalters als auch auf den Krankheitsverlauf. Welche Rolle den Cannabinoiden dabei im Detail zukommt und welche Bedeutung eine genetische Vulnerabilität sowie auch bestimmte Entwicklungsphasen, wie z.B. die Adoleszenz haben, bedarf weiterer Klärung.

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Auswirkungen von chronischer adoleszenter Cannabinoidbehandlung in einem Mausstamm mit einer für Schizophrenie prädisponierenden genetischen Veränderung auf verschiedene Verhaltensleistungen, sowie mögliche Alterationen der Genexpression im Gehirn der Maus. Dieser Ansatz entspricht dem Vulnerabilitäts-Stress-Modell der Schizophrenie, nach welchem verschiedene Faktoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf einen Organismus einwirken und letztlich additiv zu einem Ausbruch der Erkrankung führen.

In dieser Arbeit sollten die G72-transgenen Mäuse als Mausmodell mit einer erhöhten Vulnerabilität für schizophrene Störungen genutzt und ihr Verhalten nach adoleszenter Cannabinoidbehandlung mit dem Verhalten von Wildtypmäusen verglichen werden. Um gleiche Ausgangsbedingungen zu erreichen, musste zu Beginn ein möglicher Sensitivitätsunterschied in

der akuten THC-Reaktion untersucht werden. Hierfür sollten Tiere zu verschiedenen Alterszeitpunkten, nämlich im Alter von vier und acht Wochen, untersucht werden.

In den Untersuchungen zur chronischen THC-Behandlung sollten die Mäuse in der Adoleszenz, von Beginn der vierten Lebenswoche bis zur achten Lebenswoche, jeden zweiten Tag Cannabinoid-Injektionen erhalten. Um die Auswirkungen der adoleszenten Cannabinoidbehandlung auf kognitive, emotionale und motorische Leistungen adulter Tiere feststellen zu können, sollte das Verhalten der Tiere später in verschiedenen Verhaltensparadigmen näher untersucht werden. Abschließend sollten veränderte Expressionen von Genen, die für Komponenten des endogenen Cannabinoidsystems kodieren, und von G72 im Cortex, Hippocampus und Cerebellum analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Arbeitsgeräte

Analysenwaage	BP 121 S, Sartorius AG BP 2100, Sartorius AG
CCD-Kamera	KY-F75U, JVC
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH
Entwicklermaschine	X-OMAT 1000, Kodak GmbH
Gefrierschrank -80°C	Heraeus Instruments GmbH
Geldokumentation (digital)	Chemi Doc, Bio-Rad Laboratories GmbH
Heizmagnetrührer	MR 3001 K, Heidolph, Fisher
Homogenisator	ultraTurrax T8, IKA Werke DIAX 900, Heidolph
Hybridisierungskubator	OV 5, Biometra
Kombischüttler	KL2, Edmund Bühler GmbH
Drehstab	Rota-rod 47600, Ugo basile
Offenfeld	Actimot, TSE Systems GmbH
pH-Meter	inoLab, WTW GmbH
Pipetten	Research, Eppendorf
real-time PCR System	Taqman [®] 7900HT, Applied Biosystems
Rotationsmischer	Vortex Genie 2, scientific industries
Spektralphotometer	ND-1000 Thermo Scientific
Thermocycler	iCycler, Biorad
Thermometer	Model BAT-12, Physitemp Instruments, Clifton NJ
Thermomixer	KTMR-133 KühlThermoMixer, HLC BioTech
UV-Crosslinker	UV-Stratalinker 2400, Stratagene
Wärmeplatte	Hotplate Analgesia Meter, Columbus Instruments
Zentrifugen	Biofuge fresco, Heraeus Multifuge 3 S-R, Heraeus

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Autoradiographiefilme	GE Healthcare Europe GmbH
Aluminiumwiegeschalen	Aluminium weighing boats, Sigma-Aldrich
Kanülen	27 G x ½ Hypodermic Needle Pro, Smiths Medical 21 G x 1½ BD Microlance 3
Nytran N membran	Schleicher & Schuell
PCR-Tubes	Multiply-µStrip Pro 8er Kette, Sarstedt AG & Co
Reaktionsgefäße	Safelock 1,5 ml und 2 ml, Eppendorf
Spritzen	1 ml, BD Plastipak 2 ml, 5 ml und 10 ml BD Discardit II

Taqman [®] PCR Platten	Applied Biosystems
Whatman [®] -Papier	Schleicher & Schuell

2.1.3 Taqman Assays

Gen	Assay-Nummer (Applied Biosystems)
Cnr 1	Mm00432621_s1
Cnr 2	Mm00438286_m1
DAGL a	Mm00813830_m1
DAGL β	Mm00523381_m1
FAAH	Mm01191809_g1
GAPDH	Mm99999915_g1
G72	Hs01382336_m1
Mgl	Mm00449274_m1

2.1.4 Chemikalien

1-Bromo-3-chloro-propan (BCP)	Sigma-Aldrich
5 x First St. Buffer	Invitrogen GmbH
Agarose	Ultrapure Agarose, Invitrogen GmbH
Cremophor EL	Sigma-Aldrich
dNTPs Mix (10m M)	Invitrogen GmbH
Dronabinol (Δ 9-THC)	THC Pharm
DTT (0,1 M)	Invitrogen GmbH
Ethanol	Merck
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Isotone Kochsalz-Lösung	Isotone Kochsalz-Lösung, 0,9 % NaCl, Braun
Oligo(dT)12-18 Primer	Invitrogen GmbH
PCR DIG labeling Mix	Roche GmbH
Phencyclidin	Phencyclidine hydrochloride, Sigma-Aldrich Co.
Taqman Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems
Thermopol Buffer (10x)	New England Biolabs
Trizol [®] Reagenz	Invitrogen GmbH

2.1.5 Enzyme und Antikörper

Proteinase K	New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs
SuperSkript™ II Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Invitrogen GmbH
Anti-Dig-AP Fab Fragments	Roche GmbH

2.1.6 Kits

High Pure PCR Product Purification Kit, Roche

2.1.7 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung aller Lösungen wurde über eine Reinstwasseranlage (Milli-Q Academic A10 System, Millipore Corporation) deionisiertes und filtriertes Wasser verwendet. Falls nicht anders angegeben wurden die Lösungen bei Raumtemperatur gelagert. Alle Chemikalien, die zur Herstellung von Puffern und Lösungen verwendet wurden, stammen von den Firmen Invitrogen, Carl Roth, Merck oder Sigma-Aldrich.

20 x SSC-Puffer, pH 7	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat
Blockierungspuffer	10 % Blockierungsstammlösung 90 % Maleinsäurepuffer
DEPC-Wasser	1 ml DEPC in 1l MilliQ-H ₂ O Im Dunkeln über Nacht inkubiert, autoklaviert
Detektionspuffer, pH 9,5	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
Elutionspuffer	10 mM Tris-HCl pH 8 1 mM EDTA pH 8
Hybridisierungspuffer	0,02 % SDS 25 % SSC (20 x)

	10 % Blockierungsstammlösung 0,1 % N-Lauroylsarcosine Lagertemperatur: 4°C
Lysispuffer	100 mM Tris-HCl pH 8 5 mM EDTA 0,2 % SDS 200 mM NaCl
Maleinsäurepuffer, pH 7,5	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl Lagertemperatur: 4°C
Blockierungsstammlösung	10 g Blockierungsreagenz in 100 ml Maleinsäurepuffer, autoklaviert, in 10 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert
TAE Puffer, pH 8	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
Waschlösung 1	10 % SSC-Puffer (20 x) 1 % SDS
Waschlösung 2	1 % SSC-Puffer (20 x) 0, 1% SDS
Waschpuffer	0,3 % Tween in Maleinsäurepuffer

2.1.8 Computersoftware

Actimot	TSE Systems GmbH
Videomot 2	TSE Systems GmbH
The Observer XT 7.0	Noldus Technologies
Graph Pad Prism 4	Instat Graph Pad Software
ABI Prism 7000 SDS 2.2.2	Applied Biosystems
Statistica	StatSoft, Inc. USA
Office 2007 (Excel, Word)	Microsoft Corporation USA
Endnote X3	Thomson Reuters

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Zucht und Haltung der Mäuse

Für die beschriebenen Versuche wurden G72-transgene und Wildtypiere aus einer laboreigenen CD1-Mauslinie gezüchtet. Verpaarungen wurden durch die gemeinsame Haltung von einem Männchen mit 1-2 Weibchen angesetzt, die resultierenden Jungen wurden an Tag 21-23 nach der Geburt abgesetzt. Die Tiere wurden in Gruppen von 2-6 Tieren in einem konstanten Tag-Nacht-Rhythmus (Soweit nicht anders angegeben: Beleuchtung von 9-19 Uhr) mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten.

Für die Untersuchungen zur akuten THC-Wirkung wurden 4 respektive 8 Wochen alte Tiere genutzt. Zu Beginn der Untersuchung zur langfristigen Δ^9 -THC-Wirkung waren die Mäuse 21 Tage alt.

2.2.2 Pharmaka

Dronabinol ist der internationale Freiname für ein Stereoisomer des Δ^9 -THC, das (-)-trans- Δ^9 -THC. Dronabinol wird teilsynthetisch hergestellt. In einem aufwendigen Verfahren wird aus Nutzhanf Cannabidiol extrahiert und anschließend in Δ^9 -THC umgewandelt.

Die Eigenschaften des teilsynthetischen Pharmakons unterscheiden sich nicht von dem natürlich vorkommenden Δ^9 -THC. Dronabinol ist ein partieller Agonist an den CB1 und CB2-Rezeptoren. Auf Grund seiner stark lipophilen Eigenschaft wurde Dronabinol in 5 % Ethanol, 5 % Cremophor EL und 90 % isotoner Kochsalzlösung gelöst. Diese Form der Lösung wird seit langer Zeit in den meisten Laboratorien für die Applikation von THC gewählt.

Dronabinol wurde in zwei verschiedenen Dosierungen (10 mg/kg KG und 20 mg/kg KG) in einem Volumen von 10 ml/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert.

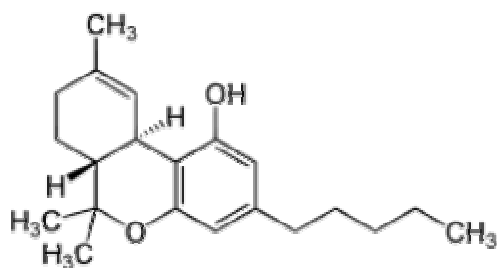


Abb. 3. Strukturformel von Δ^9 -THC

Phencyclidin ist ein synthetisches Psychotomimetikum und bindet mit hoher Affinität an eine Bindestelle (PCP-Rezeptor) in glutamatergen Ionenkanälen vom N-methyl-D-aspartat-Typ (NMDA-Rezeptor). Dort inhibiert PCP nicht kompetitiv die Aktivität des NMDA-Rezeptors. Phencyclidin wurde in isotoner Kochsalzlösung gelöst und in einer Dosierung von 3 mg/kg KG i.p. appliziert.

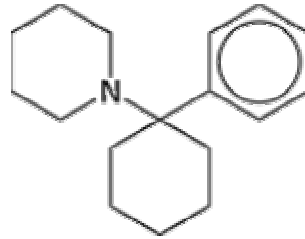


Abb. 4. Strukturformel von PCP

2.2.3 Gewebeentnahme

Zur RNA-Isolation wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und das Gehirn entnommen. Cortex, Cerebellum und Hippocampus wurden vom restlichen Gehirn isoliert und in Isopentan schockgefroren. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3 Experimentelles Design

2.3.1 Untersuchung der akuten Δ^9 -THC Empfindlichkeit

In einem ersten Versuch wurde getestet, ob G72-transgene Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine veränderte Δ^9 -THC Empfindlichkeit aufweisen. Um alters- und geschlechtsbedingte Unterschiede ausschließen zu können, wurden männliche und weibliche Mäuse während der Pubertät, im Alter von 4 Wochen, und postpubertär, im Alter von 8 Wochen, in einer Tetrade von Verhaltenstests (Veränderung der Körpertemperatur, lokomotorische Aktivität, kataleptisches Verhalten, Reaktionen auf Schmerzreize) untersucht.

Die Tiere eines Wurfes wurden hierzu direkt nach dem Absetzen genotypisiert und randomisiert den Testgruppen Vehikel (Trägersubstanz ohne THC), 10 mg THC/kg KG und 20 mg THC/kg KG zugeteilt.

2.3.2 Untersuchungen zur chronischen Cannabinoidbehandlung

Die Versuche zur chronischen Cannabinoidbehandlung begannen direkt nach dem Absetzen der Tiere im Alter von 21 Tagen. Die Tiere eines Wurfes wurden nach Geschlecht sortiert, genotypisiert und dann zufällig der Behandlungs- oder Vehikelgruppe zugeordnet. Die Tiere wurden von Tag 21 bis Tag 49 jeden zweiten Tag gewogen und mit Dronabinol (10 mg/kg KG) bzw. Vehikel behandelt. Die Injektionen erfolgten grundsätzlich zwischen 16 und 20 Uhr abends. Um den Einfluss der chronischen Cannabinoidbehandlung auf das Gewicht auch über den Behandlungszeitraum hinaus beurteilen zu können, wurde das Gewicht der Mäuse zwischen pd 49 und pd 81 jeden 8. Tag registriert. Anschließend, am Tag 81 nach der Geburt, wurde der Tag-Nacht-Rhythmus der Mäuse invertiert (Beleuchtung von 19:00-9:00 Uhr). Für die nächsten 4 Wochen verblieben die Mäuse ungestört. Durch den langen zeitlichen Abstand zwischen THC-Behandlung und den Verhaltensversuchen konnten mögliche Entzugseffekte oder eine eventuell noch andauernde Drogenwirkung ausgeschlossen werden.

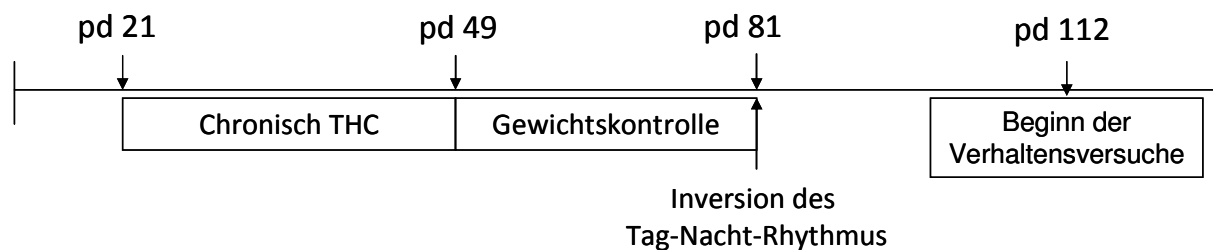


Abb. 5. Zeitverlauf der Behandlungen der Tiere

Die adulte Verhaltenstestphase begann jeweils im Alter von 16 Wochen mit dem Drehstab-Versuch an pd 112. Anschließend wurden die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt:

Mit der einen Gruppe wurde an pd 140 der O-Labyrinth-Test durchgeführt. An pd 154 wurden die Tiere im Y-Labyrinth getestet. An pd 168, im Alter von 24 Wochen, wurden zuerst das Explorationsverhalten sowie die lokomotorische Aktivität im offenen Feld beurteilt und anschließend die PCP-Sensitivität der Mäuse ermittelt. Im Anschluss daran wurden die Mäuse umgehend getötet.

Mit der anderen Gruppe wurde an pd 140 der soziale Interaktionstest durchgeführt. An pd 150 wurde die Hälfte dieser Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die Gehirne entnommen und zur Analyse verwendet. Im Alter von 7 Monaten wurden die verbliebenen Tiere dem Porsolt-Test unterzogen, anschließend ihre Gehirne entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C

gelagert.

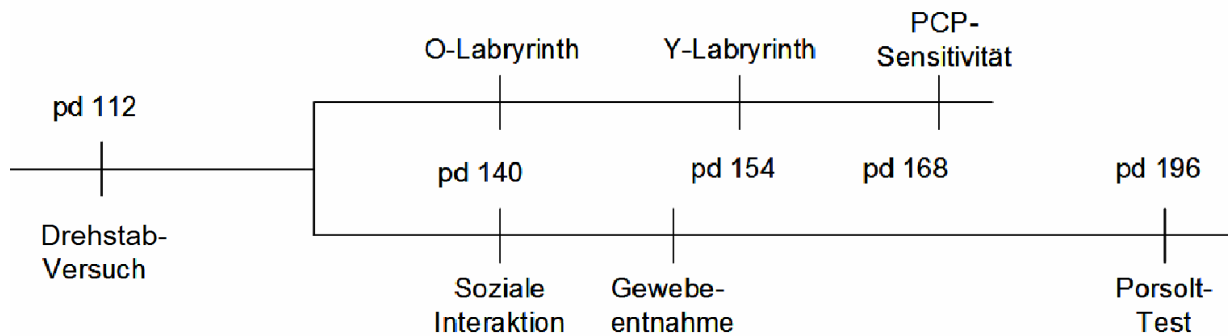


Abb. 6. Zeitverlauf und Art der durchgeführten Verhaltensversuche und Behandlungen der Tiere

2.4 Methoden zur Verhaltensanalyse

Alle Tierversuche fanden in den Verhaltenslaboratorien des HET (Haus für experimentelle Therapie) des Universitätsklinikums Bonn nach Genehmigung durch die Bezirksregierung Köln statt (Aktenzeichen: 8.87-50.10.37.09.156).

Mindestens 2 Wochen vor Beginn der Verhaltensversuche wurde der Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere invertiert, so dass die Tiere in ihrer aktiven Phase untersucht werden konnten (Dunkelheit von 9:00-19:00 Uhr, Beleuchtung von 19:00-9:00 Uhr). Vor jedem Verhaltensversuch wurden die Tiere für mindestens 30 Minuten an die Untersuchungsräume habituiert. Soweit nicht anders erwähnt, fanden alle Versuche in einem wenig beleuchteten Umfeld mit möglichst niedriger Geräuschebene statt. Die für die Versuche notwendigen Geräte wurden nach jedem Tier mit 70%igem Ethanol gereinigt. Alle Versuche fanden unter randomisierten und anonymisierten Bedingungen statt.

2.4.1 Tests zur Messung der akuten Cannabinoidwirkung

Die akuten Effekte von Cannabinoiden können mit Hilfe einer definierten Tetrade von Verhaltensversuchen untersucht werden. Im Einzelnen werden Veränderungen in der Spontanaktivität, der Körpertemperatur, des kataleptischen Verhaltens und Reaktionen auf Schmerzreize gemessen. Bei Mäusen führt eine CB1-Rezeptoraktivierung durch z.B. THC-Behandlung normalerweise zu einer Reduktion der lokomotorischen Aktivität, einem Absinken der Körpertemperatur, einer Zunahme des kataleptischen Verhalten und zu einer Verminderung des Schmerzempfindens (Compton et al., 1992).

2.4.1.1 Zeitplan der Messung der akuten Cannabinoidwirkung

Die im Folgenden beschriebenen Versuche zur Bestimmung der akuten Δ^9 -THC-Reaktion wurden nach einem festen Zeitschema nacheinander durchgeführt.

Minute	
0	Messung der Körpertemperatur, Wiegen, i.p. Injektion
30	Messung der Spontanaktivität im Offenfeld
40-44	Ring-Katalepsie
45	Wärmeplatten-Test
46	Messung der Körpertemperatur

2.4.1.2 Messung der Körpertemperatur

Die Körpertemperatur der Mäuse wurde unmittelbar vor und 46 Minuten nach Injektion von THC unter Verwendung eines lubrifizierten Physitemp-Thermometers rektal gemessen.

2.4.1.3 Messung der Spontanaktivität – Offenfeld Versuch

Zur Messung der lokomotorischen Aktivität wurden die Mäuse in ein offenes Feld (44 x 44 x 30 cm) gesetzt. Mit Hilfe von Infrarot-Lichtschraken wurde das Verhalten der Tiere aufgezeichnet und über ein automatisches Meßsystem (Actimot, TSE) registriert und ausgewertet. Die Mäuse wurden 30 Minuten nach THC bzw. Vehikel-Injektion für 10 Minuten in eine Ecke des offenen Feldes gesetzt. Ihr Verhalten wurde dann 10 Minuten lang registriert. Für die Bestimmung der Spontanaktivität wurden die Verhaltensparameter „Zurückgelegte Distanz (m)“ und „Bewegungszeit (s)“ ausgewertet.

2.4.1.4 Ring-Katalepsie-Test

Katalepsie ist definiert als ein Zustand, bei dem ein Individuum über eine lange Zeit fortwährend in einer unphysiologischen Stellung verweilt. Zur Messung des kataleptischen Verhaltens wurden die Mäuse 40 Minuten nach Injektion auf einen vertikalen PVC-Zylinder (Höhe: 28 cm, äußerer Durchmesser des Rings: 5,8 cm, innerer Durchmesser: 5,3 cm) gesetzt. Bestimmt wurde die Zeit, die eine Maus während der 4-minütigen Testphase bewegungslos auf dem Ring verbrachte. Wenn eine Maus von dem Ring fiel oder sprang, wurde sie umgehend wieder auf den Ring gesetzt und

der Versuch fortgesetzt. Nach einem Maximum von 5 solcher Fluchtversuche wurde der Test abgebrochen.

2.4.1.5 Wärmeplatten-Test

Der Wärmeplatten-Test misst die Reaktionen auf lokal applizierte thermische Reize. Die Tiere werden hierzu auf eine Wärmeplatte (Hotplate Analgesia Meter, Columbus Instruments) gesetzt, die äußerst präzise auf eine vorher definierte Temperatur eingestellt werden kann. In dieser Arbeit wurde die Temperatur der Wärmeplatte auf 55°C eingestellt. 45 Minuten nach THC oder Vehikel-Injektion wurden die Tiere auf die Platte gesetzt und die Latenzzeit bis zum ersten Auftreten folgender Reaktionen gemessen: Schütteln, Lecken der Füße, Hochspringen. Der Versuch wurde standardmäßig nach 30 Sekunden abgebrochen.

2.4.2 Verhaltensversuche zur chronischen Cannabinoidbehandlung

2.4.2.1 Drehstab-Versuch (Rota-rod-Versuch)

Der Drehstab-Versuch ermöglicht es motorische Defizite und Insuffizienzen im motorischen Lernen zu erkennen. Für diesen Test wurden die Mäuse einzeln auf einen sich drehenden Stab mit einem Durchmesser von 3 cm gesetzt. Der Drehstab ist so konzipiert, dass die Mäuse, bedingt durch den Abstand zum Boden, versuchen sich möglichst lange auf dem Drehstab zu halten. Gemessen wurde die Zeit, die die Maus auf dem Drehstab verbringt, ehe sie herunterfällt oder bis die Versuchszeit von 180 Sekunden erreicht ist. Die anfängliche Geschwindigkeit des Drehstabes betrug 2,5 Umdrehungen pro Minute, innerhalb von 150 Sekunden wurde der Drehstab auf die Endgeschwindigkeit von 45 Umdrehungen pro Minute beschleunigt. Jede Maus wurde 10 Mal getestet und die Zeitlatenz in der Relation zu den Wiederholungen ausgewertet.

2.4.2.2 Sozialer Interaktionstest

Die soziale Interaktionsfähigkeit der Mäuse sowie ihr Habitus in einer unbekanntem Umgebung wurden mit dem sozialen Interaktionstest untersucht. Hierzu wurden die Mäuse in eine durchsichtige Box (44 x 44 x 30 cm) gesetzt, die etwa 5 cm hoch mit Einstreu befüllt war. Zusätzlich befanden sich in zwei Ecken der Box, jeweils 10 cm vom Rand entfernt, zwei Objekte (Kugeln mit einem Durchmesser von 3,5 cm). Kurz vor Beginn des Versuchs wurde in die Box eine etwa gleichaltrige, gleichgeschlechtliche und der Versuchsmaus unbekanntem Maus gesetzt.

Daraufhin wurde die Versuchsmaus in eine Ecke der Box platziert und ihr Verhalten über 5 Minuten mit einer Videokamera aufgezeichnet. Die Aufnahme wurde später mit Hilfe der Software „The Observer XT“ ausgewertet.

Untersucht wurden die soziale Interaktionen der Tiere, unterteilt in freundliches soziales Verhalten (beschnüffeln und folgen) und aggressives Verhalten (beißen, verfolgen, anspringen oder ringen), und das Eigenverhalten der Tiere, das aus der Exploration der Box, Fellpflege, graben im Streu und Interaktionen mit dem Objekt bestand.

2.4.2.3 O-Labyrinth-Test

Das O-Labyrinth wird zur Messung des Angstverhaltens genutzt. Es besteht aus einem 6 cm breiten kreisförmigen Laufsteg in etwa 40 cm Höhe. Zwei Kreisquadranten besitzen keine Wand, sind also offen, während zwei Kreisquadranten eine etwa 10 cm hohe Wand haben. Nagetiere neigen dazu sich, gerade in einer hellen Umgebung, möglichst wenig in den offenen Bereichen aufzuhalten, was als Ängstlichkeit ausgelegt wird (Shepherd et al., 1994).

Der Test wurde bei einer Lichtstärke von 800 Lux ausgeführt. Die Maus wurde in einen offenen Bereich unmittelbar vor einen geschützten Bereich gesetzt. Anschließend wurde ihr Verhalten mit einem automatischen Messsystem (Videomot 2, TSE Systems GmbH) für die nächsten 5 Minuten aufgezeichnet. Ausgewertet wurde die Zeit, die die Maus im offenen Bereich verbrachte, der Anteil an der gelaufenen Gesamtstrecke, der in den offenen Quadranten zurückgelegt wurde sowie die Latenz mit der die Tiere erstmalig von dem offenen in den geschlossenen Bereich wechselten.

2.4.2.4 Y-Labyrinth-Test

Mäuse haben die natürliche Tendenz in einem symmetrischen System sukzessive alle dargebotenen Möglichkeiten zu wählen (*spontaneous alternation behavior*). Beeinträchtigungen in diesem Verhalten werden als Defizite des Arbeits- und Kurzzeitgedächtnis aufgefasst (Hughes, 2004).

Das Y-Labyrinth besteht aus 3 gleichen Armen (30 cm lang, 10 cm breit, 16 cm hoch) in denen sich die Maus frei bewegen kann. Zu Beginn des Tests wird die Maus in einen der Arme gesetzt. Ihre Bewegung wird anschließend für 10 Minuten über ein automatisiertes Messsystem (Videomot 2, TSE Systems GmbH) registriert. In diesem Experiment wurden folgende Parameter bestimmt: Das Betreten der Gänge von der Gabelung aus (Gesamtzahl der Wechsel), die

Gesamtzahl der Eintritte in den Arm, von dem aus das Tier die Gabelung betrat (Gleicher Arm), die Gesamtzahl der Eintritte in den unmittelbar vorher aufgesuchten Arm (Vorheriger Arm) und die Gesamtzahl der Eintritte in den neuen, nicht unmittelbar vorherig aufgesuchten Arm (Neuer Arm). Ausgewertet wurde schließlich der prozentuale Anteil der Eintritte in einen Arm an der Gesamtzahl der Wechsel.

2.4.2.5 Offenfeld-Versuch

Der unter 2.4.1.3 beschriebene Offenfeld-Versuch wurde auch nach der chronischen THC-Behandlung genutzt, um eventuelle Unterschiede in der lokomotorischen Aktivität und dem Explorationsverhalten der Tiere zu untersuchen. In diesem Fall wurden die Mäuse für eine Stunde in das offene Feld gesetzt und ihr Verhalten mittels 16 x 16 Infrarot-Sensoren computergestützt aufgezeichnet und anschließend ausgewertet. Es wurden folgende Verhaltensparameter gemessen: Bewegungszeit (s), zurückgelegte Distanz (m), mittlere Geschwindigkeit (cm/s), Hyperaktivität (Zeit in Sekunden, die das Tier mit einer Geschwindigkeit höher als 20 cm/s verbringt) und Zahl der Aufrichtungen (Anzahl).

2.4.2.6 PCP-induzierte Hyperlokomotion

Phencyclidin (PCP) ist ein nicht-kompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptors. Die Applikation von PCP kann bei gesunden Menschen sowohl die Positiv- als auch die Negativsymptomatik einer Schizophrenie hervorrufen. Bei Mäusen kommt es durch Verabreichung von PCP zu verschiedenen Verhaltensänderungen. Die Erhöhung der lokomotorischen Aktivität wird hierbei als Indiz für schizophrenierelevante Positivsymptomatik angesehen.

Zur Untersuchung der PCP-Sensitivität wurde das gleiche Messsystem genutzt wie unter 2.4.2.5 „Offenfeld-Versuch“ beschrieben. Die Mäuse wurden einzeln in das offene Feld gesetzt und ihr Verhalten für eine Stunde aufgezeichnet. Nach einer Stunde wurde die Maus herausgenommen, gewogen und erhielt 3 mg/kg Körpergewicht PCP als intraperitoneale Injektion. Die Maus wurde dann umgehend wieder in das offene Feld zurückgesetzt und ihr Verhalten für eine weitere Stunde aufgezeichnet. Ausgewertet wurde die von den Mäusen zurückgelegte Distanz in Intervallen von 15 Minuten.

2.4.2.7 Porsolt-Test (Forced swimming test, behavioural despair test)

Mit dem Porsolt-Test kann depressives Verhalten in Mäusen beurteilt werden. Die Maus wird hierzu in ein mit 25°C warmem Wasser gefüllten Messzylinder gegeben. Die Menge des Wassers wird so gewählt, dass die Maus den Boden nicht erreichen kann, aber auch keine Möglichkeit hat, sich aus dem Messzylinder zu befreien. Die Konfrontation mit dieser ausweglosen, aversiven Situation bedingt zunächst fluchtorientiertes Verhalten, bevor die Tiere eine unbewegliche Körperhaltung einnehmen und sich treiben lassen, so dass nur noch die Nasenspitze über die Wasseroberfläche ragt. Die in dieser immobilen „Verzweiflungshaltung“ (*behavioral despair*) verbrachte Zeit kann durch die Gabe von Antidepressiva verkürzt werden. Die Immobilitätszeit wird daher als depressionsähnlicher Zustand gewertet.

Die Tiere wurden einzeln in den Messzylinder (35,5 cm hoch, 9 cm Durchmesser) gesetzt und ihr Verhalten für 6 Minuten beobachtet. Nach einer Gewöhnungszeit von 2 Minuten wurde die Zeit, in der sich die Maus während der vierminütigen Testphase immobil treiben ließ, mittels Stoppuhr festgehalten.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Schwanzspitzen von 0,5-1 cm Länge wurden direkt nach Amputation in 200 µl Lysispuffer und 2 µl Proteinase K über Nacht bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Um Schwebeteilchen zu sedimentieren wurden die Proben anschließend für 15 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Isopropanol wurde die Probe mehrfach invertiert, so dass die DNA als Fäden ausfiel. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, 15 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das resultierende Pellet zweimal mit 0,5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet bei 50°C getrocknet um die verbliebene Flüssigkeit zu evaporieren. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl Elutionspuffer für 30 min bei 50°C resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.5.2 Isolation von RNA aus Gewebepreparaten

Aus den Regionen Cerebellum, Cortex und Hippocampus erfolgte die RNA-Isolation mittels Homogenisierung in TRIzol[®] Reagenz. Es wurde mindestens 1 ml TRIzol[®] Reagenz pro 100 mg Probe benutzt, so dass das Probenvolumen weniger als 10 % des Gesamtvolumens betrug.

Zwischen den einzelnen Proben wurde der Homogenisator zweimal gründlich mit DEPC-Wasser gereinigt. Um eine gründliche Homogenisierung zu gewährleisten, wurde das Homogenisat 10 Mal mit einer Spritze durch eine 21 G Nadel gedrückt. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile durch einen ersten Zentrifugationsschritt (12000 g, 4°C, 10 min) abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abpipettiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde 1/10 der Ausgangsmenge TRIzol[®] an 1-Bromo-3-chloro-propan (BCP) hinzugefügt, für 30 Sekunden gevortext und schließlich für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt zur Phasenseparation (12000 g, 4°C, 10 min) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 2-Propanol (1/2 der Ausgangsmenge an TRIzol[®]) gefällt. Die Proben wurden hierzu kurz gevortext, bei RT für 10 Minuten inkubiert und zentrifugiert (12000 g, 4°C, 10 min). Nach zweimaligem Waschen mit 75 % Ethanol und anschließendem Zentrifugieren wurden die Proben für etwa 30 Minuten an der Luft getrocknet und in 30-100 µl DEPC-Wasser gelöst. Die RNA-Proben wurden anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5.3 Messung der Nukleinsäuren-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte mittels NanoDrop ND1000 Spektralphotometer. Das Prinzip beruht auf der Messung der spezifischen optischen Dichte (OD) der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration wurde wie folgt berechnet: RNA-Konzentration (ng/µl) = $OD_{260} \times 40$ (Faktor für RNA) bzw. DNA-Konzentration (ng/µl) = $OD_{260} \times 50$ (Faktor für DNA).

Die Reinheit der gemessenen Nukleinsäuren wird hierbei über den Quotienten 260 nm/280 nm bestimmt. Für DNA wird ein Quotient von etwa 1,8 als rein angesehen, für RNA ein Quotient von etwa 2,0. Weist der Quotient deutlich niedrigere Werte auf, dann spricht dies für eine Verunreinigung der Probe durch Phenole, Proteine oder andere Verunreinigungen, die eine starke Absorption bei 280 nm aufweisen.

2.5.4 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer spezifischen RNA-abhängigen DNA-Polymerase, kann aus RNA die dazu komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden. Um die enzymatische DNA-Synthese zu ermöglichen, wurde den Proben Oligo (dT) Primer zugesetzt. Dieser Primer lagert sich an den Poly-A-Schwanz der RNA an und ermöglicht so der Reversen Transkriptase den Synthesestart.

In dieser Arbeit wurden für jede Probe 2 µg RNA zur cDNA Synthese eingesetzt. Das entsprechende Volumen wurde mit DEPC-Wasser auf 10 µl adjustiert. Nachfolgend wurde in jeden Ansatz 1µl Oligo (dT) hinzugegeben und die Proben für 10 Minuten bei 70°C und dann für mindestens 3 Minuten bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurde zu jeder Probe folgender Mix hinzugefügt:

1 µl H₂O

4 µl 5x First St. Buffer

2 µl 0,1 M DTT

1 µl dNTP (10 mM)

Nachdem die Proben für 2 Minuten bei 42°C und für mindestens 3 Minuten bei 4°C inkubiert wurden, erfolgte die Zugabe von 1 µl Reverse Transkriptase. In einem letzten Schritt wurden die Proben für eine Stunde bei 42°C, für 15 Minuten bei 70°C und für mindestens 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Die cDNA wurde anschließend 1:5 verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.5 Polymerase-Kettenreaktion

2.5.5.1 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Die Real-time PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, ermöglicht aber durch Fluoreszenzmessungen während des PCR-Zyklus eine Quantifizierung des Reaktionsproduktes. In dieser Arbeit wurden spezifische TaqMan[®]-Assays genutzt, die zusätzlich zu den genspezifischen Primern auch Sonden enthalten, die zwischen den Primersequenzen binden. Diese Sonden tragen an ihrem 5'-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (6-FAM-phosphoramidit) und einen „Fluoreszenzauslöcher“, einen Quencher, am 3'-Ende. Bei einer intakten Sonde wird die Fluoreszenz des Reporters durch die Nähe zu dem Quencher unterdrückt. Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-

Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich Reporter und Quencher voneinander. Die Fluoreszenz kann somit nicht länger unterdrückt werden und steigt proportional zu dem freigewordenen Reporterfarbstoff und des gebildeten Reaktionsproduktes an.

Jedes Zielgen wurde unter Verwendung des folgenden Reaktionsansatzes bestimmt:

Reagenzien	Volumen
TaqMan Gene Expression Master Mix (10x)	10 µl
20x TaqMan [®] Gene Expression Assay	1 µl
H ₂ O	6,5 µl
cDNA	2,5 µl

Tabelle 5. Reaktionsansatz der quantitativen PCR

Die Reaktionsansätze wurden als Triplikate auf Eis in eine 384-Napf-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde die Platte 5 min bei 1500 rpm und 4°C (Multifuge 3 S-R, Heraeus) zentrifugiert.

Im ABI Prism 7000 Sequence Detection System erfolgte die quantitative Real-time PCR Messung unter Verwendung des folgenden Temperaturprofils:

Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
10 Minuten	95°C	1
10 Sekunden	95°C	} 40
1 Minute	60°C	

Tabelle 6. Reaktionsbedingungen der quantitativen RT-PCR

Die Messwerte der qRT-PCR wurden anschließend mittels der Analyse-Funktion der Software SDS 2.2.2 für eine relative Bestimmung der Gensequenz-Menge herangezogen. Dies erfolgte mittels des Detektionsschwellenwertes („threshold Cycle“-, CT-Wert), der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmals über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Für jede Probe wurde der CT-Wert der Zielgene sowie der eines Referenzgens, eines konstitutiv exprimierten Genes, bestimmt. Die Transkriptionshäufigkeit der Zielgene wurde wie folgt berechnet: $\Delta CT_{\text{Probe}} = CT(\text{Zielgen}_{\text{Probe}}) - CT(\text{Referenzgen})$.

Die unterschiedliche Expression kann unter der Annahme, dass die PCR-Reaktionen gleich effizient ablaufen, mit Hilfe des $\Delta\Delta CT$ -Wertes bestimmt werden. Hierzu werden die ΔCT -Werte der Kontrollgruppe als Referenz gesetzt und die Zielgene darüber normalisiert. Die relative mRNA-Expression berechnet sich dann wie folgt: $x\text{-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.5.6 Genotypisierung der Mäuse

2.5.6.1 Herstellung einer genspezifischen Sonde

Da es sich bei den Mäusen um heterozygote Träger des G72-Gens, das mittels Pronukleusinjektion des BAC-Klons RP11-111A8 eingebracht wurde, handelt, ist es möglich die transgenen Mäuse durch eine Dig-markierte BAC-Sonde von den Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden.

Als Primer wurden benutzt:

Primer forward: BAC South F 5'-AGT TAG CTG TGC CTG ACC TCG-3'
 Primer reversed: BAC South R 5'-TGA AAG CTC TCA TCG GTC CTG-3'

Sonden PCR (Ansatz 50 µl):

- 1 µl humane DNA (ca. 100 ng)
- 2 µl Primer forward
- 2 µl Primer reversed
- 5 µl 10x Thermopol Buffer
- 5 µl PCR Dig labeling Mix
- 1 µl TaqPolymerase
- 34 µl H₂O

Temperaturprofil:

Stufe	Anzahl der Zyklen		
I	1x	94°C	5 Minuten
II	5x	94°C	45 Sekunden
		60°C	45 Sekunden
		Absenken der Temperatur um 1°C/Zyklus	
		72°C	7 Minuten
III	30x	94°C	45 Sekunden
		55°C	45 Sekunden
		72°C	45 Sekunden
IV	1x	72°C	7 Minuten
V	1x	4°C	∞

Tabelle 7. Reaktionsbedingungen der PCR zur Herstellung einer genspezifischen Sonde

Das Reaktionsprodukt wurde anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, das zu erwartende Fragment bei 300bp nachgewiesen und die Probe anschließend mit dem PCR-Aufreinigungskit von Roche nach Herstellerangabe aufgereinigt.

2.5.6.2 Dot blot-Hybridisierung

Zur Identifizierung der heterozygoten G72-transgenen Tiere wurde eine Dot blot-Hybridisierung unter Verwendung der in 2.5.6.1 beschriebenen BAC-Sonde durchgeführt. Der Dot blot ist eine vereinfachte Variante des Southern Blots und wird genutzt, um spezifische DNA-Sequenzen zu detektieren. Im Gegensatz zum Southern Blot müssen die Proben hierfür nicht zuerst aufgetrennt werden, sondern werden als Punkt („dot“) auf eine Membran („blot“) aufgetragen.

Zuerst wurde ein 2 x 2 cm großes Netz auf eine Nytran N Membran gezeichnet. Für jedes Tier wurden dann 15 µl denaturierte DNA in die Mitte eines Kästchens gegeben. Die Nytran N Membran wurde anschließend für 15 Minuten bei 37°C getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (1200 µJoule x 100) kovalent an die Nylonmembran gebunden. Die Membran wurde in eine Hybridisierungsflasche überführt und bei 68°C mit 10 ml Hybridisierungslösung und 80 µl gescherter und denaturierter Lachssperma-DNA für 1-2 Stunden inkubiert. Daraufhin erfolgte die Hybridisierung mit der denaturierten Dig-markierten Sonde (Endkonzentration 20 ng/ml) über Nacht. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit der Waschlösung 1 und dreimal für 10 Minuten bei 68°C mit Waschlösung 2 gewaschen. Daraufhin wurde die Membran fünf Minuten in Maleinsäurepuffer gespült und anschließend, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, für eine Stunde in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde Anti-Dig-AP (1:20000) hinzugegeben und die Membran für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen wurde die Membran nachfolgend dreimal für 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. In einem nächsten Schritt wurde die Membran für 5 Minuten in Detektionspuffer äquilibriert. Schließlich erfolgte die Zugabe von CDP-Star, 1:100 gelöst in Detektionspuffer, in dem die Membran für fünf Minuten geschwenkt wurde. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien in eine Röntgenkassette gelegt. Überschüssige Flüssigkeit und Luftblasen wurden vorsichtig entfernt. Ein Autoradiographiefilm wurde aufgelegt und nach einer Stunde in einer automatisierten Entwicklermaschine entwickelt.

2.5.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Kleine Moleküle wandern bedingt durch den Molekularsiebeffekt schneller durch das Gel als größere. Die Größe der einzelnen Fragmente kann dann durch Verwendung eines Größenstandards abgeschätzt werden.

In dieser Arbeit wurden 1,5%ige Agarosegele genutzt. Hierfür wurde Agarose in TAE-Puffer aufgekocht. Das Gemisch wurde anschließend in eine Gelkammer gegossen und der Kamm zur Bildung der Probenaschen eingeschoben. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer überführt. Zu den DNA-Proben wurde das 0,1fache Volumen an Probenpuffer hinzugegeben und die Proben sowie ein Größenstandard in die Taschen pipettiert. Die Gelkammer wurde anschließend verschlossen und für 50-70 Minuten eine Spannung von 90 V angelegt. Um die unterschiedlichen Fragmente im Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel vor Betrachten in Ethidiumbromid geschwenkt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der doppelsträngigen DNA und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht. Die DNA-Ethidiumbromid-Komplexe konnten im Gel mittels UV-Transilluminator visualisiert und unter Verwendung einer PC-gesteuerten CCD-Kamera digital dokumentiert werden.

2.6 Statistische Methoden

Die deskriptive Statistik erfolgte anhand von Mittelwerten und deren Standardfehlern (SEM). Alle Rohdaten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL (Microsoft) aufgelistet und mit der Statistiksoftware Prism 4 oder STATISTICA ausgewertet. Paarweise Mittelwertsvergleiche wurden mit *Student's t-Test* auf statistische Signifikanz überprüft. Bei der Analyse von mehr als zwei Parametern, wurde entweder eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) oder bei gestuften Parametern eine zwei- bzw. dreifaktorielle ANOVA durchgeführt. Nach der einfaktoriellen ANOVA wurde je nach Bedarf ein *Bonferroni post-hoc* Mittelwertsvergleich durchgeführt. Nach mehrfaktorieller ANOVA wurde je nach Bedarf ein *Bonferroni post-hoc* Mittelwertsvergleich oder ein *LSD Fisher* Vergleich durchgeführt.

Bei den jeweiligen Testverfahren wurden Unterschiede dann als signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ wurden die Unterschiede als stark signifikant, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ als hoch signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Verhaltenstest und der Genexpression grafisch dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte der erhaltenen Daten und deren Standardfehler (SEM).

3.1 Verhaltensversuche

3.1.1 Untersuchung der akuten Δ^9 -THC-Empfindlichkeit

Die akute Δ^9 -THC-Empfindlichkeit wurde mit einer Tetrade aus Verhaltenstest beurteilt. Im Einzelnen wurden Veränderungen in der Spontanaktivität, der Körpertemperatur, kataleptischem Verhalten und Reaktionen auf Schmerzreize gemessen. Verglichen wurden G72-transgene Tiere mit Wildtyptieren im Alter von 4 Wochen und im Alter von 8 Wochen unter der Behandlung mit 20 mg/kg KG THC, 10 mg/kg KG THC und dem korrespondierenden Vehikel.

3.1.1.1 Akute Δ^9 -THC-Empfindlichkeit im Alter von 4 Wochen

Vor Injektion der Cannabinoid- oder Vehikellösung wurden die Tiere gewogen. Es zeigten sich hierbei keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (ANOVA: $F_{5,65}=1,43$, $p > 0,05$).

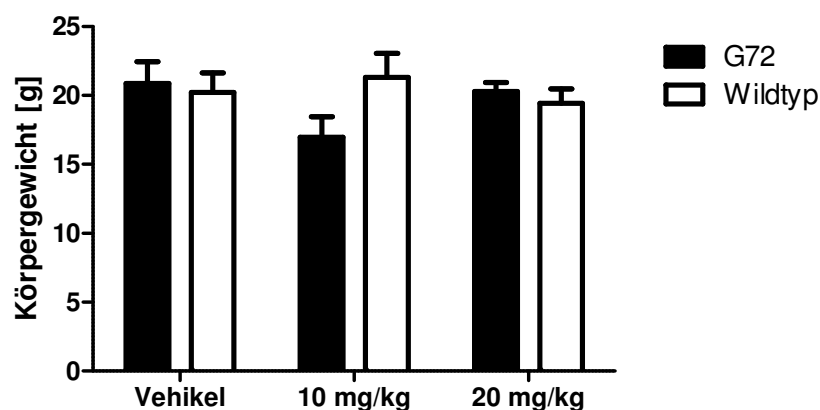


Abb. 7. Körpergewicht der G72-transgenen und Wildtypiere vor Injektion einer Cannabinoid- oder Vehikellösung. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($n = 10-12$).

Die Messung der lokomotorischen Aktivität im offenen Feld erfolgte 30 Minuten nach der Cannabinoid- oder Vehikelapplikation über eine Zeit von zehn Minuten. Es ergaben sich

signifikante dosisabhängige Effekte sowohl auf die von den Tieren zurückgelegte Distanz (zweifaktorielle ANOVA: $F_{2,60} = 3,54$; $p < 0,05$) als auch auf die Zeit, in der sich die Tiere bewegten (zweifaktorielle ANOVA: $F_{2,60} = 10,42$, $p < 0,001$). Der Genotyp hatte weder auf die zurückgelegte Distanz (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,60} = 0,14$, $p > 0,05$) noch auf die in Bewegung verbrachte Zeit (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,60} = 0,004$, $p > 0,05$) Einfluss. Interaktionseffekte fanden sich weder für die zurückgelegte Distanz (zweifaktorielle ANOVA $F_{2,60} = 1,30$, $p > 0,05$) noch für die in Bewegung verbrachte Zeit (zweifaktorielle ANOVA $F_{2,60} = 1,26$, $p > 0,05$).

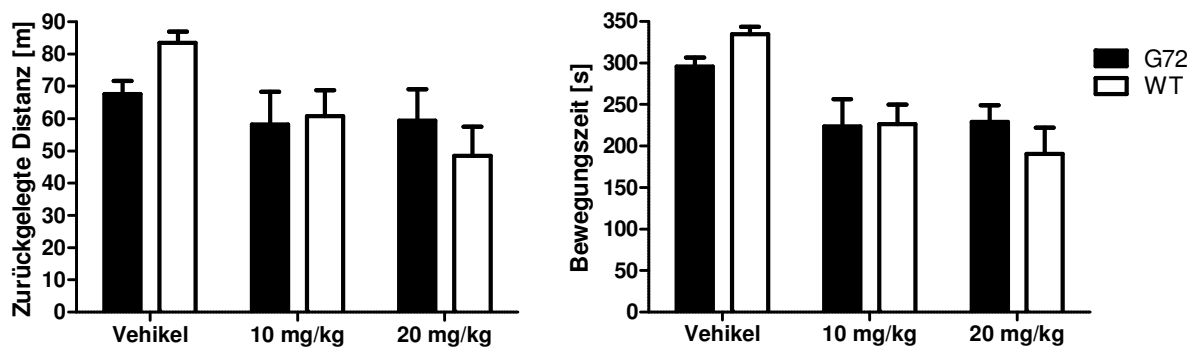


Abb. 8. Dosisabhängige Reduktion der lokomotorischen Aktivität. Die Reduktion der zurückgelegten Distanz ist über die Dosierungen hinweg signifikant ($p < 0,05$), die Reduktion der Bewegungszeit ist als hoch signifikant ($p < 0,001$) zu werten. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen ergeben sich nicht ($n = 10-12$).

Unmittelbar anschließend, 40 Minuten nach der Injektion, wurden die Tiere auf ihr kataleptisches Verhalten hin untersucht. Hierzu wurde der Ring-Katalepsie-Test genutzt und die bewegungslos verbrachte Zeit während einer Testzeit von 4 Minuten erfasst. Die Mäuse zeigten unter zunehmenden THC-Dosen eine hoch signifikante Zunahme der kataleptischen Zeit (zweifaktorielle ANOVA: $F_{2,46} = 130,1$, $p < 0,001$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ergab sich in der zweifaktoriellen ANOVA nicht: $F_{1,46} = 0,29$, $p > 0,05$. Ebenso konnte keine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung in der zweifaktoriellen ANOVA festgestellt werden: $F_{2,46} = 0,36$, $p > 0,05$.

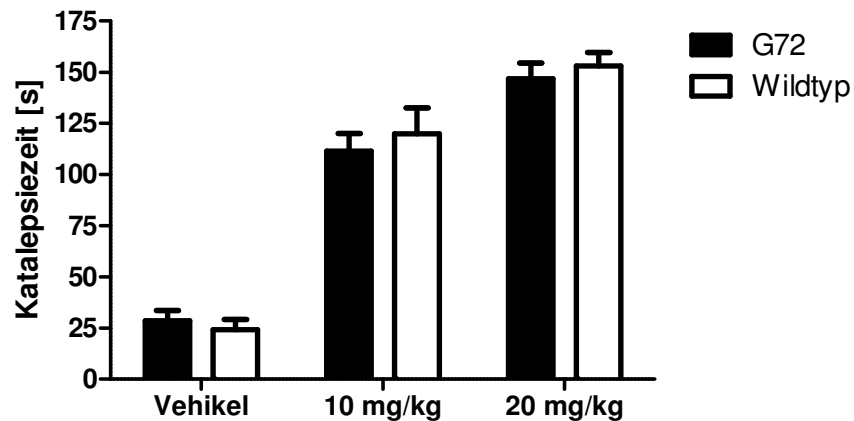


Abb. 9. Zunahme des kataleptischen Verhaltens unter zunehmenden THC-Dosen. Bestimmung der kataleptischen Zeit 40 Minuten *post injectionem*. Unter zunehmenden Dosen zeigte sich eine hoch signifikante Zunahme der Katalepsiezeit ($p < 0,001$). Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen ergaben sich nicht ($n = 8-10$).

Die Schmerzempfindlichkeit der Tiere wurde 45 Minuten nach der Cannabinoid- bzw. Vehikelinjektion mittels Wärmeplattenversuch getestet. Hierfür wurde die erste schmerzbedingte Reaktion auf die auf 55°C erhitzte Wärmeplatte ausgewertet. In diesem Paradigma zeigte sich eine hoch signifikante Zunahme der Reaktionslatenz auf den Schmerzreiz (zweifaktorielle ANOVA: $F_{2,60} = 9,91$, $p < 0,001$). Einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen bzw. eine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung gab es nicht (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,60} = 2,19$, $p > 0,05$ bzw. $F_{2,60} = 1,62$, $p > 0,05$).

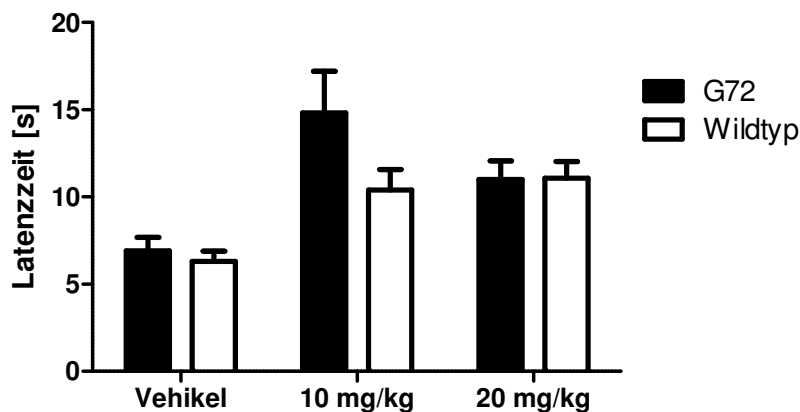


Abb. 10. Schmerzverhalten der G72- und Wildtypmäuse 45 Minuten nach Injektion. Hoch signifikante Zunahme ($p < 0,001$) der Reaktionslatenz ohne Unterschiede zwischen den Genotypen ($p > 0,05$, $n = 10-12$).

Zuletzt wurde die Körpertemperatur der Tiere unmittelbar vor und 46 Minuten nach Cannabinoid- bzw. Vehikelinjektion bestimmt und aus den Werten die Differenz gebildet. Es zeigte sich eine hoch signifikante Abnahme der Körpertemperatur unter steigenden THC- Dosen

(zweifaktorielle ANOVA: $F_{2,60} = 47,48$, $p < 0,001$). Ein Unterschied zwischen den Genotypen sowie ein Interaktionseffekt konnten nicht ermittelt werden (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,60} = 0,013$, $p > 0,05$ bzw. $F_{2,60} = 2,45$, $p > 0,05$).

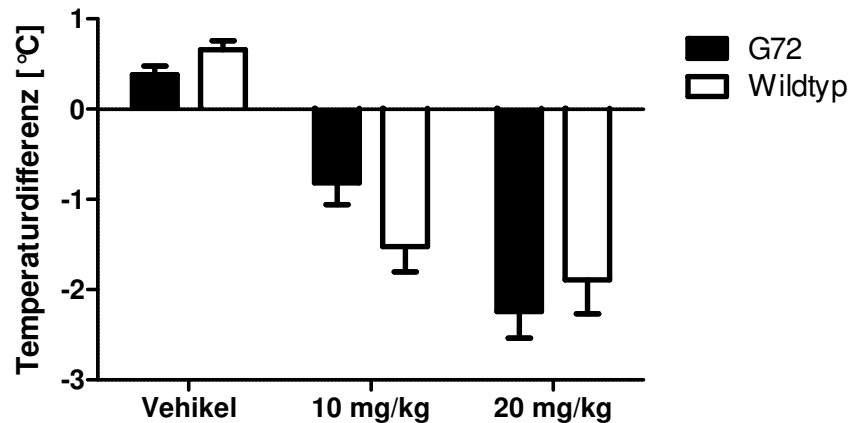


Abb. 11. Cannabinoidvermittelte Hypothermie 46 Minuten *post injectionem*. Es zeigte sich eine hoch signifikante Abnahme der Körpertemperatur unter zunehmenden Cannabinoid Dosen ($p < 0,001$) ohne Genotypeneffekte ($p > 0,05$, $n = 10-12$).

3.1.1.2 Akute Δ^9 -THC-Empfindlichkeit im Alter von 8 Wochen

Um gewichtsbedingte Unterschiede in der THC-Empfindlichkeit auszuschließen, wurden die Tiere vor Injektion der Cannabinoid- bzw. Vehikellösung gewogen. Signifikante Gewichtsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (ANOVA: $F_{5,64} = 0,29$, $p > 0,05$) zeigten sich nicht.

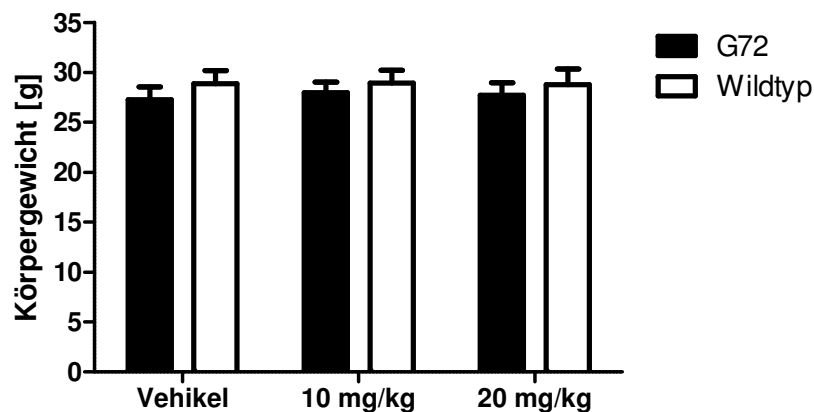


Abb. 12. Körpergewicht der 8 Wochen alten Tiere vor Vehikel- oder Cannabinoidinjektion. Signifikante Unterschiede zeigten sich nicht ($n = 10-12$).

Die Messung der lokomotorischen Aktivität im offenen Feld erfolgte 30 Minuten nach der Cannabinoid- oder Vehikelapplikation über eine Zeit von zehn Minuten. Es zeigten sich hierbei stark signifikante dosisabhängige Effekte sowohl auf die von den Tieren zurückgelegte Distanz (zweifaktorielle ANOVA: $F_{2,59} = 6,53$; $p < 0,01$) als auch auf die Zeit, in der sich die Tiere bewegten (zweifaktorielle ANOVA: $F_{2,59} = 14,95$, $p < 0,001$). Der Genotyp hatte weder auf die zurückgelegte Distanz (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,59} = 0,087$, $p > 0,05$) noch auf die in Bewegung verbrachte Zeit (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,59} = 0,30$, $p > 0,05$) Einfluss. Interaktionseffekte konnten weder für die zurückgelegte Distanz (zweifaktorielle ANOVA: $F_{2,59} = 0,17$, $p > 0,05$) noch für die in Bewegung verbrachte Zeit (zweifaktorielle ANOVA: $F_{2,59} = 0,47$, $p > 0,05$) festgestellt werden.

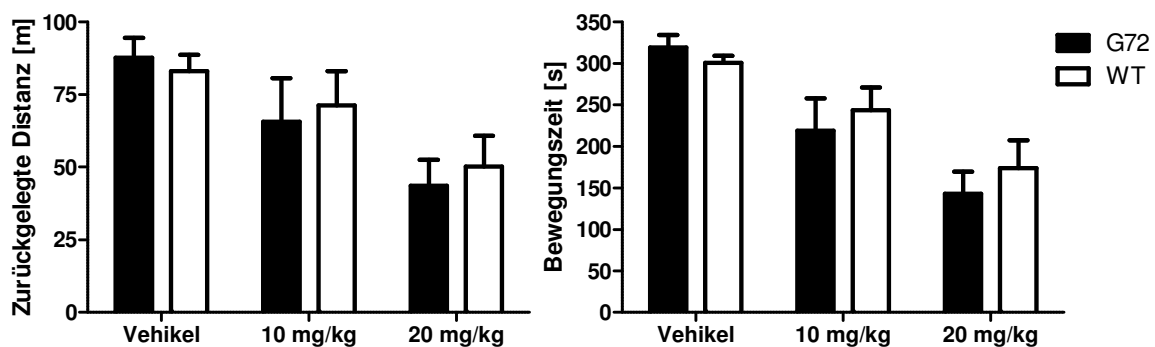


Abb. 13. Locomotorische Aktivität der 8 Wochen alten Mäuse 30 Minuten nach Cannabinoidinjektion. Die Reduktion der zurückgelegten Distanz war stark signifikant ($p < 0,01$), die Reduktion der Bewegungszeit hoch signifikant ($p < 0,001$). Der Genotyp beeinflusste die lokomotorische Aktivität nicht ($n = 10-12$).

40 Minuten nach der Injektion wurden auch die 8 Wochen alten Tiere auf ihr kataleptisches Verhalten hin untersucht. Die Mäuse zeigten unter zunehmenden THC-Dosen eine hoch signifikante Zunahme der kataleptischen Zeit (zweifaktorielle ANOVA: $F_{2,50} = 72,61$, $p < 0,001$). Über die verschiedenen THC-Dosierungen ergab sich kein signifikanter Genotypunterschied (zweifaktorielle ANOVA $F_{1,50} = 0,059$, $p > 0,05$). Ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen Genotyp und Behandlung konnte nicht festgestellt werden (zweifaktorielle ANOVA $F_{2,50} = 0,94$, $p > 0,05$).

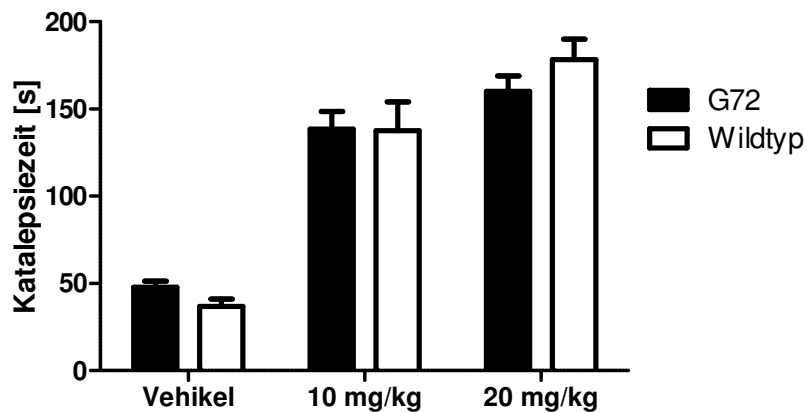


Abb. 14. Zunahme des kataleptischen Verhaltens in 8 Wochen alten Tieren unter zunehmenden THC-Dosen. Unter zunehmenden Dosen zeigte sich eine hoch signifikante Zunahme der Katalepsiezeit ($p < 0,001$, $n = 8-10$).

Im 45 Minuten nach der Injektion durchgeführten Wärmeplattenversuch zeigte sich eine hoch signifikante Zunahme der Reaktionslatenz auf den lokal applizierten Schmerzreiz (zweifaktorielle ANOVA: $F_{2,59} = 21,53$, $p < 0,001$). Überdies ergab sich eine signifikant verzögerte Schmerzreaktion der G72-transgenen gegenüber den Wildtypmäußen (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,59} = 5,59$, $p < 0,05$). Im *post-hoc* Test konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den G72-transgenen und den Wildtypmäußen für Applikation von 20 mg/kg KG gezeigt werden ($p < 0,05$). Signifikante Interaktionen zwischen Genotyp und Behandlung ergaben sich nicht (zweifaktorielle ANOVA: $F_{2,59} = 0,82$, $p > 0,05$).

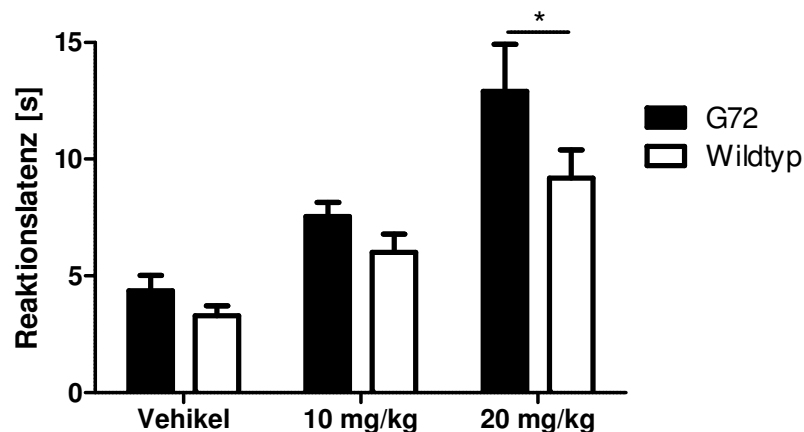


Abb. 15. Schmerzreaktion der G72- und Wildtypmäuse im Alter von 8 Wochen. Es zeigte sich eine hoch signifikante Zunahme der Reaktionslatenz unter zunehmenden THC-Dosen. Zusätzlich konnte eine signifikant verlangsamte Reaktion der G72-Tiere gegenüber den Wildtypen beobachtet werden ($p < 0,05$). * $p < 0,05$ für den Vergleich von G72-transgenen zu Wildtypmäußen bei 20 mg/kg ($n = 10-12$).

Als letztes Paradigma der Tetrade wurde die Temperatur der Tiere unmittelbar vor und 46 Minuten nach Cannabinoid- bzw. Vehikelinjektion bestimmt. Es zeigte sich eine hoch signifikante Abnahme der Körpertemperatur unter steigenden THC-Dosen (zweifaktorielle ANOVA: $F_{2,59} = 33,17$, $p < 0,001$). Ein Unterschied zwischen den Genotypen bzw. ein Interaktionseffekt konnten nicht ermittelt werden (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,59} = 0,042$, $p > 0,05$ bzw. $F_{2,59} = 0,21$, $p > 0,05$).

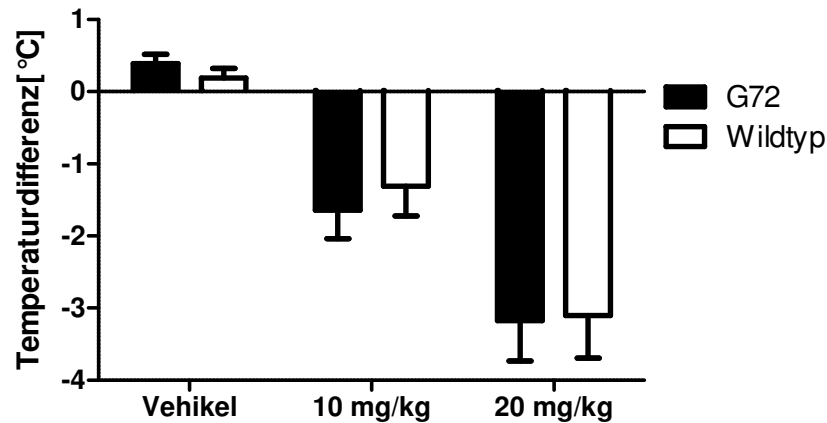


Abb. 16. Hypotherme Reaktion der Tiere nach Cannabinoidbehandlung. Es zeigte sich eine hoch signifikante Abnahme der Körpertemperatur mit steigender THC-Dosierung ($p < 0,001$). Zwischen den Genotypen fanden sich keine signifikanten Unterschiede ($n = 10-12$).

3.1.2 Ergebnisse der chronischen Cannabinoidbehandlung

Da sich unter der chronischen Cannabinoidbehandlung geschlechtsspezifische Unterschiede zeigten, wurden die Verhaltensversuche grundsätzlich jeweils für weibliche und männliche Tiere getrennt betrachtet.

3.1.2.1 Beeinflussung des Körpergewichts durch chronische Cannabinoidbehandlung

Das Körpergewicht der Tiere wurde über 8 Wochen hinweg erfasst. Während die anfänglichen Gewichtskontrollen noch zeitgleich mit den Injektionen an jedem 2. Tag stattfanden, wurden nach pd 49 wöchentliche Kontrollen durchgeführt. Die Daten wurden für Geschlecht und Genotyp getrennt ausgewertet.

Die männlichen THC-behandelten Wildtypiere (Abb. 17A) zeigten einen stark signifikanten Behandlungseffekt gegenüber den Vehikel-behandelten Wildtypieren (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,41} = 8,34$, $p < 0,01$). Ebenso zeigte sich ein hoch signifikanter Interaktionseffekt zwischen Behandlung und Zeit (zweifaktorielle ANOVA $F_{18,738} = 2,43$, $p < 0,001$). In *post-hoc* Vergleichen

ergaben sich stark signifikante Unterschiede an pd 25, 27, 29 und 31 ($p < 0,01$) und signifikante Unterschiede an Tag 35 ($p < 0,05$).

Die weiblichen THC-behandelten Wildtyptiere zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede zu den Vehikel-behandelten Mäusen (Abb. 17B).

Die männlichen THC-behandelten G72-transgenen Mäuse (Abb. 17C) zeigten gegenüber den Vehikel-behandelten G72-transgenen Mäusen einen signifikanten Interaktionseffekt zwischen Behandlung und Zeit (zweifaktorielle ANOVA: $F_{18,702} = 1,702$, $p < 0,05$). *Post-hoc* Tests dieser Messdaten ergaben keine signifikanten Unterschiede.

Die weiblichen G72-transgenen Mäuse (Abb. 17D) zeigten keinen signifikanten Behandlungseffekt (zweifaktorielle ANOVA $F_{1,40} = 3,26$, $p > 0,05$). Zwischen Zeit und Behandlung ergab sich jedoch ein hoch signifikanter Effekt ($F_{18,720} = 4,19$, $p < 0,001$). *Post-hoc* Vergleiche dieser Daten ergaben eine signifikante Gewichtsabnahme der THC-behandelten Tiere an pd 23 und 29 ($p < 0,05$) sowie stark signifikante Werte für pd 25 und 27 ($p < 0,01$).

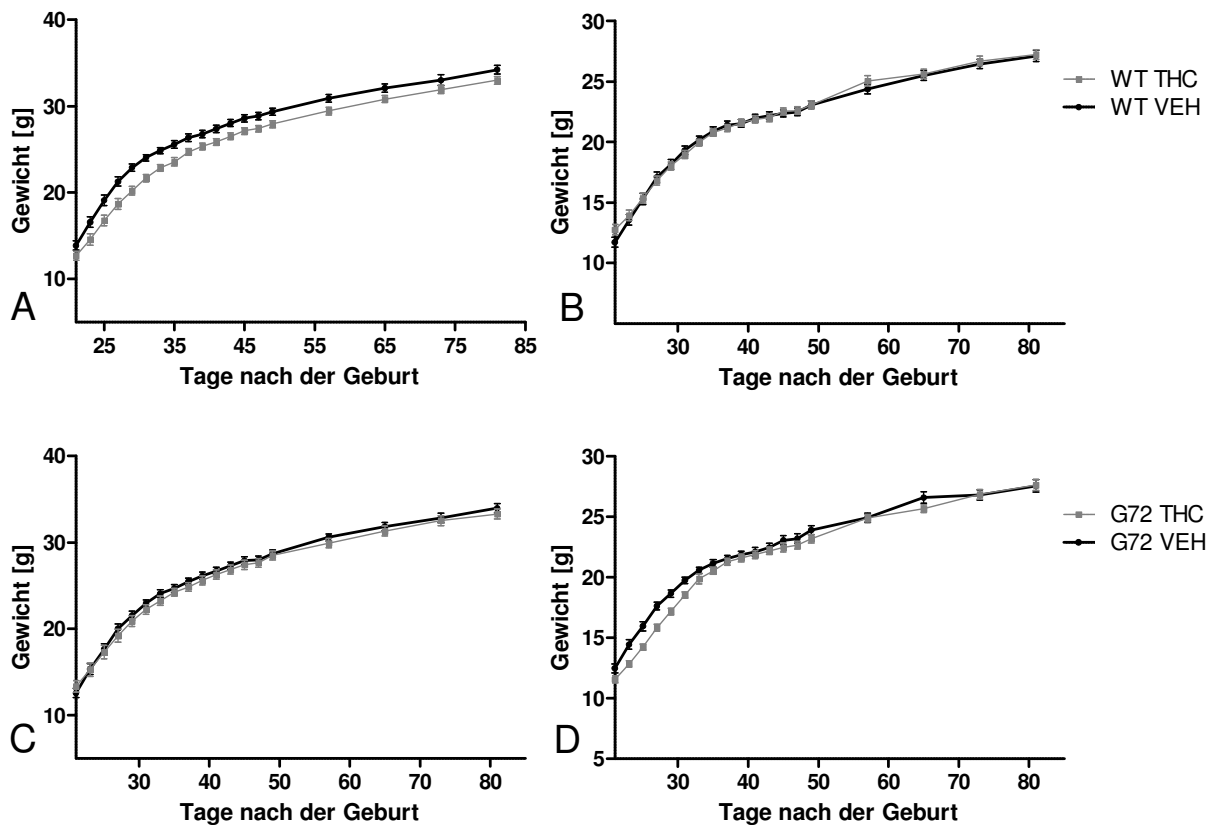


Abb. 17. Gewichtsveränderungen der G72-transgenen und Wildtypmäuse unter chronischer THC-Behandlung (n = 20-22). **A.** Männliche Wildtypmäuse zeigten hoch signifikante Interaktionseffekte ($p < 0,001$) und stark signifikante Behandlungseffekte ($p < 0,01$). **B.** Die weiblichen WT-Mäuse zeigten keine signifikanten Gewichtsunterschiede. **C.** Bei männlichen G72-Mäusen ergaben sich signifikante Interaktionseffekte ($p < 0,05$) zwischen Behandlung und Zeit. **D.** Weibliche G72-Mäuse wiesen hoch signifikante Interaktionseffekte auf ($p < 0,001$).

3.1.2.2 Drehstab-Versuch (Rota-rod-Versuch)

Der Drehstab-Versuch wurde genutzt, um die motorischen Fähigkeiten und das motorische Lernen der vier Monate alten Tiere näher zu untersuchen.

Im Rota-rod-Versuch zeigte sich für die männlichen Tiere ein hoch signifikanter Genotypeneffekt (zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen ANOVA: $F_{1,79} = 20,62$, $p < 0,001$). Die Genotypen wurden daraufhin einzeln betrachtet. Sowohl für die männlichen Wildtypmäuse als auch für die männlichen G72-transgenen Mäuse konnte ein hoch signifikantes Lernverhalten beobachtet werden (zweifaktorielle ANOVA $F_{9,378} = 16,24$, $p < 0,001$, bzw. $F_{9,333} = 18,97$, $p < 0,001$), ein signifikanter Effekt der Cannabinoid-behandlung war für beide Genotypen nicht erkennbar.

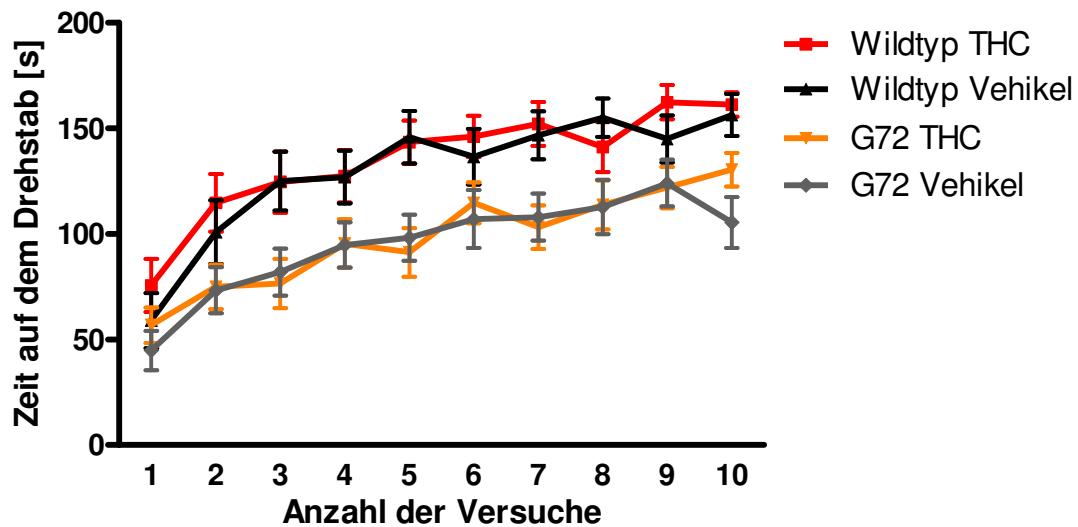


Abb. 18. Motorische Defizite der G72-transgenen männlichen Mäuse im Drehstab-Versuch (n = 19-22). Es zeigte sich zwischen den Gruppen ein hoch signifikanter Genotypeneffekt ($p < 0,001$). Isoliert betrachtet zeigten sowohl die G72-transgenen als auch die Wildtypmäuse hoch signifikantes motorisches Lernen ($p < 0,001$). Die Cannabinoidbehandlung hatte keinen Einfluss auf das motorische Verhalten der Tiere.

Die weiblichen Mäuse zeigten sowohl einen stark signifikanten Effekt des Genotyps (zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen $F_{1,77} = 10,11$, $p < 0,01$) als auch einen stark signifikanten Effekt des Genotyps über die Zeit (ANOVA $F_{9,693} = 2,50$, $p < 0,01$).

Die isolierte Betrachtung der Genotypen ergab sowohl für die Wildtyp- als auch für die G72-transgenen Mäuse ein hoch signifikantes Lernverhalten ($F_{9,324} = 23,43$, $p < 0,001$ bzw. $F_{9,369} = 22,52$, $p < 0,001$). Ein signifikanter Einfluss der Cannabinoidbehandlung auf die motorischen Fähigkeiten der Mäuse zeigte sich auch bei den weiblichen Mäusen nicht.

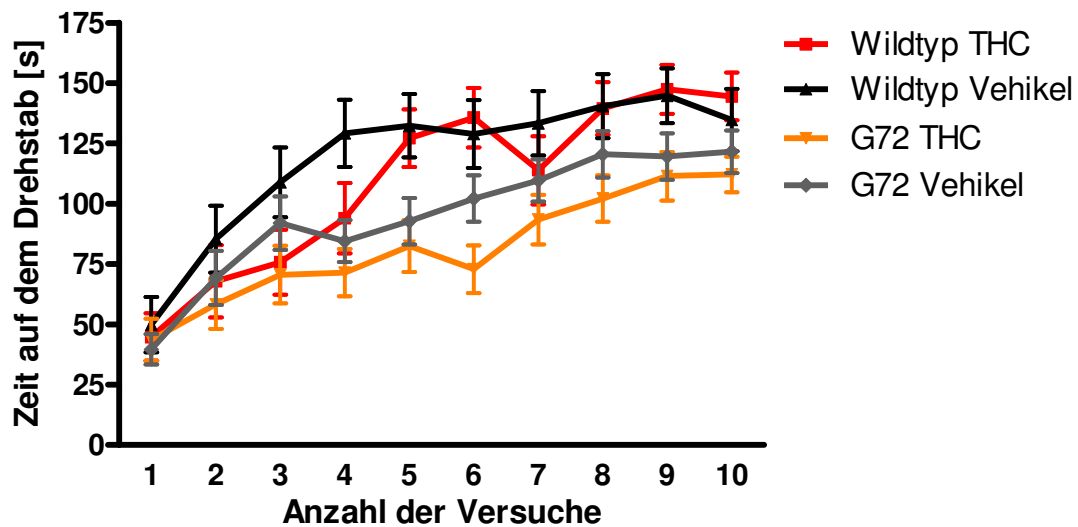


Abb. 19. Motorische Defizite der G72-transgenen weiblichen Mäuse im Drehstab-Versuch (n = 19-22). Die Wildtypmäuse konnten sich signifikant länger auf dem Drehstab halten (Genotypeneffekt: $p < 0,01$). Isoliert betrachtet konnte für beide Genotypen ein hoch signifikanter Lerneffekt gezeigt werden ($p < 0,001$). Die Cannabinoidbehandlung hatte keine Auswirkung auf die motorischen Fähigkeiten.

3.1.2.3 Sozialer Interaktionstest

Um den Einfluss der THC-Gabe auf das soziale Verhalten der Mäuse zu untersuchen, wurde der soziale Interaktionstest durchgeführt. Hierzu wurde das Verhalten der Versuchsmaus gegenüber einer ihr bisher unbekanntem gleichgeschlechtlichen Maus, einem unbelebten Objekt sowie das Eigenverhalten der Maus über einen Zeitraum von fünf Minuten ausgewertet.

Hier zeigte sich für die männlichen Tiere nach der chronischen THC-Behandlung weder eine signifikante Beeinflussung des freundlichen sozialen Verhaltens (Abb. 20B, zweifaktorielle ANOVA $F_{1,36} = 2,31$, $p > 0,05$), noch eine signifikante Beeinflussung der Aggressivität (Abb. 20A, zweifaktorielle ANOVA $F_{1,36} = 0,99$, $p > 0,05$). Zwischen den Genotypen fanden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung ließ sich ebenfalls nicht finden.

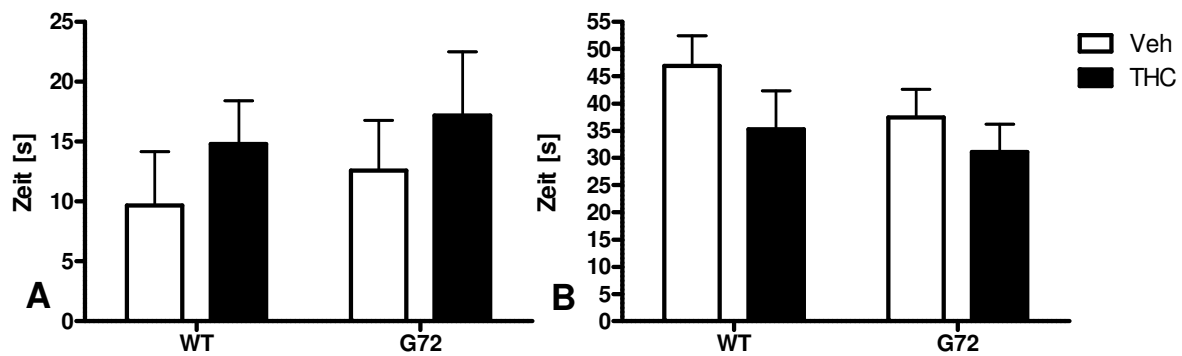


Abb. 20. Sozialverhalten der männlichen Mäuse im Alter von 5 Monaten (n = 9-11). Es ergaben sich weder signifikante Beeinflussungen durch die chronische THC-Gabe noch durch den Genotyp für das aggressive Verhalten (A) und für das freundlich soziale Verhalten (B).

Für das Eigenverhalten der männlichen Tiere zeigte sich weder eine Beeinflussung des Buddelverhaltens (Abb. 21A) noch eine Beeinflussung der Interaktionszeit mit einem Objekt (Abb. 21C). Das Putzverhalten wurde allerdings durch die chronische THC-Gabe signifikant erhöht (Abb. 21B, zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,36} = 5,81$, $p < 0,05$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen bzw. ein Interaktionseffekt zwischen Genotyp und Behandlung konnte für das Putzverhalten nicht gezeigt werden (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,36} = 0,26$, $p > 0,05$ bzw. $F_{1,36} = 0,41$, $p > 0,05$). *Post-hoc* Tests dieser Messdaten ergaben keine signifikanten Unterschiede.

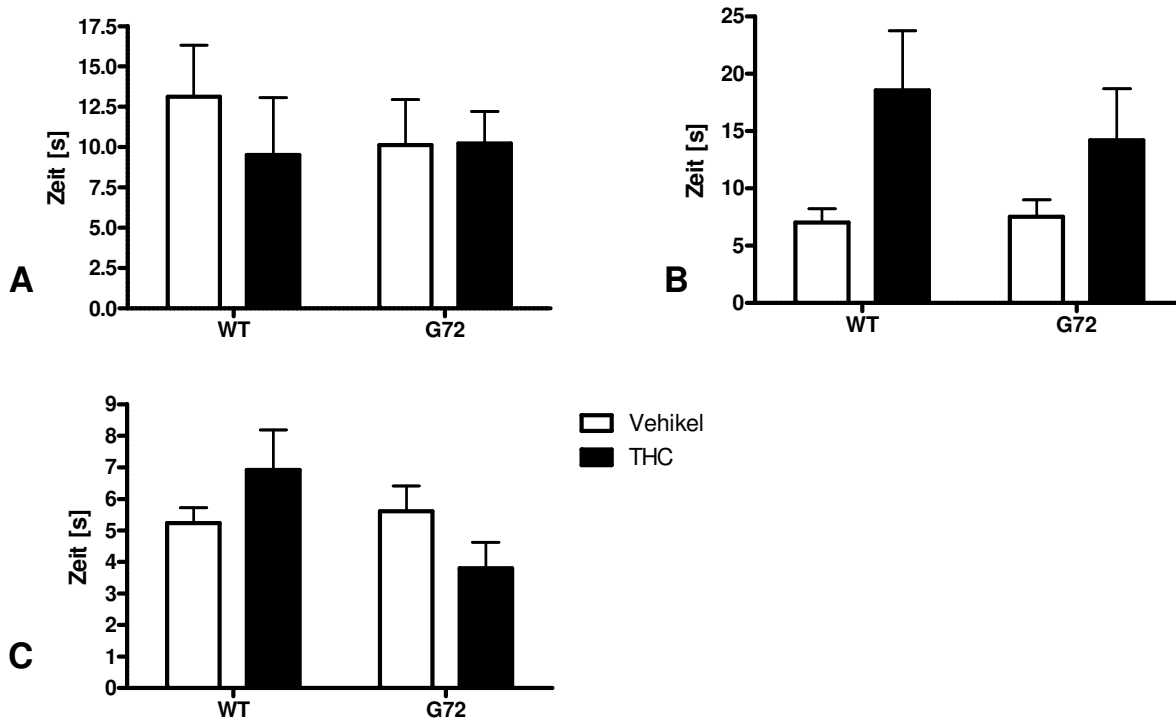


Abb. 21. Beeinflussung des Buddelverhaltens (A), der Fellpflege (B) und der Interaktion mit einem Objekt (C) der männlichen Mäuse nach chronischer THC-Gabe in der Adoleszenz (n = 9-11). Weder für das Buddelverhalten noch für die Interaktion mit einem Objekt zeigten sich signifikante Veränderungen. Die mit der Fellpflege verbrachte Zeit wurde durch die THC-Behandlung signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Für die weiblichen Tiere konnte ebenfalls keine Beeinflussung des freundlich sozialen Verhaltens durch die THC-Behandlung festgestellt werden. Es ergab sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (zweifaktorielle ANOVA $F_{1,37} = 4,61$, $p < 0,05$). Aggressives Verhalten bestand bei weiblichen Tieren praktisch nicht.

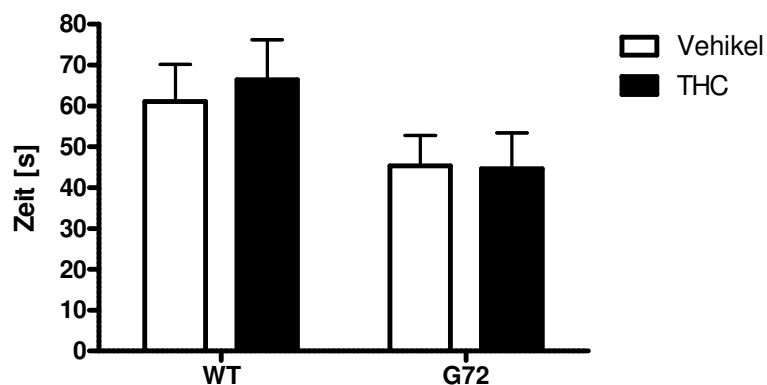


Abb. 22. Freundliches Sozialverhalten der weiblichen Mäuse im Alter von 5 Monaten (n = 9-11). Es zeigte sich ein signifikanter Genotypeneffekt zwischen den G72-transgenen und den Wildtypmäusen ($p < 0,05$).

Für das Eigenverhalten der weiblichen Mäuse zeigte sich weder eine Beeinflussung des Buddelverhaltens (Abb. 23A), der Fellpflege (Abb. 23B) noch der Interaktionszeit mit einem Objekt (Abb. 23C) nach chronischer THC-Gabe.

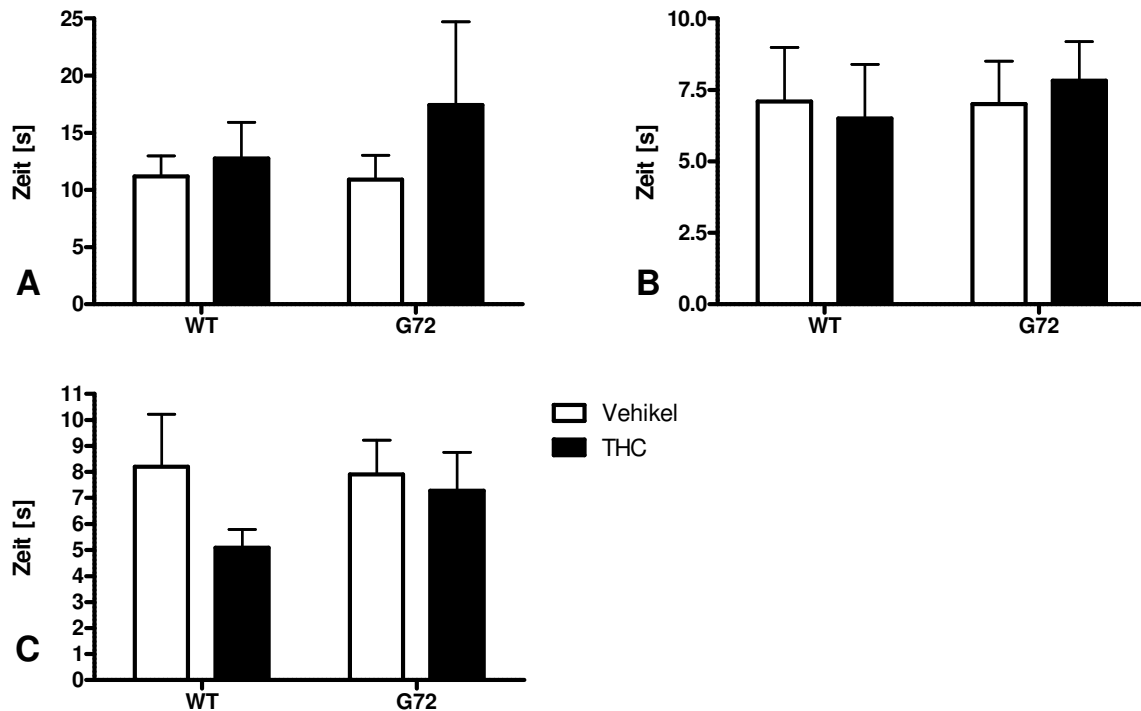


Abb. 23. Beeinflussung des Buddelverhaltens (A), der Fellpflege (B) und der Interaktion mit einem Objekt (C) der weiblichen Mäuse nach chronischer THC-Gabe in der der Adoleszenz (n = 9-11). Es ergaben sich keine signifikanten Effekte.

3.1.2.4 Beeinflussung des Angstverhaltens im O-Labyrinth-Versuch

Um zu bestimmen, ob sich die langfristige THC-Gabe in der Adoleszenz auf das Angstverhalten auswirkt, wurde das Verhalten der Tiere im offenen Bereich des O-Labyrinthes ausgewertet. Eine Verminderung der im offenen Bereich verbrachten Zeit wird als eine erhöhte Ängstlichkeit ausgelegt.

Bei den männlichen Tieren ergab sich eine hoch signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung sowohl für die im offenen Bereich verbrachte Zeit (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,38} = 24,95$, $p < 0,001$) als auch für die zurückgelegte Distanz (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,38} = 14,24$, $p < 0,001$). *Post-hoc* Vergleiche dieser Messdaten ergaben für die THC-behandelten Wildtypiere eine signifikante Verminderung der im offenen Bereich verbrachten Zeit ($p < 0,05$), die auch im

Anteil der im offenen Bereich zurückgelegten Distanz an der Gesamtdistanz bestätigt wurde ($p < 0,05$). Die *post-hoc* Tests zeigten für die THC-behandelten G72-transgenen männlichen Tiere in der im offenen Bereich verbrachten Zeit eine hoch signifikante Abnahme des Angstverhaltens ($p < 0,001$), welches sich auch in der im offenen Bereich zurückgelegten prozentualen Distanz widerspiegelte ($p < 0,05$).

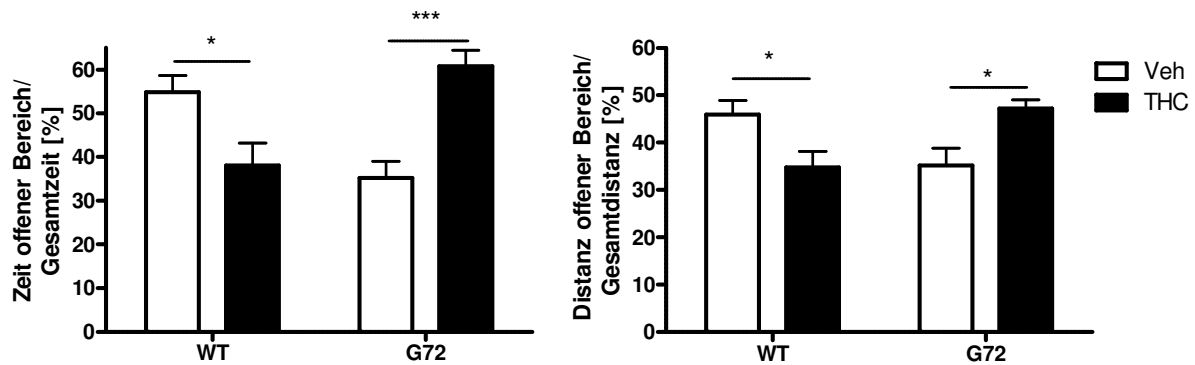


Abb. 24. Beeinflussung des Angstverhaltens der männlichen Tiere durch chronische THC-Gabe (n = 10-11). Es zeigte sich sowohl für die im offenen Bereich verbrachte Zeit als auch in der im offenen Bereich zurückgelegten Distanz eine hoch signifikante Interaktion zwischen Genotyp und THC-Behandlung (jeweils $p < 0,001$). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ für Vergleiche zwischen den Behandlungsgruppen.

Die weiblichen Tiere zeigten für die im offenen Bereich verbrachte Zeit eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und THC-Gabe (zweifaktorielle ANOVA $F_{1,37} = 4,69$, $p < 0,05$). *Post-hoc* Vergleiche dieser Daten ergaben eine signifikante Verminderung der im offenen Bereich verbrachten Zeit ausschließlich für die Wildtyptiere ($p < 0,05$). Die Auswertung des prozentualen Anteils der im offenen Bereich zurückgelegten Distanz an der Gesamtdistanz ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen ($p > 0,05$).

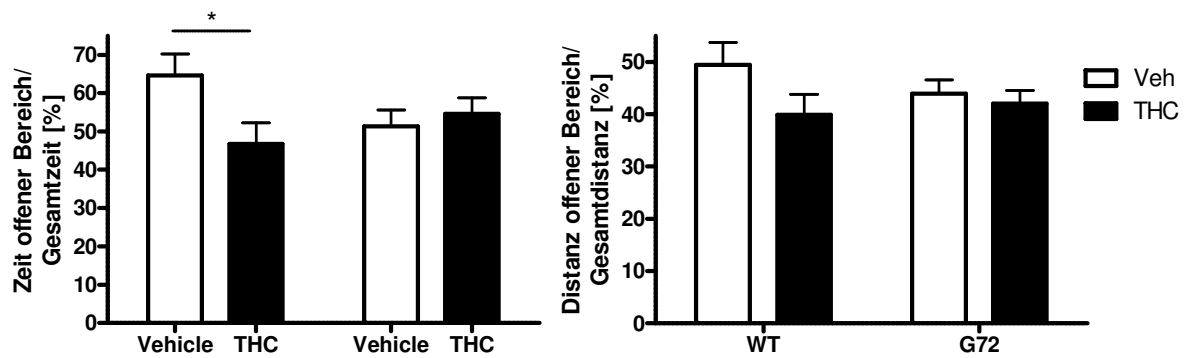


Abb. 25. Beeinflussung des Angstverhaltens durch chronische Cannabinoidgabe in weiblichen Mäusen (n = 10-11). Es zeigte sich lediglich für die im offenen Bereich verbrachte Zeit eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und THC-Behandlung ($p < 0,05$). * $p < 0,05$ für Vergleiche zwischen den Behandlungsgruppen.

Da Mäuse in einem unbekanntem, aversiven Umfeld dazu neigen primär in eine Bewegungsstarre (*freezing*) zu verfallen, wurde zur Verifizierung der oben angegebenen Ergebnisse die Zeit ausgewertet, in der die Maus zum ersten Mal vom offenen in den geschlossenen Bereich wechselte. Weder für die männlichen Tiere (Abb. 26A) noch für die weiblichen Tiere (Abb. 26B) konnte ein signifikanter Unterschied in der Latenz gezeigt werden ($p > 0,05$), daher ist nicht von einer Beeinflussung der oben angegebenen Daten durch *freezing* auszugehen.

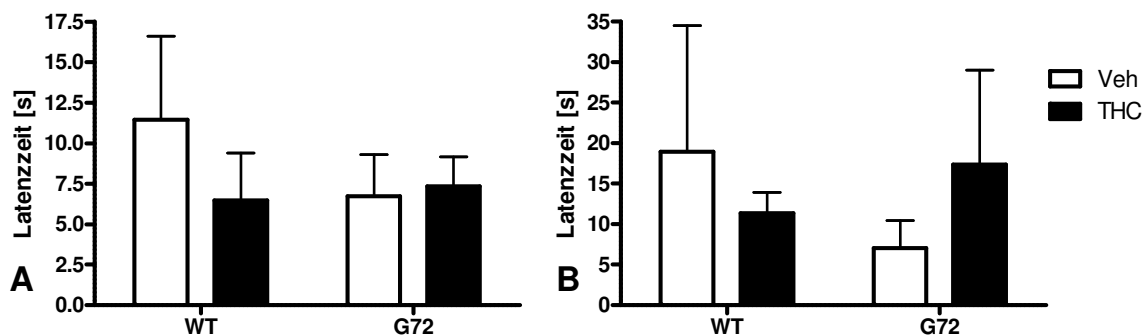


Abb. 26. Latenzzeit des ersten Wechsels von offenem zu geschlossenem Bereich (n = 10-11). Weder für männliche Tiere (A) noch für weibliche Tiere (B) konnte eine signifikante Beeinflussung der Ergebnisse durch die Latenzzeit ermittelt werden.

3.1.2.5 Y-Labyrinth-Versuch

Das Y-Labyrinth wurde eingesetzt, um eventuelle Defizite im Arbeits- oder Kurzzeitgedächtnis der Tiere zu ermitteln.

Bei den männlichen Tieren zeigte sich, dass G72-transgene Mäuse bei Zurücklegung gleicher Distanzen weniger häufig die Arme des Labyrinthes wechselten als Wildtypmäuse (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,37} = 6,61$, $p < 0,05$). Aus diesem Grunde erfolgte die Betrachtung der Armwechsel prozentual zu den Gesamtwechseln.

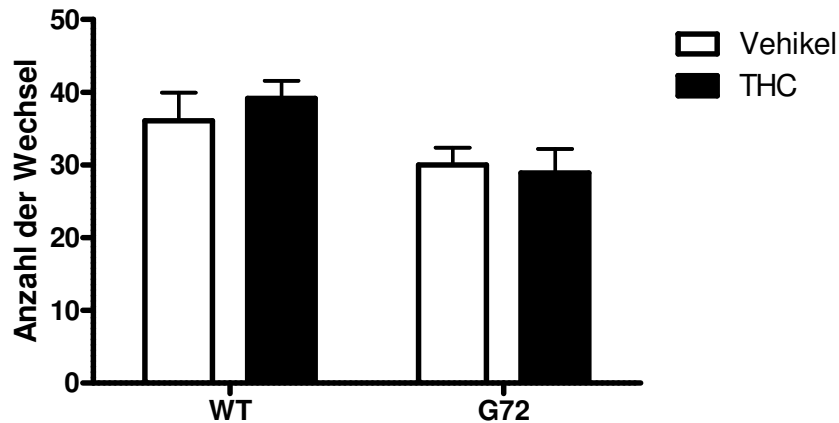


Abb. 27. Gesamtzahl der Armwechsel männlicher G72-transgener und Wildtypmäuse (n = 9-12). G72-transgene Tiere wechselten signifikant seltener zwischen den Armen des Labyrinthes ($p < 0,05$).

Alle Mäuse wechselten vom Gabelungspunkt aus signifikant häufiger in den neuen als in den vorher besuchten Arm ($p < 0,001$). Alle Tiere verfügten somit über Gedächtnisleistungen, die es ihnen ermöglichten zwischen den einzelnen Armen zu unterscheiden.

Eine genauere Betrachtung der einzelnen Armeintritte ergab, dass G72-transgene Tiere signifikant seltener einen neuen Arm betraten als Wildtypmäuse (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,37} = 4,78$, $p < 0,05$), ebenso zeigte sich eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und THC-Behandlung (zweifaktorielle ANOVA $F_{1,37} = 4,17$, $p < 0,05$). *Post-hoc* Vergleiche lieferten signifikante Unterschiede zwischen Vehikel-behandelten Wildtypmäusen und den G72-transgenen THC-behandelten Mäusen ($p < 0,05$), sowie stark signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp THC-behandelten und G72-transgenen THC-behandelten Tieren ($p < 0,01$). Bei Betrachtung der Eintritte in den vorherigen Arm ergab sich ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen Behandlung und Genotyp (zweifaktorielle ANOVA $F_{1,37} = 4,28$, $p < 0,05$). *Post-hoc* Vergleiche dieser Daten ergaben signifikant häufigere Eintritte in den vorherigen Arm für die G72-transgenen THC-behandelten Mäuse gegenüber allen anderen Gruppen ($p < 0,05$).

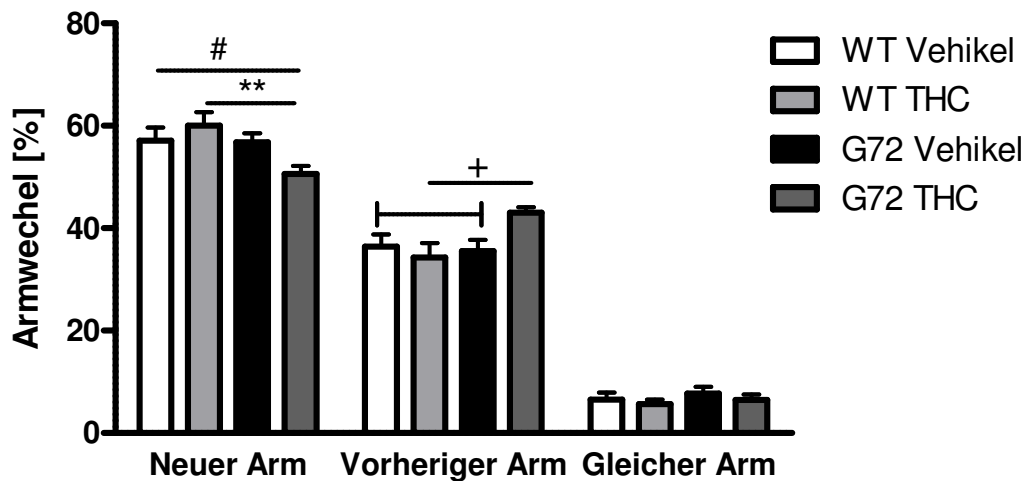


Abb. 28. Arbeitsgedächtnisleistung der männlichen G72-transgenen und Wildtypmäuse im Y-Labyrinth (n = 9-12). G72-transgene Tiere betraten signifikant seltener einen neuen Arm als Wildtypmäuse ($p < 0,05$). Ebenso zeigten sich für das Betreten des neuen und des vorherigen Arms signifikante Interaktionen zwischen Genotyp und THC-Behandlung ($p < 0,05$) $**p < 0,01$ für den Vergleich von WT THC zu G72 THC. $\#p < 0,05$ für den Vergleich von WT Vehikel zu G72 THC. $+p < 0,05$ für G72 THC zu den 3 anderen Gruppen.

Auch weibliche G72-transgene Mäuse wechselten bei gleicher zurückgelegter Distanz signifikant seltener von einem Arm in den nächsten (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,36} = 9,21$, $p < 0,01$). Aus diesem Grunde wurde für die weiblichen Mäuse ebenfalls eine prozentuale Darstellung der Armeintritte gewählt.

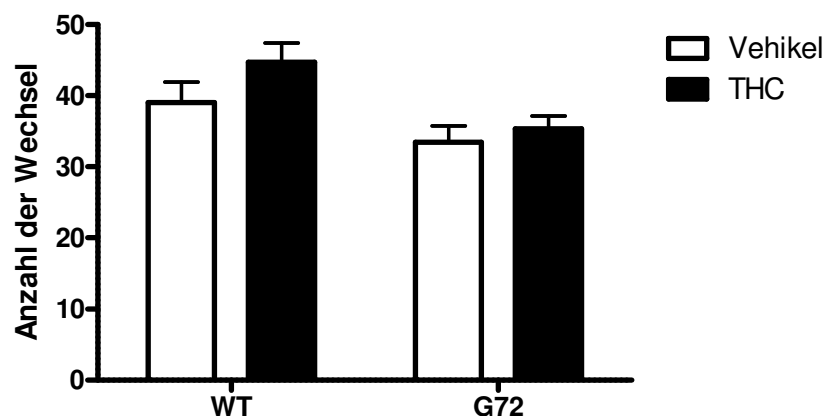


Abb. 29. Gesamtzahl der Armwechsel weiblicher G72-transgener und Wildtypmäuse (n = 9-11). G72-transgene Mäuse wechselten signifikant seltener zwischen den Armen des Y-Labyrinthes.

Auch weibliche Mäuse wechselten vom Gabelungspunkt signifikant häufiger in den neuen als in den vorherigen Arm ($p < 0,001$) und konnten demzufolge zwischen den einzelnen Armen

unterscheiden. Im Gegensatz zu den männlichen Tieren ergaben sich für die weiblichen Mäuse keinerlei signifikante Effekte für die einzelnen Regionen.

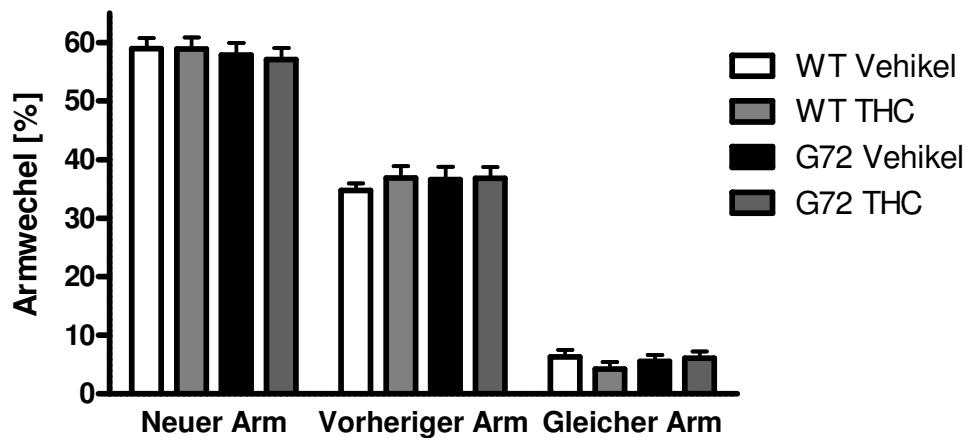


Abb. 30. Arbeitsgedächtnisleistung der weiblichen G72-transgenen und Wildtypmäuse im Y-Labyrinth (n = 9-11). Weibliche Mäuse zeigten keinerlei Beeinflussung des Arbeitsgedächtnisses durch THC. Auch Genotypeneffekte ergaben sich nicht.

3.1.2.6 Lokomotorisches Verhalten im Offenfeld

Vor Bestimmung der PCP-Empfindlichkeit wurde das Verhalten der Mäuse im offenen Feld über eine Stunde aufgezeichnet. Um zu analysieren ob eine der Gruppen in einer neuen Umgebung ein verändertes Bewegungs- oder Explorationsverhalten zeigte, wurde diese erste Stunde zuerst gesondert ausgewertet.

Hier zeigten sich für männliche Tiere signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die zweifaktorielle ANOVA ergab einen statistisch signifikanten Interaktionseffekt zwischen Genotyp und Behandlung auf die Bewegungszeit (Abb. 31A; $F_{1,39} = 5,79$, $p < 0,05$) als auch auf die zurückgelegte Distanz (Abb. 31B, $F_{1,39} = 6,55$, $p < 0,05$). *Post-hoc* Vergleiche ergaben für beide Parameter stark signifikante Unterschiede zwischen G72-transgenen Vehikel- und THC-behandelten Tieren ($p < 0,01$) sowie signifikante Unterschiede zwischen den Vehikel-behandelten Gruppen ($p < 0,05$). Ebenso zeigten sich Interaktionseffekte zwischen der THC-Behandlung und Genotyp hinsichtlich mittlerer Geschwindigkeit (Abb. 31C, $F_{1,39} = 4,679$, $p = 0,037$) und hyperaktiver Zeit (Abb. 31D, $F_{1,39} = 6,19$, $p < 0,05$). *Post-hoc* Vergleiche ergaben auch für diese Parameter stark signifikante Unterschiede zwischen G72-transgenen Vehikel-behandelten Mäusen und G72-transgenen THC-behandelten Mäusen ($p < 0,01$). Zudem ergaben sich signifikante Unterschiede der G72-Vehikel behandelten Tiere zu den WT Vehikel-

behandelten Mäusen ($p < 0,05$). Für das explorative Verhalten, gemessen an der Anzahl der Aufrichtungen, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

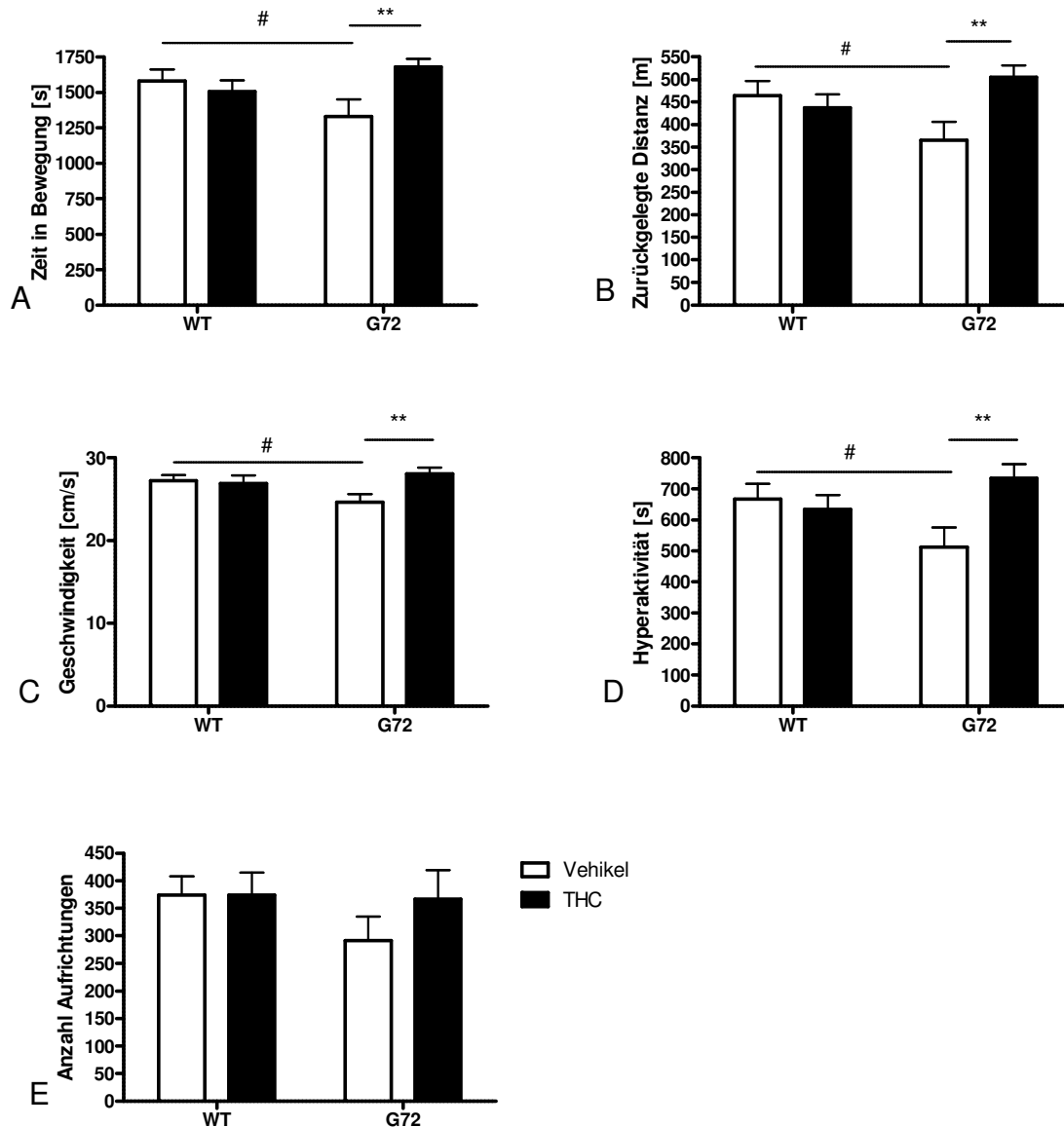


Abb. 31. Lokomotorisches Verhalten der männlichen G72-transgenen und der Wildtyp-Mäuse im Offenfeld (n = 10-12). Dargestellt sind die Aktivitätsparameter (A) Zeit in Bewegung, (B) Zurückgelegte Distanz, (C) Mittlere Geschwindigkeit, (D) Hyperaktivität und (E) Anzahl der Aufrichtungen. Diese Parameter wurden als summierte Aktivität über eine Stunde im Offenfeld erhoben. Für A-D ergaben sich Interaktionseffekte zwischen THC-Behandlung und Genotyp. ** $p < 0,01$ für Vergleiche zwischen G72-transgenen Vehikel-behandelten und THC-behandelten Mäusen. # $p < 0,05$ für Vergleiche zwischen den Vehikel-behandelten Gruppen.

Für die weiblichen Mäuse konnten dagegen keinerlei signifikanten Unterschiede in den analysierten Parametern Zeit in Bewegung, zurückgelegte Distanz, mittlere Geschwindigkeit, Hyperaktivität und Anzahl der Aufrichtungen ermittelt werden.

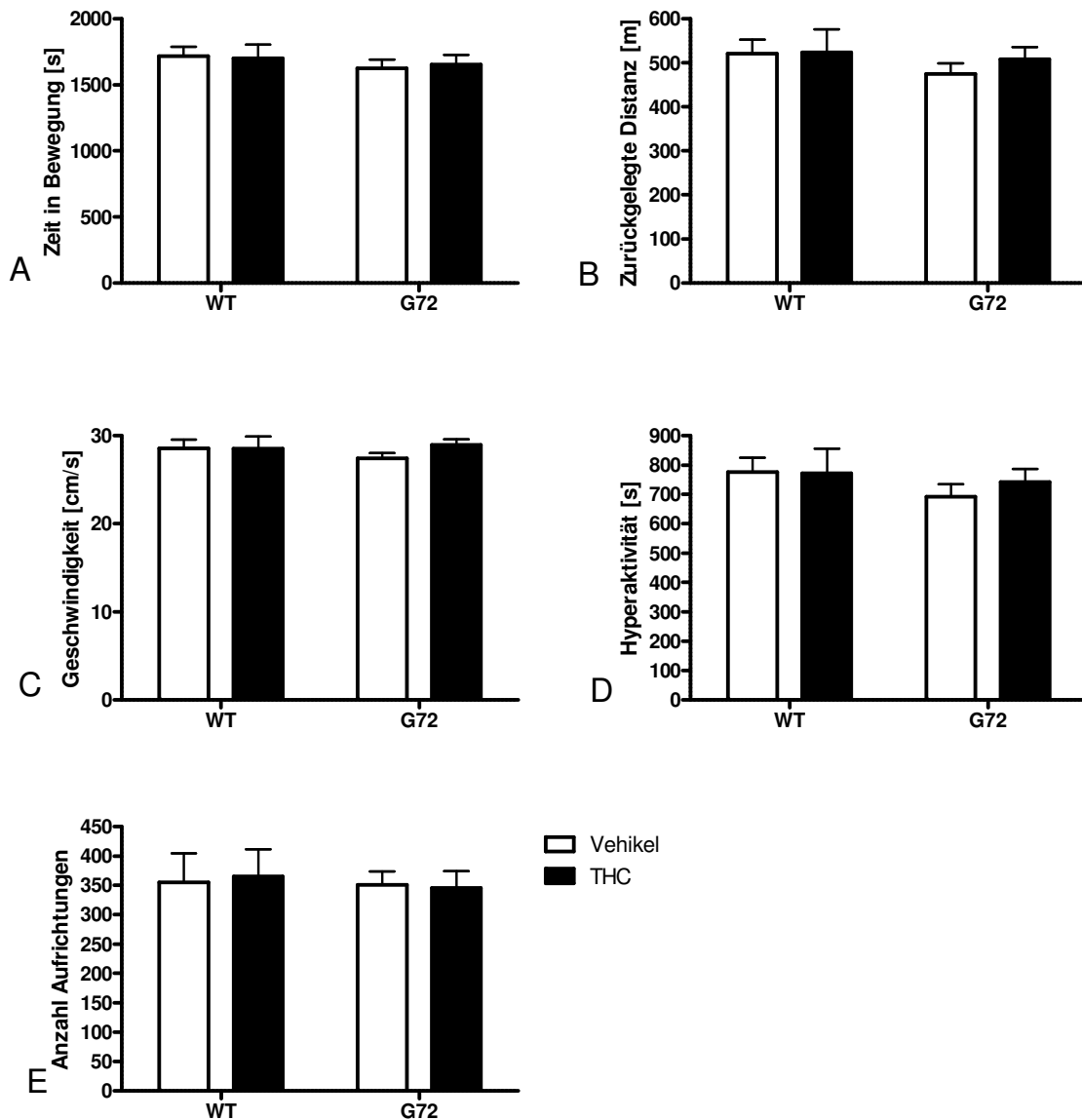


Abb. 32. Lokomotorisches Verhalten der weiblichen G72-transgenen und der Wildtyp-Mäuse im Offenfeld (n = 10-11). Dargestellt sind die Aktivitätsparameter (A) Zeit in Bewegung, (B) Zurückgelegte Distanz, (C) Mittlere Geschwindigkeit, (D) Hyperaktivität und (E) Anzahl der Aufrichtungen. Diese Parameter wurden als summierte Aktivität über eine Stunde im Offenfeld erhoben. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.1.2.7 PCP-induzierte Hyperlokomotion

G72-transgene und Wildtypiere wurden im Alter von 6 Monaten mit Phencyclidin behandelt, um festzustellen, ob es Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen in der durch PCP-induzierten Hyperlokomotion gibt. Alle Tiere wurden nach einer Stunde im offenen Feld mit 3 mg/kg KG PCP behandelt. Anschließend wurde die zurückgelegte Distanz in 15-minütigen Intervallen ausgewertet.

Für die männlichen Tiere zeigte sich in der zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen ein stark signifikanter Interaktionseffekt von Genotyp und THC-Behandlung ($F_{1,38} = 10,02$, $p < 0,01$).

Eine isolierte Betrachtung der THC-behandelten Mäuse (Abb. 33A) ergab einen signifikanten Unterschied in der PCP-Sensitivität zwischen den G72-transgenen und den Wildtypmäusen ($F_{1,19} = 7,16$, $p < 0,05$). Der *post-hoc* Vergleich offenbarte eine signifikante Steigerung der Aktivität der G72-transgenen Mäuse gegenüber den Wildtyptieren unmittelbar nach der Injektion (Intervall 60-75, $p < 0,01$) und am darauf folgenden Messzeitpunkt (Intervall 75-90: $p < 0,05$). Am Injektionszeitpunkt selbst zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtypen und den G72-transgenen Mäusen. Ein direkter Vergleich der Messdaten für die G72-transgenen THC-behandelten Tiere vor und nach Injektion ergab einen stark signifikanten antriebssteigernden Effekt der PCP-Injektion ($p < 0,01$), wohingegen die THC-behandelten Wildtypmäuse keine signifikante Reaktion auf die PCP-Injektion zeigten ($p > 0,05$).

Die zweifaktorielle ANOVA der Vehikel-behandelten Tiere (Abb. 33B) zeigte trotz der geringeren Basisaktivität der G72-transgenen Tiere keine signifikanten Effekte des Genotyps ($F_{1,19} = 3,43$, $p > 0,05$). Für beide Gruppen konnte eine starke Aktivitätssteigerung nach PCP-Injektion beobachtet werden ($p < 0,001$ für Wildtypen, $p < 0,01$ für G72-transgene Mäuse).

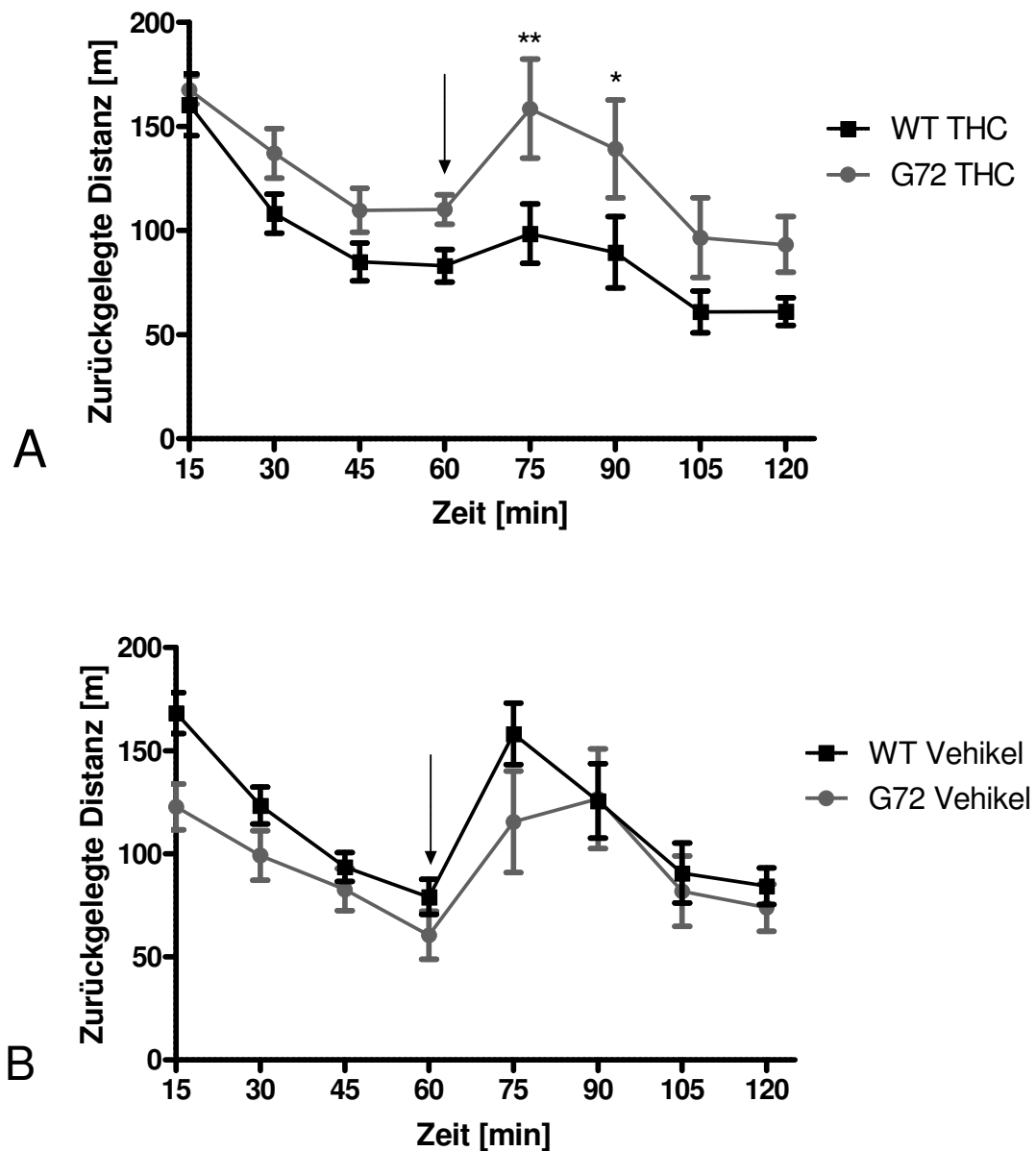


Abb. 33. PCP-induzierte Hyperlokomotion der männlichen G72-transgenen und Wildtypmäuse (n = 10-12). Abb. A zeigt einen Vergleich der THC-behandelten Tiere. Hier ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen G72-transgenen und Wildtyp-Tieren. Abb. B zeigt einen Vergleich der Vehikel-behandelten Tiere, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der PCP-Applikation. **p < 0,05, *p < 0,05 für den Unterschied WT THC zu G72 THC im Intervall 60-75 bzw. 75-90 Minuten.

Die Auswertung der Daten für weibliche Mäuse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Sowohl THC-behandelte als auch Vehikel-behandelte Mäuse reagierten mit einer stark signifikanten Antriebssteigerung auf die PCP-Injektion (p < 0,01).

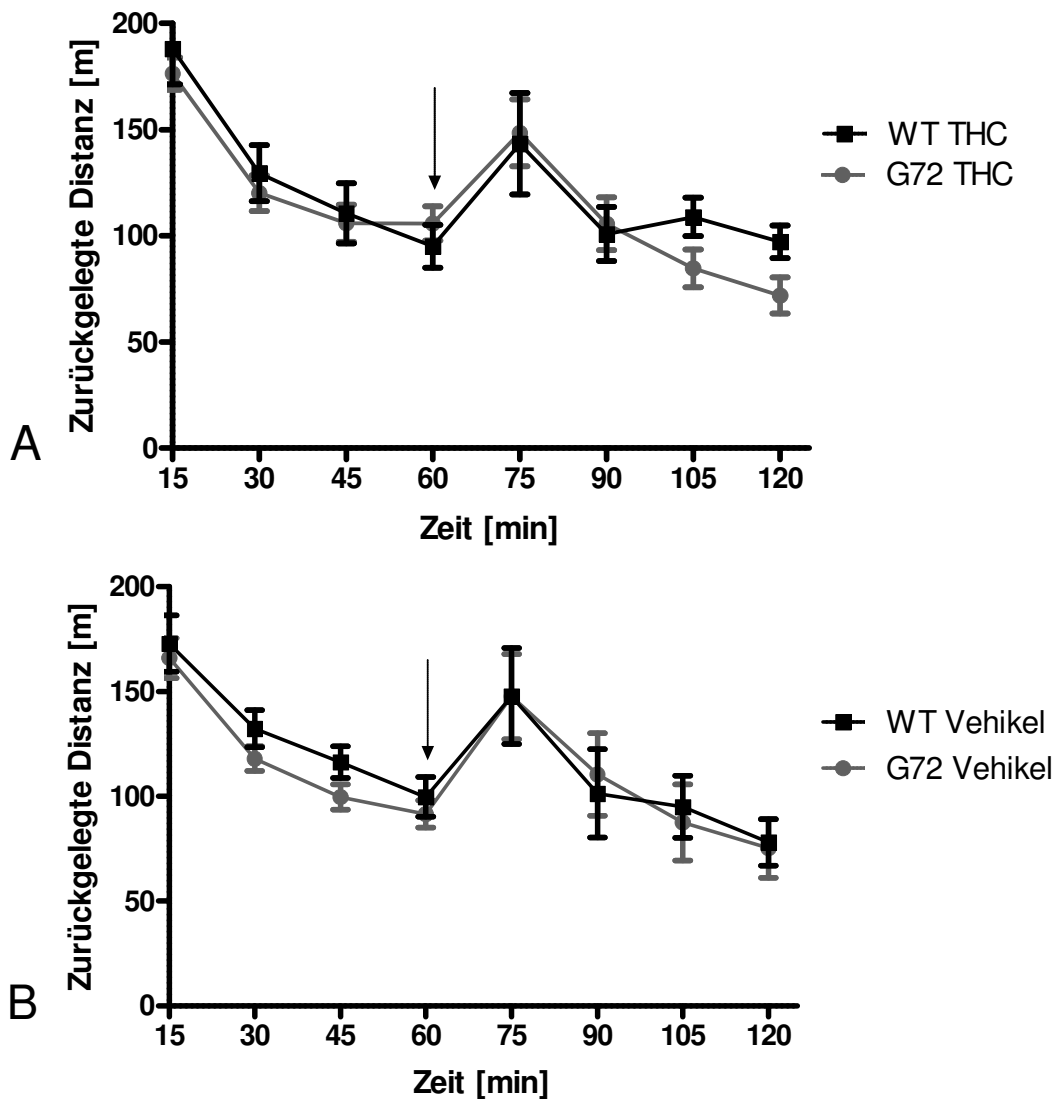


Abb. 34. PCP-induzierte Hyperlokomotion der weiblichen G72-transgenen und Wildtypmäuse (n = 10-11). Abb. A zeigt einen Vergleich der THC-behandelten Tiere. Abb. B zeigt einen Vergleich der Vehikel-behandelten Tiere. Es ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede.

3.1.2.8 Porsolt-Test (Forced swimming test, behavioural despair test)

Der Porsolt-Test wurde mit 7 Monate alten Tieren zur Beurteilung von depressivem Verhalten durchgeführt. Bestimmt wurde jeweils die Zeit, die die Tiere immobil treibend in dem mit Wasser gefüllten Messzylinder verbrachten.

Bei den männlichen Tieren zeigte sich eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und THC-Behandlung (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,16} = 5,16$, $p < 0,05$). *Post-hoc* Vergleiche ergaben signifikante Unterschiede zwischen G72-transgenen THC-behandelten und Vehikel-behandelten Mäusen ($p < 0,05$) sowie zwischen den beiden THC-behandelten Gruppen ($p < 0,05$).

Für weibliche Tiere konnte dagegen im Porsolt-Test keine signifikant veränderte Immobilitätszeit beobachtet werden.

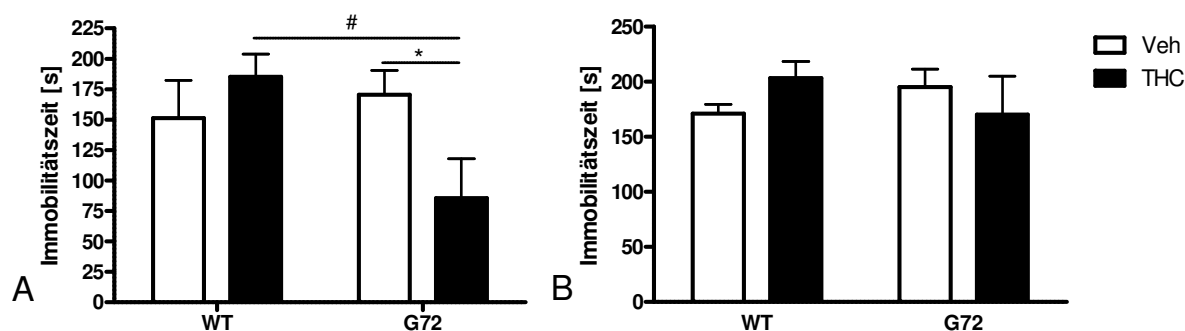


Abb. 35. Verhalten der 7 Monate alten Mäuse im Porsolt-Test. Abb. A. Die männlichen Tiere zeigten eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und THC- Behandlung. Abb. B. Die weiblichen Tiere zeigten keine signifikanten Unterschiede. * $p < 0,05$ für den Vergleich von männlichen G72-transgenen Mäusen. # $p < 0,05$ für den Vergleich zwischen den männlichen THC-behandelten Gruppen.

3.1.3 Expressionsanalyse der Hauptbestandteile des Endocannabinoidsystems

Mit Hilfe der quantitativen Real-time PCR wurde die Expression der wichtigsten Hauptbestandteile des Endocannabinoidsystems untersucht. Bestimmt wurde die Expression der Cannabinoidrezeptoren CB1, CB2, der Cannabinoid-abbauenden Enzyme FAAH und MGL sowie der wichtigsten synthetisierenden Enzyme DAGL α und DAGL β in den Gehirnregionen Cortex, Cerebellum und Hippocampus. Zusätzlich wurde die Expression von G72 bestimmt.

Für die Analyse wurden pro Gruppe fünf männliche Tiere im Alter von etwa 5,5 Monaten genutzt. Für jede Maus wurden Triplikate erstellt, die Resultate gemittelt und zur Expression des konstitutiv exprimierten Gens GAPDH normiert. Die Ergebnisse wurden anschließend zu der jeweiligen Genexpression der Wildtyp Vehikel-behandelten, bzw. für G72 zu der Genexpression der G72-transgenen Vehikel-behandelten Tiere, relativiert. Angegeben wird somit die x-fache Expression in Relation zu WT Vehikel oder G72 Vehikel für die G72-Expression.

3.1.3.1 Expression im Cortex

Die Cannabinoidrezeptoren, CB1 und CB2

Die Genexpression des für den CB1-Rezeptor codierenden Gens *Cnr1* zeigte in der zweifaktoriellen ANOVA einen Genotypeneffekt ($F_{1,16} = 6,81$, $p < 0,05$). Ein Effekt der THC-Behandlung bzw. eine Interaktion zwischen Genotyp und THC-Behandlung konnte in der zweifaktoriellen ANOVA nicht gezeigt werden ($F_{1,16} = 1,86$, $p > 0,05$ bzw. $F_{1,16} = 2,59$, $p > 0,05$). *Post-hoc* Vergleiche dieser Messdaten zeigten für THC-behandelte Wildtypmäuse tendenziell eine geringere *Cnr1*-Expression ($p = 0,052$) gegenüber den Vehikel-behandelten Mäusen.

Die zweifaktorielle ANOVA für das für den CB2-Rezeptor codierende Gen *Cnr2* ergab weder einen Genotyp- (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,16} = 1,83$, $p > 0,05$) noch einen Behandlungseffekt (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,16} = 0,061$, $p > 0,05$). Auch eine Interaktion zwischen Genotyp und THC-Behandlung zeigte sich nicht (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,16} = 0,078$, $p > 0,05$).

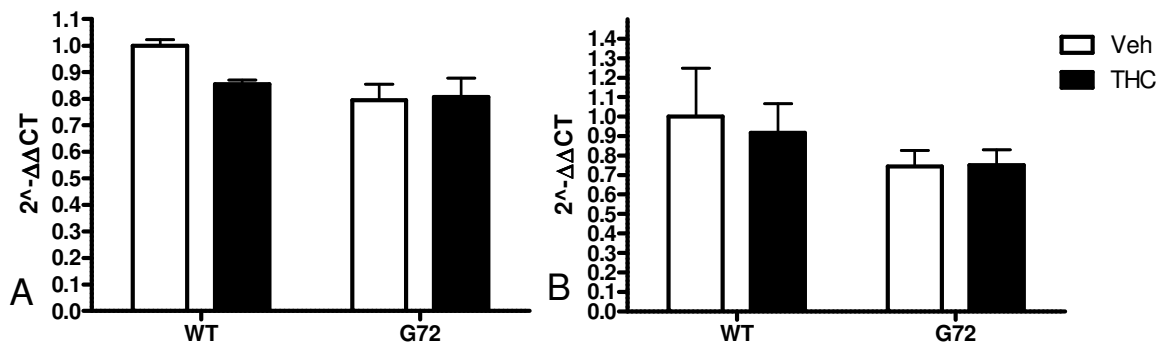


Abb. 36. *Cnr1*- bzw. *Cnr2*-Expression im Cortex. Die *Cnr1*-Expression (A) zeigte einen signifikanten Effekt des Genotyps. Die verminderte Expression der THC-behandelten Wildtyptiere zeigte einen deutlichen Trend gegenüber den WT Vehikel-behandelten Tieren ($p = 0,052$). Für die *Cnr2*-Expression (B) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Endocannabinoid-abbauenden Enzyme, FAAH und MGL

Die zweifaktorielle ANOVA ergab in der Expression für FAAH keine signifikanten Unterschiede für die THC-Behandlung ($F_{1,16} = 0,45$, $p > 0,05$). Für den Genotyp ergab sich allenfalls ein Trend einer erniedrigten FAAH-Expression der G72-transgenen Tiere ($F_{1,16} = 4,02$, $p = 0,062$). Ein Interaktionseffekt zwischen Genotyp und THC-Behandlung konnte nicht gezeigt werden (zweifaktorielle ANOVA $F_{1,16} = 0,23$, $p > 0,05$).

Die Daten für die Expression von MGL ergaben keine signifikanten Genotyp- bzw. Behandlungseffekte (zweifaktorielle ANOVA $F_{1,16} = 0,55$, $p > 0,05$ bzw. $F_{1,16} = 0,033$, $p > 0,05$). Es zeigte sich jedoch der Trend einer Interaktion zwischen THC-Behandlung und Genotyp (zweifaktorielle ANOVA $F_{1,16} = 4,18$, $p = 0,058$).

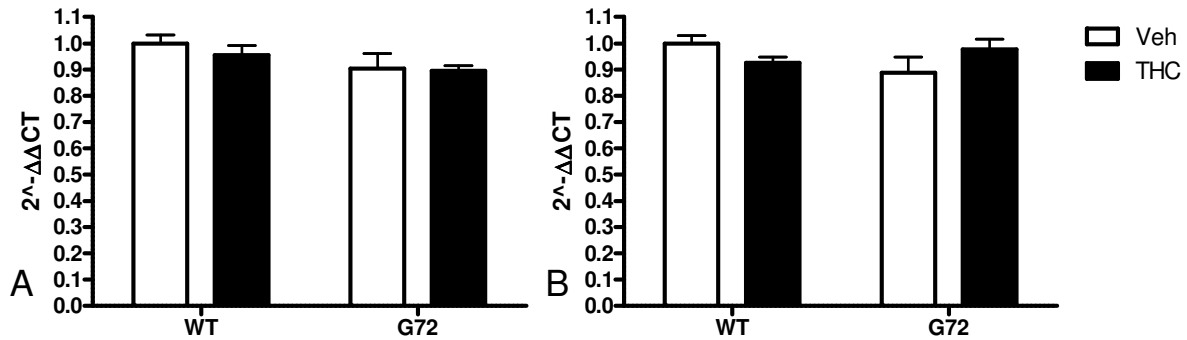


Abb. 37. FAAH- bzw. MGL-Expression im Cortex. Für keines der abbauenden Enzyme konnte eine signifikante Expressionsveränderung nachgewiesen werden.

Die Endocannabinoid-synthetisierenden Enzyme, DAGL α und DAGL β

Für die Expression von DAGL α konnte mittels der zweifaktoriellen ANOVA ein stark signifikanter Interaktionseffekt zwischen Genotyp und THC-Behandlung gezeigt werden ($F_{1,16} = 9,54$, $p < 0,01$). *Post-hoc* Vergleiche ergaben für die THC-behandelten Wildtyptiere eine stark signifikante Verringerung der DAGL α -Expression ($p < 0,01$).

Die Expressionsanalyse von DAGL β zeigte ebenfalls eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und THC-Behandlung ($F_{1,16} = 4,56$, $p < 0,05$). Zusätzlich konnte eine Verringerung der DAGL β -Expression der G72-transgenen gegenüber der Wildtypmäuse beobachtet werden (zweifaktorielle ANOVA: Genotypeneffekt: $F_{1,16} = 4,72$, $p < 0,05$).

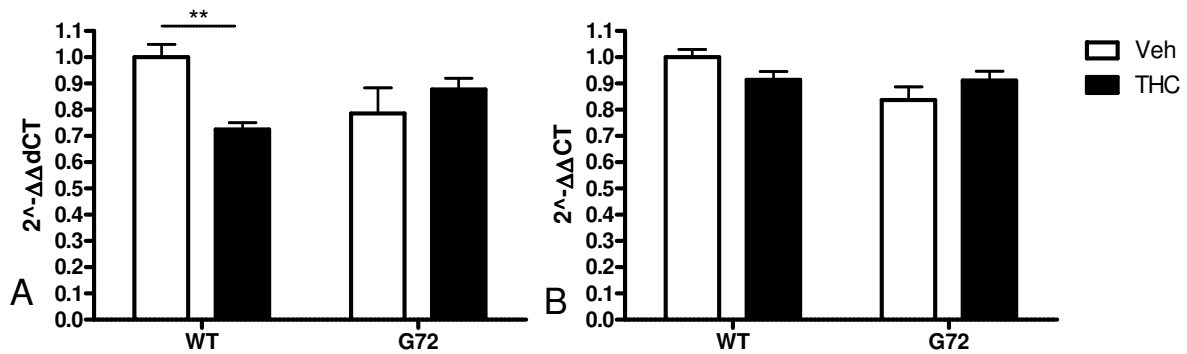


Abb. 38. DAGL α- bzw. DAGL β-Expression im Cortex. Für die DAGL α-Expression (A) konnte ein stark signifikanter Interaktionseffekt zwischen Genotyp und Behandlung ($p < 0,01$) nachgewiesen werden. Die DAGL β- Expression zeigte sowohl einen signifikanten Interaktions- als auch einen signifikanten Genotypeneffekt ($p < 0,05$). ** $p < 0,01$ für Vergleiche zwischen WT THC-behandelten und Vehikel-behandelten Tieren.

G72

Die Expressionsanalyse für G72 zeigte keine signifikante Veränderung der G72-Expression durch die THC-Behandlung (*Student's t-Test*, $p > 0,05$).

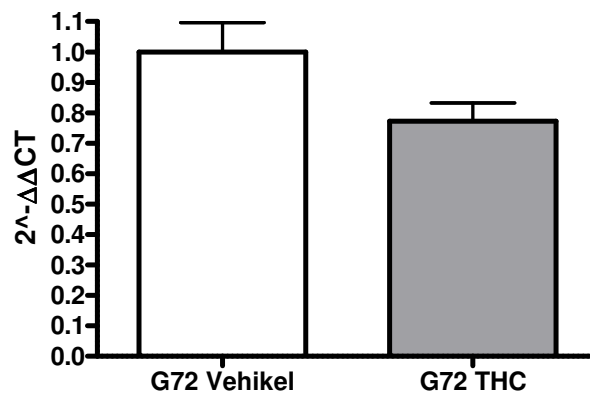


Abb. 39. G72-Expression im Cortex. Es zeigte sich keine Veränderung der G72-Expression durch die chronische adoleszente THC-Behandlung.

3.1.3.2 Expression im Cerebellum

Die Cannabinoidrezeptoren, CB1 und CB2

Die zweifaktorielle ANOVA zeigte weder einen signifikanten Einfluss des Genotyps ($F_{1,16} = 1,00$, $p > 0,05$) noch der THC-Behandlung ($F_{1,16} = 2,08$, $p > 0,05$) auf die *Cnr1*-Expression. Auch für die *Cnr2*-Expression konnten keine signifikanten Veränderungen durch den Genotyp ($F_{1,16} = 0,31$,

$p > 0,05$) oder durch die chronische Cannabinoidbehandlung ($F_{1,16} = 0,22$, $p > 0,05$) festgestellt werden. Interaktionseffekte zwischen Genotyp und THC-Behandlung fanden sich weder für die *Cnr1*-Expression (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,16} = 1,7$, $p > 0,05$) noch für die *Cnr2*-Expression (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,16} = 0,3$, $p > 0,05$).

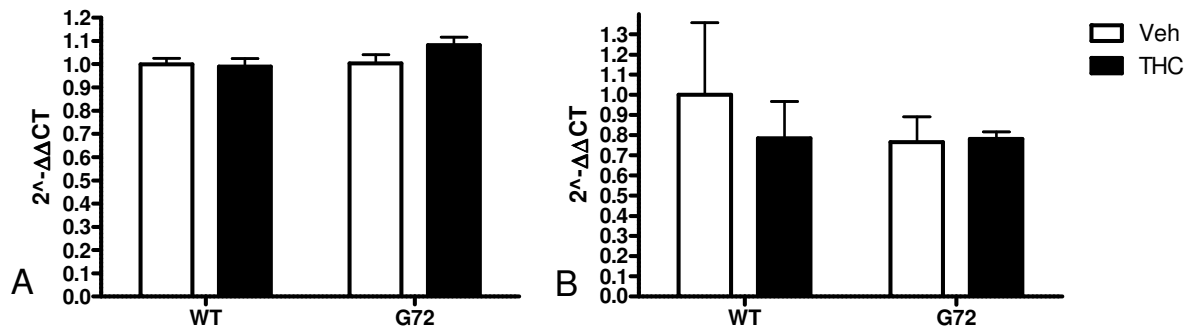


Abb. 40. *Cnr1*- (Abb. A) und *Cnr2*- Expression (Abb. B) im Cerebellum. Es zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede.

Die Endocannabinoid-abbauenden Enzyme, FAAH und MGL

Die Expression des für das abbauende Enzym FAAH codierenden Gens zeigte in der zweifaktoriellen ANOVA weder signifikante Effekte für den Genotyp ($F_{1,16} = 0,0059$, $p > 0,05$) noch für die THC-Behandlung ($F_{1,16} = 0,034$, $p > 0,05$). Interaktionseffekte zwischen Genotyp und THC-Behandlung ergaben sich nicht (zweifaktorielle ANOVA: $F_{1,16} = 0,35$, $p > 0,05$).

Ebenso ergaben sich im Cerebellum keine signifikanten Effekte für die Expression des für MGL codierenden Gens (Genotyp: $F_{1,16} = 2,18$, $p > 0,05$, THC-Behandlung: $F_{1,16} = 2,07$, $p > 0,05$, Interaktion zwischen Genotyp und THC-Behandlung: $F_{1,16} = 0,35$, $p > 0,05$).

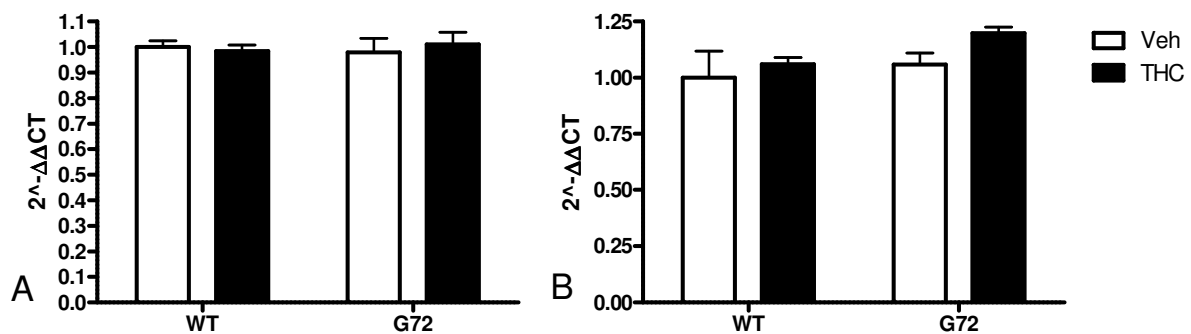


Abb. 41. FAAH (Abb. A)- bzw. MGL (Abb. B)-Expression im Cerebellum. Für keines der abbauenden Enzyme konnten signifikante Effekte belegt werden.

Die Endocannabinoid synthetisierenden Enzyme, DAGL α und DAGL β

Im Cerebellum konnten auch für die Endocannabinoid synthetisierenden Enzyme keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt werden.

So zeigte sich in der zweifaktoriellen ANOVA des für DAGL α codierenden Gens (Abb. 42A) weder ein signifikanter Genotypeneffekt ($F_{1,16} = 0,66$, $p > 0,05$) noch ein signifikanter Effekt der THC-Behandlung ($F_{1,16} = 0,1008$, $p > 0,05$) oder ein Interaktionseffekt ($F_{1,16} = 0,9$, $p > 0,05$).

Auch für die Genexpression von DAGL β (Abb. 42B) konnten mittels zweifaktorieller ANOVA keine signifikanten Effekte belegt werden (Genotyp: $F_{1,16} = 0,376$, $p > 0,05$, THC-Behandlung: $F_{1,16} = 1,81$, $p > 0,05$, Interaktion zwischen Genotyp und THC-Behandlung: $F_{1,16} = 1,30$, $p > 0,05$).

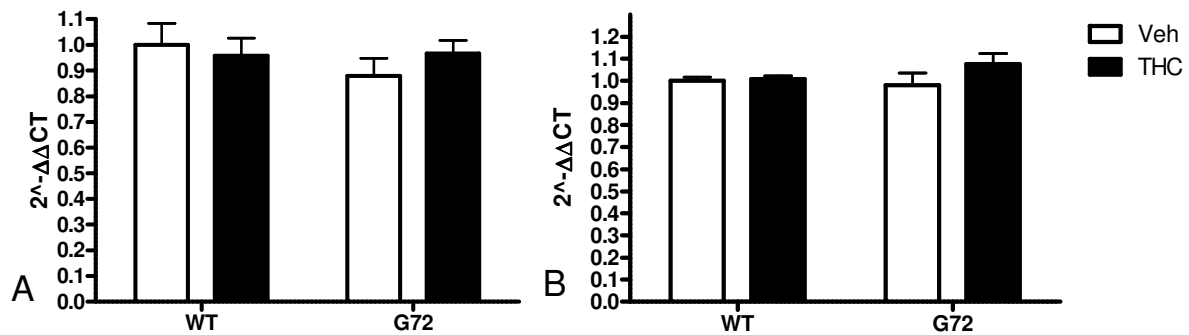


Abb. 42. DAGL α (Abb. A)- bzw. DAGL β (Abb. B)- Expression im Cerebellum. Signifikante Unterschiede konnten nicht gezeigt werden.

G72

Die Expressionsanalyse für G72 zeigte keine signifikante Veränderung der G72-Expression durch die THC-Behandlung (*Student's t-Test*, $p > 0,05$).

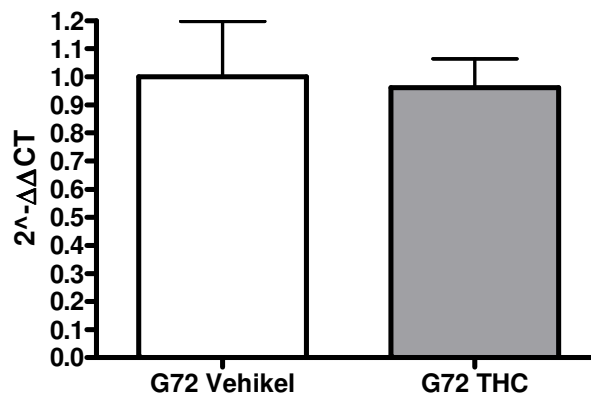


Abb. 43. G72-Expression im Cerebellum der G72-transgenen Mäuse. Durch die THC-Behandlung wurde keine signifikante Expressionsveränderung erreicht.

3.1.3.3 Expression im Hippocampus

Die Cannabinoidrezeptoren, CB1 und CB2

Die zweifaktorielle ANOVA zeigte weder einen signifikanten Einfluss des Genotyps ($F_{1,15}=0,19$, $p > 0,05$) noch der THC-Behandlung ($F_{1,15}=2,595$, $p > 0,05$) auf die Cnr1-Expression. Auch für die Cnr2-Expression konnten keine signifikanten Veränderungen durch den Genotyp ($F_{1,15}=0,14$, $p > 0,05$) oder durch die chronische adoleszente Cannabinoidbehandlung ($F_{1,15}=0,117$, $p > 0,05$) festgestellt werden. Weder für die Cnr1-Expression noch für die Cnr2-Expression konnten in der zweifaktoriellen ANOVA signifikante Interaktionen zwischen Genotyp und THC-Behandlung gezeigt werden (Cnr1: $F_{1,15}=0,16$, $p > 0,05$, Cnr2: $F_{1,15}=2,23$, $p > 0,05$).

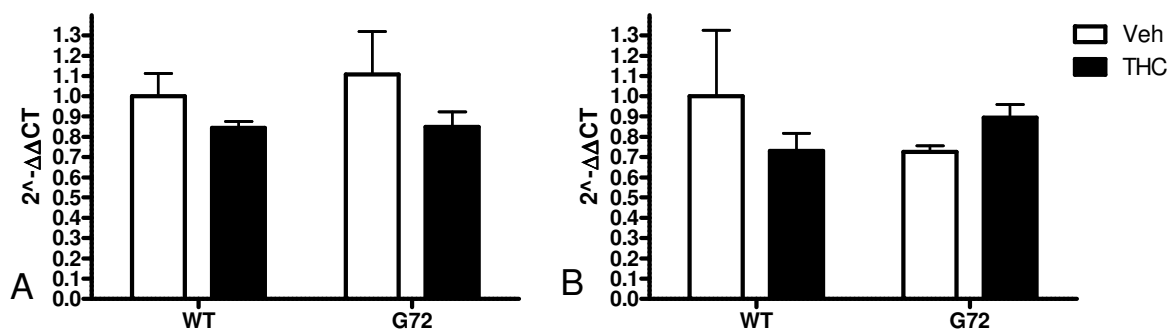


Abb. 44. Cnr1- (Abb. A) und Cnr2-Expression (Abb. B) im Hippocampus. Es zeigten sich durch die THC-Behandlung keine signifikanten Expressionsunterschiede.

Die Endocannabinoid-abbauenden Enzyme, FAAH und MGL

Die Expression des für das abbauende Enzym FAAH codierenden Gens zeigte in der zweifaktoriellen ANOVA weder signifikante Effekte für den Genotyp ($F_{1,15}=0,11$, $p > 0,05$) noch für die THC-Behandlung ($F_{1,15}=0,0302$, $p > 0,05$). Auch ein Interaktionseffekt zwischen Genotyp und THC-Behandlung konnte nicht gezeigt werden ($F_{1,15}=0,18$, $p > 0,05$).

Ebenso zeigten sich im Hippocampus keine signifikanten Effekte für die Expression des für MGL codierenden Gens (Genotyp: $F_{1,15}=0,34$, $p > 0,05$, THC-Behandlung: $F_{1,15}=1,11$, $p > 0,05$, Interaktion zwischen Genotyp und THC-Behandlung: $F_{1,15}=0,38$, $p > 0,05$).

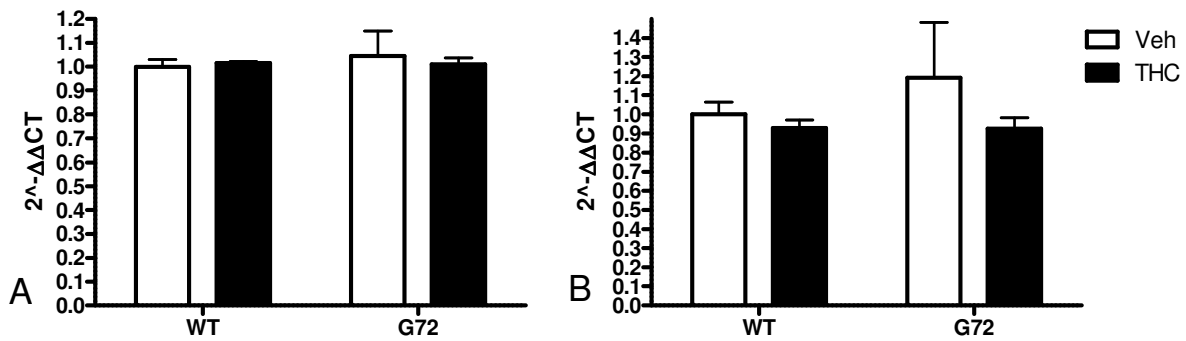


Abb. 45. FAAH(Abb. A)- bzw. MGL(Abb. B)-Expression im Hippocampus. Für keines der abbauenden Enzyme konnten signifikante Effekte belegt werden.

Die Endocannabinoid-synthetisierenden Enzyme, DAGL α und DAGL β

Auch im Hippocampus konnten für die Endocannabinoid-synthetisierenden Enzyme keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt werden.

So zeigte sich in der zweifaktoriellen ANOVA des für DAGL α codierenden Gens (Abb. 46A) weder ein signifikanter Genotypeneffekt ($F_{1,15} = 1,998$, $p > 0,05$) noch ein signifikanter Effekt der THC-Behandlung ($F_{1,15} = 1,916$, $p > 0,05$). Auch ein Interaktionseffekt konnte nicht gezeigt werden ($F_{1,15} = 0,89$, $p > 0,05$).

Auch für die Genexpression von DAGL β (Abb. 46B) konnten mittels zweifaktorieller ANOVA keine signifikanten Effekte belegt werden (Genotyp: $F_{1,15} = 0,146$, $p > 0,05$, THC-Behandlung: $F_{1,15} = 1,132$, $p > 0,05$, Interaktion zwischen Genotyp und THC-Behandlung: $F_{1,15} = 0,27$, $p > 0,05$).

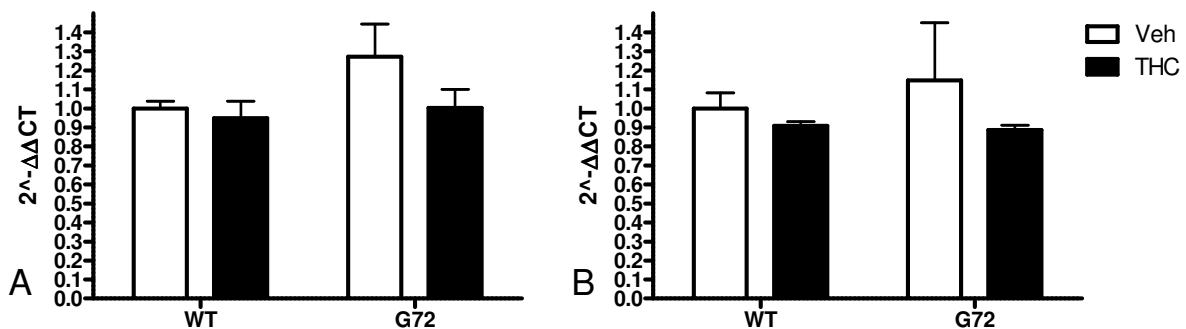


Abb. 46. DAGL α (Abb. A)-bzw. DAGL β (Abb. B)-Expression im Hippocampus. Signifikante Unterschiede konnten nicht gezeigt werden.

G72

Die Expressionsanalyse für G72 zeigte keine signifikante Veränderung der G72-Expression durch die THC-Behandlung (*Student's t-Test*, $p > 0,05$).

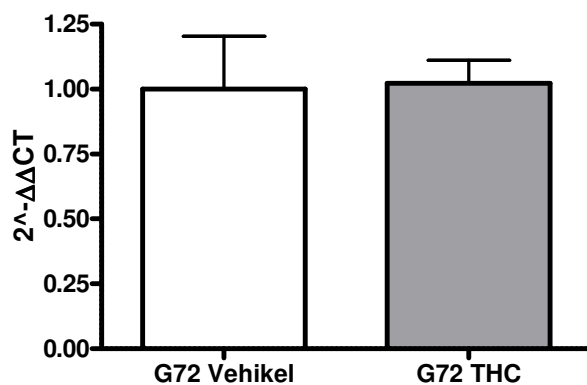


Abb. 47. G72-Expression im Hippocampus der G72-transgenen Mäuse. Durch die THC-Behandlung wurde keine signifikante Expressionsveränderung erreicht.

4 Diskussion

4.1 Verhaltensanalyse

In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen von chronischer adoleszenter Cannabinoidbehandlung auf das Verhalten von Wildtypmäusen und Mäusen, die ein mit Schizophrenie-assoziiertes primaten-spezifisches Gen tragen, quantifiziert werden.

4.1.1 Akute Δ^9 -THC-Empfindlichkeit

Wichtig für die Vergleichbarkeit der chronischen adoleszenten Cannabinoidbehandlung war es eventuelle Unterschiede in der THC-Empfindlichkeit zwischen G72-transgenen und Wildtypmäusen festzustellen. Da die chronische Cannabinoidbehandlung über einen Zeitraum von vier Wochen erfolgen sollte, wurden zur Testung der akuten Cannabinoidempfindlichkeit Mäuse in einem Alter gewählt, welches zu Beginn und am Ende dieser Zeitspanne lag. Auf diese Weise sollte eine Beeinflussung der Ergebnisse der langfristigen Cannabinoidbehandlung durch eine veränderte akute Cannabinoidempfindlichkeit ausgeschlossen werden.

Die vier Wochen und acht Wochen alten Mäuse wurden in einer definierten Verhaltenstetrade auf ihre THC-Empfindlichkeit untersucht (Compton et al., 1993). Für alle Mäuse konnte in diesen Versuchen wie erwartet eine dosisabhängige Reduktion der lokomotorischen Aktivität, ein Absinken der Körpertemperatur, eine Zunahme des kataleptischen Verhaltens und ein vermindertes Schmerzempfinden festgestellt werden (Chaperon und Thiebot, 1999).

Vier Wochen alte Mäuse zeigten einen schwächeren Effekt der THC-Behandlung auf die lokomotorische Aktivität und auf die Körpertemperatur als die adulten Tiere. Diese Ergebnisse sind konform mit einer Studie von Schramm-Sapyta et al., die zeigen konnte, dass akutes THC in adoleszenten Tieren schwächere anxiogene und lokomotorische Auswirkungen hat als in adulten Tieren (Schramm-Sapyta et al., 2007). Eine Studie von Quinn et al. konnte überdies zeigen, dass adoleszente Ratten weniger Aversion gegenüber wiederholter THC-Exposition zeigen als adulte Ratten (Quinn et al., 2008). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass gewisse Charakteristika im adoleszenten Gehirn zu einer herabgesetzten Sensitivität gegenüber den Konsum limitierenden aversiven Effekten von THC führen.

Interessanterweise zeigten die acht Wochen alten G72-transgenen Mäuse eine verzögerte Schmerzreaktion im Wärmeplattenversuch, einem Versuch zur Messung der supraspinalen Reaktion auf Schmerzreize. Auch bei schizophrenen Patienten wird seit Jahren einen alterierte

Schmerzempfindlichkeit beschrieben. Unklar ist, ob diese Patienten tatsächlich ein herabgesetztes Schmerzempfinden haben, welches beispielsweise durch eine Dysregulation des NMDA-Rezeptors hervorgerufen wird, oder ob diese Patienten Defizite haben Schmerzen auszudrücken (Autie et al., 2009).

Vier Wochen alte G72-transgene Mäuse zeigten gegenüber den Wildtypmäusen keine veränderte Schmerzempfindlichkeit. Beim Menschen entwickeln sich schizophrene Symptome zumeist erst nach der Adoleszenz. Es ist also durchaus möglich, dass sich dieser Phänotyp auch bei G72-transgenen Mäusen erst in höherem Alter entwickelt.

Da sich auch für andere Verhaltensparadigmen keine unterschiedlichen THC-Empfindlichkeiten bei 10 mg/kg KG fanden und die Mäuse auf diese Dosierung eine deutliche Reaktion zeigten, wurde die chronische adoleszente Cannabinoidbehandlung mit dieser Dosis durchgeführt.

4.1.2 Chronische Cannabinoidbehandlung

Die Ergebnisse der chronischen Cannabinoidbehandlung ergaben sehr interessante geschlechtsspezifische Unterschiede. Da die weiblichen Mäuse bei den meisten Versuchen phänotypisch eine geringere Beeinflussung durch die THC-Behandlung zeigten, werden diese Ergebnisse in einem gesonderten Kapitel diskutiert.

Bei Betrachtung der männlichen Tiere ist festzustellen, dass sowohl Wildtyp als auch G72-transgene Mäuse durch die chronische adoleszente Cannabinoidbehandlung Verhaltensänderungen entwickelt haben, die bis weit in das Erwachsenenalter reichen.

4.1.2.1 Beeinflussung des Körpergewichts durch chronische Cannabinoidbehandlung

Das Körpergewicht der Mäuse wurde über einen Zeitraum von acht Wochen hinweg erfasst. Während die anfänglichen Gewichtskontrollen noch zeitgleich mit den Injektionen an jedem zweiten Tag stattfanden, wurden später wöchentliche Kontrollen durchgeführt.

Die männlichen THC-behandelten Wildtypen zeigten grundsätzlich ein niedrigeres Körpergewicht als die Vehikel-behandelten Wildtypiere. Bei G72-transgenen Mäusen ergab sich dagegen eine Gewichtsreduktion der THC-behandelten Tiere nur über die Behandlungsdauer. Zu betonen ist, dass signifikante Gewichtsunterschiede nur für die Wildtypmäuse während der Zeit der THC-Applikation an den pd 25,27,29 und 31 bestanden.

Eine reduzierte Gewichtszunahme der Mäuse ist überraschend, da eine Assoziation zwischen Cannabiskonsum und Appetitstimulation schon lange belegt ist (Abel, 1975). Cannabiskonsumenten beschreiben ein umgehend nach dem Drogenkonsum auftretendes Verlangen nach Nahrungsmitteln, sowie eine intensiviertere sensorische und lustvollere Wahrnehmung der Lebensmittel (Kirkham, 2009). Seit 1992 ist Dronabinol daher zur Appetitstimulation und Kachexiebehandlung zugelassen.

In diesem Versuchsaufbau wurden mit 10 mg/kg KG relativ hohe Dosen THC genutzt. In dieser Dosierung hatte THC deutliche Effekte auf die lokomotorische Aktivität der Tiere. Es ist daher durchaus denkbar, dass die Mäuse zwar einen appetitstimulierenden Effekt der THC-Behandlung wahrnahmen, aber zu sediert waren, um das Futter auch tatsächlich zu konsumieren. Auch in anderen tierexperimentellen Studien wurden reduzierte Gewichtszunahmen der Tiere unter adoleszenter Cannabinoidbehandlung festgestellt, welche sich nach dem Ende der Behandlung wieder normalisierten (Biscaia et al., 2003; Rubino et al., 2008).

4.1.2.2 Drehstab-Versuch (Rota-rod-Versuch)

Der Drehstab-Versuch, als Test für motorische Fähigkeiten, wurde durchgeführt, da sowohl eine sehr hohe Expression von G72 als auch der CB1-Rezeptoren im Cerebellum beschrieben wird.

In den vier Monate alten Tieren konnten starke Defizite der G72-transgenen Tiere im Vergleich zu den Wildtypmäusen festgestellt werden. Dies korreliert sehr gut mit den von Otte et al. veröffentlichten Daten. Weder für die Wildtypmäuse noch für die G72-transgenen Mäuse konnten langfristige Auswirkungen der chronischen Cannabinoidbehandlung festgestellt werden. Cannabinoide können akut verabreicht über die CB1-Rezeptoren im Cerebellum motorische Defizite wie Ataxie und Koordinationsdefizite hervorrufen (Dar, 2000; Patel und Hillard, 2001). Langfristige Effekte von chronischer Cannabinoidbehandlung oder chronischem Cannabiskonsum auf die motorischen Fähigkeiten wurden bisher weder für Menschen noch für Tiere beschrieben und konnten auch in dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

4.1.2.3 Sozialer Interaktionstest

Im Alter von fünf Monaten wurden die Mäuse im sozialen Interaktionstest auf ihr soziales Verhalten gegenüber anderen Mäusen und auf ihren Habitus in einer neuen Umgebung hin untersucht. Das aggressive und freundlich soziale Verhalten der G72-transgenen Mäuse und der Wildtypmäuse wurde durch die THC-Behandlung nicht beeinflusst, auch unter den Genotypen

zeigten sich keine Unterschiede. Während das Buddelverhalten unbeeinflusst blieb, zeigte sich ein erhöhtes Putzverhalten bei Mäusen, die in der Adoleszenz mit THC behandelt wurden. Die Interaktion mit einem Objekt zeigte weder Genotyp- noch behandlungsbedingte Unterschiede.

Die Ergebnisse des sozialen Interaktionstests stehen im Gegensatz zu der Studie von Otte et al., die besagt, dass G72-transgene männliche Mäuse weniger aggressives Verhalten zeigen als Wildtypmäuse. Ebenso konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass G72-transgene Mäuse mehr Buddelaktivität zeigen als Wildtypmäuse (Otte et al., 2009).

Die zu der früheren Untersuchung der G72-transgenen Tiere unterschiedlichen Ergebnisse könnten aus Abweichungen in der Versuchsdurchführung herrühren. So wurden von Otte et al. deutlich jüngere Mäuse, im Alter von etwa acht Wochen, untersucht. Es ist also durchaus in Betracht zu ziehen, dass die dort festgestellten Verhaltensänderungen in höherem Lebensalter nicht mehr nachweisbar sind. Möglicherweise hat aber auch das zusätzliche Einsetzen von zwei Objekten die Sensitivität des sozialen Interaktionstests herabgesetzt.

In mehreren tierexperimentellen Studien zur chronischen Cannabinoidbehandlung in der Adoleszenz konnten Beeinträchtigungen der sozialen Interaktionen festgestellt werden. So zeigten Schneider und Koch bereits 2005 in einem Rattenmodell mit neonatalen Cortexläsionen eine Beeinträchtigung des Sozialverhaltens durch anschließende chronische pubertäre Cannabinoidbehandlung (Schneider und Koch, 2005). Auch Quinn et al. konnten 2008 ein vermindertes Sozialverhalten in Ratten nach adoleszenter, aber auch adulter Cannabinoidbehandlung feststellen (Quinn et al., 2008). Festzuhalten ist jedoch, dass in diesen beiden Studien die soziale Interaktionsfähigkeit bereits nach einer relativ kurzen drogenfreien Zeit von 15 Tagen getestet wurde, während in dieser Arbeit ein weitaus längerer Abstand von 3 Monaten zu der chronischen Cannabinoidbehandlung bestand.

4.1.2.4 Beeinflussung des Angstverhaltens im O-Labyrinth-Versuch

Die angeborene Angst von Mäusen vor offenen, stark beleuchteten Flächen wird im O-Labyrinth-Versuch genutzt, um die Ängstlichkeit der Tiere zu untersuchen. In den Ergebnissen von Otte et al. konnte bisher für G72-transgene Mäuse im Vergleich zu Wildtypen kein verändertes Angstniveau nachgewiesen werden (Otte et al., 2009). Interessanterweise zeigten in dieser Arbeit die G72-transgenen Mäuse im Alter von fünf Monaten ein deutlich erhöhtes Angstverhalten im Vergleich zu Wildtypen. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich diese Verhaltensauffälligkeit erst in späterem Alter manifestiert. Andererseits besteht aber auch die Möglichkeit, dass G72-

transgene Tiere durch die wiederholten Vehikel-Injektionen in ihrer Ängstlichkeit beeinflusst wurden.

Die THC-Behandlung beeinflusste G72-transgene und Wildtypmäuse in völlig unterschiedlicher Art und Weise. Während Wildtypmäuse eine Zunahme des Angstniveaus zeigten, wurde die erhöhte Ängstlichkeit von G72-transgenen Mäusen durch THC-Behandlung vollständig aufgehoben, so dass diese Mäuse das Niveau der Vehikel-behandelten Wildtypmäuse erreichten.

In mehreren tierexperimentellen Studien wurde der Einfluss von chronischer Cannabinoidbehandlung auf das Angstverhalten untersucht. Die Ergebnisse sind durchaus widersprüchlich und variieren je nach gewähltem Behandlungszeitraum, Testverfahren und genutztem Cannabinoid. So konnte in einer Studie in Ratten eine Abnahme des Angstverhaltens nach adoleszenter Verabreichung (pd 35- pd 45) des Cannabinoid-rezeptoragonisten CP 55,940 gezeigt werden (Biscaia et al., 2003), während in einer anderen Studie nach einer 21tägigen Verabreichung (pd 30- pd 51) desselben Agonisten eine Zunahme des Angstverhaltens bei weiblichen Ratten festgestellt wurde (O'Shea et al., 2004). Eine neuere Studie zeigte bei adulten Ratten, die in ihrer Pubertät von pd 35- pd 45 mit THC behandelt wurden, keine Veränderung des Angstverhaltens (Rubino et al., 2008). In einer aktuellen Studie, die das Verhalten von adulten Mäusen unter chronischer THC-Behandlung untersuchte, konnte dagegen eine Zunahme des Angstverhaltens gezeigt werden (Long et al., 2010).

Die Inkonsistenz in diesen Studien kann mehrere Ursachen haben. Möglich ist, dass die Verwendung von unterschiedlichen Angstparadigmen in den einzelnen Studien verschiedene Aspekte des Angstverhaltens beleuchtet und somit auch zu abweichenden Resultaten führt (Ramos, 2008). Ebenso wird auch die Behandlung mit verschiedenen Cannabinoidrezeptoragonisten zu unterschiedlichen Resultaten führen. Während nämlich das natürliche Cannabinoid THC nur einen partialen Agonisten darstellt, sind die anderen genutzten synthetisch hergestellten Cannabinoide wie CP 55,940 volle Agonisten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass der Konsum von Cannabinoiden in der Adoleszenz zu bleibenden emotionalen Veränderungen führt. Von besonderer Bedeutung ist die lange Zeitlatenz zwischen Behandlung und nachweisbaren Verhaltensänderungen, die bisher in keiner anderen tierexperimentellen Studie so gezeigt werden konnten.

Auch humane Studien konnten eine Assoziation zwischen Cannabiskonsum und emotionalen Veränderungen darstellen. So zeigte eine 2007 veröffentlichte Kohortenstudie ein deutlich erhöhtes Risiko für Angststörungen und depressive Erkrankungen nach Cannabiskonsum in der

Adoleszenz unabhängig von individueller und familiärer Vorbelastung (Hayatbakhsh et al., 2007).

4.1.2.5 Kognitive Defizite im Y-Labyrinth-Versuch

Der Y-Labyrinth-Versuch stellt einen einfachen Versuch dar, die Leistungen des Arbeits- und Kurzzeitgedächtnisses zu erfassen. In dieser Arbeit zeigten THC-behandelte Wildtyptiere keine Schwäche zwischen den einzelnen Armen des Labyrinthes zu unterscheiden, während G72-transgene Tiere nach THC-Behandlung deutliche kognitive Defizite aufwiesen.

In tierexperimentellen Studien konnte ein Einfluss von Cannabinoiden, die in der Adoleszenz verabreicht wurden, auf kognitive Fähigkeiten im Erwachsenenalter bisher nur in wenigen Studien beobachtet werden. Die Ergebnisse variieren stark, je nachdem welches Cannabinoid, welches Behandlungsschema und welcher kognitive Test benutzt wurden. So konnten im Objekt-Wiedererkennungstest nach adoleszenter CP55,940-Behandlung Defizite im Arbeitsgedächtnis von männlichen und weiblichen adulten Ratten gezeigt werden (O'Shea et al., 2006; O'Shea et al., 2004). Auch nach einer peripubertalen WIN 55,212-2 Behandlung konnten bleibende Defizite in diesem kognitiven Test nachgewiesen werden (Schneider und Koch, 2003).

Für den natürlichen Cannabinoidagonisten THC existieren dagegen widersprüchliche Daten. Cha et al. konnten beispielsweise keine bleibenden Effekte auf das räumliche Denken im *Morris-water-Maze* in männlichen und weiblichen adulten Ratten nach adoleszenter 21-tägiger THC-Exposition (pd 30-50) nachweisen (Cha et al., 2007; Cha et al., 2006). In einer anderen Studie konnten dagegen nach adoleszenter THC-Behandlung Defizite im Objektwiedererkennungstest nachgewiesen werden. Interessanterweise konnten in dieser Studie auch Defizite nach adulter THC-Behandlung nachgewiesen werden. Diese waren jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als nach adoleszenter Exposition. Dass THC größere Schäden in adoleszenten Gehirnen hervorruft, konnte zudem mittels Proteinexpressionsprofilen bestätigt werden. Eine Analyse von hippocampalen Proteinen der in der Adoleszenz THC-exponierten Tiere zeigte eine gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe veränderte Expression von 27 Proteinen, die vor allem in der Regulation von oxidativem Stress, mitochondrialer Funktion und Zytoarchitektur eine Rolle spielen. Im Vergleich dazu zeigte sich in der adulten Behandlungsgruppe lediglich für 10 dieser Proteine eine veränderte Expression (Quinn et al., 2008). Eine andere Arbeitsgruppe testete weibliche Ratten nach adoleszenter THC-Exposition in verschiedenen kognitiven Paradigmen. Während im aversiven Lernen keine Defizite festgestellt werden konnten, ergaben sich im *Radial*

Maze Defizite im räumlichen Arbeitsgedächtnis. Die Defizite waren korreliert mit einer Abnahme der aktiven Synapsen im präfrontalen Cortex, welches zu einer Reduktion der synaptischen Effizienz führt. In männlichen Ratten konnten diese kognitiven Defizite mit hippocampalen morphologischen Modifikationen, wie beispielsweise eine Verminderung der NMDA-Rezeptoren und Veränderungen der hippocampalen Neuroplastizität belegt werden (Rubino et al., 2009a; Rubino et al., 2009b)

Die kognitiven Defizite konnten in dieser Arbeit ausschließlich bei G72-transgenen Mäusen gefunden werden. Möglich ist, dass die gewählte THC-Dosierung in Wildtypmäusen keine Veränderungen hervorgerufen hat, oder aber sie mit dem einfachen Y-Labyrinth nicht nachgewiesen werden konnten. Dass die Defizite bei gleicher Dosierung bei G72-transgenen Mäusen auftreten, könnte in der vermuteten Funktion des G72 begründet sein. Sowohl eine Regulation der mitochondrialen Funktion als auch eine Herabsetzung der NMDA-Rezeptorfunktion wurden für G72 postuliert. Da Alterationen dieser Funktionen auch nach adoleszenter THC-Behandlung im Zusammenhang mit kognitiven Defiziten diskutiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass G72 hier eine spezifische Rolle zukommt.

4.1.2.6 Lokomotorisches Verhalten im Offenfeld

Im Offenfeld-Versuch zeigte sich interessanterweise eine Reduktion der lokomotorischen Aktivität der G72-transgenen Vehikel-behandelten Tiere gegenüber den Vehikel-behandelten Wildtypmäusen. Diese Beobachtung konnte von Otte et al. in sieben bis acht Wochen alten Mäusen noch nicht gemacht werden. Es ist denkbar, dass sich dieser Verhaltensphänotyp erst mit zunehmendem Alter entwickelt und in dieser Arbeit, in der eher ältere Mäuse untersucht wurden, auffällig wurde. Möglich ist aber auch, dass das lokomotorische Verhalten der G72-transgenen Mäuse durch die Vehikel-Injektionen beeinflusst wurde.

Während die adoleszente THC-Behandlung auf das lokomotorische Verhalten von Wildtypmäusen im Alter von sechs Monaten keinen Einfluss hatte, konnte in den G72-transgenen Mäusen eine deutliche Erhöhung der Aktivität festgestellt werden.

Obwohl dem endogenen Cannabinoidsystem eine Rolle in der Regulation der motorischen Aktivität zugesprochen wird (Rodriguez de Fonseca et al., 1993), konnte in vorangegangenen Studien bisher kein Effekt von THC-Behandlung in der Adoleszenz auf die lokomotorische Aktivität nachgewiesen werden (Rubino et al., 2008). Auch in anderen Studien, in denen synthetische Cannabinoirezeptoragonisten genutzt wurden, wurde meist kein Effekt auf die

lokomotorische Aktivität der Tiere erzielt (Biscaia et al., 2003; O'Shea et al., 2006; O'Shea et al., 2004; Schneider und Koch, 2005). 20-tägige WIN 55,212-2 Behandlung in der Adoleszenz zeigte bei Ratten in einer Studie lediglich die Tendenz eine höhere Distanz zurückzulegen (Bambico et al., 2010), während eine andere Studie mit dem gleichen Cannabinoidrezeptoragonisten eine Steigerung der lokomotorischen und explorativen Aktivität in adulten Ratten nachweisen konnte (Wegener und Koch, 2009).

In einem anderen Tiermodell der Schizophrenie, der DAT-*Knockout* Maus, konnte ebenfalls eine hyperlokomotorische Aktivität festgestellt werden (Ralph et al., 2001). Auch Mäuse, die nur 8 % der NMDA-Rezeptorlevel exprimieren, zeigten eine erhöhte motorische Aktivität, die mit Dopaminantagonisten wie Haloperidol und Clozapin antagonisiert werden konnte (Mohn et al., 1999).

In dieser Arbeit wurden lokomotorische Effekte durch die THC-Behandlung ausschließlich auf G72-transgene Mäuse erzielt. Möglich ist, dass eine adoleszente Cannabinoidbehandlung in Kombination mit G72 zu Veränderungen der glutamatergen und/oder auch dopaminergen Neurotransmission geführt hat, welche dann ursächlich für die Veränderung der motorischen Aktivität sind.

4.1.2.7 PCP-induzierte Hyperlokomotion

Phencyclidin, als nicht-kompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptors, wird in Tiermodellen häufig genutzt um schizophrene Symptomatik zu simulieren. Die von PCP induzierte Hyperlokomotion gilt als Index für eine Positivsymptomatik.

Otte et al. konnten nachweisen, dass G72-transgene Mäuse eine erhöhte Sensitivität gegenüber PCP zeigen. In dieser Arbeit konnten für die Vehikel-behandelten Gruppen keine Sensitivitätsunterschiede gezeigt werden. Die THC-behandelten G72-transgenen Mäuse zeigten dagegen eine deutlich erhöhte PCP-Sensitivität gegenüber den THC-behandelten Wildtypmäusen. Eine mögliche Ursache für die von den vorherigen Daten abweichenden Ergebnisse der Vehikelgruppen könnte eine allgemein höhere Empfindlichkeit der Mäuse gegenüber Phencyclidin im Alter von sechs Monaten darstellen. Während die Wildtypmäuse im Alter von acht Wochen in den Ergebnissen von Otte et al. kaum eine Reaktion auf die PCP-Behandlung zeigten, ist in dieser Arbeit für beide Gruppen eine eindeutige Reaktion festzustellen. Eventuell wurden mögliche Sensitivitätsunterschiede durch eine zu hohe PCP-Dosierung maskiert.

Interessanterweise zeigen THC-behandelte Wildtypmäuse keine Reaktion auf PCP, während G72-transgene Mäuse deutlich mit einer Aktivitätssteigerung reagieren. Möglicherweise führt die chronische adoleszente THC-Behandlung sowohl in den G72-transgenen als auch in den Wildtypmäusen zu einer Abschwächung der PCP-Empfindlichkeit, so dass es möglich wurde die Unterschiede zwischen den Genotypen darzustellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die adoleszente THC-Behandlung zu einer Modulation der NMDA-Rezeptoren geführt hat. In experimentellen Studien wurden bisher selten die kombinierten Effekte von THC und Phencyclidin untersucht. Eine Studie, die an Wildtypmäusen und CB1-Rezeptor-*Knockout* Mäusen durchgeführt wurde, konnte jedoch zeigen, dass Wildtypmäuse mit einer Aktivitätssteigerung auf PCP reagierten, während CB1-Rezeptor defiziente Mäuse eine Aktivitätsminderung zeigten (Haller et al., 2005). Eine Verringerung der CB1-Rezeptordichte könnte demnach durchaus Ursache der verminderten PCP-Reaktion sein.

4.1.2.8 Porsolt-Test (Forced swimming test, behavioral despair test)

Der Porsolt-Test ist ein Versuch, der ursprünglich dazu diente Substanzen mit antidepressivem Potential zu identifizieren (Porsolt et al., 1977). Es wurde festgestellt, dass Antidepressiva in der Lage sind die Zeit, in der die Tiere immobil im Wasser treiben, zu verkürzen. Inzwischen wird der Test auch vermehrt genutzt, um erste Hinweise auf depressives Verhalten zu erhalten.

In diesem Versuch zeigten G72-transgene Tiere nach adoleszenter THC-Behandlung eine Verringerung der Immobilitätszeit im Vergleich zu G72-transgenen Vehikel-behandelten Mäusen.

Eine Studie konnte eine veränderte, in diesem Fall verlängerte, Immobilitätszeit nach adoleszenter Cannabinoidbehandlung im Porsolt-Test ausschließlich für weibliche Ratten nachweisen, während für männliche Ratten keine Veränderung festgestellt werden konnte (Rubino et al., 2008). In einer anderen Studie konnte dagegen gezeigt werden, dass eine erhöhte CB1-Rezeptoraktivierung durch Endocannabinoidwiederaufnahmehemmer zu einer verminderten Immobilitätszeit ähnlich wie nach antidepressiver Behandlung führt (Hill und Gorzalka, 2005). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte wiederum eine Verlängerung der Immobilitätszeit für akut verabreichtes THC in Mäusen nachweisen (Egashira et al., 2008).

Die Auswirkungen der Cannabinoidbehandlung auf den Porsolt-Test sind bisher für chronische THC-Behandlung selten beschrieben und nicht immer im Einklang. Zudem ist beschrieben, dass viele Substanzen zu divergierenden Reaktionen im *Forced swimming test* führen, in Abhängigkeit

davon ob Ratten oder Mäuse genutzt wurden (Borsini und Meli, 1988). Dies liegt mitunter auch an dem abweichenden Versuchsaufbau, der es vorsieht, Ratten an zwei Tagen zu testen, wohingegen Mäuse gängigerweise nur an einem Tag getestet werden.

Die reduzierte Immobilitätszeit der G72-transgenen Tiere in diesem Versuch ist möglicherweise stark durch deren erhöhte Aktivität beeinflusst, so dass es schwierig ist aus diesem Ergebnis unter Beachtung der oben angeführten Beobachtungen weitere Schlüsse zu ziehen.

4.1.2.9 Verhaltensanalyse der weiblichen Tiere

Die weiblichen Mäuse zeigten erstaunlicherweise in den meisten untersuchten Paradigmen keinerlei Veränderungen nach adoleszenter THC-Behandlung.

Im O-Labyrinth ergab sich für die im offenen Bereich verbrachte Zeit ein den männlichen Tieren ähnliches Verhaltensmuster. Ein verändertes Angstverhalten konnte allerdings in der Auswertung des prozentualen Anteils der im offenen Bereich zurückgelegten Distanz an der Gesamtdistanz nicht bestätigt werden. Kognitive Defizite zeigten weibliche Mäuse im Y-Labyrinth nicht, ebenso ergaben sich zwischen den Gruppen keinerlei Unterschiede in der PCP-induzierten Hyperlokomotion und im Porsolt-Test.

Im sozialen Interaktionstest zeigte sich, dass G72-transgene weibliche Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen weniger Zeit mit freundlichem Sozialverhalten verbringen. Da dieser Verhaltensphänotyp im Alter von acht Wochen noch nicht nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass sich dieses Verhalten erst mit höherem Alter manifestiert.

Meistens werden tierexperimentelle Studien ausschließlich mit männlichen Tieren durchgeführt, da man davon ausgeht, dass viele Verhaltenstests durch den weiblichen Zyklus in unbekanntem Ausmaß beeinflusst werden. Die Tatsache, dass die Schizophrenie sich in weiblichen Individuen später und häufig mit einem milderem klinischen Erscheinungsbild manifestiert, hat zu einem stärkeren Interesse an den zugrunde liegenden geschlechtsspezifischen Mechanismen geführt.

Depressionen und Angststörungen scheinen bei weiblichen Individuen in einem höheren Maß mit Cannabiskonsum verbunden zu sein. Eine Studie von Patton et al. konnte beispielsweise zeigen, dass täglicher Cannabiskonsum mit einem fünffach erhöhten Risiko für Angsterkrankungen und Depression bei jungen Frauen einhergeht (Patton et al., 2002). Auch in tierexperimentellen Studien gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang von Cannabiskonsum mit Depression in weiblichen Tieren (Rubino und Parolaro, 2008; Rubino et al., 2008).

In einer dänischen Kohortenstudie wurden Patienten, die wegen Cannabis-induzierter Störungen behandelt wurden, in der darauf folgenden Zeit auf das Auftreten von schizophrenen Störungen hin untersucht. Hier konnte festgestellt werden, dass männliches Geschlecht und frühes Auftreten der Cannabis-induzierten Störungen das Risiko für spätere schizophrene Erkrankungen deutlich erhöhten (Arendt et al., 2005). Pope et al. konnten schlechtere Leistungen der männlichen Studienteilnehmer im Vergleich zu den weiblichen starken Cannabiskonsumern in kognitiven Tests nachweisen (Pope und Yurgelun-Todd, 1996). Bisher existierende tierexperimentellen Studien bestätigen eine erhöhte Vulnerabilität von männlichen Ratten gegenüber der schädlichen kognitiven Effekte der chronischen adoleszenten Cannabinoidexposition (O'Shea et al., 2006; O'Shea et al., 2004).

Auch tierexperimentelle Studien, die die Auswirkung von THC in der fetalen Entwicklung untersucht haben, deuten auf geschlechtsspezifische Unterschiede in der Cannabinoidwirkung hin. So konnte in einer Studie nach maternaler Cannabisexposition vor allem in männlichen Nachkommen eine Alteration der dopaminergen Neurotransmission nachgewiesen werden (Rodriguez de Fonseca et al., 1992). In einer neueren Studie von Gomez et al. konnte gezeigt werden, dass fetale THC-Exposition nur in männlichen Tieren zu der Erhöhung eines Moleküls führt, welches eine wichtige Rolle in Zellproliferation, Zellmigration, Synaptogenese und neuritischer Entwicklung spielt (Gomez et al., 2003).

Möglich ist auch, dass in der Adoleszenz, einer Phase, in der dem endogenen Cannabinoidsystem eine wichtige Rolle bei der Maturation verschiedener Hirnprozesse zukommt, extern zugeführte Cannabinoide den weiblichen und männlichen Organismus auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen.

Um genaue Aussagen treffen und auch mögliche Differenzen im zugrunde liegenden Pathomechanismus feststellen zu können, bedarf es allerdings weiterer humaner und tierexperimenteller Studien.

4.2 Expressionsanalyse der Hauptbestandteile des Endocannabinoidsystems

Zur Untersuchung der mRNA-Expression wurden ausschließlich männliche Tiere genutzt, da diese deutliche Veränderungen in kognitiven und emotionalen Leistungen zeigten.

In den untersuchten Gehirnregionen Hippocampus, Cortex und Cerebellum konnten Unterschiede in der Genexpression ausschließlich für den Cortex festgestellt werden. Interessanterweise zeigte sich eine erniedrigte Expression der CB1-Rezeptoren in G72-transgenen Mäusen im Vergleich zu

Wildtypmäusen. Auch für das an der Cannabinoidsynthese beteiligte Enzym DAGL β konnte eine erniedrigte Expression in G72-transgenen Mäusen im Cortex nachgewiesen werden. In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit Tieren im Alter von drei bis vier Monaten konnten bisher keinerlei Unterschiede zwischen den Genotypen nachgewiesen werden. Möglich ist, dass es durch G72 zu Veränderungen innerhalb des endogenen Cannabinoidsystems kommt, die erst in höherem Alter manifest werden.

Bemerkenswert ist auch, dass in den Expressionsanalysen von DAGL α und DAGL β Genotyp und THC-Behandlung miteinander interagieren. Diese Interaktion korreliert mit dem im O-Labyrinth gemessenen Angstverhalten, dem lokomotorischen Verhalten im offenen Feld und Porsolt-Test.

In vorangegangenen Studien konnten nach chronischer adoleszenter Cannabinoidbehandlung Alterationen im endogenen Cannabinoidsystem festgestellt werden. In Ratten fanden sich beispielsweise in einer Studie von Rubino et al. nach THC-Behandlung signifikant geringere CB1-Rezeptorlevel in der Amygdala, dem ventralen Tegmentum und Nucleus accumbens von weiblichen Tieren. In männlichen Tieren fanden sich dagegen reduzierte CB1-Rezeptordichten in der Amygdala und im Hippocampus (Rubino et al., 2008).

In dieser Arbeit fanden sich tendenziell erniedrigte CB1-Rezeptoren ausschließlich im Cortex. Für andere Hirnregionen konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache dafür, dass nur geringe Alterationen nachgewiesen werden konnten ist, dass die Gehirnentnahme zu einem viel späteren Zeitpunkt nach der THC-Behandlung (ca. drei Monate) erfolgte als in anderen vergleichbaren Studien (ca. ein Monat).

Die unterschiedliche Regulation der cannabinoidsynthetisierenden Enzyme DAGL α und DAGL β deutet darauf hin, dass in G72-transgenen und Wildtypmäusen unterschiedliche Cannabinoidmengen synthetisiert werden. Gerade in Wildtypmäusen ist nach THC-Behandlung eine deutliche Verminderung der DAGL α -Expression festzustellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es in dieser Arbeit gelungen ist Alterationen im endogenen Cannabinoidsystem nach adoleszenter THC-Behandlung bis weit nach der Adoleszenz nachzuweisen. Welchen Einfluss diese Alterationen im endogenen Cannabinoidsystem haben, kann allerdings durch einfache Expressionsanalysen nicht festgestellt werden. Von Bedeutung wäre es, diese Veränderungen durch Rezeptorbindungsstudien zu komplementieren und die Auswirkungen auf andere Neurotransmittersysteme zu verschiedenen Zeitpunkten festzustellen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von chronischer adoleszenter Cannabinoidbehandlung an einem Mausmodell der Schizophrenie untersucht. Es sollte überprüft werden, ob adoleszente Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC)-Behandlung in Tieren mit einer für Schizophrenie prädisponierenden genetischen Veränderung zu veränderten Verhaltensleistungen und zu einer Alteration der Genexpression im Gehirn der Maus führt. Dieser Ansatz entspricht dem Vulnerabilitäts-Stress-Modell der Schizophrenie, nach dem verschiedene Faktoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf einen Organismus einwirken und letztlich additiv zu einem Ausbruch der Erkrankung führen („*two-hit*“-Hypothese).

G72-transgene Mäuse wurden als Mausmodell mit einer erhöhten Vulnerabilität für schizophrene Erkrankungen genutzt und ihr Verhalten nach adoleszenter Cannabinoidbehandlung mit dem Verhalten von Wildtypmäusen verglichen. G72 ist ein Gen, welches erst spät in der Evolution entstanden ist und nur im Genom anthropoider Primaten enthalten ist. In verschiedenen Studien konnte eine Assoziation von G72 mit schizophrenen Erkrankungen gezeigt werden. Die transgenen Mäuse zeigten entsprechend den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe einen für die Schizophrenie relevanten Phänotyp mit Defiziten in kognitiven Leistungen, der Motorkoordination, der Diskriminierung olfaktorischer Signale und erhöhtem kompulsivem Verhalten.

Da die chronische Cannabinoidbehandlung in der Adoleszenz der Tiere über einen Zeitraum von vier Wochen erfolgen sollte, wurde - um gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen- zu Beginn dieser Arbeit ein möglicher Sensitivitätsunterschied in der akuten THC-Reaktion der Tiere untersucht. Wildtyp- und G72-transgene Mäuse unterschiedlichen Alters (4 und 8 Wochen) wurden zunächst einmalig mit THC (10 mg/kg Körpergewicht bzw. 20 mg/kg Körpergewicht) oder dem entsprechenden Vehikel behandelt. Sowohl in Wildtyp- als auch in G72-transgenen Tieren konnte die klassische Cannabinoidrezeptor 1- vermittelte Tetrade mit Reduktion der lokomotorischen Aktivität, einem Absinken der Körpertemperatur, einer Zunahme des kataleptischen Verhaltens und einer Verminderung des Schmerzempfindens als Reaktion auf die THC-Gabe nachgewiesen werden. Da für die Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht keine Unterschiede zwischen G72-transgenen und Wildtypmäusen in der akuten THC-Sensitivität festgestellt werden konnten, wurde diese Dosierung für die chronische Cannabinoidbehandlung gewählt.

Nach der vierwöchigen chronischen THC- Behandlung erfolgte die Untersuchung der Auswirkungen dieser Behandlung auf kognitive, emotionale und motorische Leistungen der adulten Tiere in verschiedenen Verhaltensparadigmen. Die Testung der adulten Tiere erfolgte ab einem Alter von 16 Wochen, nach mindestens 9 Wochen Drogenabstinenz. Sowohl in G72-transgenen als auch in Wildtypmäusen kam es nach der adoleszenten Cannabinoidbehandlung zu lange persistierenden Verhaltensänderungen, die sich vorrangig in männlichen Tieren manifestierten. Während für Wildtypmäuse vor allem Alterationen des Angstniveaus festgestellt wurden, ergaben sich für G72-transgene Mäuse zusätzlich kognitive Defizite und motorische Veränderungen sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Psychotomimetikum Phencyclidin. Diese Verhaltensänderungen können mit den Symptomen einer Schizophrenie in Einklang gebracht werden.

Abschließend wurden Cortex, Cerebellum und Hippocampus der 5,5 Monate alten männlichen Mäuse auf die Expression der wichtigsten Hauptbestandteile des Endocannabinoidsystems sowie auf die die Expression von G72 hin untersucht. Im Cortex der Tiere konnten Alterationen der Expression von Bestandteilen des Endocannabinoidsystems gezeigt werden, während für Cerebellum und Hippocampus keine Expressionsunterschiede festgestellt werden konnten.

Die verstärkten Auswirkungen der adoleszenten Cannabinoidbehandlung auf die G72-transgenen Mäuse können als „*two-hit*“-Effekte interpretiert werden. Eine unterschiedliche Beeinflussung der Verhaltensleistungen durch adoleszente Cannabinoidbehandlung der G72-transgenen und Wildtypiere, welche auch in den Expressionsanalysen bestätigt wird, lässt auch eine spezifische Rolle des G72 vermuten, die jedoch weiterer Klärung bedarf.

6 Literaturverzeichnis

- Abel EL. Cannabis: effects on hunger and thirst. *Behav Biol.* 1975; 15: 255-281
- Abou Jamra R, Schmael C, Cichon S, Rietschel M, Schumacher J, Nöthen MM. The G72/G30 gene locus in psychiatric disorders: a challenge to diagnostic boundaries? *Schizophr Bull.* 2006; 32: 599-608
- Aleman A, Kahn RS, Selten JP. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60: 565-571
- Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JP, Kavvoura FK, Khoury MJ, Tanzi RE, Bertram L. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet.* 2008; 40: 827-834
- Andréasson S, Allebeck P, Engström A, Rydberg U. Cannabis and schizophrenia. A longitudinal study of Swedish conscripts. *Lancet* 1987; 2: 1483-1486
- Arendt M, Rosenberg R, Foldager L, Perto G, Munk-Jørgensen P. Cannabis-induced psychosis and subsequent schizophrenia-spectrum disorders: follow-up study of 535 incident cases. *Br J Psychiatry* 2005; 187: 510-515
- Arseneault L, Cannon M, Witton J, Murray RM. Causal association between cannabis and psychosis: examination of the evidence. *Br J Psychiatry* 2004; 184: 110-117
- Autie A, Montreuil M, Moulier V, Braha S, Wojakiewicz A, Januel D. Pain and schizophrenia: myth and reality. *L'Encephale* 2009; 35: 297-303
- Bambico FR, Nguyen NT, Katz N, Gobbi G. Chronic exposure to cannabinoids during adolescence but not during adulthood impairs emotional behaviour and monoaminergic neurotransmission. *Neurobiology of disease* 2009; 37: 641-655
- Barnett, JH, Werners U, Secher SM, Hill KE, Brazil R, Masson K, Pernet DE, Kirkbride JB, Murray GK, Bullmore ET, Jones PB. Substance use in a population-based clinic sample of people with first-episode psychosis. *Br J Psychiatry* 2007; 190: 515-520
- Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernández-Ruiz JJ. Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* 1999; 33: 181-191
- Bersani G, Orlandi V, Kotzalidis GD, Pancheri P. Cannabis and schizophrenia: impact on onset, course, psychopathology and outcomes. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2002; 252: 86-92
- Biscaia M, Marín S, Fernández B, Marco EM, Rubio M, Guaza C, Ambrosio E, Viveros MP. Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects

- the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)* 2003; 170: 301-308
- Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)* 1988; 94: 147-160
- Cantor-Graae E, Selten JP. Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *Am J Psychiatry* 2005; 162: 12-24
- Caspi, A, Moffitt TE, Cannon M, McClay J, Murray R, Harrington H, Taylor A, Arseneault L, Williams B, Braithwaite A, Poulton R, Craig IW. Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene X environment interaction. *Biol Psychiatry* 2005; 57: 1117-1127
- Cha YM, Jones KH, Kuhn CM, Wilson WA, Swartzwelder HS. Sex differences in the effects of delta9-tetrahydrocannabinol on spatial learning in adolescent and adult rats. *Behav pharmacol.* 2007; 18: 563-569
- Cha YM, White AM, Kuhn CM, Wilson WA, Swartzwelder HS. Differential effects of delta9-THC on learning in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006; 83: 448-455
- Chaperon F, Thiébot MH. Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. *Crit Rev Neurobiol.* 1999; 13: 243-281
- Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, Bougueleret L, Barry C, Tanaka H, La Rosa P, Puech A, Tahri N, Cohen-Akenine A, Delabrosse S, Lissarrague S, Picard FP, Maurice K, Essioux L, Millasseau P, Grel P, Debailleul V, Simon AM, Caterina D, Dufaure I, Malekzadeh K, Belova M, Luan JJ, Bouillot M, Sambucy JL, Primas G, Saumier M, Boubkiri N, Martin-Saumier S, Nasroune M, Peixoto H, Delaye A, Pinchot V, Bastucci M, Guillou S, Chevillon M, Sainz-Fuertes R, Meguenni S, Aurich-Costa J, Cherif D, Gimalac A, Van Duijn C, Gauvreau D, Ouellette G, Fortier I, Raelson J, Sherbatich T, Riazanskaia N, Rogaev E, Raeymaekers P, Aerssens J, Konings F, Luyten W, Macciardi F, Sham PC, Straub RE, Weinberger DR, Cohen N, Cohen D. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 13675-13680
- Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci.* 2011; 29: 311-324
- Compton DR, Gold LH, Ward SJ, Balster RL, Martin BR. Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992; 263: 1118-1126
- Compton DR, Rice KC, De Costa BR, Razdan RK, Melvin LS, Johnson MR, Martin BR. Cannabinoid structure-activity relationships: correlation of receptor binding and in vivo activities. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 265: 218-226

- Coyle JT, Tsai G, Goff D. Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1003: 318-327
- D'Souza DC, Abi-Saab WM, Madonick S, Forselius-Bielen K, Doersch A, Braley G, Gueorguieva R, Cooper TB, Krystal JH. Delta-9-tetrahydrocannabinol effects in schizophrenia: implications for cognition, psychosis, and addiction. *Biol Psychiatry* 2005; 57: 594-608
- D'Souza DC, Perry E, MacDougall L, Ammerman Y, Cooper T, Wu YT, Braley G, Gueorguieva R, Krystal JH. The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 1558-1572
- Dar MS. Cerebellar CB(1) receptor mediation of Delta(9)-THC-induced motor incoordination and its potentiation by ethanol and modulation by the cerebellar adenosinergic A(1) receptor in the mouse. *Brain Res.* 2000; 864: 186-194
- Davies GJ, Welham J, Chant D, Torrey EF, McGrath J. A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2003; 29: 587-593
- Dawe GS, Hwang EH, Tan CH. Pathophysiology and animal models of schizophrenia. *Ann Acad Med Singapore.* 2009; 38: 425-426
- De Marchi NL, De Petrocellis L, Orlando P, Daniele F, Fezza F, Di Marzo V. Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia. *Lipids Health Dis.* 2003; 2: 5
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988; 34: 605-613
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258: 1946-1949
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3: 771-784
- Drogen- und Suchtbericht der Bundesregierung 2009, Bundesministerium für Gesundheit
- Eaton WW, Hall AL, Macdonald R, McKibben J. Case identification in psychiatric epidemiology: a review. *Int Rev Psychiatry.* 2007; 19: 497-507
- Ebert D, *Psychiatrie systematisch* 6.Auflage, Bremen: UNI-MED, 2005
- Egashira N, Matsuda T, Koushi E, Higashihara F, Mishima K, Chidori S, Hasebe N, Iwasaki K, Nishimura R, Oishi R, Fujiwara M. Delta(9)-tetrahydrocannabinol prolongs the immobility time in the mouse forced swim test: involvement of cannabinoid CB(1) receptor and serotonergic system. *Eur J Pharmacol.* 2008; 589: 117-121
- Ehrenreich H, Rinn T, Kunert HJ, Moeller MR, Poser W, Schilling L, Gigerenzer G, Hoehle MR.

Specific attentional dysfunction in adults following early start of cannabis use. *Psychopharmacology (Berl)* 1999; 142: 295-301

Ellenbroek BA, Cools AR. Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. *Behav Pharmacol.* 2000; 11: 223-233

Favrat B, Ménétrey A, Augsburger M, Rothuizen LE, Appenzeller M, Buclin T, Pin M, Mangin P, Giroud C. Two cases of "cannabis acute psychosis" following the administration of oral cannabis. *BMC Psychiatry.* 2005; 5: 17

Fergusson DM, Horwood LJ, Swain-Campbell NR. Cannabis dependence and psychotic symptoms in young people. *Psychol Med.* 2003 33: 15-21

Fernandez-Espejo E, Viveros MP, Núñez L, Ellenbroek BA, Rodriguez de Fonseca F. Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* 2009; 206: 531-549

Fernández-Ruiz J, Berrendero F, Hernández ML, Ramos JA. The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci.* 2000; 23: 14-20

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 1996; 379: 606-612

Giuffrida A, Leweke FM, Gerth CW, Schreiber D, Koethe D, Faulhaber J, Klosterkötter J, Piomelli D. Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 2108-2114

Goff DC, Coyle JT. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2001; 158: 1367-1377

Gómez M, Hernández M, Johansson B, de Miguel R, Ramos JA, Fernández-Ruiz J. Prenatal cannabinoid and gene expression for neural adhesion molecule L1 in the fetal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003; 147: 201-207

Gottesman, II, McGuffin P, Farmer AE. Clinical genetics as clues to the "real" genetics of schizophrenia (a decade of modest gains while playing for time). *Schizophr Bull.* 1987; 13: 23-47

Grech A, Van Os J, Jones PB, Lewis SW, Murray RM. Cannabis use and outcome of recent onset psychosis. *Eur Psychiatry* 2005; 20: 349-353

Hall W, Solowij N. Adverse effects of cannabis. *Lancet* 1998; 352: 1611-1616

Haller J, Szirmai M, Varga B, Ledent C, Freund TF. Cannabinoid CB1 receptor dependent effects of the NMDA antagonist phencyclidine in the social withdrawal model of schizophrenia. *Behav Pharmacol.* 2005; 16: 415-422

Harkany T, Keimpema E, Barabás K, Mulder J. Endocannabinoid functions controlling neuronal

specification during brain development. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 286: 84-90

- Hayatbakhsh MR, Najman JM, Jamrozik K, Mamun AA, Alati R, Bor W. Cannabis and anxiety and depression in young adults: a large prospective study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2007; 46: 408-417
- Henquet C, Krabbendam L, Spauwen J, Kaplan C, Lieb R, Wittchen HU, van Os J. Prospective cohort study of cannabis use, predisposition for psychosis, and psychotic symptoms in young people. *BMJ* 2005; 330: 11
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 1932-1936
- Hill MN, Gorzalka BB. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2005; 15: 593-599
- Hughes RN. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004; 28: 497-505
- Kapur S, Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27: 1081-1090
- Kirkham TC. Cannabinoids and appetite: food craving and food pleasure. *Int Rev Psychiatry.* 2009; 21: 163-171
- Krystal JH, D'Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, Hoffman R. NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology (Berl).* 2003; 169: 215-233
- Kvajo M, Dhillon A, Swor DE, Karayiorgou M, Gogos JA. Evidence implicating the candidate schizophrenia/bipolar disorder susceptibility gene G72 in mitochondrial function. *Mol Psychiatry* 2008; 13: 685-696
- Leweke FM, Giuffrida A, Koethe D, Schreiber D, Nolden BM, Kranaster L, Neatby MA, Schneider M, Gerth CW, Hellmich M, Klosterkötter J, Piomelli D. Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: impact of cannabis use. *Schizophr Res.* 2007; 94: 29-36
- Leweke FM, Giuffrida A, Wurster U, Emrich HM, Piomelli D. Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport* 1999; 10: 1665-1669
- Lipska BK, Weinberger DR. Genetic variation in vulnerability to the behavioral effects of neonatal hippocampal damage in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 8906-8910
- Long LE, Giuffrida A, Wurster U, Emrich HM, Piomelli D. A behavioural comparison of acute and chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2010; 13: 861-876

- Madeira C, Freitas ME, Vargas-Lopes C, Wolosker H, Panizzutti R. Increased brain D-amino acid oxidase (DAAO) activity in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2008; 101: 76-83
- 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
- Maynard TM, Sikich L, Lieberman JA, LaMantia AS. Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2001; 27: 457-476
- McAllister SD, Glass M. CB(1) and CB(2) receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002; 66: 161-171
- McGrath J, Saha S, Welham J, El Saadi O, MacCauley C, Chant D. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Med* 2004; 2: 13
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Graeme G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50: 83-90
- Mechoulam R, Gaoni. A Total Synthesis of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc.* 1965; 87: 3273-3275
- Miyamoto Y, Yamada K, Noda Y, Mori H, Mishina M, Nabeshima T. Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neuronal systems in mice lacking the NMDA receptor epsilon1 subunit. *J Neurosci.* 2001; 21: 750-757
- Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 1999; 98: 427-436
- Moore TH, Zammit S, Lingford-Hughes A, Barnes TR, Jones PB, Burke M, Lewis G. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet* 2007; 370: 319-328
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO Jr, Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4926-4931
- Mueser KT, Yarnold PR, Levinson DF, Singh H, Bellack AS, Kee K, Morrison RL, Yadalam KG. Prevalence of substance abuse in schizophrenia: demographic and clinical correlates. *Schizophr Bull.* 1990; 16: 31-56
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61-65
- Murray RM, Morrison PD, Henquet C, Di Forti M. Cannabis, the mind and society: the hash realities. *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8: 885-895
- Nuechterlein KH, Dawson ME. A heuristic vulnerability/stress model of schizophrenic episodes.

Schizophr Bull. 1984; 10: 300-312

- O'Shea M, McGregor IS, Mallet PE. Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J Psychopharmacol.* 2006; 20: 611-621
- O'Shea M, Singh ME, McGregor IS, Mallet PE. Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J Psychopharmacol.* 2004; 18: 502-508
- Otte DM, Bilkei-Gorzó A, Filiou MD, Turck CW, Yilmaz O, Holst MI, Schilling K, Abou-Jamra R, Schumacher J, Benzel I, Kunz WS, Beck H, Zimmer A. Behavioral changes in G72/G30 transgenic mice. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2009; 19: 339-348
- Patel S, Hillard CJ. Cannabinoid CB(1) receptor agonists produce cerebellar dysfunction in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 297: 629-637
- Patton GC, Coffey C, Carlin JB, Degenhardt L, Lynskey M, Hall W. Cannabis use and mental health in young people: cohort study. *BMJ* 2002; 325: 1195-1198
- Pedersen CB, Mortensen PB. Evidence of a dose-response relationship between urbanicity during upbringing and schizophrenia risk. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 1039-1046
- Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther.* 1997; 74: 129-180
- Pertwee RG. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br J Pharmacol.* 2009; 156: 397-411
- Pope HG Jr, Gruber AJ, Hudson JI, Cohane G, Huestis MA, Yurgelun-Todd D. Early-onset cannabis use and cognitive deficits: what is the nature of the association? *Drug Alcohol Depend.* 2003; 69: 303-310
- Pope HG Jr, Gruber AJ, Yurgelun-Todd D. The residual neuropsychological effects of cannabis: the current status of research. *Drug Alcohol Depend.* 1995; 38: 25-34
- Pope HG Jr, Yurgelun-Todd D. The residual cognitive effects of heavy marijuana use in college students. *JAMA* 1996; 275: 521-527
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1977; 229: 327-336
- Quinn HR, Matsumoto I, Callaghan PD, Long LE, Arnold JC, Gunasekaran N, Thompson MR, Dawson B, Mallet PE, Kashem MA, Matsuda-Matsumoto H, Iwazaki T, McGregor IS. Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 1113-1126
- Ralph RJ, Paulus MP, Fumagalli F, Caron MG, Geyer MA. Prepulse inhibition deficits and perseverative motor patterns in dopamine transporter knock-out mice: differential effects

- of D1 and D2 receptor antagonists. *J Neurosci.* 2001; 21: 305-313
- Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29: 493-498
- Realini N, Rubino T, Parolaro D. Neurobiological alterations at adult age triggered by adolescent exposure to cannabinoids. *Pharmacol Res.* 2009; 60: 132-138
- Regier DA, Farmer ME, Rae DS, Locke BZ, Keith SJ, Judd LL, Goodwin FK. Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. *JAMA* 1990; 264: 2511-2518
- Rodriguez de Fonseca F, Hernández ML, de Miguel R, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA. Early changes in the development of dopaminergic neurotransmission after maternal exposure to cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992; 41: 469-474
- Rodriguez de Fonseca F, Ramos JA, Bonnin A, Fernández-Ruiz JJ. Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport* 2003; 4: 135-138
- Rubino T, Parolaro D. Long lasting consequences of cannabis exposure in adolescence. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 286: S108-113
- Rubino T, Realini N, Braida D, Alberio T, Capurro V, Viganò D, Guidali C, Sala M, Fasano M, Parolaro D. The depressive phenotype induced in adult female rats by adolescent exposure to THC is associated with cognitive impairment and altered neuroplasticity in the prefrontal cortex. *Neurotox Res.* 2009 a; 15: 291-302
- Rubino T, Realini N, Braida D, Guidi S, Capurro V, Viganò D, Guidali C, Pinter M, Sala M, Bartesaghi R, Parolaro D. Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus* 2009 b; 19: 763-772
- Rubino T, Viganò D, Realini N, Guidali C, Braida D, Capurro V, Castiglioni C, Cherubino F, Romualdi P, Candeletti S, Sala M, Parolaro D. Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 2760-2771
- Sacchi S, Bernasconi M, Martineau M, Mothet JP, Ruzzene M, Pilone MS, Pollegioni L, Molla G. pLG72 modulates intracellular D-serine levels through its interaction with D-amino acid oxidase: effect on schizophrenia susceptibility. *J Biol Chem.* 2008; 283: 22244-22256
- Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med.* 2005; 2: e141
- Schneider M, Koch M. Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 1760-1769
- Schneider M, Koch M. Deficient social and play behavior in juvenile and adult rats after neonatal

cortical lesion: effects of chronic pubertal cannabinoid treatment. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 944-957

Schramm-Sapyta NL, Cha YM, Chaudhry S, Wilson WA, Swartzwelder HS, Kuhn CM. Differential anxiogenic, aversive, and locomotor effects of THC in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007; 191: 867-877

Seeman P, Lee T. Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science* 1975; 188: 1217-1219

Shepherd JK, Grewal SS, Fletcher A, Bill DJ, Dourish CT. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. 1994; 116: 56-64

Siever LJ, Davis KL. The pathophysiology of schizophrenia disorders: perspectives from the spectrum. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 398-413

Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60: 1187-1192

Takeuchi T, Kiyama Y, Nakamura K, Tsujita M, Matsuda I, Mori H, Munemoto Y, Kuriyama H, Natsume R, Sakimura K, Mishina M. Roles of the glutamate receptor epsilon2 and delta2 subunits in the potentiation and prepulse inhibition of the acoustic startle reflex. *Eur J Neurosci*. 2001; 14: 153-160

Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res*. 2008; 102: 1-18

Toda M, Abi-Dargham A. Dopamine hypothesis of schizophrenia: making sense of it all. *Curr Psychiatry Rep*. 2007; 9: 329-336

Trezza V, Cuomo V, Vanderschuren LJ. Cannabis and the developing brain: insights from behavior. *Eur J Pharmacol*. 2008; 585: 441-452

van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet* 2009; 374: 635-645

Wang X, Dow-Edwards D, Keller E, Hurd YL. Preferential limbic expression of the cannabinoid receptor mRNA in the human fetal brain. *Neuroscience* 2003; 118: 681-694

Wegener N, Koch M. Behavioural disturbances and altered Fos protein expression in adult rats after chronic pubertal cannabinoid treatment. *Brain Res*. 2009; 1253: 81-91

Weiser M, Knobler HY, Noy S, Kaplan Z. Clinical characteristics of adolescents later hospitalized for schizophrenia. *Am J Med Genet*. 2002; 114: 949-955

Wilson W, Mathew R, Turkington T, Hawk T, Coleman RE, Provenzale J. Brain morphological changes and early marijuana use: a magnetic resonance and positron emission tomography study. *J Addict Dis*. 2000; 19: 1-22

Wohl M, Gorwood P. Paternal ages below or above 35 years old are associated with a different risk of schizophrenia in the offspring. *Eur Psychiatry* 2007; 22: 22-26

Zammit S, Allebeck P, Andreasson S, Lundberg I, Lewis G. Self reported cannabis use as a risk factor for schizophrenia in Swedish conscripts of 1969: historical cohort study. *BMJ* 2002; 325: 1199

Zubin J, Spring B. Vulnerability--a new view of schizophrenia. *J Abnorm Psychol.* 1977; 86: 103-126

7 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt allen, die zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Zimmer für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Dissertation am Institut für Molekulare Psychiatrie der Universität Bonn erstellen zu können. Insbesondere bedanke ich mich für sein Vertrauen, seine persönliche Förderung und Unterstützung diese Arbeit zu einem größtmöglichen Erfolg zu führen.

Herrn Dr. David Otte danke ich für seine hervorragende Betreuung und seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Herrn PD Dr. Andràs Bilkei-Gorzo und Frau Dr. Ildikó RÁCZ danke ich für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Verhaltensversuche.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Kerstin Michel, Öznur Yilmaz und Anne Zimmer für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und ihre unerschöpfliche Geduld. Kim Neitzert und Astrid Becker danke ich herzlichst für ihre Bereitschaft zur Diskussion in allen Lebenslagen.

Desweiteren danke ich allen MitarbeiterInnen des IMP für ihre freundliche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima. Ich bedanke mich herzlichst für eine aufregende, schöne Zeit in Bonn und für die gewonnenen Freundschaften.

Meiner Schwester Laura Knüppel danke ich für die Korrektur dieser Dissertation, ihre Hilfestellungen und ihre konstruktiven Anregungen.

Meinem Mann John Scharlau danke ich für seine unerschöpfliche Geduld, seine Diskussionsbereitschaft und seine immerwährende Unterstützung.

Abschließend danke ich meiner Familie für ihre liebevolle Unterstützung und ihren emotionalen Rückhalt.