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

Die Rolle des Q63R Polymorphismus im Cannabinoid Rezeptor 2 (CNR2) Gen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

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

Vorgelegt von
Christopher Duane Rugg
aus
Bad-Tölz
2011

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

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Martin Storr
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Veit Gülberg apl. Prof. Dr. Heinrich Kremer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. Stefan Brand
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	27.10.2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 8

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen 9

1.1.1 Epidemiologie und Geschichte 9

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese 10

1.1.3 Klinik und Diagnostik 22

1.2 Cannabis in der Medizin 25

1.2.1 Allgemeines und Geschichte 25

1.2.2 Das Endocannabinoidsystem 27

1.2.3 Der CB2-Rezeptor 31

1.3 Fragestellung der Arbeit 37

2 Material und Methoden 38

2.1 Patienten- und Kontrollgruppe 38

2.2 Methoden 40

2.2.1 Isolierung der DNA 40

2.2.2 DNA Amplifikation mittels PCR 41

2.2.3 Verdau des PCR-Produkts 43

2.2.4 Bestimmung des Genotyps mittels Gelelektrophorese 45

2.2.5 Vorbereitung der humanen intestinalen Zelllinie HT-29 46

2.2.6 Gewinnung und Bearbeitung der Darmbiopsien 47

2.2.7 Herstellung der zur RT-PCR benötigten cDNA 48

2.2.8 Quantitative Real Time PCR 49

2.2.9 Statistik 52

2.3 Materialien 52

2.3.1 Allgemein 52

2.3.2 Isolierung der DNA 53

2.3.3 PCR 53

2.3.4 Verdau des PCR Produkts 53

2.3.5 Gelelektrophorese 53

2.3.6 Zellkulturen und Biopsien 54
2.3.7 RT-PCR 55
3 Ergebnisse 56
3.1 CB2 – Rezeptor – Polymorphismus 56
3.1.1 Genotyp – Verteilung 56
3.1.2 Genotyp – Phänotyp – Korrelation 57
3.2 CB2 – Rezeptor – Expressionsverhalten 63
3.2.1 Daten der Zelllinie HT-29 64
3.2.2 Daten der Darmbiopsien 66
4 Diskussion 70
4.1 Diskussion der Polymorphismusergebnisse 70
4.2 Diskussion der Expressionsergebnisse 74
5 Zusammenfassung 79
6 Abbildungsverzeichnis 81
7 Tabellenverzeichnis 82
8 Referenzen 84
9 Lebenslauf 111
10 Danksagung 112

Abkürzungsverzeichnis

2-AG: 2-arachidonoyl-glycerol

A: .....Adenosin

APC: ..... Antigenpräsentierende Zelle

bp: .....Basenpaare

C: .....Cytosin

CB: ..... Cannabinoid

cDNA: .....complementary DNA

CED: .....chronisch entzündliche Darmerkrankungen

C_t: .....Threshold Cycle

dNTP: .....desoxy Nukleosidtriphosphat

ECS: .....Endocannabinoidsystem

FAAH: .....Fatty Acid Amide Hydrolase

G: .....Guanosin

GI-Trakt: .....Gastrointestinaltrakt

IFN: .....Interferon

IL: ..... Interleukin

IRF: .....Interferon regulatory factor

kb: .....Kilobasen

LPS: .....Lipopolysaccharid

MAGL: .....Monoacylglycerol Lipase

mRNA: ..... messenger RNA

NAPE: .....N-arachidonoyl-Phosphatidylethanolamin

PAMP: .....Pathogen Associated Molecular Pattern

PCR: .....Polymerase chain reaction

PRR: ..... Pattern Recognition Rezeptor

RNase: .....Ribonuklease

RT-PCR: .....quantitative-Real-Time-PCR

SNP: .....single nucleotid polymorphismus

T: ..... Thymidin

Taq: .....Thermus aquaticus

THC: ..... Tetrahydrocannabinol

TLR: .....Toll-like-Rezeptor

TNF: .....Tumornekrosefaktor

UV: .....Ultraviolettstrahlung

1 Einleitung

Die genaue Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), vor allem die ihrer Hauptvertreter Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, ist trotz intensiver Forschung noch weitesgehend unbekannt. Es wird jedoch von einem sich auf drei Säulen basierenden, multifaktoriellen Model, bestehend aus genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und einer Dysregulation des Immunsystems ausgegangen. Mit der Einführung genomweiter Kopplungs- und Assoziationsstudien, wurde in den letzten Jahren ein besonderes Augenmerk auf genetische Risikofaktoren gelegt. Im Rahmen dieser Studien konnte inzwischen eine Vielzahl eindeutiger Risikoloci ermittelt werden, welche die Suszeptibilität für CED beeinflussen. Auch diese Arbeit wird sich mit einem solchen möglichen Genlocus beschäftigen und unter anderem untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen dem von uns auserwählten Polymorphismus und der Entstehung oder der phänotypischen Ausprägung einer CED vorliegt. Hierbei handelt es sich um den von Sipe et al. beschriebenen dinukleotid Polymorphismus pQ63R des Cannabinoid-2-Rezeptors (CB2-Rezeptor) (Sipe et al. 2005). Dieser, dem Endocannabinoidsystem (ECS) zugehörige Rezeptor wird überwiegend auf Immunzellen exprimiert (Howlett et al. 2002) und scheint hier eine immunsuppressive Wirkung zu entfalten (Cabral and Dove Pettit 1998). Sipe et al. konnten zeigen, dass nicht nur der immunmodulierende Effekt des Rezeptors durch diesen häufig vorkommenden Polymorphismus negativ beeinträchtigt wird, sondern auch, dass die Allelfrequenz des Polymorphismus in Patienten mit autoimmunen Erkrankungen wie Multiple Sklerose, rheumatoider Arthritis, Lupus erythematodes und Myasthenia gravis erhöht ist. Andere Studien belegten bereits früher einen Einfluss der Cannabinoide und des ECS sowohl auf die Darmmotilität als auch auf Entzündung, Sekretion und Sensitivität im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt), so dass die Untersuchung des CB2-Rezeptor einschließlich seines Polymorphismus in Bezug auf CED als sinnvoll erschien (Izzo and Coutts 2005; Massa et al. 2005). Zunächst soll jedoch näher auf die CED und das ECS eingegangen werden.

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.1.1 Epidemiologie und Geschichte

Die Geschichte der CED reicht zurück bis ins 17. Jahrhundert. Einzelfallbeschreibungen, Autopsieberichte und Symptomschilderungen aus dieser Zeit lassen nach heutigem Kenntnisstand zumindest die Vermutung eines Morbus Crohn oder einer Colitis ulcerosa zu. Erst im späten 18. und 19. Jahrhundert gelang eine Abgrenzung zu anderen infektiösen, hier vor allem tuberkulösen Darmerkrankungen. So konnten unter anderem G.B. Morgagni (1761), S. Wilks (1859) und K. Dalziel (1913) erste genauere Schilderungen dieser Krankheitsentitäten liefern (Kirsner 1988; Hoffmann 2009). Schließlich war es dann Dr. Burill B. Crohn vom Mt. Sinai Hospital in New York, der 1932 durch seine Beschreibung mehrerer an einer nicht-tuberkulösen Ileitis terminalis erkrankter Patienten das Krankheitsbild des später nach ihm benannten Morbus Crohn einschließlich seiner klassischen Krankheitsmerkmale definierte (Crohn et al. 2000). Die exakte klinische und pathologische Abgrenzung eines den Kolon befallenden Morbus Crohn zur Colitis ulcerosa wurde 1960 dargelegt (Lockhart-Mummery and Morson 1960) und Anfang der 70er Jahre durch die Verbreitung der Endoskopie und den damit verbundenen Möglichkeiten der erleichterten bioptischen Untersuchung erweitert.

Seit den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts spielen die CED eine zunehmende Rolle in der Gastroenterologie. Mit zunächst steigenden Inzidenzraten für Nordamerika und den Westen Europas, scheinen sich diese seit den 70er Jahren bei Werten von 3,9 – 7,0 / 10^5 für Morbus Crohn und 8,7 – 11,8 / 10^5 für Colitis ulcerosa in Europa stabilisiert zu haben (Lakatos 2006; Sands 2007). Ein für diese Gegenden zunächst angenommenes signifikantes Nord-Süd-Gefälle konnte durch Kooperation der Studienzentren und die Standardisierung der Diagnosekriterien zwar bestätigt, jedoch bei steigenden Inzidenzraten in Südeuropa in seinem Ausmaß als gering eingeschätzt werden (Shivananda et al. 1996). Galten lange Zeit die CED hauptsächlich als Problem der westlichen Industrienationen, ist es in den letzten Jahren

zu einem deutlichen Anstieg der Inzidenzen auch in Osteuropa, Südamerika und Asien gekommen (Lakatos 2006). Inwiefern die Industrialisierung und die Adaptation eines westlichen Lebensstils eine Rolle spielen oder hier die verbesserte Diagnostik, standardisierte Studiendesigns und ein geschulteres Bewusstsein gegenüber der Erkrankung zum Tragen kommen, bleibt zu klären.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Wie bereits erwähnt, sind an der weitgehend noch unklaren Pathogenese der CED nach heutigem Wissensstand maßgeblich drei wesentliche Faktoren beteiligt. Hierzu zählen Umwelteinflüsse, eine Dysregulation des Immunsystems und spezifische genetische Faktoren. Von besonderem Interesse sind diesbezüglich die genetischen Faktoren die einerseits die Reaktion auf Umwelteinflüsse modulieren und andererseits eine Dysregulation des Immunsystems bewirken können.

Epidemiologische Studien legten frühzeitig den Verdacht eines starken Einflusses genetischer Faktoren in der Pathogenese der CED nahe. So sind ethnische Unterschiede in der Inzidenz zu verzeichnen, welche nicht allein durch geographische Unterschiede zu erklären sind (Bonen and Cho 2003). Des Weiteren zeigten Zwillingsstudien erhöhte Konkordanzraten bei monozygoten (35-58% für M. Crohn, 6-17% für Colitis ulcerosa) im Vergleich zu dizygoten Zwillingen (2-7%) (Tysk et al. 1988; Bonen and Cho 2003; Spehlmann et al. 2008). Bereits früh fiel auch eine familiäre Häufung der CED auf. Ungefähr 5-10% der Patienten hatten eine positive Familienanamnese, wodurch dies als wichtigster Risikofaktor eingestuft werden konnte (Kuster et al. 1987; Tysk et al. 1988; Bonen and Cho 2003). Bei betroffenen Verwandten ersten Grades geht man hierbei von einem 10-35-fach erhöhten Erkrankungsrisiko mit etwas niedrigeren Werten für die Colitis ulcerosa aus (Kuster et al. 1987; Orholm et al. 1991; Bonen and Cho 2003). All diese Beobachtungen sind jedoch nicht durch einen rein monogenen Mendel´schen Erbgang zu erklären, so dass man eher von einem komplex multifaktoriellen, polygenen Zusammenhang ausgehen muss. Auf der Suche nach möglichen

Suszeptibilitätsgenen, die sowohl das Erkrankungsrisiko erhöhen als auch die phänotypische Ausprägung der Erkrankung mitbestimmen können, stieß man im Rahmen genomweiter Kopplungsstudien zunächst auf die in Tabelle 1-1 aufgeführten mehrfach reproduzierbaren Risikoloci.

Tabelle 1-1: Risikomarker für CED in Anlehnung an (Göke et al. 2007)

Locus	Chromosom	Suszeptibilitätsgen	Assoziation	Referenz
IBD1	16q12	NOD2/CARD15	M. Crohn	(Hampe et al. 2001; Hugot et al. 2001; Ogura et al. 2001)
IBD2	12p13.2-q24.1	unbekannt	Colitis ulcerosa	(Satsangi et al. 1996; Duerr et al. 1998)
IBD3	6p	unbekannt	CED	(Hampe et al. 1999; Dechairo et al. 2001)
IBD4	14q11/12	unbekannt	M. Crohn	(Ma et al. 1999; Duerr et al. 2000)
IBD5	5q31-33	SLC22A4/A5	M. Crohn	(Rioux et al. 2000; Rioux et al. 2001)
IBD6	19p13	unbekannt	CED	(Rioux et al. 2000)
IBD7	1p36	unbekannt	CED	(Cho et al. 1998; Cho et al. 2000)
IBD8	16p12	unbekannt	M. Crohn	(Satsangi et al. 1996)
IBD9	3p26	unbekannt	CED	(Satsangi et al. 1996)

Metaanalysen dieser genomweiten Assoziationsstudien erweiterten die in Verdacht stehenden Suszeptibilitätsloci erheblich, so dass bereits über 30 solcher Risikogene für den Morbus Crohn angenommen werden (Barrett et al. 2008). Einen Überblick der gefundenen Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs) verschafft die Tabelle 1-2.

Tabelle 1-2: Suszeptibilitätsloci für Morbus Crohn in Anlehnung an (Barrett et al. 2008)

SNP	Chromosom	Gen
rs11465804	1p31	IL23R
rs3828309	2q37	ATG16L1
rs3197999	3p21	MST1
rs4613763	5p13	PTGER4
rs2188962	5q31	
rs11747270	5q33	IRGM
rs4263839	9q32	TNFSF15
rs10995271	10q21	ZNF365
rs11190140	10q24	NKX2-3
rs2066847	16q12	NOD2
rs2542151	18p11	P TPN2
rs2476601	1p13	P TPN22
rs2274910	1q23	ITLN1
rs9286879	1q24	
rs11584383	1q32	
rs10045431	5q33	IL12B
rs6908425	6p22	CDKAL1
rs7746082	6q21	
rs2301436	6q27	CCR6
rs1456893	7p12	

rs1551398	8q24	
rs10758669	9p24	JAK2
rs17582416	10p11	
rs7927894	11q13	C11orf30
rs11175593	12q12	LRRK2, MUC19
rs3764147	13q14	
rs2872507	17q21	ORMDL3
rs744166	17q21	STAT3
rs1736135	21q21	
rs762421	21q22	ICOSLG

Die stärkste Reproduzierbarkeit waren hierbei für das der IL23-Signaltransduktion zugehörige IL23-Rezeptor-Gen, die Autophagie betreffenden Gene ATG16L1 und IRGM sowie das zum angeborenen Immunsystem zugehörige NOD2-Gen gegeben, wodurch diesen drei funktionellen Achsen das größte Gewicht in der Pathogenese des M. Crohn zugesprochen wird (Mathew 2008). Neuere Studien konnten zeigen, dass einige dieser Gene wie IL23R, JAK2, STAT3, CDKAL1 und IL12B ebenfalls als Suszeptibilitätsgene für die Colitis ulcerosa gelten (Anderson et al. 2009). Andere wiederum waren spezifisch für Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa. Die Colitis betreffend seien hier vor allem das sich auf dem Chromosom 1q32 befindende KIF21B-Gen, das neu entdeckte Suszeptibilitätsgen LYRM4 auf Chromosom 6p25 und die Gene HLA-DRB1, HLA-DQA, SLC26A3, ECM1 und NFKB1 genannt (Borm et al. 2005; Fisher et al. 2008; Anderson et al. 2009).

Diese Erkenntnisse verdeutlichen den ätiologisch-pathogenetischen Zusammenhang dieser beiden, dennoch als getrennt zu betrachtenden Krankheitsentitäten,

deren nur teilweise gemeinsame Suszeptibilitätsgene überwiegend zu einer Dysregulation des Immunsystems führen. Ein intaktes mukosales Immunsystem ist Voraussetzung für einen intakten GI-Trakt. Hierbei spielen die physiologische Darmflora, die mit bis zu 10^{12} Bakterien pro Gramm Stuhl ein beträchtliches Antigenrepertoire darstellt, das intestinale Epithel, welches eine Barrierefunktion gegenüber diesen luminalen Antigenen ausübt und das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe eine wesentliche Rolle. Ein gestörtes Gleichgewicht in der Abwehr potentiell pathogener Antigene und der Toleranz gegenüber apathogener Reize wie Nahrungsproteine oder Antigene der kommensalen Flora, gilt als pathogenetisch wichtiger Faktor in der Entstehung der CED. So führt der Verlust dieser oralen Toleranz, die im wesentlichen durch Anergie, Apoptose immunkompetenter Zellen und ein antiinflammatorisches Zytokinprofil sichergestellt wird (Braunstein et al. 1997; Boirivant et al. 1999), über eine überschießende Immunreaktion zu einer dauerhaften Schädigung der intestinalen Mukosa, wie es bei den CED der Fall ist (MacDermott 1996).

Am Anfang dieser Kette steht die Erkennung bestimmter, repetitiver Antigenmuster, den sogenannten Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs), an den zugehörigen Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs). Als PAMPs dienen hierbei meist bakterielle Zellwandbestandteile und bakterielle oder virale Nukleinsäuren. Zu der stetig wachsenden Gruppe der teilweise intra-, teilweise extrazellulär liegenden PRRs zählt man heute die Toll-like- (TLRs), die RIG-I-like-, die Nod-like- und die C-type-lectin-Rezeptoren. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt über unterschiedliche Signaltransduktionswege, die wiederum bestimmte Transkriptionsfaktoren, wie NF-κB, aktivieren, oder posttranskriptionell die mRNA-Stabilität regulieren (Anderson 2008), zu einer Modulation des Immunsystems mitsamt seines Zytokinprofils. Einen Überblick hierüber verschafft nachfolgende Tabelle.

Tabelle 1-3: PRRs und PAMPs in Anlehnung an (Kumagai and Akira 2010)

PRRs	PAMPs	Aktivierter Signalweg	Referenz
Toll-like-Rezeptoren			(Akira et al. 2006)
TLR1 – TLR2	Triacyl-Lipopeptide	MyD88-abhängig NF-κB	
TLR2 – TLR6	Diacyl-Lipopeptide	MyD88-abhängig NF-κB	
TLR4	LPS	MyD88- und TRIF-abhängig NF-κB	
TLR3	Doppelstrang-RNA	TRIF-abhängig NF-κB und IRF3 (Interferon regulatory factor)	
TLR7	Einzelstrang-RNA	MyD88-abhängig NF-κB und IRFs	
TLR9	Nicht-methylierte-DNA (CpG-DNA)	MyD88-abhängig NF-κB und IRFs	
RIG-I-like-Rezeptoren			(Kawai and Akira 2006)
RIG-I	Paramyxoviridae, Doppelstrang-RNA	IPS-1-abhängig NF-κB und IRFs	(Kato et al. 2008; Schlee et al. 2009)
MDA5	Picornaviridae, Doppelstrang-RNA	IPS-1-abhängig NF-κB und IRFs	
NOD-like-Rezeptoren			(Akira et al. 2006)
NOD2	Muramyl-Dipeptid	RIP2-abhängig NF-κB	(Ogura et al. 2001; Martinon et al. 2009)
NALP3	Harnsäure, Silica, Asbest, Hemozoin, Zymosan, C. albicans, Influenza Virus, L. monocytogenes, S. aureus	Inflammasom	
IPAF	Flagellin, Salmonella typhimurium, Legionella pneumophila, Shigella flexneri	Inflammasom	
AIM2	Doppelstrang-DNA	Inflammasom	

C-type-lectin-Rezeptoren			(Geijtenbeek and Gringhuis 2009)
Mincle	SAP130 nuclear protein, Malassezia species, trehalose dimycolate	Syk-abhängig	(Yamasaki et al. 2008; Ishikawa et al. 2009; Sancho et al. 2009; Yamasaki et al. 2009)
Clec9a/DNGR-1	Nekrotische Zellen	Syk-abhängig	

Im Rahmen der CED scheinen vor allem der in Monozyten und Makrophagen exprimierte NOD2-Rezeptor (Ogura et al. 2001) und die in Epithel-, mesenchymalen und Immunzellen exprimierte TLR-Familie eine entscheidende Rolle zu spielen. Die im Vordergrund stehende Aktivierung des NF-κB führt dabei unter anderem zu einer Aktivierung des Immunsystems und einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine. So ist es offensichtlich, dass eine Fehlregulation auf dieser Ebene zu einer überschießenden Immunantwort führen kann (Fukata et al. 2009). Im Jahre 2001 wurden als erstes Suszeptibilitätsgen für M. Crohn drei unterschiedliche Mutationen des NOD2-Rezeptors beschrieben (Hugot et al. 2001; Ogura et al. 2001). Bei Stimulation dieser Varianten mit Muramyl-Dipeptid kam es zu einer Verringerung der NF-κB Aktivierung und somit auch der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (van Heel et al. 2005). Ebenso war die vom Epithel sezernierte Defensinkonzentration im terminalen Ileum verringert (Wehkamp et al. 2008). Gleichzeitig konnte allerdings eine vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit TLR2-Liganden verzeichnet werden (Netea et al. 2004), was die überschießende Entzündungsreaktion bei Trägern dieser Mutation erklären könnte. Obwohl die größere Gruppe der TLRs bereits besser erforscht ist, wurden bisher lediglich Polymorphismen im TLR4 mit einem erhöhten Risiko für CED in Verbindung gebracht (Franchimont et al. 2004; Torok et al. 2004). Jedoch zeigt ein unterschiedliches Expressionsmuster einer Vielzahl von TLRs im entzündeten Gewebe ihren pathogenetisch relevanten Stellenwert im

Rahmen chronisch entzündlicher Erkrankungen. So ist die Expression des TLR2 und des TLR4 in Bereichen einer floriden Entzündung hoch reguliert, während die des TLR3 erniedrigt ist (Cario and Podolsky 2000; Szebeni et al. 2008). Ferner wurde gezeigt, dass es in Mäusen mit einer künstlich induzierten Kolitis oder Ileitis zu einer signifikanten Änderung des von der Darmflora sezernierten PAMP-Profils kommt (Erridge et al. 2010).

Antigenpräsentierende-Zellen (APCs) des GI-Traktes sind so permanent einer Vielzahl dieser luminalen Antigene ausgesetzt. In Folge dessen kommt es zu einer Interaktion der APCs mit naiven CD4-positiven T-Lymphozyten in den Peyer'schen Plaques und den mesenterialen Lymphknoten. Abhängig vom präsentierten Antigen und dem umgebenden Zytokinmilieu differenzieren diese dann zu Th1-, Th2-, Th17- oder Treg-Lymphozyten, die wiederum ihr jeweils charakteristisches Zytokinprofil ausschütten und somit unterschiedliche Effekte auf das Immunsystem auswirken. Physiologischerweise steht hierbei das proinflammatorische Zytokinmuster der Th-Zellen in Balance mit der antiinflammatorischen Wirkung der regulierenden Treg-Zellen.

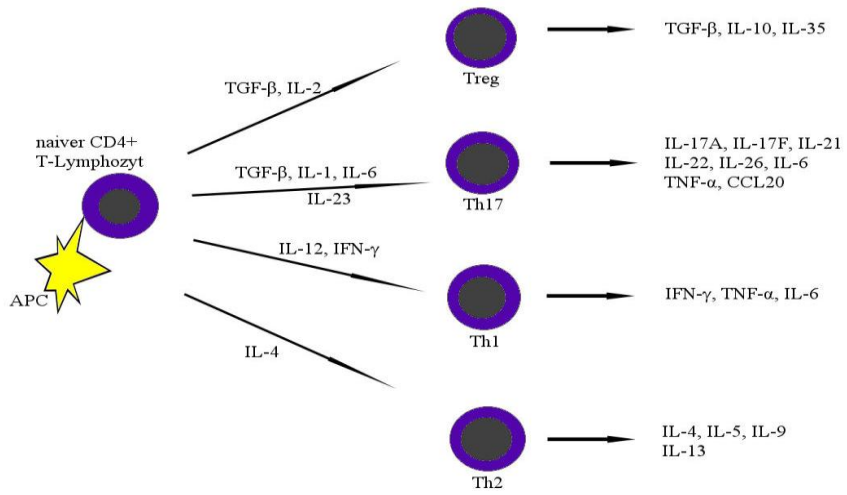


Abbildung 1-1: Die T-Zell Differenzierung und seine Zytokine (Abraham and Cho 2009; Brand 2009)

In Patienten mit CED jedoch zeigten bereits mehrere Studien ein Ungleichgewicht dieses Zytokinmusters zugunsten der proinflammatorischen Seite, die mit einer Akkumulation reaktiver T-Lymphozyten im entzündeten Gewebe durch erniedrigte Apoptoserate und erhöhte Migration aus der Blutbahn (Van Assche and Rutgeerts 2005; Sturm et al. 2008) einher ging. So konnte bei Patienten mit Morbus Crohn eine IL-12 getriggerte Th1-dominierende Immunreaktion mit verstärkter Produktion von TNF-α und IFN-γ sowie bei Patienten mit Colitis ulcerosa eine Th2-Dominanz mit erhöhter Synthese von IL-5 und IL-13 nachgewiesen werden (MacDonald et al. 1990; Fuss et al. 1996; Pallone and Monteleone 1998; Fuss et al. 2004). Eine entscheidende Rolle der neu entdeckten IL-23 induzierten Th17-Antwort, die sich durch stark proinflammatorische Zytokine und Chemokine auszeichnet, konnte in den letzten Jahren nicht nur für die CED gezeigt werden (Leung et al. 2010). Während eine IL-17 Produktion im Darm gesunder Patienten nicht nachweisbar ist, sind stark erhöhte Werte bei M. Crohn-Patienten, unabhängig vom Schweregrad, und etwas weniger stark erhöhte Werte bei Colitis ulcerosa-Patienten mit moderatem bis schwerem Krankheitsverlauf zu verzeichnen (Fujino et al. 2003; Nielsen et al. 2003). Andere Th17-vermittelte Zytokine wie IL-22, IL-26 und CCL20 zeigten ebenfalls bei M. Crohn-Patienten eine erhöhte Expression (Brand et al. 2006; Seiderer et al. 2008; Dambacher et al. 2009). Dabei scheinen die Th17- und Treg-Zellen im Zusammenspiel den wichtigsten Baustein in der intestinalen Immunhomeostase zu bilden. Beide Zelllinien benötigen für ihre Differenzierung die Anwesenheit von TGF-β. In Abhängigkeit der zusätzlich vorhandenen proinflammatorischen Zytokine entstehen bei Anwesenheit von IL-23 oder IL-6 beispielsweise aus über NOD2- oder TLR2-aktivierten APCs Th17-Zellen, bei dessen Abwesenheit jedoch Treg-Zellen (van Beelen et al. 2007; Gerosa et al. 2008). Letztere wirken mit ihren antiinflammatorischen Zytokinen IL-10 und TGF-β einer Entzündung entgegen und sind maßgeblich an der Toleranz gegenüber apathogenen Antigenen als auch Autoantigenen beteiligt (Workman et al. 2009). Eine Dysbalance auf dieser Ebene kann logischerweise zu einer überschießenden Immunreaktion wie bei den CED führen. Unterstrichen

wird dieser enge Zusammenhang durch die hohe Anzahl der entdeckten, entweder direkt an der Th17-Differenzierung beteiligten (IL23R, IL12B, STAT3, JAK2, CCR6, TNFSF15) oder die Th17-Zellen beeinflussenden (NOD2, TLR4, ATG16L1, IRGM, PTGER4, SLC22A4/5) Suszeptibilitätsgene für CED (Anderson et al. 2009; Brand 2009).

Die oben erwähnte, nicht 100%ige Konkordanz für CED bei monozygoten Zwillingen wie auch die steigenden Inzidenzraten mancher geographischer Regionen, beweisen jedoch, dass die Genetik allein zur pathogenetischen Erklärung der CED nicht ausreicht. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass in genetisch prädisponierten Patienten zusätzlich einwirkende Umweltfaktoren die Dysregulation des Immunsystems auslösen. Eine Vielzahl solcher exogener Risikofaktoren wurde bereits identifiziert, jedoch scheint die Reproduzierbarkeit in klinisch signifikanten Studien für die meisten schwer zu fallen. Ein Grund hierfür könnte in der Bandbreite der möglichen krankheitsauslösenden Mutationen liegen, die jeweils unterschiedlich auf exogene Faktoren reagieren.

Zu den wichtigsten und bisweilen am besten belegtesten Umweltfaktoren zählt die individuelle Darmflora, die physiologischerweise - wie oben auch beschrieben - mit dem intestinalen Immunsystem reagiert, dieses stimuliert und moduliert (Sartor 2008; Round and Mazmanian 2009). So zeigten diverse genetisch veränderte Maus-Modelle für CED keinen Krankheitsausbruch nach keimfreier Hygienesanierung (Taurog et al. 1994; Sellon et al. 1998) sowie nach unspezifischer Aktivierung von T-Lymphozyten, jedoch schon nach spezifischer Aktivierung mit bakteriellen Antigenen (Cong et al. 1998; Iqbal et al. 2002). Weitere Belege für dessen Stellenwert demonstrieren der teilweise erfolgreiche Einsatz von Antibiotika und der noch kontrovers diskutierte Einsatz von Probiotika in der Therapie der CED (Gionchetti et al. 2003; Sartor 2004; Thukral et al. 2005; Rioux and Fedorak 2006). Die interindividuell stark unterschiedliche Zusammensetzung der kommensalen Flora wird in einem hohen Maß von dem der Mutter bestimmt und

durch genetische und exogene Faktoren moduliert (Turnbaugh et al. 2009). Genetische Faktoren betreffen hier unter anderen die intestinalen Epithelzellen, die zum Beispiel im Rahmen einer NOD2-Mutation weniger antibakteriell wirksame Defensine sezernieren (Wehkamp et al. 2008) oder auf Grund ihrer Oberflächenmoleküle eine Kolonisation bestimmter Bakterienarten bevorzugen (Sonnenburg et al. 2005; Barnich et al. 2007), aber auch das intestinale Immunsystem. Exogene Faktoren beinhalten in diesem Sinne vor allem die Diät, die hygienischen Lebensumstände und den Einsatz von Antibiotika. In Patienten mit CED wird von einer Dysbiose, also eines gestörten Gleichgewichts zwischen potentiell schädlichen und protektiven Bakterien ausgegangen (De Hertogh et al. 2008). Zudem belegen mehrere Studien, dass sich die bakterielle Flora im Vergleich zu Gesunden in einer Verringerung der physiologischen Kommensalier der Gattung Firmicutes und Bacteroides unterscheidet und dass die Zahl der an der Mukosa anhaftenden Bakterien in Patienten mit CED erhöht ist (Swidsinski et al. 2002; Frank et al. 2007). Ob diese Dysbiose mit Ursache oder nur Ergebnis der intestinalen Entzündung darstellt, ist noch unklar.

Weitere Risikofaktoren sind in einem verringerten, intestinalen Kontakt zu pathogenen, aber auch apathogenen Organismen in der frühen Kindheit durch verbesserte Lebensumstände und den frühen Einsatz von Antibiotika zu sehen, wodurch es zu einer inadäquaten Reaktion des Immunsystems auf neue Antigene im späteren Leben kommen kann (Gent et al. 1994; Hildebrand et al. 2008). Ernährungsfaktoren werden weiterhin kontrovers diskutiert. So scheint ein hoher Konsum an ballaststoffreichem Obst und Gemüse protektiv, ein hoher Anteil an raffiniertem Zucker und ungesättigten Fettsäuren schädlich zu wirken. Jedoch ist dieser Zusammenhang unklar und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gering (Sakamoto et al. 2005). Paradoxer Weise erhöht das Rauchen das Risiko, einen Morbus Crohn zu entwickeln, scheint aber eher protektiv in Bezug auf die Colitis ulcerosa zu sein (Calkins 1989). Als letzte potentiell krankheitsauslösende Risikofaktoren einer CED sind noch die Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika, die die

Barrierefunktion des Epithels schädigen können und die Einnahme von oralen Kontrazeptiva, die sowohl die Mikrozirkulation als auch das Immunsystem beeinflussen können, zu nennen (Felder et al. 2000; Cutolo et al. 2006; Cornish et al. 2008).

Eine Zusammenschau der komplexen Ätiologie bietet nachfolgende Abbildung.

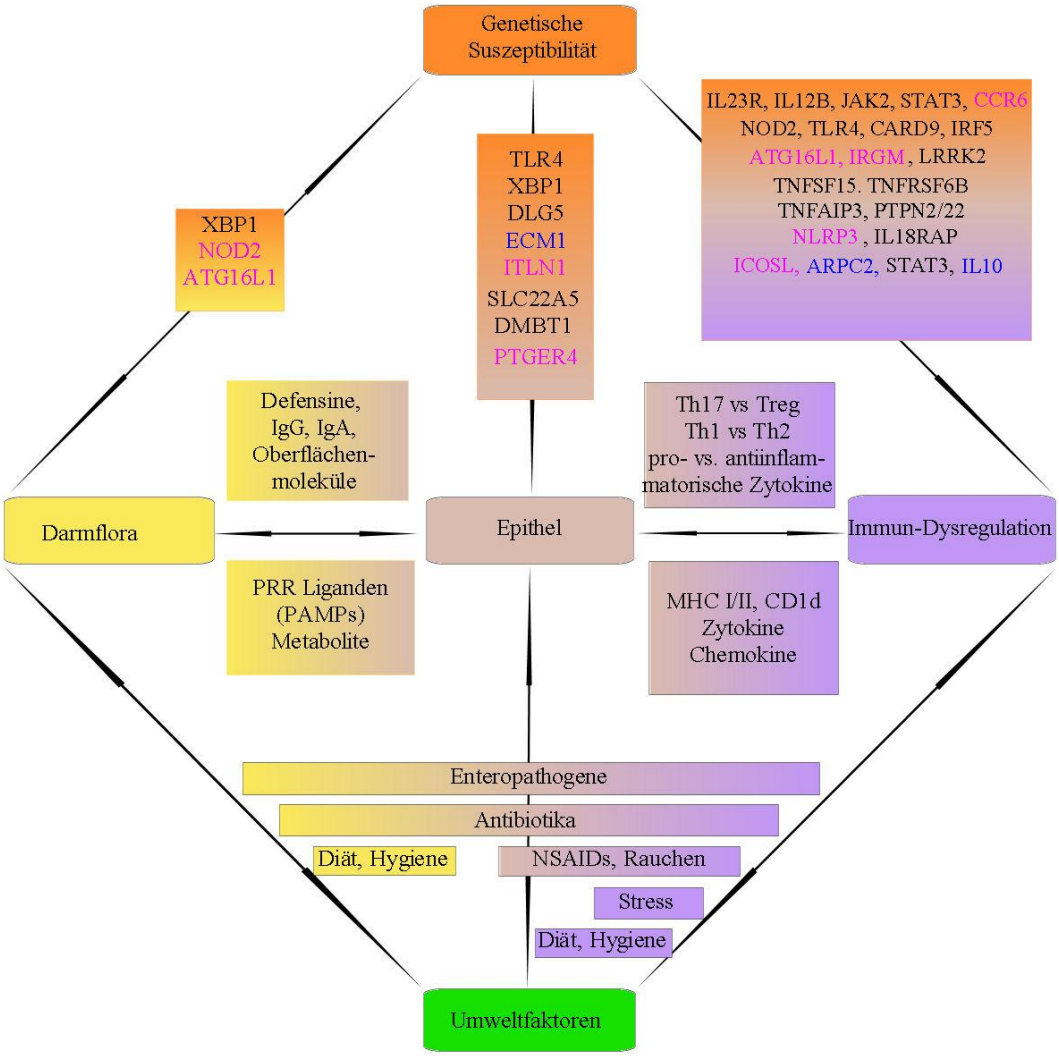


Abbildung 1-2: CED als multifaktorielles Model in Anlehnung an (Kaser et al. 2010) Genetische Polymorphismen spezifisch für Morbus Crohn sind magenta, für Colitis ulcerosa blau und für beide Erkrankungen schwarz dargestellt.

1.1.3 Klinik und Diagnostik

Bei der Colitis ulcerosa handelt es sich um eine, meist auf die Mukosa und oberflächliche Submukosa des Kolons beschränkte Entzündung, die mit Schleimhautödemen, Ulzerationen, Kryptenabszessen und reduzierter Kryptenanzahl einher geht. Beginnend am Rektum erfolgt eine kontinuierliche Ausbreitung, wodurch sich aus einer, auf das Rektum und Sigmoid beschränkten Proktitis (40-50% der Fälle) eine linksseitige Kolitis (30-40%) und anschließend eine Pankolitis (ca. 20%) entwickeln kann (Göke et al. 2007). Nur in seltenen Fällen tritt dann im Rahmen der sogenannten backwash-Ileitis eine Mitbeteiligung des terminalen Ileums in Erscheinung. Durch den entzündlich bedingten Barriereverlust des Darmepithels kommt es bei der Colitis ulcerosa vornehmlich zu blutig, schleimigen Durchfällen, oftmals begleitet von krampfartigen Bauchschmerzen. In schweren Fällen können systemische Symptome wie Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Fieber und Anämie hinzutreten. Die Erkrankung verläuft in bis zu mehrere Monate dauernden Schüben. In Remission kann die Mukosa normal erscheinen, jedoch ist bei langjährigem Verlauf mit einem atrophischen, verkürzten und verengten Kolon zu rechnen (Fahrradschlauch-Phänomen). Als wichtigste Komplikation ist das toxische Megakolon zu nennen, das bei fulminanter Erkrankung auftreten und zu einer Perforation führen kann.

Im Gegensatz dazu handelt es sich beim Morbus Crohn um eine transmurale Entzündung, gekennzeichnet durch eine Infiltration und Verdickung der gesamten Darmwand. Aphtöse teilweise konfluierende Ulzerationen, die zu einem sogenannten Pflasterstein-Relief führen können sowie nicht verkäsende Epitheloidzellgranulome, Abszesse und Lymphödeme sind die Folge. Charakteristisch ist hierbei ein diskontinuierlicher, segmentaler Befall der den gesamten GI-Trakt betreffen kann (skip-lesions). Diesbezüglich ist vor allem der Dünndarm (30-40% der Fälle), insbesondere die zur Erstbeschreibung führende Ileitis terminalis zu erwähnen. In 15 – 25% der Fälle kommt es zum alleinigen Befall des Kolons und in 40 – 55% der Fälle zu einer Ileo-Kolitis Crohn (Göke et al. 2007). Die verur-

sachten Beschwerden sind von der Lokalisation und dem Ausmaß der Erkrankung abhängig und beinhalten meist nicht blutige Durchfälle, Bauchschmerzen, Fieber, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit und eine tastbare Resistenz im Abdomen. Auch hier verläuft die Erkrankung in rezidivierenden Schüben. Die Liste der klinischen Symptome wird durch die der möglichen Komplikationen erheblich erweitert. Neben Abszessen, können aus entzündlichen Darmwandverdickungen narbige Stenose und aus tiefen Ulzerationen Fistelgänge über Mikroperforationen entstehen. Ebenso ist eine entzündlich bedingte Resorptionsstörung, die zu einem möglichen Malabsorptionssyndrom führen kann, zu erwähnen. In diesem Zusammenhang entsteht neben dem Mangel an Vitaminen und Spurenelementen auch ein Gallensäureverlust, was unter anderem zu einer zusätzlichen chologenen Diarrhoe, aber auch infolge eines Vitamin-B12-Mangels zu einer megaloblastären Anämie führen kann.

Extraintestinale Manifestationen wie Arthritiden, Augenbeteiligungen (Iridozyklitis, Episkleritis), Hauterscheinungen (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum) und Perikarditiden finden sich in beiden Hauptformen der CED. Auch gibt es eine starke Assoziation zu HLA-B27-positiver ankylosierender Spondylarthritis und der primär sklerosierenden Cholangitis. Prinzipiell können alle Organsysteme befallen werden. Sind beim Morbus Crohn Symptome wie orale Läsionen, Gallensteine, Pankreatitis, Nephrolithiasis und Amyloidose häufiger zu beobachten, scheinen Haut- und Augenbeteiligungen bei beiden gleich oft vorzukommen (Rothfuss et al. 2006). Ebenfalls beide Krankheitsbilder betreffend ist das erhöhte, karzinomatöse Entartungsrisiko, weshalb jährliche Endoskopiekontrollen empfohlen werden (Zisman and Rubin 2008).

Bestätigt wird der klinische Verdacht auf eine CED mit Hilfe diagnostischer Maßnahmen, insbesondere der Endoskopie mit histopathologischer Auswertung entnommener Biopsien. Malignome, Infektionen und andere Erkrankungen müssen ausgeschlossen, Komplikationen frühzeitig entdeckt werden. Hierzu bedient man

sich unter anderen laborchemischen Untersuchungen und der weiterführenden Bildgebung wie Sonographie, Röntgenkontrastdarstellungen, Computer- und Kernspintomographie (Dassopoulos 2001). Ist eine eindeutige Diagnose zu stellen, kann anhand der Lokalisation beziehungsweise Ausdehnung sowie dem Verhalten der Erkrankung und des Alters bei Erstdiagnose eine Einteilung anhand der international anerkannten Montreal-Klassifikation erfolgen (Silverberg et al. 2005). Die in dieser Studie verwendete Einteilung ist an diese Klassifikation angelehnt und in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 1-4: Einteilung der CED in Anlehnung an (Silverberg et al. 2005)

Morbus Crohn		**Colitis ulcerosa**	
Alter bei Erstdiagnose (A)			
A1	≤ 16 Jahre		
A2	17 – 40 Jahre		
A3	> 40 Jahre		
Lokalisation (L)		**Ausdehnung (Extent; E)**	
L1	Terminales Ileum	E1	Ulzerative Proktitis
L2	Kolon	E2	Linksseitige Kolitis (bis linke Flexur)
L3	Ileokolon	E3	Pankolitis
L4	Oberer GI-Trakt (definiert als proximal des terminalen Ileum)		
Verhalten (Behavior; B)			
B1	Entzündlich, nicht-stenosierend, nicht penetrierend		
B2	Stenosierend		
B3	Penetrierend, Fistulierend		

In diesem Rahmen sei erwähnt, dass ein Befall des oberen GI-Traktes (L4) mit den anderen Lokalisationen frei kombinierbar ist (z.B. L2 + L4) und ein penetrierender Phänotyp des Morbus Crohn der gleichzeitig Stenosen aufweist ebenfalls als B3 klassifiziert wird.

1.2 Cannabis in der Medizin

1.2.1 Allgemeines und Geschichte

Erste Beschreibungen über die Anwendung von Cannabis als Nutz-, Heil- und Rauschmittel gehen zurück auf den chinesischen Kaiser Shen-Nung im Jahre 2737 v. Chr. (Grinspoon 1999). Von dort aus fand es schnell seine Ausbreitung nach Indien, wo seine sedative, anxiolytische und relaxierende Wirkung nicht nur zu traditionellen Festen geschätzt wurde. Auch in der klassischen indischen Medizin wurde es sowohl beim Alkohol- und Opiumentzug als auch zur Analgesie, Appetitanregung, Entzündungshemmung und wegen seiner antibakteriellen sowie antikonvulsiven Wirkung und zur Linderung einer Diarrhoe verwendet (Kalant 2001). Seither erfolgt die Ausbreitung nahezu weltweit. Den Weg nach Europa fand es vermutlich durch die Ägyptische Expedition Napoleons im Jahre 1798 (Bouquet 1912). Der zunehmende Missbrauch als Droge führte zu Verboten, so auch 1929 in Deutschland durch das Opiumgesetz, welches Cannabis mit Opium gleichsetzte und den freien Erwerb untersagte. Der Anbau, Besitz und die Weitergabe der Pflanze oder von Pflanzenteilen wurde schließlich 1971 durch das Betäubungsmittelgesetz in Deutschland unter Strafe gestellt.

Erst in den 30er und 40er Jahren des 20. Jahrhunderts gelang die Isolierung der für die psychoaktive Hauptwirkung verantwortlichen Tetrahydrocannabinole (THC) (Todd 1940; Adams et al. 1941). Eine genaue Strukturanalyse und die Synthese der Hauptkomponenten gelang aufgrund des flüchtigen Charakters vieler Inhaltsstoffe erst ab den 60er Jahren (Mechoulam and Gaoni 1965; Mechoulam et al. 1972). Besonders hervorzuheben sind hier die psychoaktiv wirksamen Δ^8-THC, Δ^9-THC und Cannabinol sowie das weniger psychoaktive Cannabidiol. Strukturell handelt es sich hierbei um Terpenphenole. Inzwischen sind mehr als 60 solcher natürlichen Cannabinoide sowie diverse weitere Inhaltsstoffe der Hanfpflanze, darunter Flavonoide und Terpene, bekannt, jedoch in Ihrer medizinischen Wirkung noch wenig untersucht (Mechoulam 1970; Mechoulam 2005).

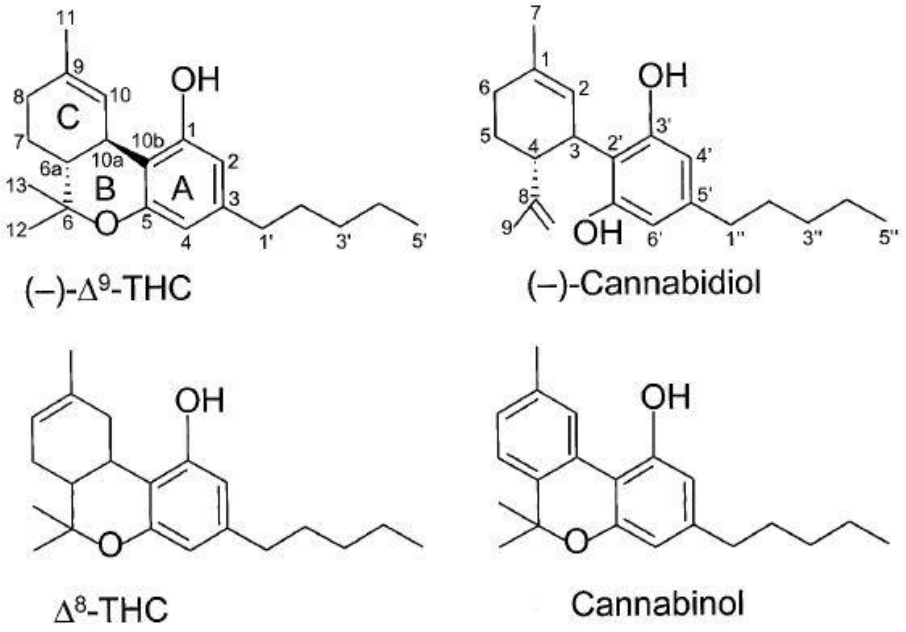


Abbildung 1-3: Strukturformeln wichtiger natürlicher Cannabinoide (Howlett et al. 2002)

Schwierigkeiten in der Herstellung vergleichbar wirkender Tinkturen, die Entdeckung und Weiterentwicklung spezifischer wirkender Medikamente wie Aspirin, Opiate, Babiturate und Chloralhydrat sowie nicht zuletzt die rechtliche Situation verdrängten Anfang des 20. Jahrhunderts allmählich das Cannabis aus seiner klinischen Anwendung. Eine „Renaissance“ hingegen erlebt die Cannabisforschung seit den frühen 90er Jahren, als die Strukturanalyse der Cannabinoide letztendlich auch zur Entdeckung spezifischer Cannabinoid-Rezeptoren, gefolgt von endogenen Liganden und damit des Endocannabinoidsystems, führte (Martin et al. 1999). Die Herstellung synthetischer Analoga sowie Rezeptor-Agonisten und Antagonisten bereitete sowohl der Forschung als auch der klinischen Anwendung neue Möglichkeiten. Heutzutage finden Cannabis bzw. Cannabinoid-Analoga wie Dronabinol und Nabilon vor allem Anwendung in der Behandlung von Übelkeit, Erbrechen oder Appetitlosigkeit bei Krebs- und AIDS-Patienten (Gorter 1991; Machado Rocha et al. 2008). Ebenfalls erfolgsversprechend scheint ein Einsatz zur Analgesie (Hosking and Zajicek 2008), zur Senkung des intraokulären Drucks bei Glaukom Patienten (Green 1998) sowie zur Reduktion einer Spastizität, Ataxie

und muskulären Schwäche assoziiert mit Multipler Sklerose oder anderweitigen Lähmungen zu sein (Rog 2010). Speziell hinsichtlich gastrointestinaler Erkrankungen wie Infektionen, akute und chronische Entzündungen oder Reizdarmsyndrome möchte man sich die antiinflammatorische, analgetische sowie Motilität und Sekretion beeinflussenden Eigenschaften der (Endo-)Cannabinoide zu Nutze machen (Izzo and Coutts 2005). Gegenstand intensiver Forschung wird es sein, Präparate herzustellen oder aus der Natur zu beziehen, die mit möglichst wenigen, vor allem zentralen Nebenwirkungen, die gewünschten Cannabinoid-Wirkungen entfalten, und dessen Erfolg zu prüfen. Erste Ansätze sind hier mit nicht-psychoaktiven Cannabinoiden und mit Hilfe von Präparaten, die die Konzentration endogener Cannabinoid-Liganden beeinflussen, bereits geschehen. Erfolgreiche Beispiele für solche Substanzen sind das Cannabidiol und weitere natürliche nicht psychoaktive Cannabinoide (Mechoulam 2005), das synthetische ajulemic acid (Burstein et al. 2004) oder das KDS-4103, das als sogenannter FAAH-Inhibitor ein Schlüsselenzym des Endocannabinoidabbaus blockiert und somit die Konzentration dieser erhöht (Piomelli et al. 2006).

1.2.2 Das Endocannabinoidsystem

Zwischen der exakten Strukturanalyse des für die psychotrope Hauptwirkung der Cannabispflanze verantwortlichen Δ^9-THC (Mechoulam and Gaoni 1965) und der Entdeckung des ersten THC-spezifischen Rezeptors im Gehirn von Ratten, genannt Cannabinoid-Rezeptor-Type-1 (CB1-Rezeptor), sind mehr als 20 Jahre vergangen (Devane et al. 1988). Bald darauf konnte noch ein zweiter, peripherer Cannabinoid-Rezeptor, der CB2-Rezeptor, mit einer erhöhten Expression vor allem auf Zellen des Immunsystems identifiziert werden (Munro et al. 1993). Die Klonierung und damit die Analyse der Strukturen dieser Rezeptoren führte zur Identifikation spezifischer endogener Liganden, der sogenannten Endocannabinoide. Allen voran seien hier die zwei Hauptvertreter, das N-arachidonoyl-Ethanolamid, genannt Anandamid, und das 2-arachidonoyl-Glycerol (2-AG) erwähnt, die hohe Affinitäten zu beiden Cannabinoid-Rezeptoren aufweisen

(Devane et al. 1992; Mechoulam et al. 1995; Sugiura et al. 1995). Andere bisher weniger genau untersuchte und in ihrer physiologischen Bedeutung noch nicht ausreichend geklärte Endocannabinoide sind der N-arachidonoyl-glyceryl-Ether (Noladin-Ether) (Hanus et al. 2001), das N-arachidonoyl-Dopamin (NADA) (Bisogno et al. 2000; Huang et al. 2002) und das Virodhamin (Porter et al. 2002).

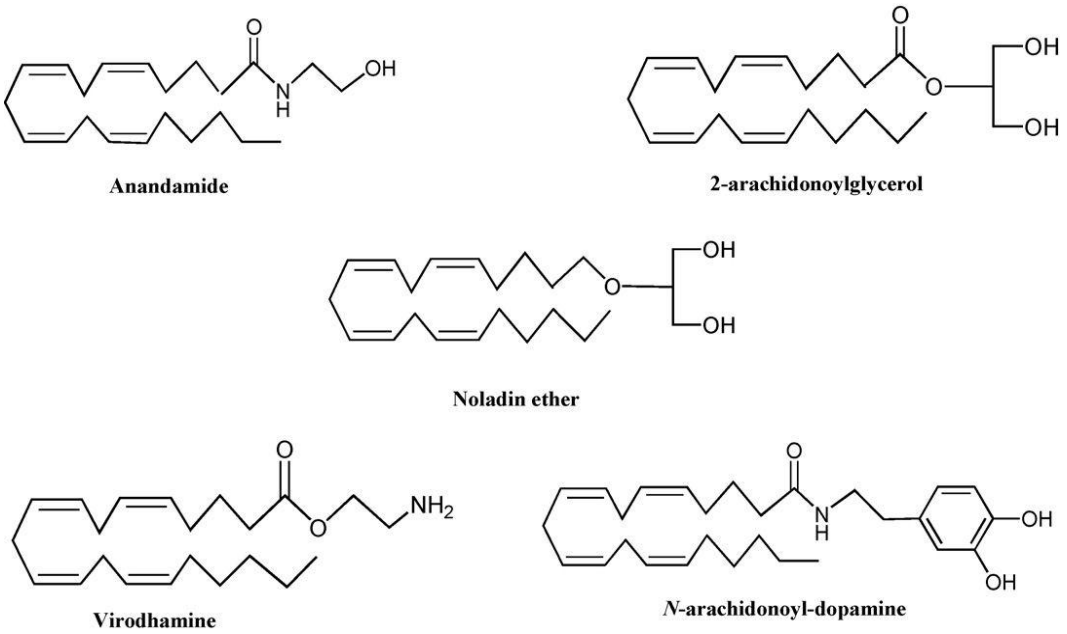


Abbildung 1-4: Strukturformeln der Endocannabinoide (Di Marzo 2009)

Endocannabinoide liegen ungleich anderen Neurotransmittern nicht gespeichert in Vesikeln vor, sondern werden bei Bedarf als Lipid-Mediatoren aus Vorstufen in der Zellwand synthetisiert (Piomelli et al. 2000; Di Marzo 2008). Als erster Schritt in der Synthese des Anandamids wird N-arachidonoyl-Phosphatidylethanolamin (NAPE) aus Arachidonsäure und Phosphatidylethanolamin mit Hilfe einer Calcium-abhängigen Acyltransferase gebildet. Die darauf folgende Hydrolyse zu Anandamid wird katalysiert von der NAPE-Phospholipase D (NAPE-PLD) (Di Marzo et al. 1994; Cadas et al. 1997). Andere Synthesewege müssen jedoch zusätzlich eine Rolle spielen, da NAPE-PLD knockout Mäuse normale Anandamid-Spiegel aufweisen (Leung et al. 2006). Als Vorstufe für 2-AG dienen

Diacylglycerole (DAGs) vornehmlich aus der, durch die Phospholipase C katalysierten Hydrolyse von Phosphatidylinositol, mit Arachidonsäure an zweiter Position (Di Marzo et al. 1996; Bisogno et al. 1997). Daraufhin erfolgt die Konversion zu 2-AG mit Hilfe der sn1-selektiven DAG-Lipasen-α und -β (Bisogno et al. 2003). Schlüsselenzyme in der Inaktivierung der Endocannabinoide sind die Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) für Anandamid und 2-AG oder die Monoacylglycerol Lipase (MAGL) für 2-AG (Cravatt et al. 1996; Karlsson et al. 1997; Dinh et al. 2002). Zusätzlich scheinen selektive Transporter, die eine aktive Aufnahme in die Zelle bewerkstelligen, eine Rolle zu spielen. Eine Klonierung dieser Transporter ist zwar noch nicht gelungen, jedoch konnten mehrere Studien Hinweise auf die Existenz eines Anandamid Membran Transporters geben (Di Marzo et al. 1994; Beltramo et al. 1997; Maccarrone et al. 1998; Fowler and Jacobsson 2002). So wurden Substanzen entwickelt, die die Aufnahme von Anandamid, aber nicht seinen enzymatischen Abbau hemmen und so seine intrazelluläre Konzentration senken (Ortar et al. 2003; Fegley et al. 2004). Auch für andere Endocannabinoide geht man von ähnlichen Transportmechanismen aus. Allerdings konnten diese noch nicht durch eindeutige Versuche belegt werden (Huang et al. 2001; Fezza et al. 2002; Wilson and Nicoll 2002).

Beide Cannabinoid-Rezeptoren sind $G_{i/o}$-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus der Rhodopsin Familie, gekennzeichnet durch sieben hydrophobe, helikale Transmembrandomänen und jeweils drei intra- und extrazelluläre Schleifen. Durch Bindung eines Liganden am Rezeptor kommt es zur Aktivierung und Dissoziation der α-Untereinheit des G-Proteins, welches wiederum die Adenylatcyclase inhibiert und die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) stimuliert und dadurch das Signal nach intrazellulär weiterleitet (Howlett 2005). Des Weiteren scheint es zu einer erhöhten NO-Freigabe und darauf folgender cGMP Bildung zu kommen (Stefano et al. 2003; Sergeeva et al. 2007; Jones et al. 2008). Andere Rezeptorspezifische Signale sind die Blockade spannungsabhängiger Calciumkanäle und die Stimulation von Kaliumkanälen für CB1-Rezeptoren sowie erhöhte

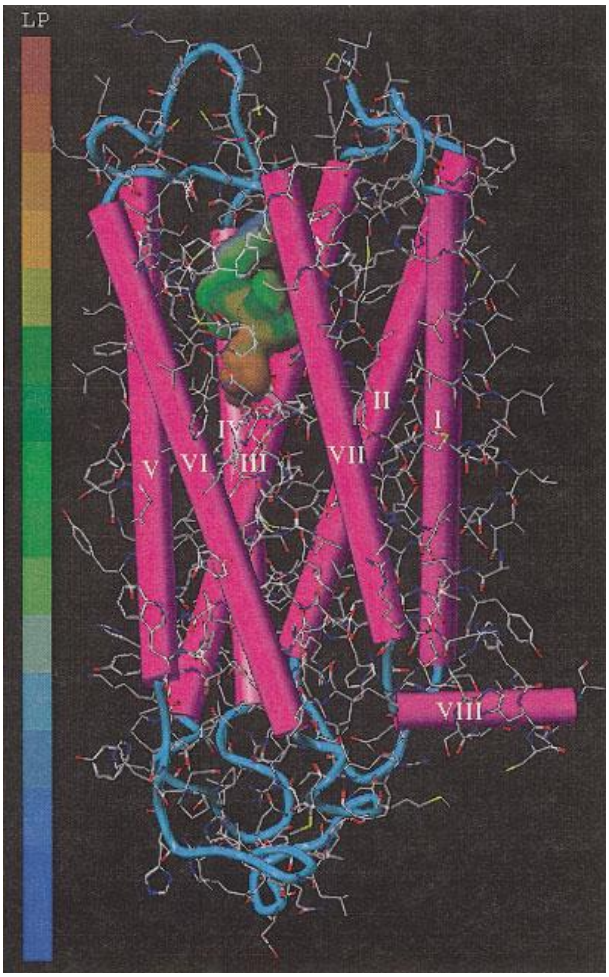
Ceramidkonzentrationen für CB2-Rezeptoren (Twitchell et al. 1997; Gebremedhin et al. 1999; Howlett 2005). Neben diesen Rezeptoren scheinen noch weitere nicht-CB1- nicht-CB2-Rezeptoren von Relevanz im Endocannabinoidsystem zu sein. Am Besten etabliert ist hierbei der TRPV1-Rezeptor (transient receptor potential vanilloid type 1), ein unselektiver Kationenkanal, der durch schädliche Hitzeeinwirkung (>42°C), niedrigem pH (<6,0), Capsaicin, aber auch Anandamid und NADA, jedoch nicht durch 2-AG, aktiviert wird (Zygmunt et al. 1999; Starowicz et al. 2007). Die genaue Pharmakologie ist komplex und vermutlicherweise vom Grad der Rezeptordichte abhängig. Bei hohen Rezeptordichten soll Anandamid dabei als reiner, bei niedrigeren als partieller Agonist wirken (Ross 2003). Zudem führt Anandamid über bisher ungeklärte Mechanismen zu einer Aktivitätsänderung dieses Rezeptors. Ferner scheinen die „orphan“ G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren GPR55 und GPR119 eine Rolle zu spielen, müssen in ihrer Bedeutung jedoch noch genauer untersucht werden (Godlewski et al. 2009).

Werden CB1-Rezeptoren hauptsächlich im zentralen und peripheren Nervensystem und CB2-Rezeptoren überwiegend auf Zellen des Immunsystems exprimiert, so handelt es sich hierbei jedoch nicht um eine strikte Verteilung. Hatte man zunächst den CB1-Rezeptor überwiegend im Gehirn, vor allem in den Basalganglien, dem Hippocampus, dem Kleinhirn und dem limbischen Kortex nachgewiesen (Herkenham et al. 1991; Glass et al. 1997), ist ebenfalls ein Nachweis unter anderem im Hoden (Gerard et al. 1991), auf sympathischen Nervenendigungen (Ishac et al. 1996) und in der Leber erfolgt (Osei-Hyiaman et al. 2005). Ebenfalls gelang inzwischen der Nachweis von CB2-Rezeptoren sowohl im entzündlich veränderten als auch im nicht-entzündlichen Gehirn (Van Sickle et al. 2005; Ashton and Glass 2007; Onaivi et al. 2008). Somit scheinen beide Rezeptoren die vielzähligen zentralen als auch peripheren Funktionen, wie neuronale Entwicklung, Entzündung, kardiovaskuläre, respiratorische und reproduktive Funktionen, Hormonausschüttung, Knochenbildung und Energiehaushalt, Zellproliferation, -motilität, -adhäsion und -apoptose kontrollieren und modulieren zu können (Guzman et al.

2002; Di Marzo et al. 2004; Pertwee 2005; Pacher et al. 2006). Im GI-Trakt werden CB-Rezeptoren überwiegend im enterischen Nervensystem, hier vor allem im Meißner- und Auerbach-Plexus sowie im lymphatischen Gewebe der Peyer'schen Plaques gefunden (Lynn and Herkenham 1994; Duncan et al. 2005).

Bezogen auf den GI-Trakt nimmt das Endocannabinoidsystem so Einfluss, indem es den Appetit und das Essverhalten steigert (Bellocchio et al. 2008), Übelkeit und Erbrechen lindert (Tramer et al. 2001), die gastrale Säureproduktion reduziert (Adami et al. 2002), den unteren Ösophagussphinkter tonisiert (Beaumont et al. 2009) und die Motilität und Peristaltik (Izzo and Camilleri 2008) sowie Entzündung und Sensibilität dämpft (Di Marzo and Izzo 2006; Sanson et al. 2006).

1.2.3 Der CB2-Rezeptor



Wie bereits erwähnt, handelt es sich beim CB2-Rezeptor um einen G–Protein-gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen und jeweils drei intra- und extrazellulären Schleifen. Eine drei- bzw. zweidimensionale Darstellung dieses Rezeptors zeigen die Abbildungen 1-5 und 1-6.

Abbildung 1-5: 3D-Modell des CB2-Rezeptors. Helices inkl. Transmembrandomänen sind als violette Zylinder, Schleifen als blaue Bänder dargestellt. Rezeptorbindungsstelle als amphipathische Region in der Nähe der Transmembrandomänen III, V und VI inkl. Lipophilitätsskala zu sehen. (Xie et al. 2003)

Bindet ein Ligand am Rezeptor, kommt es zur Dissoziation und Aktivierung des $G_{i/o}$-Proteins mit darauffolgender Inhibierung der Adenylatcyclase und Aktivierung der Mitogen-assoziierten Proteinkinase (Howlett 2005). Die damit einhergehenden Funktionen sowie das Expressionsverhalten dieses Rezeptors im gesunden und kranken Gewebe zeigt nachfolgende Tabelle.

Tabelle 1-5: Expression und Funktionen des CB2-Rezeptors nach (Patel et al. 2010)

	Physiologische Expression	**Funktion im Gesunden**	**Funktion während Verletzung/Erkrankung**
Immunsystem	Alle Leukozyten	Immunsuppressiv T-Zellen: verringert Proliferation und Zytokinproduktion B-Zellen: verstärkt Proliferation und behält unreife Zellen im Knochenmark	Limitiert LPS-induzierte Zytokinproduktion Moduliert Leukozyten Migration
GI-Trakt	Magen: enterische Nervenfasern Darm: enterische Nervenfasern, Epithel	Inhibiert cholinerge und nonadrenerge, noncholinerge Transmission Moduliert Transmitterfreisetzung Dämpft viszerale Sensitivität	Verringert Motilität nach LPS-Gabe Verhindert Kolitis Dämpft viszerale Sensitivität Antiproliferativ in Kolonkarzinom Modellen
Leber	keine	keine	Erhöhte Expression im Kranken Verhindert Fibrose Reduziert Entzündung
Gehirn	Neurone und Microglia	Antiemetisch Aktiviert Neurogenese	Erhöhte Expression im Kranken Reduziert Entzündung Aktiviert Neurogenese

Cardiovaskuläres System	Myokard, Endothel, intimale Makrophagen	Unklar	Schützt vor Ischämie/Reperfusions-Syndrom Schützt vor Atherosklerose Hemmt Zytokinproduktion und Leukozytenmigration Reduziert Makrophagen-Aktivierung
Lunge	Unklar	Antitussiv	Beugt Bronchokonstriktion vor

Des Weiteren soll auf die für die vorliegende Arbeit bedeutenden Funktionen des CB2-Rezeptors auf das Immunsystem und den GI-Trakt eingegangen werden. Wurde der CB2-Rezeptor durch Munro et al. 1993 ursprünglich auf Makrophagen der marginalen Zone der Milz entdeckt (Munro et al. 1993), so ist es naheliegend, dass weiterhin Zellen des Immunsystems als Hauptexpressionsort gelten. Durch die Verwendung selektiver Agonisten und Antagonisten konnte gezeigt werden, dass Leukozyten, allen voran B-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen, eine zehn- bis hundertfach höhere Expression des CB2- im Vergleich zum CB1-Rezeptor besitzen und somit die Effekte der Cannabinoide auf das Immunsystem hauptsächlich CB2-Rezeptor-gesteuert sind (Galiegue et al. 1995). Hierbei stehen die durch die Inhibierung der Adenylatcyclase übermittelten, immunsuppressiven Effekte der Cannabinoide im Vordergrund (Kaminski et al. 1994; Herring et al. 1998). So konnte bewiesen werden, dass eine Aktivierung des CB2-Rezeptors zu einer verringerten Proliferationsrate und Expression von IL-12 in T-Lymphozyten führt (Condie et al. 1996; Yuan et al. 2002) und ebenfalls die induzierte Zytokinausschüttung in B- und T-Lymphozyten sowie Makrophagen blockiert (Pandey et al. 2009). Im Gegensatz dazu steht die durch CB2-Rezeptor-Stimulation nachgewiesene, erhöhte CD40-induzierte Proliferationsrate in B-Lymphozyten (Carayon et al. 1998). Ebenfalls CB2-Rezeptor-abhängig scheint die Regulation der Zellmigration von Neutrophilen, Makrophagen, Natürlichen Killerzellen und B-

Lymphozyten zu sein, wobei in manchen Fällen die Migration inhibiert in anderen induziert wird (Kishimoto et al. 2005; McHugh et al. 2008; Miller and Stella 2008; Pereira et al. 2009).

Im Gastrointestinaltrakt wurde ursprünglich CB2-Rezeptor-mRNA im Ösophagus, Magen und Ileum der Ratte sowie im Ileum des Meerschweinchens beschrieben (Griffin et al. 1997; Storr et al. 2002). Der Nachweis einer Expression gelang zunächst jedoch nicht – wie zu erwarten wäre – in der den Hauptanteil der Immunzellen tragenden Mukosa, sondern vielmehr in Präparationen der longitudinalen Muskulatur mit dem anhängenden Plexus myentericus (Storr et al. 2002). Mit Hilfe spezifischer Antikörper konnte dieser Fund auch beim Menschen bestätigt und der CB2-Rezeptor auf Neurone des myenterischen und submucosalen Plexus nachgewiesen werden (Wright et al. 2008; Marquez et al. 2009). Jedoch ist die Expression dieses Rezeptors keinesfalls auf das enterische Nervensystem beschränkt, sondern ließ sich ebenfalls auf Zellen des Immunsystems in der Mukosa des Menschen nachweisen, wo es zusätzlich zu einer Hochregulation im aktiven Stadium chronisch entzündlicher Darmerkrankungen kam (Wright et al. 2005; Marquez et al. 2009). Inwiefern bzw. wann das Kolonepithel diesen Rezeptor exprimiert, ist noch nicht völlig geklärt. So gelang einer Studie der Nachweis (Marquez et al. 2009), der anderen hingegen nicht (Wright et al. 2005). Jedenfalls konnte eine Expression im chronisch entzündlichen Epithel (Wright et al. 2005; Marquez et al. 2009), in adenomatösen Polypen und in kolorektalen Karzinomen (Ligresti et al. 2003) sowie den humanen, von kolorektalen Karzinomen stammenden, epithelialen Zelllinien HT-29 nachgewiesen werden (Ihenetu et al. 2003; Ligresti et al. 2003). Eine tragende Rolle des CB2-Rezeptors im Rahmen entzündlicher Geschehen im GI-Trakt konnte bereits durch mehrere Studien belegt werden. Neben der oben beschriebenen Hochregulation konnte in einer Reihe chemisch induzierter Kolitiden mit Hilfe selektiver CB2-Rezeptor-Agonisten und Antagonisten sowie CB2-Rezeptor-knock-out Mäusen ein eindeutiger CB2-Rezeptor-spezifischer Benefit im Sinne einer Besserung mikro- und makroskopi-

scher Entzündungszeichen sowie Symptomenmilderung nachgewiesen werden (Kimball et al. 2006; Storr et al. 2009). Ein ähnlicher Effekt konnte für Endocannabinoidabbau-hemmende Substanzen wie den FAAH-Inhibitor URB597 und den Endocannabinoid-Membran-Transporter-Inhibitor VDM11 dargelegt werden (Storr et al. 2008). Zu erwähnen sei hierbei, dass im Gegensatz zu CB1-Rezeptor-knock-out Mäusen die CB2-Rezeptor defizienten Mäuse keine massivere Kolitis im Vergleich zu den Kontrollen bekamen, was die Vermutung nahe legt, dass der CB2-Rezeptor zwar ausreichend, jedoch nicht notwendig ist, um eine Kolitis zu verhindern.

Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass CB2- wie auch CB1-Rezeptor-Agonisten die viszerale Sensitivität im GI-Trakt sowohl im Grundzustand, als auch im Rahmen einer Kolitis induzierten Hypersensitivität entscheidend dämpfen können (Sanson et al. 2006). Weniger eindeutig scheint die Rolle des CB2-Rezeptors hinsichtlich der gastrointestinalen Motilität zu sein. Eindeutige Belege sind bisher lediglich für den Magen von Mäusen und Ratten sowie für die intestinale Motilität im Rahmen einer LPS-induzierten Hypermotilität gelungen und bedürfen noch weiteren Untersuchungen (Storr et al. 2002; Mathison et al. 2004; Mule et al. 2007).

Zahlreiche Polymorphismen des CB2-Rezeptors sind bereits beschrieben worden, wobei es sich bei den meisten um synonyme SNP’s ohne Aminosäureausstausch handelt. Zwei dieser bekannten Polymorphismen gehen jedoch mit einem Austausch einer Aminosäure und damit zumindest teilweiser Funktionsbeeinträchtigung einher. Für die Polymorphismen pQ63R und pH316Y konnte gezeigt werden, dass zwar die Ligandenbindung intakt, jedoch die Signaltransduktion in ihrer Effizienz beeinträchtigt ist (Carrasquer et al. 2010). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit dem von Sipe et al. 2005 nachgewiesenen geringeren immunsuppressiven Effekt der pQ63R-Variante des CB2-Rezeptors und der damit verbundenen Suszeptibilität für autoimmune Erkrankungen wie Multiple Sklerose, rheuma-

toider Arthritis, Lupus erythematodes und Myasthenia gravis. Ebenfalls scheint es eine Korrelation zwischen dem pQ63R Polymorphismus und einer primär biliären Zirrhose zu geben (Floreani et al. 2010).

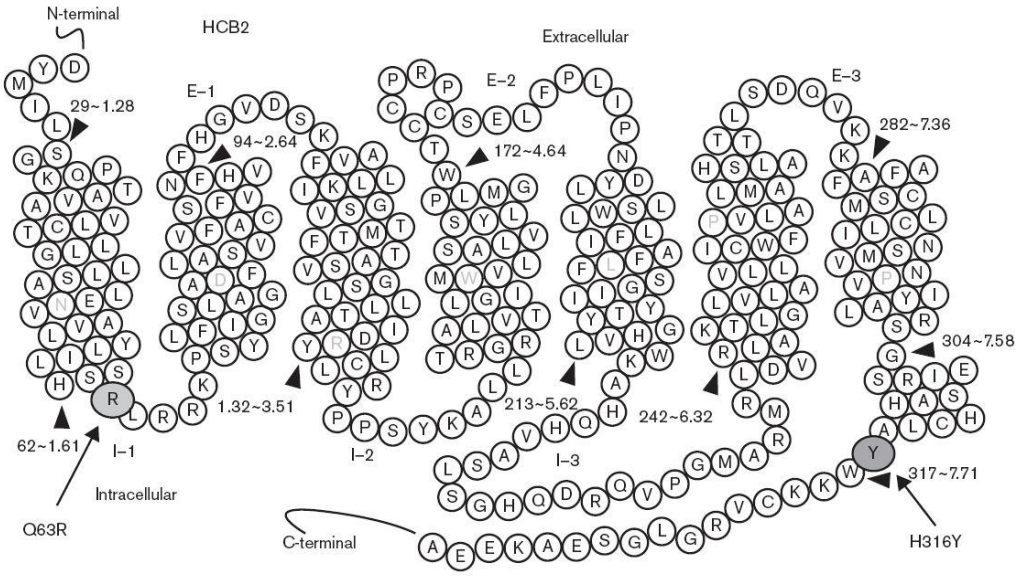


Abbildung 1-6: Der CB2-Rezeptor mitsamt seiner Polymorphismen (Carrasquer et al. 2010). Der Polymorphismus pQ63R befindet sich in der ersten intrazellulären Schleife. Es wird Glutamin (Q) mit Arginin (R) substituiert. Der Polymorphismus pH316Y befindet sich am C-terminalen Schwanz. Es wird Histidin (H) mit Tyrosin (Y) substituiert.

1.3 Fragestellung der Arbeit

Sowohl diese eindeutigen Belege für den Zusammenhang des Endocannabinoidsystems, insbesondere des CB2-Rezeptors mit entzündlichen Geschehen und Hypersensitivität im GI-Trakt als auch der Bezug des pQ63R Polymorphismus des CB2-Rezeptors zu autoimmunen Erkrankungen gaben Anlass folgende Punkte zu untersuchen.

1. Den Einfluss des CB2-Rezeptor-Polymorphismus pQ63R auf die Anfälligkeit und phänotypische Ausprägung einer CED

2. Den Zusammenhang zwischen der CB2-Rezeptor-Genexpression und einer intestinalen Entzündungsreaktion in Zellkulturen und endoskopisch gewonnenen Biopsien.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten- und Kontrollgruppe

Im Rahmen dieser Studie wurden 966 Personen eingeschlossen, von denen 426 an Morbus Crohn und 162 an Colitis ulcerosa erkrankt sind. Dem gegenüber wurde ein Kontrollkollektiv aus 378 gesunden nicht-verwandten Probanden kaukasischen Ursprungs gestellt. Alle an dieser Studie teilnehmenden Personen haben nach ausführlicher Aufklärung schriftlich der wissenschaftlichen Auswertung ihrer Krankenakten und der molekularbiologischen Untersuchung ihres Blutes zugestimmt. Die demographischen Daten der Studienpopulation werden in Tabelle 2-1 dargestellt. Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität München genehmigt.

Die an Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa erkrankten Patienten entstammen ausnahmslos der Ambulanz für chronisch entzündliche Darmerkrankungen der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätskrankenhauses München Großhadern. Die Diagnosen wurden nach anerkannten klinischen Richtlinien anhand endoskopischen, radiologischen und histopathologischen Kriterien gestellt (Dassopoulos 2001). Unklare Fälle einer Colitis indeterminata wurden von der Studie ausgeschlossen. Demographische und klinische Daten entstammen einer groß angelegten Datenbank der CED-Ambulanz des Klinikums Großhadern, dessen Daten retrospektiv aus Patientenakten und Fragebögen durch mehrere unabhängige Untersucher bezogen wurden. Der Schweregrad, die Lokalisation, das Verhalten und das Alter bei Erstdiagnose der Erkrankungen wurden entsprechend der Vienna Klassifikation mit Anlehnung an die neue Montreal Klassifikation bestimmt beziehungsweise anhand dessen eingeteilt (Gasche et al. 2000; Silverberg et al. 2005). Abgesehen davon wurde insbesondere auf die im Rahmen der Erkrankung eingenommenen Medikamente, hier vor allem eventuelle Immunsuppressiva, die Familienanamnese, das Auftreten von Komplikationen oder extrain-

testinalen Manifestationen und operative Eingriffe, die im Zusammenhang mit der Erkrankung standen, Wert gelegt.

Die aus gesunden nicht-verwandten Probanden bestehende Kontrollgruppe stammt aus einer zu Forschungszwecken gebildeten DNA-Bank des Instituts für Klinische Chemie der Universität München. Hieraus konnte mit freundlicher Genehmigung des Instituts randomisiert eine Kontrollgruppe erstellt werden.

Tabelle 2-1: Studienpopulation

	Morbus Crohn *(n = 426)*	**Colitis ulcerosa** *(n = 162)*	**Kontrollen** *(n = 378)*
Geschlecht (n)			
männlich *weiblich*	210 (49,3%) 216 (50,7%)	80 (49,4%) 82 (50,6%)	190 (50,3%) 188 (49,7%)
Alter (Jahre)			
Mean ± SD *Range*	39,7 ± 12,9 10 - 75	43,0 ± 14,5 19 - 85	49,9 ± 19,3 2 - 89
Body mass index (kg/m^2)			
Mean ± SD *Range*	23,1 ± 4,2 13 - 40	24,0 ± 4,2 16 - 41	
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)			
Mean ± SD *Range*	27,7 ± 13,9 13 - 40	31,9 ± 14,9 16 - 41	
Krankheitsdauer (Jahre)			
Mean ± SD *Range*	12,0 ± 8,7 0 - 44	11,0 ± 7,5 1 - 40	
Positive Familienanamnese (n)	50 (11,7%)	21 (13,0 %)	

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung der DNA

Mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits der Firma QIAGEN (Hilden und Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) und dem dazugehörigen Blood and Body Fluid Protocol (siehe Tabelle 2-2) wurde aus jeweils 200 µl venösem Vollblut der an dieser Studie teilnehmenden Probanden die genomische DNA aus peripheren Blutleukozyten isoliert. Hierzu wurde nach Zelllyse durch 20 µl der Proteinkinase K und Fällung der DNA durch Zugabe von 200 µl Ethanol das Lysat in die QIAamp Spin Column, ein Plastikröhrchen mit unten trichterförmiger Öffnung, welches durch ein Silikatkissen bedeckt ist, gegeben. Die Spin Column kann in ein 2 ml Sammelröhrchen gesteckt und so die abzentrifugierte Flüssigkeit aufgefangen werden. Die gefällte DNA wird beim zentrifugieren an die Membran aus Silikat-Gel gebunden. Durch Zugabe zweier Puffer (AW1 und AW2) kann nach erneuter späterer Abzentrifugation die Reinheit der DNA erhöht werden. In einem letzten Elutionsschritt wird durch Zugabe von 200 µl des AE Puffers die DNA vom Silikatkissen gelöst und nach Zentrifugation in ein 1,5 ml großes Eppendorf Gefäß aufgefangen. Somit erhält man ungefähr 6 µg gereinigte, in 200 µl Puffer gelöste DNA, dessen Fragmente bis zu 50 kb lang sind. Diese wird bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 2-2: Blood and Body Fluid Spin Protocol
In Anlehnung an das QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook (Quiagen 2010)

Arbeitsschritte zur Isolierung von DNA aus venösem Vollblut	
1.	20 µl Proteinkinase K in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geben
2.	200 µl Vollblut zugeben
3.	200 µl Puffer AL zugeben und für 15 s pulsierend vortexen
4.	Bei 56°C für 10 min inkubieren und danach kurz zentrifugieren
5.	200 µl Ethanol (96 – 100 %) zugeben 15 s pulsierend vortexen und kurz zentrifugieren
6.	Mischung in die, in ein 2 ml Sammelgefäß gesteckte, QIAamp Mini Spin Column geben 1 min bei 6000 g (8000 rpm) zentrifugieren Spin Column in ein neues 2 ml Sammelgefäß stecken Altes Sammelgefäß verwerfen
7.	500 µl Puffer AW1 in Spin Column geben 1 min bei 6000 g (8000 rpm) zentrifugieren Spin Column in ein neues 2 ml Sammelgefäß stecken Altes Sammelgefäß verwerfen
8.	500 µl Puffer AW2 in Spin Column geben 1 min bei 6000g (8000 rpm) zentrifugieren Spin Column in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß stecken Altes Sammelgefäß verwerfen
9.	200 µl Puffer AE zugeben Bei Raumtemperatur (15 – 25°C) für 1 min inkubieren 1 min bei 6000g (8000 rpm) zentrifugieren

Im 1,5 ml Reaktionsgefäß befinden sich jetzt, bei angenommenen 5 x 10^6 Leukozyten/ml Vollblut, ungefähr 6 µg DNA in 200 µl Puffer gelöst (30 ng/µl).

2.2.2 DNA Amplifikation mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1985 von Kary Mullis erfunden (Mullis et al. 1986) und erlaubt, unter Zuhilfenahme einer thermostabilen DNA-Polymerase – in den meisten Fällen die aus dem thermophilen Bakterium

Thermus aquaticus gewonnene, sogenannte Taq-Polymerase – und dem Einsatz passender komplementärer Oligonukleotide (Primer), die Amplifikation spezifischer kurzer DNA-Abschnitte. Hierzu wird das Reaktionsgemisch, bestehend aus der DNA-Lösung, den Primern, der thermostabilen Polymerase, einer Mischung aus Desoxy-Nukleotiden (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) sowie einer Pufferlösung und Wasser, in einen sogenannten Thermocycler gebracht, in dem es in mehreren Zyklen mit jeweils drei Schritten unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt wird. Zunächst erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei Temperaturen zwischen 94 und 96°C. Daraufhin kommt es in der Annealing-Phase bei einer Temperatur von meist 55–65°C zur spezifischen Anlagerung der Primer an die jetzt einzelsträngige DNA. Im letzten Schritt, die Elongation, füllt die DNA-Polymerase vom 3‘-Ende des angelagerten Primers ausgehend, bei einer Temperatur von 68-72°C die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Diese Vorgänge werden nun in 12-50 Zyklen wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnitts kommt. Vor dem ersten Zyklus kann es von Nöten sein, eine längere Erhitzungsphase zu durchlaufen, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben. Auch benötigen sogenannte Hot-Start-Polymerasen diese Phase der Initialisierung, um aktiviert zu werden. Die Tabellen 2-3 bis 2-5 zeigen das von uns verwendete PCR-Reaktionsgemisch, die verwendeten Primer und die Einstellung des Thermocyclers. Die zu erwartende Größe des PCR-Produkts betrug hiermit 259 bp.

Tabelle 2-3: Für die PCR Verwendete Primer

Primer	**Sequenz**
Forward Primer	5‘-GCTGGGTGACAGAGATAGCC-3‘
Reverse Primer	5‘-CTGCATGCAAAGACCACACT-3‘

Tabelle 2-4: PCR-Ansatz

Volumen pro Reaktion	Substanz
29,75 µl	H_2O
5 µl	PCR-Puffer
3 µl	$MgCl_2$
5 µl	dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
2 µl	Primer-Mix (bestehend aus 5µl forward, 5µl reverse Primer und 40µl H_2O)
0,25 µl	Thermostart Taq-Polymerase
5 µl	DNA-Lösung
50 µl	Gesamtvolumen

Tabelle 2-5: Einstellungen am Thermocycler

Initialisierung	15 min 95°C
Amplifikation	40 Zyklen à: 30 sec 94°C (Denaturierung) 30 sec 60°C (Annealing) 30 sec 72°C (Elongation)
Letzte Elongation	5 min 72°C

2.2.3 Verdau des PCR-Produkts

Um eine Genotypisierung in Bezug auf den von uns untersuchten Polymorphismus an der Stelle 188-189 des CB2-Rezeptor-Gens durchzuführen, kam es zum Einsatz von bakteriellen Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme sind in der Lage, bestimmte Basenfolgen in der DNA zu erkennen und diese dort spezifisch zu spalten. In unserem Fall wurde das aus einer Gattung des Bacillus stearothermophilus gewonnene Restriktionsenzym BsrFI verwendet, dessen genaue Schnittstelle in Tabelle 2-6 dargestellt ist und im Bereich des Polymorphismus an besagter Position 188-189 des CB2-Rezeptor-Gens liegt.

Tabelle 2-6: Schnittstelle der Restriktionsendonuklease BsrFI

5‘…R▼CCGGY…3‘ 3‘…YGGCC▲R…5‘
R = A oder G; Y = C oder T

Somit erhielten wir – je nach Genotyp – ein nicht geschnittenes PCR-Produkt mit einer Länge von 259 bp für den Wildtyp AA/AA, ein in zwei Fragmente, von 175 und 84 bp Länge, zerteiltes PCR-Produkt für den homozygoten Mutationsträger GG/GG und dementsprechend drei Fragmente im verdauten PCR-Produkt der heterozygoten Mutationsträger AA/GG (259, 175 und 84 bp). Die gelelektrophoretische Darstellung dieser drei Möglichkeiten zeigt die Abbildung 2-1.

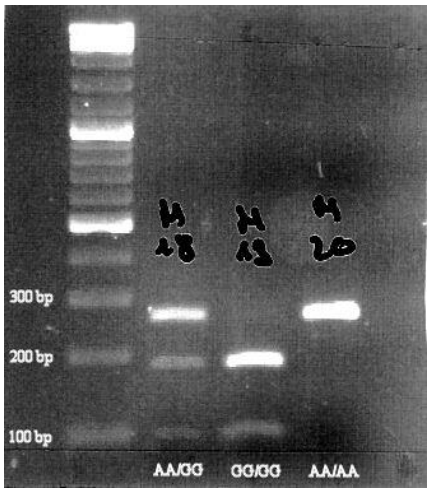


Abbildung 2-1: Darstellung der möglichen Genotypen

Der Verdau erfolgte im Wärmeschrank bei 37°C für mindestens 12 Stunden (über Nacht) nach Herstellung des unter Tabelle 2-7 aufgeführten Reaktionsgemisches.

Tabelle 2-7: Reaktionsgemisch zum Verdau des PCR-Produkts

Volumen pro Reaktion	Substanz	Zusammensetzung
12,9 µl	H_2O	
2 µl	NEB-Puffer für BsrFI	(50mM NaCl, 100mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, 0,025% Triton X-100)
0,1 µl	BsrFI	
5 µl	PCR-Produkt	
20 µl	Gesamtvolumen	

2.2.4 Bestimmung des Genotyps mittels Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine analytische, molekularbiologische Methode, bei der es unter Einfluss eines elektrischen Feldes zur Wanderung und somit zur Trennung verschiedener Moleküle durch ein Gel kommt. Das Gel wirkt hierbei als Sieb, durch das – je nach Größe und Ladung – die Moleküle unterschiedlich schnell durch wandern. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten die beim Verdau des PCR-Produkts entstandenen Restriktionsfragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt und somit analysiert werden. Hierfür wurde ein 2%iges Agarosegel, bestehend aus Agarose und Marathonpuffer, verwendet. Nach Erhitzen dieser Lösung in der Mikrowelle wurde das nun flüssige Gel in eine dafür vorgesehen Form gegossen und mit einem Kamm zum Offenhalten der Taschen versehen. Nach Erhärten des Gels konnte der Kamm entfernt werden und die nun verbliebenen Taschen mit 12 µl der verdauten Proben vermengt mit 2 µl eines Ladepuffers, der neben 15% Ficoll noch jeweils 0,25% Bromphenolblau und Xylencyanol als Farbstoff enthielt, beladen werden. In die erste Tasche des Gels wurde ein 100-bp-DNA-Ladder gebracht. Dieser stellt ein Gemisch aus DNA-Fragmenten definierter Größe dar, das als Standardskalierung zur Größenbestimmung der aufgetrennten Fragmente benutzt werden kann. Das so bestückte Gel wurde, getaucht in einem Marathonpuffer-Bad, zunächst für 30 Minuten einer Stromstärke von etwa 40 – 100 mA ausgesetzt. Nach anschließender zehnminütiger Färbung mit Ethidiumbromid, wodurch eine Fluoreszenz der DNA unter ultraviolettem Licht erzeugt wurde, erfolgte eine erneute Laufzeit von ca. 30 Minuten in der Elektrophoresekammer. Im letzten Schritt konnte so unter einem, mit einer Kamera bestückten UV-Transluminator (λ = 302 nm) ein Foto des gefärbten Gels angefertigt und anhand des aufgetrennten Bandenmusters der Genotyp bestimmt werden (siehe Abbildung 2-1).

2.2.5 Vorbereitung der humanen intestinalen Zelllinie HT-29

Die intestinale Zelllinie HT-29 wurde 1964 von J. Fogh aus dem Kolonadenokarzinom einer 44-jährigen Frau kaukasischen Ursprungs etabliert und für unsere Versuche von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) bezogen. Die Kultivierung fand in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) bei 37°C und einer atmosphärischen CO_2 Konzentration von 5% in einem befeuchteten Inkubator statt. Zusätzlich wurde 10% hitzeaktiviertes fetales Kälberserum und 1% Penicillin und Streptomycin zugegeben. Ein Mediumwechsel fand alle zwei bis drei Tage statt. Nachdem eine Konfluenz von 70% erreicht worden war, konnten die Zellen, für die von uns durchgeführten Experimente verwendet werden.

Um einen eventuellen regulativen Einfluss proinflammatorischer Chemokine und Endotoxine auf die Genexpression des CB2-Rezeptors nachzuweisen, wurden Subpopulationen dieser Zellkultur jeweils mit rekombinantem TNF-α (50 ng/ml), IFN-γ (1000 U/ml), IL-1β (10 ng/ml) oder aus Escherichia coli gewonnenem Lipopolysaccharid (LPS; 1 µg/ml) stimuliert. Das LPS wurde zuvor in gereinigtem und endotoxinfreiem Wasser in einem Ultraschallbad aufgelöst und anschließend auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Nach zeitlich vorgegebenen Intervallen (1, 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden nach Stimulation) wurden jeweils zwei Proben aus dem Zellverband gelöst und nach Herstellung einer gereinigten cDNA der quantitativen Real Time PCR (RT-PCR) zugeführt (siehe Kapitel 2.2.7 und 2.2.8). Um einen Ausgangswert zu erhalten, wurden ebenfalls Zellen vor der Stimulation entnommen und einem solchen Schritt unterzogen. Somit konnte der Einfluss dieser proinflammatorischen Reize auf die CB2-Rezeptor-Expression in seinem zeitlichen Verlauf dargestellt werden.

2.2.6 Gewinnung und Bearbeitung der Darmbiopsien

Die aus dem Kolon und terminalen Ileum entnommenen Biopsien stammten allesamt von an Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa leidenden Patienten der Ambulanz für chronische entzündliche Darmerkrankungen der Universitätsklinik München Großhadern. Die Entnahme erfolgte nach ausführlicher Aufklärung bezüglich der molekulargenetischen Untersuchung und dessen Einwilligung durch die Patienten im Rahmen einer Endoskopie. Dabei wurden sowohl von entzündlich veränderten als auch von makroskopisch intakten Darmabschnitten Biopsien entnommen. Diese wurden in weiteren Schritten (siehe Kapitel 2.2.7 und 2.2.8) sowohl auf ihre Interleukin-8- (IL-8) als auch auf ihre CB2-Rezeptor-Genexpression hin untersucht. Die IL-8-Expression, welches in entzündlichen Geweben nachweislich erhöht ist (Nielsen et al. 1997; Rogler and Andus 1998), diente hierbei zum einen als Beweis für eine inflammatorische Aktivität zum anderen als Bezugswert für die CB2-Rezeptor-Expression. Dieses chemotaktische und proinflammatorische Zytokin, das unter anderem von Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten ausgeschüttet wird, führt vor allem zur Chemotaxis, Stimulation und Aktivierung neutrophiler Granulozyten (Baggiolini and Clark-Lewis 1992).

Somit war eine Aussage darüber möglich, ob in einem entzündlich veränderten Gewebe, in dem eine im Vergleich zu intaktem Gewebe erhöhte IL-8-Expression zu verzeichnen ist, es ebenfalls zu einer Erhöhung der CB2-Rezeptor-Expression kommt.

2.2.7 Herstellung der zur RT-PCR benötigten cDNA

Um eine quantitative Aussage einer bestimmten Genexpression zu treffen, musste zunächst die RNA der zu untersuchenden Zellen bzw. des zu untersuchenden Gewebes isoliert werden. In einem nächsten Schritt wurde diese in komplementäre DNA (cDNA) zurückgeführt und anschließend per quantitativer Real Time PCR (RT-PCR) analysiert (siehe Kapitel 2.2.8).

Die Isolation der RNA geschah mit Hilfe des TRIzol Reagenz der Firma Invitrogen. Hierbei wurden die Proben zunächst mit dieser Guanidium-Isothiocyanat und Phenol enthaltenen Lösung zusammengebracht und anschließend im Ultraschallbad (Biopsien) oder durch auf- und abpipettieren (Zellkulturen) lysiert. Nach Zugabe von Chloroform mit anschließender Durchmischung und Zentrifugation, konnte die in einer oberen wässrigen Phase sich befindende RNA abpipettiert werden. Durch Zugabe von Isopropylalkohol und später Ethanol kam es zur Ausfällung und Reinigung der RNA, die nach jeweiliger Zentrifugation und Abkippung des Überstands im letzten Schritt erneut in die nun endgültige Lösung gebracht werden konnte. Die Vorgehensweise richtete sich nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen 2007).

Anschließend wurde die Konzentration der so gewonnenen RNA-Lösung anhand ihrer photometrischen Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt und daraufhin 1 µg RNA für die Umschreibung in die benötigte cDNA entnommen. Diese erfolgte mit Hilfe der Omnisscript reversen Transkriptase der Firma Qiagen. Zunächst wurde ein, mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefülltes, in Tabelle 2-8 dargestelltes Reaktionsgemisch bestehend aus dem Puffer RT, einem dNTP Gemisch, einem Oligo-dT-Primers (bindet an den Poly-A-Schwanz der mRNA), einem RNase Inhibitor, der Omniscript Reversen Transkriptase und 1 µg RNA hergestellt.

Tabelle 2-8: Reaktionsgemisch der Omniscript Reversen Transkriptase

Volumen pro Reaktion	Substanz
2µl	Puffer RT
2µl	dNTP Gemisch (5mM)
2µl	Oligo-dT-Primer (10µM)
1µl	RNase Inhibitor (10U/µl)
1µl	Omniscript Reverse Transkriptase
variabel	RNase freies Wasser
variabel (konzentrationsabhängig)	1 µg RNA
20 µl	Gesamtvolumen

Dieses Gemisch wurde bei 37°C für 60 Minuten inkubiert und die so entstandene cDNA-Lösung im Anschluss bei -20°C aufbewahrt. Auch hier wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen (Quiagen 2004).

2.2.8 Quantitative Real Time PCR

Die Methode der RT-PCR beruht auf dem oben beschriebenen Prinzip der herkömmlichen PCR. Durch den Einsatz interkalierender Farbstoffe, die an doppelsträngiger DNA binden und daraufhin ein spezifisches Fluoreszenzsignal abgeben, wird in speziellen RT-PCR Geräten die Zunahme dieser Fluoreszenz, welche direkt proportional zur Zunahme der DNA ist, detektiert. Für gewöhnlich erfolgt die Messung am Ende eines jeden Zyklus.

Voraussetzung für eine korrekte Quantifizierung sind optimale Versuchsbedingungen, bei denen es zu einem exponentiellen Wachstum der eingesetzten DNA-Menge kommt. Diese Bedingungen sind meist nur für wenige Zyklen einer PCR, in denen ein optimales Verhältnis der Substrate zu den Produkten vorliegt, gegeben. Am Anfang dieser exponentiellen Phase kommt es erstmalig zu einem signifikanten Anstieg der Reporterfluoreszenz gegenüber der Hintergrundfluoreszenz. Der Zyklus in dem dieser Fluoreszenz-Schwellenwert passiert wird, nennt man Threshold Cycle beziehungsweise C_t-Wert. Es besteht ein linearer, umgekehrt

proportionaler Zusammenhang zwischen dem C_t-Wert und dem dekadischen Logarithmus der eingesetzten Menge an DNA. Hat man nun eine bekannte Ausgangsmenge an cDNA, kann mit Hilfe einer Verdünnungsreihe eine Standardkurve erzeugt und dadurch bei später erhaltenen C_t-Werten auf die eingesetzte Template-Menge zurückgeschlossen werden. Die Effizienz der PCR-Reaktion lässt sich hierbei aus der Steigung der Standardkurve berechnen und liegt optimaler Weise bei Werten zwischen 1,8 und 2 vor, was eine (annähernde) Verdoppelung des PCR-Produkts pro Zyklus in der Messphase bedeutet. Diese formalen Zusammenhänge werden in Tabelle 2-9 verdeutlicht.

Tabelle 2-9: Formale Zusammenhänge der RT-PCR

Formel	**Erklärung**
$y = mx + n$ $\rightarrow C_t = mx + n$ $\rightarrow x = (C_t - n) / m$ $\rightarrow$ cDNA-Menge = $10^{(Ct - n) / m}$	Standard-Geradengleichung mit: *y = C_t-Wert* *x = dekadischer Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge* *m = Steigung der Geraden* *n = Y- Abschnitt*
$E = 10^{-1 / m}$	Berechnung der Effizienz: *E = 2 bedeutet eine Verdopplung des PCR-Produkts pro Zyklus.* *Optimal: E > 1,8*

Um der eventuell unterschiedlichen Effizienz der cDNA-Gewinnung verschiedener Proben Rechnung zu tragen, wurden die errechneten Mengen an Ausgangs-cDNA, gegenüber den vorangegangenen, ebenfalls per RT-PCR bestimmten Expressionswerten für β-Aktin normalisiert. Dieses Strukturprotein, das im Zytoskelett aller eukaryotischen Zellen vorkommt, gehört zu den konstant exprimierten sogenannten Haushaltsgenen und dient als endogene Referenz. Die Relativierung der so ermittelten Template-Mengen des CB2-Rezeptors mithilfe derer des β-Aktins erlaubte einen exakteren Vergleich der Proben untereinander. Zur Durch-

führung der RT-PCR wird ein, analog zur PCR, ähnliches Reaktionsgemisch benötigt (siehe Tabelle 2-10). Für die von uns durchgeführten Experimente wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen verwendet, welches neben dem interkalierenden Farbstoff SYBR Green I, eine Taq-DNA-Polymerase, ein dNTP-Gemisch, den als Hintergrundfluoreszenz dienenden ROX-Farbstoff und einen Puffer enthält. Der asymmetrische Cyanin-Farbstoff SYBR Green I bildet dabei mit der doppelsträngigen DNA einen fluoreszierenden Komplex, der blaues Licht (λ = 494 nm) absorbiert und grünes Licht (λ = 521 nm) emittiert. Die unterschiedlichen Primer der jeweils zu untersuchenden cDNA-Abschnitte und die genauen Reaktionsbedingungen der RT-PCR sind den Tabellen 2-11 und 2-12 zu entnehmen.

Tabelle 2-10: Reaktionsgemisch der RT-PCR

Volumen pro Reaktion	Substanz
10 µl 0,6 µl 1,4 µl 8 µl	QuantiTect SYBR Green Mix Primer Mix (5µl forward, 5µl reverse Primer und 40µl H_2O) H_2O cDNA-Lösung
20 µl	Gesamtvolumen

Tabelle 2-11: Für die RT-PCR verwendete Primer

cDNA	Forward Primer	Reverse Primer
CB2-Rezeptor	5‘-CATGCTGTGCCTCATCAACT-3‘	5‘-GGGCTTCTTCTTTTGCCTCT-3‘
β-Aktin	5‘-GCCAACAGCGAGAAGATGA-3‘	5‘-CATCACGATGCCAGTGGTA-3‘
IL-8	5‘-CCAGGAAGAAACCACCGGA-3‘	5‘-GAAATCAGGAAGGCTGCCAAG-3‘

Tabelle 2-12: Einstellungen der RT-PCR

Initialisierung	15 min 95°C
Amplifikation	40 Zyklen à: 25 sec 94°C (Denaturierung) 25 sec 60°C (Annealing) 25 sec 72°C (Elongation)

2.2.9 Statistik

Diskrete Variablen wurden mit dem Exakt-Test nach Fischer verglichen, für kontinuierliche Variablen wurde der Student-T-Test verwendet. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

2.3 Materialien

2.3.1 Allgemein

Ethanol 100%	Merck, Darmstadt, D
Pipetten „Pipetman“	Gilson, Bad Camberg, D
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt, D
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, D
Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Genie-Mixer	Bender & Hobein, Zürich, CH

2.3.2 Isolierung der DNA

Proteinase K	Qiagen, Hilden, D
QIAamp Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
Heizblock	Lab-Line Inc., Melrose Park, USA

2.3.3 PCR

dNTP	Amersham BioSciences, Freiburg, D
PCR-Reaktionsgefäß	ABgene, Hamburg, D
Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg, D
Magnesiumchlorid	ABgene, Hamburg, D
Taq-DNA-Polymerase / Puffer	ABgene, Hamburg, D
Thermocycler MJ-Research PTC 225	Biozym, Hess. Oldendorf, D

2.3.4 Verdau des PCR Produkts

BsrFI / NEB Puffer für BsrFI	New England BioLabs Inc., Frankfurt / Main, D

2.3.5 Gelelektrophorese

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Sigma / Aldrich, Taufkirchen, D
DNA Molecular Weight Marker	Fermentas Life Sciences, St. Leonrot, D

Elektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Sigma / Aldrich, Taufkirchen, D
Gelträger	Invitrogen, Karlsruhe, D
Spannungsgeräte	Amersham BioSciences, Freiburg, D
TRIS	Invitrogen, Karlsruhe, D
UV – Transluminator	MWG-Biotech, Ebersberg, D
Xylencyanol	Sigma / Aldrich, Taufkirchen, D

2.3.6 Zellkulturen und Biopsien

Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Hitzeaktiviertes fetales Kälberserum	PAA Laboratorien, Osnabrück, D
Humane intestinale Zellinie HT-29	American Type Culture Collection, Manassas, USA
IFN-γ	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-1β	R&D Systems, Minneapolis, USA
LPS	Sigma, St. Louis, USA
Oligo-dT-Primer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Omniscript Reverse Transkriptase Kit	Qiagen, Hilden, D
Penicillin	PAA Laboratorien, Osnabrück, D
Streptomycin	PAA Laboratorien, Osnabrück, D

TNF-α	R&D Systems, Minneapolis, USA
TRIzol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.3.7 RT-PCR

Abi Prism 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Primer	MWG-Biotech, Ebersberg, D
Quantitect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, D

3 Ergebnisse

3.1 CB2 – Rezeptor – Polymorphismus

Die Untersuchungen bezüglich des von J.C. Sipe beschriebenen pQ63R CB2-Rezeptor-Polymorphismus, der im Zusammenhang mit autoimmunen Erkrankungen stehen soll (Sipe et al. 2005), wurden an den unter Kapitel 2.1 (siehe S. 38) beschriebenen Patienten und Kontrollen durchgeführt. Die demographischen Daten dieser Studienpopulation sind der Tabelle 2-1 (siehe S. 39) zu entnehmen.

3.1.1 Genotyp – Verteilung

Von Interesse war, ob es einen signifikanten Unterschied in der Genotyp-Verteilung der untersuchten Patienten und Kontrollen gibt und damit auf eine mögliche Krankheitssuszeptibilität des Polymorphismus zurückgeschlossen werden kann. Wie aus der Tabelle 3-1 ersichtlich wird, war dies hier nicht der Fall. Die Genotypen verteilten sich in allen Gruppen annähernd dem Hardy-Weinberg-Gesetz entsprechend, bei GG-Allel-Frequenzen von 58% bei den Kontrollen, 62% bei den Morbus Crohn-Patienten und 59% bei den Colitis ulcerosa-Patienten. Im Gegensatz dazu stehen die von Sipe et al. beschriebenen GG-Allel-Frequenzen von 53% bei den Kontrollen und 62% bei den Patienten mit einer Autoimmunkrankheit. Im Vergleich zu den per Hardy-Weinberg-Gesetz, errechneten Erwartungswerten jedoch, verteilten sich hierbei die einzelnen Genotypen mit einer Verzerrung zugunsten der homozygoten Allelträger (AA/AA oder GG/GG).

Tabelle 3-1: Verteilung des pQ63R CB2-Rezeptor-Polymorphismus

	(1) AA/AA	(2) AA/GG	(3) GG/GG	(1) vs (2)	(1) vs (3)	(2) vs (3)	(1+2) vs (3)
Morbus Crohn	64 (15,0%)	200 (46,9%)	162 (38,0%)	**Morbus Crohn vs. Kontrollen**			
				p = 0,61 OR 0,90 CI 0,61 – 1,34	p = 0,20 OR 0,75 CI 0,5 – 1,14	p = 0,27 OR 0,84 CI 0,62 – 1,14	p = 0,18 OR 0,81 CI 0,61 – 1,09
Kontrollen	66 (17,5%)	186 (49,2%)	126 (33,3%)	**Colitis ulcerosa vs. Kontrollen**			
				p = 1,00 OR 1,01 CI 0,60 – 1,69	p = 0,89 OR 0,95 CI 0,55 – 1,64	p = 0,83 OR 0,94 CI 0,63 – 1,42	p = 0,84 OR 0,95 CI 0,64 – 1,40
Colitis ulcerosa	28 (17,3%)	78 (48,1%)	56 (34,6%)	**Morbus Crohn vs. Colitis ulcerosa**			
				p = 0,69 OR 0,89 CI 0,53 – 1,49	p = 0,40 OR 0,79 CI 0,46 – 1,35	p = 0,61 OR 0,89 CI 0,59 – 1,32	p = 0,45 OR 0,86 CI 0,59 – 1,26

3.1.2 Genotyp – Phänotyp – Korrelation

Als nächstes wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen dem bestimmten CB2-Rezeptor-Genotyp und der phänotypischen Ausprägung der jeweiligen chronisch entzündlichen Darmerkrankung gibt. Die Morbus Crohn-Patienten wurden hierzu, anhand der Montreal Klassifikation (Silverberg et al. 2005) nach Alter bei Erstdiagnose, Lokalisation und Verhalten der Erkrankung eingeteilt. In Annäherung daran wurden auch die Colitis ulcerosa-Patienten nach den gängigen Parametern Alter bei Erstdiagnose und Lokalisation der Erkrankung eingeteilt. Weitere Faktoren die berücksichtigt wurden, waren ferner Größe und Gewicht der Patienten, eine positive Familienanamnese bezüglich CED sowie im Rahmen der

Krankheit auftretende Komplikationen und Operationen als auch die Notwendigkeit zum Gebrauch von Immunsuppressiva. Die genauen Einteilungen sind den Tabellen 3-2 für Morbus Crohn und 3-3 für Colitis ulcerosa-Patienten zu entnehmen. In beiden Gruppen gab es bezüglich der Häufigkeit des Auftretens der bestimmten Charakteristika keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen des CB2-Rezeptors. Eine Auswirkung des pQ63R-Polymorphismus auf das Krankheitsverhalten scheint somit ausgeschlossen.

Tabelle 3-2: Genotyp-Phänotyp-Korrelation der Morbus Crohn-Patienten
(1) Das Krankheitsverhalten richtete sich nach den Definitionen der Montreal Klassifikation (Silverberg et al. 2005). Eine stenosierende Erkrankungsform war dabei definiert als Auftreten von Stenosen ohne die Anwesenheit von Fisteln.
(2) Als Immunsuppressiva wurden Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Methotrexat und/oder Infliximab gewertet
(3) Das Auftreten einer oder mehrerer der folgenden nicht-medikamentös bedingten, Morbus Crohn-assoziierten Erkrankungen: Arthropathien (z.B. ankylosierende Spondylitis, Sakroileitis, periphere Arthritiden), Augenbeteiligung (z.B. Episkleritis, Iritis, Uveitis), Hautbeteiligung (z.B. Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum), Gallenwegserkrankungen (z.B. primär sklerosierende Cholangitis)
(4) Gezählt wurden nur Operationen, die im Zusammenhang mit Morbus Crohn-assoziierten Komplikationen standen (z.B. Fistulektomie. Kolektomie, Ileostomie)

	(1) **AA/AA** (n = 64)	**(2)** **AA/GG** (n = 200)	**(3)** **GG/GG** (n = 162)	**(1) vs (2)**	**(1) vs (3)**	**(2) vs (3)**	**(1+2) vs (3)**	**(1) vs (2+3)**
Männliches Geschlecht (n)	36 (56,2%)	93 (46,5%)	81 (50,0%)	p = 0,197	p = 0,461	p = 0,527	p = 0,842	p = 0,278
Alter (Jahre) Mittelwert ± SA Spannweite	36,7 ± 11,6 10 – 57	40,2 ± 12,5 17 – 75	40,1 ± 13,8 15 – 74	**p = 0,0462**	p = 0,084	p = 0,921	p = 0,577	**p = 0,0474**
Alter bei Erstdiagnose (Jahre) Mittelwert ± SA Spannweite	(n = 60) 26,9 ± 10,7 1 – 52	(n = 182) 27,7 ± 11,6 7 – 71	(n = 145) 28,0 ± 12,7 9 – 71	p = 0,635	p = 0,540	p = 0,799	p = 0,664	p = 0,567
Krankheitsdauer (Jahre) Mittelwert ± SA Spannweite	(n = 60) 10,0 ± 7,3 0 – 29	(n = 182) 12,1 ± 8,9 1 – 44	(n = 145) 12,0 ± 9,2 1 – 37	p = 0,096	p = 0,132	p = 0,908	p = 0,657	p = 0,093
Body Mass Index (kg/m^2) Mittelwert ± SA Spannweite	(n = 55) 22,6 ± 4,3 13 – 35	(n = 164) 23,3 ± 4,4 16 – 40	(n = 126) 23,0 ± 3,9 16 – 38	p = 0,324	p = 0,554	p = 0,568	p = 0,807	p = 0,376

Alter bei Erstdiagnose (Montreal A) < 17 Jahre (A1) 17 – 40 Jahre (A2) > 40 Jahre (A3)	(n = 60) 7 (11,7%) 45 (75,0%) 8 (13,3%)	(n = 182) 19 (10,5%) 142 (78,5%) 21 (11,0%)	(n = 146) 20 (13,7%) 105 (71,9%) 21 (14,4%)	 p = 0,811 p = 0,723 p = 0,819	 p = 0,822 p = 0,732 p = 1,000	 p = 0,394 p = 0,246 p = 0,507	 p = 0,419 p = 0,275 p = 0,533	 p = 1,000 p = 1,000 p = 0,837
Lokalisation (Montreal L) Terminales Ileum (L1) Kolon (L2) Ileokolon (L3) oberer GI-Trakt (L4) Ileale Beteiligung (L1+L3)	(n = 57) 8 (14,0%) 5 (8,8%) 43 (75,4%) 9 (15,8%) 51 (89,5%)	(n = 185) 27 (14,6%) 28 (15,1%) 125 (67,6%) 27 (14,6%) 152 (82,1%)	(n = 143) 26 (18,2%) 21 (14,7%) 91 (63,6%) 25 (17,5%) 118 (82,5%)	 p = 1,000 p = 0,274 p = 0,324 p = 0,833 p = 0,221	 p = 0,538 p = 0,353 p = 0,134 p = 0,838 p = 0,281	 p = 0,450 p = 1,000 p = 0,482 p = 0,543 p = 1,000	 p = 0,386 p = 0,764 p = 0,262 p = 0,564 p = 0,777	 p = 0,845 p = 0,301 p = 0,171 p = 1,000 p = 0,247
Krankheistverhalten (Montreal B) [(1)] nicht-stenosierend oder penetrierend (B1) Stenosierend (B2) Penetrierend (B3)	(n = 56) 14 (25,0%) 17 (30,4%) 25 (44,6%)	(n = 174) 30 (17,2%) 49 (28,2%) 95 (54,6%)	(n = 137) 28 (20,4%) 39 (28,5%) 70 (51,1%)	 p = 0,241 p = 0,737 p = 0,220	 p = 0,565 p = 0,862 p = 0,432	 p = 0,558 p = 1,000 p = 0,568	 p = 0,787 p = 1,000 p = 0,914	 p = 0,276 p = 0,750 p = 0,309
Gebrauch von Immunsuppressiva [(2)]	53 (82,8%)	140 (70,0%)	121 (74,4%)	p = 0,052	p = 0,222	p = 0,347	p = 0,735	p = 0,090
Extraintestinale Manifestationen [(3)]	24 (37,5%)	79 (39,5%)	64 (39,5%)	p = 0,883	p = 0,880	p = 1,000	p = 0,919	p = 0,783
Positive Familienanamnese für CED	6 (9,4%)	24 (12,0%)	20 (12,3%)	p = 0,656	p = 0,647	p = 1,000	p = 0,759	p = 0,674
M. Crohn assoziierte Operationen [(4)]	33 (51,6%)	115 (57,5%)	88 (54,3%)	p = 0,470	p = 0,768	p = 0,595	p = 0,764	p = 0,586
Fisteln	26 (40,6%)	103 (51,5%)	74 (45,7%)	p = 0,151	p = 0,553	p = 0,291	p = 0,550	p = 0,277
Stenosen	32 (50,0%)	124 (62,0%)	93 (57,4%)	p = 0,108	p = 0,373	p = 0,390	p = 0,762	p = 0,169
Abszesse	17 (26,6%)	64 (32,0%)	43 (26,5%)	p = 0,441	p = 1,000	p = 0,297	p = 0,381	p = 0,765

Tabelle 3-3: Genotyp-Phänotyp-Korrelation der Colitis ulcerosa-Patienten
(1) Als Immunsuppressiva wurden Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Methotrexat und/oder Infliximab gewertet
(2) Das Auftreten einer oder mehrerer der folgenden nicht-medikamentös bedingten, Colitis ulcerosa-assoziierten Erkrankungen: Arthropathien (z.B. ankylosierende Spondylitis, Sakroileitis, periphere Arthritiden), Augenbeteiligung (z.B. Episkleritis, Iritis, Uveitis), Hautbeteiligung (z.B. Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum), Gallenwegserkrankungen (z.B. primär sklerosierende Cholangitis)
(3) Gezählt wurden nur Operationen, die im Zusammenhang mit Colitis ulcerosa-assoziierten Komplikationen standen (z.B. Fistulektomie. Kolektomie, Ileostomie)

	(1) **AA/AA** (n = 28)	**(2)** **AA/GG** (n = 78)	**(3)** **GG/GG** (n = 56)	**(1) vs (2)**	**(1) vs (3)**	**(2) vs (3)**	**(1+2) vs (3)**	**(1) vs (2+3)**
Männliches Geschlecht (n)	13 (46,4%)	35 (44,9%)	32 (57,1%)	p = 1,000	p = 0,366	p = 0,220	p = 0,187	p = 0,836
Alter bei Erstdiagnose (Jahre) Mittelwert ± SA Spannweite	(n = 27) 30,6 ± 10,7 14 – 58	(n = 76) 32,7 ± 14,1 13 – 81	(n = 53) 31,6 ± 15,1 9 – 75	p = 0,490	p = 0,758	p = 0,686	p = 0,828	p = 0,580
Body Mass Index (kg/m^2) Mittelwert ± SA Spannweite	(n = 21) 24,3 ± 5,3 18 – 37	(n = 60) 23,8 ± 4,0 16 – 41	(n = 43) 24,1 ± 3,7 16 – 32	p = 0,667	p = 0,898	p = 0,668	p = 0,787	p = 0,732
Lokalisation Proktitis ulcerosa Linksseitige Colitis ulcerosa Pankolitis	(n = 28) 4 (14,3%) 13 (46,4%) 11 (39,3%)	(n = 73) 3 (4,1%) 31 (42,5%) 39 (53,4%)	(n = 55) 6 (10,9%) 24 (43,6%) 25 (45,5%)	 p = 0,091 p = 0,823 p = 0,267	 p = 0,727 p = 0,820 p = 0,645	 p = 0,171 p = 1,000 p = 0,475	 p = 0,383 p = 1,000 p = 0,738	 p = 0,252 p = 0,834 p = 0,404
Gebrauch von Immunsuppressiva (1)	19 (67,9%)	56 (71,8%)	40 (71,4%)	p = 0,809	p = 0,802	p = 1,000	p = 1,000	p = 0,656
Anwendung von Infliximab (≥1 Infusion)	8 (28,6%)	19 (24,4%)	15 (26,8%)	p = 0,801	p = 1,000	p = 0,841	p = 0,853	p = 0,813

Colitis ulc.-assoziierte Operationen[(2)]	2 (7,1%)	3 (3,8%)	2 (3,6%)	p = 0,606	p = 0,598	p = 1,000	p = 1,000	p = 0,348
Fisteln	1 (3,6%)	3 (3,8%)	1 (1,8%)	p = 1,000	p = 1,000	p = 0,640	p = 0,660	p = 1,000
Stenosen	2 (7,1%)	12 (15,4%)	4 (7,1%)	p = 0,346	p = 1,000	p = 0,183	p = 0,301	p = 0,741
Abszesse	3 (10,7%)	4 (5,1%)	3 (5,4%)	p = 0,377	p = 0,395	p = 1,000	p = 1,000	p = 0,379
Extraintestinale Manifestationen [(3)]	7 (25,0%)	11 (14,1%)	7 (12,5%)	p = 0,241	p = 0,213	p = 1,000	p = 0,502	p = 0,150
Positive Familienanamnese für CED	5 (17,9%)	8 (10,3%)	8 (14,3%)	p = 0,322	p = 0,752	p = 0,591	p = 0,807	p = 0,368

3.2 CB2 – Rezeptor – Expressionsverhalten

Um eine korrekte Analyse des Expressionsverhalten mittels RT-PCR durchzuführen, musste – wie oben beschrieben – anhand einer Verdünnungsreihe von cDNA eine Standardkurve zur späteren Berechnung der eingesetzten Template-Menge erstellt werden. Da in unserem Fall lediglich eine relative Quantifizierung von Nöten war, wurde die unverdünnte cDNA, entsprechend dem eingesetzten Volumen in Mikroliter willkürlich auf 8 ng festgelegt. Die Tabelle 3-4 zeigt die für die einzelnen Verdünnungen erhaltenen C_t-Werte und die Abbildung 3-1 die dadurch erhaltene Standardkurve mit der dazugehörigen Geradengleichung.

Tabelle 3-4: C_t-Werte der einzelnen cDNA Verdünnungen

Verdünnung	C_t-Werte	Relative cDNA-Menge	Dekadischer log
1:10	28,48	0,8	-0,0969
1:20	29,42	0,4	-0,3979
1:50	30,91	0,16	-0,7959
1:100	32,29	0,08	-1,0969
1:250	33,78	0,032	-1,4949

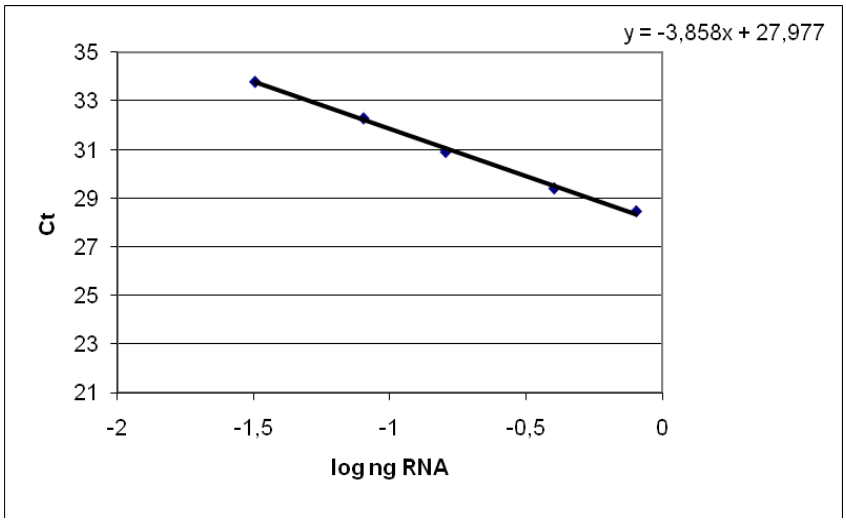
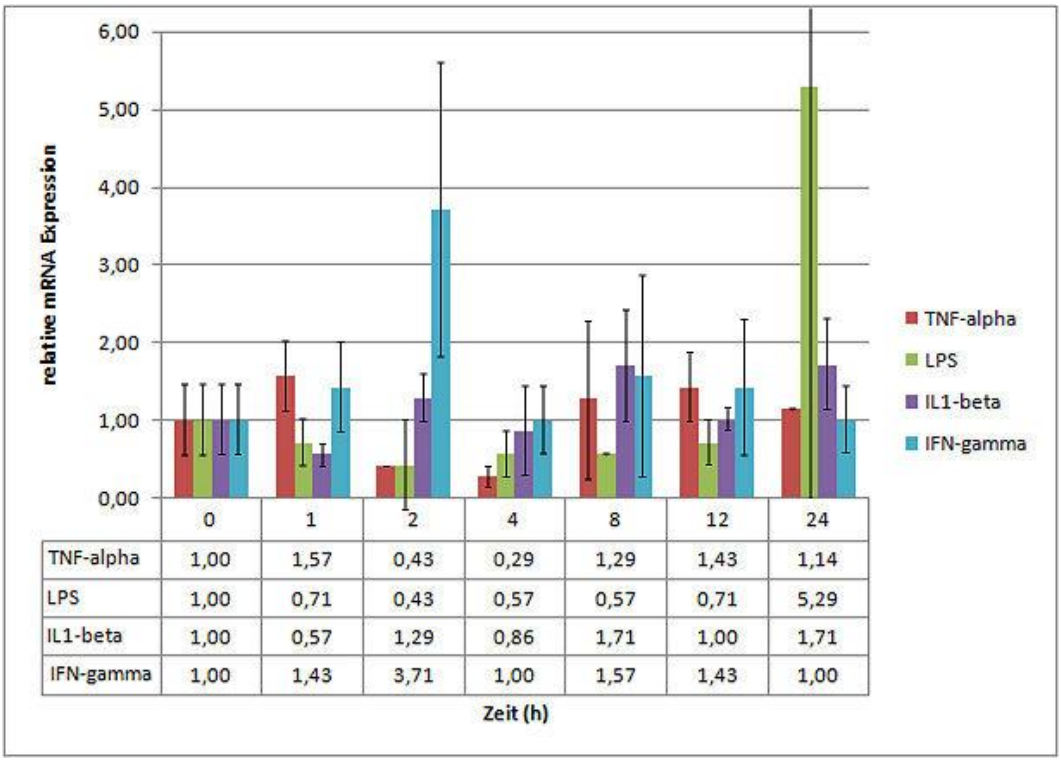


Abbildung 3-1: Standardkurve der RT-PCR für den CB2-Rezeptor

Die errechnete Effizienz der durchgeführten RT-PCR lag somit bei $E = 10^{-1/m} = 10^{-1/-3,858} = 1,816$. Wie im Vorausgehenden erläutert wird eine Effizienz von $E \geq 1,8$ angestrebt, da dies aussagt, dass es hierbei zu einer annähernden Verdoppelung der cDNA-Menge pro Zyklus kommt und damit optimale Versuchsbedingungen während der Messphase herrschen. Somit kann die von uns durchgeführte RT-PCR als effizient angesehen werden.

3.2.1 Daten der Zelllinie HT-29

Die humane intestinale Zelllinie HT-29 wurde in festen zeitlichen Intervallen nach proinflammatorischer Stimulation mit TNF-α, LPS, IL-1β und INF-γ auf ihre CB2-Rezeptor-Expression hin untersucht. Als Vergleich dienten zuvor bestimmte Expressionswerte nicht stimulierter Zellen. Wie aus Abbildung 3-2 ersichtlich wird, konnte jedoch kein relevant signifikanter poststimulativer Anstieg der CB2-Rezeptor-mRNA verzeichnet werden. Ein regulativer Einfluss der verwendeten Zytokine und des Endotoxins LPS auf die Expression des CB2-Rezeptors konnte also nicht gezeigt werden.



	0	1	2	4	8	12	24
TNF-alpha	1,00	1,57	0,43	0,29	1,29	1,43	1,14
LPS	1,00	0,71	0,43	0,57	0,57	0,71	5,29
IL1-beta	1,00	0,57	1,29	0,86	1,71	1,00	1,71
IFN-gamma	1,00	1,43	3,71	1,00	1,57	1,43	1,00

Abbildung 3-2: Poststimulativer Verlauf der relativen CB2-Rezeptor-mRNA Expression

3.2.2 Daten der Darmbiopsien

Die von uns untersuchten, endoskopisch gewonnenen Darmbiopsien stammten von insgesamt 24 Patienten, von denen zwölf an Colitis ulcerosa und zwölf an Morbus Crohn litten. In beiden Patientengruppen wurden jeweils 41 Biopsien entnommen, wobei 20 aus makroskopisch entzündeten und 21 aus makroskopisch nicht-entzündeten Arealen stammten. Die Expressionsanalyse des CB2-Rezeptors sowie des IL-8 erfolgte mit Hilfe der oben beschriebenen RT-PCR.

Hierbei war die zuvor als Kontrollmarker für ein inflammatorisches Geschehen bestimmte IL-8-Expression der entzündlich veränderten Biopsien im Vergleich zu den Biopsien aus unveränderten Bereichen der Darmmukosa signifikant erhöht ($p < 0,05$). Eine solche Signifikanz konnte bezüglich des CB2-Rezeptors lediglich für die aus Morbus Crohn-Patienten gewonnenen Biopsien nachgewiesen werden ($p = 0,0057$), wodurch gezeigt werden konnte, dass es zu einer Hochregulation des CB2-Rezeptors in entzündlich veränderten Bereichen der Darmwand von Morbus Crohn-Patienten kommt. Für Colitis ulcerosa-Patienten war dieser Unterschied bei einem p-Wert von $p = 0,119$ leider nicht signifikant. Die genauen Daten können der Tabelle 3-5 und eine bildliche Darstellung den Abbildungen 3-3 und 3-5 entnommen werden.

Eine direkte Korrelation der IL-8- und CB2-Rezeptor-Expression scheint bei Korrelationskoeffizienten von $r = 0,057$ in der Morbus Crohn und $r = 0,201$ in der Colitis ulcerosa-Gruppe ausgeschlossen. Die Abbildungen 3-4 und 3-6 verdeutlichen dies in einem Scatter-Plot.

Tabelle 3-5: Expressionsquotienten aus entzündlichen und nicht-entzündlichen Biopsien für IL-8 und den CB2-Rezeptor

Morbus Crohn-Patienten			Colitis ulcerosa-Patienten		
Nr.	IL-8 mRNA entzündet / nicht entzündet	CB2-Rezeptor mRNA entzündet / nicht entzündet	Nr.	IL-8 mRNA entzündet / nicht entzündet	CB2-Rezeptor mRNA entzündet / nicht entzündet
7	4,5	53,8	8	7,0	0,3
10	11,7	8,2	11	2,4	2,0
12	1,5	37,9	13	1,0	0,9
18	11,1	16,1	20	2,0	5,2
19	1,5	13,3	24	8,1	4,2
22	1,4	46,4	31	2,6	0,4
25	5,0	2,4	32	5,8	2,2
26	2,2	1,4	33	3,3	3,0
27	1,0	0,7	35	0,5	1,3
34	1,5	2,6	40	2,4	1,3
38	1,4	3,3	81	1,6	0,5
39	4,3	0,4	82	4,3	0,5

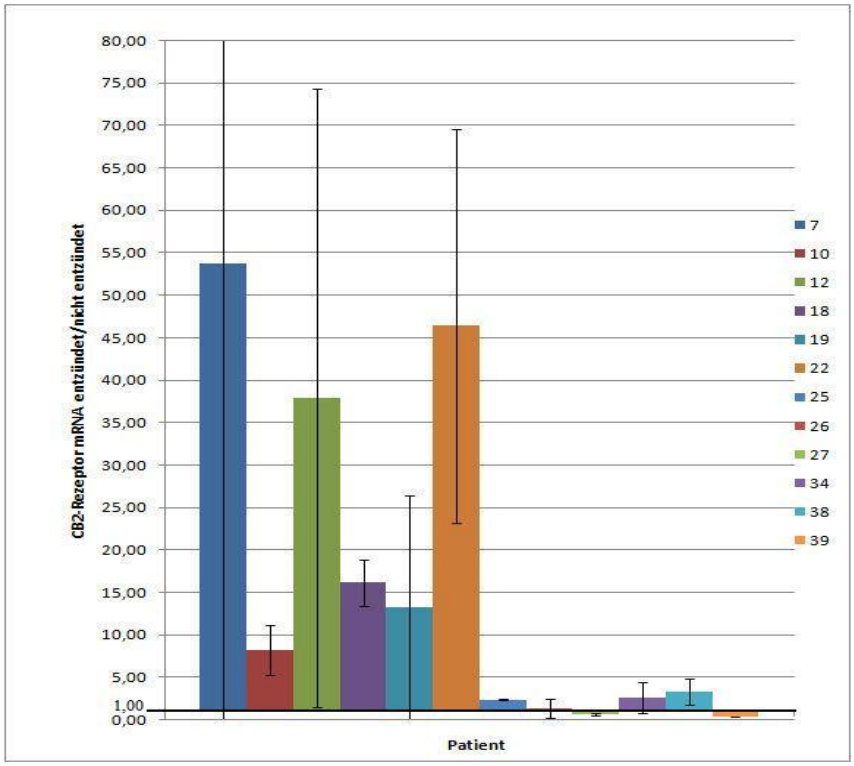


Abbildung 3-3: Relative CB2-Rezeptor-Expression der Morbus Crohn-Patienten

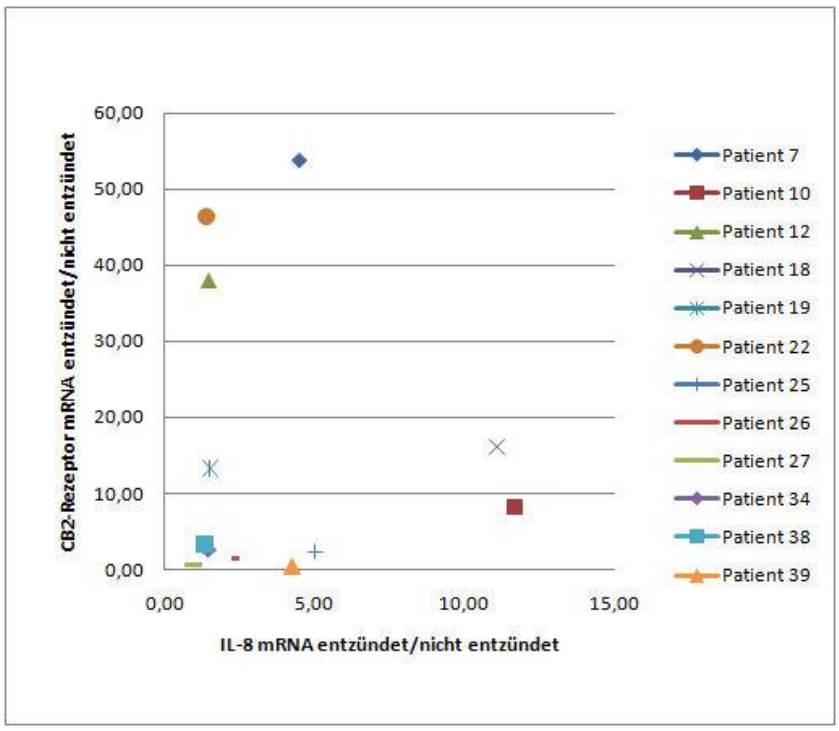


Abbildung 3-4: CB2-Rezeptor/IL-8 Korrelation der Morbus Crohn-Patienten

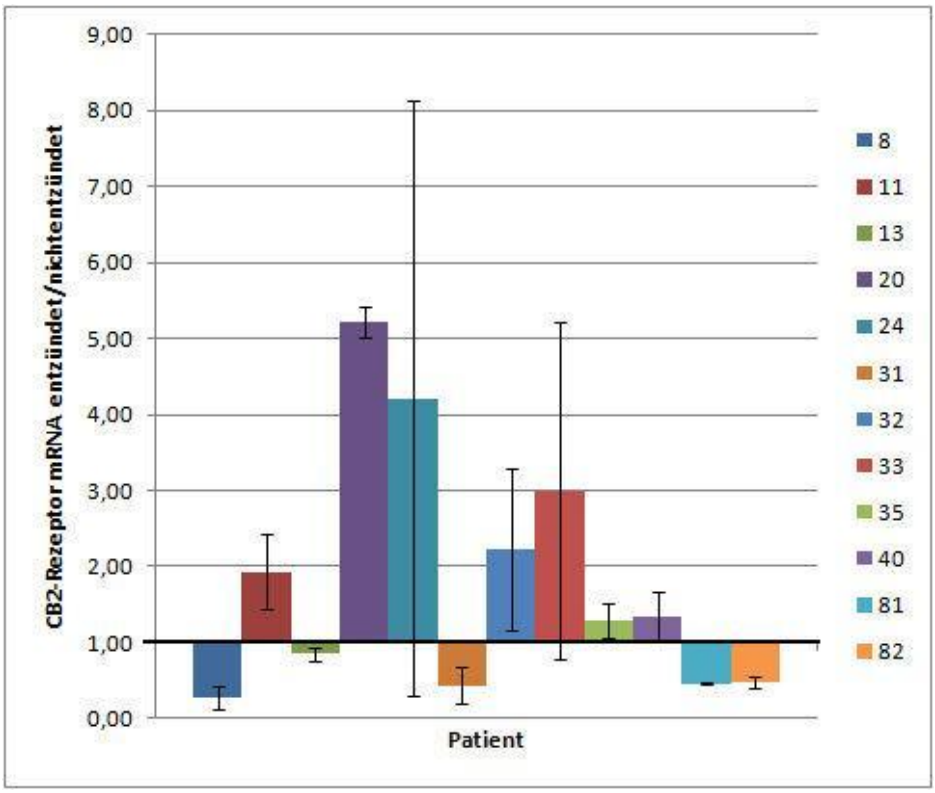


Abbildung 3-5: Relative CB2-Rezeptor-Expression der Colitis ulcerosa-Patienten

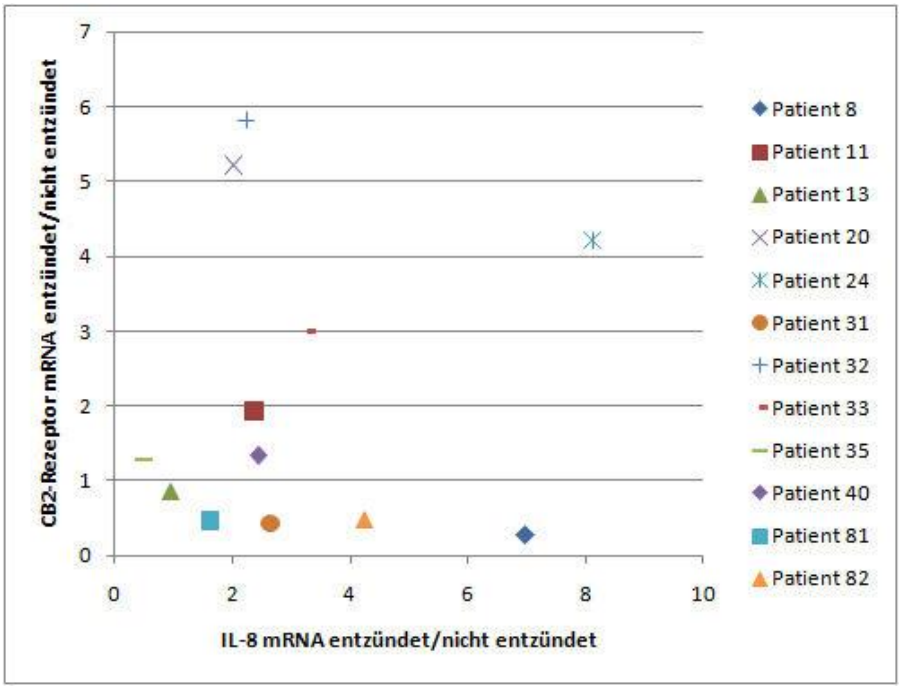


Abbildung 3-6: CB2-Rezeptor/IL-8 Korrelation der Colitis ulcerosa-Patienten

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Polymorphismusergebnisse

Der mitentscheidende Stellenwert verschiedener genetischer Polymorphismen in der Entstehung oder phänotypischen Ausprägung unterschiedlicher Krankheiten konnte schon mehrfach belegt werden. So können SNPs in G-Protein-gekoppelten Rezeptoren über Veränderungen der Liganden-Bindungsaktivität oder der Signaltransduktion zu Erkrankungen führen oder diese beeinflussen (Stephens 1999; Sachidanandam et al. 2001; Crawford and Nickerson 2005). Nur beispielhaft seien hierfür multiple SNPs im β_2-adrenergen-Rezeptor, die mit dem Auftreten von Asthma bronchiale (Liggett 2000), der SNP an Position 124 des Serotonin-Rezeptors-1B, der mit einer Depression (Bruss et al. 1999) oder aber der pT280M Polymorphismus des Fractalkine-Rezeptors, der mit einem fibrostenosierenden Phänotyp eines Morbus Crohn assoziiert ist (Brand et al. 2006), genannt. Sicherlich gilt ein solcher Zusammenhang von Polymorphismus und Erkrankung nicht nur auf Rezeptorebene, sondern betrifft vielmehr die gesamte Signaltransduktion wie auch Ligandensynthese und –abbau. Diesbezüglich sei exemplarisch der pP129T Polymorphismus des maßgeblich für den Abbau der Endocannabinoide verantwortlichen Enzyms FAAH erwähnt, der mit einer schwereren Form eines Morbus Crohn im Sinne einer erhöhten Neigung zur Fistelbildung und vermehrt extraintestinalen Manifestationen in Verbindung steht (Storr et al. 2009).

Bezüglich des CB2-Rezeptors sind mehrere Polymorphismen bekannt, von denen zwei zu einem Aminosäureaustausch und somit zu funktionellen Konsequenzen führen. Diese sind zum einen der von uns untersuchte pQ63R-, zum anderen der pH316Y-Polymorphismus. Beide befinden sich auf zytoplasmatischer Seite (siehe Abbildung 1-6), wodurch die Ligandenbindung im Wesentlichen unbeeinflusst bleibt (Carrasquer et al. 2010). Lediglich für den pH316Y-Polymorphismus konnte eine etwas geringere Affinität gegenüber 2-AG gezeigt werden. Darüber hinaus

legten Carrasquer et al. jedoch dar, dass diese beiden Rezeptorpolymorphismen nach Stimulation mit den Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten WIN55212-2 oder 2-AG zu einer geringeren maximalen Antwort im Sinne einer intrazellulären cAMP-Akkumulation führen. Ebenso konnte eine erhöhte Basalaktivität des nichtstimulierten pH316Y-Typs des CB2-Rezeptors nachgewiesen werden. Diese funktionellen Konsequenzen legen einen Zusammenhang dieser Polymorphismen mit der Entstehung von Krankheiten nahe. Eingehend belegt ist dies für die Osteoporose. Sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten produzieren nicht nur 2-AG, sondern exprimieren auch den CB2-Rezeptor, dessen Aktivierung zu einer vermehrten Knochenbildung und einer verringerten Knochenresorption führt (Bab et al. 2008; Bab and Zimmer 2008). Für verschiedene Polymorphismen in diesem Rezeptor wie auch dem weniger effizienten pQ63R-Rezeptor konnte eine signifikante Assoziation zu verringerter Knochendichte und Osteoporose nachgewiesen werden (Karsak et al. 2005). Des Weiteren zeigten Sipe et al. 2005, dass der CB2-Rezeptorpolymorphismus pQ63R zu einer reduzierten Inhibition der T-Lymphozyten-Proliferation durch Endocannabinoide führt und belegten eine Beziehung dieses Polymorphismus mit autoimmunen Erkrankungen wie Lupus erythematodes, Myasthenia gravis, rheumatoide Arthritis und Multipler Sklerose. Eine Erklärung hierfür könnte in der von Carrasquer et al. 2010 nachgewiesenen geringeren Wirksamkeit von 2-AG am polymorphen Rezeptor sowie der Tatsache, dass speziell 2-AG am CB2-Rezeptor als wichtiger Immunmodulator und -regulator gilt (Sugiura and Waku 2000; Sugiura et al. 2006), liegen.

In diesem Rahmen erschien es interessant, die Bedeutung des pQ63R-Polymorphismus bei den Krankheitsentitäten Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, die sich ebenfalls durch eine Dysregulation des Immunsystems kennzeichnen, zu untersuchen. Zusätzlich identifizierten bereits genomweite Assoziationsstudien den Bereich auf Chromosom 1p36 als möglichen Suszeptibilitätslocus für CED (Cho et al. 1998; Cho et al. 2000). Dieser beinhaltet neben dem CB2-Rezeptor-Gen noch eine Reihe weiterer Gene wie den TNF-Rezeptor-superfamily-1B oder

den Ephrin A2 – ein Tyrosin-Protein-Kinase-Rezeptor. Die Ergebnisse unserer Studie ließen jedoch keinen Unterschied in Bezug auf Suszeptibilität oder phänotypische Ausprägung beider Erkrankungen zwischen dem untersuchten Polymorphismus und dem CB2-Rezeptor-Wildtyp erkennen. Ob eine höhere Fallzahl in unserer Studie dies geändert hätte oder ob die niedrige Fallzahl der Studie von Sipe et al. 2005 verfälscht hohe Ergebnisse hinsichtlich der Suszeptibilität autoimmuner Erkrankungen zur Folge hatte, bleibt ungewiss.

Auch die Untersuchung anderer Krankheitsentitäten, bei denen der CB2-Rezeptor eine Rolle zu spielen scheint, und somit ein Zusammenhang dieser mit polymorphen Varianten des Rezeptors vermuten ließen, kam zu keinem signifikanten Ergebnis. Im Rahmen der Atherosklerose zum Beispiel spielen entzündliche Prozesse eine Schlüsselrolle in der Pathogenese (Libby 2002). Es konnte gezeigt werden, dass der CB2-Rezeptor in atherosklerotischen Plaques von Mäusen und Menschen exprimiert wird und niedrig dosierte orale Cannabinoide den Fortschritt der Erkrankung in Apolipoprotein-E-Knock-out-Mäusen verhindern können (Steffens et al. 2005). Hierbei scheinen die durch den CB2-Rezeptor vermittelten Effekte einer inhibierten Makrophagen-Chemotaxis und reduzierten Lymphozyten-Proliferation von Relevanz zu sein (Klein et al. 2003). Dennoch konnte in einer groß angelegten Studie der Universitätsklinik Regensburg kein Zusammenhang zwischen diversen SNPs im CB2-Rezeptor-Gen - mitunter dem pH316Y-Polymorphismus - und dem Auftreten eines Myokardinfarkts als Maximalform der Atherosklerose oder von kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonus, Hypercholesterinämie, Adipositas sowie Diabetes mellitus hergestellt werden (Reinhard et al. 2008).

Im Hinblick auf die Leber wurde gezeigt, dass das ECS besonders die Fibrogenese betreffend von Bedeutung zu sein scheint (Julien et al. 2005; Caraceni et al. 2008). Tatsächlich zeigen Tiermodelle einer chronischen Lebererkrankung eine Mitbeteiligung des ECS am komplexen Prozess der Fibrogenese (Siegmund and Schwabe 2008). Hierbei spielen beide CB-Rezeptoren in gegensätzlicher Weise

zusammen. Fördert einerseits eine Aktivierung des CB1-Rezeptors eine Leberfibrose, so scheint der CB2-Rezeptor andererseits nach Stimulation antifibrogen zu wirken (Julien et al. 2005; Teixeira-Clerc et al. 2006; Munoz-Luque et al. 2008). Diese Eigenschaft des CB2-Rezeptors gab zusammen mit der bekannten antiinflammatorischen Wirkung Anlass dessen Expression und den Einfluss des pQ63R-Polymorphismus hinsichtlich der autoimmunen Erkrankung der primär biliären Zirrhose zu untersuchen. Zwar konnte eine eindeutige Hochregulation beider in der gesunden Leber kaum nachweisbaren CB-Rezeptoren festgestellt werden, jedoch spielte auch hier der ebenfalls von uns untersuchte CB2-Rezeptor-Polymorphismus keine Rolle – weder auf Entstehung noch Ausprägung der Krankheit (Floreani et al. 2010).

Wurden also Nachweise erbracht, die den CB2-Rezeptor-Polymorphismus pQ63R in Verbindung mit bestimmten Krankheitsentitäten bringen und dies mit der geringeren Effizienz dieses Rezeptors begründen, so scheint jedoch dieser Polymorphismus im Rahmen einer CED wie auch bei anderen Erkrankungen nicht von Relevanz zu sein. Dennoch bleibt die Bedeutung des ECS und auch speziell des CB2-Rezeptors bei CED – wie ausführlich in der Einleitung beschrieben – unbestritten. Von Interesse wäre, ob andere SNPs im CB2-Rezeptor-Gen wie der pH316Y- oder der rs2501431- und rs4649124-Polymorphismus, die bei der Suszeptibilität für Osteoporose die höchste Signifikanz erzielten (Karsak et al. 2005), sowie SNPs in anderen Komponenten des ECS, ähnlich dem pP129T Polymorphismus der FAAH in die Ätiopathogenese, oder das phänotypischen Erscheinungsbild einer CED mitwirken.

4.2 Diskussion der Expressionsergebnisse

Den GI-Trakt betreffend wurde der CB2-Rezeptor ursprünglich im Ösophagus, Magen und Ileum der Ratte sowie im Ileum des Meerschweinchens beschrieben (Griffin et al. 1997; Storr et al. 2002). Als Organ der Abwehr mit ausgeprägtem Immunsystem ist dieser Fund des bisweilen hauptsächlich auf Immunzellen vermuteten CB2-Rezeptors im GI-Trakt vielleicht zunächst nicht verwunderlich. Storr et al. 2002 fanden jedoch die CB2-Rezeptor-mRNA in Präparationen der longitudinalen Muskulatur mit dem anhängenden myenterischen Plexus und nicht in der den Hauptteil der Immunzellen tragenden Mukosa. Dies deutete auf die Muskulatur oder Nerven als Hauptort der CB2-Rezeptor Expression hin und konnte durch CB2-Rezeptor-spezifische Antikörpertests, die eine Immunoreaktivität im myenterischen und submukosalen Plexus des humanen und murinen enterischen Nervensystems zeigten, bestätigt werden (Duncan et al. 2008; Wright et al. 2008; Marquez et al. 2009). Marquez et al. 2009 belegten zudem eine Expression in der Muskularis mucosae, der Muskularis externa sowie den Endothelzellen der Blutgefäße. Zwar wurde der Rezeptor ebenfalls auf Plasmazellen und Makrophagen in der Lamina propria nachgewiesen, dennoch widerlegten diese Funde das klassische Dogma, der CB2-Rezeptor würde sich grundsätzlich auf Zellen des Immunsystems befinden.

Die weitere immunhistochemische Analyse der intestinalen Mukosa führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. So konnte eine Studie eine epitheliale Expression des CB2-Rezeptors auch in gesunden humanen Kolon-Präparaten, hier vor allem in den Paneth-Zellen der Krypten, aber auch im resorbierenden Epithel sowie in den Becherzellen nachweisen (Marquez et al. 2009), eine andere Studie jedoch nicht (Wright et al. 2005). Diese zeigte zwar ebenfalls ein schwach positives Signal im Kryptenepithel normaler Kolonschleimhaut, konnte allerdings aufgrund ähnlicher Muster in den Präabsorptions- und Weglasskontrollen sowie der Inkonsistenz der Ergebnisse eine CB2-Rezeptor-Expression des gesunden Kolonepithels formell weder ausschließen noch bestätigen. Beiden gelang jedoch der Nachweis

einer signifikant erhöhten Expression im Epithel bei aktiver CED (Wright et al. 2005; Marquez et al. 2009). Eine genauere Unterteilung der Patienten in akut-aktiver oder ruhender Colitis ulcerosa sowie nach den unterschiedlichen klinischen Schweregraden (Truelove and Witts 1955) durch Marquez et al. 2009 erlaubte einen differenzierten Einblick in diese Hochregulation des CB2-Rezeptors. So zeigten Patienten mit einer milden bis moderaten akuten Colitis ulcerosa einen signifikanten Anstieg der CB2-Rezeptor-Expression, der im chronisch-ruhenden Stadium zurückkehrte oder gar unter den Kontrollwert sank – unabhängig vom ursprünglichen Schweregrad und der eingeleiteten Therapie. Erstaunlicher Weise konnte jedoch bei Patienten mit einer schweren akuten Verlaufsform kein Anstieg weder der CB2-Rezeptor- noch der Expression anderer Komponenten des ECS verzeichnet werden. Vielmehr wurde sogar eine signifikante Verringerung der an der Anandamidsynthese beteiligten NAPE-Phospholipase D im Vergleich zu Kontrollprobanden nachgewiesen (Marquez et al. 2009). Bedenkt man, dass die Aktivierung des CB2-Rezeptors zu einer verminderten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α und IL-8 auch durch Epithelzellen führt (Ihenetu et al. 2003) und dass eine solche Aktivierung zur klinischen sowie mikro- und makroskopischen Besserung führt (Kimball et al. 2006; Storr et al. 2009), so kann von einer relevanten Rolle des CB2-Rezeptors und des ECS hinsichtlich der Antwort auf akute inflammatorische Reize im GI-Trakt ausgegangen werden. Allerdings scheint es bei einer schweren Verlaufsform zu einer Erschöpfung dieses Systems zu kommen oder aber die fehlende Antwort des ECS bedingt erst diese.

Interessanter Weise fanden Rousseaux et al. heraus, dass auch die hochdosierte Gabe des probiotischen Bakteriums Lactobacillus acidophilus zu einer erhöhten Expression des CB2-Rezeptors im intestinalen Epithel von Mäusen und Ratten führt (Rousseaux et al. 2007). Die epitheliale CB2-Rezeptor-Expression stieg von 0 – 20 % in unbehandelten Tieren auf 25 – 60 % nach 15-tägiger Behandlung und senkte signifikant das viszerale Schmerzempfinden. Hierbei kam es zu keinen makroskopischen oder histologischen Veränderungen der Darmwand, wodurch

negative Effekte dieser Behandlung sowie eine lediglich durch entzündliche Vorgänge ausgelöste reaktive Antwort auf diese ausgeschlossen werden konnten. Auch bei 80°C abgetötete Bakterienstämme führten zu denselben Ergebnissen. Da gleichzeitig embryonale $Rela^{-/-}$ Mäuse-Fibroblasten die Fähigkeit verloren, auf eine Lactobacillus acidophilus-Stimulation mit einer Erhöhung der CB2-Rezeptor-Expression zu reagieren, wurde eine Aktivierung des NF-κB-Signalweges hierfür verantwortlich gemacht. Die genauen Mechanismen, die zu einer solchen Induktion führen, bleiben jedoch noch weitesgehend zu klären.

Unsere Versuche an der von einem kolorektalen Karzinom stammenden humanen intestinalen Zellreihe HT-29 zeigen, dass proinflammatorische Reize durch TNF-α, IL-1β, LPS oder IFN-γ zumindest hier keine Induktion des CB2-Rezeptors zur Folge hatten. Auch Rousseaux et al. 2007 erzielten dasselbe Resultat als sie HT-29-Zellen mit TNF-α stimulierten. Dies wäre im Einklang mit der von uns gezeigten fehlenden Korrelation zwischen der CB2-Rezeptor- und der IL-8-Expression, die durch solche proinflammatorischen Reize induziert wird. Wie Ihenetu et al. konnten wir bestätigen, dass der CB2-Rezeptor in dieser Zellreihe durchaus exprimiert wird (Ihenetu et al. 2003). Für andere humane kolorektale Karzinomzellreihen wie DLD-1 sowie für Adenome als auch Karzinome des Kolons in vivo wurde ebenfalls eine CB2-Rezeptor-Expression festgestellt (Ligresti et al. 2003). Dieser scheint hier einen antiproliferativen, apoptoseinduzierenden Effekt zu entfalten und sogar hochreguliert zu sein (Ligresti et al. 2003; Cianchi et al. 2008; Alexander et al. 2009; Pisanti et al. 2009). Inwiefern dadurch eine weitere Induzierbarkeit beeinflusst wird, ist fraglich, gleichwohl die von Rousseaux et al. 2007 gezeigte Expressionserhöhung des CB2-Rezeptors durch Lactobacillus acidophilus-Stimulation auch an HT-29-Zellen stattfand und somit dies unwahrscheinlich macht.

Bei den von uns durchgeführten Untersuchungen der endoskopisch gewonnenen Darmbiopsien verglichen wir Biopsien aus makroskopisch gesunden Arealen mit

denen aus entzündlich veränderten Bereichen der Darmwand von ein und demselben Patienten. Dies steht im Gegensatz zu den Expressionsanalysen durch Wright et al. 2005 und Marquez et al. 2009, die eine Gruppe akut erkrankter Patienten einem Kontrollkollektiv gesunder Probanden gegenüberstellte. Zudem verwendeten sie die Methode der antikörpergestützten Immunhistochemie und nicht – wie wir – eine RT-PCR der zuvor als Ganzes gelösten und gereinigten Biopsie. Auch wir stellten eine signifikante Erhöhung der Expression des CB2-Rezeptors in entzündlichen Abschnitten der Darmmukosa von Morbus Crohn-Patienten fest. Leider gelang uns dieser Nachweis für Colitis ulcerosa-Patienten nicht. Des Weiteren fallen bei unseren Versuchen inkonstante Ergebnisse mit hohen Standardabweichungen auf. Hierfür kommen mehrere mögliche Ursachen in Betracht. Das Hauptproblem liegt sicherlich in der verwendeten Methodik bei der wir – wie oben beschrieben – Biopsien eines Patienten in einem akuten Schub einer CED entnahmen und vollständig der RT-PCR zuführten. Die exakte Tiefe bzw. der genaue Inhalt einer Biopsie kann dabei ohne histologische Aufarbeitung nicht festgestellt werden. Sie kann lediglich bis in die Mukosa reichen oder gar die nerven- sowie gefäßreiche Submukosa miteinbeziehen. Die Menge der beinhalteten Nerven, Blutgefäße oder auch Zellen des Immunsystems kann hierbei erheblich schwanken. Findet man nun hohe Expressionen des CB2-Rezeptors sowohl auf Immunzellen wie auch dem Endothel der Blutgefäße und den Neuronen des submukosalen Plexus (Duncan et al. 2008; Wright et al. 2008; Marquez et al. 2009), so ist naheliegend, dass die „blinde“ Verwendung von Biopsien durchaus zu inkonstanten Ergebnissen mit großer Streuung in der empfindlichen RT-PCR führen kann. Auch Wright et al. 2005 hatten bei der Untersuchung der normalen, gesunden Kolonschleimhaut trotz immunhistochemischer Aufarbeitung mit inkonstanten Ergebnissen zu kämpfen. Diese erklärten Sie mit einer möglichen normalen Variation des entzündlichen Status des GI-Trakts, der weder makroskopisch noch mikroskopisch ersichtlich ist. Nun stammen die von uns verwendeten Biopsien aus nur makroskopisch gesunden Bereichen erkrankter Patienten. Gerade hier ist eine solche Variation, bei dem sich augenscheinlich normale Kolonschleimhaut

bereits in einem leicht entzündlichen Zustand befindet durchaus denkbar. Die aus Tabelle 3-5 ersichtliche, teilweise große Variabilität des IL-8-Quotienten aus entzündlichen und nicht entzündlichen Arealen bestärkt möglicherweise diese These.

Die von uns durchgeführte RT-PCR erwies sich zwar als effizient und dadurch aussagekräftig, jedoch sei als letztes noch anzumerken, dass das von uns verwendete Verfahren zur Normalisierung der Ergebnisse anhand der β-Aktin-Expression nicht unangefochten ist. Die Verwendung ist zwar gebräuchlich, allerdings konnte gezeigt werden, dass die Expression durchaus nicht immer konstant ist und somit falsche Ergebnisse auftreten können (Huggett et al. 2005).

Auch wenn wir lediglich für Morbus Crohn-Patienten eine Hochregulation des CB2-Rezeptors im akut entzündlichen Status nachweisen konnten, halte ich eine generelle Induktion dessen bei CED – wie sie Wright und Marquez et al. nachweisen konnten – für sehr wahrscheinlich (Wright et al. 2005; Marquez et al. 2009). Nachdem wir einige proinflammatorische Zytokine und das Endotoxin LPS als Ursache, zumindest bei HT-29-Zellen, ausschließen konnten, bleibt die Frage offen, wie diese Expressionserhöhung reguliert wird.

5 Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa haben bei weltweit steigenden Inzidenzen zunehmend an Relevanz gewonnen. Ätiologisch scheint es in genetisch prädisponierten Personen durch den Einfluss von Umweltfaktoren zu einer Dysregulation des Immunsystems im Sinne eines Toleranzverlusts gegenüber Kommensalier oder Antigenen aus der Nahrung zu kommen. Durch die Einführung genomweiter Assoziationsstudien haben genetische Faktoren einen besonderen Stellenwert erlangt. Inzwischen sind eine Reihe genetischer Polymorphismen entdeckt worden, die die Reaktion auf Umweltfaktoren oder die Dysregulation des Immunsystems und somit die Krankheitssuszeptibilität für CED beeinflussen. Unsere Studie befasste sich mit dem pQ63R Polymorphismus des dem ECS zugehörigen CB2-Rezeptors. Die Strukturanalyse einiger Cannabinoide führte in den 90er Jahren zur Entdeckung der spezifisch Cannabinoid-bindenden CB-Rezeptoren sowie darauffolgend der zugehörigen endogenen Liganden, den sogenannten Endocannabinoiden. Seither konnten dem ECS etliche regulatorische Funktionen zugeschrieben werden. Im GI-Trakt betreffen diese vor allem die Darmmotilität, Sekretion, Sensitivität sowie den entzündlichen Status. Der CB2-Rezeptor wird dabei überwiegend auf Zellen des Immunsystems exprimiert, aber auch auf Epithel, Endothel sowie Neuronen und scheint hier hauptsächlich über eine Reduktion der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine antiinflammatorisch zu wirken. Sipe et al. 2005 konnten zeigen das der pQ63R Polymorphismus dieses Rezeptors nicht nur in seinen immunmodulatorischen Effekten abgeschwächt, sondern somit auch die Suszeptibilität für einige Autoimmunerkrankungen erhöht ist. Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, diesen Polymorphismus mittels PCR-Untersuchung in Bezug auf die Anfälligkeit und phänotypische Ausprägung einer CED hin zu untersuchen. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass dieser CB2-Rezeptor-Polymorphismus im Rahmen einer CED keine Rolle zu spielen scheint.

Ebenfalls von Interesse war, ob es in entzündlich veränderten Bereichen der Darmmukosa von CED-Patienten zu einer Hochregulation des antiinflammatorisch wirkenden CB2-Rezeptors kommt und ob eine solche Expressionserhöhung durch proinflammatorische Reize wie TNF-α, INF-γ, IL-1β oder LPS induziert werden kann. Hierzu bedienten wir uns der RT-PCR-Technik und untersuchten Biopsien aus entzündeten und nicht entzündeten Arealen von CED-Patienten sowie die CB2-Rezeptor-Expression der humanen intestinalen Zellreihe HT-29 nach proinflammatorischer Stimulation im zeitlichen Verlauf. Für Morbus Crohn-Patienten konnten wir signifikant erhöhte Expressionswerte in akut entzündlichen Biopsien verzeichnen, für Colitis ulcerosa-Patienten jedoch nicht. Anderen Studien gelang allerdings der Nachweis einer epithelialen Hochregulation des CB2-Rezeptors für beide Patientengruppen im akut-aktiven Schub. Dies geschah mittels der sensitiveren Methode der antikörpergestützten Immunhistochemie, wodurch wahrscheinlich von einer vermehrten Expression im Rahmen einer aktiven CED auszugehen ist. Wie diese reguliert wird, bleibt dennoch weiterhin unklar, nachdem unsere Versuche an der HT-29-Zellreihe keine wesentlichen Ergebnisse lieferten.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Die T-Zell Differenzierung und seine Zytokine (Abraham and Cho 2009; Brand 2009)..... 17

Abbildung 1-2: CED als multifaktorielles Model in Anlehnung an (Kaser et al. 2010) 21

Abbildung 1-3: Strukturformeln wichtiger natürlicher Cannabinoide (Howlett et al. 2002) 26

Abbildung 1-4: Strukturformeln der Endocannabinoide (Di Marzo 2009) 28

Abbildung 1-5: 3D-Modell des CB2-Rezeptors. (Xie et al. 2003) 31

Abbildung 1-6: Der CB2-Rezeptor mitsamt seiner Polymorphismen (Carrasquer et al. 2010) 36

Abbildung 2-1: Darstellung der möglichen Genotypen 44

Abbildung 3-1: Standardkurve der RT-PCR für den CB2-Rezeptor 64

Abbildung 3-2: Poststimulativer Verlauf der relativen CB2-Rezeptor-mRNA Expression..... 65

Abbildung 3-3: Relative CB2-Rezeptor-Expression der Morbus Crohn-Patienten 68

Abbildung 3-4: CB2-Rezeptor/IL-8 Korrelation der Morbus Crohn-Patienten 68

Abbildung 3-5: Relative CB2-Rezeptor-Expression der Colitis ulcerosa-Patienten 69

Abbildung 3-6: CB2-Rezeptor/IL-8 Korrelation der Colitis ulcerosa-Patienten .. 69

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Risikomarker für CED in Anlehnung an (Göke et al. 2007) 11

Tabelle 1-2: Suszeptibilitätsloci für Morbus Crohn in Anlehnung an (Barrett et al. 2008) 12

Tabelle 1-3: PRRs und PAMPs in Anlehnung an (Kumagai and Akira 2010) 15

Tabelle 1-4: Einteilung der CED in Anlehnung an (Silverberg et al. 2005).....24

Tabelle 1-5: Expression und Funktionen des CB2-Rezeptors nach (Patel et al. 2010) 32

Tabelle 2-1: Studienpopulation.....39

Tabelle 2-2: Blood and Body Fluid Spin Protocol In Anlehnung an das QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook (Quiagen 2010) 41

Tabelle 2-3: Für die PCR Verwendete Primer 42

Tabelle 2-4: PCR-Ansatz 43

Tabelle 2-5: Einstellungen am Thermocycler.....43

Tabelle 2-6: Schnittstelle der Restriktionsendonuklease BsrFI.....44

Tabelle 2-7: Reaktionsgemisch zum Verdau des PCR-Produkts.....44

Tabelle 2-8: Reaktionsgemisch der Omniscript Reversen Transkriptase 49

Tabelle 2-9: Formale Zusammenhänge der RT-PCR 50

Tabelle 2-10: Reaktionsgemisch der RT-PCR 51

Tabelle 2-11: Für die RT-PCR verwendete Primer.....51

Tabelle 2-12: Einstellungen der RT-PCR.....52

Tabelle 3-1: Verteilung des pQ63R CB2-Rezeptor-Polymorphismus 57

Tabelle 3-2: Genotyp-Phänotyp-Korrelation der Morbus Crohn-Patienten 59

Tabelle 3-3: Genotyp-Phänotyp-Korrelation der Colitis ulcerosa-Patienten..... 61

Tabelle 3-4: C_t-Werte der einzelnen cDNA Verdünnungen 63

Tabelle 3-5: Expressionsquotienten aus entzündlichen und nicht-entzündlichen Biopsien für IL-8 und den CB2-Rezeptor..... 67

8 Referenzen

Abraham, C. and J. H. Cho (2009). "IL-23 and autoimmunity: new insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease." Annu Rev Med **60**: 97-110.

Adami, M., P. Frati, S. Bertini, A. Kulkarni-Narla, D. R. Brown, G. de Caro, G. Coruzzi and G. Soldani (2002). "Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach." Br J Pharmacol **135**(7): 1598-1606.

Adams, R., S. Loewe, C. Jelinek and H. Wolff (1941). "Tetrahydrocannabinol homologs with marihuana activity." J Am Chem Soc **63**: 1971-1973.

Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.

Alexander, A., P. F. Smith and R. J. Rosengren (2009). "Cannabinoids in the treatment of cancer." Cancer Lett **285**(1): 6-12.

Anderson, C. A., D. C. Massey, J. C. Barrett, N. J. Prescott, M. Tremelling, S. A. Fisher, R. Gwilliam, J. Jacob, E. R. Nimmo, H. Drummond, C. W. Lees, C. M. Onnie, C. Hanson, K. Blaszczyk, R. Ravindrarajah, S. Hunt, D. Varma, N. Hammond, G. Lewis, H. Attlesey, N. Watkins, W. Ouwehand, D. Strachan, W. McArdle, C. M. Lewis, A. Lobo, J. Sanderson, D. P. Jewell, P. Deloukas, J. C. Mansfield, C. G. Mathew, J. Satsangi and M. Parkes (2009). "Investigation of Crohn's disease risk loci in ulcerative colitis further defines their molecular relationship." Gastroenterology **136**(2): 523-529 e523.

Anderson, P. (2008). "Post-transcriptional control of cytokine production." Nat Immunol **9**(4): 353-359.

Ashton, J. C. and M. Glass (2007). "The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration." Curr Neuropharmacol **5**(2): 73-80.

Bab, I., O. Ofek, J. Tam, J. Rehnelt and A. Zimmer (2008). "Endocannabinoids and the regulation of bone metabolism." J Neuroendocrinol **20 Suppl 1**: 69-74.

Bab, I. and A. Zimmer (2008). "Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass." Br J Pharmacol **153**(2): 182-188.

Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis (1992). "Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine." FEBS Lett **307**(1): 97-101.

Barnich, N., F. A. Carvalho, A. L. Glasser, C. Darcha, P. Jantscheff, M. Allez, H. Peeters, G. Bommelaer, P. Desreumaux, J. F. Colombel and A. Darfeuille-Michaud (2007). "CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease." J Clin Invest **117**(6): 1566-1574.

Barrett, J. C., S. Hansoul, D. L. Nicolae, J. H. Cho, R. H. Duerr, J. D. Rioux, S. R. Brant, M. S. Silverberg, K. D. Taylor, M. M. Barmada, A. Bitton, T. Dassopoulos, L. W. Datta, T. Green, A. M. Griffiths, E. O. Kistner, M. T. Murtha, M. D. Regueiro, J. I. Rotter, L. P. Schumm, A. H. Steinhart, S. R. Targan, R. J. Xavier, C. Libioulle, C. Sandor, M. Lathrop, J. Belaiche, O. Dewit, I. Gut, S. Heath, D. Laukens, M. Mni, P. Rutgeerts, A. Van Gossum, D. Zelenika, D. Franchimont, J. P. Hugot, M. de Vos, S. Vermeire, E. Louis, L. R. Cardon, C. A. Anderson, H. Drummond, E. Nimmo, T. Ahmad, N. J. Prescott, C. M. Onnie, S. A. Fisher, J. Marchini, J. Ghori, S. Bumpstead, R. Gwilliam, M. Tremelling, P. Deloukas, J. Mansfield, D. Jewell, J. Satsangi, C. G. Mathew, M. Parkes, M. Georges and M. J. Daly (2008). "Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease." Nat Genet **40**(8): 955-962.

Beaumont, H., J. Jensen, A. Carlsson, M. Ruth, A. Lehmann and G. Boeckxstaens (2009). "Effect of delta9-tetrahydrocannabinol, a cannabinoid receptor agonist, on the triggering of transient lower oesophageal sphincter relaxations in dogs and humans." Br J Pharmacol **156**(1): 153-162.

Bellocchio, L., C. Cervino, R. Pasquali and U. Pagotto (2008). "The endocannabinoid system and energy metabolism." J Neuroendocrinol **20**(6): 850-857.

Beltramo, M., N. Stella, A. Calignano, S. Y. Lin, A. Makriyannis and D. Piomelli (1997). "Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition." Science **277**(5329): 1094-1097.

Bisogno, T., F. Howell, G. Williams, A. Minassi, M. G. Cascio, A. Ligresti, I. Matias, A. Schiano-Moriello, P. Paul, E. J. Williams, U. Gangadharan, C. Hobbs, V. Di Marzo and P. Doherty (2003). "Cloning of the first sn1-DAG

lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain." J Cell Biol **163**(3): 463-468.

Bisogno, T., D. Melck, M. Bobrov, N. M. Gretskaya, V. V. Bezuglov, L. De Petrocellis and V. Di Marzo (2000). "N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo." Biochem J **351 Pt 3**: 817-824.

Bisogno, T., N. Sepe, D. Melck, S. Maurelli, L. De Petrocellis and V. Di Marzo (1997). "Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells." Biochem J **322 (Pt 2)**: 671-677.

Boirivant, M., M. Marini and G. Di Felice (1999). "[Functional status of intestinal t lymphocytes, regulatory mechanisms, and their variations in the course of Crohn disease and ulcerative colitis]." Ann Ist Super Sanita **35**(2): 283-289.

Bonen, D. K. and J. H. Cho (2003). "The genetics of inflammatory bowel disease." Gastroenterology **124**(2): 521-536.

Borm, M. E., A. A. van Bodegraven, C. J. Mulder, G. Kraal and G. Bouma (2005). "A NFKB1 promoter polymorphism is involved in susceptibility to ulcerative colitis." Int J Immunogenet **32**(6): 401-405.

Bouquet, J. (1912). "Contribution à l'étude du chanvre indien." Lyon: Paul Legendre & Cie.

Brand, S. (2009). "Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease." Gut **58**(8): 1152-1167.

Brand, S., F. Beigel, T. Olszak, K. Zitzmann, S. T. Eichhorst, J. M. Otte, H. Diepolder, A. Marquardt, W. Jagla, A. Popp, S. Leclair, K. Herrmann, J. Seiderer, T. Ochsenkuhn, B. Goke, C. J. Auernhammer and J. Dambacher (2006). "IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(4): G827-838.

Brand, S., K. Hofbauer, J. Dambacher, F. Schnitzler, T. Staudinger, S. Pfennig, J. Seiderer, C. Tillack, A. Konrad, B. Goke, T. Ochsenkuhn and P. Lohse (2006). "Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn's

disease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease Phenotype." Am J Gastroenterol **101**(1): 99-106.

Braunstein, J., L. Qiao, F. Autschbach, G. Schurmann and S. Meuer (1997). "T cells of the human intestinal lamina propria are high producers of interleukin-10." Gut **41**(2): 215-220.

Bruss, M., H. Bonisch, M. Buhlen, M. M. Nothen, P. Propping and M. Gothert (1999). "Modified ligand binding to the naturally occurring Cys-124 variant of the human serotonin 5-HT1B receptor." Pharmacogenetics **9**(1): 95-102.

Burstein, S. H., M. Karst, U. Schneider and R. B. Zurier (2004). "Ajulemic acid: A novel cannabinoid produces analgesia without a "high"." Life Sci **75**(12): 1513-1522.

Cabral, G. A. and D. A. Dove Pettit (1998). "Drugs and immunity: cannabinoids and their role in decreased resistance to infectious disease." J Neuroimmunol **83**(1-2): 116-123.

Cadas, H., E. di Tomaso and D. Piomelli (1997). "Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain." J Neurosci **17**(4): 1226-1242.

Calkins, B. M. (1989). "A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease." Dig Dis Sci **34**(12): 1841-1854.

Caraceni, P., M. Domenicali and M. Bernardi (2008). "The endocannabinoid system and liver diseases." J Neuroendocrinol **20 Suppl 1**: 47-52.

Carayon, P., J. Marchand, D. Dussossoy, J. M. Derocq, O. Jbilo, A. Bord, M. Bouaboula, S. Galiegue, P. Mondiere, G. Penarier, G. L. Fur, T. Defrance and P. Casellas (1998). "Modulation and functional involvement of CB2 peripheral cannabinoid receptors during B-cell differentiation." Blood **92**(10): 3605-3615.

Cario, E. and D. K. Podolsky (2000). "Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease." Infect Immun **68**(12): 7010-7017.

Carrasquer, A., N. M. Nebane, W. M. Williams and Z. H. Song (2010). "Functional consequences of nonsynonymous single nucleotide

polymorphisms in the CB2 cannabinoid receptor." Pharmacogenet Genomics **20**(3): 157-166.

Cho, J. H., D. L. Nicolae, L. H. Gold, C. T. Fields, M. C. LaBuda, P. M. Rohal, M. R. Pickles, L. Qin, Y. Fu, J. S. Mann, B. S. Kirschner, E. W. Jabs, J. Weber, S. B. Hanauer, T. M. Bayless and S. R. Brant (1998). "Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7502-7507.

Cho, J. H., D. L. Nicolae, R. Ramos, C. T. Fields, K. Rabenau, S. Corradino, S. R. Brant, R. Espinosa, M. LeBeau, S. B. Hanauer, J. Bodzin and D. K. Bonen (2000). "Linkage and linkage disequilibrium in chromosome band 1p36 in American Chaldeans with inflammatory bowel disease." Hum Mol Genet **9**(9): 1425-1432.

Cianchi, F., L. Papucci, N. Schiavone, M. Lulli, L. Magnelli, M. C. Vinci, L. Messerini, C. Manera, E. Ronconi, P. Romagnani, M. Donnini, G. Perigli, G. Trallori, E. Tanganelli, S. Capaccioli and E. Masini (2008). "Cannabinoid receptor activation induces apoptosis through tumor necrosis factor alpha-mediated ceramide de novo synthesis in colon cancer cells." Clin Cancer Res **14**(23): 7691-7700.

Condie, R., A. Herring, W. S. Koh, M. Lee and N. E. Kaminski (1996). "Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase-mediated signal transduction and interleukin 2 (IL-2) expression in the murine T-cell line, EL4.IL-2." J Biol Chem **271**(22): 13175-13183.

Cong, Y., S. L. Brandwein, R. P. McCabe, A. Lazenby, E. H. Birkenmeier, J. P. Sundberg and C. O. Elson (1998). "CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease." J Exp Med **187**(6): 855-864.

Cornish, J. A., E. Tan, C. Simillis, S. K. Clark, J. Teare and P. P. Tekkis (2008). "The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis." Am J Gastroenterol **103**(9): 2394-2400.

Cravatt, B. F., D. K. Giang, S. P. Mayfield, D. L. Boger, R. A. Lerner and N. B. Gilula (1996). "Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides." Nature **384**(6604): 83-87.

Crawford, D. C. and D. A. Nickerson (2005). "Definition and clinical importance of haplotypes." Annu Rev Med **56**: 303-320.

Crohn, B. B., L. Ginzburg and G. D. Oppenheimer (2000). "Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932." Mt Sinai J Med **67**(3): 263-268.

Cutolo, M., S. Capellino, A. Sulli, B. Serioli, M. E. Secchi, B. Villaggio and R. H. Straub (2006). "Estrogens and autoimmune diseases." Ann N Y Acad Sci **1089**: 538-547.

Dambacher, J., F. Beigel, K. Zitzmann, E. N. De Toni, B. Goke, H. M. Diepolder, C. J. Auernhammer and S. Brand (2009). "The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation." Gut **58**(9): 1207-1217.

Dassopoulos, T. (2001). "Diagnostic methodologies: serology, endoscopy, and radiology." Curr Gastroenterol Rep **3**(6): 491-499.

De Hertogh, G., J. Aerssens, K. P. Geboes and K. Geboes (2008). "Evidence for the involvement of infectious agents in the pathogenesis of Crohn's disease." World J Gastroenterol **14**(6): 845-852.

Dechairo, B., C. Dimon, D. van Heel, I. Mackay, M. Edwards, P. Scambler, D. Jewell, L. Cardon, N. Lench and A. Carey (2001). "Replication and extension studies of inflammatory bowel disease susceptibility regions confirm linkage to chromosome 6p (IBD3)." Eur J Hum Genet **9**(8): 627-633.

Devane, W. A., F. A. Dysarz, 3rd, M. R. Johnson, L. S. Melvin and A. C. Howlett (1988). "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain." Mol Pharmacol **34**(5): 605-613.

Devane, W. A., L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger and R. Mechoulam (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." Science **258**(5090): 1946-1949.

Di Marzo, V. (2008). "Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?" Nat Rev Drug Discov **7**(5): 438-455.

Di Marzo, V. (2009). "The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation." Pharmacol Res **60**(2): 77-84.

Di Marzo, V., M. Bifulco and L. De Petrocellis (2004). "The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation." Nat Rev Drug Discov **3**(9): 771-784.

Di Marzo, V., L. De Petrocellis, T. Sugiura and K. Waku (1996). "Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells." Biochem Biophys Res Commun **227**(1): 281-288.

Di Marzo, V., A. Fontana, H. Cadas, S. Schinelli, G. Cimino, J. C. Schwartz and D. Piomelli (1994). "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons." Nature **372**(6507): 686-691.

Di Marzo, V. and A. A. Izzo (2006). "Endocannabinoid overactivity and intestinal inflammation." Gut **55**(10): 1373-1376.

Dinh, T. P., D. Carpenter, F. M. Leslie, T. F. Freund, I. Katona, S. L. Sensi, S. Kathuria and D. Piomelli (2002). "Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10819-10824.

Duerr, R. H., M. M. Barmada, L. Zhang, S. Davis, R. A. Preston, L. J. Chensny, J. L. Brown, G. D. Ehrlich, D. E. Weeks and C. E. Aston (1998). "Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12." Am J Hum Genet **63**(1): 95-100.

Duerr, R. H., M. M. Barmada, L. Zhang, R. Pfutzer and D. E. Weeks (2000). "High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12." Am J Hum Genet **66**(6): 1857-1862.

Duncan, M., J. S. Davison and K. A. Sharkey (2005). "Review article: endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system." Aliment Pharmacol Ther **22**(8): 667-683.

Duncan, M., A. Mouihate, K. Mackie, C. M. Keenan, N. E. Buckley, J. S. Davison, K. D. Patel, Q. J. Pittman and K. A. Sharkey (2008). "Cannabinoid CB2 receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide-treated rats." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **295**(1): G78-G87.

Erridge, C., S. H. Duncan, S. Bereswill and M. M. Heimesaat (2010). "The induction of colitis and ileitis in mice is associated with marked increases

in intestinal concentrations of stimulants of TLRs 2, 4, and 5." PLoS One **5**(2): e9125.

Fegley, D., S. Kathuria, R. Mercier, C. Li, A. Goutopoulos, A. Makriyannis and D. Piomelli (2004). "Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(23): 8756-8761.

Felder, J. B., B. I. Korelitz, R. Rajapakse, S. Schwarz, A. P. Horatagis and G. Gleim (2000). "Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study." Am J Gastroenterol **95**(8): 1949-1954.

Fezza, F., T. Bisogno, A. Minassi, G. Appendino, R. Mechoulam and V. Di Marzo (2002). "Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues." FEBS Lett **513**(2-3): 294-298.

Fisher, S. A., M. Tremelling, C. A. Anderson, R. Gwilliam, S. Bumpstead, N. J. Prescott, E. R. Nimmo, D. Massey, C. Berzuini, C. Johnson, J. C. Barrett, F. R. Cummings, H. Drummond, C. W. Lees, C. M. Onnie, C. E. Hanson, K. Blaszczyk, M. Inouye, P. Ewels, R. Ravindrarajah, A. Keniry, S. Hunt, M. Carter, N. Watkins, W. Ouwehand, C. M. Lewis, L. Cardon, A. Lobo, A. Forbes, J. Sanderson, D. P. Jewell, J. C. Mansfield, P. Deloukas, C. G. Mathew, M. Parkes and J. Satsangi (2008). "Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease." Nat Genet **40**(6): 710-712.

Floreani, A., R. Lazzari, V. Macchi, A. Porzionato, A. Variola, D. Colavito, A. Leon, M. Guido, V. Baldo, R. De Caro and N. V. Bergasa (2010). "Hepatic expression of endocannabinoid receptors and their novel polymorphisms in primary biliary cirrhosis." J Gastroenterol **45**(1): 68-76.

Fowler, C. J. and S. O. Jacobsson (2002). "Cellular transport of anandamide, 2-arachidonoylglycerol and palmitoylethanolamide--targets for drug development?" Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **66**(2-3): 193-200.

Franchimont, D., S. Vermeire, H. El Housni, M. Pierik, K. Van Steen, T. Gustot, E. Quertinmont, M. Abramowicz, A. Van Gossum, J. Deviere and P. Rutgeerts (2004). "Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is

associated with Crohn's disease and ulcerative colitis." Gut **53**(7): 987-992.

Frank, D. N., A. L. St Amand, R. A. Feldman, E. C. Boedeker, N. Harpaz and N. R. Pace (2007). "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(34): 13780-13785.

Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba and Y. Fujiyama (2003). "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." Gut **52**(1): 65-70.

Fukata, M., A. S. Vamadevan and M. T. Abreu (2009). "Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders." Semin Immunol **21**(4): 242-253.

Fuss, I. J., F. Heller, M. Boirivant, F. Leon, M. Yoshida, S. Fichtner-Feigl, Z. Yang, M. Exley, A. Kitani, R. S. Blumberg, P. Mannon and W. Strober (2004). "Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis." J Clin Invest **113**(10): 1490-1497.

Fuss, I. J., M. Neurath, M. Boirivant, J. S. Klein, C. de la Motte, S. A. Strong, C. Fiocchi and W. Strober (1996). "Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5." J Immunol **157**(3): 1261-1270.

Galiegue, S., S. Mary, J. Marchand, D. Dussossoy, D. Carriere, P. Carayon, M. Bouaboula, D. Shire, G. Le Fur and P. Casellas (1995). "Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations." Eur J Biochem **232**(1): 54-61.

Gasche, C., J. Scholmerich, J. Brynskov, G. D'Haens, S. B. Hanauer, E. J. Irvine, D. P. Jewell, D. Rachmilewitz, D. B. Sachar, W. J. Sandborn and L. R. Sutherland (2000). "A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998." Inflamm Bowel Dis **6**(1): 8-15.

Gebremedhin, D., A. R. Lange, W. B. Campbell, C. J. Hillard and D. R. Harder (1999). "Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle

functions to inhibit L-type Ca2+ channel current." Am J Physiol **276**(6 Pt 2): H2085-2093.

Geijtenbeek, T. B. and S. I. Gringhuis (2009). "Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses." Nat Rev Immunol **9**(7): 465-479.

Gent, A. E., M. D. Hellier, R. H. Grace, E. T. Swarbrick and D. Coggon (1994). "Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy." Lancet **343**(8900): 766-767.

Gerard, C. M., C. Mollereau, G. Vassart and M. Parmentier (1991). "Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis." Biochem J **279 (Pt 1)**: 129-134.

Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, L. A. Lyakh, G. Batoni, S. Esin, R. T. Winkler-Pickett, M. R. Consolaro, M. De Marchi, D. Giachino, A. Robbiano, M. Astegiano, A. Sambataro, R. A. Kastelein, G. Carra and G. Trinchieri (2008). "Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells." J Exp Med **205**(6): 1447-1461.

Gionchetti, P., F. Rizzello, U. Helwig, A. Venturi, K. M. Lammers, P. Brigidi, B. Vitali, G. Poggioli, M. Miglioli and M. Campieri (2003). "Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial." Gastroenterology **124**(5): 1202-1209.

Glass, M., M. Dragunow and R. L. Faull (1997). "Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain." Neuroscience **77**(2): 299-318.

Godlewski, G., L. Offertaler, J. A. Wagner and G. Kunos (2009). "Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119." Prostaglandins Other Lipid Mediat **89**(3-4): 105-111.

Göke, B., C. Beglinger and S. Brand (2007). Gastroenterologie systematisch. Bremen, Uni-Med.

Gorter, R. (1991). "Management of anorexia-cachexia associated with cancer and HIV infection." Oncology (Williston Park) **5**(9 Suppl): 13-17.

Green, K. (1998). "Marijuana smoking vs cannabinoids for glaucoma therapy." Arch Ophthalmol **116**(11): 1433-1437.

Griffin, G., S. R. Fernando, R. A. Ross, N. G. McKay, M. L. Ashford, D. Shire, J. W. Huffman, S. Yu, J. A. Lainton and R. G. Pertwee (1997). "Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals." Eur J Pharmacol **339**(1): 53-61.

Grinspoon, L. (1999). "The future of medical marijuana." Forsch Komplementarmed **6 Suppl 3**: 40-43.

Guzman, M., C. Sanchez and I. Galve-Roperh (2002). "Cannabinoids and cell fate." Pharmacol Ther **95**(2): 175-184.

Hampe, J., A. Cuthbert, P. J. Croucher, M. M. Mirza, S. Mascheretti, S. Fisher, H. Frenzel, K. King, A. Hasselmeyer, A. J. MacPherson, S. Bridger, S. van Deventer, A. Forbes, S. Nikolaus, J. E. Lennard-Jones, U. R. Foelsch, M. Krawczak, C. Lewis, S. Schreiber and C. G. Mathew (2001). "Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations." Lancet **357**(9272): 1925-1928.

Hampe, J., S. H. Shaw, R. Saiz, N. Leysens, A. Lantermann, S. Mascheretti, N. J. Lynch, A. J. MacPherson, S. Bridger, S. van Deventer, P. Stokkers, P. Morin, M. M. Mirza, A. Forbes, J. E. Lennard-Jones, C. G. Mathew, M. E. Curran and S. Schreiber (1999). "Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p." Am J Hum Genet **65**(6): 1647-1655.

Hanus, L., S. Abu-Lafi, E. Fride, A. Breuer, Z. Vogel, D. E. Shalev, I. Kustanovich and R. Mechoulam (2001). "2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3662-3665.

Herkenham, M., A. B. Lynn, M. R. Johnson, L. S. Melvin, B. R. de Costa and K. C. Rice (1991). "Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study." J Neurosci **11**(2): 563-583.

Herring, A. C., W. S. Koh and N. E. Kaminski (1998). "Inhibition of the cyclic AMP signaling cascade and nuclear factor binding to CRE and kappaB elements by cannabinol, a minimally CNS-active cannabinoid." Biochem Pharmacol **55**(7): 1013-1023.

Hildebrand, H., P. Malmborg, J. Askling, A. Ekbom and S. M. Montgomery (2008). "Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease." Scand J Gastroenterol **43**(8): 961-966.

Hoffmann, J. C. (2009). Chronisch entzündliche Darmerkrankungen : Handbuch für Klinik und Praxis. Stuttgart ; New York, Thieme.

Hosking, R. D. and J. P. Zajicek (2008). "Therapeutic potential of cannabis in pain medicine." Br J Anaesth **101**(1): 59-68.

Howlett, A. C. (2005). "Cannabinoid receptor signaling." Handb Exp Pharmacol(168): 53-79.

Howlett, A. C., F. Barth, T. I. Bonner, G. Cabral, P. Casellas, W. A. Devane, C. C. Felder, M. Herkenham, K. Mackie, B. R. Martin, R. Mechoulam and R. G. Pertwee (2002). "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors." Pharmacol Rev **54**(2): 161-202.

Huang, C. C., S. W. Lo and K. S. Hsu (2001). "Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons." J Physiol **532**(Pt 3): 731-748.

Huang, S. M., T. Bisogno, M. Trevisani, A. Al-Hayani, L. De Petrocellis, F. Fezza, M. Tognetto, T. J. Petros, J. F. Krey, C. J. Chu, J. D. Miller, S. N. Davies, P. Geppetti, J. M. Walker and V. Di Marzo (2002). "An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8400-8405.

Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin and A. Zumla (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." Genes Immun **6**(4): 279-284.

Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou and G. Thomas (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 599-603.

Ihenetu, K., A. Molleman, M. E. Parsons and C. J. Whelan (2003). "Inhibition of interleukin-8 release in the human colonic epithelial cell line HT-29 by cannabinoids." Eur J Pharmacol **458**(1-2): 207-215.

Invitrogen. (2007). "TRIzol Reagent." Retrieved 22.06.2010, from http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/15596018%20pps%20Trizol%20Reagent%20061207.pdf.

Iqbal, N., J. R. Oliver, F. H. Wagner, A. S. Lazenby, C. O. Elson and C. T. Weaver (2002). "T helper 1 and T helper 2 cells are pathogenic in an antigen-specific model of colitis." J Exp Med **195**(1): 71-84.

Ishac, E. J., L. Jiang, K. D. Lake, K. Varga, M. E. Abood and G. Kunos (1996). "Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves." Br J Pharmacol **118**(8): 2023-2028.

Ishikawa, E., T. Ishikawa, Y. S. Morita, K. Toyonaga, H. Yamada, O. Takeuchi, T. Kinoshita, S. Akira, Y. Yoshikai and S. Yamasaki (2009). "Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle." J Exp Med **206**(13): 2879-2888.

Izzo, A. A. and M. Camilleri (2008). "Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects." Gut **57**(8): 1140-1155.

Izzo, A. A. and A. A. Coutts (2005). "Cannabinoids and the digestive tract." Handb Exp Pharmacol(168): 573-598.

Jones, J. D., S. T. Carney, K. E. Vrana, D. C. Norford and A. C. Howlett (2008). "Cannabinoid receptor-mediated translocation of NO-sensitive guanylyl cyclase and production of cyclic GMP in neuronal cells." Neuropharmacology **54**(1): 23-30.

Julien, B., P. Grenard, F. Teixeira-Clerc, J. T. Van Nhieu, L. Li, M. Karsak, A. Zimmer, A. Mallat and S. Lotersztajn (2005). "Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver." Gastroenterology **128**(3): 742-755.

Kalant, H. (2001). "Medicinal use of cannabis: history and current status." Pain Res Manag **6**(2): 80-91.

Kaminski, N. E., W. S. Koh, K. H. Yang, M. Lee and F. K. Kessler (1994). "Suppression of the humoral immune response by cannabinoids is partially mediated through inhibition of adenylate cyclase by a pertussis toxin-sensitive G-protein coupled mechanism." Biochem Pharmacol **48**(10): 1899-1908.

Karlsson, M., J. A. Contreras, U. Hellman, H. Tornqvist and C. Holm (1997). "cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases,

lysophospholipases, and haloperoxidases." J Biol Chem **272**(43): 27218-27223.

Karsak, M., M. Cohen-Solal, J. Freudenberg, A. Ostertag, C. Morieux, U. Kornak, J. Essig, E. Erxlebe, I. Bab, C. Kubisch, M. C. de Vernejoul and A. Zimmer (2005). "Cannabinoid receptor type 2 gene is associated with human osteoporosis." Hum Mol Genet **14**(22): 3389-3396.

Kaser, A., S. Zeissig and R. S. Blumberg (2010). "Inflammatory bowel disease." Annu Rev Immunol **28**: 573-621.

Kato, H., O. Takeuchi, E. Mikamo-Satoh, R. Hirai, T. Kawai, K. Matsushita, A. Hiiragi, T. S. Dermody, T. Fujita and S. Akira (2008). "Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5." J Exp Med **205**(7): 1601-1610.

Kawai, T. and S. Akira (2006). "Innate immune recognition of viral infection." Nat Immunol **7**(2): 131-137.

Kimball, E. S., C. R. Schneider, N. H. Wallace and P. J. Hornby (2006). "Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulfate sodium." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **291**(2): G364-371.

Kirsner, J. B. (1988). "Historical aspects of inflammatory bowel disease." J Clin Gastroenterol **10**(3): 286-297.

Kishimoto, S., M. Muramatsu, M. Gokoh, S. Oka, K. Waku and T. Sugiura (2005). "Endogenous cannabinoid receptor ligand induces the migration of human natural killer cells." J Biochem **137**(2): 217-223.

Klein, T. W., C. Newton, K. Larsen, L. Lu, I. Perkins, L. Nong and H. Friedman (2003). "The cannabinoid system and immune modulation." J Leukoc Biol **74**(4): 486-496.

Kumagai, Y. and S. Akira (2010). "Identification and functions of pattern-recognition receptors." J Allergy Clin Immunol **125**(5): 985-992.

Kuster, W., J. Purrmann, S. Funk and G. Strohmeyer (1987). "[Genetics of Crohn disease. A family study of 265 patients with Crohn disease]." Med Klin (Munich) **82**(20): 679-682, 721.

Lakatos, P. L. (2006). "Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down?" World J Gastroenterol **12**(38): 6102-6108.

Leung, D., A. Saghatelian, G. M. Simon and B. F. Cravatt (2006). "Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids." Biochemistry **45**(15): 4720-4726.

Leung, S., X. Liu, L. Fang, X. Chen, T. Guo and J. Zhang (2010). "The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease." Cell Mol Immunol **7**(3): 182-189.

Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-874.

Liggett, S. B. (2000). "The pharmacogenetics of beta2-adrenergic receptors: relevance to asthma." J Allergy Clin Immunol **105**(2 Pt 2): S487-492.

Ligresti, A., T. Bisogno, I. Matias, L. De Petrocellis, M. G. Cascio, V. Cosenza, G. D'Argenio, G. Scaglione, M. Bifulco, I. Sorrentini and V. Di Marzo (2003). "Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth." Gastroenterology **125**(3): 677-687.

Lockhart-Mummery, H. E. and B. C. Morson (1960). "Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis." Gut **1**: 87-105.

Lynn, A. B. and M. Herkenham (1994). "Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids." J Pharmacol Exp Ther **268**(3): 1612-1623.

Ma, Y., J. D. Ohmen, Z. Li, L. G. Bentley, C. McElree, S. Pressman, S. R. Targan, N. Fischel-Ghodsian, J. I. Rotter and H. Yang (1999). "A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **5**(4): 271-278.

Maccarrone, M., M. van der Stelt, A. Rossi, G. A. Veldink, J. F. Vliegenthart and A. F. Agro (1998). "Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain." J Biol Chem **273**(48): 32332-32339.

MacDermott, R. P. (1996). "Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease." J Gastroenterol **31**(6): 907-916.

MacDonald, T. T., P. Hutchings, M. Y. Choy, S. Murch and A. Cooke (1990). "Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine." Clin Exp Immunol **81**(2): 301-305.

Machado Rocha, F. C., S. C. Stefano, R. De Cassia Haiek, L. M. Rosa Oliveira and D. X. Da Silveira (2008). "Therapeutic use of Cannabis sativa on chemotherapy-induced nausea and vomiting among cancer patients: systematic review and meta-analysis." Eur J Cancer Care (Engl) **17**(5): 431-443.

Marquez, L., J. Suarez, M. Iglesias, F. J. Bermudez-Silva, F. Rodriguez de Fonseca and M. Andreu (2009). "Ulcerative colitis induces changes on the expression of the endocannabinoid system in the human colonic tissue." PLoS One **4**(9): e6893.

Martin, B. R., R. Mechoulam and R. K. Razdan (1999). "Discovery and characterization of endogenous cannabinoids." Life Sci **65**(6-7): 573-595.

Martinon, F., A. Mayor and J. Tschopp (2009). "The inflammasomes: guardians of the body." Annu Rev Immunol **27**: 229-265.

Massa, F., M. Storr and B. Lutz (2005). "The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract." J Mol Med **83**(12): 944-954.

Mathew, C. G. (2008). "New links to the pathogenesis of Crohn disease provided by genome-wide association scans." Nat Rev Genet **9**(1): 9-14.

Mathison, R., W. Ho, Q. J. Pittman, J. S. Davison and K. A. Sharkey (2004). "Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats." Br J Pharmacol **142**(8): 1247-1254.

McHugh, D., C. Tanner, R. Mechoulam, R. G. Pertwee and R. A. Ross (2008). "Inhibition of human neutrophil chemotaxis by endogenous cannabinoids and phytocannabinoids: evidence for a site distinct from CB1 and CB2." Mol Pharmacol **73**(2): 441-450.

Mechoulam, R. (1970). "Marihuana chemistry." Science **168**(936): 1159-1166.

Mechoulam, R. (2005). "Plant cannabinoids: a neglected pharmacological treasure trove." Br J Pharmacol **146**(7): 913-915.

Mechoulam, R., S. Ben-Shabat, L. Hanus, M. Ligumsky, N. E. Kaminski, A. R. Schatz, A. Gopher, S. Almog, B. R. Martin, D. R. Compton and et al. (1995). "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors." Biochem Pharmacol **50**(1): 83-90.

Mechoulam, R., P. Braun and Y. Gaoni (1972). "Syntheses of 1 - tetrahydrocannabinol and related cannabinoids." J Am Chem Soc **94**(17): 6159-6165.

Mechoulam, R. and Y. Gaoni (1965). "A Total Synthesis of Dl-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish." J Am Chem Soc **87**: 3273-3275.

Miller, A. M. and N. Stella (2008). "CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way." Br J Pharmacol **153**(2): 299-308.

Mule, F., A. Amato, S. Baldassano and R. Serio (2007). "Involvement of CB1 and CB2 receptors in the modulation of cholinergic neurotransmission in mouse gastric preparations." Pharmacol Res **56**(3): 185-192.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.

Munoz-Luque, J., J. Ros, G. Fernandez-Varo, S. Tugues, M. Morales-Ruiz, C. E. Alvarez, S. L. Friedman, V. Arroyo and W. Jimenez (2008). "Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats." J Pharmacol Exp Ther **324**(2): 475-483.

Munro, S., K. L. Thomas and M. Abu-Shaar (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." Nature **365**(6441): 61-65.

Netea, M. G., B. J. Kullberg, D. J. de Jong, B. Franke, T. Sprong, T. H. Naber, J. P. Drenth and J. W. Van der Meer (2004). "NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease." Eur J Immunol **34**(7): 2052-2059.

Nielsen, O. H., I. Kirman, N. Rudiger, J. Hendel and B. Vainer (2003). "Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease." Scand J Gastroenterol **38**(2): 180-185.

Nielsen, O. H., N. Rudiger, M. Gaustadnes and T. Horn (1997). "Intestinal interleukin-8 concentration and gene expression in inflammatory bowel disease." Scand J Gastroenterol **32**(10): 1028-1034.

Ogura, Y., D. K. Bonen, N. Inohara, D. L. Nicolae, F. F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R. H. Duerr, J. P. Achkar, S. R. Brant, T. M. Bayless, B. S. Kirschner, S. B. Hanauer, G. Nunez and J. H. Cho (2001). "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 603-606.

Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F. F. Chen, S. Yamaoka and G. Nunez (2001). "Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB." J Biol Chem **276**(7): 4812-4818.

Onaivi, E. S., H. Ishiguro, J. P. Gong, S. Patel, P. A. Meozzi, L. Myers, A. Perchuk, Z. Mora, P. A. Tagliaferro, E. Gardner, A. Brusco, B. E. Akinshola, B. Hope, J. Lujilde, T. Inada, S. Iwasaki, D. Macharia, L. Teasenfitz, T. Arinami and G. R. Uhl (2008). "Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects." PLoS One **3**(2): e1640.

Orholm, M., P. Munkholm, E. Langholz, O. H. Nielsen, T. I. Sorensen and V. Binder (1991). "Familial occurrence of inflammatory bowel disease." N Engl J Med **324**(2): 84-88.

Ortar, G., A. Ligresti, L. De Petrocellis, E. Morera and V. Di Marzo (2003). "Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake." Biochem Pharmacol **65**(9): 1473-1481.

Osei-Hyiaman, D., M. DePetrillo, P. Pacher, J. Liu, S. Radaeva, S. Batkai, J. Harvey-White, K. Mackie, L. Offertaler, L. Wang and G. Kunos (2005). "Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity." J Clin Invest **115**(5): 1298-1305.

Pacher, P., S. Batkai and G. Kunos (2006). "The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy." Pharmacol Rev **58**(3): 389-462.

Pallone, F. and G. Monteleone (1998). "Interleukin 12 and Th1 responses in inflammatory bowel disease." Gut **43**(6): 735-736.

Pandey, R., K. Mousawy, M. Nagarkatti and P. Nagarkatti (2009). "Endocannabinoids and immune regulation." Pharmacol Res **60**(2): 85-92.

Patel, K. D., J. S. Davison, Q. J. Pittman and K. A. Sharkey (2010). "Cannabinoid CB(2) receptors in health and disease." Curr Med Chem **17**(14): 1393-1410.

Pereira, J. P., J. An, Y. Xu, Y. Huang and J. G. Cyster (2009). "Cannabinoid receptor 2 mediates the retention of immature B cells in bone marrow sinusoids." Nat Immunol **10**(4): 403-411.

Pertwee, R. G. (2005). "Pharmacological actions of cannabinoids." Handb Exp Pharmacol(168): 1-51.

Piomelli, D., A. Giuffrida, A. Calignano and F. Rodriguez de Fonseca (2000). "The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs." Trends Pharmacol Sci **21**(6): 218-224.

Piomelli, D., G. Tarzia, A. Duranti, A. Tontini, M. Mor, T. R. Compton, O. Dasse, E. P. Monaghan, J. A. Parrott and D. Putman (2006). "Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597)." CNS Drug Rev **12**(1): 21-38.

Pisanti, S., A. M. Malfitano, C. Grimaldi, A. Santoro, P. Gazzerro, C. Laezza and M. Bifulco (2009). "Use of cannabinoid receptor agonists in cancer therapy as palliative and curative agents." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **23**(1): 117-131.

Porter, A. C., J. M. Sauer, M. D. Knierman, G. W. Becker, M. J. Berna, J. Bao, G. G. Nomikos, P. Carter, F. P. Bymaster, A. B. Leese and C. C. Felder (2002). "Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor." J Pharmacol Exp Ther **301**(3): 1020-1024.

Quiagen. (2004). "Omniscript Reverse Transcription Handbook." Retrieved 22.06.2010, from http://www.qiagen.com/products/pcr/qiagenreversetranscriptases/omniscriptrt.aspx#Tabs=t2.

Quiagen. (2010, 04.2010). "QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook." 3. Retrieved 20.06.2010, from http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/qiaampsystem/qiaampdnaminikit.aspx#Tabs=t2.

Reinhard, W., K. Stark, K. Neureuther, K. Sedlacek, M. Fischer, A. Baessler, S. Weber, B. Kaess, S. Wiedmann, J. Erdmann, W. Lieb, A. Jeron, G. Riegger

and C. Hengstenberg (2008). "Common polymorphisms in the cannabinoid CB2 receptor gene (CNR2) are not associated with myocardial infarction and cardiovascular risk factors." Int J Mol Med **22**(2): 165-174.

Rioux, J. D., M. J. Daly, M. S. Silverberg, K. Lindblad, H. Steinhart, Z. Cohen, T. Delmonte, K. Kocher, K. Miller, S. Guschwan, E. J. Kulbokas, S. O'Leary, E. Winchester, K. Dewar, T. Green, V. Stone, C. Chow, A. Cohen, D. Langelier, G. Lapointe, D. Gaudet, J. Faith, N. Branco, S. B. Bull, R. S. McLeod, A. M. Griffiths, A. Bitton, G. R. Greenberg, E. S. Lander, K. A. Siminovitch and T. J. Hudson (2001). "Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease." Nat Genet **29**(2): 223-228.

Rioux, J. D., M. S. Silverberg, M. J. Daly, A. H. Steinhart, R. S. McLeod, A. M. Griffiths, T. Green, T. S. Brettin, V. Stone, S. B. Bull, A. Bitton, C. N. Williams, G. R. Greenberg, Z. Cohen, E. S. Lander, T. J. Hudson and K. A. Siminovitch (2000). "Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci." Am J Hum Genet **66**(6): 1863-1870.

Rioux, K. P. and R. N. Fedorak (2006). "Probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease." J Clin Gastroenterol **40**(3): 260-263.

Rog, D. J. (2010). "Cannabis-based medicines in multiple sclerosis--a review of clinical studies." Immunobiology **215**(8): 658-672.

Rogler, G. and T. Andus (1998). "Cytokines in inflammatory bowel disease." World J Surg **22**(4): 382-389.

Ross, R. A. (2003). "Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors." Br J Pharmacol **140**(5): 790-801.

Rothfuss, K. S., E. F. Stange and K. R. Herrlinger (2006). "Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases." World J Gastroenterol **12**(30): 4819-4831.

Round, J. L. and S. K. Mazmanian (2009). "The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease." Nat Rev Immunol **9**(5): 313-323.

Rousseaux, C., X. Thuru, A. Gelot, N. Barnich, C. Neut, L. Dubuquoy, C. Dubuquoy, E. Merour, K. Geboes, M. Chamaillard, A. Ouwehand, G. Leyer, D. Carcano, J. F. Colombel, D. Ardid and P. Desreumaux (2007).

"Lactobacillus acidophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors." Nat Med **13**(1): 35-37.

Sachidanandam, R., D. Weissman, S. C. Schmidt, J. M. Kakol, L. D. Stein, G. Marth, S. Sherry, J. C. Mullikin, B. J. Mortimore, D. L. Willey, S. E. Hunt, C. G. Cole, P. C. Coggill, C. M. Rice, Z. Ning, J. Rogers, D. R. Bentley, P. Y. Kwok, E. R. Mardis, R. T. Yeh, B. Schultz, L. Cook, R. Davenport, M. Dante, L. Fulton, L. Hillier, R. H. Waterston, J. D. McPherson, B. Gilman, S. Schaffner, W. J. Van Etten, D. Reich, J. Higgins, M. J. Daly, B. Blumenstiel, J. Baldwin, N. Stange-Thomann, M. C. Zody, L. Linton, E. S. Lander and D. Altshuler (2001). "A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms." Nature **409**(6822): 928-933.

Sakamoto, N., S. Kono, K. Wakai, Y. Fukuda, M. Satomi, T. Shimoyama, Y. Inaba, Y. Miyake, S. Sasaki, K. Okamoto, G. Kobashi, M. Washio, T. Yokoyama, C. Date and H. Tanaka (2005). "Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan." Inflamm Bowel Dis **11**(2): 154-163.

Sancho, D., O. P. Joffre, A. M. Keller, N. C. Rogers, D. Martinez, P. Hernanz-Falcon, I. Rosewell and C. Reis e Sousa (2009). "Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity." Nature **458**(7240): 899-903.

Sands, B. E. (2007). "Inflammatory bowel disease: past, present, and future." J Gastroenterol **42**(1): 16-25.

Sanson, M., L. Bueno and J. Fioramonti (2006). "Involvement of cannabinoid receptors in inflammatory hypersensitivity to colonic distension in rats." Neurogastroenterol Motil **18**(10): 949-956.

Sartor, R. B. (2004). "Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics." Gastroenterology **126**(6): 1620-1633.

Sartor, R. B. (2008). "Microbial influences in inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **134**(2): 577-594.

Satsangi, J., M. Parkes, E. Louis, L. Hashimoto, N. Kato, K. Welsh, J. D. Terwilliger, G. M. Lathrop, J. I. Bell and D. P. Jewell (1996). "Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for

susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12." Nat Genet **14**(2): 199-202.

Schlee, M., A. Roth, V. Hornung, C. A. Hagmann, V. Wimmenauer, W. Barchet, C. Coch, M. Janke, A. Mihailovic, G. Wardle, S. Juranek, H. Kato, T. Kawai, H. Poeck, K. A. Fitzgerald, O. Takeuchi, S. Akira, T. Tuschl, E. Latz, J. Ludwig and G. Hartmann (2009). "Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus." Immunity **31**(1): 25-34.

Seiderer, J., I. Elben, J. Diegelmann, J. Glas, J. Stallhofer, C. Tillack, S. Pfennig, M. Jurgens, S. Schmechel, A. Konrad, B. Goke, T. Ochsenkuhn, B. Muller-Myhsok, P. Lohse and S. Brand (2008). "Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD." Inflamm Bowel Dis **14**(4): 437-445.

Sellon, R. K., S. Tonkonogy, M. Schultz, L. A. Dieleman, W. Grenther, E. Balish, D. M. Rennick and R. B. Sartor (1998). "Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice." Infect Immun **66**(11): 5224-5231.

Sergeeva, O. A., N. Doreulee, A. N. Chepkova, T. Kazmierczak and H. L. Haas (2007). "Long-term depression of cortico-striatal synaptic transmission by DHPG depends on endocannabinoid release and nitric oxide synthesis." Eur J Neurosci **26**(7): 1889-1894.

Shivananda, S., J. Lennard-Jones, R. Logan, N. Fear, A. Price, L. Carpenter and M. van Blankenstein (1996). "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 **39**(5): 690-697.

Siegmund, S. V. and R. F. Schwabe (2008). "Endocannabinoids and liver disease. II. Endocannabinoids in the pathogenesis and treatment of liver fibrosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **294**(2): G357-362.

Silverberg, M. S., J. Satsangi, T. Ahmad, I. D. Arnott, C. N. Bernstein, S. R. Brant, R. Caprilli, J. F. Colombel, C. Gasche, K. Geboes, D. P. Jewell, A. Karban, E. V. Loftus Jr, A. S. Pena, R. H. Riddell, D. B. Sachar, S. Schreiber, A. H. Steinhart, S. R. Targan, S. Vermeire and B. F. Warren (2005). "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 **19 Suppl A**: 5-36.

Sipe, J. C., N. Arbour, A. Gerber and E. Beutler (2005). "Reduced endocannabinoid immune modulation by a common cannabinoid 2 (CB2) receptor gene polymorphism: possible risk for autoimmune disorders." J Leukoc Biol **78**(1): 231-238.

Sonnenburg, J. L., J. Xu, D. D. Leip, C. H. Chen, B. P. Westover, J. Weatherford, J. D. Buhler and J. I. Gordon (2005). "Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont." Science **307**(5717): 1955-1959.

Spehlmann, M. E., A. Z. Begun, J. Burghardt, P. Lepage, A. Raedler and S. Schreiber (2008). "Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study." Inflamm Bowel Dis **14**(7): 968-976.

Starowicz, K., S. Nigam and V. Di Marzo (2007). "Biochemistry and pharmacology of endovanilloids." Pharmacol Ther **114**(1): 13-33.

Stefano, G. B., T. Esch, P. Cadet, W. Zhu, K. Mantione and H. Benson (2003). "Endocannabinoids as autoregulatory signaling molecules: coupling to nitric oxide and a possible association with the relaxation response." Med Sci Monit **9**(4): RA63-75.

Steffens, S., N. R. Veillard, C. Arnaud, G. Pelli, F. Burger, C. Staub, M. Karsak, A. Zimmer, J. L. Frossard and F. Mach (2005). "Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice." Nature **434**(7034): 782-786.

Stephens, J. C. (1999). "Single-nucleotide polymorphisms, haplotypes, and their relevance to pharmacogenetics." Mol Diagn **4**(4): 309-317.

Storr, M., D. Emmerdinger, J. Diegelmann, B. Yuce, S. Pfennig, T. Ochsenkuhn, B. Goke, P. Lohse and S. Brand (2009). "The role of fatty acid hydrolase gene variants in inflammatory bowel disease." Aliment Pharmacol Ther **29**(5): 542-551.

Storr, M., E. Gaffal, D. Saur, V. Schusdziarra and H. D. Allescher (2002). "Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus." Can J Physiol Pharmacol **80**(1): 67-76.

Storr, M. A., C. M. Keenan, D. Emmerdinger, H. Zhang, B. Yuce, A. Sibaev, F. Massa, N. E. Buckley, B. Lutz, B. Goke, S. Brand, K. D. Patel and K. A. Sharkey (2008). "Targeting endocannabinoid degradation protects against experimental colitis in mice: involvement of CB1 and CB2 receptors." J Mol Med **86**(8): 925-936.

Storr, M. A., C. M. Keenan, H. Zhang, K. D. Patel, A. Makriyannis and K. A. Sharkey (2009). "Activation of the cannabinoid 2 receptor (CB2) protects against experimental colitis." Inflamm Bowel Dis **15**(11): 1678-1685.

Sturm, A., H. S. de Souza and C. Fiocchi (2008). "Mucosal T cell proliferation and apoptosis in inflammatory bowel disease." Curr Drug Targets **9**(5): 381-387.

Sugiura, T., S. Kishimoto, S. Oka and M. Gokoh (2006). "Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand." Prog Lipid Res **45**(5): 405-446.

Sugiura, T., S. Kondo, A. Sukagawa, S. Nakane, A. Shinoda, K. Itoh, A. Yamashita and K. Waku (1995). "2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain." Biochem Biophys Res Commun **215**(1): 89-97.

Sugiura, T. and K. Waku (2000). "2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors." Chem Phys Lipids **108**(1-2): 89-106.

Swidsinski, A., A. Ladhoff, A. Pernthaler, S. Swidsinski, V. Loening-Baucke, M. Ortner, J. Weber, U. Hoffmann, S. Schreiber, M. Dietel and H. Lochs (2002). "Mucosal flora in inflammatory bowel disease." Gastroenterology **122**(1): 44-54.

Szebeni, B., G. Veres, A. Dezsofi, K. Rusai, A. Vannay, M. Mraz, E. Majorova and A. Arato (2008). "Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease." Clin Exp Immunol **151**(1): 34-41.

Taurog, J. D., J. A. Richardson, J. T. Croft, W. A. Simmons, M. Zhou, J. L. Fernandez-Sueiro, E. Balish and R. E. Hammer (1994). "The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats." J Exp Med **180**(6): 2359-2364.

Teixeira-Clerc, F., B. Julien, P. Grenard, J. Tran Van Nhieu, V. Deveaux, L. Li, V. Serriere-Lanneau, C. Ledent, A. Mallat and S. Lotersztajn (2006). "CB1

cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis." Nat Med **12**(6): 671-676.

Thukral, C., W. J. Travassos and M. A. Peppercorn (2005). "The Role of Antibiotics in Inflammatory Bowel Disease." Curr Treat Options Gastroenterol **8**(3): 223-228.

Todd, A. R. (1940). "Chemistry of the hemp drugs." Nature **146**: 829-830.

Torok, H. P., J. Glas, L. Tonenchi, T. Mussack and C. Folwaczny (2004). "Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis." Clin Immunol **112**(1): 85-91.

Tramer, M. R., D. Carroll, F. A. Campbell, D. J. Reynolds, R. A. Moore and H. J. McQuay (2001). "Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review." BMJ **323**(7303): 16-21.

Truelove, S. C. and L. J. Witts (1955). "Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial." Br Med J **2**(4947): 1041-1048.

Turnbaugh, P. J., M. Hamady, T. Yatsunenko, B. L. Cantarel, A. Duncan, R. E. Ley, M. L. Sogin, W. J. Jones, B. A. Roe, J. P. Affourtit, M. Egholm, B. Henrissat, A. C. Heath, R. Knight and J. I. Gordon (2009). "A core gut microbiome in obese and lean twins." Nature **457**(7228): 480-484.

Twitchell, W., S. Brown and K. Mackie (1997). "Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons." J Neurophysiol **78**(1): 43-50.

Tysk, C., E. Lindberg, G. Jarnerot and B. Floderus-Myrhed (1988). "Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking." Gut **29**(7): 990-996.

Van Assche, G. and P. Rutgeerts (2005). "Physiological basis for novel drug therapies used to treat the inflammatory bowel diseases. I. Immunology and therapeutic potential of antiadhesion molecule therapy in inflammatory bowel disease." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(2): G169-174.

van Beelen, A. J., Z. Zelinkova, E. W. Taanman-Kueter, F. J. Muller, D. W. Hommes, S. A. Zaat, M. L. Kapsenberg and E. C. de Jong (2007). "Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells." Immunity **27**(4): 660-669.

van Heel, D. A., S. Ghosh, M. Butler, K. A. Hunt, A. M. Lundberg, T. Ahmad, D. P. McGovern, C. Onnie, K. Negoro, S. Goldthorpe, B. M. Foxwell, C. G. Mathew, A. Forbes, D. P. Jewell and R. J. Playford (2005). "Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease." Lancet **365**(9473): 1794-1796.

Van Sickle, M. D., M. Duncan, P. J. Kingsley, A. Mouihate, P. Urbani, K. Mackie, N. Stella, A. Makriyannis, D. Piomelli, J. S. Davison, L. J. Marnett, V. Di Marzo, Q. J. Pittman, K. D. Patel and K. A. Sharkey (2005). "Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors." Science **310**(5746): 329-332.

Wehkamp, J., M. Koslowski, G. Wang and E. F. Stange (2008). "Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease." Mucosal Immunol **1 Suppl 1**: S67-74.

Wilson, R. I. and R. A. Nicoll (2002). "Endocannabinoid signaling in the brain." Science **296**(5568): 678-682.

Workman, C. J., A. L. Szymczak-Workman, L. W. Collison, M. R. Pillai and D. A. Vignali (2009). "The development and function of regulatory T cells." Cell Mol Life Sci **66**(16): 2603-2622.

Wright, K., N. Rooney, M. Feeney, J. Tate, D. Robertson, M. Welham and S. Ward (2005). "Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing." Gastroenterology **129**(2): 437-453.

Wright, K. L., M. Duncan and K. A. Sharkey (2008). "Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation." Br J Pharmacol **153**(2): 263-270.

Xie, X. Q., J. Z. Chen and E. M. Billings (2003). "3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor." Proteins **53**(2): 307-319.

Yamasaki, S., E. Ishikawa, M. Sakuma, H. Hara, K. Ogata and T. Saito (2008). "Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells." Nat Immunol **9**(10): 1179-1188.

Yamasaki, S., M. Matsumoto, O. Takeuchi, T. Matsuzawa, E. Ishikawa, M. Sakuma, H. Tateno, J. Uno, J. Hirabayashi, Y. Mikami, K. Takeda, S. Akira and T. Saito (2009). "C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, Malassezia." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(6): 1897-1902.

Yuan, M., S. M. Kiertscher, Q. Cheng, R. Zoumalan, D. P. Tashkin and M. D. Roth (2002). "Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells." J Neuroimmunol **133**(1-2): 124-131.

Zisman, T. L. and D. T. Rubin (2008). "Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14**(17): 2662-2669.

Zygmunt, P. M., J. Petersson, D. A. Andersson, H. Chuang, M. Sorgard, V. Di Marzo, D. Julius and E. D. Hogestatt (1999). "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide." Nature **400**(6743): 452-457.

9 Lebenslauf

Name	Christopher Rugg
Adresse	Schellingstr. 114, 80798 München
Email	chris.rugg@web.de
Geburtsort und –datum	15.11.1982 in Bad-Tölz

Ausbildung

1993 – 2002	Gymnasium Geretsried
06/ 2002	Abitur
2003 – 2010	Studium der Humanmedizin an der LMU München
08/2005	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2010	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

12/2008 – 03/2009	Kreisklinik Wolfratshausen, Innere Medizin
03/2009 – 07/2009	Klinikum Harlaching, München, Anästhesiologie
08/2009 – 12/2009	Klinikum Schwabing, München, Chirurgie

Beruflicher Werdegang

Seit 04/2011	Assistenzarzt, Anästhesie, Klinikum Rechts der Isar, TU München

10 Danksagung

Als aller erstes möchte ich Herrn PD Dr. Martin Storr für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation danken. Er war stets eine sowohl kompetente als auch sympathische Unterstützung zu allen Zeiten. Mit Geduld, Verständnis und Hilfsbereitschaft begleitete er mich durch dieses äußerst interessante Thema.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn PD Dr. S. Brand mitsamt seiner Arbeitsgruppe für die freundliche Zusammenarbeit. Als mein Ansprechpartner vor Ort fand er immer ein Ohr für mich und stand mir mit Rat und Tat zur Seite. In diesem Zusammenhang möchte ich mich noch herzlichst bei Frau Dr. Julia Diegelmann und Frau Simone Pfennig bedanken, die mir bei der Datenerhebung und dessen statistischen Auswertung mehr als freundlich mit Ihrer Hilfe unterstützten.

Herrn Prof. Dr. P. Lohse und seinem Team in der molekularbiologischen Abteilung der klinischen Chemie im Klinikum Großhadern gilt mein besonderer Dank. In ihrem Labor bekam ich nicht nur die Möglichkeit den Großteil meiner Experimente durchzuführen, ich wurde auch äußerst entgegenkommend aufgenommen, eingearbeitet und unterstützt.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Göke, dem Leiter der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der LMU München.

Für die persönliche Unterstützung möchte ich mich zuletzt noch bei meinen Freunden bedanken die mich die lange Zeit hindurch begleiteten und zur Seite standen.

Vielen Dank.