

Aus der Klinik und Poliklinik II - Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

Die Rolle des Enzyms Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH)  
und von Varianten des FAAH Gens bei chronisch  
entzündlichen Darmerkrankungen

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von  
Dominik Emmerdinger  
aus  
Altötting  
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München:

Berichterstatter: PD Dr. med. M. Storr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Clemens von Schacky  
Prof. Dr. Heiko Hermeking

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. S. Brand

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen  
Prüfung: 15.10.2009

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	5
1.1	Botanische Eingruppierung der Gattung Cannabis .....	5
1.2	Geschichte der Cannabisnutzung .....	5
1.3	Das Endocannabinoidsystem.....	6
1.4	Fatty acid amide hydrolase als Schlüsselenzym im Endocannabinoidsystem ...	7
1.5	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....	8
1.5.1	Morbus Crohn.....	8
1.5.2	Colitis ulzerosa .....	9
1.6	Zusammenhang zwischen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und dem Endocannabinoidsystem .....	11
1.7	Fragestellung dieser Arbeit .....	11
2	Abkürzungsverzeichnis .....	13
3	Material und Methoden .....	14
3.1	Patienten .....	14
3.2	Isolierung der DNA .....	15
3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	16
3.3.1	Ermittlung des FAAH-Polymorphismus .....	17
3.3.2	Verdau der PCR-Produkte .....	18
3.3.3	Agarosegelelektrophorese .....	18
3.4	Zellkultur .....	20
3.5	Biopsien.....	20
3.6	Realtime-PCR.....	20
3.6.1	Quantifizierung.....	21
3.6.2	$C_T$ -Wert.....	21
3.6.3	Effizienz .....	22
3.6.4	Relative Quantifizierung .....	22
3.6.5	Berechnung mit Hilfe einer Standardkurve.....	22
3.6.6	Durchführung der RT-PCR .....	22
3.6.7	Statistik.....	25
3.6.8	Geräte und Materialien .....	25
4	Ergebnisse .....	28
4.1	Ergebnisse des FAAH-Polymorphismus .....	28
4.1.1	Zusammenhang zwischen dem FAAH-Polymorphismus und der Anfälligkeit für CED .....	28
4.1.2	Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp.....	29
4.2	Biopsien und Zellkultur .....	36

---

4.2.1	Standardkurve.....	36
4.2.2	Analyse der Biopsiedaten.....	37
4.2.3	Analyse der Zellkulturdaten .....	39
5	Diskussion .....	40
5.1	Morbus Crohn und Colitis ulzerosa Genetik.....	40
5.1.1	Genetik des Morbus Crohn.....	40
5.1.2	Genetik der Colitis ulzerosa .....	41
5.2	Das Endocannabinoidsystem (ECS).....	42
5.2.1	Cannabisrezeptoren .....	42
5.2.2	Physiologische Aufgaben des ECS .....	43
5.2.3	Zellbiologie des ECS.....	44
5.2.4	CB1-Rezeptor-Signal-Transduktion.....	45
5.2.5	Das ECS im Gastrointestinaltrakt.....	46
5.2.6	Das ECS bei gastrointestinalen Erkrankungen.....	47
5.2.7	Das ECS und gastrointestinale Entzündungsreaktionen .....	49
5.2.8	Fatty acid amide hydrolase.....	50
5.2.9	FAAH und chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....	52
6	Zusammenfassung .....	54
7	Abbildungsverzeichnis .....	58
8	Tabellenverzeichnis.....	59
9	Referenzen.....	61
10	Lebenslauf .....	78
11	Danksagung .....	80

# 1 Einleitung

## 1.1 Botanische Eingruppierung der Gattung Cannabis

Cannabis, eine zur Familie der Cannabaceae gehörende einjährige Pflanze, wird von Botanikern in drei unterschiedliche Arten unterteilt. Dabei wird die erste Art Cannabis sativa vor allem zur Fasergewinnung benutzt, da sie einen faserreichen Stängel und nur eine sehr geringe Menge psychoaktiver Inhaltsstoffe besitzt. Die zweite Art nennt sich Cannabis indica und wird vornehmlich zur Gewinnung der psychoaktiven Bestandteile verwendet. Bei Cannabis ruderalis hingegen handelt es sich vermutlich um eine verwilderte Art der Cannabispflanze. Bei allen drei Arten handelt es sich um zweihäusige Pflanzen, d.h. die männlichen und weiblichen Blüten sind nie zusammen auf einer, sondern immer nur auf verschiedenen Pflanzen zu finden. Zur Gewinnung von psychoaktiven Pflanzenteilen werden meist nur die Blüten und Blätter der weiblichen Pflanzen verwendet, da diese Bestandteile der Pflanze den höchsten Gehalt an psychoaktiven Wirkstoffen aufweisen.

## 1.2 Geschichte der Cannabisnutzung

Die erste schriftliche Erwähnung der Cannabisnutzung geht auf den chinesischen Kaiser Shen-Nung 2737 vor Christus zurück, der vom Einsatz der Cannabispflanze bei Malaria, Berberi, Rheuma und Frauenleiden berichtet. Auch die indisch, vedische Literatur erwähnt den Einsatz von Cannabis zu medizinischen und rituellen Zwecken.

Von Zentralasien ausgehend breitete sich die Cannabispflanze nahezu weltweit aus und erreichte in Europa im 18. Jahrhundert einen ersten Höhepunkt der Verwendung. In Frankreich wurde zu dieser Zeit vor allen Dingen die bewusstseinsverändernde Wirkung in literarischen Kreisen geschätzt. In England hingegen war Cannabis zeitgleich aufgrund seiner medizinischen Einsatzmöglichkeiten bekannt. Eine medizinische Anwendung fand zum Beispiel bei der Linderung von Schmerzen und der Senkung der Anfallshäufigkeit bei Epilepsiepatienten statt.

Bis ins erste Drittel des 20. Jahrhunderts war Cannabis vor allem in Form von alkoholischen Extrakten ein leicht verfügbares und deshalb sehr häufig verschriebenes Medikament.

Ein Verbot der Cannabisnutzung wurde erstmals 1925 auf der Opiumkonferenz in Genf diskutiert. 1929 trat schließlich das Opiumgesetz des deutschen Reiches in Kraft. Da Cannabis in den folgenden Jahrzehnten immer häufiger als bewusstseinsweiternde Droge missbraucht wurde, verabschiedete die deutsche Regierung am 24. Dezember 1971 das Betäubungsmittelgesetz, das den Gebrauch von Cannabisprodukten unter Strafe stellte.

### 1.3 Das Endocannabinoidsystem

1964 beschrieb R. Mechoulam die korrekte chemische Struktur von  $\Delta^9$ -THC, dem wichtigsten pharmakologischen und toxikologischen Inhaltsstoff der Cannabispflanze. Seitdem wurden über 60 unterschiedliche Cannabinoide isoliert. Als man 1990 den CB1-Rezeptor und drei Jahre später den CB2-Rezeptor klonierte und dadurch zum ersten mal einen Einblick in die Wirkungsweise der Cannabinoide erzielte, erfuhr die Pflanze einen erneuten Höhepunkt des wissenschaftlichen Interesses<sup>84;94</sup>.

1992 schließlich isolierte Devane den ersten körpereigenen Stoff, der an den CB1-Rezeptor bindet, das N-Arachidonylethanolamid, besser bekannt als Anandamid<sup>32</sup>. In den folgenden Jahren wurden weitere sogenannte Endocannabinoide gefunden und lieferten damit einen besseren Einblick in das Endocannabinoid-System. Abbildung 1 zeigt die chemischen Strukturformeln von  $\Delta^9$ -THC und Anandamid, die beide an den CB1-Rezeptor binden.

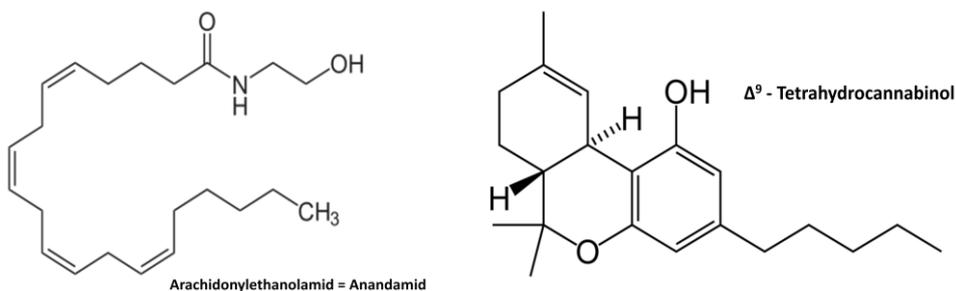


Abbildung 1 chemische Struktur von Anandamid und  $\Delta^9$ -THC

## 1.4 Fatty acid amide hydrolase als Schlüsselenzym im Endocannabinoidsystem

Im Jahr 1996 klonierte Ben Cravatt das Enzym Fatty acid amide hydrolase, das eine entscheidende Rolle im Endocannabinoid-System spielt <sup>21</sup>.

FAAH ist ein Membranprotein, das bioaktive Amide einschließlich des Endocannabinoids Anandamid in Arachidonsäure und Ethanolamin hydrolisiert und damit die Wirkung von Anandamid beendet. FAAH ist auch in der Lage andere Endocannabinoide in freie Fettsäuren und Ethanolamin zu zersetzen. Durch seine enzymatische Aktivität nimmt FAAH Einfluss auf die vorhandene Menge an Anandamid und anderer Endocannabinoide und stellt damit eine interessante Angriffsstelle für Medikamente dar. Mittlerweile sind sowohl nicht-selektive als auch selektive Inhibitoren des Enzyms bekannt. Beispiele für nicht-selektive Inhibitoren sind: Phenylmethylsulfonylfluorid, Methoxyarachidonyl-fluorophosfonat und Arachidonoyltrifluoromethylketon. URB597 ist ein selektiver Inhibitor des FAAH-Enzyms und führt durch seine blockierende Wirkung des FAAH-Enzyms zu einer Vermehrung von Anandamid im ZNS und in der Peripherie <sup>111</sup>.

Cravatt et al. konnten die Auswirkungen bei fehlendem FAAH an Rezeptor-defizienten „Knockout“-Mäusen zeigen. Durch das Ausschalten des FAAH-Enzyms entwickelten die Mäuse 15-fach höhere Anandamid-Konzentrationen im Gehirn, als dies bei normalen Mäusen der Fall ist. Als Resultat dessen zeigte sich eine vielfach niedrigere Schmerzanfälligkeit, die mit dem CB1-Antagonisten SR141716A aufgehoben werden konnte .

2002 fand man eine Missense Mutation im humanen FAAH Gen, die dazu führt, dass das Enzym bei homozygoten Trägern der Mutation zwar normale katalytische Eigenschaften besitzt, aber anfälliger gegen den proteolytischen Abbau ist <sup>118</sup>. Dadurch kommt das Endocannabinoidsystem anscheinend soweit aus dem Gleichgewicht, dass die Menge an Endocannabinoiden im Gehirn bis auf das 10-fache des Normalwertes steigt <sup>118</sup>. In Studien zeigte sich, dass Menschen, die diese Mutation aufweisen, anfälliger für Drogen- und Alkoholabhängigkeit sind und zu Übergewicht und Adipositas neigen <sup>118;119</sup>.

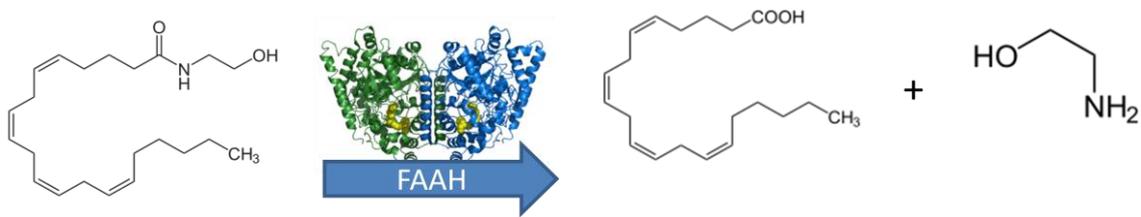


Abbildung 2 Abbau von Anandamid durch FAAH in Arachidonsäure und Ethalonamin

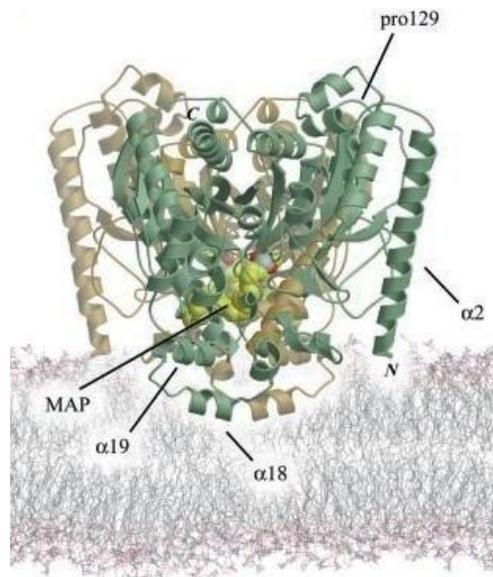


Abbildung 3 FAAH als integrales Membranprotein in einer Lipiddoppelschicht  
Mittels Röntgenkristallographie wurde die dreidimensionale Struktur des Enzyms entschlüsselt<sup>10</sup>. Der mit pro129 markierte Locus zeigt die Stelle im Protein, an der der untersuchte Polymorphismus lokalisiert ist<sup>10</sup>.

## 1.5 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

### 1.5.1 Morbus Crohn

Der Morbus Crohn gehört zur Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Die erste klare Deskription der Charakteristika des Morbus Crohn wurde 1932 von B.B. Crohn zusammen mit L. Ginzburg und G. Oppenheimer im JAMA publiziert<sup>23</sup>. Beim Morbus Crohn handelt es sich um eine chronisch-granulomatöse Erkrankung, die den gesamten Gastrointestinaltrakt von der Mundhöhle bis zum After betreffen kann. Am häufigsten ist jedoch das terminale Ileum befallen (bis etwa 40%), während ein

alleiniger Befall des Kolons bei etwa 15-35% der Patienten beobachtet wird. Der Befall des oberen Gastrointestinaltraktes ist deutlich seltener (5-8%)<sup>41</sup>.

Charakterisierend für den Morbus Crohn ist der diskontinuierliche, segmentale Befall der Darmschleimhaut. Dabei kommt es zu einer transmuralen Entzündung, die alle Wandabschnitte von der Tunica mucosa bis zur Tunica serosa mit einbeziehen kann. Daraus resultiert eine ödematöse Verdickung der Darmwand und es können sich Fisteln, Fissuren und Stenosen ausbilden.

Klinisch präsentiert sich der Morbus Crohn häufig mit Müdigkeit, abdominellen Schmerzen und meist unblutigen Durchfällen. Es zeigen sich auch häufig unklares Fieber, starker Gewichtsverlust, Übelkeit und Erbrechen. Nicht bei allen Betroffenen manifestiert sich die Erkrankung mit Diarrhoen. Bis zu 50% der Erkrankten haben extraintestinale Manifestationen ihrer Erkrankung, die sich an der Haut (Aphten, Erythema nodosum), den Gelenken (Arthritiden), an den Augen (Uveitis und Episkleritis), an der Leber (primär sklerosierende Cholangitis), an den Gefäßen (venöse und arterielle Thrombembolien) und an den Nieren (Amyloidose) entwickeln können<sup>25</sup>.

Der Morbus Crohn weist einen Altersgipfel bei etwa 30 Jahren auf und kommt in der Bundesrepublik Deutschland mit einer Inzidenz von 5,2/100000 vor<sup>115;126</sup>.

Die Ätiologie der Erkrankung ist weitestgehend unbekannt. Neben den Annahmen, dass Umwelt- und psychische Einflüsse bei der Entstehung beteiligt sein könnten, hat sich 2001 die Identifikation von Varianten im NOD2/CARD15-Gen als bedeutender Risikofaktor herausgestellt<sup>59;96</sup>.

### **1.5.2 Colitis ulzerosa**

Die Colitis ulzerosa gehört ebenfalls zur Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Dabei ist stets ein Beginn im Rektum zu beobachten, von dem aus sich die Erkrankung bei der 54% der Betroffenen innerhalb 10 Jahren weiter nach proximal ausbreitet<sup>89</sup>. Die Entzündung ist bei der Colitis ulzerosa auf die Mukosa beschränkt.

Klinisch wird die Erkrankung meist durch anhaltende blutig, schleimige Diarrhoen auffällig. Viele Patienten berichten über einen ausgeprägten Drang zur Defäkation und haben konstant ein Gefühl inkompletter Stuhlentleerung. In vielen Fällen berichten die Patienten auch über Schmerzen im unteren linken Abdomen, die häufig kollikartig ausgeprägt sind und von einem starken Drang zur Defäkation begleitet werden. Bei schweren Krankheitsverläufen kommen zu den abdominellen Beschwerden auch systemische Krankheitssymptome wie Appetitlosigkeit, Leistungsminderung und vermehrte Müdigkeit.

Die Colitis ulzerosa verläuft in rezidivierenden Schüben von unterschiedlich langer Dauer. Patienten mit ausgeprägtem Kolonbefall erleiden dabei häufiger Krankheitsschübe. Aus diesem Grund ist es oft nötig, dass diese Patienten kolektomiert werden.

Der akute Schub ist durch die typischen klinischen Beschwerden (blutig, schleimige Diarrhoen; Tenesmen) gekennzeichnet. Die fulminante Colitis ulzerosa stellt einen akuten Schub mit systemischer Beteiligung wie z.B. Fieber und Anämie dar. Die gefürchtetste Komplikation der Colitis ulzerosa ist das sogenannte toxische Megakolon, bei dem der Kolondurchmesser in der Abdomenleeraufnahme mehr als 6 cm beträgt. Dabei kann es zur freien oder gedeckten Perforation des Kolons in die Bauchhöhle, Retroperitoneum oder den Beckenboden kommen. Beim chronisch-aktiven Verlauf kann ein akuter Schub zwar medikamentös gelindert werden, allerdings ist keine komplette Remission zu erreichen. Von einer klinischen Remission kann man dann ausgehen, wenn der Patient keine Diarrhoen angibt, kein sichtbares Blut im Stuhl und keine intestinalen und extraintestinalen Manifestationen bestehen.

Bei der Colitis ulzerosa können ebenfalls extraintestinale Manifestationen beobachtet werden, die dieselben Organe wie auch beim Morbus Crohn befallen können, allerdings seltener auftreten als beim M.Crohn.

Nach langjährigem Befall der Kolonschleimhaut kann es bei der Colitis ulzerosa über Schleimhautdysplasien zu malignen Entartungen kommen. So entsteht bei Patienten mit einer chronischen Pankolitis innerhalb 20 Jahren in bis zu 8% ein kolorektales

Karzinom<sup>39</sup>. Deshalb sollte Patienten, deren Erkrankung medikamentös nicht gut kontrolliert werden kann, frühzeitig zur Kolektomie geraten werden.

Wie auch beim Morbus Crohn ist die Ätiologie der Colitis ulzerosa bisher nicht vollständig geklärt. Man nimmt auch hier an, dass genetische Veränderungen im Mittelpunkt der Krankheitsentstehung stehen.

## **1.6 Zusammenhang zwischen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und dem Endocannabinoidsystem**

Vor kurzem wurde bei Mäusen ein protektiver Mechanismus von Cannabinoiden gegen eine durch Di-Nitro-Benzol-Sulfat ausgelöste experimentelle Colitis entdeckt, der durch die Stimulierung von CB1-Rezeptoren vermittelt wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Aktivierung des CB1-Rezeptors einen direkten protektiven Mechanismus in Gang setzt, der den inflammatorischen Insult abschwächt. Bei CB1-Knockout-Tieren war dieser protektive Mechanismus nicht nachzuweisen<sup>79</sup>. Mäuse, denen das Enzym FAAH entfernt wurde, entwickelten eine weniger ausgeprägte Colitis durch DNBS<sup>79</sup>. Das deutet darauf hin, dass nicht nur der CB1-Rezeptor, sondern auch das FAAH-Enzym einen wichtigen Einfluss auf die Pathophysiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hat<sup>79;121</sup>.

## **1.7 Fragestellung dieser Arbeit**

Da Endocannabinoide zeigen, dass sie einen wichtigen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen im Gastrointestinalbereich haben, scheint es angebracht zu sein, mit dieser Studie zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Missense Mutation im humanen FAAH Gen und den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulzerosa gibt.

Die vorgelegt Doktorarbeit untersucht:

1. den Zusammenhang zwischen der FAAH-Genexpression und einer intestinalen Entzündungsreaktion in Zellkulturen
2. den Einfluss von FAAH-Genvarianten auf die Anfälligkeit für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

## 2 Abkürzungsverzeichnis

2-AG:	2-Arachidonoylglycerol
AA-5-HT:	Arachidonoyl-Serotonin
bp:	Basenpaare
BSA:	bovines Serumalbumin
CB:	Cannabinoid
cDNA:	complementary DNA
CED:	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
Ct:	Threshold Cycle
DNBS:	Di-Nitro-Benzolsulfat
DS-DNA:	Doppelstrang - DNA
EC(s):	Endocannabinoid(e)
ECS:	Endocannabinoid-System
IFN:	Interferon
IL:	Interleukin
GPCR:	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
LPS:	Lipopolysaccharid
mRNA:	Messenger-RNA
PCR:	Polymerasekettenreaktion
Pro:	Prolin
RT – PCR:	Realtime - Polymerasekettenreaktion
SNP:	single nucleotide polymorphism
Thr:	Threonin
TNF:	Tumornekrosefaktor
TRPV-1:	transient receptor potential vanilloid-1

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Patienten

Die Studienpopulation bestand aus 1008 Personen, von denen 435 an Morbus Crohn und 167 an Colitis ulzerosa erkrankt sind. Außerdem wurden 406 gesunde Kontrollpatienten in die Studie eingeschlossen. Das Patientenkollektiv umfasste den Behandlungszeitraum von Februar 2002 bis Dezember 2006 und ging dabei vollständig aus der Ambulanz für chronisch entzündliche Darmerkrankungen des Universitätskrankenhauses München Großhadern hervor. Die demographischen Hauptcharakteristika der Studienpopulation werden in Tabelle 1 vorgestellt.

Die Diagnosen Morbus Crohn und Colitis ulzerosa mussten endoskopisch, radiologisch und histopathologisch gesichert sein. Fälle in denen es sich um eine Colitis indeterminata handelte, wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Kontrollpatienten waren nicht-verwandte, gesunde Personen kaukasischen Ursprungs, die den Crohn-Patienten in der Geschlechterhäufigkeit angepasst wurden. Demographische und klinische Daten wurden von zwei unabhängigen Untersuchern retrospektiv aus den Patientenkurven ermittelt. Dabei wurden die Ausprägung und die Lokalisation der CED, durch die Erkrankung ausgelöste Komplikationen und der Einsatz von Immunsuppressiva (Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanion, Methotrexat, Infliximab) berücksichtigt. Die Daten wurden in Bezug auf den FAAH-Genotyp verblindet. Sowohl die Colitis ulzerosa- als auch die Crohn-Patienten wurden entsprechend der Vienna Klassifikation, mit Rücksichtnahme auf die neue Montreal Klassifikation, in Untergruppen unterteilt<sup>48;117</sup>. Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt. Alle teilnehmenden Patienten wurden über die genetische Analyse informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis dafür.

Tabelle 1 Eigenschaften der Studienpopulation

	<b>Morbus Crohn</b> (n=435)	<b>Colitis ulzerosa</b> (n=167)	<b>Kontrollen (n=406)</b>
<b>Geschlecht</b>			
männlich (%)	213 (49.0%)	84 (50.3%)	211 (52.0%)
weiblich (%)	222 (51.0%)	83 (49.7%)	195 (48.0%)
<b>Alter (Jahre)</b>			
Mean ± SD	39.6 ± 12.9	42.5 ± 14.5	47.3 ± 18.2
Range	10 - 75	18 - 85	1 - 88
<b>Body mass index</b>			
Mean ± SD	23.2 ± 4.3	24.2 ± 4.2	
Range	13 - 40	16 - 41	
<b>Alter bei Erstdiagnose (Jahre)</b>			
Mean ± SD	27.6 ± 11.8	31.7 ± 13.7	
Range	1 - 71	9 - 81	
<b>Krankheitsdauer (Jahre)</b>			
Mean ± SD	12.0 ± 8.7	10.7 ± 7.6	
Range	0 - 44	1-40	
<b>Pos. Familienanamnese für CED(%)</b>	52 (12.0%)	21 (12.6%)	

### 3.2 Isolierung der DNA

Die genomische DNA wurde mit Hilfe des DNA Mini Kits der Firma Qiagen (Hilden und Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) aus Leukozyten von 200 µl venösem Blut gewonnen. Zunächst wurde eine Lyse der Zellen mittels einer proteasehaltigen Lösung durchgeführt. Anschließend erfolgte die Bindung der DNA an eine Silika-Gel-Membran. Die gewonnene DNA wurde nach Entfernung der Blut- und Zellbestandteile mit Hilfe einer Elutionspufferlösung (AE Puffer des QIAamp® DNA Mini Kits, Qiagen, Hilden, Deutschland) eluiert. Gelagert wurde die so gewonnene DNA bei 4°C.

### 3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerasekettenreaktion wurde 1983 vom Biochemiker Kary Mullis beschrieben. Polymerase ist ein Enzym, das in allen Lebewesen vorkommt, und die DNA vor der Zellteilung verdoppelt. Mit dieser Technik ist es möglich spezifische DNA-Abschnitte zu kopieren und exponentiell zu vervielfältigen.

Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 25 bis 50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

#### Denaturierung der Doppelstrang-DNA

Bei der Denaturierung wird die DS-DNA kurzzeitig auf 94-96°C erhitzt, um sie in zwei Einzelstränge zu teilen. Durch die Erhitzung werden Wasserstoffbrücken, die die Einzelstränge zusammenhalten, aufgebrochen. An die so gewonnenen Einzelstränge können sich im nächsten Schritt die sogenannten Primer anlagern.

#### Annealing

Im nächsten Reaktionsschritt wird die Temperatur auf ca. 45 bis 60 °C abgesenkt. Dadurch können die Primer an die jeweils passende Stelle in den Einzelsträngen binden (das so genannte Annealing). Primer sind kurze einsträngige DNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 20 Basen. Sie werden synthetisch hergestellt und können von biotechnologischen Firmen gekauft werden. Für die PCR werden zwei Primer benötigt. Man braucht einen forward und einen reverse Primer um eine PCR durchzuführen. Die Primer bestimmen den Anfang und das Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Durch die Sequenz der Primer wird festgelegt, welcher Genabschnitt amplifiziert wird. Durch die Bindung des Primers an den Einzelstrang entsteht am 5'-Ende ein doppelsträngiger Abschnitt. Die Taq-Polymerase erkennt diesen doppelsträngigen Abschnitt und bindet daran. Damit beginnt die Synthese des Zweitstranges.

## Elongation

Die so entstandenen kurzen doppelsträngigen DNA-Fragmente dienen der Polymerase im dritten Schritt, der sogenannten Elongationsphase, als Startpunkte, von denen ausgehend sie in 5'-3'-Richtung komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. Bei einer Temperatur von 72 °C entfaltet die Polymerase ihre maximale Aktivität.

### 3.3.1 Ermittlung des FAAH-Polymorphismus

Im FAAH-Gen wurde an der Nukleotid-Position 385 ein Austausch von Cytosin gegen Adenin identifiziert, der dazu führt, dass die Aminosäure Prolin an der Position 129 gegen ein Threonin ausgetauscht wird <sup>14;118</sup>. Daraus ergeben sich drei unterschiedliche Genotypen (CC, CA, AA). Beim AA-Genotyp handelt es sich um den gesuchten Polymorphismus, der zu einer für die Proteolyse anfälligeren Form des FAAH-Enzyms führt. Die 1008 Individuen wurden mittels folgender Methode in Bezug auf ihren jeweiligen FAAH-Genotyp untersucht.

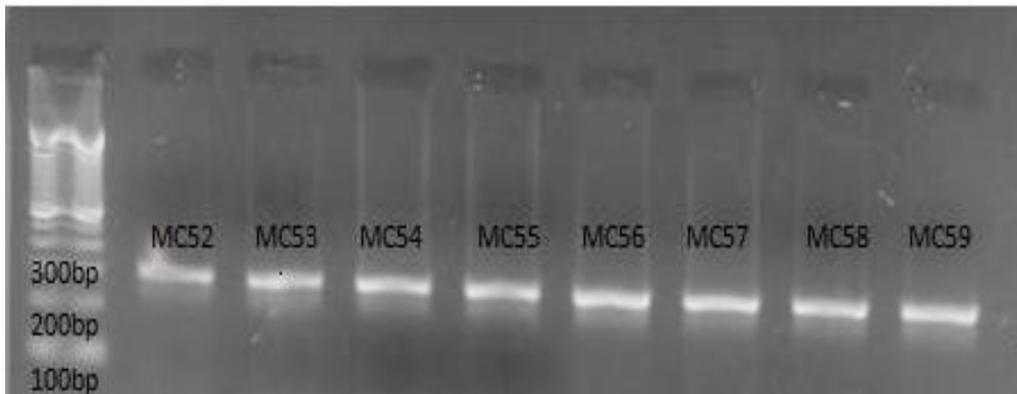
Die Amplifikation wurde mit Hilfe eines Standard-PCR-Ansatzes durchgeführt. Dafür wurde aus 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 400µM jeder einzelnen dNTP, 1,25U Taq-Polymerase, 1x Reaktionspuffer und je 20pM des forward und des reverse Primers ein Mastermix hergestellt. Je 45µl dieses Mastermixes wurden pro PCR mit 5µl DNA (etwa 200ng genomische DNA) versetzt. Die Oligonukleotid-Primer (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) werden in Tabelle 2 dargestellt.

Die PCR-Reaktion wurde im Thermocycler mit einem 15 minütigen Denaturierungsschritt bei 95° C begonnen, um die Taq-Polymerase zu aktivieren. Danach folgten 40 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 95° C für 30 Sekunden, einem Annealing bei 55° C für 30 Sekunden und einer Elongationsphase bei 72° C für weitere 30 Sekunden. Nach diesen 40 Zyklen schloss sich ein weiterer Schritt bei 72° C für 5 Minuten an, der zur endgültigen DNA-Synthese führt.

Nach der PCR-Reaktion wurden die PCR-Produkte auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und nach der Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht überprüft, ob jede Reaktion auch zu einem Produkt geführt hat. Abbildung 4 zeigt ein so entstandenes Bild.

Tabelle 2 Zeigt die verwendeten Primer des PCR-Ansatzes zur Identifizierung des FAAH Polymorphismus

Exon	Primer		Produktgröße
	forward	reverse	
9 / 12 / 13	5'-aag-caa-cat-acc-cca-tgc-tc-3'	5'-ggt-ttg-cgg-tac-acc-tcg-at-3'	299bp



**Abbildung 4** PCR-Produkte nach Auftragung auf ein Agarosegel und erfolgter Gelelektrophorese. Alle aufgetragenen PCR-Produkte zeigen eine Bande bei 299bp. Durch diesen Schritt kann gezeigt werden, dass jede einzelne Reaktion auch zu einem PCR-Produkt geführt hat.

### 3.3.2 Verdau der PCR-Produkte

Nachdem jede Reaktion durch die Auftragung auf ein Agarosegel überprüft wurde, wurden von jedem entstandenen PCR-Produkt 5µl mit dem in Tabelle 3 dargestellten Enzymansatz vermischt. Das darin enthaltene Enzym StyI ist in der Lage die PCR-Produkte an der Codon-Position 129 zu spalten und damit die verschiedenen Genotypen darzustellen. Dafür wurden 15µl des Enzymansatzes mit 5µl PCR-Produkt versetzt und über Nacht bei 37° C im Wärmeschrank belassen.

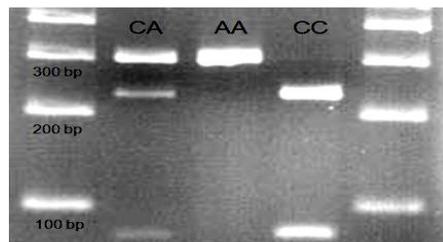
**Tabelle 3** Reagenzien zur Herstellung des Enzymansatzes

Reagenz	Menge
H <sub>2</sub> O	11,25 µl
NEB 3-Puffer	2,00 µl
StyI-Enzym	0,75 µl
BSA-Puffer	1,00 µl

### 3.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Auftrennung von RNA und DNA bzw. deren Bruchstücken, sowie der Bestimmung ihrer Größe, ggf. nach einem Restriktionsverdau. Dazu wird die DNA in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Da die DNA negativ geladen ist, wandert sie im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Dabei wandern kleinere DNA-Fragmente schneller als größere, so dass es zur typischen Bandenauftrennung im Agarosegel kommt.

Um die Banden nach erfolgter Elektrophorese sichtbar zu machen, wird die DNA mit speziellen DNA-Farbstoffen angefärbt. Dafür wurde bei den vorliegenden Experimenten Ethidiumbromid verwendet, das die DNA bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar macht. Abbildung 5 zeigt die verschiedenen Genotypen, die bei der Bestrahlung mit UV-Licht gesehen werden können.



**Abbildung 5** Darstellung der möglichen Genotypen durch Elektrophorese nach dem Verdau mit StyI. Der CC-Wildtyp zeigt zwei Banden bei 71bp und bei 228bp. Bei den heterozygoten CA-Individuen werden drei Banden dargestellt. Je eine schwache Bande bei 71bp und zwei stärkere Banden bei 228bp und bei 299bp. Die gesuchten homozygoten AA-Träger weisen nur eine einzelne Bande bei 299bp auf, da das Enzym StyI bei den Homozygoten keine Stelle zum Spalten findet.

#### Durchführung:

Zunächst wurde die Agarose mit Marathonpuffer versetzt und in der Mikrowelle solange erhitzt, bis aus dem Gemisch ein Gel entstand. Daraufhin wurde das Gel in einen dafür vorgesehenen Gelträger gegossen und ein Kamm wurde in das noch flüssige Gel gestellt, um Taschen zu erhalten, in die später die DNA geladen werden konnte. Für die durchgeführten Versuche wurde eine Agarosekonzentration von 2% gewählt. Sobald das Agarosegel fest genug war, konnte der Kamm wieder entfernt werden.

Den über Nacht verdauten Proben wurden jeweils 12µl entnommen und mit 2µl Ladepuffer vermischt, der dazu dient, dass die Proben in den Taschen verbleiben und nicht aufschwimmen. Der Ladepuffer enthält neben 15% Ficoll auch noch je 0,25% Bromphenolblau und Xylencyanol als Farbstoffe. Das Agarosegel wurde jetzt in die Gelkammern gegeben und mit den zuvor präparierten Proben beladen. In eine Tasche wurde ein Größenmarker („1kb DNA ladder“) gegeben, um die Größe der DNA-Fragmente ablesen zu können. Zur Elektrophorese wurde eine Stromstärke von etwa 40-100 mA eingestellt. Nach etwa einer halben Stunde wurde das Gel aus der Kammer entfernt und die DNA mit Ethidiumbromid für einige Minuten gefärbt. Anschließend wurde das überschüssige Ethidiumbromid noch für etwa eine viertel Stunde entfärbt.

Als letzter Schritt wurde zum Darstellen der Fragmente ein UV-Transluminator ( $\lambda=302\text{nm}$ ) verwendet und zur Dokumentation ein Foto des gefärbten Gels angefertigt.

### 3.4 Zellkultur

Die humane intestinale Zelllinie HT29 wurde von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) bezogen. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), ergänzt durch 10% hitzeaktiviertes fetales Kälberserum der PAA Laboratorien (Cölbe, Deutschland) und 1% Penicillin und Streptomycin, am Leben erhalten. Die Zellen wuchsen in 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei 37°C in einem befeuchteten Inkubator heran. Bei Erreichen einer 70%igen Konfluenz wurden die Zellen für die Experimente verwendet. Die Zellen wurden nach den zeitlichen Vorgaben mit rekombinatem TNF- $\alpha$  (50ng/ml), IFN- $\gamma$  (1000U/ml) oder IL-1 $\beta$  (10ng/ml) der Firma R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) oder mit aus *Escherichia coli* gewonnenem Lipopolysaccharid (LPS; 1 $\mu$ g/ml) der Firma Sigma (St. Louis, MO, USA) stimuliert. LPS wurde in gereinigtem und endotoxinfreiem Wasser in einem Ultraschallbad aufgelöst und nach vollständiger Lösung weiterverdünnt.

### 3.5 Biopsien

Die Biopsien stammten von Patienten aus der Ambulanz für chronisch entzündliche Darmerkrankungen der Universitätsklinik München Großhadern. Alle Patienten wurden bezüglich der molekulargenetischen Untersuchung im Rahmen von Studien aufgeklärt.

Es wurden bei jedem Patienten Biopsien aus entzündlich veränderten und intakten Darmabschnitten entnommen. Die Biopsien wurden dabei während einer Endoskopie gewonnen.

Nach der Entnahme der Gewebestücke wurden diese in Trizol®-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eingelegt und im Ultraschallbad aufgelöst. Anschließend wurde die RNA nach dem Trizol-Protokoll der Firma Invitrogen unter Verwendung des TRIzol® Plus RNA Purification Kits isoliert. Die dabei gewonnene RNA wurde photometrisch auf die vorhandene Konzentration bestimmt und 1 $\mu$ g RNA mit der Omniscript® reversen Transkriptase (Qiagen, Hilden, Deutschland) von Qiagen in die benötigte cDNA umgeschrieben. Das Vorgehen bei der reversen Transkription richtete sich nach den Vorgaben des Herstellers.

### 3.6 Realtime-PCR

Die Technik der RT-PCR beruht auf einem ähnlichen Prinzip wie die einer herkömmlichen PCR-Reaktion. Der Unterschied besteht darin, dass mit Hilfe der RT-Methode auch eine Quantifizierung der gewonnenen DNA-Menge möglich ist. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während

eines PCR-Zyklus erfasst werden. Dabei nimmt die Fluoreszenz zusammen mit der Menge der entstehenden PCR-Produkte zu. Durch die quantitativen Messungen während der einzelnen Zyklen, kann die Zunahme der PCR-Produkte im Laufe der Zeit dokumentiert werden. Darin unterscheidet sich die RT-PCR von den anderen quantitativen PCR-Methoden, die häufig erst am Ende des ganzen PCR-Vorganges eine quantitative Messung durchführen. So findet bei der RT-PCR etwa alle 7 Sekunden eine Messung der Menge der PCR-Produkte statt.

Die RT-PCR wurde mit Hilfe eines ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Als fluoreszierender Farbstoff diente das im Quantitect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) enthaltene SYBR Green I. Dabei handelt es sich um einen asymmetrischen Cyanin-Farbstoff, der zum Nachweis doppelsträngiger DNA eingesetzt werden kann. SYBR Green bindet an doppelsträngige DNA und bildet damit einen DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, der einerseits blaues Licht mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 498\text{nm}$  absorbiert und selbst ein grünes Licht mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 522\text{nm}$  emittiert. Zum Fluoreszenzphänomen kommt es dabei nur, wenn SYBR Green an eine doppelsträngige DNA gebunden vorliegt. Die Messung der Fluoreszenz findet im Rahmen der RT-PCR nach jedem Elongationsschritt statt, d.h. immer dann wenn SYBR Green an die DNA gebunden hat. Somit kann die Zunahme der DNA-Menge von Zyklus zu Zyklus verfolgt werden.

### 3.6.1 Quantifizierung

Verschiedene Rechenmodelle werden für die Quantifizierung herangezogen, wobei meistens ein Referenz-Gen mit gemessen wird, um einen relativen Mengen-Vergleich durchzuführen. Bei den hier vorliegenden Versuchen wurde Beta-Aktin als Referenzgen herangezogen.

### 3.6.2 $C_t$ -Wert

Die Quantifizierung der PCR basiert bei allen Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold Cycle oder  $C_t$ -Wert. Der  $C_t$ -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Am Anfang der PCR-Reaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Parallel dazu werden in jedem PCR-Lauf bekannte Templatemenge amplifiziert, sodass ein Vergleich ermöglicht wird, welche Templatmenge bei welchem  $C_t$ -Wert

resultiert. Daraus lässt sich eine Standardkurve erstellen, die einen Rückschluss aus einem bestimmten Ct-Wert auf eine Templatekonzentration erlaubt.

### 3.6.3 Effizienz

Die PCR Effizienz eines bestimmten Faktors lässt sich durch verschiedenste Methoden bestimmen. Bei Verfügbarkeit von genügend cDNA Startmatrize kann eine probenindividuelle Verdünnungsreihe verwendet werden. Die Effizienz E kann mit Hilfe der Steigung m einer Standardkurve berechnet werden.

$$E = 10^{(1/m)}$$

### 3.6.4 Relative Quantifizierung

Um eine relative Quantifizierung durchführen zu können, wird eine interne Kontrolle benötigt. Eine interne Kontrolle kann ein Gen-Transkript sein, dessen Signal verwendet wird, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Dies bezeichnet man als Normierung. Weil die Gesamtanalyse auf diesem Signal beruht, ist die Wahl der internen Kontrolle ein wichtiger Aspekt des Experiments.

### 3.6.5 Berechnung mit Hilfe einer Standardkurve

Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem Ct-Wert. Ist die Ausgangsmenge bekannt, kann eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den Ct-Wert konstruiert werden. Durch die Geradengleichung  $x = (C_t - b)/m$  kann an der Standardkurve für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden.

### 3.6.6 Durchführung der RT-PCR

Zuerst wurde aus einer Auswahl mehrerer potentiell brauchbarer Primer, der beste Primer durch die Durchführung einer Standard-PCR bestimmt. Nach Auftragen der PCR-Produkte auf ein Agarosegel und erfolgter Gelelektrophorese zeigten sich je nach verwendetem Primer Banden von verschiedener Dicke. Der Primer, der die beste Bande lieferte, wurde für die anschließenden Experimente verwendet. Tabelle 4 zeigt den dafür benutzten Ansatz. Verwendet wurde 5'-aag-caa-cat-acc-cca-tgc-tc-3' als forward- und 5'-gtt-ttg-cgg-tac-acctcg-at-3' als reverse-Primer.

Tabelle 4 20µl Ansatz für die Durchführung einer RT-PCR

Reagenz	Menge
Quantitec® Sybr® Green Mix	10 µl
Primer Mix	0,6 µl
H <sub>2</sub> O	1,4 µl
cDNA	8 µl

Der zweite Arbeitsschritt bestand in der Erstellung einer Standardkurve. Dafür wurde cDNA, die aus Biopsien von Morbus Crohn Patienten gewonnen wurde, in einer Verdünnungsreihe (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:250) mit den in Tabelle 4 gezeigten Reagenzien vermischt und eine RT-PCR durchgeführt. Die erhaltenen C<sub>T</sub>-Werte wurden in einem Excel Diagramm gegen den Logarithmus der enthaltenen Menge an RNA in Nanogramm aufgetragen. Dadurch war zum einen die Geradengleichung zu berechnen, zum anderen konnte man mit Hilfe der Steigung der Geraden auch die Effizienz der RT-PCR herausfinden.

#### Aktin:

Um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen, wurden sowohl die Proben der Biopsien als auch der Zellkulturen anstatt mit dem FAAH-Primer mit einem Beta-Aktin-Primer im Ansatz vermischt und daraufhin wurde eine RT-PCR nach den in Tabelle 6 genannten Bedingungen gemacht. Beta-Aktin stellt ein Strukturprotein dar, das in allen eukaryotischen Zellen im Zytoskelett vorkommt. Daher eignet es sich äußerst gut als Referenz-Gen. Tabelle 5 zeigt die Primer für die Beta-Aktin RT-PCR.

Tabelle 5 Primer für Beta-Aktin

forward - Primer	reverse – Primer
5'-gcc-aac-agc-gag-aag-atg-a-3'	5'-cat-cac-gat-gcc-agt-ggt-a-3'

#### Interleukin 8:

Interleukine sind Peptidhormone, die zu den Zytokinen gezählt werden. Sie sind Träger der Kommunikation zwischen Leukozyten, aber auch anderen an der Immunreaktion beteiligten Zellen. Dabei gibt es sowohl das Immunsystem stimulierende, als auch hemmende Interleukine. Interleukin-8 (IL-8) wird unter anderem durch Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten produziert. Ein wichtiger Angriffspunkt des Chemokins sind neutrophile Granulozyten. Die wesentlichen biologischen Wirkungen von IL-8 auf Granulozyten beinhalten die Förderung der Chemotaxis, die Stimulation

der Expression von Adhäsionsmolekülen und die Aktivierung mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Granula.

Da IL8 in inflammatorischen Geweben vermehrt produziert und ausgeschüttet wird, erlaubt eine RT-PCR zur Detektion der vorhandenen IL8 RNA-Menge einen Vergleich zur Menge an gefundener FAAH-RNA. Damit lässt sich aussagen, ob in einem inflammatorisch veränderten Gewebe, in dem ein Anstieg der relativen IL8-Menge im Vergleich zum Normalgewebe zu verzeichnen ist, ebenfalls einen Anstieg der relativen FAAH RNA-Menge aufzeigt.

Für die Durchführung dieser Versuche wurde 5-‘cca-gga-aga-aac-cac-cgg-a-3’ als forward- und 5’-gaa-atc-agg-aag-gct-gcc-aag-3‘ als reverse-Primer benutzt.

Die Ct-Werte für diese Untersuchungen waren schon vorhanden und konnten somit gleich für die Auswertung verwendet werden.

#### Biopsien:

Es lagen Darmbiopsien von 11 Patienten mit einem Morbus Crohn vor, wobei von jedem Patienten jeweils Biopsien aus entzündeten und nicht-entzündeten Arealen vorhanden waren. Die zuvor schon extrahierte cDNA wurde wie in Tabelle 4 gezeigt mit den anderen Reagenzien vermischt und der erhaltene Ansatz in eine dafür vorgesehene 96 Loch Platte pipettiert. Die RT-PCR wurde nach dem in Tabelle 6 gezeigten Schema für 40 Zyklen durchgeführt.

Tabelle 6 RT-PCR Temperaturbedingungen

Temperatur	Dauer
96 ° C	20 sec
60 ° C	20 sec
72 ° C	20 sec

Die C<sub>t</sub>-Werte wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und zunächst mittels der Geradengleichung in vorhandene RNA-Mengen umgerechnet. Die relative Quantifizierung erfolgte durch die zuvor ermittelte Aktin-RNA Menge bei denselben Proben. Anschließend konnte statistisch ermittelt werden, ob zwischen den entzündeten und den nicht-entzündeten Biopsien ein signifikanter Unterschied bestand und ob es einen Zusammenhang mit den IL8-Werten gab.

#### Zellkultur:

Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit vier unterschiedlichen Zytokinen behandelt. Nach vorher festgelegten Zeitintervallen wurden eine bestimmte Menge der

Zellen aus dem Verband herausgenommen und zur cDNA-Gewinnung genutzt. Dadurch war überprüfbar, ob die Zellen mit einer vermehrten Produktion von FAAH-RNA auf die proinflammatorischen Reize reagieren. Außerdem erscheint so ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem proinflammatorischen Reiz und der zellulären Antwort im Sinne einer vermehrten FAAH-Expression. Auf diese Weise wurden je zwei Nullwertproben, zwei 1h-, zwei 2h-, vier 4h-, zwei 8h-, zwei 12 h- und zwei 24h-Proben erstellt und diese nach den in Tabellen 4 und 6 genannten Bedingungen einer RT-PCR zugeführt. Die erhaltenen Ct-Werte wurden erneut mit den zuvor bestimmten Werten für Beta-Aktin relativiert.

### 3.6.7 Statistik

Diskrete Variablen wurden mit dem Exakt-Test nach Fisher verglichen, für kontinuierliche Variablen wurde der Student-T-Test verwendet. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Für die Durchführung der statistischen Tests wurde SPSS 14.0.1 für Windows gebraucht.

### 3.6.8 Geräte und Materialien

#### PCR

Pipetten „Pipetman“	Gilson, Bad Camberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäß	ABgene, Hamburg, Deutschland
Thermo-Start-Taq-DNA Polymerase / Reaktionspuffer	ABgene, Hamburg, Deutschland
Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
dNTP	Amersham BioSciences, Freiburg, Deutschland
Magnesiumchlorid	ABgene, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler MJ-Research PTC 225	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

#### Restriktionsendonuklease mit Puffer

StyI	New England Biolabs, Frankfurt / Main, Deutschland
------	---

**Post - PCR**

Pipetten „Pipetman“	Gilson, Bad Camberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gelträger	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophoresekammern	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Spannungsgeräte	Amersham BioSciences, Freiburg, Deutschland
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma / Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Xylencyanol	Sigma / Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DNA Molecular Weight Marker	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma / Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Video-Photo-Anlage	MWG - Biotech, Ebersberg, Deutschland

**Präparation genomischer DNA**

1,5 ml-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Proteinase K	Qiagen, Hilden, Deutschland
QiaAmp Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pipetten „Pipetman“	Gilson, Bad Camberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizblock	Lab - Line Inc., Melrose Park III, USA

**Realtime-PCR**

Quantitec® Sybr® Green Mix	Qiagen, Hilden, Deutschland
Primer	MWG - Biotech, Ebersberg, Deutschland
Pipetten „Pipetman“	Gilson, Bad Camberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Abi Prism® 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City CA, USA

**Zellkultur**

humane intestinale Zelllinie HT29	American Type Culture Collection, Manassas, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
hitzeaktiviertes fetales Kälberserum	PAA Laboratorien, Osnabrück, Deutschland
Penicillin	PAA Laboratorien, Osnabrück, Deutschland
Streptomycin	PAA Laboratorien, Osnabrück, Deutschland
TNF- $\alpha$	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-1 $\beta$	R&D Systems, Minneapolis, USA
LPS	Sigma, St. Louis, USA
IFN- $\gamma$	R&D Systems, Minneapolis, USA

**Biopsien**

TRIzol® Plus RNA Purification Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse des FAAH–Polymorphismus

#### 4.1.1 Zusammenhang zwischen dem FAAH–Polymorphismus und der Anfälligkeit für CED

Die Tabelle 1 zeigt die detaillierten, demographischen Charakteristika der Morbus Crohn- und Colitis ulzerosa-Patienten und der Kontrollpopulation. Die Mehrheit der Patienten hatte einen frühen Beginn der Erkrankung mit einem mittleren Alter bei Erstdiagnose des Morbus Crohn von  $27,6 \pm 11,8$  Jahren. Bei den Colitis ulzerosa-Patienten war ein späterer Krankheitsbeginn mit einem mittleren Alter bei Erstdiagnose von  $31,7 \pm 13,7$  Jahren zu verzeichnen. Die Morbus Crohn–Population wies in 12,0% ein gehäuftes Vorkommen von CED in der Familie auf, bei den Colitis ulzerosa-Patienten waren es 12,6%. Die Ergebnisse der Genotypen Analyse der 435 Morbus Crohn–Patienten, 167 Colitis ulzerosa–Patienten und den 406 Kontrollindividuen sieht man in Tabelle 7. Dabei lässt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den verschiedenen Genotypen und den drei untersuchten Gruppen feststellen.

**Tabelle 7** Häufigkeit der verschiedenen Genotypen des FAAH-Polymorphismus bei Morbus Crohn, Colitis ulzerosa und den Kontrollen

	(1) CC	(2) CA	(3) AA	(1)vs.(2)	(1)vs.(3)	(2)vs.(3)	(1)vs.(2+3)
Morbus Crohn	286 (65,8%)	131 (30,1%)	18 (4,1%)	Morbus Crohn vs. Kontrollen			
				p= 0,18	p= 1,00	p= 0,72	p= 0,22
				OR 1,22	OR 1,02	OR 0,83	OR 1,20
				CI 0,76- 1,64	CI 0,51- 2,04	CI 0,41- 1,70	CI 0,90- 1,60
Kontrollen	250 (61,6%)	140 (34,5%)	16 (3,9%)	Colitis ulzerosa vs. Kontrollen			
				p= 0,63	p= 0,21	p= 0,29	p= 0,45
				OR 1,11	OR 2,33	OR 2,10	OR 1,17
				CI 0,76- 1,63	CI 0,66- 8,14	CI 0,60- 7,48	CI 0,81- 1,71
Colitis ulzerosa	109 (65,3%)	55 (32,9%)	3 (1,8%)	Morbus Crohn vs. Colitis ulzerosa			
				p= 0,62	p= 0,22	p= 0,20	p= 0,92
				OR 0,91	OR 2,29	OR 2,52	OR 0,98
				CI 0,62- 1,33	CI 0,66- 7,92	CI 0,71- 8,90	CI 0,67- 1,42

#### 4.1.2 Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp

##### Morbus Crohn:

Die Morbus Crohn Patienten wurden hinsichtlich ihres Phäno- und Genotyps unterteilt. Dabei wurde auf das Alter bei Erstdiagnose, auf die Lokalisation der Erkrankung und auf das in der Montreal Klassifikation beschriebene Verhalten der Erkrankung Wert gelegt<sup>39;48;117</sup>. Die genaue Unterteilung der Morbus Crohn Patienten in verschiedene Subklassen und die statistischen Analysen zeigt Tabelle 8.

Bei der statistischen Auswertung fiel ein vermehrtes Auftreten von Fisteln (72,2% gegenüber 45,5%; p=0,03) und extraintestinalen Manifestationen (72,2% gegenüber 37,8%; p=0,005) bei den AA Genotypen im Vergleich zu den CC Wildtypen auf. Darüberhinaus gab es einen Trend zu häufigeren penetrierenden Formen der Erkrankung bei den AA Genotypen in Gegenüberstellung zum Wildtyp (72,2% gegenüber 47,9%; p=0,05).

Hingegen lässt sich keine Verbindung zwischen dem FAAH Pro129Thr Polymorphismus und der Lokalisation der Erkrankung, der Einnahme von

Immunsuppressiva, dem familiären Auftreten von CED, Morbus Crohn-assoziierten Operationen, Stenosen und Abszessen finden.

Colitis ulzerosa:

Die Colitis ulzerosa Patienten wurden ebenfalls anhand gängiger Parameter in Subklassen eingeteilt. Dabei standen die Lokalisation der Colitis ulzerosa, das Alter bei Erstdiagnose und Colitis ulzerosa–bedingte Operationen im Vordergrund. Eine dezidierte Aufteilung der Subklassen liefert Tabelle 9.

Die statistische Auswertung der Colitis ulzerosa Patienten ergab, dass diejenigen, die homozygote Träger des A–Allels sind, signifikant jünger erkranken als die Träger des Wildtyp–Allels (28,3 gegenüber 32,3 Jahre;  $p=0,01$ ). Im Bezug auf die anderen Charakteristika konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem FAAH Pro129Thr Polymorphismus entdeckt werden.

Tabelle 8 Zusammenhang zwischen dem C385A Genotyp und den Morbus Crohn–Charakteristika

1 Das Krankheitsverhalten wurde nach den Definitionen der Montreal Klassifikation definiert (CITE). Eine stenosierende Erkrankungsform war dabei definiert als das Auftreten von Stenosen ohne die Anwesenheit von Fisteln. Die Diagnosestellung von Stenosen erfolgte chirurgisch, endoskopisch oder radiologisch mittels MRT.

2 Als Immunsuppressiva wurden Azathioprin, 6–Mercaptopurin, 6–Thioguanin, Methotrexat und/oder Infliximab gewertet.

3 Extraintestinale Manifestationen waren das Auftreten einer oder mehrerer der folgenden Morbus Crohn–assoziierten Erkrankungen: nicht-medikamentös induzierte Arthropathien (z.B. ankylosierende Spondylitis, Sakroileitis, periphere Arthritiden), Augenbeteiligung (z.B. Episkleritis, Iritis/Uveitis), Hautbeteiligung (z.B. Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum), nicht–medikamentös–induzierte Gallenwegserkrankungen (z.B. primär sklerosierende Cholangitis)

4 Es wurden nur Operationen mit eingerechnet, die aufgrund eines Morbus Crohn–assoziierten Problems notwendig wurden (z.B. Fistulektomie, Kolektomie, Ileostomie)

	(1) CC (n=286)	(2) CA (n=131)	(3) AA (n=18)	(1) vs. (2) p - Wert	(1) vs. (3) p - Wert	(2) vs. (3) p - Wert	(1) vs. (2+3) p - Wert
<b>Männliches Geschlecht</b> n (%)	132 (46.2%)	71 (54.2%)	13 (72.2%)	p= 0.14	p= 0.05	p= 0.21	<b>p= 0.04</b> <b>OR 0.66</b> <b>CI 0.45-</b> <b>0.98</b>
<b>Body mass index</b> (kg/m <sup>2</sup> )							
Mittelwert ± SA	23.1± 4.2	23.1 ± 4.4	23.4 ± 4.1	p= 0.96	p= 0.77	p= 0.74	p= 0.98
Spannweite	16 - 40	13 – 38	18 – 32				
<b>Alter bei ED</b> (Jahre)							
Mittelwert ± SA	27.3 ± 11.3	29.0 ± 13.1	27.8 ± 9.7	p= 0.21	p= 0.82	p= 0.64	p= 0.22
Spannweite	6 - 71	1 - 71	16 – 53				
<b>Krankheitsdauer</b> (Jahre)							
Mittelwert ± SA	12.7 ± 9.2	10.5 ± 7.6	18.1 ± 8.1	<b>p= 0.02</b>	<b>p= 0.01</b>	<b>p= 0.001</b>	p= 0.19

Spannweite	0 - 44	1 - 37	5 - 33				
<b>Alter (Jahre)</b> Mittelwert $\pm$ SA Spannweite	40.0 $\pm$ 12.7 15 - 75	39.5 $\pm$ 13.3 10 - 74	45.4 $\pm$ 9.2 31 - 66	p= 0.70	<b>p= 0.03</b>	<b>p= 0.02</b>	p= 0.89
<b>Alter bei ED (Montreal A)</b> < 17 Jahre (A1) 17-40 Jahre (A2) > 40 Jahre (A3)	30 (11.7%) 196 (76.3%) 31 (12.0%)	12 (9.9%) 91 (75.2%) 18 (14.9%)	1 (5.6%) 15 (83.3%) 2 (11.1%)	p= 0.73 p= 0.90 p= 0.51	p= 0.70 p= 0.77 p= 0.71	p= 1.00 p= 0.72 p= 1.00	p= 0.61 p= 1.00 p= 0.53
<b>Lokalisation</b> Terminales Ileum (L1) Colon (L2) oberer GI (L3) Beteiligung des Ileums (L4)	40 (14.0%) 49 (17.1%) 159 (55.6%) 38 (13.3%) 199 (69.6%)	24 (18.3%) 25 (19.1%) 72 (55.0%) 10 (7.6%) 96 (73.3%)	0 (0.0%) 5 (27.8%) 10 (55.5%) 3 (16.7%) 10 (55.6%)	p= 0.31 p= 0.68 p= 0.92 p= 0.10 p= 0.49	p= 0.14 p= 0.33 p= 1.00 p= 0.72 p= 0.29	p= 0.08 p= 0.36 p= 1.00 p= 0.19 p= 0.16	p= 0.57 p= 0.44 p= 0.92 p= 0.21 p= 0.83
<b>Krankheitsverhalten</b> <sup>1</sup> nicht-stenosierend, nicht- penetrierend (B1) Stenosierend (B2) Penetrierend (B3)	60 (21.0%) 89 (31.1%) 137 (47.9%)	32 (24.4%) 37 (28.2%) 62 (47.4%)	3 (16.7%) 2 (11.1%) 13 (72.2%)	p= 0.45 p= 0.57 p= 0.92	p= 1.00 p= 0.11 <b>p= 0.05</b> <b>OR 2.83</b> <b>CI 0.98-</b> <b>8.14</b>	p= 0.57 p= 0.16 p= 0.08	p= 0.54 p= 0.32 p= 0.69
<b>Gebrauch von Immunsuppressiva</b> <sup>2</sup>	203 (71.0%)	93 (71.0%)	16 (88.9%)	p= 1.00	p= 0.11	p= 0.16	p= 0.66

<b>Extraintestinale Manifestationen</b> <sup>3</sup>	108 (37.8%)	57 (43.5%)	13 (72.2%)	p= 0.28	<b>p= 0.005</b> <b>OR 4.29</b> <b>CI 1.49-12.35</b>	<b>p= 0.03</b> <b>OR 3.38</b> <b>CI 1.14-10.02</b>	p= 0.07
<b>gehäuftes Vorkommen von CED in der Familie</b>	35 (12.2%)	14 (10.7%)	3 (16.7%)	p= 0.74	p= 0.26	p= 0.43	p= 0.88
<b>Morbus Crohn-assoziierte Operationen</b> <sup>4</sup>	155 (54.2%)	67 (51.1%)	12 (66.7%)	p= 0.60	p= 0.34	p= 0.31	p= 0.84
<b>Fisteln</b>	130 (45.5%)	63 (48.1%)	13 (72.2%)	p= 0.67	<b>p= 0.03</b> <b>OR 3.12</b> <b>CI 1.08-8.98</b>	p= 0.07	p= 0.31
<b>Stenosen</b>	168 (58.7%)	70 (53.4%)	12 (66.7%)	p= 0.34	p= 0.62	p= 0.32	p= 0.48
<b>Abszesse</b>	78 (27.3%)	40 (30.5%)	8 (44.4%)	p= 0.56	p= 0.17	p= 0.28	p= 0.32

Tabelle 9 Zusammenhang zwischen dem C385A Genotyp und den Colitis ulzerosa-Merkmalen

<sup>1</sup> Als Immunsuppressiva wurden Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Methotrexat und/oder Infliximab gewertet.

<sup>2</sup> Extraintestinale Manifestationen waren das Auftreten einer oder mehrerer der folgenden Morbus Crohn – assoziierten Erkrankungen: nicht-medikamentös induzierte Arthropathien (z.B. ankylosierende Spondylitis, Sakroileitis, periphere Arthritiden), Augenbeteiligung (z.B. Episkleritis, Iritis/Uveitis), Hautbeteiligung (z.B. Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum), nicht – medikamentös – induzierte Gallenwegserkrankungen (z.B. primär sklerosierende Cholangitis)

<sup>3</sup> Es wurden nur Operationen mit eingerechnet, die aufgrund eines Colitis ulzerosa-assozierten Problems notwendig wurden (z.B. Fistulektomie, Kolektomie, Ileostomie)

	(1) CC (n=109)	(2) CA (n=55)	(3) AA (n=3)	(1) vs.(2) p - Wert	(1)vs.(3) p - Wert	(2)vs.(3) p - Wert	(1)vs.(2+3) p – Wert
<b>Männliches Geschlecht</b> n (%)	55 (50.5%)	26 (47.3%)	3 (100%)	p=0.74	p=0.24	p=0.24	p= 1.00
<b>Body mass index</b> (kg/m <sup>2</sup> )							
Mittelwert ± SA	24.2 ± 4.4	24.1 ± 3.8	24.3 ± 4.8	p=0.92	p=0.97	p=0.95	p=0.94
Spannweite	16 - 41	18 - 36	19 - 29				
<b>Alter bei ED</b> (Jahre)							
Mittelwert ± SA	32.3 ± 14.4	30.7 ± 12.8	28.3 ± 0.6	p=0.46	<b>p=0.01</b>	p=0.19	p=0.42
Spannweite	13 – 81	9 - 68	28 - 29				
<b>Lokalisation</b>							
Proktitis ulzerosa	11 (10.6%)	2 (3.8%)	0 (0.0%)	p= 0.22	p= 1.00	p= 1.00	p= 0.14
Linksseitige Colitis ulzerosa	47 (45.2%)	21 (39.6%)	1 (33.3%)	p= 0.61	p= 1.00	p= 1.00	p= 0.51
Pankolitis	46 (44.2%)	30 (56.6%)	2 (66.7%)	p= 0.18	p= 0.59	p= 1.00	p= 0.14
<b>Gebrauch von Immunsuppressiva</b> <sup>1</sup>	76 (69.7%)	41 (74.6%)	3 (100.0%)	p=0.59	p=0.55	p=1.00	p=0.47
<b>Anwendung von Infliximab</b> (≥ 1 Infusion)	23 (21.1%)	16 (29.1%)	1 (33.3%)	p=0.33	p=0.52	p=1.00	p=0.26

<b>Colitis ulzerosa – assoziierte Operationen <sup>2</sup></b>	2 (1.8%)	2 (3.6%)	0 (0.0%)	p=0.60	p=1.00	p=1.00	p=0.61
<b>Fisteln</b>	5 (4.6%)	2 (3.6%)	0 (0.0%)	p=1.00	p=1.00	p=1.00	p=1.00
<b>Stenosen</b>	12 (11.0%)	7 (12.7%)	1 (33.3%)	p=0.80	p=0.31	p=0.36	p=0.62
<b>Abszesse</b>	5 (4.6%)	4 (7.3%)	0 (0.0%)	p=0.49	p=1.00	p=1.00	p=0.72
<b>Extraintestinale Manifestationen <sup>3</sup></b>	16 (14.7%)	9 (16.4%)	0 (0.0%)	p=0.82	p=1.00	p=1.00	p=1.00
<b>gehäuftes Vorkommen von CED in der Familie</b>	16 (14.7%)	5 (9.1%)	0 (0.0%)	p=0.46	p=1.00	p=1.00	p=0.33

## 4.2 Biopsien und Zellkultur

### 4.2.1 Standardkurve

Wie vorher beschrieben wurde eine Verdünnungsreihe von cDNA hergestellt und nach einem Standardschema eine RT-PCR durchgeführt. Dadurch erhielt man für die verschiedenen Verdünnungsfaktoren jeweils dazugehörige Ct-Werte, die in Tabelle 10 angegeben sind.

Tabelle 10 Ct-Werte zur Erstellung der Standardkurve

Verdünnung	Ct – Wert
1:10	23,36
1:20	23,12
1:50	23,99
1:100	25,56
1:250	27,28

Diese Ct-Werte wurden in einem Excel-Diagramm gegen die logarithmische RNA-Menge in Nanogramm aufgetragen, so dass man schließlich die benötigte Standardkurve erhielt. Abbildung 3 zeigt die mittels RT-PCR ermittelte Standardkurve für den verwendeten Primer.

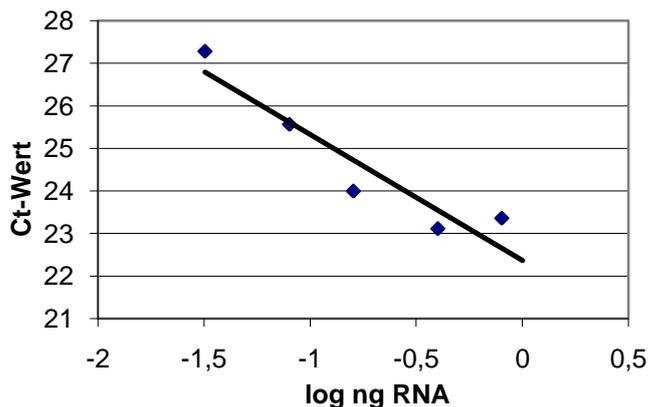


Abbildung 6 Standardkurve für FAAH

Daraus lässt sich folgende Geradengleichung erstellen:

$$y = -2,961x + 22,36$$

Die Effizienz der PCR ergibt sich nach folgender Rechnung:

$$E = 1^{(1/2,961)} = 2,18$$

Eine Effizienz von 2 entspricht dabei einer Verdoppelung der RNA-Menge mit jedem einzelnen Zyklus der PCR. Die Effizienz von 2,18 rührt daher, dass nicht alle Punkte genau auf der Geraden liegen und Excel die Ausgleichsgerade nicht immer optimal zwischen die Punkte legt. Anhand der Daten zeigt sich eine sehr gute Effizienz.

#### 4.2.2 Analyse der Biopsiedaten

Aufgrund des vorher beschriebenen Einflusses des Pro129Thr FAAH-Polymorphismus auf einige Krankheitsmerkmale bei Morbus Crohn-Patienten, war die nächste zu untersuchende Fragestellung, ob es einen Zusammenhang zwischen der FAAH mRNA Expression und der intestinalen Entzündungsreaktion gibt.

Bei diesen Versuchen wurde die FAAH mRNA Expression in 44 Darmbiopsien untersucht. Diese wurden aus 22 unterschiedlichen Stellen bei 11 individuellen Patienten entnommen. Die eine Hälfte entstammte aus makroskopisch entzündlich veränderten Mukosaregionen, die andere Hälfte aus makroskopisch gesunder Schleimhaut. Die mRNA Expression beider Mukosaabschnitte wurde mit Hilfe der RT-PCR auf ihre Konzentration an FAAH mRNA untersucht.

Die Expression von IL-8, die als Kontrollmarker für ein entzündliches Geschehen diente, war bei den entzündlich veränderten Biopsien signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Der Anstieg der IL-8 mRNA im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses betrug das 1,0 bis 31-fache der Konzentration im Vergleich zu nicht-entzündlichen Geweben. In Tabelle 11 sind die Quotienten der vorhandenen mRNA-Konzentrationen aus entzündeten und nicht-entzündeten Geweben sowohl von IL-8 als auch FAAH zu sehen.

Die FAAH mRNA Level zeigten jedoch nur einen moderaten Zusammenhang mit den IL-8 mRNA Expressionsmengen ( $r=0,53$ ). Auch der Anstieg der FAAH Expression bei einer vorhandenen Inflammation war bei weitem geringer als bei IL-8. Zudem war die FAAH mRNA Menge nur bei 7 von 11 Patienten in den entzündlichen Biopsien höher als bei den nicht-entzündlichen. Der Scatter Plot in Abbildung 4 verdeutlicht, dass es zwischen den IL-8 und den FAAH mRNA Expressionsmengen nur wenig Zusammenhang gibt.

Tabelle 11 Quotienten aus entzündlichen und nicht entzündlichen Geweben für IL-8 und FAAH

Biopsie	FAAH entzündet/nicht-entzündet	IL-8 entzündet/nicht-entzündet
7	1,8	4,5
10	2,4	11,7
12	1,6	1,5
18	0,8	11,1
19	0,6	1,5
25	0,5	31,1
26	1,2	2,2
27	0,3	1,0
34	2,1	3,3
38	1,1	1,4
39	1,5	1,4

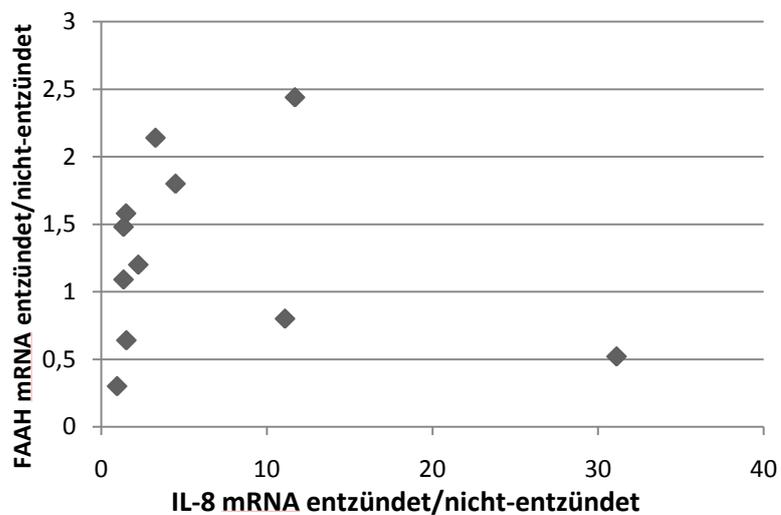


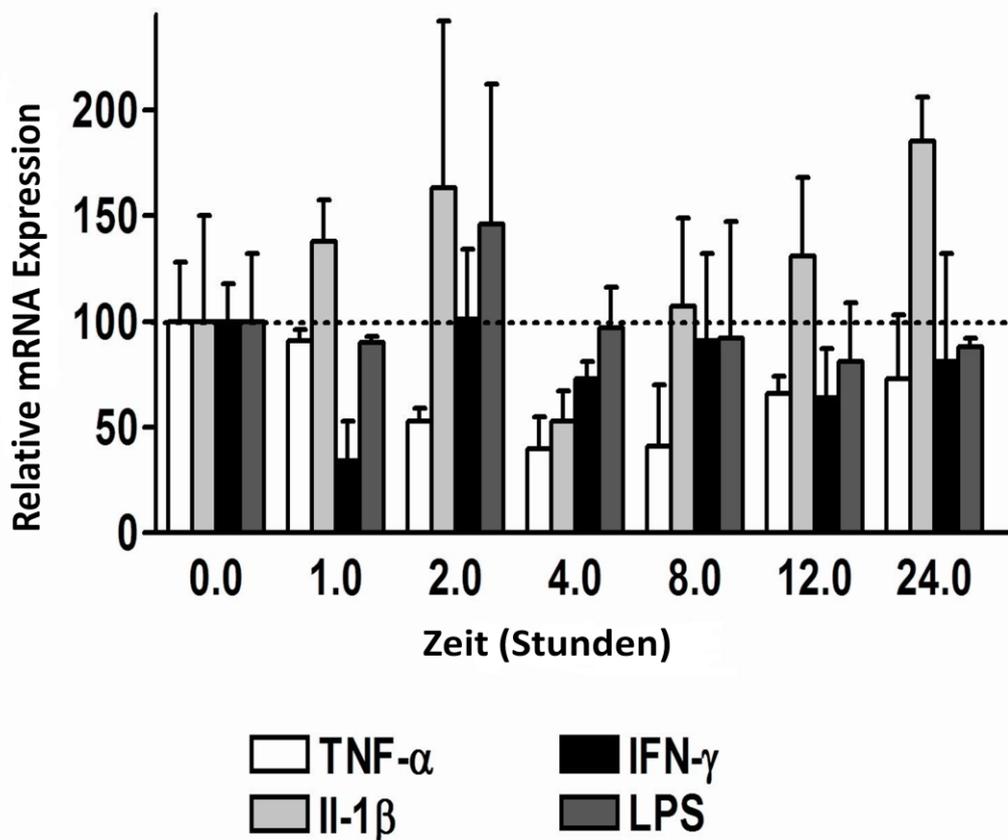
Abbildung 7 Zusammenhang zwischen IL-8 und FAAH mRNA Expressionsmengen

### 4.2.3 Analyse der Zellkulturdaten

Um den Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Expression des FAAH Gens zu analysieren, wurden Zellen der humanen Zelllinie HT29 mit LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  stimuliert. Zum Vergleich dienten unstimulierte Zellen, von denen ebenfalls die FAAH mRNA Menge quantifiziert wurde.

Die Stimulation mit den unterschiedlichen Zytokinen bewirkte jedoch keinen Anstieg der FAAH Expression, der über das 2-fache des Ausgangswertes hinausging. Abbildung 5 demonstriert die FAAH mRNA Expression in intestinalen Epithelzellen bei Stimulierung durch die unterschiedlichen Zytokine im zeitlichen Verlauf.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass es keinen Zusammenhang zwischen proinflammatorischen Stimuli und der Expression von FAAH mRNA gibt.



**Abbildung 8** Zeitlicher Verlauf der relativen FAAH mRNA Expression nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und LPS

## 5 Diskussion

### 5.1 Morbus Crohn und Colitis ulzerosa Genetik

#### 5.1.1 Genetik des Morbus Crohn

Die ersten Studien zum genetischen Hintergrund der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beschäftigten sich mit dem Zusammenhang zwischen dem humanen Leukozyten Antigen (HLA) und den CEDs. Dabei konnten allerdings nur geringe Korrelationen gefunden werden.<sup>38</sup>

In der folgenden Zeit wurden Familien exploriert, die zwei oder mehr Angehörige mit einer CED aufwiesen. Dabei wurden nach Genen gesucht, die diese erkrankten Individuen von gesunden Probanden unterschieden. Im Rahmen dieser Studien wurde eine Region auf dem Chromosom 16 gefunden, die mit Morbus Crohn zu korrelieren schien. Diese Region wurde IBD1 Lokus benannt<sup>8;38;60</sup>.

Schließlich wurde im Jahre 2001 von zwei unabhängigen Forschergruppen das nukleotide-binding oligomerization domain 2 Gen (NOD2) gefunden, das in hohem Maße mit der Wahrscheinlichkeit an Morbus Crohn zu erkranken korrelierte. Dieses Gen wurde auch unter dem Namen Caspase recruitment domain 15 (CARD 15) bekannt und liegt im Bereich des IBD1 Lokus<sup>59;96</sup>. Insgesamt wurden 3 genetische Varianten des NOD2/CARD15 Gens entdeckt, die mit einem erhöhten Risiko an Morbus Crohn zu erkranken einhergehen. Mit dem Risiko an einer Colitis ulzerosa zu erkranken, ließ sich jedoch kein Zusammenhang erschließen. Bei den Untersuchungen stellte sich heraus, dass Träger einer einzelnen der drei Varianten ein 2-4 fach erhöhtes Risiko tragen, an Morbus Crohn zu erkranken. Bei Trägern von 2 Mutationen erhöhte sich das Risiko bereits auf das 20-40 fache. Allerdings zeigte sich auch, dass lediglich 20-30% aller Morbus Crohn-Patienten Träger der NOD2/CARD15 Mutationen sind<sup>8;38</sup>.

Der Fortschritt, der in den letzten Jahren in der Genomforschung erreicht wurde, führte im Rahmen von internationalen Projekten wie dem HapMap- oder dem Human Genome Projekt dazu, dass großangelegte genome-wide association studies (GWA) durchgeführt werden konnten. Dabei wurden zahlreiche single nucleotide Polymorphismen (SNPs) aufgespürt, die sich durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure gegen eine andere auszeichnen. Dieser Austausch kann eine veränderte Funktion des fertigen Genprodukts bewirken<sup>1;133</sup>. Im Jahre 1996 wurde von Cravatt et al. das Enzym FAAH zum ersten Mal kloniert<sup>21</sup>. Sipe et al. entdeckten den in dieser Studie entdeckten SNP im FAAH-Gen, der zu einem Austausch von Prolin gegen Threonin führt<sup>118</sup>. Dieser

Aminosäurenaustausch führt zu einem Protein, das wesentlich anfälliger für die Proteolyse ist als das ursprüngliche Enzym.

In einer neuen Untersuchung aus dem Jahre 2006 berichten die Autoren von drei neu identifizierten SNPs, die mit dem Risiko an Morbus Crohn zu erkranken korrelieren. Zwei SNPs befinden sich im NOD2/CARD15 Gen, der dritte liegt im Bereich des IL23R-Gens. Interessanterweise verringert der SNP im IL23R- Gen das Risiko für Morbus Crohn. Die Autoren berechneten eine Odds Ratio von 0,26. Anschließende Investigationen führten zu acht weiteren SNPs in der Region des IL23R- und des darauf folgenden IL12-Rezeptor- $\beta$ 2-Gens (IL12RB2). All diese SNPs stehen in einer Beziehung zu Morbus Crohn und auch in geringerem Maße zu Colitis ulcerosa. Die Verkettung von IL23 und den CEDs ist deshalb interessant, da IL23 ein proinflammatorisches Zytokin darstellt und einen Teil der T-Helfer-17-Achse ausmacht. In diesem Kontext ist es in der Entstehung von autoimmunen und chronischen Erkrankungen von immenser Wichtigkeit<sup>63</sup>.

Aktuelle Studien belegen noch weit mehr SNPs, die in Beziehung zu Morbus Crohn stehen. Dazu gehören z.B. SNPs im IBD5 Locus, im ATG16L1-Gen, im 5p13.1 Locus, im NELL1-Gen und viele andere mehr<sup>44</sup>.

Aufgrund der Erkenntnisse der zuvor genannten Studien scheint der IL23/TH17 Signalweg und der Vorgang der Autophagozytose im Mittelpunkt der Ätiologie der Erkrankung Morbus Crohn zu stehen.

### 5.1.2 Genetik der Colitis ulcerosa

Im Gegensatz zum Morbus Crohn wurden bei der Colitis ulcerosa bisher noch nicht so viele auslösende genetische Veränderungen identifiziert.

Bei der Colitis ulcerosa stellte sich NF- $\kappa$ B, ein Transkriptionsfaktor für Gene der Immunantwort, als wichtiger Faktor heraus<sup>6</sup>. NF- $\kappa$ B ist bei vielen chronischen Erkrankungen wie Asthma, CEDs, rheumatoider Arthritis, Psoriasis usw. involviert<sup>13</sup>. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wird von den beiden Genen NFKB1 und NFKB2 kodiert<sup>13</sup>. Die -49ATTG Deletion im NFKB1 Gen zeigte eine signifikante Korrelation mit der Colitis ulcerosa von nichtjüdischen Nordamerikanern und dänischen Kohorten<sup>9</sup>.

Der ECM1 Locus kodiert für das extrazelluläre Matrixprotein 1, das sowohl im Dickdarm als auch im Dünndarm die Matrixmetalloproteinase 9 inhibiert. Menschen, die eine Mutation im ECM1 Locus haben, erkranken gehäuft an Colitis ulcerosa. Außerdem aktiviert ECM1 den NF- $\kappa$ B Signalweg<sup>43</sup>.

Zusammenfassend lässt sich der Schluss ziehen, dass bisher weit mehr genetische Hintergründe für Morbus Crohn gefunden wurden. Aber auch bei Colitis ulcerosa sind erste Schritte in der Erforschung der molekularen Ätiologie beschriftet worden.

Dass beide Erkrankungen auf ähnlichen Mechanismen beruhen, zeigen Gene, die sowohl an der Pathologie von Morbus Crohn als auch Colitis ulzerosa beteiligt sind. Dazu zählen z.B. IL23R, IL12B, HLA, NKX2-3 und MST-1.

Im Rahmen unserer Studie versuchten wir herauszufinden, ob der P129T SNP einen neuen prädiktiven Faktor für Aussagen zur Anfälligkeit für CEDs darstellt. Dabei stellte sich heraus, dass Patienten, die den Pro129Thr Polymorphismus tragen, zu einer schweren fistelbildenden und penetrierenden Form des Morbus Crohn neigen. Außerdem haben sie ein erhöhtes Risiko für extraintestinale Manifestationen. Bei Colitis ulzerosa Patienten mit dem SNP kann es zu einem sehr frühen Krankheitsbeginn kommen.

## 5.2 Das Endocannabinoidsystem (ECS)

Das Endocannabinoidsystem als komplexes, endogenes Signalsystem hat Einfluss auf zahlreiche metabolische und neuronale Signalwege<sup>16</sup>. Es besteht aus transmembranären Endocannabinoidrezeptoren, ihren Liganden und den Enzymen, die an der Synthese und am Abbau der Endocannabinoide beteiligt sind<sup>28</sup>. Mittlerweile wurde das ECS in den unterschiedlichsten Organsystemen nachgewiesen. So finden sich CB1-Rezeptoren z.B. in Adipozyten, Leberzellen oder in Skelettmuskeln. Tabelle 12 zeigt die Organsysteme, in denen bisher CB1-Rezeptoren beschrieben wurden<sup>34;97</sup>.

Tabelle 12: Organsysteme in denen CB1-Rezeptoren gefunden wurden

ZNS	Urogenital	GIT	Andere
Gehirn	Niere	Ileum	Fettgewebe
Rückenmark	Plazenta	Leber	Lunge
	Prostata	Pankreas	Skelettmuskel
	Hoden	Magen	Milz
	Uterus	Colon	
		Ösophagus	

### 5.2.1 Cannabisrezeptoren

Die Cannabisrezeptoren gehören der Klasse A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an<sup>11</sup>. Der CB1-Rezeptor stellt den am häufigsten vorkommenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im Gehirn dar<sup>97</sup>. Außerdem findet er sich in vielen anderen Geweben, die in Tabelle 12 aufgezählt sind.

Die in der Hypophyse und im Hypothalamus befindlichen CB1-Rezeptoren haben eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Hungergefühlen und bei der Nahrungsaufnahme<sup>16</sup>. Außerdem ist der CB1-Rezeptor an der Verarbeitung von Stress beteiligt, da seine Aktivierung Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse hat<sup>97</sup>.

Außerdem ist die Expression des Rezeptors in dopaminergen, mesolimbischen Regionen, die für Belohnungseffekte wie Befriedigung oder dem Sättigungsgefühl zuständig sind, besonders hoch<sup>16</sup>.

Die zuerst entdeckten endogenen Cannabinoide Anandamid und 2-Arachidonoylglycerol werden aus Membranphospholipiden synthetisiert<sup>36;107</sup>. Beide ECs üben ihren biologischen Effekt an CB1- und CB2-Rezeptoren, sowie an anderen zellulären Strukturen aus<sup>36</sup>. Die ECs sind Derivate der Arachidonsäure<sup>58</sup>. Aufgrund ihres lipophilen Charakters und der Tatsache, dass sie aus Membranphospholipiden synthetisiert werden, können ECs nicht wie andere Neurotransmitter in Vesikeln gespeichert werden, sondern sie werden nur bei Bedarf hergestellt und im Anschluss gleich wieder gespalten<sup>10;16;97</sup>. Im Gehirn werden sie von Neuronen an Ort und Stelle produziert und bewirken durch ihre Freisetzung einen kurzen Effekt, bevor sie wieder abgebaut werden<sup>3;10;16</sup>. Aufgrund ihres lipophilen Charakters geht man davon aus, dass ECs lokal wirksame Neuromodulatoren sind<sup>16</sup>.

### 5.2.2 Physiologische Aufgaben des ECS

Das ECS ist bei allen Vertebraten vorhanden<sup>16;28;86</sup>. Dies lässt darauf schließen, dass das ECS eine bedeutende Rolle für viele biologische Funktionen hat. Es ist bei der Regulation von Nozizeption, bei motorischen Prozessen, Gedächtnis- und Lernleistung, Appetit und Nahrungsaufnahme beteiligt<sup>3;36;97</sup>. Außerdem nimmt es Einfluss auf endokrine Funktionen, auf die Immunantwort des Körpers, auf neuroprotektive Mechanismen und auf den Knochenumsatz<sup>4;15;27;51;61;91;128;131</sup>.

Es konnte gezeigt werden, dass das ECS die Energiebilanz des Körpers und die metabolische Homöostase reguliert und auch Prozesse wie die Nahrungsaufnahme steuert<sup>17;35;55;68;98</sup>.

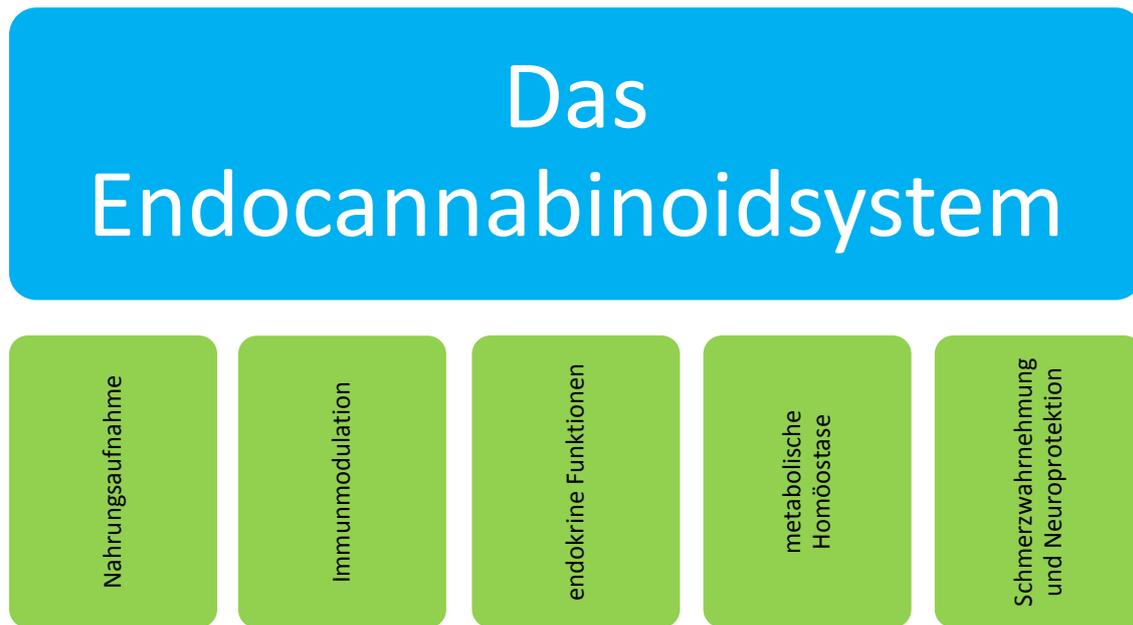


Abbildung 9 Vorgänge an denen das ECS beteiligt ist

### 5.2.3 Zellbiologie des ECS

Der CB1-Rezeptor wurde als erstes aus der Großhirnrinde von Ratten kloniert, anschließend aus menschlichem Gehirn und Hodengewebe und danach aus dem Gehirn der Maus. In den letzten Jahren wurde der Rezeptor in unterschiedlichen peripheren Gewebetypen und Organsystemen gefunden<sup>29</sup>. Im Gehirn kommt der CB1-Rezeptor in sehr großer Dichte vor und ist in etwa so häufig wie GABAerge und glutaminerge Ionenkanäle<sup>58</sup>.

Der CB2-Rezeptor hingegen befindet sich im Wesentlichen in der Milz, den Tonsillen und den verschiedenen Immunzellen (B- und T-Zellen, Monozyten). Er ist für die Immunantwort des Körpers wichtig. Nach Verletzungen des zentralen Nervensystems wird der CB2-Rezeptor auch dort exprimiert<sup>29</sup>. Daten, die von CB2 Knockoutmäusen stammen, lassen erkennen, dass der CB2-Rezeptor bei der Aktivierung von T-Zellen durch Makrophagen beteiligt ist<sup>72</sup>.

Die Familie der endogenen Cannabinoide ist mittlerweile größer als man zunächst annahm<sup>28;58</sup>. Definitionsgemäß sind Endocannabinoide vom Körper produzierte Stoffe, die an den CB1- oder CB2-Rezeptor oder an beide binden<sup>83</sup>. 2-Arachidonylglycerol bindet an CB1 und CB2 mit einer etwa gleich großen Affinität und aktiviert sie mit gleich ausgeprägtem Effekt. Anandamid hingegen bindet besser an CB1 als an CB2, hat jedoch bei beiden Rezeptoren nur einen geringen Effekt. Deshalb agiert Anandamid häufig als partieller Agonist am CB1-Rezeptor, während 2-AG für weitere Rezeptoren

als vollständiger Agonist dient <sup>123</sup>. Erst kürzlich entdeckte Endocannabinoide sind 2-Arachidonyl-glycerol-ether (2-AGE oder Noladinether), O-Arachidonoyl-ethanolamin (Virodhamine) und N-Arachidonoyl-dopamin (NADA). Die physiologischen Eigenschaften dieser Endocannabinoide müssen erst noch wissenschaftlich untersucht werden <sup>28;97</sup>.

Daten aus CB1- und CB2-Rezeptor Knockout Mäusen lassen die Vermutung zu, dass es noch andere Rezeptoren geben muss, an die die ECs binden <sup>67;135</sup>. Viele Cannabinoide binden z.B. an den GPR55-Rezeptor und aktivieren ihn. Dieser Rezeptor befindet sich im Gehirn und in peripheren Geweben von Menschen und Mäusen. Zusätzlich gibt es nicht-G-Protein-gekoppelte Effekte, die durch ECs ausgelöst werden. Diese Effekte sind momentan Gegenstand aktueller Untersuchungen <sup>5</sup>.

#### 5.2.4 CB1-Rezeptor-Signal-Transduktion

Der CB1-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und setzt sich aus sieben Transmembrandomänen zusammen <sup>29;114</sup>. CB1-Rezeptoren sind typischerweise mit G-Proteinen der Klasse G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> gekoppelt. Einer der Haupteffekte bei ihrer Aktivierung besteht in der Inhibierung der Adenylatzyklase. Außerdem regulieren sie Ionenkanäle und setzen den MAP-Kinase-Weg in Gang <sup>29</sup>.

Die Aktivierung von CB1-Rezeptoren durch ECs an Nervenenden inhibiert die Erregungsübertragung in vielen Hirnzentren wie Striatum, Hippocampus, Cerebellum, Cortex, Hypothalamus und Nucleus acumbens <sup>67</sup>. Die Hemmung von Ca<sup>2+</sup>- und die Stimulierung von K<sup>+</sup>-Kanälen trägt zur Verminderung der neuronalen Erregbarkeit und zum Rückgang der Neurotransmitterfreisetzung bei <sup>34</sup>. Die Aktivierung des CB1-Rezeptors hemmt die GABA- und Glutamat-Freisetzung, je nachdem auf welcher Art von Neuronen die Rezeptoren exprimiert werden <sup>76</sup>.

Die Dichte an exprimierten CB1-Rezeptoren variiert je nach Subpopulation der Neuronen und nach dem jeweiligen Hirnanteil. Zudem gibt es wenig Übereinstimmung zwischen den exprimierten Mengen und den Funktionalitäten der CB1-Rezeptoren <sup>97</sup>. Die Aktivierung des CB1-Rezeptors hat Einfluss auf einige wichtige Signalwege. In Nervenzellen sind die CB1-Rezeptoren zum Beispiel direkt mit der Hemmung von spannungsabhängigen-Ca<sup>2+</sup>-Kanälen gekoppelt <sup>34</sup>. Außerdem sind sie mit K<sup>+</sup>-Kanälen verbunden und setzen damit die neuronale Erregbarkeit herab. In peripheren Geweben und Nervenzellen führt eine Aktivierung der CB1-Rezeptoren zu intrazellulären Signalwirkungen, die zum Beispiel die Hemmung der Adenylatzyklase mit entsprechender Abschwächung der Proteinkinase A oder die Stimulierung der MAP Proteinkinasen auslöst <sup>34;97</sup>. Wie und in welcher Weise die verschiedenen Signalwege durch die Aktivierung der CB1-Rezeptoren moduliert werden, hängt zum einen vom jeweiligen Agonisten ab, und zum anderen vom beteiligten Gewebe bzw. Organ <sup>34</sup>. Für

2-AG wurde kürzlich gezeigt, dass es bei Ratten die Adenosinmonophosphatkinasen im Hypothalamus anregt und in der Leber und Fettgewebe blockiert<sup>70</sup>.

Extrazellulär werden Endocannabinoide sehr rasch eliminiert<sup>28</sup>. Deshalb wird konstatiert, dass Anandamid und 2-AG nach der Aktivierung ihres Rezeptors von einem vermuteten Transportmechanismus, dem sogenannten Anandamid-Membrantransporter, aufgenommen werden<sup>7</sup>. Mittlerweile gibt es immer mehr Beweise für das Vorhandensein eines solchen Transporters<sup>88</sup>. Egal wie der Aufnahmemechanismus in die Zellen auch funktionieren mag, der Abbau der ECs spielt eine herausragende Rolle. In vivo wird der Abbau der EC durch das Enzym FAAH vermittelt<sup>20;21;31;106</sup>. Nebenbei weiß man mittlerweile, dass 2-AG durch eine Monoacylglycerol-Lipase abgebaut wird<sup>37</sup>. Außerdem wurden weitere enzymatische Abbaumechanismen für ECs beschrieben<sup>85;132</sup>.

Die Eigenschaft, dass ECs nur dann gebildet werden, wenn sie lokal benötigt werden, und ihr rascher Abbau zeigen, dass ECs am Ort ihrer Synthese zur Wirkung kommen<sup>35</sup>.

### 5.2.5 Das ECS im Gastrointestinaltrakt

Das Endocannabinoid 2-AG wurde 1995 zum ersten Mal aus dem Darm von Kaninchen isoliert<sup>87</sup>. Wesentlich später wurde Anandamid aus dem Dünndarm von Mäusen isoliert<sup>64</sup>. Das Anandamid-abbauende Enzym FAAH wurde in Mäuse- und Rattendärmen identifiziert<sup>66;105</sup>. CB1-Rezeptoren wurden in Därmen unterschiedlicher Spezies beschrieben, darunter z.B. in Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Schweinen und Menschen<sup>12;18;22;71</sup>. All diese Funde deuten darauf hin, dass das ECS zum einen im Intestinum stark verbreitet ist und zum anderen dort auch wichtige Aufgaben erfüllt.

CB1-Rezeptoren befinden sich im unteren Ringmuskel der Speiseröhre<sup>56</sup>. Cannabinoidrezeptor-Agonisten hemmen die Entspannung dieses Muskels bei Frettchen und Hunden und wirken dadurch einem Rückfluss von Magensäure in die Speiseröhre entgegen. Das legt nahe, dass Medikamente auf Cannabinoid-Basis nützlich gegen gastroösophagealen Reflux sein könnten<sup>74;101</sup>. CB1-Rezeptoren kommen im gesamten Gastrointestinaltrakt vor<sup>19;103</sup>. Allerdings ist ihre Dichte im Kolon und im Magen am größten<sup>2;12</sup>. Es wurden auch CB1-Rezeptoren in Nervenzellen gefunden, die die Hormone Vasointestinales Peptid und Neuropeptid Y enthalten. Das lässt erahnen, dass Endocannabinoide mit diesen Peptiden bei der Kontrolle des Magendarmtraktes kooperieren<sup>18</sup>.

Das ubiquitäre Vorkommen von Cannabisrezeptoren im Gastrointestinaltrakt unterstützt die Annahme, dass die Endocannabinoide und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle bei einer Anzahl von Schlüsselaspekten der Verdauung spielen. Tatsächlich haben Untersuchungen eine Wirkung des ECS auf die sekretorische Aktivität und Bewegungen des Darms nachgewiesen<sup>19</sup>. Eine Aktivierung des ECS hemmt die

Magenentleerung, die Darmperistaltik und die Nahrungspassage durch den Darm<sup>64;65;73;78</sup>. Weitere Untersuchungen haben eine protektive Funktion des ECS gegen Entzündungen im Magendarmtrakt, beispielsweise in einem Mausmodell für Colitis, nachgewiesen<sup>79;121</sup>.

Untersuchungen haben auch gezeigt, dass sowohl Endocannabinoide als auch deren abbauende Enzyme und Wiederaufnahmetransporter im GIT vorkommen<sup>33;64;79;105</sup>. Dabei finden sich die Endocannabinoide in mehrfach höheren Konzentrationen als im Gehirn<sup>64;104</sup>. Die durch Anandamid induzierte Hemmung der Darmentleerung bei Mäusen war der erste Bericht, dass ECs die Darmfunktion beeinflussen<sup>45</sup>. All diese Erkenntnisse stützen die Annahme, dass das ECS wesentlich für die Funktion des Gastrointestinalsystems ist. Aufgrund der oben genannten Ergebnisse scheint es wahrscheinlich, dass der P129T SNP aufgrund der Veränderung im EC-Haushalt einen Einfluss auf gastrointestinale Erkrankungen und somit auch auf die untersuchten CEDs hat.

### 5.2.6 Das ECS bei gastrointestinalen Erkrankungen

Das oben beschriebene ECS ist ausgeprägt im Gehirn, Magendarmtrakt und Fettgewebe vertreten. Besonders seine Beteiligung an emotionalen Prozessen, macht aus dem ECS einen ausgezeichneten Kandidaten für einen zu Grunde liegenden Faktor, in der Pathologie von psychosomatischen Problemen des Verdauungssystems als auch ein Ziel für neue therapeutische Herangehensweisen.

#### Reizdarm:

Es gibt vielfältige Hinweise für eine Endocannabinoid-regulierte Reduzierung der Darmbewegungen durch CB1- und CB2-Rezeptoren<sup>45;54;64;82</sup>. Die beschriebenen Eigenschaften des ECS könnten nützlich bei der Therapie des Reizdarmes sein, der häufig durch eine verstärkte Darmperistaltik charakterisiert ist<sup>33;105;122</sup>.

#### Gastroösophagealer Reflux:

Ein Reflux von saurem Mageninhalt in die Speiseröhre resultiert aus einem schwachen unteren Ringmuskel mit Symptomen wie Brennen im Bereich der Herzgegend und saures Aufstoßen<sup>33;42</sup>. Es wurde nachgewiesen, dass es einen Einfluss durch psychologischem Stress, Angst und Depressionen auf diese Erkrankung gibt<sup>33;42;112;136</sup>. Man könnte Therapien auf Cannabinoid-Basis entwickeln, die durch zentrale oder periphere Cannabinoidrezeptor-Aktivierung gegen den Reflux wirken. In der Tat wurde gezeigt, dass CB1-Rezeptoragonisten den Speiseröhrenringmuskel bei Hunden und Frettchen entspannen. Diese Wirkungen wurden durch Cannabinoidrezeptoren am Vagus-Nerv vermittelt<sup>19;74;101</sup>.

### Sekretorische Diarrhoen:

Eine flüssigkeitsinduzierte Zunahme des Stuhlvolumens, ein sekretorischer Durchfall, wird durch eine Störung der Absorption von Wasser und Elektrolyten sowie durch eine gestörte Darmbeweglichkeit verursacht<sup>112;113</sup>. Psychologischer Stress kann eine sekretorische Diarrhoe verstärken. Dies geschieht vermutlich, wenn Stress die Aktivierung von Rezeptoren für das Corticotropin-Releasing-Hormon auslöst<sup>113</sup>. Mehrere Studien befassten sich mit der Rolle des ECS bei diesem Prozess. So reduzierte die Stimulierung des ECS die Flüssigkeitsmenge im Darm, während umgekehrt die Blockierung von CB1-Rezeptoren mit dem Antagonisten Rimonabant die Flüssigkeitsmenge erhöhte<sup>19</sup>. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Endocannabinoide eine tonische Regulierung der sekretorischen Darmaktivität ausüben, die entsprechend der physiologischen Umgebung herauf oder herunter reguliert werden kann. Da die Aktivierung des CB1-Rezeptors zu einer Abnahme der Flüssigkeitsmenge im Dünndarm von Ratten führte, kann eine auf Cannabinoiden basierende Therapie darüber hinaus nützlich bei dieser Form von Diarrhoe sein<sup>127</sup>.

### Ulcus ventriculi:

Es ist bekannt, dass die Entstehung von Magengeschwüren durch psychologischen Stress gefördert wird. Die Fähigkeit von Cannabinoiden, die Magensäuresekretion und die Entstehung von Ulcera zu reduzieren, wurde bereits vor vielen Jahren beobachtet. Interessanterweise reduzieren Cannabinoide insbesondere diejenigen Ulcera, die durch Stress verursacht waren<sup>49</sup>. Diese Wirkung könnte durch eine direkte Aktivierung von Cannabinoidrezeptoren im Magen, oder durch eine Reduzierung der Stressreaktion im zentralen Nervensystem oder durch beide Mechanismen verursacht sein<sup>2;102</sup>.

### Übelkeit und Erbrechen:

Antiemetische Wirkungen von Cannabinoiden wurden umfassend nachgewiesen und mehrere Cannabinoidmedikamente mit  $\Delta$ 9-THC oder THC-ähnlichen Substanzen sind für die klinische Verwendung verfügbar<sup>19;26;33;100</sup>. Die antiemetischen Effekte werden durch CB1- und CB2-Rezeptoren auf den Vagusnerven im Magen, oder durch niedrigere Gehirnstrukturen des dorsalen vagalen Komplexes vermittelt<sup>19;130</sup>. Zusammengefasst ist es weitgehend akzeptiert, dass Medikamente auf Cannabinoidbasis, besonders solche, die keine zentralen Nebenwirkungen haben, als antiemetische Medikamente für Krebs- und Aidspatienten, die eine chemotherapeutische Behandlung erhalten, entwickelt werden sollten. Cannabinoide könnten besonders wirksam bei der Bekämpfung von antizipatorischer Übelkeit sein<sup>99</sup>. Da in der Area postrema Rezeptoren außerhalb des Gehirns lokalisiert sind, sollten CB1-rezeptorspezifische Cannabinoide, die nicht im zentralen Nervensystem aktiv sind, besonders passend sein<sup>46;47</sup>.

### 5.2.7 Das ECS und gastrointestinale Entzündungsreaktionen

Zum Thema Endocannabinoidsystem und chronisch entzündliche Darmerkrankungen gibt es bisher nicht viele Studien. Einige der bisher vorhandenen Studien werden im nächsten Abschnitt besprochen.

An CB1-Knockoutmäusen konnte 2004 der Zusammenhang zwischen dem ECS und den CEDs gezeigt werden. In dieser Studie wurde die Entzündungsreaktion von Wildtypmäusen und den CB1<sup>-/-</sup> Mäusen nach Behandlung mit DNBS verglichen. Dabei wiesen die Knockoutmäuse sowohl bei rektaler Gabe von DNBS, als auch bei oraler Gabe von DSS makroskopisch und histologisch eine deutlich stärker ausgeprägte Entzündungsreaktion im Kolon auf. Bei rektaler Behandlung mit DNBS war der makroskopische Score bei den CB1<sup>-/-</sup> Mäusen 2,2-fach höher als bei den Wildtypmäusen. Bei der oralen Applikation von DSS über 7 Tage war der Score für die CB1<sup>-/-</sup> Mäuse um das 2,1-fache höher.

Um zu überprüfen, ob der CB1-Rezeptor an einem Schutzmechanismus vor Entzündungen beteiligt ist, wurden Wildtypmäuse mit dem spezifischen CB1-Antagonisten SR141716A vor und nach der rektalen Applikation von DNBS behandelt. Im Vergleich zu einer Placebogabe reagierten die mit dem CB1-Antagonisten behandelten Mäuse mit einer fast doppelt so stark ausgeprägten Colitis.

Wurde den Mäusen allerdings vor und nach DNBS ein CB1-Agonist, in diesem Fall HU 210, gegeben, so halbierte sich der Score der Entzündungsreaktion.

Im Zuge dieser Studie verwendete man auch FAAH<sup>-/-</sup> Mäuse, die durch den Ausfall des FAAH-Enzyms über einen erhöhten Endocannabinoidspiegel verfügten. Die durch DNBS entstandene Colitis war bei den FAAH<sup>-/-</sup> Mäusen ebenfalls um das zweifache geringer als bei Wildtypmäusen<sup>79</sup>, was erneut auf die physiologische Bedeutung des ECS hinweist.

In einer Untersuchung aus dem Jahre 2005 konnte nachgewiesen werden, dass die glatten Muskelzellen von CB1-Knockoutmäusen ein gestörtes elektrophysiologisches Bild zeigen, das sich durch spontane spitzenförmige Aktivitäten äußert. Diese sogenannten Spikes traten acht Stunden nach der Auslösung einer Entzündungsreaktion mit einer Frequenz von  $32,9 \pm 2,3 \text{ min}^{-1}$  und einer Amplitude von  $27,9 \pm 2,7 \text{ mV}$  auf. 16 Stunden später waren die Frequenz und die Amplitude sogar noch höher. Knockoutmäuse ohne eine intestinale Inflammation wiesen solche Spikes zu keiner Zeit auf. Diese Untersuchung belegte, dass das Membranpotential der glatten intestinalen Muskulatur stark auf Entzündungsreize reagiert. Da diese Reaktion bei den CB1<sup>-/-</sup> Mäusen sehr viel stärker ausfiel, ist davon auszugehen, dass diesen Mäusen ein Mechanismus fehlt, der das Membranpotential stabil hält. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das ECS an der Aufrechterhaltung von Membranpotentialen in intestinalen Muskelzellen beteiligt ist<sup>116</sup>.

Argenio et al. verglichen die Wirkung von einem Inhibitor des Anandamidabbaus und der Anandamidwiederaufnahme. Weiterhin bestimmten sie die Konzentration an Endocannabinoiden in Mäusen- und Rattenkolons und aus Biopsien von Colitis ulzerosa Patienten, die zum Zeitpunkt der Biopsientnahme keine Therapie erhielten <sup>24</sup>.

Die Therapie mit dem Anandamidtransportinhibitor VDM-11 und die 5-ASA-Therapie bewirkten eine komplette Remission der induzierten Colitis. Auch die Behandlung mit dem FAAH-Inhibitor AA-5-HT besserte die Entzündung. Allerdings war die Wirkung von AA-5-HT nicht so ausgeprägt, wie bei den beiden anderen Substanzen <sup>24</sup>.

Der Anandamidspiegel erhöhte sich durch die Anwendung des 5-ASA Präparates und durch VDM-11, während keine Beeinflussung des 2-AG-Spiegels beobachtet werden konnte <sup>24</sup>.

Interessanterweise war bei den unbehandelten Colitis ulzerosa Patienten die Anandamidkonzentration in den Mukosabiopsien 2-fach erhöht, während die 2-AG-Konzentration im Normbereich lag <sup>24</sup>, was auf die Bedeutung des ECS auch beim Menschen hindeutet.

Diese Ergebnisse belegen, dass eine Entzündung im Kolon von erhöhten Anandamidkonzentrationen begleitet wird. 2-AG als das zweite wichtige Endocannabinoid scheint bei diesen Mechanismen nicht beteiligt zu sein. Außerdem stützt diese Untersuchung die Annahme, dass Inhibitoren des Anandamid-Reuptakes in Zukunft als Medikation bei entzündlichen Erkrankungen dienen könnten, wie auch eine Untersuchung an Mäusen zeigt <sup>121</sup>. Der FAAH-Inhibitor war in weiteren Studien auch in der Lage eine Remission herbeizuführen <sup>121</sup>.

### 5.2.8 Fatty acid amide hydrolase

Das Enzym FAAH, als zentraler Bestandteil des ECS, wurde in vielen unterschiedlichen Studien aus nahezu allen Fachrichtungen untersucht. Dabei wurde klar, dass es für ein Gleichgewicht zwischen EC-Synthese und –Abbau von immenser Wichtigkeit ist. Wenn diese Homöostase gestört ist, kann es zu Erkrankungen in unterschiedlichen Organen kommen.

In der Urologie wurden in jüngster Zeit vor allen Dingen zwei Mechanismen beschrieben, bei denen das ECS maßgeblich beteiligt ist. Zum einen scheint es eine große Rolle bei der Entwicklung von Prostatakarzinomen zu spielen, zum anderen ist es für die männliche Zeugungsfähigkeit bedeutend <sup>40;124</sup>

Endsley et al. berichten über den Zusammenhang zwischen dem ECS und Prostatakarzinomzellen. Schon seit 2004 war bekannt, dass sich in den Zellen eines Prostatakarzinoms hohe Mengen an 2-AG nachweisen lassen <sup>95</sup>. Jedoch untersuchte man damals nicht die EC-abbauenden Enzyme. In einer neueren Studie konnte gezeigt

werden, dass FAAH sowohl in den normalen Zellen, als auch in den Karzinomzellen, in der Prostata vorhanden ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass 2-AG als anti-invasiver Faktor in Prostatakarzinomzellen wirkt. Es wurden drei unterschiedliche Zellkulturen für die Experimente verwendet. Die Zelllinie LNCaP wies eine 20-fach höhere Expression von FAAH mRNA auf als nicht-Tumorzellen. Dies führt zu einer erhöhten Produktion des FAAH-Genproduktes. Nachdem FAAH-spezifische siRNA in diese LNCaP-Zellen transfiziert wurde, verminderte sich die Expression des Genproduktes um 80%. Dabei war eine signifikant reduzierte Invasion von LNCaP-Zellen nach Rückgang der FAAH-Expression durch die zuvor genannte Transfektion zu beobachten. Derselbe Effekt lies sich durch eine pharmakologische Blockierung des FAAH-Enzyms mittels CAY10401 nachweisen. Das deutet darauf hin, dass ein höherer EC-Spiegel die Ausbreitung von Tumorzellen in der Prostata verhindern, bzw. zumindest verlangsamen könnte. Dieser Mechanismus ließ sich durch SR141716A blockieren und ist demnach CB1-vermittelt<sup>40</sup>.

Eine Studie von Sun et al beschäftigte sich mit einem anderen urologischen Thema. Eine Untersuchung an männlichen chronischen Marihuanakonsumenten zeigte eine eingeschränkte Fortpflanzungsfähigkeit. Allerdings waren bis dato die Gründe dafür unbekannt. Anderen Untersuchungen bewiesen, dass sich im Hodengewebe und in der Samenflüssigkeit von Intervertebraten und Vertebraten ECs befinden<sup>109</sup>. Außerdem konnte bei männlichen Schweinen nachgewiesen werden, dass ECs die Kapazitation der Spermien und die Akrosomenreaktion verhindern<sup>75</sup>. Beim Menschen führt Anandamid über eine Dämpfung der Mitochondrienaktivität zur Verlangsamung von Samenzellen<sup>109</sup>.

Männliche FAAH<sup>-/-</sup> Mäuse erzielten bei einer Paarung um 13% geringere Würfe als Wildtyp-Männchen. Via Western-Blot konnte belegt werden, dass sich FAAH in Spermatozyten und in fertigen Spermien befindet. FAAH<sup>-/-</sup> Mäuse haben signifikant höhere Anandamid und 2-AG Konzentrationen im Hoden und Nebenhoden. Das heißt, dass auch in diesen Geweben das Enzym FAAH zur Aufrechterhaltung eines konstanten EC-Spiegels benötigt wird. Das Sperma der Knockout-Mäuse wies eine deutlich verminderte Fertilisationsrate gegenüber Sperma von Wildtypmäusen auf. Obwohl die FAAH<sup>-/-</sup> Spermien in der Lage sind an die Zona pellucida zu binden und eine Akrosomenreaktion durchzuführen, ist ihre Fähigkeit weibliche Eizellen zu befruchten eingeschränkt. Darüberhinaus sind diese Spermien deutlich langsamer als normale Spermien<sup>124</sup>.

Verschiedene Untersuchungen belegen den Einfluss des ECS auf die Entstehung und das Verschwinden von Angstreaktionen. Bei Gabe des selektiven FAAH-Blockers URB597 in niedriger Dosierung, konnte bei Ratten ein anxiolytischer Effekt beobachtet werden. Hohe Dosierungen verschlimmerten die Angstreaktion bei Ratten. Dieser Effekt konnte durch einen TRPV1 Antagonisten verhindert werden<sup>110</sup>. Da sich zeigte,

dass durch den TRPV1-Agonisten Capsaicin angstauslösende Effekte erzeugt werden können, schloss man daraus, einen FAAH/TRPV1-Blocker als Anxiolytikum einzusetzen<sup>120</sup>. Ein geeigneter Antagonist für beide Enzyme ist AA-5-HT, das bereits in anderen Studien eine schmerzstillende Wirkung gezeigt hatte<sup>77</sup>. Ein anxiolytischer Effekt war bei einer niedrigen Dosierung von 1mg/kg zu verzeichnen. Die Wirkung entsprach in etwa der äquivalenten Menge an Diazepam. Größere Mengen schwächten die Wirkung allerdings ab<sup>90</sup>.

#### **5.2.8.1 Der FAAH Single Nucleotide Polymorphismus**

Der Vergleich mit den vorhandenen Studien, die sich mit dem FAAH-SNP befassen, zeigt eine ähnliche Verteilung der verschiedenen Genotypen. Der Anteil des AA-Genotyps liegt in unserer Studie bei 3,9%. In anderen Studien liegt dieser Anteil jeweils auch bei etwa 4%. Auch bei den heterozygoten Trägern und den Wildtypindividuen gibt es keinen wesentlichen Unterschied<sup>14;118</sup>. Ein Vergleich der phänotypischen Eigenschaften der Studienpopulation ist zu keiner bisher veröffentlichten Studie möglich, da es keine vergleichbare Untersuchung mit Kolitis ulzerosa oder Morbus Crohn Patienten gibt.

In mehreren Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen dem FAAH C385A Polymorphismus und dem Vorhandensein einer Adipositas belegt werden. Daher kam für einige Forscherteams auch die Überlegung auf, ob es eventuell auch eine Korrelation mit anderen Essstörungen geben könnte. Müller et al. veröffentlichten ihre Ergebnisse zum Thema Anorexia nervosa und genetische Veränderung im ECS im Jahre 2008. Obwohl die genauen Hintergründe der Entstehung einer Anorexie noch nicht bis ins Detail bekannt sind, gibt es viele Hinweise auf eine multifaktorielle Pathogenese. Zwillingsstudien belegen, dass etwa 58-76% der Anorexiefälle genetische Faktoren bei der Entstehung beinhalten<sup>69</sup>. Sowohl exogen zugeführte, als auch endogene Cannabinoide stimulieren über eine CB1-Aktivierung die Nahrungsaufnahme<sup>34</sup>. Eine Blockierung des CB1-Rezeptors durch den Inhibitor Rimonabant hingegen führt zu einer geringeren Nahrungsaufnahme und damit zu einer Verringerung des Körpergewichts<sup>129</sup>. In der vorliegenden Studie untersuchten Muller et al. unterschiedliche genetische Varianten des CB1-Rezeptors und der Enzyme FAAH, *N*-acylethanolamine-hydrolysing acid amidase (NAAA) und Monoglyceride lipase (MGLL). Keiner der überprüften Polymorphismen korrelierte signifikant mit dem Auftreten einer Anorexia nervosa<sup>93</sup>.

#### **5.2.9 FAAH und chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Neben der hier vorliegenden Studie gibt es noch eine weitere Untersuchung, die sich mit dem Thema FAAH - Polymorphismus und chronisch entzündliche Darmerkrankungen beschäftigt.

Die erste Studie von Storr et al. aus dem Jahre 2008 untersucht die Wirkung eines FAAH-Inhibitors und eines Inhibitors des EC-Membrantransporters bei Mäusen, bei denen eine Colitis durch TNBS induziert wurde. Der FAAH-Inhibitor URB597 wurde den Mäusen entweder nur 30 Minuten vor der TNBS-Behandlung, oder aber auch noch 12,24,38,48 und 60 Stunden nach TNBS gegeben. Beide Regimes waren in der Lage die durch TNBS ausgelöste Colitis signifikant abzumildern. Mittels des EC-Membrantransporter-Inhibitors VDM11 sollte überprüft werden, ob ein lokaler Anstieg der EC-Konzentration durch eine Wiederaufnahme-Hemmung sich ebenfalls auf die Entzündungsreaktion auswirkt. Wie auch bei der URB597 Untersuchung gab es auch hier wieder ein prä-TNBS und ein dreitägiges post-TNBS Behandlungsregime. Obwohl die Effekte von URB597 deutlicher waren, zeigte sich auch bei VDM11 für beide Behandlungswege eine signifikante Besserung der Colitis. Eine kombinierte Gabe der beiden Präparate war der Einzelgabe allerdings nicht überlegen. Um zu überprüfen, ob die erhaltenen Ergebnisse auf einer CB1- oder CB2-Aktivierung beruhen, wiederholte man die vorher genannten Tests an CB1<sup>-/-</sup> und CB2<sup>-/-</sup> Mäusen. Dabei konnte belegt werden, dass sowohl eine CB1- als auch eine CB2-Aktivierung an den Therapieerfolgen beteiligt sind<sup>121</sup>. Diese Studie belegt einen Zusammenhang zwischen dem ECS und einer Entzündung des Kolons. Dadurch ist ein Effekt des durch den untersuchten SNP veränderten FAAH-Enzyms auf die beiden Erkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulzerosa sehr wahrscheinlich.

## 6 Zusammenfassung

Verschiedene genetische Faktoren spielen eine äußerst wichtige Rolle in der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Als erstes verantwortliches Gen wurde im Jahre 2001 NOD2/CARD15 entdeckt<sup>59;134</sup>. In groß angelegten Genomuntersuchungen wurden weitere Gene wie IL23R, ATG16L1, IRGM und NELL1 identifiziert, die vermutlich an der Ätiologie des Morbus Crohn beteiligt sind<sup>44;50;59;81;108;134</sup>. Es erscheint allerdings möglich, dass verschiedene Genausprägungen nicht nur Einfluss auf die Anfälligkeit für CEDs haben, sondern auch die Effektivität und Sicherheit der Therapien beeinflussen, wie es z.B. beim Mangel an Thiopurinmethyltransferase bei Patienten, die Azathioprin erhalten, der Fall ist<sup>125</sup>.

Da das FAAH Enzym einen derartig wichtigen Baustein im Abbauprozess der Endocannabinoide darstellt, war es unser Bestreben zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Pro129Thr Polymorphismus im FAAH Gen und der Anfälligkeit oder dem Phänotyp von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gibt. Das Vorkommen heterozygoter und homozygoter Träger wich nicht signifikant vom erwarteten Verhältnis, dass mit dem Hardy-Weinberg Gesetz berechnet wurde, ab. Hinsichtlich der vorkommenden Genotypen gab es Übereinstimmungen mit anderen Studien, was die Validität unserer Daten erhärtet. Sippe et al. fanden 3,7% AA Polymorphismen innerhalb der untersuchten kaukasischen Bevölkerung, in der Studie von Moritat et al. waren 1,5% Polymorphismen in der Kontrollgruppe vertreten<sup>92;119</sup>. Da in unserer Studie kein signifikanter Unterschied in der Genotypenhäufigkeit zwischen der Morbus Crohn Gruppe und den gesunden Kontrollindividuen bestand und lediglich 4,1% aller Morbus Crohn Patienten homozygot für den Pro129Thr Polymorphismus sind, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Polymorphismus keinen Risikofaktor für die Erkrankung an Morbus Crohn darstellt, so wie es für Mutationen im NOD2/CARD15 Gen der Fall ist<sup>52;53;62;92;96</sup>. Allerdings verlangt die niedrige Zahl an homozygoten Trägern des Polymorphismus größer angelegte Studien, um die Ergebnisse dieser Studie zu bekräftigen.

Hingegen demonstriert der Genotyp-Phänotyp Vergleich bei Morbus Crohn Patienten, dass homozygote Träger des AA Genotyps in größerem Maße dazu neigen, Fisteln und extraintestinale Manifestationen zu entwickeln. Das lässt den Schluss zu, dass das Vorhandensein des Pro129Thr Polymorphismus die Schwere der Krankheitsausprägung des Morbus Crohn beeinflussen könnte. Bei den Colitis ulcerosa-Patienten war kein Einfluss des Polymorphismus auf den Phänotyp zu finden. Allerdings zeigte sich ein früherer Beginn der Erkrankung bei homozygoten Trägern.

Die in dieser Studie hervorgebrachten p-Werte wurden aufgrund fehlender Signifikanzen nicht durch die Bonferroni Methode korrigiert.

Da der untersuchte Polymorphismus keinen Einfluss auf die Anfälligkeit für CEDs und nur einen geringen Effekt auf den Phänotyp zu haben scheint, kann davon ausgegangen werden, dass diese genetische Variation keinen Risikofaktor für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa darstellt. Interessanterweise kommt der AA Genotyp sowohl bei Morbus Crohn als auch Colitis ulcerosa häufiger beim männlichen Geschlecht vor. Bei den Morbus Crohn Patienten sind 72,2% der homozygoten Träger männlich, bei den Colitis ulcerosa Patienten sogar 100%. Aufgrund der insgesamt jedoch sehr niedrigen Anzahl an homozygoten Trägern müsste man größere Studien durchführen, um die hier genannten Ergebnisse zu bestätigen.

Es bleibt jedoch die Frage, ob die enzymatische Aktivität von FAAH sich je nach vorhandenem Genotyp unterscheidet. Eine Studie von Sipe et al. deutet an, dass sich in vitro die katalytische Aktivität der FAAH Mutante nicht verändert, das diese mutierte Form jedoch anfälliger für einen proteolytischen Abbauprozess ist<sup>118</sup>. In vivo konnten keine Veränderungen der FAAH Halbwertszeit, oder der EC-Konzentrationen gefunden werden<sup>118</sup>. Ob diese erhöhte Sensitivität für eine Proteolyse auch bei heterozygoten Individuen zum Tragen kommt, ist bisher nicht bekannt.

In einer neueren Studie zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass die FAAH Aktivität in aufbereiteten menschlichen T-Lymphozyten reduziert ist, was wiederum mit einer verringerten FAAH Proteinexpression korreliert<sup>14</sup>. Folglich könnten homozygote Träger der 385A Mutation konstitutiv niedrigere FAAH-Aktivitätslevel in vivo aufweisen. Bisher ist ungewiss, ob das zu höheren Anandamidkonzentrationen führt. Außerdem ist auch noch nicht geklärt, ob andere Enzyme, die ECs abbauen, in ihrer Aktivität gesteigert werden und dadurch eventuell andere Metaboliten im Abbau der ECs entstehen. Wenn man das mögliche therapeutische Potential der Beeinflussung des ECS im Rahmen der CED-Therapie betrachtet, könnte dieser Polymorphismus als Marker dienen, um Patienten zu identifizieren, die auf eine Therapie, die auf das ECS abzielt, ansprechen können.

Um die Rolle von Entzündungsvorgängen bei der Regulation der Transkription von FAAH näher zu untersuchen, prüften wir die Expression in entzündeten und nicht-entzündeten Morbus Crohn-Biopsien und in mit Zytokinen behandelten epithelialen Zellen. Obgleich es eine moderate Korrelation mit dem proinflammatorischen Marker IL-8 ( $r=0,53$ ) gab, konnten wir keinen ausgeprägten Anstieg, wie im Falle der IL-8 mRNA bei entzündlich veränderten Biopsien, feststellen. Gleichzeitig führte die in vitro Behandlung mit den proinflammatorischen Zytokinen in keinem Fall zu einer Steigerung der FAAH Konzentration, die über das 2-fache des Ausgangswertes hinausging. Das lässt den Rückschluss zu, dass die intestinale Inflammation die FAAH Genexpression nicht in größerem Masse zu erhöhen scheint. Falls die FAAH

Expression im Gastrointestinaltrakt allerdings an anderer Stelle als in der Mukosa stattfinden sollte, so wurde das durch unsere Untersuchungen nicht erfasst.

Neuere Studien deuten an, dass bei FAAH Knockout Mäusen (FAAH<sup>-/-</sup> Mäuse) eine durch DNBS ausgelöste Kolitis weit weniger fulminant verläuft. Das wiederum lässt die bedeutende Rolle von FAAH im Entzündungsgeschehen erahnen<sup>79</sup>.

Darüber hinaus wurde im Tiermodell gezeigt, dass eine Aktivierung von FAAH gegen intestinale Entzündungen schützen kann, was die protektiven Mechanismen des EC-abbauenden Enzyms nochmalig hervorhebt<sup>24</sup>. In diesen ganzen Prozess sind nicht nur CB-Rezeptoren involviert, da das EC Anandamid, welches durch eine Blockade des Enzyms FAAH ansteigt, nicht nur CB1-Rezeptoren erregt. Der TRPV1-Rezeptor, dem das Anandamid ebenfalls als potenter Agonist dient, scheint wie auch die CB-Rezeptoren an der Verhinderung von intestinalen Entzündungen beteiligt zu sein<sup>80;116</sup>.

Das Enzym FAAH ist eines der elementarsten Teile des Abbauvorgangs von ECs<sup>30;57</sup>. Aus diesem Grund gibt es sehr großes Interesse an der Erforschung der Beteiligung des Enzyms an verschiedensten Erkrankungen. So wurde bei FAAH Knockout Mäusen ein Anstieg des Anandamidspiegels auf das 15-fache beobachtet, was die Bedeutung für den Abbau von ECs und insbesondere von Anandamid veranschaulicht<sup>20</sup>. Der Pro129Thr Polymorphismus steht laut neueren Untersuchungen in Zusammenhang mit Drogenmissbrauch<sup>118</sup>, Alkoholmissbrauch<sup>118</sup> und Fettsucht<sup>119</sup>. Kein Zusammenhang konnte mit der Abhängigkeit von Metamphetamin und dem Auftreten von Schizophrenien gefunden werden<sup>92</sup>.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass nach den durchgeführten Untersuchungen der Pro129Thr Polymorphismus zu einer schweren fistelbildenden und penetrierenden Form des Morbus Crohn führen kann. Zudem besteht bei Trägern ein erhöhtes Risiko für extraintestinale Manifestationen. Bei der Colitis ulzerosa kann es bei Konduktoren zu einem sehr frühen Krankheitsbeginn kommen.

Intestinale Entzündungen und das Hinzufügen proinflammatorischer Zytokine zur Zellkultur hatte keinen wesentlichen Effekt auf die FAAH Genexpression. Wenn man den fehlenden Zusammenhang mit der Anfälligkeit für CEDs und das geringe Auftreten dieses Polymorphismus in der europäischen Bevölkerung betrachtet, kann man zwei unterschiedliche Schlüsse ziehen. Einerseits scheint der untersuchte Polymorphismus keinen Einfluss auf die Ätiologie der CEDs zu haben, andererseits bedürfte es einer groß angelegten Multicenter-Studie um dieses Ergebnis auch untermauern zu können.

Nichtsdestotrotz deutet das therapeutische Potential von ECs und die bereits bekannte Auswirkung des AA Phänotyps auf den EC-Abbau darauf hin, dass der SNP eine bedeutende Rolle in der EC-basierten Therapie homozygoter Träger spielen könnte. Es benötigt weitere Studien, um herauszufinden, ob dasselbe für den weitaus verbreiteteren heterozygoten CA-Typ gilt.

Das bisherige Wissen über den Zusammenhang zwischen ECS und intestinale Inflammationsvorgänge beschränkt sich bisher auf folgende Punkte: Es war bereits bekannt, dass das ECS physiologischerweise in einem Schutzprozess vor intestinalen Entzündungen eingebunden ist. Dabei zeigte sich die Aktivierung des CB1-Rezeptors als immens wichtig für die Abwendung von Entzündungen. Ebenfalls war bekannt, dass endogene Cannabinoide durch spezifische Enzyme abgebaut werden. FAAH ist dabei das wichtigste abbauende Enzym.

Aufgrund der hier durchgeführten Studie konnte das Wissen um einige Punkte erweitert werden. Der AA Genotyp des FAAH Pro129Thr präsentierte sich als Faktor, der mit einem schwerwiegenderen Morbus Crohn-Phänotyp einhergeht. Das lässt sich an einer signifikant höheren Frequenz von Fistel und extraintestinalen Manifestationen bei den homozygoten Trägern des Polymorphismus erkennen. Im Falle der Colitis ulzerosa war ein früherer Krankheitsbeginn bei den homozygoten Trägern bemerkenswert. Bei der Behandlung von intestinalen Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen konnte keine signifikante Korrelation mit der FAAH mRNA gefunden werden. Auch in den entzündlichen Darmbiopsien von Morbus Crohn Patienten war die FAAH mRNA nicht signifikant erhöht.

## 7 Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1</u>	chemische Struktur von Anandamid und delta-9-THC .....	6
<u>Abbildung 2</u>	Abbau von Anandamid durch FAAH in Arachidonsäure und Ethalonamin .....	7
<u>Abbildung 3</u>	FAAH als integrales Membranprotein in einer Lipiddoppelschicht.....	8
	Mittels Röntgenkristallographie wurde die dreidimensionale Struktur des Enzyms entschlüsselt [9]. Der mit pro129 markierte Locus zeigt die Stelle im Protein, an der der untersuchte Polymorphismus lokalisiert ist.....	8
<u>Abbildung 4</u>	PCR - Produkte nach Auftragung auf ein Agarosegel und erfolgter Gelelektrophorese Alle aufgetragenen PCR - Produkte zeigen eine Bande bei 299 bp. Durch diesen Schritt kann gezeigt werden, dass jede einzelne Reaktion auch zu einem PCR- Produkt geführt hat. ....	16
<u>Abbildung 5</u>	Darstellung der möglichen Genotypen durch Elektrophorese nach dem Verdau mit Sty I Der CC – Wildtyp zeigt zwei Banden bei 71 und bei 228 Basenpaaren. Bei den heterozygoten CA - Individuen werden drei Banden dargestellt. Je eine schwache Bande bei 71 bp und zwei stärkere Banden bei 228 bp und bei 299 bp. Die gesuchten homozygoten AA – Träger weisen nur eine einzelne Bande bei 299 bp auf, da das Enzym StyI bei den Homozygoten keine Stelle zum Spalten findet .....	17
<u>Abbildung 6</u>	Standardkurve für FAAH.....	33
<u>Abbildung 7</u>	Zusammenhang zwischen IL-8 und FAAH mRNA Expressionsmengen .....	35
<u>Abbildung 8</u>	Zeitlicher Verlauf der relativen FAAH mRNA Expression nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ und LPS.....	36
<u>Abbildung 9</u>	Vorgänge an denen das ECS beteiligt ist.....	41

## 8 Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1</u>	Eigenschaften der Studienpopulation .....	12
<u>Tabelle 3</u>	Reagenzien zur Herstellung des Enzymansatzes .....	15
<u>Tabelle 4</u>	20µl Ansatz für die Durchführung einer RT - PCR .....	19
<u>Tabelle 5</u>	Beta - Aktin Primer .....	20
<u>Tabelle 6</u>	RT-PCR Temperaturbedingungen .....	21
<u>Tabelle 7</u>	Häufigkeit der verschiedenen Genotypen des FAAH–Polymorphismus bei Morbus Crohn, Colitis ulzerosa und den Kontrollen.....	24
<u>Tabelle 8</u>	Zusammenhang zwischen dem C385A Genotyp und den Morbus Crohn–Charakteristika .....	28
	1 Das Krankheitsverhalten wurde nach den Definitionen der Montreal Klassifikation definiert (CITE). Eine stenosierende Erkrankungsform war dabei definiert als das Auftreten von Stenosen ohne die Anwesenheit von Fisteln. Die Diagnosestellung von Stenosen erfolgte chirurgisch, endoskopisch oder radiologisch mittels MRT.....	28
	2 Als Immunsuppressiva wurden Azathioprin, 6 – Mercaptopurin, 6 – Thioguanin, Methotrexat und/oder Infliximab gewertet.....	28
	3 Extraintestinale Manifestationen waren das Auftreten einer oder mehrerer der folgenden Morbus Crohn – assoziierten Erkrankungen: nicht-medikamentös induzierte Arthropathien (z.B. ankylosierende Spondylitis, Sakroileitis, periphere Arthritiden), Augenbeteiligung (z.B. Episkleritis, Iritis/Uveitis), Hautbeteiligung (z.B. Erythema nodosum, Pyoderma gangrenosum), nicht – medikamentös – induzierte Gallenerkrankungen (z.B. primär sklerosierende Cholangitis) .....	28
	4 Es wurden nur Operationen mit eingerechnet, die aufgrund eines Morbus Crohn – assoziierten Problems notwendig wurden (z.B. Fistulektomie, Kolektomie, Ileostomie) .....	28
<u>Tabelle 9</u>	Zusammenhang zwischen dem C385A Genotyp und den Colitis ulzerosa – Merkmalen .....	30
	<sup>1</sup> Als Immunsuppressiva wurden Azathioprin, 6 – Mercaptopurin, 6 – Thioguanin, Methotrexat und/oder Infliximab gewertet.....	30
	<sup>2</sup> Extraintestinale Manifestationen waren das Auftreten einer oder mehrerer der folgenden Morbus Crohn – assoziierten Erkrankungen: nicht-medikamentös induzierte Arthropathien (z.B. ankylosierende Spondylitis, Sakroileitis, periphere Arthritiden), Augenbeteiligung (z.B. Episkleritis, Iritis/Uveitis), Hautbeteiligung (z.B. Erythema nodosum, Pyoderma gangrenosum), nicht – medikamentös – induzierte Gallenerkrankungen (z.B. primär sklerosierende Cholangitis) .....	30

<sup>3</sup> Es wurden nur Operationen mit eingerechnet, die aufgrund eines Colitis ulzerosa – assoziierten Problems notwendig wurden (z.B. Fistulektomie, Kolektomie, Ileostomie) .....	30
<u>Tabelle 10</u> Ct – Werte zur Erstellung der Standardkurve.....	31
<u>Tabelle 11</u> Quotienten aus entzündlichen und nicht entzündlichen Geweben für IL-8 und FAAH.....	33

## 9 Referenzen

1. The International HapMap Project. *Nature* 2003;426:789-96.
2. Adami M, Frati P, Bertini S et al. Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *Br.J.Pharmacol.* 2002;135:1598-606.
3. Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog.Neurobiol.* 1999;58:315-48.
4. Arenos JD, Musty RE, Bucci DJ. Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and memory. *Eur.J.Pharmacol.* 2006;539:177-83.
5. Baker D, Pryce G, Davies WL et al. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol.Sci.* 2006;27:1-4.
6. Baldwin AS, Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J.Clin.Invest* 2001;107:3-6.
7. Bari M, Battista N, Fezza F et al. New insights into endocannabinoid degradation and its therapeutic potential. *Mini.Rev.Med.Chem.* 2006;6:257-68.
8. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:521-36.
9. Borm ME, van Bodegraven AA, Mulder CJ et al. A NFKB1 promoter polymorphism is involved in susceptibility to ulcerative colitis. *Int.J.Immunogenet.* 2005;32:401-5.

10. Bracey MH, Hanson MA, Masuda KR et al. Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science* 2002;298:1793-6.
11. Bramblett RD, Panu AM, Ballesteros JA et al. Construction of a 3D model of the cannabinoid CB1 receptor: determination of helix ends and helix orientation. *Life Sci.* 1995;56:1971-82.
12. Casu MA, Porcella A, Ruiu S et al. Differential distribution of functional cannabinoid CB1 receptors in the mouse gastroenteric tract. *Eur.J.Pharmacol.* 2003;459:97-105.
13. Chen F, Castranova V, Shi X et al. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin.Chem.* 1999;45:7-17.
14. Chiang KP, Gerber AL, Sipe JC et al. Reduced cellular expression and activity of the P129T mutant of human fatty acid amide hydrolase: evidence for a link between defects in the endocannabinoid system and problem drug use. *Hum.Mol.Genet.* 2004;13:2113-9.
15. Correa F, Mestre L, Molina-Holgado E et al. The role of cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation. *Mini.Rev.Med.Chem.* 2005;5:671-5.
16. Cota D WS. The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy homeostasis. 2005. Ref Type: Generic
17. Cota D, Marsicano G, Tschop M et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J.Clin.Invest* 2003;112:423-31.

18. Coutts AA, Irving AJ, Mackie K et al. Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *J.Comp Neurol.* 2002;448:410-22.
19. Coutts AA, Izzo AA. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update. *Curr.Opin.Pharmacol.* 2004;4:572-9.
20. Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP et al. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;98:9371-6.
21. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP et al. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996;384:83-7.
22. Croci T, Manara L, Aureggi G et al. In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum. *Br.J.Pharmacol.* 1998;125:1393-5.
23. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt.Sinai J.Med.* 2000;67:263-8.
24. D'Argenio G, Valenti M, Scaglione G et al. Up-regulation of anandamide levels as an endogenous mechanism and a pharmacological strategy to limit colon inflammation. *FASEB J.* 2006;20:568-70.
25. Danese S, Semeraro S, Papa A et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J.Gastroenterol.* 2005;11:7227-36.
26. Darmani NA. Methods evaluating cannabinoid and endocannabinoid effects on gastrointestinal functions. *Methods Mol.Med.* 2006;123:169-89.

27. de Oliveira AL, Genro BP, Vaz BR et al. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res.* 2006;1075:60-7.
28. De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br.J.Pharmacol.* 2004;141:765-74.
29. Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signalling. *Life Sci.* 2006;78:549-63.
30. Deutsch DG, Chin SA. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem.Pharmacol.* 1993;46:791-6.
31. Deutsch DG, Ueda N, Yamamoto S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 2002;66:201-10.
32. Devane WA, Hanus L, Breuer A et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;258:1946-9.
33. Di Carlo G, Izzo AA. Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert.Opin.Investig.Drugs* 2003;12:39-49.
34. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2004;3:771-84.
35. Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat.Neurosci.* 2005;8:585-9.
36. Di Marzo V, Melck D, Bisogno T et al. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* 1998;21:521-8.

37. Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002;99:10819-24.
38. Duerr RH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.Clin.North Am.* 2002;31:63-76.
39. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001;48:526-35.
40. Endsley MP, Thill R, Choudhry I et al. Expression and function of fatty acid amide hydrolase in prostate cancer. *Int.J.Cancer* 2008;123:1318-26.
41. Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB, Jr. Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology* 1975;68:627-35.
42. Fass R, Ofman JJ. Gastroesophageal reflux disease--should we adopt a new conceptual framework? *Am.J.Gastroenterol.* 2002;97:1901-9.
43. Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA et al. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat.Genet.* 2008;40:710-2.
44. Franke A, Hampe J, Rosenstiel P et al. Systematic association mapping identifies NELL1 as a novel IBD disease gene. *PLoS.ONE.* 2007;2:e691.
45. Frider E. Anandamides: tolerance and cross-tolerance to delta 9-tetrahydrocannabinol. *Brain Res.* 1995;697:83-90.
46. Frider E, Feigin C, Ponde DE et al. (+)-Cannabidiol analogues which bind cannabinoid receptors but exert peripheral activity only. *Eur.J.Pharmacol.* 2004;506:179-88.

47. Frideric E, Ponde D, Breuer A et al. Peripheral, but not central effects of cannabidiol derivatives: Mediation by CB(1) and unidentified receptors. *Neuropharmacology* 2005;48:1117-29.
48. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2000;6:8-15.
49. Germano MP, D'Angelo V, Mondello MR et al. Cannabinoid CB1-mediated inhibition of stress-induced gastric ulcers in rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 2001;363:241-4.
50. Glas J, Konrad A, Schmechel S et al. The ATG16L1 Gene Variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) Are Strongly Associated With Susceptibility to Crohn's Disease in the German Population. *Am.J.Gastroenterol.* 2007.
51. Guindon J, De Léan A, Beaulieu P. Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain* 2006;121:85-93.
52. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925-8.
53. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S et al. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 2002;359:1661-5.
54. Hanus L, Breuer A, Tchilibon S et al. HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:14228-33.

55. 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;15:593-9.
56. Hornby PJ, Prouty SM. Involvement of cannabinoid receptors in gut motility and visceral perception. *Br.J.Pharmacol.* 2004;141:1335-45.
57. Howlett AC, Barth F, Bonner TI et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol.Rev.* 2002;54:161-202.
58. Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR et al. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 2004;47 Suppl 1:345-58.
59. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
60. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-3.
61. Idris AI, van 't Hof RJ, Greig IR et al. Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat.Med.* 2005;11:774-9.
62. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J.Biol.Chem.* 2003;278:5509-12.
63. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J.Clin.Invest* 2006;116:1218-22.

- 
64. Izzo AA, Fezza F, Capasso R et al. Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. *Br.J.Pharmacol.* 2001;134:563-70.
  65. Izzo AA, Pinto L, Borrelli F et al. Central and peripheral cannabinoid modulation of gastrointestinal transit in physiological states or during the diarrhoea induced by croton oil. *Br.J.Pharmacol.* 2000;129:1627-32.
  66. Katayama K, Ueda N, Kurahashi Y et al. Distribution of anandamide amidohydrolase in rat tissues with special reference to small intestine. *Biochim.Biophys.Acta* 1997;1347:212-8.
  67. Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T et al. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J.Neurosci.* 2006;26:2991-3001.
  68. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2004;89:2548-56.
  69. Klump KL, Miller KB, Keel PK et al. Genetic and environmental influences on anorexia nervosa syndromes in a population-based twin sample. *Psychol.Med.* 2001;31:737-40.
  70. Kola B, Hubina E, Tucci SA et al. Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* 2005;280:25196-201.
  71. Kulkarni-Narla A, Brown DR. Localization of CB1-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system. *Cell Tissue Res.* 2000;302:73-80.

72. Kunos G, Batkai S. Novel physiologic functions of endocannabinoids as revealed through the use of mutant mice. *Neurochem.Res.* 2001;26:1015-21.
73. Landi M, Croci T, Rinaldi-Carmona M et al. Modulation of gastric emptying and gastrointestinal transit in rats through intestinal cannabinoid CB(1) receptors. *Eur.J.Pharmacol.* 2002;450:77-83.
74. Lehmann A, Blackshaw LA, Branden L et al. Cannabinoid receptor agonism inhibits transient lower esophageal sphincter relaxations and reflux in dogs. *Gastroenterology* 2002;123:1129-34.
75. Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A et al. Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J.Cell Sci.* 2005;118:4393-404.
76. Mackie K. Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int.J.Obes.(Lond)* 2006;30 Suppl 1:S19-S23.
77. Maione S, De Petrocellis L, De Novellis V et al. Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. *Br.J.Pharmacol.* 2007;150:766-81.
78. Manara L, Croci T, Guagnini F et al. Functional assessment of neuronal cannabinoid receptors in the muscular layers of human ileum and colon. *Dig.Liver Dis.* 2002;34:262-9.
79. Massa F, Marsicano G, Hermann H et al. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J.Clin.Invest* 2004;113:1202-9.

- 
80. Massa F, Sibaev A, Marsicano G et al. Vanilloid receptor (TRPV1)-deficient mice show increased susceptibility to dinitrobenzene sulfonic acid induced colitis. *J.Mol.Med.* 2006;84:142-6.
  81. Massey DC, Parkes M. Genome-wide association scanning highlights two autophagy genes, ATG16L1 and IRGM, as being significantly associated with Crohn's disease. *Autophagy.* 2007;3:649-51.
  82. Mathison R, Ho W, Pittman QJ et al. Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br.J.Pharmacol.* 2004;142:1247-54.
  83. Matias I, Gonthier MP, Orlando P et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2006;91:3171-80.
  84. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;346:561-4.
  85. McKinney MK, Cravatt BF. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu.Rev.Biochem.* 2005;74:411-32.
  86. McPartland JM, Matias I, Di Marzo V et al. Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene* 2006;370:64-74.
  87. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem.Pharmacol.* 1995;50:83-90.
  88. Mechoulam R, Deutsch DG. Toward an anandamide transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005;102:17541-2.

89. Meucci G, Vecchi M, Astegiano M et al. The natural history of ulcerative proctitis: a multicenter, retrospective study. Gruppo di Studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali (GSMII). *Am.J.Gastroenterol.* 2000;95:469-73.
90. Micale V, Cristino L, Tamburella A et al. Anxiolytic Effects in Mice of a Dual Blocker of Fatty Acid Amide Hydrolase and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channels. *Neuropsychopharmacology* 2008.
91. Mikics E, Dombi T, Barsvari B et al. The effects of cannabinoids on contextual conditioned fear in CB1 knockout and CD1 mice. *Behav.Pharmacol.* 2006;17:223-30.
92. Morita Y, Ujike H, Tanaka Y et al. A nonsynonymous polymorphism in the human fatty acid amide hydrolase gene did not associate with either methamphetamine dependence or schizophrenia. *Neurosci.Lett.* 2005;376:182-7.
93. Muller TD, Reichwald K, Bronner G et al. Lack of association of genetic variants in genes of the endocannabinoid system with anorexia nervosa. *Child Adolesc.Psychiatry Ment.Health* 2008;2:33.
94. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;365:61-5.
95. Nithipatikom K, Endsley MP, Isbell MA et al. 2-arachidonoylglycerol: a novel inhibitor of androgen-independent prostate cancer cell invasion. *Cancer Res.* 2004;64:8826-30.
96. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.

- 
97. Pagotto U, Marsicano G, Cota D et al. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr.Rev.* 2006;27:73-100.
  98. Pagotto U, Vicennati V, Pasquali R. The endocannabinoid system and the treatment of obesity. *Ann.Med.* 2005;37:270-5.
  99. Parker LA, Kemp SW. Tetrahydrocannabinol (THC) interferes with conditioned retching in *Suncus murinus*: an animal model of anticipatory nausea and vomiting (ANV). *Neuroreport* 2001;12:749-51.
  100. Parker LA, Kwiatkowska M, Burton P et al. Effect of cannabinoids on lithium-induced vomiting in the *Suncus murinus* (house musk shrew). *Psychopharmacology (Berl)* 2004;171:156-61.
  101. Partosoedarso ER, Abrahams TP, Scullion RT et al. Cannabinoid1 receptor in the dorsal vagal complex modulates lower oesophageal sphincter relaxation in ferrets. *J.Physiol* 2003;550:149-58.
  102. Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ et al. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 2004;145:5431-8.
  103. Pertwee RG. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 2001;48:859-67.
  104. Pinto L, Capasso R, Di Carlo G et al. Endocannabinoids and the gut. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 2002;66:333-41.
  105. Pinto L, Izzo AA, Cascio MG et al. Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. *Gastroenterology* 2002;123:227-34.

106. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat.Rev.Neurosci.* 2003;4:873-84.
107. Piomelli D, Beltramo M, Giuffrida A et al. Endogenous cannabinoid signaling. *Neurobiol.Dis.* 1998;5:462-73.
108. Roberts RL, Gearry RB, Hollis-Moffatt JE et al. IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease. *Am.J.Gastroenterol.* 2007;102:2754-61.
109. Rossato M, Ion PF, Ferigo M et al. Human sperm express cannabinoid receptor Cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2005;90:984-91.
110. Rubino T, Realini N, Castiglioni C et al. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb.Cortex* 2008;18:1292-301.
111. Russo R, LoVerme J, La Rana G et al. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 (cyclohexylcarbamic acid 3'-carbamoylebiphenyl-3-yl ester) reduces neuropathic pain after oral administration in mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2007;322:236-42.
112. Sanger GJ, Yoshida M, Yahyah M et al. Increased defecation during stress or after 5-hydroxytryptophan: selective inhibition by the 5-HT(4) receptor antagonist, SB-207266. *Br.J.Pharmacol.* 2000;130:706-12.

113. Saunders PR, Maillot C, Million M et al. Peripheral corticotropin-releasing factor induces diarrhea in rats: role of CRF1 receptor in fecal watery excretion. *Eur.J.Pharmacol.* 2002;435:231-5.
114. Shim JY, Welsh WJ, Howlett AC. Homology model of the CB1 cannabinoid receptor: sites critical for nonclassical cannabinoid agonist interaction. *Biopolymers* 2003;71:169-89.
115. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-7.
116. Sibaev A, Massa F, Yuce B et al. CB1 and TRPV1 receptors mediate protective effects on colonic electrophysiological properties in mice. *J.Mol.Med.* 2006;84:513-20.
117. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can.J.Gastroenterol.* 2005;19 Suppl A:5-36.
118. Sipe JC, Chiang K, Gerber AL et al. A missense mutation in human fatty acid amide hydrolase associated with problem drug use. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002;99:8394-9.
119. Sipe JC, Waalen J, Gerber A et al. Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Int.J.Obes.(Lond)* 2005;29:755-9.

120. Starowicz K, Nigam S, Di M, V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol.Ther.* 2007;114:13-33.
121. Storr MA, Keenan CM, Emmerdinger D et al. Targeting endocannabinoid degradation protects against experimental colitis in mice: involvement of CB1 and CB2 receptors. *J.Mol.Med.* 2008;86:925-36.
122. Storr MA, Yuce B, Andrews CN et al. The role of the endocannabinoid system in the pathophysiology and treatment of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol.Motil.* 2008;20:857-68.
123. Sugiura T, Kodaka T, Nakane S et al. Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J.Biol.Chem.* 1999;274:2794-801.
124. Sun X, Wang H, Okabe M et al. Genetic loss of Faah compromises male fertility in mice. *Biol.Reprod.* 2009;80:235-42.
125. Tai HL, Krynetski EY, Yates CR et al. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am.J.Hum.Genet.* 1996;58:694-702.
126. Timmer A, Goebell H. Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995--a prospective study in an urban population in Germany. *Z.Gastroenterol.* 1999;37:1079-84.
127. Tyler K, Hillard CJ, Greenwood-van MB. Inhibition of small intestinal secretion by cannabinoids is CB1 receptor-mediated in rats. *Eur.J.Pharmacol.* 2000;409:207-11.

128. van der Stelt M, Di Marzo V. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular.Med.* 2005;7:37-50.
129. Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ et al. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 2005;365:1389-97.
130. Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 2005;310:329-32.
131. Wang H, Dey SK, Maccarrone M. Jekyll and Hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocr.Rev.* 2006;27:427-48.
132. Wang H, Xie H, Sun X et al. Differential regulation of endocannabinoid synthesis and degradation in the uterus during embryo implantation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007;83:62-74.
133. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG et al. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat.Rev.Genet.* 2005;6:109-18.
134. Weersma RK, Zhernakova A, Nolte IM et al. ATG16L1 and IL23R Are Associated With Inflammatory Bowel Diseases but Not With Celiac Disease in The Netherlands. *Am.J.Gastroenterol.* 2007.
135. Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 2002;296:678-82.

136. Wright CE, Ebrecht M, Mitchell R et al. The effect of psychological stress on symptom severity and perception in patients with gastro-oesophageal reflux. *J.Psychosom.Res.* 2005;59:415-24.

## 10 Lebenslauf

Anschrift: Heideckstr.12, 80637 München

### Persönliche Daten

Geburtsdatum: 02. Juli 1981

Geburtsort: Altötting

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

09/87-07/91 Grund- und Teilhauptschule Unterneukirchen

09/91-07/00 König-Karlmann-Gymnasium Altötting

11/01-09/03 Ludwig-Maximilians-Universität München, Studium der Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt

11/03-12/08 Ludwig-Maximilians-Universität München, Studium der Humanmedizin, klinischer Abschnitt

### Praktisches Jahr

06/07-10/07 Klinikum München Schwabing Chirurgie, Dr. med. E. F. J. Höcherl, Dr. med. D. Sackerer, Prof. Dr. H. Waldner

10/07-02/08 Klinikum Großhadern Innere Medizin, II. und III. Medizinische Klinik, Prof. Dr. A. Wagner, Prof. Dr. H. Ostermann

02/08-06/08 Klinikum Ludwig-Maximilians-Universität Anästhesie Innenstadt, PD. Dr. D. Irnich, Dr. med. T. Geisenberger, Prof. Dr. U. Kreimeier

Berufliche Tätigkeit

seit 01/09 Assistenzarzt, Anästhesie, Klinikum Großhadern, LMU  
München, Prof. Dr. B. Zwissler

seit 04/09 Assistenzarzt, Innere Medizin, Krankenhaus Peißenberg,  
Dr. W. Fischer

## 11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Martin Storr für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit in seiner Forschungsgruppe und vor allem für die freundschaftliche Unterstützung und Förderung auch über die wissenschaftliche Tätigkeit hinaus. Er war zu jeder Zeit ein hilfsbereiter und kompetenter Ansprechpartner, der mich in meinem Interesse an dem faszinierenden Gebiet der molekularen Gastroenterologie bestärkt und gefördert hat.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. S. Brand und seiner gesamten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Julia Diegelmann für die Hilfe bei den Laborarbeiten, und bei Frau Caroline Wolf für die freundliche Unterstützung in der CED-Ambulanz bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Göke dafür, dass ich diese Arbeit in der von ihm geleiteten Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Ludwig- Maximilians- Universität München durchführen durfte.

Eine herzliche Danksagung geht an Frau Simone Pfennig, deren Unterstützung bei der statistischen Auswertung für meine Ergebnisse unerlässlich war.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. P. Lohse, seiner Frau Pia Lohse und allen Mitarbeitern in der molekularbiologischen Abteilung der klinischen Chemie im Klinikum Großhadern. Ich wurde sehr freundlich in ihrem Labor aufgenommen und durfte dort den Großteil meiner Experimente durchführen. Bei allen aufkommenden Fragen fand ich dort jemanden mit einem offenen Ohr für mich.

Natürlich nicht zu vergessen ist meine Familie, die in allen Situationen für mich da war und mich in all meinen Entscheidungen unterstützte.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Lebensgefährtin Maria Remmelberger für ihre Geduld, für viele tiefsinnige Gespräche und all die Aufmunterungen in schweren Zeiten danken, mit der sie mich begleitet und so auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.