

Az endokannabinoid rendszer genetikai asszociációs vizsgálatai szorongással összefüggésben

LAZÁRY JUDIT^{1,2}, ESZLÁRI NÓRA^{2,3}, JUHÁSZ GABRIELLA^{2,3} ÉS BAGDY GYÖRGY^{2,3}

¹ Klinikai és Kutatási Mentálhigiénés Osztály, Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest

² SE-MTA Neuropszichofarmakológiai és Neurokémiai Kutatócsoport, Budapest

³ Gyógyszerhatástani Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

Bevezetés: A stresszválasz és az érzelmi élet szabályozásában betöltött szerepéről egyre több adat gyűlt össze az endokannabinoid rendszerrel (ECS) kapcsolatban és komoly farmakológiai targetté vált elsősorban a szorongásoldás területén. Amellett, hogy az állatkísérletes vizsgálatok meggyőző, az anxiolitikus hatást megalapozó eredményekkel szolgálnak, a vonatkozó humán genetikai adatok meglepően hiányosak az irodalomban. Saját vizsgálatunkban az ECS-hez tartozó cannabinoid receptor 1 (CB1R) és a zsírsavamid hidroláz (fatty acid amide hydrolase, FAAH) gén polimorfizmusokat vizsgálatuk különböző interakciós modellekben a szorongással összefüggésben. **Módszerek:** Vizsgálatsorozatunkba kb. 900 önkéntes, átlagpopulációt reprezentáló résztvevőt vontunk be. A fenotípus méréséhez a Rövid Tünet Skála Szorongás alszámláját, valamint a STAI kérdőívet használtuk. A gyermekkori trauma előfordulását a Gyermekkori Adverzitás Kérdőív segítségével tártuk fel. A genetikai vizsgálatok elvégzéséhez szájnyalkahártya mintából izoláltunk DNS-t, majd MassArray Sequenom technikával történt a genotipizálás. A statisztikai elemzéshez generalizált lineáris regressziót, illetve post hoc tesztekét végeztünk. **Eredmények:** Az egyes SNP-k önálló hatása nem bizonyult szignifikánsnak a fenotípusvarianciák tekintetében. Ezzel szemben az interakciós elemzések markáns összefüggéseket tárt fel. A CB1R gén promoterében elhelyezkedő rs2180619 polimorfizmus GG genotípus az 5-HTTLPR SS genotípussal együtt szignifikánsan magasabb STAI-T pontszámmal járt együtt ($p=0.0006$) összehasonlítva az ellenpárokkal. A GG és SS genotípus egyidejű hordozása majdnem 5-szörös rizikót jelentett a magas szorongáspontszámmal járó fenotípusra, mint az A és L allél hordozás (OR=4.64, 95% CI: 1.7-12.71). A FAAH gén C385A polimorfizmusát tekintve az A allél járt együtt magasabb BSI-ANX és a STAI-T pontszámmal abban az esetben, ha többszörös gyermekkori trauma szerepelt az anamnézisben, szemben a C allél hordozókkal ($p_{interact}=0.00002$; $p_{interact}=0.0023$). **Konklúzió:** Vizsgálatunkban újabb megerősítést nyertek az ECS patogenikus szerepét igazoló korábbi adatok a szorongásra vonatkozóan. Eredményeink szerint a CB1R és a FAAH gén komplex módon, a szerotonintranszporter-génnel és a gyermekkori traumákkal interakcióban vesz részt a felnőttkori, humán szorongásos fenotípus kialakulásában.

(*Neuropsychopharmacol Hung 2017; 19(4): 177–182*)

Kulcsszavak: szorongás, FAAH, korai trauma, gén-környezet interakció, endokannabinoid rendszer

BEVEZETÉS

A szorongásra való hajlam örökölhetősége régóta ismert jelenség, a pontos genetikai háttere azonban mindmáig nem ismert. A kannabiszszármazékok közül ismert anxiolitikus hatásával kapcsolatban számos

tanulmány született (Haller et al., 2002; Navarro et al., 1997; Rodgers et al., 2003), és az endokannabinoid rendszer (ECS) a szorongás patomechanizmusának feltárását célzó kutatások fókuszába került. Az ECS-hez tartoznak a lipidtranszmitterek (anandamid, AEA; 2-arachidonoil-glicerol, 2-AG), a receptorok (kan-

nabinoid-1 receptor, CB1R és kannabinoid-2 receptor; CB2R) valamint enzimek (zsírsavamid-hidroláz, FAAH; monoglicero-lipáz; MGLP).

Az agyi morfológiai vizsgálatok arra utalnak, hogy a CB1R azokban az agyi régiókban expresszálódik, amelyek a szorongás szabályozásáért felelősek, úgymint a mediális prefrontális cortex, hippocampus és a bazolaterális amygdala (Freund et al., 2003; Pertwee, 2005; Turu et al., 2007).

A CB1R-t kódoló, 4 exont tartalmazó gén (CNR1) a 6. kromoszómán található és a konvencionális promoter régió mellett leírtak egy alternatív promoter régiót a 2. intronban (Zhang et al., 2004), azonban a szorongás patomechanizmusában betöltött szerepét eddig kevéssé vizsgálták. Az endokannabinoidok retrográd módon gátolják a preszinaptikus neuronokban termelődő neurotranszmitterek felszabadulását számos agyi területen beleértve a kogníció, a memória és a hangulati élet szabályozásáért felelős régiókat (pl.: hippocampus és prefrontális cortex). Annak ellenére, hogy a legtöbb adat a glutamaterg és a GABAerg neuronokban expresszálódó CB1R-ről jelent meg, egyéb, a szorongással jelentős kapcsolatot mutató neurotranszmitter rendszerekkel, mint például az 5-HT-val kapcsolatban is végeztek vizsgálatokat. A CB1R aktiválása blokkolja a 5-HT felszabadulást kísérletes körülmények között, illetve a CB1R antagonisták alkalmazása növeli a szinaptikus 5-HT koncentrációt a prefrontális cortexben (Nakazi et al., 2000; Tzavara et al., 2003). További adatok igazolták az ECS és az 5-HT rendszer kapcsolatát (Darmani et al., 2003; Gobbi et al., 2005; Haring et al., 2007; Hermann et al., 2002; Mato et al., 2007), azonban humán vizsgálatok ezzel kapcsolatban nem állnak rendelkezésre.

A FAAH jelentőségét a szorongás kialakulásában komoly irodalmi anyag támasztja alá. A FAAH az egyik fő lipidtranszmitter, az anandamid (AEA) lebontásáért felelős enzim és aktivitása jelentős szerepet játszik a CB1R jelátvitel intenzitás szabályozásában az AEA koncentráció alakításán keresztül. A szorongás kialakulásában a FAAH a stresszreakcióban betöltött funkciója révén is részt vesz, mivel az irodalmi adatok arra utalnak, hogy állatkísérletben a stressz (emelkedett glükokortikoid) által aktiválódott HPA tengely ismételt deaktiválódását egészséges viszonyok között a FAAH aktivitásának csökkenése teszi lehetővé, a következményesen megemelkedett AEA koncentráció segítségével, ami a glutamát felszabadulást gátlásán keresztül inaktíválja a rendszert. Az ECS stresszreakciót pufferező hatásának is nevezik ezt a funkcióját (Hill et al., 2009). Krónikus stressz hatására a FAAH elhúzódó aktivitása tartósan csökkent AEA

szinthez vezet, ami miatt a HPA-tengely deaktiválása nem történik meg, ellenkezőleg, túlaktiválódáshoz vezet, ami a szorongás kialakulásának kedvező körülmény (Hill et al., 2005).

Annak ellenére, hogy a FAAH szerepét a szorongásban számos állatkísérletes kutatásban vizsgálták, a humán genetikai vonatkozásai kevéssé ismertek.

Saját vizsgálatunkban a CNR1 és az 5-HT receptor gén, valamint a FAAH gén szerepét vizsgáltuk a szorongással való hajlammal összefüggésben.

MÓDSZEREK

Vizsgálati alanyok

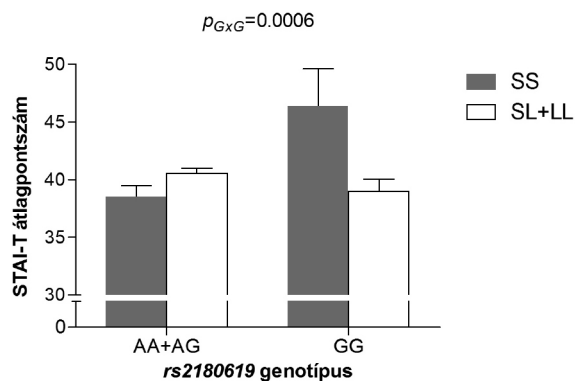
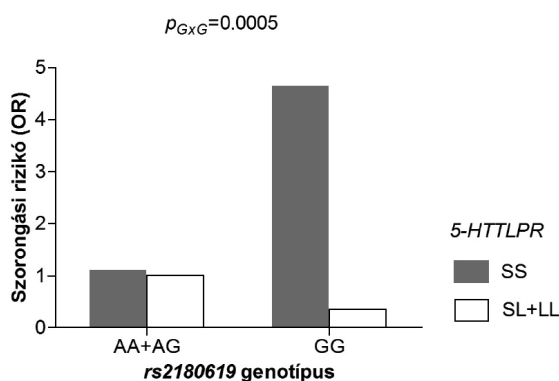
A vizsgálatokba 927 önkéntes, átlagpopulációt reprezentáló alanyt vontunk be (30.2% nő, 69.8% férfi, átlag életkor: 31.2 ± 10.5 év). A beválasztás független volt a pszichiátriai anamnézistól. A genetikai és fenotípusos adatok áttekintését követően a végső elemzést 858 fő adataival végeztük el. A vizsgálati alanyok a kaukázusi rasszhoz tartoztak kivétel nélkül. A vizsgálat az Egészségügyi Tanács Orvosetikai Bizottsága engedélyezésével történt. Minden résztvevő írásos beleegyezését adta a vizsgálathoz.

Fenotípus mérőeszközök

A szorongásra való hajlamot két kérdőív segítségével mértük fel. A Rövid Tünetletár (Brief Symptom Inventory, BSI) 26-tételes, önkitöltős mérőeszköz, melyet a hosszabb változatából (SLC-90-R) fejlesztettek ki (Derogatis and Melisaratos, 1983). A 26-tételes verzió többféle pszichiátriai zavar szűrésére alkalmas, a jelen vizsgálatban a szorongás alszkaláját (anxiety, BSI-ANX) alkalmaztuk. Az Állapot-Vonás Szorongás Kérdőív (STAI) 40-tételes, önkitöltős kérdőív, ami a szorongást két dimenzióban, az állapot és a vonás dimenzióban méri (Spielberger, 1970). A korai stresszkelte életesemények vizsgálatához a Gyermekkor Adverzív Kérdőívet (Childhood Adversity scale, CHA) alkalmaztuk, amely a Gyermekkor Trauma Kérdőív rövidített változata (Bernstein et al., 1997). A 4 tételből álló kérdőív az érzelmi, a fizikai, valamint a szexuális abúzusra vonatkozó kérdéseket tartalmaz. Saját vizsgálatunkban a tételket kiegészítettük a szülők elvesztésével kapcsolatos kérdéssel.

Genotipizálási módszerek

A vizsgálathoz szükséges DNS-t a résztvevők szájnyalakahártyamintájából nyertük Freeman és mtsai mód-

1. ábra A CB1R és az 5-HTT gén polimorfizmusainak interakciós hatása a STAI-T alskála pontszámra vonatkozóan**2. ábra** A CB1R és az 5-HTT polimorfizmusok interakciós hatása a magas szorongás pontszám rizikójára (OR)

szere alapján. A kandidáns egy pontos variációt (FAAH génben rs324420; CNR1 génben rs2180619) Sequenom MassArray technológiával (Sequenom, San Diego) genotipizáltuk. Az Iplex™ assay a gyártó használati utasítása alapján történt 25ng DNS felhasználásával. 5-HTTLPR hosszúság polimorfizmust 6-FAM jelöléssel amplifikáltuk korábban leírt módszer szerint.

Statistikai módszerek

A genotípus asszociációs vizsgálatokhoz regressziós analízist végeztünk, melyhez a PLINK v. 1.07 és R 2.0 program SNPAssoc alkalmazását, majd a post hoc tesztek elvégzéséhez az SPSS 20.0 programot használtuk. A post hoc variancia vizsgálatok esetén a modellt korrigáltuk a nem és az életkor hatására nézve. A szignifikancia szint meghatározásánál a p-érték Bonferroni-féle korrekcióját alkalmaztuk. A minor allél frekvencia, valamint a Hardy-Weinberg egyensúly meghatározása a HaploView 4.2. programmal történt.

EREDMÉNYEK

A CNR1 és a FAAH gének polimorfizmusainak önálló hatása nem bizonyult szignifikánsnak a fenotípusvariancia szempontjából.

Az rs2180619 polimorfizmus GG homozigóta hordozók abban az esetben, ha 5-HTTLPR SS genotípust hordoztak, szignifikánsan magasabb pontszámot értek el a STAI-T alskálán (átlag±S.E.M. =46.35±3.262, $p=0.0006$; 1. ábra). Magas szorongáspontszám-hordozó kategóriába kerülni majdnem 5-szörös volt az esélye azoknak, akik egyszerre hordozták a GG és

SS genotípust az A és L allél hordozókhöz képest (OR=4.64, 95% CI: 1.7-12.71; 2. ábra).

A regressziós analízis alapján az A allél hordozók a FAAH C385A polimorfizmusra nézve annál magasabb pontszámot értek el a BSI-ANX és a STAI-T alskálakon, minél magasabb CHA értékkel rendelkeztek szemben a C allél hordozókkal ($p_{interact}=0.00002$; $p_{interact}=0.0023$; 1. táblázat).

A becsült ereje a vizsgálatnak a BSI-ANX alskálára számolva 98.1% volt ($\beta_G=-0.176$, $\beta_E=0.0367$, $\beta_{GE}=0.069$).

1. táblázat A FAAH C385A polimorfizmus hordozás, valamint a gyermekkori trauma gyakoriságának hatása a szorongás (BSI-ANX, STAI-T) pontszámokra

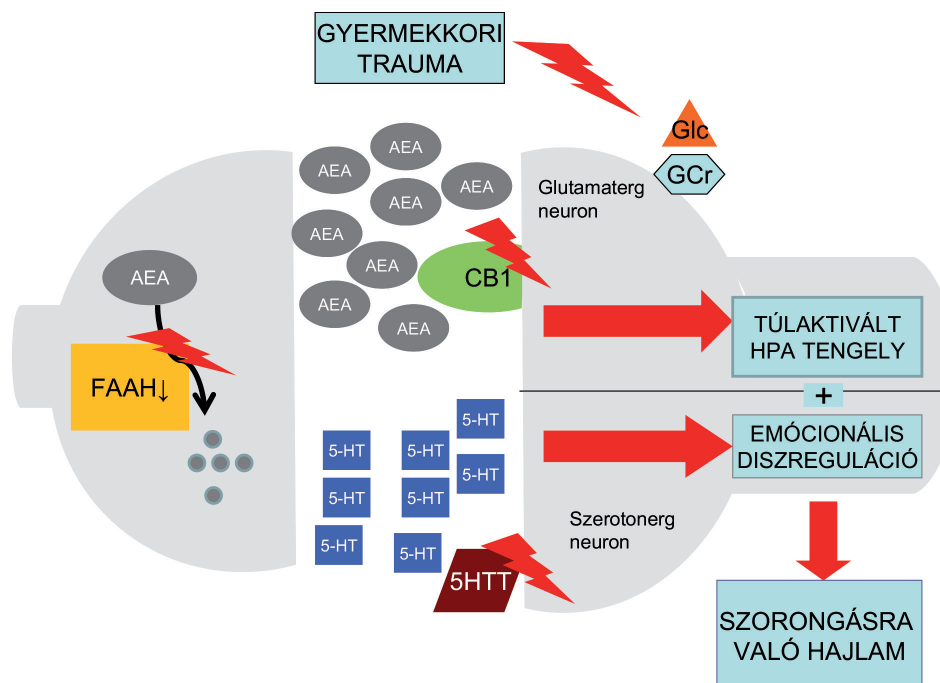
	BSI-ANX	STAI-T
CHA1	Átlag±SD	Átlag±SD
CC	0.63±0.63	38.3±9.8
CA+AA	0.57±0.63	38.9±10.0
CHA2		
CC	0.84±0.75	41.9±9.6
CA+AA	0.73±0.65	41.5±10.7
CHA3		
CC	0.81±0.83	42.7±12.4
CA+AA	1.52±1.07	50.8±13.7
p-érték	0.000003	0.005

CHA 1=0 pont; CHA 2 =1-3 pont; CHA 3= több mint 3 pont

MEGBESZÉLÉS

Eredményeink szerint a CNR1 promter és az 5-HTT promter gén-gén interakció jelentős szerepet játszik a szorongás kialakulásában. Emellett a gyermekkori trauma a FAAH genetikailag meghatáro-

3. ábra A szorongásra való hajlam kialakulásában feltételezett szerepük a CB1R és a FAAH gén polimorfizmusokhoz társuló molekuláris változásoknak az agyban



5-HT, szerotonin; 5-HTT, szerotonin transzporter; AEA, anandamid; FAAH, zsírsav amid hidroláz; GCr, glukokortikoid receptor; Glc, glukokortikoid

zott aktivitáscsökkenése esetén vezet felnőttkori szorongáshoz.

A CB1 receptorral kapcsolatos eredményeink értelmezéséhez fontos megjegyezni, hogy a szerotonerg neuronok felszínén igazolódott a CB1 receptorok preszinaptikus expressziója, tehát a 5-HTT és a CB1R kolokalizációja (Haring et al., 2007), illetve az 5-HT felszabadulás CB1R általi szabályozása az egéregy prefrontális cortex területén kimutatható volt (Tzavara et al., 2003). Emellett CB1R antagonistá (SR141716A) kezelést követően növekedett az 5-HT turnover (Darmani et al., 2003). A két rendszer (ECS és 5-HT) molekuláris kapcsolatát tehát számos adat támasztja alá. A genetikai interakció interpretációjához a polimorfizmusok funkcionális hatását érdemes figyelembe venni. Az 5-HTTLPR esetén jól ismert, hogy a rövid allél esetén gyengébb, míg a hosszú allél hordozása intenzívebb génexpressziót eredményez. Az rs21906128 funkciójára vonatkozó vizsgálat nem áll rendelkezésre ugyan, azonban a transzkripció faktor kötődési mintázat *in silico* adatbázisban ellenőrizhető. Ezek alapján a G allél hordozás gyengébb CB1R expresszióval járhat együtt, azaz a CB1R jel kevésbé érvényesül jelenlétében, mint C allél hordozás esetén.

Az SS és a GG genotípus együttes hordozása esetén tehát gyenge transzporter működéshez társul kevésbé aktív CB1R funkció, ami eredményeink szerint magas szorongáspontszámmal járt együtt (3. ábra).

A FAAH génben található C385A polimorfizmus A alléja bizonyult vizsgáltunkban rizikó allélnak. Ez a variáció csökkent enzimaktivitással járt együtt *in vitro* kísérleti körülmények között (Chiang et al., 2004). Azokkal az állatkísérleti adatokkal, amelyek a FAAH enzim blokkolásának vizsgálatából származnak, első megközelítésben ellentmondónak tűnnek eredményeink, hiszen az enzim gátlásával a szorongás oldódása járt együtt. Az ellentmondó eredményekre kétféle magyarázat adható. Az egyik, hogy az enzim farmakológiai blokkolása és a genetikailag meghatározott csökkent aktivitás nem ugyanazt az állapotot jelenti. Azaz akut blokkolás hatása jelentősen eltér az idegrendszeri fejlődést végig kísérő tartós hatástól. Tekintettel arra, hogy a gyermekkori traumák bizonyultak jelentősnek az ECS-nek a kóros stressz reakcióban betöltött funkcióját illetően, az idegrendszeri fejlődést érintő vizsgálatoknak különösen fontos jelentősége van az eredményeink értelmezésében. Mivel a FAAH aktivitásmintázat alakulása szignifikáns

hatással bír az adolescens korú agy érési folyamataira, adataink arra utalnak, hogy a veleszületett csökkent aktivitású FAAH enzim a stresszreakció megahatározó mechanizmusokon keresztül vulnerábilissá teszi a fejlődésben lévő idegrendszert a traumákkal szemben (Lee and Gorzalka, 2015).

A másik a rágcsálók és a humán agyi folyamatok szabályozási rendszerének különböző komplexitása. Az általunk kiválasztott FAAH gén funkcionális polimorfizmus hatását szorongással összefüggésben meglepően kevés humán vizsgálatban elemezték. Ugyanakkor az a néhány humán vizsgálat figyelemreméltó módon a saját eredményeinket erősítik meg szemben az experimentális adatokkal. Monteleone és mtsai saját eredményeinkkel részben összehangban szintén az A allélt találták gyakoribbnak depresszióban szenvedő populációban kontroll csoporttal összehasonlítva (Monteleone et al., 2010). Emellett szintén az általunk talált összefüggést erősíti meg, hogy teljes genom asszociációs vizsgálatban az A allél bizonyult rizikóallélnak a major depressziós zavar tekintetében (Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric, 2013).

További értelmezési szempont a korai trauma repetitív jellege. A FAAH enzim krónikus antagonistá kezelése esetén (ami a krónikus stresszt modellezi) csökkent CB1R expressziót találtak patkány agyban, ami kóros neurogén sejtproliferációhoz és csökkent sejt túléléshez vezetett (Rivera et al., 2015). Ennek alapján feltételezhető, hogy az A allél hordozás repetitív korai trauma esetén a krónikus FAAH gátláshoz hasonlóan a CB1R downreguláción keresztül anxiogén hatású lehet (Pacher and Kunos, 2013).

Eredményeink szerint tehát az ECS genetikailag meghatározott működése komplex módon vesz részt a szorongásra való hajlam kialakulásában. Míg a CB1R a szerotonin transzporter génnel, a FAAH a korai traumákkal mutatott interakciós összefüggést. Tekintettel arra, hogy az ECS jelentős farmakológiai target és a közelmúltban éppen a FAAH inhibitor klinikai tesztelése során történt halálos kimenetelű tragédia, az állatkísérleti adatokkal némiképp ellentmondó eredményeink felhívják a figyelmet a humán genetikai vizsgálatok fontosságára.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS: A vizsgálatot az Európai Unió 6. Keretprogram (LSHM-CT-2004-503474) és a Nemzeti Agykutatási Program (NAP-B, Grant KTIA_13_NAP-A-II/14) támogatta. Lazáry Judit a közlemény írása idején MTA Bolyai János kutatói ösztöndíjban részesült. Ezúton is köszönjük az önkéntes vizsgálati alanyok szíves részvételét.

LEVELEZŐ SZERZŐ: Lazáry Judit

Klinikai és Kutatási Mentálhigiénés Osztály, Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest 1125 Budapest, Kútvölgyi út 4.
E-mail: lazaryjudit@gmail.com

IRODALOM

- Bernstein, D.P., Ahluvalia, T., Pogge, D., Handelsman, L., 1997. Validity of the Childhood Trauma Questionnaire in an adolescent psychiatric population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36, 340-348.
- Chiang, K.P., Gerber, A.L., Sipe, J.C., Cravatt, B.F., 2004. Reduced cellular expression and activity of the P129T mutant of human fatty acid amide hydrolase: evidence for a link between defects in the endocannabinoid system and problem drug use. *Hum Mol Genet* 13, 2113-2119.
- Darmani, N.A., Janoyan, J.J., Kumar, N., Crim, J.L., 2003. Behaviorally active doses of the CB1 receptor antagonist SR 141716A increase brain serotonin and dopamine levels and turnover. *Pharmacol Biochem Behav* 75, 777-787.
- Derogatis, L.R., Melisaratos, N., 1983. The Brief Symptom Inventory: an introductory report. *Psychol Med* 13, 595-605.
- Freund, T.F., Katona, I., Piomelli, D., 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83, 1017-1066.
- Gobbi, G., Bambico, F.R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., Cassano, T., Morgese, M.G., Debonnel, G., Duranti, A., Tontini, A., Tarzia, G., Mor, M., Trezza, V., Goldberg, S.R., Cuomo, V., Piomelli, D., 2005. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18620-18625.
- Haller, J., Bakos, N., Szirmay, M., Ledent, C., Freund, T.F., 2002. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci* 16, 1395-1398.
- Haring, M., Marsicano, G., Lutz, B., Monory, K., 2007. Identification of the cannabinoid receptor type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice. *Neuroscience* 146, 1212-1219.
- Hermann, H., Marsicano, G., Lutz, B., 2002. Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience* 109, 451-460.
- Hill, M.N., McLaughlin, R.J., Morrish, A.C., Viau, V., Floresco, S.B., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., 2009. Suppression of amygdalar endocannabinoid signaling by stress contributes to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology* 34, 2733-2745.
- Hill, M.N., Patel, S., Carrier, E.J., Rademacher, D.J., Ormerod, B.K., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., 2005. Downregulation of endocannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress. *Neuropsychopharmacology* 30, 508-515.
- Lee, T.T., Gorzalka, B.B., 2015. Evidence for a Role of Adolescent Endocannabinoid Signaling in Regulating HPA Axis Stress Responsivity and Emotional Behavior Development. *Int Rev Neurobiol* 125, 49-84.
- Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric, G.C., 2013. A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 18, 497-511.
- Mato, S., Aso, E., Castro, E., Martin, M., Valverde, O., Maldonado, R., Pazos, A., 2007. CB1 knockout mice display impaired functionality of 5-HT1A and 5-HT2A/C receptors. *J Neurochem* 103, 2111-2120.

15. Monteleone, P., Bifulco, M., Maina, G., Tortorella, A., Gazzo, P., Proto, M.C., Di Filippo, C., Monteleone, F., Canestrelli, B., Buonerba, G., Bogetto, F., Maj, M., 2010. Investigation of CNR1 and FAAH endocannabinoid gene polymorphisms in bipolar disorder and major depression. *Pharmacol Res* 61, 400-404.
16. Nakazi, M., Bauer, U., Nickel, T., Kathmann, M., Schlicker, E., 2000. Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 361, 19-24.
17. Navarro, M., Hernandez, E., Munoz, R.M., del Arco, I., Villanua, M.A., Carrera, M.R., Rodriguez de Fonseca, F., 1997. Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport* 8, 491-496.
18. Pacher, P., Kunos, G., 2013. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease--successes and failures. *FEBS J* 280, 1918-1943.
19. Pertwee, R.G., 2005. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* 76, 1307-1324.
20. Rivera, P., Blanco, E., Bindila, L., Alen, F., Vargas, A., Rubio, L., Pavon, F.J., Serrano, A., Lutz, B., Rodriguez de Fonseca, F., Suarez, J., 2015. Pharmacological activation of CB2 receptors counteracts the deleterious effect of ethanol on cell proliferation in the main neurogenic zones of the adult rat brain. *Front Cell Neurosci* 9, 379.
21. Rodgers, R.J., Haller, J., Halasz, J., Mikics, E., 2003. 'One-trial sensitization' to the anxiolytic-like effects of cannabinoid receptor antagonist SR141716A in the mouse elevated plus-maze. *Eur J Neurosci* 17, 1279-1286.
22. Spielberger, C.D., 1970. *Manual for the State-Trait Anxiety Inventory*. Consulting Psychologist Press. .
23. Turu, G., Simon, A., Gyombolai, P., Szidonya, L., Bagdy, G., Lenkei, Z., Hunyady, L., 2007. The role of diacylglycerol lipase in constitutive and angiotensin AT1 receptor-stimulated cannabinoid CB1 receptor activity. *J Biol Chem* 282, 7753-7757.
24. Tzavara, E.T., Davis, R.J., Perry, K.W., Li, X., Salhoff, C., Bymaster, F.P., Witkin, J.M., Nomikos, G.G., 2003. The CB1 receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. *Br J Pharmacol* 138, 544-553.
25. Zhang, P.W., Ishiguro, H., Ohtsuki, T., Hess, J., Carillo, F., Walther, D., Onaivi, E.S., Arinami, T., Uhl, G.R., 2004. Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Mol Psychiatry* 9, 916-931.

Genetic association analyses of the endocannabinoid system on anxious phenotype

Background: Accumulating data confirmed that the endocannabinoid system (ECS) is involved in the regulation of stress response and emotional processes, therefore ECS became an important pharmacological target as a potential anxiolytic. Although unequivocal data from animal studies confirmed the relevancy of the ECS in anxious phenotype, human genetic data are poorly available in the literature in this field. In the presented studies we tested possible associations between anxious phenotype and the cannabinoid receptor 1 and the fatty acid amide hydrolase gene polymorphisms. **Methods:** Almost 900 subjects were involved in our study from the general population. Anxious phenotype was measured by the State-Trait Anxiety Inventory (STAI) and the anxious subscale of the Brief Symptom Inventory (BSI-ANX). Genetic polymorphisms were genotyped from buccal mucosa samples' DNA by MassArray Sequenom technic. General linear models and post hoc tests were performed for statistical analyses. **Results:** Phenotypic variances were not dependent on single marker's effect. However, interaction analyses provided significant results. Carriers of GG genotype of the rs2180619 scored significantly higher on the STAI-T scale in presence of SS genotype of 5-HTTLPR compared to other allelic variants ($p=0.0006$). SS genotype together with GG genotype meant almost a 5-fold risk to be anxious (OR=4.64, 95% CI: 1.7-12.71). In case of the C385A polymorphism of FAAH gene, A allele was associated with high scores of the BSI-ANX and the STAI-T if there were multiple childhood traumas in the anamnesis compared to C allele ($p_{\text{interact}}=0.00002$; $p_{\text{interact}}=0.0023$; respectively). **Conclusion:** Our results confirmed earlier positive data on the association between ECS and anxious phenotype. According to our findings ECS plays a significant role in the pathomechanism of anxious disorders by a complex mechanism of genetic interaction with the serotonin transporter gene and childhood traumas.

Keywords: anxiety, FAAH, early trauma, gene-environment interaction, endocannabinoid system