

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. A. Gerbes

Interaktion zwischen GPR119 und CB₁-Rezeptoren bei
der Modulation der gastrointestinalen Motilität im Maus-
und Humangewebe

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

vorgelegt von
Lorenzo Botteselle
aus Bozen, Italien

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Storr
Mitberichterstatter: Univ. Prof. Dr. Stephan Kröger
 Priv. Doz. Dr. Christian Bauer
 Prof. Dr. Norbert Schindlbeck

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Andrei Sibaev

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2016

Meinen Eltern gewidmet

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden als
Vorträge/Poster präsentiert:

Vortrag:

Botteselle L., Zhao X., Göke B., Sibaev A., Storr M.

Interaction between GPR119 and CB₁ receptors in the inhibition of contractile activity in mouse and human gut

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität,
Freising

28.02. – 02.03.2014

Poster:

Botteselle L., Zhao X., Göke B., Sibaev A., Storr M.

Interaction between GPR119 and CB₁ receptors in the inhibition of contractile activity in mouse and human gut

Digestive Disease Week, Chicago IL, USA

03.05. – 06.05.2014

Gastroenterology, Vol. 146, Issue 5, S-530

Published in issue: May 2014

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 1 |
| 2. EINLEITUNG..... | 3 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN..... | 5 |
| 3.1 ELEKTRISCHE FELDSTIMULATION AN DÜNNDARM- UND KOLONSEGMENTEN | |
| 3.1.1 Versuchstiere | 6 |
| 3.1.2 Humangewebe..... | 6 |
| 3.1.3 Versuchsanordnung..... | 7 |
| 3.1.4 Versuchsdurchführung..... | 9 |
| 3.1.5 Auswertung..... | 11 |
| 3.1.6 Statistische Auswertung..... | 11 |
| 4. ERGEBNISSE..... | 12 |
| 4.1 ELEKTRISCHE FELDSTIMULATION AN DÜNNDARMSEGMENTEN DER MAUS | |
| 4.1.1 Wirkung des nicht-selektiven GPR119-Agonisten OEA auf die glattmuskuläre Kontraktilität des Dünndarms der Maus..... | 12 |
| 4.1.2 Wirkung des selektiven GPR119-Agonisten AS 1269574 auf die glattmuskuläre Kontraktilität des Dünndarms der Maus..... | 13 |
| 4.1.3 Interaktion zwischen dem CB ₁ -Rezeptor-Blocker SR141716 und OEA im Dünndarm der Maus..... | 14 |
| 4.1.4 Interaktion zwischen dem CB ₁ -Rezeptor-Blocker SR141716 und AS1269574 im Dünndarm der Maus..... | 15 |
| 4.2 ELEKTRISCHE FELDSTIMULATION AN KOLONSEGMENTEN DER MAUS | |
| 4.2.1 Wirkung des nicht-selektiven GPR119-Agonisten OEA auf die glattmuskuläre Kontraktilität des Kolons der Maus..... | 15 |
| 4.2.2 Wirkung des selektiven GPR119-Agonisten AS1269574 auf die glattmuskuläre Kontraktilität des Kolons der Maus..... | 17 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.2.3 | Interaktion zwischen dem CB ₁ -Rezeptor-Blocker SR141716 und OEA im Kolon der Maus..... | 18 |
| 4.2.4 | Interaktion zwischen dem CB ₁ -Rezeptor-Blocker SR141716 und AS1269574 im Kolon der Maus..... | 19 |
| 4.3 | ELETTRISCHE FELDSTIMULATION AN HUMANEN KOLONSEGMENTEN | |
| 4.3.1 | Wirkung des nicht-selektiven GPR119-Agonisten OEA auf die glattmuskuläre Kontraktilität im menschlichen Kolon..... | 20 |
| 4.3.2 | Wirkung des selektiven GPR119 Agonisten-AS1269574 auf die glattmuskuläre Kontraktilität im menschlichen Kolon..... | 21 |
| 4.3.3 | Interaktion zwischen dem CB ₁ -Rezeptor-Blocker SR141716 und OEA im menschlichen Kolon..... | 22 |
| 4.3.4 | Interaktion zwischen dem CB ₁ -Rezeptor-Blocker SR141716 und AS1269574 im menschlichem Kolon..... | 23 |
| 5. | ALLGEMEINE DISKUSSION..... | 24 |
| 5.1 | ENTERISCHES NERVENSYSTEM (ENS)..... | 24 |
| 5.2 | ENDOCANNABINOIDSYSTEM (ECS) | 25 |
| 5.3 | CANNABINOIDREZEPTOREN..... | 26 |
| 5.4 | GPR119..... | 27 |
| 5.5 | WIRKUNGEN DER CANNABINOIDE AUF DIE GI-MOTILITÄT..... | 29 |
| 6. | SPEZIELLE DISKUSSION..... | 31 |
| 6.1 | WIRKUNG GPR119-AGONISTEN IM MAUSGEWEBE..... | 32 |
| 6.2 | GPR119/CB₁-REZEPTOR- INTERAKTION IM MAUSGEWEBE..... | 33 |
| 6.3 | GPR119 WIRKUNGEN IM HUMANGEWEBE..... | 34 |
| 6.4 | GPR119/CB₁-INTERAKTION IM HUMANGEWEBE..... | 34 |
| 6.5 | KLINISCHE BEDEUTUNG UND THERAPEUTISCHE ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN..... | 36 |
| 7. | ZUSAMMENFASSUNG..... | 37 |
| 8. | ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | 39 |

9. REFERENZEN..... **41**

10. DANKSAGUNG..... **48**

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-----------------------------------|--|
| ACh | Acetylcholin |
| AEA | Arachidonoylethanolamid |
| CB ₁ / CB ₂ | Cannabinoid 1-Rezeptor /Cannabinoid 2-Rezeptor |
| Δ ⁹ -THC | Δ ⁹ -tetrahydrocannabinol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPP4 | Dipeptidyl peptidase IV |
| ECS | Endocannabinoidsystem |
| EFS | Elektrische Feldstimulation |
| ENS | enterisches Nervensystem |
| FAAH | fatty acid amide hydrolase |
| GI | gastrointestinal |
| GPCR | G-Protein-gekoppelten Rezeptoren |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KO | Knockout |
| KRP | Krebs Ringer Puffer |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| n | Stückzahl |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |

| | |
|----------------------------------|---|
| NaH ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogenphosphat |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS | Stickstoffmonoxid-Synthase |
| OEA | Oleylethanolamid |
| PEA | Palmitoylethanolamid |
| PPAR- α | Peroxisome proliferator-activated receptor alpha |
| TRPV-1 | Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 |
| Tween80 | Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate |
| V | Volt |
| wt | Wild-Typ |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

2. EINLEITUNG

Das Endocannabinoidsystem (ECS) war in den letzten Jahrzehnten Fokus zahlreicher Studien, die dessen Auswirkung unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen im menschlichen Körper untersuchten.

Der therapeutische Nutzen der ECS-Modulation umfasst entzündliche, kardiovaskuläre, metabolische und neurodegenerative Erkrankungen sowie die Schmerzregulation. Cannabinoide spielen auch eine wesentliche Rolle in gastrointestinalen (GI-) Prozessen wie Motilitätsstörungen, Entzündungen, Infektionen und Schmerzmodulation.¹ Das ECS besteht aus den zwei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) CB₁- und CB₂-Rezeptor, den endogenen Liganden wie Anandamid (AEA) und 2-Arachidonoylglycerol, den biosynthetischen und katabolen Wegen und möglicherweise einem Membrantransporter, dessen Vorkommen momentan unter Diskussion steht.

Dazu sind in den letzten Jahren andere ECS-assoziierte Rezeptoren entdeckt worden², die möglicherweise als pharmakologisches *target* benutzt werden können, ohne die typischen zentralen Nebenwirkungen der endogenen und exogenen Cannabinoiden zu besitzen. Unter diesen neuen Rezeptoren gibt es unter anderem den G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR119. Zahlreiche Studien haben die Rolle vom GPR119-Rezeptor in der Regulation der Glukosehomöostase, des Sättigungsgefühls und des Körpergewichts gezeigt. Dieser Rezeptor wird hauptsächlich im GI-Trakt exprimiert (Darm und Pankreas), nicht aber im zentralen Nervensystem. Genau diese Erkenntnis macht aus GPR119 ein attraktives Ziel für die pharmakologische Modulation des ECS. Dennoch haben sich bis heute wenige Studien mit der Funktion dieses Rezeptors in der GI-Motilität befasst. Es ist nicht bekannt, ob dieser Rezeptor an der Modulation der GI-Motilität teilnimmt und ob er ausschließlich durch neuronale oder auch muskuläre Mechanismen seine Wirkung entfalten kann. Diese Arbeit hat die möglichen Einflüsse von GPR119 auf die Darmkontraktilität im Dünndarm und Kolon der Maus und im menschlichen Kolon untersucht. Es ist weiterhin bekannt, dass der CB₁-Rezeptor der Hauptrezeptor des ECS ist, der die Darmmotilität unter physiologischen Bedingungen beeinflussen kann. Deswegen wurde in dieser Arbeit auch untersucht, ob die CB₁-Rezeptoren in der GPR119-induzierten Wirkung involviert sind und wenn ja, in welchen Abschnitten des unteren GI-Trakt und im welchen Ausmaß. Um diese Fragen zu beantworten

wurden verschiedene Organbad-Versuche mit Maus- und Humangewebe durchgeführt.

Fragestellungen dieser Arbeit waren:

- Wie beeinflussen nicht-selektive und selektive GPR119-Rezeptor-Agonisten die Kontraktilität vom Dünnd- und Dickdarmgewebe der Maus?
- Sind die Effekte auf humanes Kolongewebe übertragbar?
- Werden die GPR119-Effekte ausschließlich durch den CB₁-Rezeptor vermittelt oder gibt es einen CB₁-unabhängigen Weg, der die Motilität moduliert?

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen der Frage nach der Bedeutung des GPR119-Rezeptors im GI-Trakt nachgehen, insbesondere ob es einen möglichen therapeutischen Nutzen in der Therapie motilitätsassoziierten Krankheiten gibt.

3. MATERIAL UND METHODEN

Geräte:

| | |
|--------------------------|---|
| Analog/Digital | Power 1401 |
| Wandler | (Cambridge Electronic, Cambridge, UK) |
| Stimulator | Grass S11 Stimulator (Grass, Quincy, Massachusetts, USA) |
| Verstärker | Transbridge (World precision instruments Inc., Sarasota, Florida, USA) |
| Kraftwandler | FTO3C Force Transducer (Grass, Quincy, Massachusetts, USA) |
| Stimulatorbox | Eigenbau |
| Computer | Fujitsu Siemens GmbH, München, DE |
| Software SPIKE2 | Version 4.01 (Cambridge Electronic, Cambridge, UK) |
| Organbad-Set | Eingebau |
| Thermostat | Thermomix 1420 (B. Braun, Melsungen, DE) |
| Doppelwandige Organbäder | Laborglaswaren Josef Schmitz, München, DE |

Verwendete Substanzen

SR141716 Tocris bioscience, Ellisville, USA

Oleylethanolamide Tocris bioscience, Ellisville, USA

AS 1269574 Tocris bioscience, Ellisville, USA

3. ELEKTRISCHE FELDSTIMULATION AN DÜNNDARM- UND KOLONSEGMENTEN

3.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche Balb/C Mäuse verwendet (8 bis 10 Wochen alt). Unter standardisierten Bedingungen wurden die Tiere artgerecht in einem Raum unter Temperaturkontrolle ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) mit einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus von 12-h/12-h Tag/Nacht-Zyklus gehalten und konnten *ad libitum* trinken und Trockenfutter essen. Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt und alle erforderlichen Anstrengungen wurden unternommen, um die Zahl der Tiere und das Leiden dabei zu minimieren.

3.1.2 Humangewebe

Für die Humangewebe-Versuche wurde Gewebe aus den gesunden Resektionsrändern von Kolonresektaten von Patienten benutzt, die aufgrund eines Kolonkarzinoms operiert worden sind (in Zusammenarbeit mit der Chirurgischen Klinik Großhadern, München und dem Human Tissue and Cell Research Foundation). Die Präparate stammen aus dem proximalen oder distalen Kolon von makroskopisch tumorfreien Kolonregionen von n=15 Patienten (Alter: 40-90 Jahren, 27 % Frauen, 73 % Männer) (**Tabelle 1**). Die ausgewählten Patienten litten weder unter Motilitätsstörungen, noch unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Die Patienten wurden nicht mit Opioiden oder Motilitätshemmer prämediziert und lediglich 20 % wurden präoperativ chemotherapeutisch behandelt. Die mittlere warme Ischämiezeit für die Geweberesektate war 27 min; die mittlere kalte Ischämiezeit war 1 h und 14 Minuten. Nach zügigem, gekühltem Transport ins Labor wurden die Präparate sofort für die Versuche weiter verarbeitet. *Mucosa* und *Submucosa* wurden sorgfältig entfernt, so dass nur die zirkuläre und longitudinale Muskelschichten verblieben sind.

| n der Patienten | Alter + Geschlecht | Mittlere warme Ischämiezeit | Mittlere kalte Ischämiezeit |
|-----------------|--|-----------------------------|-----------------------------|
| n= 15 | 40-90 Jahren Frauen: 27 % Männer: 73 % | 27 min | 1 h 14 min |

Tabelle 1. Darstellung des Patientenkollektivs der Humangewebeversuche. Für die Versuche wurde Gewebe aus den gesunden Resektionsrändern von Kolonresektaten von n=15 Patienten benutzt, die aufgrund eines Kolonkarzinoms operiert worden sind. Alter zwischen 40-90 Jahren, 27 % Frauen, 73 % Männer. Die mittlere warme Ischämiezeit war 27 min, die mittlere kalte Ischämiezeit 1h 14 min.

3.1.3 Versuchsanordnung

Für die Versuche standen sechs Organbäder zur Verfügung. Diesen wurden jeweils mit 7 ml Krebs-Ringer-Puffer (KRP) (NaCl 115,5 mM, NaHCO₃ 21,9 mM, Glukose 1,1 mM, MgSO₄ 1,16 mM, NaH₂PO₄ 1,16 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KCl 4,16 mM) gefüllt. Die Pufferlösung wurde kontinuierlich bei einer konstanten Temperatur von 37,0°C mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast. Ca. 1 cm lange Darmabschnitte aus dem Dünndarm und dem mittleren und distalen Kolon der Maus wurden präpariert und in die Organbäder eingebracht. Dabei wurden die Darm-Segmente an beiden Enden mit nicht-elastischen Fäden geknotet und zwischen zwei Platin-Ringeletroden platziert. Das orale Ende des Segmentes wurde oben und das anale unten positioniert. (**Abb.2a**)

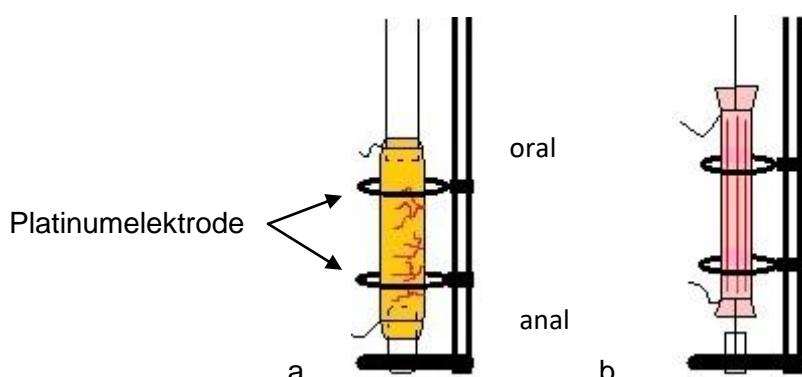


Abb.2 Schematische Darstellung der Positionierung der Gewebe zwischen den Elektroden. Komplette Darmsegmente der Maus wurden an beiden Enden mit nicht-elastischen Fäden geknotet und zwischen den Platin-Ringeletroden platziert. Angedeutet sind die Gefäßarkaden des Segmentes (a). Beim Humangewebe wurden Darmstreifen bestehend aus zirkulärer und longitudinaler Muskelschicht an beiden Enden geknotet und zwischen den Elektroden platziert und gespannt (b).

Während der Vorbereitung der Darmsegmente wurde der Puffer alle 15 Minuten gewechselt. Der Faden des oralen Endes wurde dann mit dem isometrischen Kraftwandler verbunden. Der Stimulator löste eine elektrische Feldstimulation (EFS) aus, die die Darmsegmente zur Kontraktion in longitudinaler Richtung anregte (Stimulationsparameter: Elektrische Spannung: 40 V, Pulsdauer: 0,5 ms, Stimulationsdauer 10 sec, Stimulationsfrequenz 10 Hz und 50 Hz). Die Kontraktionskraft wurde dann in Gramm (g) angegeben und durch den Einsatz eines Kraftwandlers, eines Signalverstärkers und eines Analog-Digital-Umsetzer (A/D-Wandlers) konnten die ausgelösten Kontraktionen am Computer-Bildschirm beobachtet werden (**Abb.3**). Bei den Humangewebe-Versuchen war das Vorgehen ähnlich: Bei der Präparation des Gewebes wurden Serosa und Submucosa entfernt und ca. 1 cm langen und 0,5 cm breiten Streifen wurden vorbereitet und in die Organbäder eingebbracht. Dabei wurden die Darm-Streifen an beiden Enden mit nicht-elastischen Fäden geknotet und zwischen zwei Platinringeletroden platziert und gespannt (**Abb.2b**).

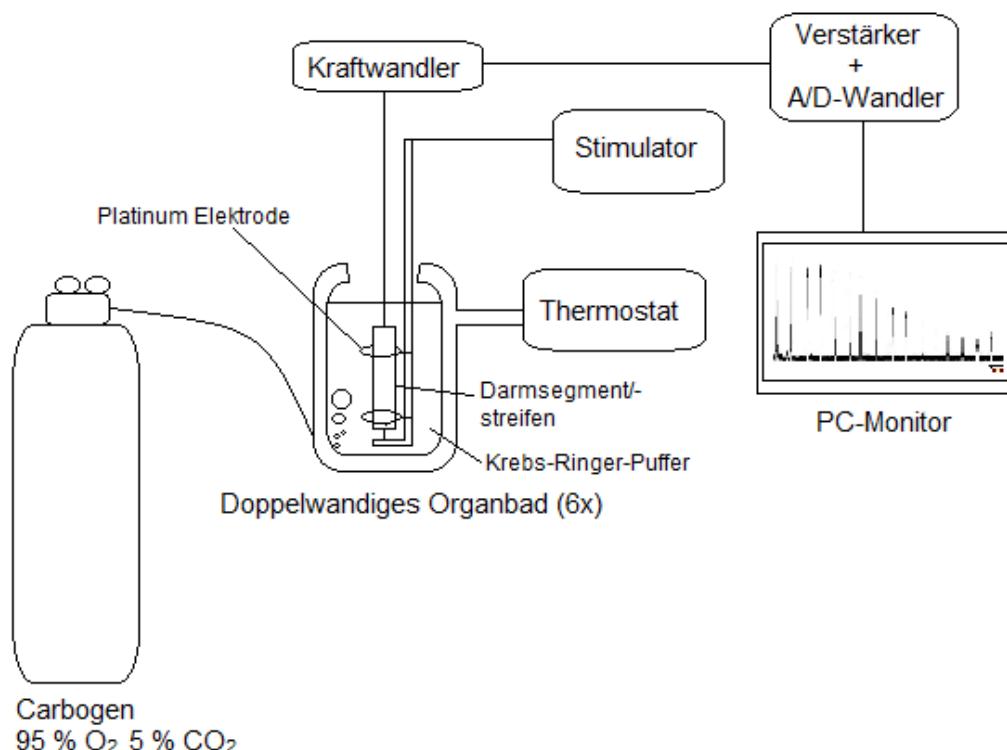


Abb. 3: Versuchsaufbau. Ca. 1 cm lange Darmsegmente der Maus bzw. humane Darmstreifen wurden in das doppelwandige Organbad eingespannt und am oralen und analen Ende mittels Fäden fixiert. Die Stimulation erfolgte über die Platinumelektrode (Elektrische Spannung: 40V, Stimulationsfrequenz: 10Hz und 50 Hz, Pulsdauer 0,5 ms, Stimulationsdauer: 10 sec). Die ausgelösten Kontraktionen konnten über den Kraftwandler abgeleitet werden und am PC-Monitor ausgewertet werden.

3.1.4 Versuchsdurchführung

Die Betäubung der Versuchstiere wurde mit Isofluran (Forene®) durchgeführt. Nach erfolgreicher Betäubung wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Das Abdomen wurde dann durch einen medianen Schnitt durch die *Linea alba* geöffnet und das Ileum, Jejunum und Kolon wurden dargestellt und schnell entnommen. Die entnommenen Darmabschnitte wurden dann in mit begastem KRP gefüllten Petrischalen platziert. Die Mesenterialgefäße samt Bindegewebe wurden sorgfältig präparativ entfernt um glatte Darmsegmente für die weitere Präparation zu erhalten. Ca. 1 cm lange Darmabschnitte aus dem Dünndarm und dem mittleren und distalen Kolon wurden präpariert und in die Organbäder eingebracht. Dabei wurden die Darm-Segmente an beiden Enden mit nicht-elastischen Fäden geknotet und zwischen zwei Platinringeletroden platziert. Während der Vorbereitung der Darmsegmente wurde der Puffer circa alle 15 Minuten gewechselt. Nach einer Äquilibrierungsphase von ca. 30 Minuten wurde der Puffer der Organbäder gewechselt und die Darmsegmente alle 5 Minuten elektrisch stimuliert. Bei stabilen und konstanten Kontraktionen wurden die ersten drei gleichmäßigen Kontraktionen als Kontrollwert benutzt. Placebo-Versuche zeigten konstante Kontraktionen über mehreren Stunden.

Die Testsubstanzen wurden dann alle 20 Minuten (vier Kontraktionen in 5-minütigen Abständen waren ausreichend als Einwirkzeit für die Substanz) in kumulativ steigender Konzentration in die Organbäder eingeführt. Bei den Versuchen mit dem CB₁-Antagonist SR141716 wurde, vor der Gabe der zu untersuchenden Substanz, die Einwirkzeit des Antagonisten auf 1 Stunde verlängert.

Die OP-Präparate aus dem menschlichen Kolon wurden nach der Entnahme aus den Patienten sofort in ein mit Carbogen aufgesättigtem KRP eingebracht und ins Labor transportiert. Die mittlere warme Ischämiezeit für die Geweberesektate war 27 min; die mittlere kalte Ischämiezeit war 1 h und 14 Minuten. Bei der Präparation des Gewebes wurden Serosa und Submucosa sorgfältig entfernt und ca. 1 cm langen und 0.5 cm breiten Streifen wurden vorbereitet und in die Organbäder eingebracht. Die Segmente wurden an beiden Enden mit chirurgischen Fäden geknotet und an den Kraftwandler angebracht. Auch bei diesen Versuchen wurde, nach einer Äquilibrierungsphase von ca. 30 Minuten, der Puffer der Organbäder gewechselt und die Darmsegmente alle 5 Minuten elektrisch stimuliert.

In dieser Studie wurden folgende Versuche durchgeführt:

- Wirkung des nichtselektiven GPR119-Agonisten Oleylthanolamide (OEA) auf die Kontraktilität im Dünndarm und Kolon der Maus
- Wirkung des selektiven GPR119-Agonisten AS 1269574 auf die Kontraktilität im Dünndarm und Kolon der Maus
- Plazeboversuche mit Mausgewebe
- Wiederholung der Versuche in Anwesenheit des CB₁-Antagonist SR141716
- Wirkung von OEA und AS 1269574 im menschlichen Kolon
- Plazeboversuche mit menschlichem Gewebe
- Wiederholung der Humangewebe-Versuche in Anwesenheit von SR141716

3.1.5 Auswertung

Es wurden die Amplituden der elektrisch induzierten Kontraktionen ausgewertet.

Die Amplitude wurde aus dem Abstand zwischen Basallinie und dem jeweiligen maximalen Ausschlag der Reflexantwort ermittelt (**Abb.4**). Die Kontraktionskraft wurde in Gramm (g) gerechnet. Als Kontrollwert wurde der Mittelwert aus den ersten drei Kontrollkontraktionen (ohne Hinzugabe einer Substanz) gewählt und als 100 % angesehen. Bei Zugabe der Testsubstanzen wurde die Änderung der Kontraktionsamplitude erfasst und erneut der Mittelwert daraus ausgerechnet. Die Wirkung der Testsubstanzen wurde dann im Verhältnis zum Kontrollwert von 100 % berechnet. Die Amplitude wurde mit der Software SPIKE2 4.01 (Cambridge Electronic, Cambridge, U.K.) ausgewertet.

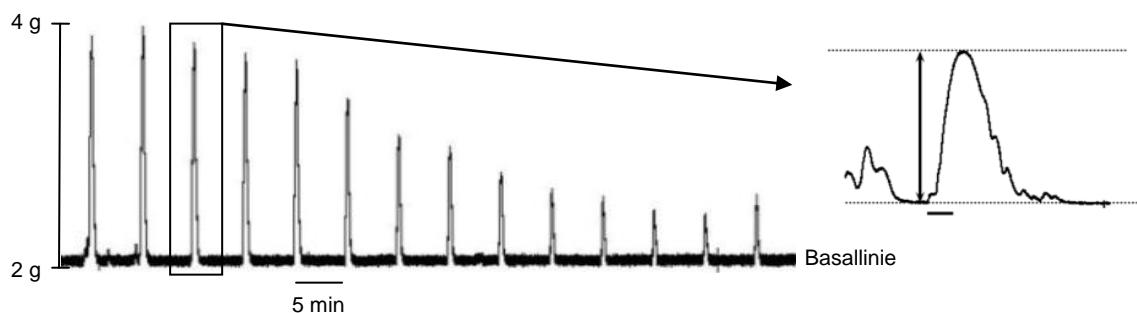


Abb.4 Schematische Darstellung eines Beispielversuches mit Amplitudenmessung einer EFS-ausgelösten Kontraktion. Zeit zwischen den Kontraktionen = 5 min. Kontraktionsamplitude in Gramm (g) gemessen. (Elektrische Spannung: 40V, Stimulationsfrequenz: 10Hz und 50 Hz, Pulsdauer 0,5 ms, Stimulationsdauer: 10 sec).

3.1.6 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (Standard error of the mean S.E.M.) angegeben. Das Symbol „n“ steht für die Anzahl unabhängiger Experimente an Darmgewebe von unterschiedlichen Mäuse/Humanpräparaten. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der Student-t-Test für gepaarte Stichproben angewendet. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

4. ERGEBNISSE

4.1 ELEKTRISCHE FELDSTIMULATION AN DÜNNNDARMSEGMENTEN DER MAUS

4.1.1 Wirkung des nicht-selektiven GPR119-Agonisten OEA auf die glattmuskuläre Kontraktilität des Dünndarms der Maus

Die Zugabe von OEA in kumulativ steigenden Konzentrationen (100 nM – 100 µM) führte zu einer Hemmung der ausgelösten Kontraktionen im Dünndarm der Maus nur in hohen Konzentrationen (10 µM bis 100 µM). Bis zur Konzentration von 1 µM waren keine signifikanten Änderungen zu sehen. Bei 10 µM wird eine Amplitudenabnahme von $12 \pm 2,5\%$ beobachtet. In der höchsten Konzentration von 100 µM wurde eine Hemmung von $71 \pm 4,5\%$ erreicht ($n>6$, $p < 0,005$) (Abb. 5).

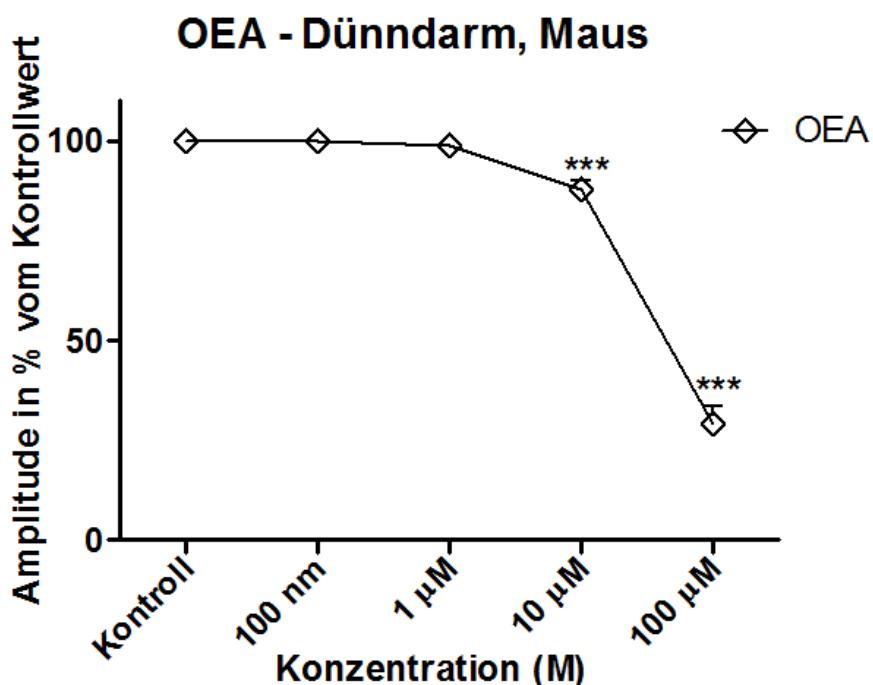


Abb.5 Einfluss von OEA auf die Kontraktilität im Dünndarm der Maus. Die früheste signifikante Abnahme der kontraktilen Aktivität wird mit 10 µM erreicht ($n>6$, $p < 0,005$) mit einer Amplitudenabnahme von $12 \pm 2,5\%$. In der höchsten Konzentration von 100 µM wurde eine Hemmung von $71 \pm 4,5\%$ erreicht.

4.1.2 Wirkung des selektiven GPR119-Agonisten AS1269574 auf die glattmuskuläre Kontraktilität des Dünndarms der Maus

Wie bei OEA führt AS1269574 zu einer schwachen Abnahme der Kontraktilität im Dünndarm der Maus. Es zeigt sich lediglich in der höchsten Konzentration von 100 µM eine Abnahme der Amplitude von $22 \pm 3,5\%$ erreicht ($n>6$, $p< 0,0001$) (Abb.6).

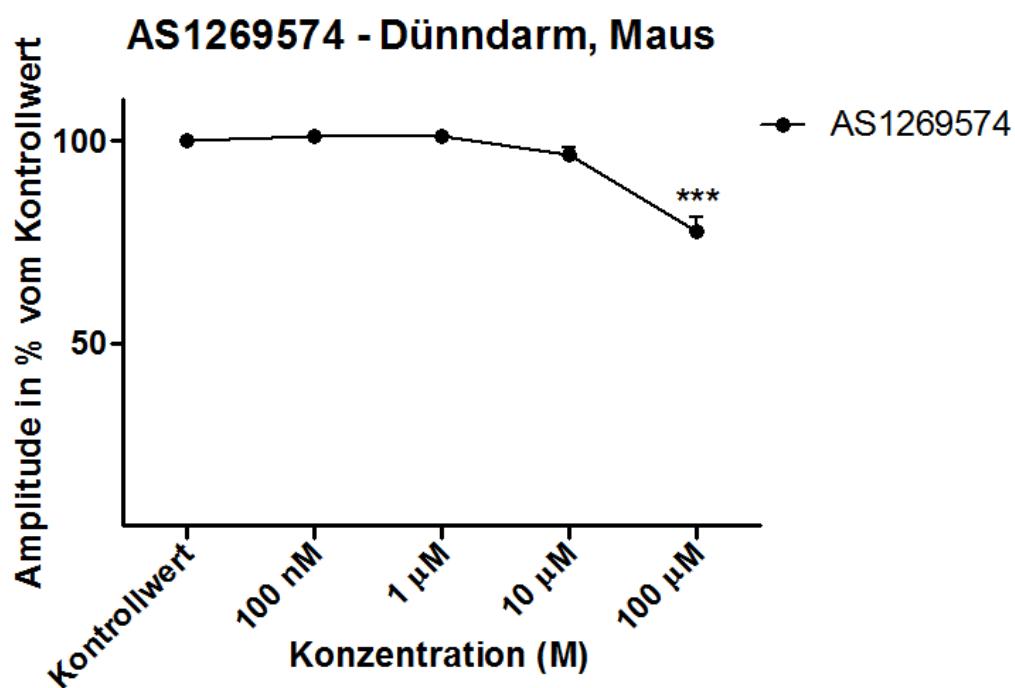


Abb.6 Einfluss des selektiven GPR119 Agonisten AS1269574 auf die Kontraktilität im Dünndarm der Maus. Es zeigte sich einen Einfluss nur bei einer Konzentration von 100 µM mit einer Abnahme der Amplitude von $22 \pm 3,5\%$ (p -Wert bei 100 µM *** = $< 0,0001$, $n>6$)

4.1.3 Interaktion zwischen dem CB₁-Rezeptor-Blocker SR141716 und OEA im Dünndarm der Maus

Um die mögliche Interaktion zwischen dem CB₁-Rezeptor und dem GPR119-Rezeptor zu untersuchen erfolgte nun die pharmakologische Antagonisierung des CB₁-Rezeptors mit dem selektiven Antagonisten SR141716 in einer Konzentration von 100 nM. Bei hohen Konzentrationen (10-10 µM) von OEA zeigt sich mit und ohne Antagonist eine Reduktion der Kontraktionsamplitude. Signifikante Unterschiede wurden nicht beobachtet ($n > 6$, p-Wert nicht signifikant). (Abb.7)

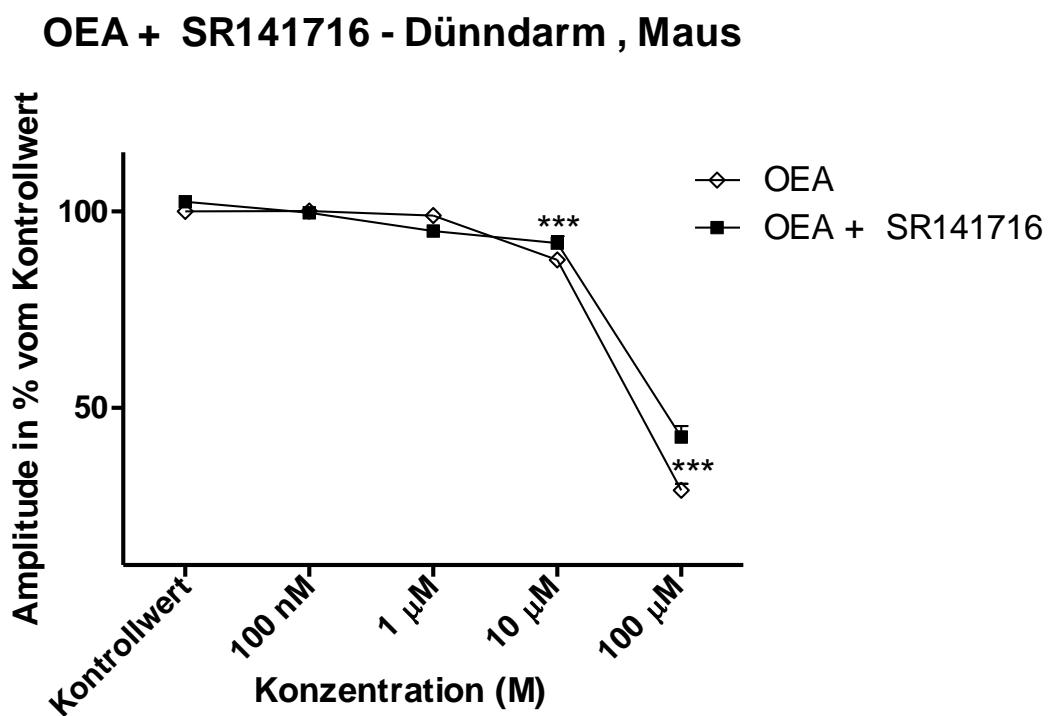


Abb.7 Interaktion zwischen OEA und SR141716 im Dünndarm der Maus. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der OEA-Wirkung bei der Hemmung der Kontraktilität nach SR141716-Gabe ($n > 6$).

4.1.4 Interaktion zwischen dem CB₁-Rezeptor-Blocker SR141716 und AS1269574 im Dünndarm der Maus

Wie bei OEA wird die Wirkung von AS1269574 durch SR141716 nicht signifikant beeinflusst. (**Abb.8**)

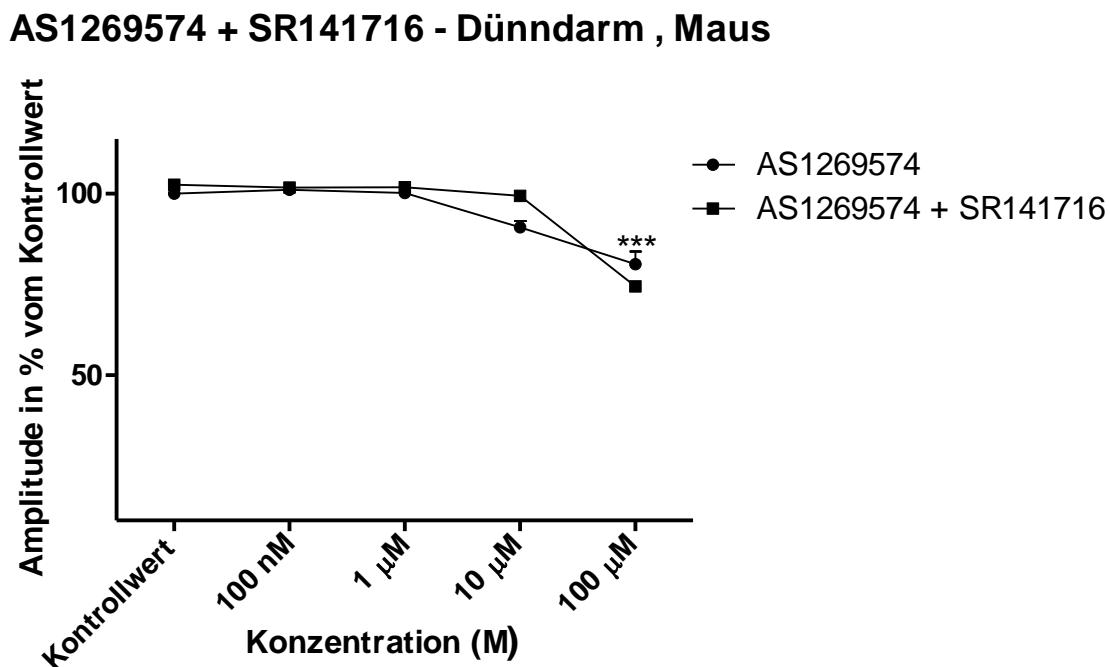


Abb.8 Interaktion zwischen AS1269754 mit SR141716. Auch im Dünndarm zeigen sich keine signifikanten Unterschiede nach CB₁-Antagonismus (p-Wert nicht signifikant)

4.2 ELEKTRISCHE FELDSTIMULATION AN KOLONSEGMENTEN DER MAUS

4.2.1 Wirkung des nicht-selektiven GPR119 Agonisten OEA auf die glattmuskuläre Kontraktilität des Kolon der Maus

OEA führt im Kolon der Maus zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Kontraktilität schon ab einer Konzentration von 1 μM. Diese Konzentration führt zu einer Abnahme der Kontraktilität von $6,7 \pm 1,4\%$. Bei 100 nM wurde keine signifikante Wirkung beobachtet. Bei 10 μM kommt es zu einer Abnahme der Kontraktionen von $20 \pm 3\%$. In der höchsten Konzentration von OEA kommt es zu einer ausgeprägten Abnahme der Kontraktilität von $81,5 \pm 5\%$ ($n > 6$) (**Abb.9**)

p-Wert bei 1 μM *** = 0,0007, p-Wert bei 10 μM *** = < 0,0001, p-Wert bei 100 μM *** = < 0,0001

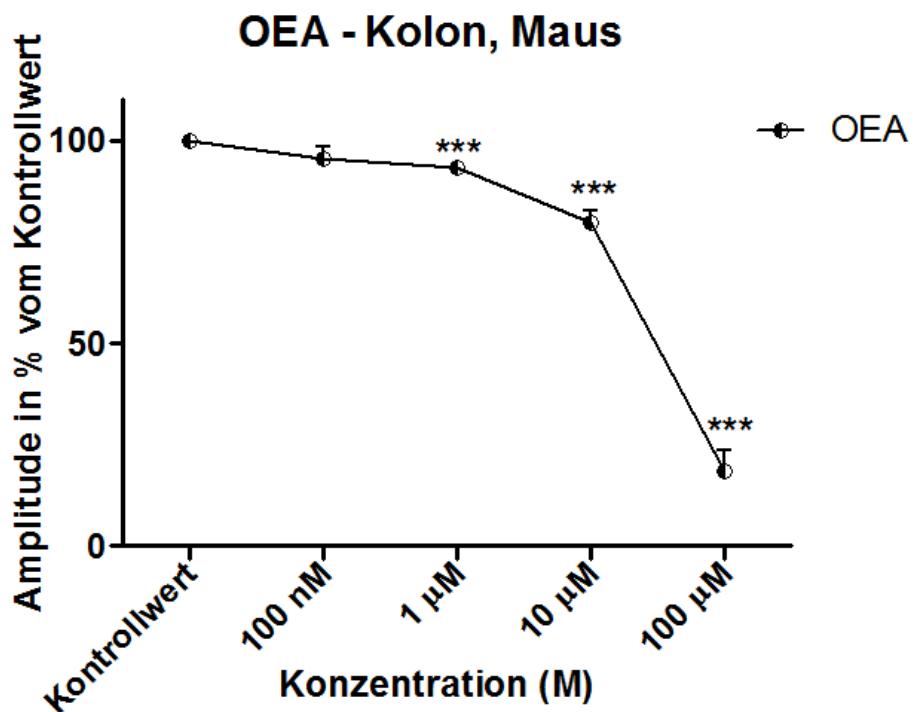


Abb.9 Wirkung von OEA im Kolon der Maus. Es zeigen sich signifikante Abnahmen der muskulären Kontraktilität ab einer Konzentration von 1 μM ($6,7 \pm 1,4\%$). Bei 10 μM kommt es zu einer Abnahme der Kontraktilität um $20 \pm 3\%$. Die höchste hemmende Wirkung ist bei einer OEA Konzentration von 100 μM zu sehen ($81,5 \pm 5\%$). ($n > 6$, p-Wert bei 1 μM *** = 0,0007, p-Wert bei 10 μM *** = < 0,0001, p-Wert bei 100 μM *** = < 0,0001)

4.2.2 Wirkung des selektiven GPR119-Agonisten AS1269574 auf die glattmuskuläre Kontraktilität im Kolon der Maus

Ähnlich wie OEA zeigt AS1269574 eine ausgeprägte Hemmung der Kontraktilität im Kolon der Maus schon ab einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ (Abnahme der Kontraktilität um $50,5 \pm 6 \%$). In der höchsten Konzentration von $100 \mu\text{M}$ ist die Abnahme der Kontraktilität am größten ($88 \pm 3,5 \%$, $n>6$) (Abb.10). p-Wert *** bei $10 \mu\text{M} = 0,0002$, *** bei $100 \mu\text{M} = < 0,0001$

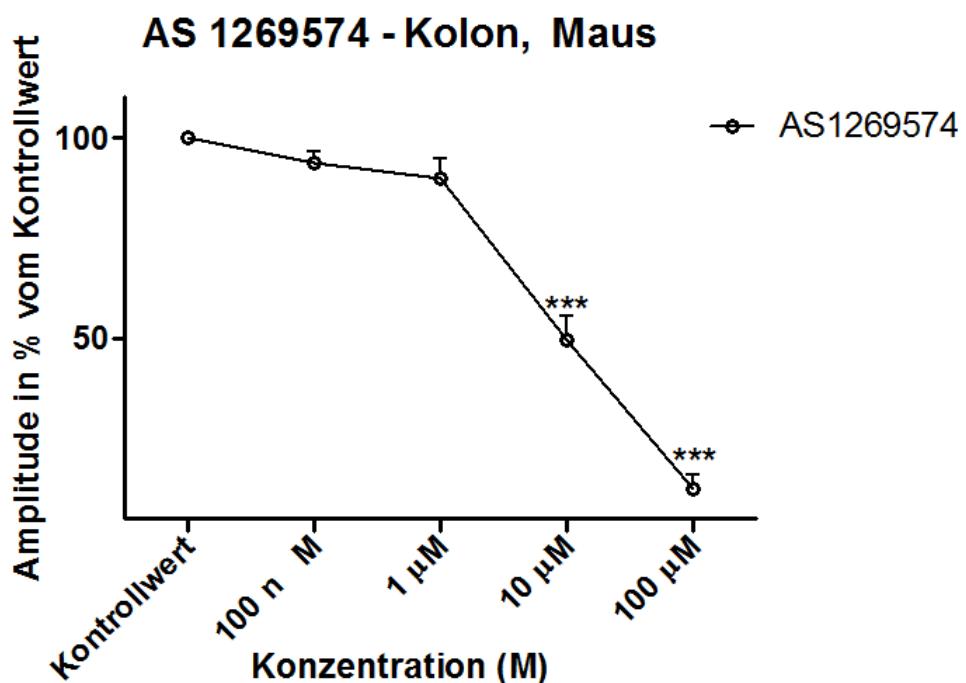


Abb.10 Konzentrationsabhängige Hemmung der Kontraktilität von AS1269574 im Kolon der Maus. Eine signifikante Abnahme der Kontraktilität findet sich schon ab einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$. Die maximale Abnahme der Kontraktilität findet sich bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$. ($n>6$, bei $10 \mu\text{M} p = 0,0002$, bei $100 \mu\text{M} p < 0,0001$)

4.2.3 Interaktion zwischen dem CB₁-Rezeptor Blocker SR141716 und OEA im Kolon der Maus

Wie bei den Versuchen im Dünndarm, erfolgte auch im Kolon die Antagonisierung des CB₁-Rezeptors um die mögliche Interaktion mit dem nicht-selektiven GPR119-Agonisten OEA zu untersuchen.

Die Zugabe von SR141716 (100 nM, Äquilibrierungsphase von 1 h) vor OEA zeigt einen signifikanten Einfluss auf die OEA-induzierte Wirkung auf die Kontraktilität. Bei den höheren OEA-Konzentrationen (10 µM und 100 µM) wird eine signifikante Abnahme der hemmenden Wirkung auf die Kontraktilität beobachtet. Bei einer OEA Konzentration von 10 µM nimmt die Amplitude nach SR141716 Gabe um $11,5 \pm 3\%$ zu. Bei 100 µM nimmt die Amplitude der Kontraktionen um $16,5 \pm 7\%$ zu (p -Wert < 0,005, n=7) (Abb.11).

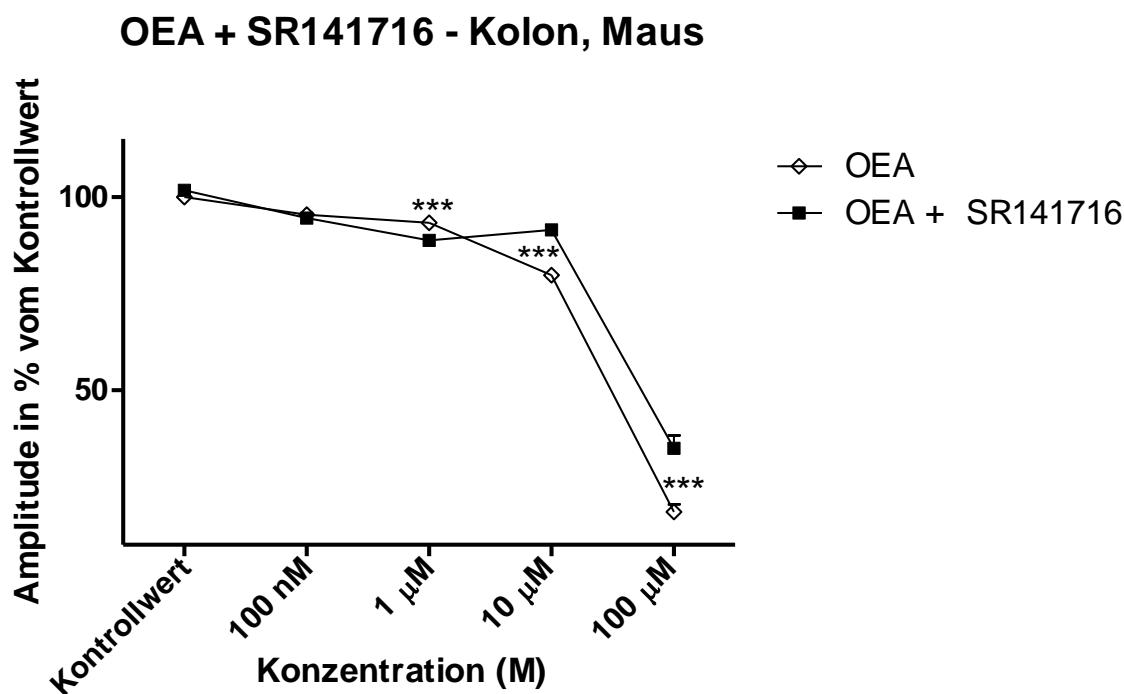


Abb.11 Einfluss vom CB₁-Rezeptor Antagonist SR141716 (100 nM) auf die OEA-vermittelte Hemmung der kontraktilen Aktivität im Kolon der Maus. Es zeigt sich eine partielle Antagonisierung der OEA-vermittelten Hemmung der Kontraktionen mit einer Signifikanz von $p<0,005$, n=7.

4.2.4 Interaktion zwischen dem CB₁-Rezeptor Blocker SR141716 und AS1269574 im Kolon der Maus

Die Gabe von SR141716 (Äquilibrierungsphase von 1 h) führt zu einer deutlichen Antagonisierung der AS1269574 –Wirkung im Kolon der Maus. AS 1269574 bis zu einer Konzentration von 10 µM entfaltet keine hemmende Wirkung mehr, und die Amplitude der Kontraktionen bleibt bei auf Niveau der Kontrollwerte. Die Wirkung von AS1269574 in höherer Konzentration (100 µM) wird aber nur partiell von SR141716 antagonisiert, mit einer Zunahme der Amplitude um 28 ± 6 % (n=7, p< 0,0001).

Hier wird den Kontrollwert nicht erreicht (**Abb.12**).

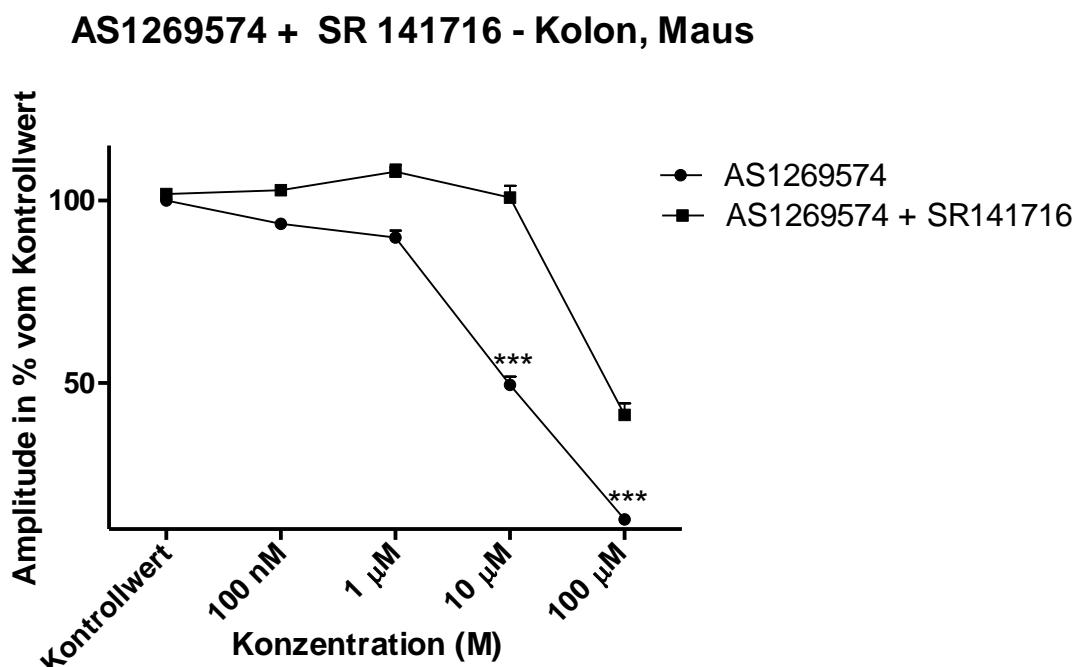


Abb. 12 Die Abbildung zeigt den Einfluss von AS1269574 vor und nach CB₁-Blockade durch SR141716. Die Blockade führt zu einer Aufhebung der AS1269574-Wirkung bis zu einer Konzentration von 10 µM. Bei einer AS1269574 Konzentration von 100 µM ist die Antagonisierung nur partiell, mit einer Zunahme der Amplitude um 28 ± 6 % (n=7, Signifikanz p< 0,0001)

4.3 ELEKTRISCHE FELDSTIMULATION AN HUMANEN KOLONSEGMENTEN

4.3.1 Wirkung des nicht-selektiven GPR119-Agonisten OEA auf die glattmuskuläre Kontraktilität im menschlichen Kolon

OEA zeigt eine konzentrationsabhängige Hemmung der Kontraktilität schon ab einer Konzentration von 10 nM ($3 \pm 1,5\%$, $p < 0,03$, $n=6$). Bei 100 nM wird eine Abnahme der Kontraktilität von $9 \pm 2,5\%$ ($p < 0,006$) beobachtet. Bei 1 μ M zeigt sich eine Abnahme der Amplitude um $18 \pm 3\%$ ($p < 0,0001$). Bei 10 μ M kommt es im Vergleich zur vorherigen Konzentration zu einer weniger ausgeprägten Abnahme der Kontraktilität von $16 \pm 5\%$ ($p < 0,004$). Die höchste OEA Konzentration von 100 μ M erzielt die höchste hemmende Wirkung auf die Kontraktilität mit einer Abnahme der Kontraktionsamplitude von $54 \pm 6\%$ ($p < 0,0001$). (Abb.13) Die Trägersubstanzen in dieser Versuchsreihe (DMSO, Aqua ad injectabilia und Tween80) zeigten keinen Einfluss auf die Kontraktionen (Ergebnisse nicht aufgeführt).

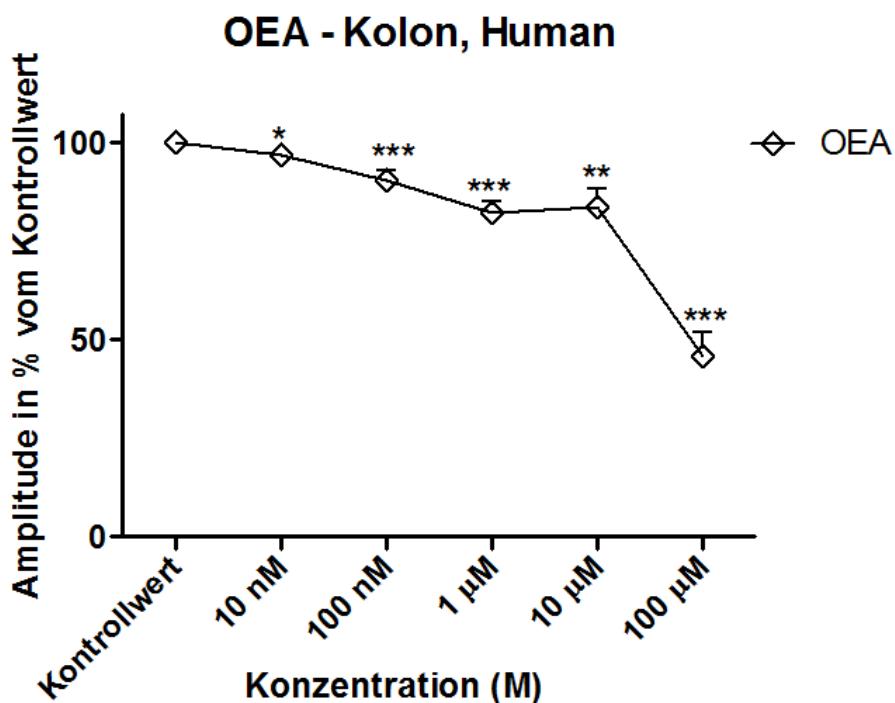


Abb.13 Darstellung des Einflusses von OEA in kumulativ steigenden Konzentrationen (10 nM – 100 μ M) auf die glattmuskuläre Kontraktilität im menschlichen Kolon ($n>6$). Bei 10 nM wird eine Amplitudenabnahme von $3 \pm 1,5\%$ erreicht ($p < 0,03$). Bei 100 nM beträgt die Abnahme der Kontraktionen $9 \pm 2,5\%$ ($p < 0,006$). Bei 1 μ M zeigt sich eine Abnahme der Amplitude um $18 \pm 3\%$ ($p < 0,0001$). Die höchste OEA-Konzentration (100 μ M) erreicht eine Abnahme der Kontraktilität von $54 \pm 6\%$ ($n=6$, $p < 0,0001$)

4.3.2 Wirkung des selektiven GPR119-Agonisten AS1269574 auf die glattmuskuläre Kontraktilität im menschlichen Kolon

Der selektive GPR119-Agonist AS1269574 verdeutlicht seine Wirkung durch die kontinuierliche und signifikante Abnahme der Kontraktilität im humanen Kolon. Er entfaltet seine Wirkung schon ab einer Konzentration von 10 nM, mit einer signifikanten Abnahme der Amplitude um $3,5 \pm 1\%$ ($p= 0,0025$). Bei 100 nM wird eine Abnahme der Kontraktilität um $11,5 \pm 2\%$ beobachtet ($p < 0,0001$). Es zeigt sich weiterhin eine konzentrationsabhängige Hemmung der Kontraktilität bei Konzentrationen von 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M mit den jeweiligen Abnahmen der Amplituden um $37 \pm 6\%$, $67 \pm 6\%$ und $91,5 \pm 1\%$ ($p < 0,0001$). Unter 100 μ M AS1269574 zeigt sich eine fast vollständige Hemmung der Kontraktilität ($n = 6$).

(Abb.14)

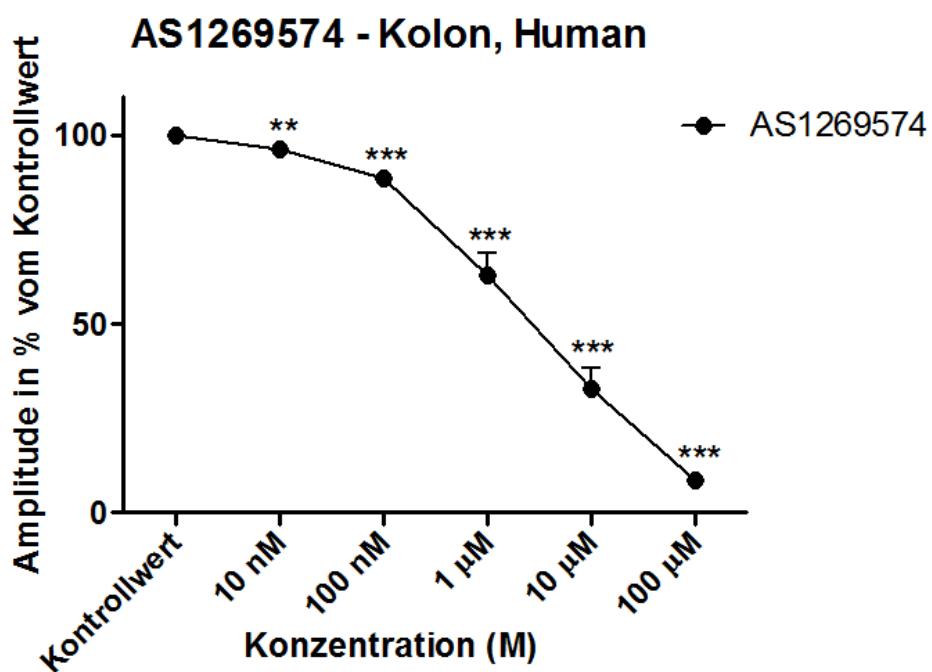


Abb.14 Einfluss von AS1269574 in kumulativ steigender Konzentration (10 nM-100 μ M) auf die Kontraktilität im menschlichen Kolon. Bei 10 nM kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Amplituden um $3,5 \pm 1\%$ ($p=0,0025$). In der höheren Konzentration von 100 nM beträgt die Abnahme der Kontraktionsamplitude $11,5 \pm 2\%$ ($p < 0,0001$). Bei 1 μ M wird eine Abnahme von $37 \pm 6\%$, bei 10 μ M von $67 \pm 6\%$ und bei 100 μ M von $91,5 \pm 1\%$ erreicht ($p < 0,0001$). Es zeigt sich also eine konzentrationsabhängige Hemmung der Kontraktilität schon bei niedrigen Konzentrationen.

4.3.3 Interaktion zwischen dem CB₁-Rezeptor-Blocker SR14716 und OEA im menschlichen Kolon

Der nicht-selektive GP119-Agonist OEA bewirkt dosisabhängig eine Abnahme der Kontraktilität, die ab einer Konzentration von 10 nM signifikant ist. Der CB₁-Rezeptor-Antagonist SR141716 (100 nM) antagonisiert vollständig die Wirkung von OEA im menschlichen Kolon (**Abb.15**). Die Zugabe von OEA bei vorheriger Gabe von SR141716 (Äquilibrierungsphase von 1 h) zeigt keine Einflüsse auf die Kontraktilität des Kolons mehr; die Amplituden der Kontraktionen bleiben bis zum Ende des Versuchs auf Niveau der Kontrollamplitude von 100 % (n= 6, p< 0,0001). Die für diese Versuche benutzte Trägersubstanzen DMSO, Tween80 und *Aqua ad iniecatabilia* zeigten keinen Einfluss auf die EFS-ausgelösten Kontraktionen (Ergebnisse nicht aufgeführt). Es zeigt sich also eine total Aufhebung der OEA Wirkung nach CB₁-Antagonisierung.

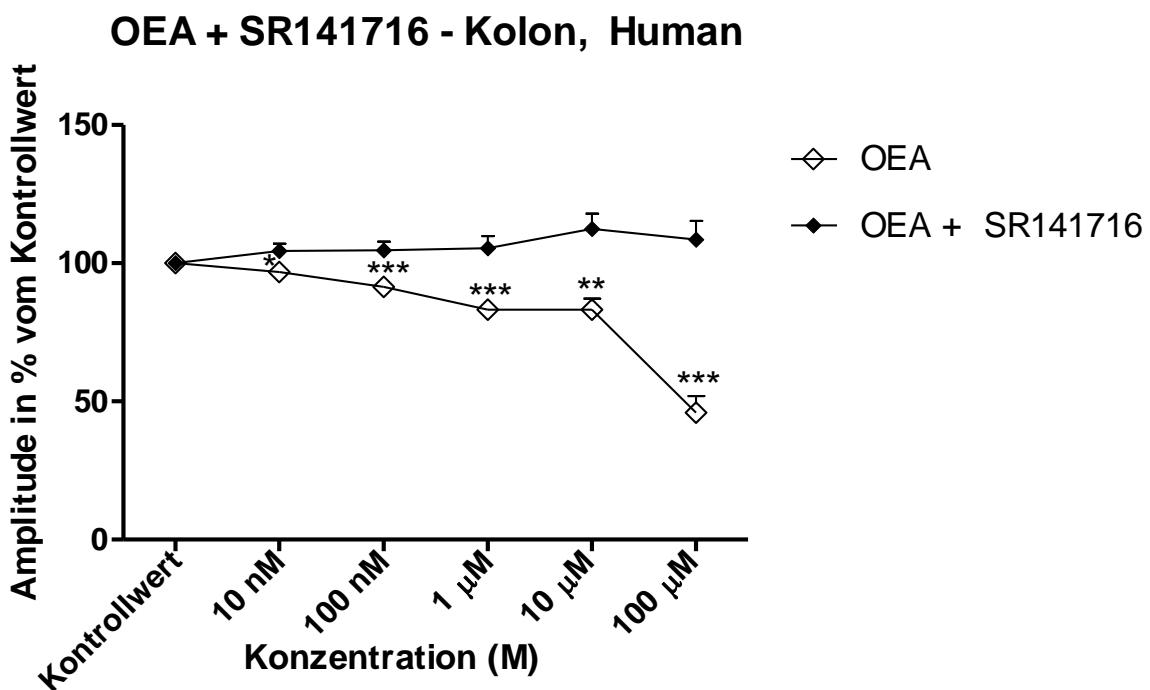


Abb. 15 Einfluss des nicht-selektiven GPR119 Agonisten OEA alleine und nach Zugabe des CB₁-Antagonisten SR141716A (100 nM) im menschlichen Kolon. Nach SR141716-Gabe entfaltet OEA keine hemmende Wirkung mehr, und die Kontrollwerte werden wieder erreicht (n= 6, p< 0,0001). Es zeigt sich also eine totale Antagonisierung der OEA-vermittelten Hemmung der Kontraktilität.

4.3.4 Interaktion zwischen dem CB₁-Rezeptor-Blocker SR141716 und AS1269574 im menschlichem Kolon

Der selektive GP119-Agonist AS1269574 führt zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Kontraktilität im menschlichen Kolon. Die Zugabe vom CB₁-Rezeptor-Blocker SR141716 führt zu einer partiellen Antagonisierung der AS1269574-induzierten Wirkung (n=6) (**Abb.16**). Bei AS1269574 Konzentrationen von 10 nM wird der Kontrollwert von 100 % erreicht, was eine vollständige Antagonisierung bei dieser niedrigen Konzentrationen zeigt. Bei 100 nM zeigt sich, nach Gabe von SR141716, eine Zunahme der Amplituden von $11,5 \pm 2\%$, was den Kontrollwert von 100 % wieder erreicht. Bei einer steigenden AS1269574-Konzentration von 1 μ M zeigt sich nach CB₁-Blockierung eine Zunahme der Amplitude um $27 \pm 4,5\%$; der Kontrollwert von 100 % wird aber nicht erreicht, was eine partielle Antagonisierung zeigt. Bei einer AS1269574-Konzentration von 10 μ M kommt es durch SR141716-Zugabe zu einer Zunahme der Kontraktilität um $43 \pm 5\%$. In der höchsten AS1269574-Konzentration (100 μ M) führt die CB₁-Antagonisierung zu einer Zunahme der Amplitude um $21,5 \pm 3\%$. Signifikanz der Interaktion: p< 0,0001. Die für diese Versuche benutzte Trägersubstanzen DMSO, Tween80 und *Aqua ad injectabilia* zeigten keinen Einfluss auf die EFS-ausgelösten Kontraktionen (Ergebnisse nicht aufgeführt).

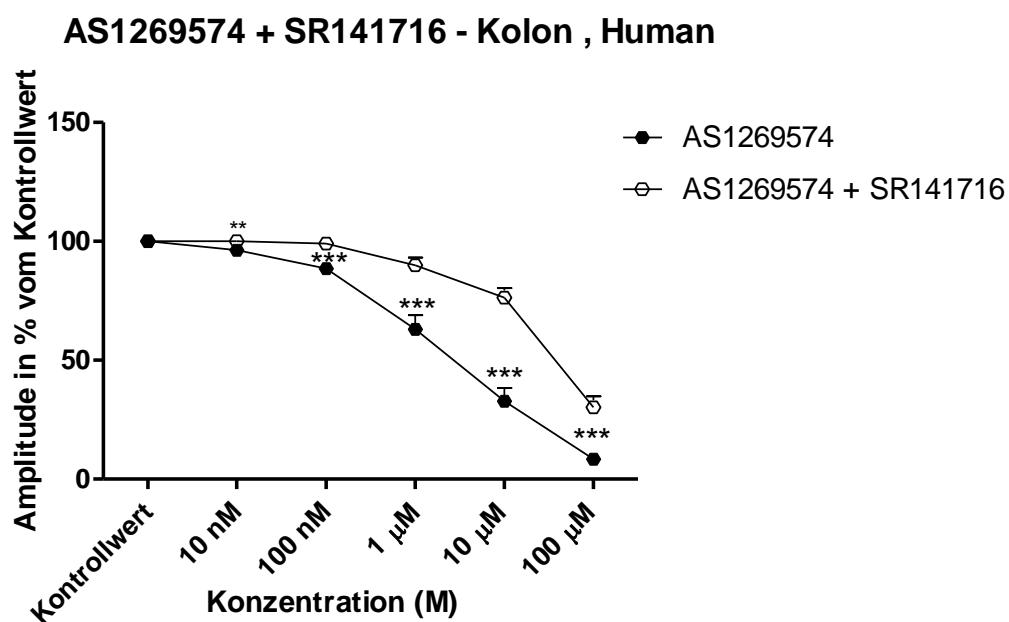


Abb.16 Einfluss des selektiven GPR119-Agonisten AS1269574 alleine und nach Zugabe von SR141716 (100 nM) auf die Kontraktilität im menschlichen Kolon. Es zeigt sich eine partielle Antagonisierung durch SR141716 (p< 0,0001). Die Kontrollwerte von 100 % werden nicht bei allen Konzentrationen erreicht.

5. ALLGEMEINE DISKUSSION

5.1 ENTERISCHES NERVENSYSTEM (ENS)

Die Innervation des Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) erfolgt durch das zentrale (ZNS) und durch das enterische Nervensystem (ENS). Diese zwei Systeme kommunizieren miteinander, obwohl das ENS, bekannt als „Gehirn des Magen-Darm-Traktes“, viele Funktionen wie z.B die GI-Motilität und Sekretion weitgehend unabhängig vom ZNS regulieren kann.³ Die intrinsische Innervation des Darms setzt sich zusammen aus Ganglienzellen die sich in zwei Plexus befinden: der myenterische Plexus (auch Auerbach-Plexus genannt) zwischen der Ring- und der Längsmuskelschicht der *Muscularis externa* und der submuköse Plexus (Meissner-Plexus) in der *Submucosa*.⁴ Während die Neurone im *Plexus myentericus* die glattmukuläre Aktivität des Darms regulieren, modulieren die Neurone im *Plexus submucosus* die sekretorische Funktion und die Durchblutung.⁵ Beide Plexus werden von präganglionären parasympatischen und postganglionären sympathischen Fasern innerviert, was die modulierenden Effekte des ZNS auf das ENS vermittelt. Unter den enterischen Neuronen findet man, je nach Funktion und Eigenschaften, afferente/sensorische Neurone, Interneurone und efferente, postganglionäre-parasympathische Neurone.^{6, 7} Sensorische Neurone nehmen intraluminale Veränderungen im GI-Trakt (chemisch/mechanisch) wahr und aktivieren dann Interneurone, die die sekretomotorische Neurone entweder stimulieren oder hemmen. Die Mehrheit der exzitatorischen Neuronen benutzt Acetylcholine (ACh) und Substanz P als exzitatorische Neurotransmitter/Neuropeptid, während andere Neurone inhibitorische Neurotransmitter wie Stickstoffmonoxid (NO), vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Neuropeptid Y (NPY) und Adenosintriphosphat (ATP) in unterschiedlichen Zusammensetzungen verwenden.⁸ Das enterische Nervensystem wird durch das ZNS und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse moduliert, was zusammen als „Hirn-Darm-Achse“ bezeichnet wird („Brain-gut Axis“). Unter physiologischen Bedingungen erreichen Signale aus dem GI-Trakt das Gehirn, was wiederum zu Änderungen in der Motilität, Sekretion und Immunsystem des GI-Traktes führen kann.⁹

5.2 Endocannabinoidsystem (ECS)

Seit tausenden von Jahren wurden pflanzliche- und Kräuterpräparate für die Therapie gastrointestinaler Beschwerden eingesetzt.¹⁰ Unter diesen Präparaten hat *Cannabis sativa* eine wichtige Stellung bei der Behandlung verschiedener Störungen wie Migräne, Krampfanfälle, Glaukom, Muskelpasmen, Schmerz, Übelkeit und Diarröh gehabt.¹¹ Weitere Cannabis-Einsatzgebiete waren GI-Infektionen, entzündliche Prozesse und Motilitätsstörungen.¹² Die verantwortliche Cannabis-Komponente mit diesen positiven Eigenschaften war Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), erstmals in den Sechzigerjahren entdeckt.¹³ Seitdem wurde ein neuer endogener Signalweg identifiziert, das sog. Endocannabinoid System (ECS).

Die Hauptkomponente dieses Systems sind:

- die CB₁- und CB₂-Rezeptoren (entdeckt und kloniert jeweils in 1990 und 1993)^{14, 15}
- endogene CB-Liganden (wie Anandamide und 2-arachidonylglycerol (2-AG))^{16, 17}
- *fatty acid amide hydrolase* (FAAH), das wichtigste Enzym zur Inaktivierung der endogenen CB-Liganden und die biosynthetische und metabolische Wege der Endocannabinoiden^{18, 19}
- und Endocannabinoid-Membrantransporter, die weiter erforscht werden müssen (es gibt noch keinen Konsensus bezüglich des Transportmechanismus)²⁰

Durch das ECS werden viele physiologische und pathologische Prozesse moduliert und beeinflusst. Es nimmt u.a. Teil an der Energiebilanz und der Nahrungsaufnahme durch zentrale und periphere Wirkungen, inklusive dem GI-Trakt.²¹ Dadurch führen Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten zu einer vermehrten Nahrungs- und Körpergewichtszunahme, was in der Therapie von Kachexie im Rahmen HIV-Erkrankungen und Tumoren zu Nutzen kommen kann.^{22, 23} Cannabinoide besitzen weiterhin effektive antiemetische Eigenschaften.²⁴ Das Vorhandensein von zentralen Nebenwirkungen macht aber deren Einsatz eher zur *Second-Line-Therapie*.²⁵

Das ECS spielt auch eine Rolle in der Modulation der Schmerzwahrnehmung, was positive Effekte in der Behandlung von chronischen Schmerzzuständen und Spastik bei Multiple Sklerose zeigt.^{26, 27} Auch neurodegenerative Erkrankungen wie *Morbus Alzheimer* können durch die ECS-Modulation positiv beeinflusst werden.²⁸

Zu guter Letzt zeigen Cannabinoide auch antitumorale Wirkungen, was ein attraktives pharmakologisches *target* in der Therapie maligner Tumoren darstellt.²⁹

5.3 CANNABINOIDREZEPTOREN

Wie bereits in Kapitel 2 erwähnt, sind der CB₁- und CB₂-Rezeptor die klassischen Cannabinoide-Rezeptoren für alle CB-Agonisten (Endocannabinoide, synthetisch hergestellte Cannabinoide und Phytocannabinoide). Diese zwei Rezeptoren gehören der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) an.³⁰ Während CB₁ hauptsächlich im zentralen und peripheren Nervensystem lokalisiert ist, wird CB₂ vorwiegend auf Immunzellen exprimiert und wird bei entzündlichen Prozessen verstärkt exprimiert.³¹⁻³³ Im Darm sind die CB₁-Rezeptoren in den zwei Plexus des ENS lokalisiert; *Plexus submucosus* und *Plexus myentericus*.³² In diesen Plexus finden sich CB₁- und CB₂-Rezeptoren auf Motoneuronen, Interneuronen und primär-afferente Neuronen. Auf inhibitorischen Motoneuronen, die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) enthalten, sind weder CB₁- noch CB₂-Rezeptoren zu finden.^{34, 35}

Die Wirkung der CB-Rezeptoren auf die Motilität im GI-Trakt wird in 6.1.5 erläutert.

Es werden weiterhin andere Rezeptoren durch bestimmte Endocannabinoide aktiviert: u.a. Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha), GPR55 und GPR119.

Das Endocannabinoid Anandamide und Oleylethanolamide (OEA) sind beide Liganden des TRPV1 Rezeptors.³⁶ OEA ist ein Lipid mit struktureller Ähnlichkeit zu Anandamid, besitzt aber keine bzw. eine nur schwache CB₁- und CB₂-Affinität. Es gibt Hinweise, dass das ECS eine Rolle bei der Modulation der Aktivierung des TRPV1 Rezeptors spielen könnte.³⁷ Dieser Rezeptor, zusammen mit dem CB₁-Rezeptor, kann z.B. die viszerale Hyperalgesie beeinflussen.³⁸ Es findet sich auch ein Zusammenspiel zwischen ECS und TRPV1 bei der Modulation der Motilität unter pathologischen Zuständen.³⁹ Die Pharmakologie der Interaktionen zwischen Endocannabinoiden und TRPV1 ist aber komplex und noch nicht völlig geklärt; weitere Studien sollen diese Interaktionen besser untersuchen.

PPAR α ist ein intrazellulärer Rezeptor, der bei Aktivierung als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Gene reguliert. Dieser Rezeptor ist im ganzen GI-Trakt lokalisiert, mit der höchsten Konzentration im Dünndarm.⁴⁰ OEA und PEA (Palmitoylethanolamid) sind keine CB-Rezeptor Liganden, aktivieren jedoch PPAR α . Wahrscheinlich sind auch THC und Anandamid PPAR α -Agonisten. Die Interaktion zwischen PPAR α und den Endocannabinoiden führt zur Regulation des Sättigungsgefühl, der Gewichtsreduktion, der Lipolyse, der Analgesie und zu Anti-Entzündlichen Effekten.⁴¹ Dieser intrazelluläre Rezeptor scheint nicht an die Regulation der Motilität im GI-Trakt teilzunehmen.

GPR55 wurde erstmals in 1999 als *orphan* G-Protein-gekoppelter Rezeptor identifiziert und⁴², trotz geringer Strukturähnlichkeiten zu den CB-Rezeptoren, wurde dieser Rezeptor den CB-Rezeptoren zugeordnet.⁴³ Doch der Cannabinoid-Status wird bis heute kontrovers diskutiert.⁴⁴ GPR55 wird hauptsächlich im ZNS, im oberen-GI-Trakt und den Nebennieren exprimiert. Eine Studie suggeriert GPR55 als neuer CB-Rezeptor mit CB₁- und CB₂-unabhängigen Signalwegen.⁴⁵ Unter den vielen Substanzen die getestet worden sind, zeigte auch OEA, ein Lipid mit struktureller Ähnlichkeit zum Endocannabinoid Anandamid ohne CB-Rezeptor Affinität, GPR55-Aktivität.⁴³

5.4 GPR119

In der Literatur findet man verschiedene Namen die für denselben Rezeptor benutzt worden sind: u.a. GPCR2⁴⁶ und 19AJ.⁴⁷ 2003 wurde erstmals GPR119 (zusammen mit anderen ähnlichen G-Protein gekoppelten Rezeptoren) durch eine schwedische Arbeitsgruppe als Waise Klasse 1 (Rhodopsin-Typ) G-Protein gekoppelter Rezeptor identifiziert.⁴⁸ Fredriksson ordnete den Rezeptor zu einer neuen Untergruppe der Bioamin-Rezeptoren zu. Griffin G.⁴⁹ zeigte, dass GPR119 die größte Affinität zu den Cannabinoid-Rezeptoren besitzt, mit Oleylethanolamide als effektivstes und potentestes Ligand für diesen Rezeptor, im Gegensatz zur Studie von Bonini JA *et al.*,⁵⁰ die bestimmte Retinoide als Rezeptor-Agonisten suggeriert hatte (*all-trans* Retinsäure). Overton *et al.*⁵¹ beschrieb auch die OEA-induzierte Aktivierung von Hefen die entweder humanen oder murinen GPR119-Rezeptoren exprimierten. Andere Cannabinoide wie AEA haben dagegen keine Wirkung entfaltet. Aus diesen Berichten wurde dann GPR119 als putativer Cannabinoid-Rezeptor klassifiziert.

Doch die OEA-Konzentrationen die den GPR119-Rezeptor aktivieren können scheinen physiologischerweise zu hoch zu sein; andere mögliche potente endogene Agonisten müssen noch identifiziert werden. GPR119 wird hauptsächlich im Pankreas und im gastrointestinalen Trakt exprimiert.

Seit der Entdeckung von GPR119 in den pankreatischen Insel- und β -Zellen wurde eine modulierende Rolle des Rezeptors auf die Insulin-Freisetzung spekuliert. Seitdem haben viele Studien gezeigt, dass GPR119-Agonisten tatsächlich die Glukoseabhängige Insulin-Freisetzung modulieren, ähnlich wie GLP-1-Analoga. Dabei gibt es keine signifikante Stimulation des basalen Glukose-Wertes.⁵²⁻⁵⁴ GPR119 ist auch in den intestinalen neuroendokrinen L-Zellen lokalisiert, wo es die GLP-1 Freisetzung stimuliert.^{55, 56} In einer Studie wurde herausgefunden, dass GPR119-Agonisten die GLP-1 Sekretion in GLUTag Zellen, intestinalen Zellen und *in vivo* glukoseunabhängig stimulieren. Im Vergleich war die GPR119-vermittelte Insulinfreisetzung, wie bereits beschrieben, glukoseabhängig.⁵⁷ Verschiedene Studien haben gezeigt, dass GPR119-Agonisten, sowohl in normoglykämischen als auch in hyperglykämischen Nagetiermodellen die Glukose-Peaks während des oralen Glukosetoleranztests (oGTT) verhindern/supprimieren können.⁵⁸ Das Inkretin GLP-1 hat aber viele Eigenschaften: Es inhibiert auch die glukoseabhängige Glukagon-Freisetzung, es verzögert die Magenentleerung und erhöht das Sättigungsgefühl in Tier- und Humanmodelle. Daraus folgt eine verminderte Kalorieneinnahme mit konsequenter Gewichtsabnahme.^{59, 60}

Verschiedene Moleküle wurden als GPR119-Liganden identifiziert. Unter diesen z.B. *platelet-activating factor* und *lyso-platelet activating factor*, *lysophosphatidic acid*, *lysophosphatidylserine*, und *lysophosphatidylcholine*.⁵² Seitdem auch OEA als Ligand für GPR119 beschrieben worden ist, wurde spekuliert, dass OEA, zusätzlich zur den Wirkungen auf PPAR α , auch ein endogener Ligand von GPR119 ist.² Es fehlen aber weitere Studien um das zu beweisen.

Andere GPR119-Agonisten sind in den letzten Jahren untersucht worden. Unterdessen PSN375963, PSN632408 und AS1269574. Während OEA die Insulin-Ausschüttung als Folge eines cAMP-Anstiegs und der Verstärkung der Glukose-abhängigen Ca^{2+} -Freisetzung erhöhte, hatten die synthetisch hergestellten GPR119-

Agonisten PSN375963 und PSN632408 unterschiedliche Effekte auf die Insulin Freisetzung, cAMP und intrazelluläres Ca^{2+} .⁵⁴ Das zeigte, dass trotz selektivem GPR119-Agonismus, andere GPR119-unabhängige Signalwege aktiviert werden könnten. In den letzten Jahren wurden weitere hochselektive und hochpotente GPR119-Agonisten entwickelt, mit denen die Wirkungen dieses Rezeptors besser untersucht werden können. Unter diesen neuen Substanzen zeigt AS1269574 die besten Eigenschaften (**Abb.17**). Dieser neue GPR119-Agonist wurde als potenzielles Pharmakon in der oralen Diabetes mellitus Typ II-Therapie untersucht und führte dabei zu einer in vitro und in vivo glukoseabhängigen Insulinsekretion.⁶¹

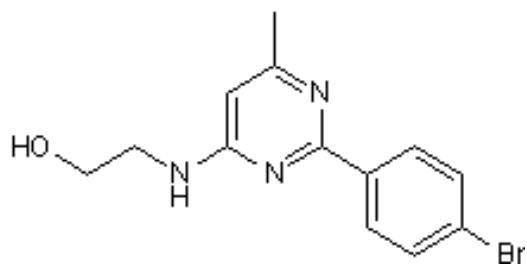


Abb.17 Struktur des selektiven GPR119-Agonisten AS1269574 (© Copyright 2015 Tocris Bioscience. All Rights Reserved). 2-[[2-(4-Bromophenyl)-6-methyl-4-pyrimidinyl]amino]ethanol

Weitere Modifikationen dieser Substanz führten zu anderen GPR119-Agonisten wie AS1535907 und AS1907417, die auch zu ähnlichen Ergebnisse führten.^{62, 63} In der vorliegender Arbeit wurde AS1269574 als selektiver GPR119-Agonist benutzt, weil es in verschiedenen Studien eine hohe Selektivität und Potenz gezeigt hat.^{64, 65}

5.5 WIRKUNGEN DER CANNABINOIDE AUF DIE GI-MOTILITÄT

Das ECS ist u.a. an der Darmmotilität, Magensekretion und dem GI-Transit beteiligt. Diese Effekte sind durch eine CB1-vermittelte präsynaptische Inhibition der Sekretion exzitatorischen Neurotransmitter vermittelt.⁶⁶ Darüber hinaus sind auch andere Mechanismen vorgeschlagen worden: unter anderem die Inhibition der nicht-adrenergen-nicht-cholinergen (*non-adrenergic-non-cholinergic*) extitatorischen und inhibitorischen Übertragung.^{67, 68} Es gibt Hinweise dafür, dass sich der GI-Trakt unter einem ständigen Einfluss des ECS befindet und dass die Cannabinoide als physiologische „Bremse“ der Motilität dienen.⁶⁹ Hauptrezeptor für die Vermittlung

der Inhibition der Motilität unter physiologischen Bedingungen ist der CB₁-Rezeptor. Andererseits gibt es aktuell weniger Hinweise bezüglich den CB₂-vermittelten Einflüssen auf die Motilität unter normale Bedingungen. Unter pathologischen Zuständen konnte man eine Beteiligung beider Cannabinoidrezeptoren in der Modulation der Motilität beobachten. Es wurde z.B. gezeigt, dass eine induzierte Entzündung des Kolons von CB₁-Knockout Mäusen zu spontanen rhythmischen Aktionspotentialen in den glatten Muskelzellen führte, was aber in den Wildtyp-Mäusen nicht der Fall war. Es findet sich also auch eine CB₁-Komponente in der Regulation der Motilität unter pathologischen Zuständen.⁷⁰ Weitere Studien kamen auch zu ähnlichen Ergebnissen.⁷¹ CB₂ Rezeptoren werden im Darm hauptsächlich in Makrophagen und Plasmazellen der *Lamina propria* gefunden⁷², was die Überexpression dieser Rezeptoren bei entzündlichen Prozessen erklärt.³³ Außerdem wurde gezeigt, dass CB₂-Rezeptor Knockout Mäuse empfindlicher gegenüber einer 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure induzierten Entzündung waren.^{73, 74} Verschiedene Studien sprechen für das Vorhandensein von CB₁- und CB₂-vermittelten Effekten in der Hemmung der Motilität unter entzündlichen Zuständen (begleitet durch eine Abnahme des Schmerzempfindens, der intestinalen Flüssigkeitssekretion und des Entzündungsprozesses).^{75, 76}

In 2011 wurden die GPR55-Einflüsse auf die Motilität untersucht.⁷⁷ Erstens fand sich eine GPR55-Expression im Darm der Ratte die Ähnlich zur Expression in der Maus ist. Die Lokalisation des Rezeptors war auf die *Submucosa* und den *Plexus myentericus* beschränkt. Es fand sich weiterhin eine Überexpression von GPR55 unter entzündlichen Bedingungen, was Hinweise für eine mögliche Beteiligung dieses Rezeptors in der Regulation des Darms unter pathologischen Zuständen liefert. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass der GPR55-Agonist O-1602 inhibierende Einflüsse auf die evozierten Kontraktionen in Muskelstreifen vom Kolon und Ileum der Maus hatte, wobei die größten Effekte im Kolon zu sehen waren. Diese Effekte konnten durch den selektiven Antagonist Cannabidiol aufgehoben werden, aber nicht durch CB₁- und CB₂-Antagonisten. Weiterhin verlangsamte O-1602 u.a. die Transitzeit im Darm, was bei GPR55-KO-Mäusen nicht der Fall war.⁷⁸ GPR55 hat also nützliche Eigenschaften bezüglich der Therapie funktioneller aber auch entzündlicher GI-Störungen gezeigt. Attraktiv ist die Tatsache, dass die Aktivierung dieses Rezeptors, wie auch GPR119, keine CB₁-typischen zentralnervöse Nebenwirkungen aufweist.

6. Spezielle Diskussion

Das ECS war und ist Fokus vieler Studien um optimale therapeutische Möglichkeiten der Modulation dieses Komplexen Systems zu erreichen, sei es im GI-Trakt oder im ZNS. Das ECS verfügt über ein großes therapeutisches Potenzial, was aber durch die zentralnervösen Nebenwirkungen (Dysphorie, Unruhe, Panik, Benommenheit, Gedächtnisstörungen, Abnahme der psychomotorischen und kognitiven Fähigkeiten, etc.) limitiert wird. Deswegen wird ständig nach neuen Möglichkeiten der ECS-Modulation gesucht, die keine negativen Wirkungen im ZNS als Folge haben. Die Suche nach neuen Wegen beinhaltet auch die Erforschung der ECS-assoziierten Rezeptoren wie GPR119, die trotz mangelnder strukturellen Ähnlichkeit zu den klassischen Cannabinoidrezeptoren, ähnliche Liganden besitzen. Die Tatsache, dass dieser Rezeptor nicht im ZNS sondern im GI-Trakt exprimiert wird, macht ihn umso attraktiver. Zahlreiche Studien haben sich mit den positiven Eigenschaften dieses Rezeptors bezüglich der Glukosehomöostase, Gewichtskontrolle und Nahrungsaufnahme beschäftigt. Nichtsdestotrotz wissen wir bis heute sehr wenig über die Funktion dieses Rezeptors bei der Modulation der Motilität im GI-Trakt. Keine Studie hat sich bis heute mit dieser Fragenstellung beschäftigt.

Ziel dieser Studie war, neue Erkenntnisse über die mögliche Beteiligung vom GPR119-Rezeptor in der Modulation der GI-Motilität im Darm der Maus und des Menschen zu gewinnen.

Da der CB₁-Rezeptor eine große Rolle in der Modulation der Motilität spielt⁷⁹, wurde untersucht, ob GPR119 im Zusammenspiel mit CB₁ seine Wirkung entfaltet. Die Interaktion mit dem CB₂-Rezeptor war nicht Teil der Studie, weil bekannt ist, dass CB₂-Rezeptor hauptsächlich unter pathologischen Bedingungen seine Wirkung auf die Motilität entfaltet.^{80, 81} Um die Wirkungen von GPR119 zu testen, wurden verschiedene Organbad-Versuche durchgeführt; erst mit der Maus und dann mit Humangewebe. Bei der Maus wurde die Substanz im Dünndarm und im Kolon getestet. Weil es sehr schwer ist, Operations-Präparate aus dem Dünndarm des Menschen zu bekommen, wurde lediglich die Wirkung der Substanz im menschlichen Kolon getestet. Die gleichen Versuche wurden dann nach Gabe des CB₁-Rezeptor-Antagonisten SR 141716 wiederholt, um die mögliche Interaktion zwischen GPR119- und CB₁-Rezeptoren zu zeigen.

Letztlich wurde der Einfluss des selektiven Muskarinrezeptor-Agonisten Bethanechol auf die Wirkung der GPR119 Agonisten untersucht, um Hinweise für den möglichen

Wirkort dieser Substanzen zu erhalten (Neuronal oder muskulär. Es ist bekannt, dass Endocannabinoide ihre Wirkung auf neuronale Ebene entfalten, in dem sie auf die präsynaptische Cannabinoidrezeptoren binden).

6.1 WIRKUNG GPR119-AGONISTEN IM MAUSGEWEBE

Im Dünndarm der Maus zeigen sich signifikante Wirkungen der zwei GPR119-Agonisten auf die Motilität des Darms nur in sehr hohen Konzentrationen (10 -100 µM). Die Substanz mit der größten Potenz bezüglich der Inhibition der Kontraktilität ist der nicht-selektive GPR119 Agonist OEA, die bei einer Konzentration von 100 µM zu einer Abnahme der Kontraktionsamplitude um $71 \pm 4,6\%$ führt ($n>6$). Der selektive GPR119 Agonist AS1269574 erreicht in seiner höchsten Konzentration eine Inhibition von $22 \pm 3,5\%$ ($n>6$) (**Abb.5 und Abb.6**)

Es zeigt sich eine schwache Wirkung beider GPR119-Agonisten auf die Kontraktilität, wobei der selektive Agonist AS1269574 schwächer ist. Es ist bekannt, dass OEA die Magenentleerung und die Motilität im Darm hemmt.^{82, 83} Nicht bekannt ist die Wirkweise dieser Substanz und durch welche Rezeptoren diese Hemmung stattfindet. Eine Studie von 2009 zeigte, dass OEA unabhängig von dem CB1,CB2, PPAR α , TRPV1 oder GLP-1-Rezeptor seine Wirkung entfaltet.⁸⁴ Weil OEA auch ein GPR119-Agonist ist⁸⁵, wurde spekuliert, dass die hemmende Wirkung auf die Motilität durch diesen Rezeptor zustande kommt. Es fehlen aber Studien mit spezifischen GPR119-Antagonisten und GPR119-KO-Mäusen, mit denen diese Theorie bestätigt oder widergesprochen werden kann.

Im Dünndarm der Maus zeigt OEA eine größere Wirkung gegenüber AS1269574. Vermutlich entfaltet OEA diese hemmende Wirkung durch andere Rezeptoren und Signalwege, die bis heute noch unbekannt sind.

Im Kolon der Maus zeigt sich eine stärkere inhibitorische Wirkung beider GPR119-Agonisten(**Abb.9 und Abb.10**). Die Substanzen zeigen eine konzentrationsabhängige Inhibition der Kontraktilität schon bei niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zum Dünndarm. OEA verhält sich fast wie im Dünndarm, obwohl im Kolon schon bei 1 µM eine signifikante Inhibition beobachtet wird. Andererseits zeigt AS1269574 eine viel

größere inhibitorische Potenz im Kolon im Vergleich zum Dünndarm. Schon in einer Konzentration von 10 µM kommt es zu einer ausgeprägten Abnahme der Kontraktilität um $50,5 \pm 6\%$. Insgesamt zeigt sich also eine stärkere Beteiligung des GPR119-Rezeptors im Kolon der Maus.

6.2 GPR119/CB₁-REZEPTOR-INTERAKTION IM MAUSGEWEBE

Im Dünndarm der Maus zeigt sich für beide GPR119-Agonisten keinen signifikanten Einfluss des CB₁-Rezeptor-Antagonisten SR141716 auf die schwache hemmende Wirkung der zwei Substanzen (**Abb.7 und Abb. 8**). Es ist also eine CB₁-unabhängige Wirkung der GPR119-Agonisten in der Modulation der Kontraktilität im Dünndarm der Maus zu sehen.

Interessanterweise zeigt sich im Kolon der Maus eine starke CB₁-Rezeptor Mitbeteiligung in der hemmenden Wirkung der GPR119 Agonisten, insbesondere bei dem selektiven GPR119-Agonisten AS1269574. Die hemmende Wirkung von OEA wird durch SR141716 teilweise antagonisiert ($p<0,005$, $n=7$). (**Abb.11 und Abb.12**)

Es zeigt sich also eine partielle Mitbeteiligung der CB₁-Rezeptoren bei der OEA-vermittelte Hemmung der Kontraktilität im Kolon der Maus.

Bei dem selektiven GPR119-Agonisten AS1269574 zeigt sich im Kolon der Maus eine interessante Interaktion. Bis zu einer AS1269574-Konzentration von 10 µM wird eine komplette Antagonisierung beobachtet, mit einer fehlenden Hemmung der Kontraktilität, was eine CB₁-vermittelte Hemmung der Kontraktilität vermuten lässt. Bei 100 µM wird der Kontrollwert aber nicht erreicht, was eine partielle CB₁-Beteiligung in der GPR119-vermittelten Wirkung im Kolon zeigt. Es zeigt sich also eine CB₁-abhängigen und einen CB₁-unabhängigen Weg in der GPR119-vermittelten Hemmung der kontraktilen Aktivität im Kolon.

Zusammenfassend kann behauptet werden, dass der GPR119-Rezeptor eine untergeordnete Rolle in der Modulation der GI-Motilität im Dünndarm der Maus spielt und dass es keine relevante CB₁-Komponente in der GPR119-induzierten Hemmung der Kontraktilität gibt. OEA zeigt eine höhere Potenz im Dünndarm der Maus, was sich auf das Vorhandensein anderer GPR119-unabhängigen Wege erklären lässt. Im Kolon werden aber die Effekte von OEA komplett durch SR141716 antagonisiert,

was einen CB₁-abhängigen Weg in der Hemmung der Motilität vermuten lässt. Beide GPR119-Agonisten zeigen eine größere Wirkung im Kolon. Die inhibitorische Wirkung von AS1269574 im Kolon der Maus wird aber nur partiell von SR141716 blockiert, was einen GPR119-abhängigen Weg bei der Modulation der Motilität zu bedeuten hat.

6.3 GPR119 WIRKUNGEN IM HUMANGEWEBE

Interessanterweise zeigen beide GPR119 Agonisten eine stärkere Wirkung im menschlichen Kolon, mit einer signifikanten Hemmung der Kontraktilität schon ab einer Konzentration von 10 nM (**Abb.13 und Abb.14**). OEA erreicht nicht die ausgeprägte Hemmung der Kontraktilität, die im Kolon der Maus zu sehen war, wirkt aber schon bei niedrigeren Konzentrationen (10 nM), was durch die stärkere Wirkung zu erklären ist. Das gleiche gilt auch für AS1269574, obwohl hier eine stärkere Hemmung der Kontraktilität auch in der höchsten Konzentration von 100 µM beobachtet wird. Die Tatsache, dass der nicht-selektive GPR119-Agonist eine schwächere hemmende Potenz im Vergleich zum selektiven Agonisten besitzt kann sich dadurch erklären, dass unbekannte GPR119-unabhängigen Mechanismen involviert sind. Das Zusammenspiel dieser Mechanismen führt möglicherweise zu dieser etwas schwächeren Wirkung von OEA. Es wurde erstmalig gezeigt, dass GPR119-Rezeptor-Agonisten zu einer ausgeprägter Hemmung der Kontraktilität im menschlichen Kolon führen.

6.4 GPR119/CB₁-INTERAKTION IM HUMANGEWEBE

Im Vergleich zum Mausgewebe führt die Antagonisierung mit SR141716 zu einer vollständigen Aufhebung der OEA-vermittelten Inhibition der Kontraktilität im menschlichen Kolon (**Abb.15**). Der Kontrollwert wird wieder erreicht und OEA entfaltet keine Wirkung mehr. Es zeigt sich also eine CB₁-abhängige Hemmung der kontraktilen Aktivität durch OEA im menschlichen Kolon. In der OEA-vermittelten Wirkung sind wahrscheinlich auch andere Rezeptoren wie möglicherweise auch GPR119 involviert. In diesen Versuchen ist aber deutlich geworden, dass der CB₁-Rezeptor der Hauptspieler in der OEA-vermittelten Modulation der Motilität ist.

Trotz niedriger bis fehlender Affinität zu den Cannabinoidrezeptoren zeigt OEA eine signifikante Interaktion mit dem CB₁-Rezeptor im Humangewebe.^{43, 86} Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kam auch eine andere Arbeit, die eine inkomplette Antagonisierung der OEA-induzierten Inhibition des oberen-GI Transit durch CB₁-Blockade gezeigt hat.⁸⁷ Nichtdestotrotz kann man eine GPR119-Komponente in der OEA-vermittelten Wirkung nicht ausschließen.

Interessanterweise führt die Antagonisierung von AS1269574 zu einer partiellen Aufhebung der hemmenden Wirkung, was einen CB₁-unabhängigen Weg in der GPR119-vermittelten Modulation der Motilität vermuten lässt (**Abb. 16**). Es wird also zum ersten Mal gezeigt, dass der GPR119 Rezeptor erstens zu einer Hemmung der Kontraktilität im menschlichen Kolon führt, und zweitens, dass diese Effekte nur partiell durch CB₁-Aktivierung bedingt sind. Ob diese Effekte durch GPR119-induzierte GLP-1 Freisetzung bedingt sind, was auch zu einer Hemmung der Motilität führen kann, ist sehr unwahrscheinlich, da die Kolonsegmente, die für die Versuche präpariert und benutzt worden sind, ausschließlich aus der Muskelschicht zusammengesetzt waren (d.h. ohne *Mucosa* und ohne *Submucosa*). Eine CB₂-Mitbeteiligung unter physiologischen Bedingungen ist laut Literatur extrem unwahrscheinlich³³, deswegen wurde bei dieser Studie verzichtet, diesen Rezeptor zu Antagonisieren.

Es ist auch wahrscheinlich, dass die CB₁-vermittelte Hemmung im Gewebe von gesunden Probanden viel ausgeprägter im Vergleich zu Kolon-Karzinom Patienten ist, da die CB₁-Expression in diesen Geweben viel niedriger ist⁸⁸. Es scheint deshalb sehr plausibel zu sein, dass GPR119 direkte Effekte auf die Kontraktilität besitzt, die nur zum Teil durch CB₁-Rezeptoren bedingt ist.

6.5 KLINISCHE BEDEUTUNG UND THERAPEUTISCHE ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN

Die GPR119-Forschung hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Im Fokus standen dabei vor allem die Therapiemöglichkeiten bei Diabetes mellitus. Doch die Wirkungen vom GPR119-Rezeptor auf die Motilität waren bis heute noch unbekannt. Mit dieser Studie zeigt dieser Rezeptor ein neues therapeutisches Potenzial was die Modulation der GI-Motilität angeht. Die Forschung dieses neuen Rezeptors wird auch von Nutzen in der Entwicklung neuer Antidiabetika sein, denn nur so wird man in der Lage sein, die bestmöglichen Pharmaka zu entwickeln. Die Tatsache, dass es eine neue Möglichkeit gibt, das ECS ohne zentralnervöse Nebenwirkungen zu modulieren, macht diese Entdeckung interessant. Obwohl GPR119 nicht zu den klassischen Cannabinoidrezeptoren gehört, wurde eine Interaktion zwischen diesen Rezeptoren beobachtet. Dass die Effekte im menschlichen Kolon ausgeprägter im Vergleich zum Tiermodell sind, macht dieser Rezeptor umso attraktiver. Weitere Studien sollen die Rolle dieses Rezeptors bei der Modulation der Motilität in anderen GI-Regionen des Menschen erforschen, um die vollständige Wirkung von GPR119 besser zu verstehen.

Das meistbenutzte Arzneimittel gegen Durchfall ist der Opioid-Rezeptor-Agonist Loperamid, dass bei kleinen Kindern zu erheblichen Nebenwirkungen wie Lethargie, Atemdepression und Koma führen kann, weil die Blut-Hirn-Schranke noch nicht völlig entwickelt ist.^{89, 90} Loperamid wird im ZNS über Effluxpumpen vom Para-Glykoprotein (p-GP)-Typ aus dem Gehirn transportiert, was zur überwiegend peripheren Wirkung führt. Dieser Mechanismus erklärt auch warum es zum Abusus oder zu Nebenwirkungen kommen kann, wenn die Einnahme von Loperamid mit P-Glykoprotein Inhibitoren kombiniert wird.⁹¹ In der normalen Dosierung ist die Einnahme von Loperamid beim Erwachsenen aber unbedenklich.⁹² Viele sind die möglichen Einsatzgebiete einer motilitätshemmenden Substanz ohne ZNS-Wirkung; u.a. Reisediarröh, funktionelle Störungen wie Reizdarmsyndrom vom Diarröh-Typ, Chemotherapie-induzierte Diarröh und Kurzdarmsyndrom. Die Applikation eines GPR119-Agonisten kann eine potentielle Alternative zu Loperamid darstellen, vor allem bei kindlichen Patienten, da die Substanz keine zentralnervösen Nebenwirkungen zeigt.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Das ECS war in den letzten Jahren Fokus zahlreicher Studien. Die vielfältigen therapeutischen Möglichkeiten der Beeinflussung des ECS sind aber durch die zentralen Nebenwirkungen der endogenen und exogenen Cannabinoiden begrenzt. Um die modulierende Wirkung der Cannabinoiden auf die Darmmotilität pharmakologisch zu nutzen sind aber andere Wege, die auf die Peripherie beschränkt sind, zu finden. Die Suche nach neuen Angriffspunkten des ECS ohne diese Nebenwirkungen hat sich auch mit anderen ECS-assoziierten Rezeptoren beschäftigt. Unter diesen Rezeptoren finden wir auch den GPR119-Rezeptor, der hauptsächlich im Pankreas und GI-Trakt exprimiert wird, nicht aber im ZNS. Während zahlreiche Studien die Rolle dieses Rezeptors in der Regulation der Glukosehomöostase, des Sättigungsgefühls und des Körpergewichts untersucht haben, sind die Wirkungen von GPR119 auf die Modulation der Motilität im GI-Trakt noch unbekannt.

In den durchgeföhrten Versuchen mit Maus- und Humangewebe konnte gezeigt werden, dass der GPR119-Rezeptor eine Rolle bei der Modulation der Motilität im GI-Trakt spielt. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die Wirkung von GPR119-Agonisten auf Darmgeweben Mukosa- und Submukosa-unabhängig geschehen kann.

Beide GPR119-Agonisten zeigten eine schwache hemmende Wirkung im Dünndarm der Maus. Diese Wirkung konnte durch die CB₁-Blockade nicht aufgehoben werden. Vermutlich spielt der GPR119-Rezeptor eine untergeordnete Rolle bei der Modulation der Motilität im Dünndarm der Maus und wahrscheinlich auch beim Menschen.

Im Kolon der Maus und des Menschen zeigten beide Agonisten eine viel höhere Potenz im Vergleich zum Dünndarm, was wahrscheinlich auf die verstärkte Expression dieses Rezeptors in dieser Region des GI-Trakt zurückzuführen ist. Wir können also spekulieren, dass der Hauptwirkort vom GPR119-Rezeptor für die Modulation der Motilität das Kolon ist.

Weil der CB₁-Rezeptor der Hauptrezeptor des ECS ist, der die Motilität unter physiologischen Bedingungen beeinflusst, wurde die Interaktion zwischen GPR119-Rezeptor und CB₁-Rezeptor untersucht. Während im Dünndarm der Maus keine

signifikante Interaktion zwischen den zwei Rezeptoren festzustellen war, zeigte sich im Kolon der Maus und des Menschen eine signifikante partielle CB₁-Komponente in der GPR119-vermittelten Hemmung der Kontraktilität. Bei dem nicht-selektiven Agonisten OEA wurden die Effekte auf die Kontraktilität durch CB₁-Antagonismus komplett aufgehoben, was vermuten lässt, dass OEA u. a. durch den CB₁-Rezeptor seine hemmende Wirkung auf die Motilität entfaltet. Möglicherweise spielt auch der GPR119-Rezeptor eine Rolle bei der OEA-vermittelten Inhibition der Motilität, zur Zeit fehlen aber die pharmakologischen Möglichkeiten um diese Hypothese zu bestätigen oder zu widerlegen.

Diese Erkenntnisse sollen ein besseres Verständnis über die Funktion des GPR119-Rezeptors als neue pharmakologische Zielstruktur zur Modulation der GI-Motilität liefern.

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Tabelle.1 | 7 |
| Darstellung des Patientenkollektivs der Humangewebeversuche. | |
| Abb.2 | 7 |
| Schematische Darstellung der Positionierung der Gewebe zwischen den Elektroden. | |
| Abb. 3 | 8 |
| Versuchsaufbau. | |
| Abb.4 | 11 |
| Schematische Darstellung eines Beispielversuches mit Amplitudenmessung einer EFS-ausgelösten Kontraktion. | |
| Abb.5 | 12 |
| Einfluss von OEA auf die Kontraktilität im Dünndarm der Maus. | |
| Abb.6 | 13 |
| Einfluss des selektiven GPR119 Agonisten AS1269574 auf die Kontraktilität im Dünndarm der Maus. | |
| Abb.7 | 14 |
| Interaktion zwischen OEA und SR141716 im Dünndarm der Maus. | |
| Abb.8 | 15 |
| Interaktion zwischen AS1269754 mit SR141716 im Dünndarm der Maus. | |
| Abb.9 | 16 |
| Wirkung von OEA im Kolon der Maus. | |
| Abb.10 | 17 |
| Konzentrationsabhängige Hemmung der Kontraktilität von AS1269574 im Dickdarm der Maus. | |
| Abb.11 | 18 |
| Einfluss vom CB ₁ -Rezeptor Antagonist SR141716 (100 nM) auf die OEA-vermittelte Hemmung der kontraktilen Aktivität im Dickdarm der Maus. | |
| Abb.12 | 19 |
| Die Abbildung zeigt den Einfluss von AS1269574 vor und nach CB ₁ -Blockade durch SR141716. | |
| Abb.13 | 20 |
| Darstellung des Einflusses von OEA in kumulativ steigenden Konzentrationen (10 nM – 100 µM) auf die glattmuskuläre Kontraktilität im menschlichen Kolon (n>6). | |

| | | |
|--|-------|----|
| Abb.14 | | 21 |
| Einfluss von AS1269574 in kumulativ steigender Konzentration (10 nM-100 µM) auf die Kontraktilität im menschlichen Kolon. | | |
| Abb. 15 | | 22 |
| Einfluss des nicht-selektiven GPR119 Agonisten OEA alleine und nach Zugabe des CB ₁ -Antagonisten SR141716A (100 nM) im menschlichen Kolon. | | |
| Abb.16 | | 23 |
| Einfluss des selektiven GPR119 Agonisten AS1269574 alleine und nach Zugabe von SR141716 (100 nM) auf die Kontraktilität im menschlichen Kolon. | | |
| Abb.17 | | 29 |
| Struktur des selektiven GPR119-Agonisten AS1269574 (© Copyright 2015 Tocris Bioscience. All Rights Reserved). 2-[[2-(4-Bromophenyl)-6-methyl-4-pyrimidinyl]amino]ethanol | | |

9. REFERENZEN

1. Coutts AA, Izzo AA. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:572-579.
2. Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2007;152:567-575.
3. Costa M, Brookes SJ, Hennig GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 2000;47 Suppl 4:iv15-iv19.
4. Grundy D, Schemann M. Enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:121-126.
5. Benarroch EE. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* 2007;69:1953-1957.
6. Grundy D, Schemann M. Enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:176-182.
7. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000;81:87-96.
8. Benarroch EE. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* 2007;69:1953-1957.
9. Mayer EA, Naliboff BD, Craig AD. Neuroimaging of the brain-gut axis: from basic understanding to treatment of functional GI disorders. *Gastroenterology* 2006;131:1925-1942.
10. Langmead L, Rampton DS. Review article: herbal treatment in gastrointestinal and liver disease--benefits and dangers. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1239-1252.
11. Felder CC, Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:179-200.
12. Coutts AA, Izzo AA. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:572-579.
13. Gaoni Y, Mechoulam R. The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc* 1971;93:217-224.
14. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;346:561-564.
15. Munro S, Thomas KL, bu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;365:61-65.
16. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;258:1946-1949.
17. Hanus L, bu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3662-3665.

18. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:873-884.
19. Di M, V. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol Res* 2009;60:77-84.
20. Glaser ST, Kaczocha M, Deutsch DG. Anandamide transport: a critical review. *Life Sci* 2005;77:1584-1604.
21. Bellocchio L, Cervino C, Pasquali R, Pagotto U. The endocannabinoid system and energy metabolism. *J Neuroendocrinol* 2008;20:850-857.
22. Haney M, Gunderson EW, Rabkin J, Hart CL, Vosburg SK, Comer SD, Foltin RW. Dronabinol and marijuana in HIV-positive marijuana smokers. Caloric intake, mood, and sleep. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45:545-554.
23. Strasser F, Luftner D, Possinger K, Ernst G, Ruhstaller T, Meissner W, Ko YD, Schnelle M, Reif M, Cerny T. Comparison of orally administered cannabis extract and delta-9-tetrahydrocannabinol in treating patients with cancer-related anorexia-cachexia syndrome: a multicenter, phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial from the Cannabis-In-Cachexia-Study-Group. *J Clin Oncol* 2006;24:3394-3400.
24. Tramer MR, Carroll D, Campbell FA, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review. *BMJ* 2001;323:16-21.
25. Kris MG, Hesketh PJ, Somerfield MR, Feyer P, Clark-Snow R, Koeller JM, Morrow GR, Chinnery LW, Chesney MJ, Gralla RJ, Grunberg SM. American Society of Clinical Oncology guideline for antiemetics in oncology: update 2006. *J Clin Oncol* 2006;24:2932-2947.
26. Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di NM, Duffy S, Hernandez AV, Keurentjes JC, Lang S, Misso K, Ryder S, Schmidtkofer S, Westwood M, Kleijnen J. Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 2015;313:2456-2473.
27. Novotna A, Mares J, Ratcliffe S, Novakova I, Vachova M, Zapletalova O, Gasperini C, Pozzilli C, Cefaro L, Comi G, Rossi P, Ambler Z, Stelmasiak Z, Erdmann A, Montalban X, Klimek A, Davies P. A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, enriched-design study of nabiximols* (Sativex((R))), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused by multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2011;18:1122-1131.
28. Bedse G, Romano A, Lavecchia AM, Cassano T, Gaetani S. The role of endocannabinoid signaling in the molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2015;43:1115-1136.
29. Bifulco M, Laizza C, Pisanti S, Gazzero P. Cannabinoids and cancer: pros and cons of an antitumour strategy. *Br J Pharmacol* 2006;148:123-135.
30. Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 1997;74:129-180.
31. Munro S, Thomas KL, bu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;365:61-65.

32. Duncan M, Davison JS, Sharkey KA. Review article: endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:667-683.
33. Wright KL, Duncan M, Sharkey KA. Cannabinoid CB₂ receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. *Br J Pharmacol* 2008;153:263-270.
34. Coutts AA, Irving AJ, Mackie K, Pertwee RG, navi-Goffer S. Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *J Comp Neurol* 2002;448:410-422.
35. Storr M, Sibaev A, Marsicano G, Lutz B, Schusdziarra V, Timmermans JP, Allescher HD. Cannabinoid receptor type 1 modulates excitatory and inhibitory neurotransmission in mouse colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G110-G117.
36. Starowicz K, Nigam S, Di M, V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* 2007;114:13-33.
37. Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 2003;140:790-801.
38. Hong S, Fan J, Kemmerer ES, Evans S, Li Y, Wiley JW. Reciprocal changes in vanilloid (TRPV1) and endocannabinoid (CB1) receptors contribute to visceral hyperalgesia in the water avoidance stressed rat. *Gut* 2009;58:202-210.
39. Capasso R, Orlando P, Pagano E, Aveta T, Buono L, Borrelli F, Di M, V, Izzo AA. Palmitoylethanolamide normalizes intestinal motility in a model of post-inflammatory accelerated transit: involvement of CB(1) receptors and TRPV1 channels. *Br J Pharmacol* 2014;171:4026-4037.
40. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 1996;137:354-366.
41. O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* 2007;152:576-582.
42. Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'dowd BF. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;64:193-198.
43. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 2007;152:1092-1101.
44. Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:928-934.
45. Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2699-2704.
46. Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* 2002;520:97-101.

47. Davey J. G-protein-coupled receptors: new approaches to maximise the impact of GPCRs in drug discovery. *Expert Opin Ther Targets* 2004;8:165-170.
48. Fredriksson R, Hoglund PJ, Gloriam DE, Lagerstrom MC, Schioth HB. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett* 2003;554:381-388.
49. Griffin G. Methods for identification of modulators of OSGPR116 activity US Patent 7,083,933-B1. US: 2006.
50. Bonini JA, Borowsky BE, Adham N, Boyle N, Thompson TO. DNA encoding SNORF25 receptorUS patent 6,221,660-B1. 2001.
51. Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab* 2006;3:167-175.
52. Soga T, Ohishi T, Matsui T, Saito T, Matsumoto M, Takasaki J, Matsumoto S, Kamohara M, Hiyama H, Yoshida S, Momose K, Ueda Y, Matsushima H, Kobori M, Furuichi K. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326:744-751.
53. Chu ZL, Jones RM, He H, Carroll C, Gutierrez V, Lucman A, Moloney M, Gao H, Mondala H, Bagnol D, Unnett D, Liang Y, Demarest K, Semple G, Behan DP, Leonard J. A role for beta-cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucose-dependent insulin release. *Endocrinology* 2007;148:2601-2609.
54. Ning Y, O'Neill K, Lan H, Pang L, Shan LX, Hawes BE, Hedrick JA. Endogenous and synthetic agonists of GPR119 differ in signalling pathways and their effects on insulin secretion in MIN6c4 insulinoma cells. *Br J Pharmacol* 2008;155:1056-1065.
55. Chu ZL, Carroll C, Alfonso J, Gutierrez V, He H, Lucman A, Pedraza M, Mondala H, Gao H, Bagnol D, Chen R, Jones RM, Behan DP, Leonard J. A role for intestinal endocrine cell-expressed g protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like Peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic Peptide release. *Endocrinology* 2008;149:2038-2047.
56. Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes* 2009;58:1058-1066.
57. Lan H, Lin HV, Wang CF, Wright MJ, Xu S, Kang L, Juhl K, Hedrick JA, Kowalski TJ. Agonists at GPR119 mediate secretion of GLP-1 from mouse enteroendocrine cells through glucose-independent pathways. *Br J Pharmacol* 2012;165:2799-2807.
58. Patel S, Mace OJ, Tough IR, White J, Cock TA, Warpman BU, Schindler M, Cox HM. Gastrointestinal hormonal responses on GPR119 activation in lean and diseased rodent models of type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)* 2014;38:1365-1373.
59. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* 2002;359:824-830.

60. Meier JJ, Gallwitz B, Schmidt WE, Nauck MA. Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol* 2002;440:269-279.
61. Yoshida S, Ohishi T, Matsui T, Shibasaki M. Identification of a novel GPR119 agonist, AS1269574, with in vitro and in vivo glucose-stimulated insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;400:437-441.
62. Yoshida S, Ohishi T, Matsui T, Tanaka H, Oshima H, Yonetoku Y, Shibasaki M. Novel GPR119 agonist AS1535907 contributes to first-phase insulin secretion in rat perfused pancreas and diabetic db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402:280-285.
63. Yoshida S, Tanaka H, Oshima H, Yamazaki T, Yonetoku Y, Ohishi T, Matsui T, Shibasaki M. AS1907417, a novel GPR119 agonist, as an insulinotropic and beta-cell preservative agent for the treatment of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;400:745-751.
64. Moran BM, bdel-Wahab YH, Flatt PR, McKillop AM. Activation of GPR119 by fatty acid agonists augments insulin release from clonal beta-cells and isolated pancreatic islets and improves glucose tolerance in mice. *Biol Chem* 2014;395:453-464.
65. Chepurny OG, Bertinetti D, Diskar M, Leech CA, Afshari P, Tsalkova T, Cheng X, Schwede F, Genieser HG, Herberg FW, Holz GG. Stimulation of proglucagon gene expression by human GPR119 in enteroendocrine L-cell line GLUTag. *Mol Endocrinol* 2013;27:1267-1282.
66. Izzo AA, Camilleri M. Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. *Gut* 2008;57:1140-1155.
67. Izzo AA, Mascolo N, Borrelli F, Capasso F. Excitatory transmission to the circular muscle of the guinea-pig ileum: evidence for the involvement of cannabinoid CB1 receptors. *Br J Pharmacol* 1998;124:1363-1368.
68. Storr M, Sibaev A, Marsicano G, Lutz B, Schusdziarra V, Timmermans JP, Allescher HD. Cannabinoid receptor type 1 modulates excitatory and inhibitory neurotransmission in mouse colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G110-G117.
69. Galligan JJ. Cannabinoid signalling in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:899-902.
70. Sibaev A, Massa F, Yuce B, Marsicano G, Lehr HA, Lutz B, Goke B, Allescher HD, Storr M. CB1 and TRPV1 receptors mediate protective effects on colonic electrophysiological properties in mice. *J Mol Med (Berl)* 2006;84:513-520.
71. Di CG, Izzo AA. Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12:39-49.
72. Wright K, Rooney N, Feeney M, Tate J, Robertson D, Welham M, Ward S. Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* 2005;129:437-453.
73. Storr MA, Keenan CM, Emmerdinger D, Zhang H, Yuce B, Sibaev A, Massa F, Buckley NE, Lutz B, Goke B, Brand S, Patel KD, Sharkey KA. Targeting endocannabinoid degradation protects against experimental colitis in mice: involvement of CB1 and CB2 receptors. *J Mol Med (Berl)* 2008;86:925-936.

74. Storr MA, Keenan CM, Zhang H, Patel KD, Makriyannis A, Sharkey KA. Activation of the cannabinoid 2 receptor (CB2) protects against experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1678-1685.
75. Izzo AA, Sharkey KA. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacol Ther* 2010;126:21-38.
76. Izzo AA, Camilleri M. Cannabinoids in intestinal inflammation and cancer. *Pharmacol Res* 2009;60:117-125.
77. Lin XH, Yuece B, Li YY, Feng YJ, Feng JY, Yu LY, Li K, Li YN, Storr M. A novel CB receptor GPR55 and its ligands are involved in regulation of gut movement in rodents. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:862-e342.
78. Li K, Fichna J, Schicho R, Saur D, Bashashati M, Mackie K, Li Y, Zimmer A, Goke B, Sharkey KA, Storr M. A role for O-1602 and G protein-coupled receptor GPR55 in the control of colonic motility in mice. *Neuropharmacology* 2013;71:255-263.
79. Abalo R, Vera G, Lopez-Perez AE, Martinez-Villaluenga M, Martin-Fontelles MI. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: focus on motility. *Pharmacology* 2012;90:1-10.
80. Wright KL, Duncan M, Sharkey KA. Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. *Br J Pharmacol* 2008;153:263-270.
81. Aviello G, Romano B, Izzo AA. Cannabinoids and gastrointestinal motility: animal and human studies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2008;12 Suppl 1:81-93.
82. Aviello G, Matias I, Capasso R, Petrosino S, Borrelli F, Orlando P, Romano B, Capasso F, Di M, V, Izzo AA. Inhibitory effect of the anorexic compound oleoylethanolamide on gastric emptying in control and overweight mice. *J Mol Med (Berl)* 2008;86:413-422.
83. Capasso R, Matias I, Lutz B, Borrelli F, Capasso F, Marsicano G, Mascolo N, Petrosino S, Monory K, Valenti M, Di M, V, Izzo AA. Fatty acid amide hydrolase controls mouse intestinal motility in vivo. *Gastroenterology* 2005;129:941-951.
84. Cluny NL, Keenan CM, Lutz B, Piomelli D, Sharkey KA. The identification of peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent effects of oleoylethanolamide on intestinal transit in mice. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:420-429.
85. Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab* 2006;3:167-175.
86. Lambert DM, DiPaolo FG, Sonveaux P, Kanyonyo M, Govaerts SJ, Hermans E, Bueb J, Delzenne NM, Tschart EJ. Analogues and homologues of N-palmitoylethanolamide, a putative endogenous CB(2) cannabinoid, as potential ligands for the cannabinoid receptors. *Biochim Biophys Acta* 1999;1440:266-274.
87. Capasso R, Matias I, Lutz B, Borrelli F, Capasso F, Marsicano G, Mascolo N, Petrosino S, Monory K, Valenti M, Di M, V, Izzo AA. Fatty acid amide hydrolase controls mouse intestinal motility in vivo. *Gastroenterology* 2005;129:941-951.

88. Wang D, Wang H, Ning W, Backlund MG, Dey SK, DuBois RN. Loss of cannabinoid receptor 1 accelerates intestinal tumor growth. *Cancer Res* 2008;68:6468-6476.
89. Bhutta TI, Tahir KI. Loperamide poisoning in children. *Lancet* 1990;335:363.
90. Schwartz RH, Rodriguez WJ. Toxic delirium possibly caused by loperamide. *J Pediatr* 1991;118:656-657.
91. Sadeque AJ, Wandel C, He H, Shah S, Wood AJ. Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68:231-237.
92. Vandenbossche J, Huisman M, Xu Y, Sanderson-Bongiovanni D, Soons P. Loperamide and P-glycoprotein inhibition: assessment of the clinical relevance. *J Pharm Pharmacol* 2010;62:401-412.

10. DANKSAGUNG

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Martin Storr, Leiter der Arbeitsgruppe Neurogastroenterologie, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Ich danke ihm herzlich für das Vertrauen und die optimale Betreuung während der gesamten Arbeit und für die Möglichkeit der Präsentation dieser Ergebnisse bei der DGNM-Jahrestagung in Freising und beim DDW in Chicago.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Andrei Sibaev, der mich in die Experimentelle Forschung eingearbeitet hat und mich jederzeit unterstützt hat. Seine kreative Ideen und Seine besondere Art Probleme zu lösen habe ich sehr geschätzt und sie werden mich für den Rest meines Lebens begleiten.

Weiterhin möchte ich mich bei den Kooperationspartner der Human Tissue and Cell Research-Stiftung und der Chirurgischen Klinik Großhadern bedanken, die die Versuche auf Humangewebe möglich gemacht haben.

Eidesstattliche Versicherung

Botteselle, Lorenzo

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Interaktion zwischen GPR119 und CB1-Rezeptoren bei der Modulation der
gastrointestinalen Motilität im Maus- und Humangewebe

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzelnen nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

München, 28.2.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand