

**(Patho)physiologische Rolle des Endocannabinoids Anandamid  
bei der bronchialen Tonusregulation**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Annika Simon**

aus

Kappeln

Bonn 2022





Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gutachterin: Prof. Dr. med. Daniela Wenzel

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Höfeld

Tag der Promotion: 02.12.2022

Erscheinungsjahr: 2022

## Zusammenfassung

Asthma und COPD gehören zu den häufigsten chronischen Erkrankungen und sind Hauptursachen für Morbidität und Mortalität bei Kindern und Erwachsenen weltweit. Diese obstruktiven Lungenerkrankungen sind durch einen erhöhten Atemwegswiderstand, eine Entzündung der Bronchien, eine Verdickung des Epithels und eine erhöhte Schleimproduktion gekennzeichnet. Vor allem die Bronchokonstriktion stellt für die Patienten ein großes Problem dar und ist daher das Hauptziel der derzeitigen Behandlungsstrategien. Beta2 Sympathomimetika und Anticholinergika werden eingesetzt, um den Atemwegstonus zu senken, doch sprechen viele Patienten nicht zufriedenstellend auf diese Medikamente an oder leiden unter Nebenwirkungen. Daher werden alternative Wirkstoffe dringend benötigt. In einer früheren Studie haben wir festgestellt, dass das Endocannabinoid System, ein körpereigenes System aus Enzymen, Rezeptoren und Lipid-Mediatoren, den Gefäßtonus in der Lunge reguliert. Daher wollten wir im nächsten Schritt untersuchen, ob auch der Atemwegstonus durch das Endocannabinoid System beeinflusst wird. Das am besten charakterisierte Endocannabinoid ist Anandamid (AEA); es gibt einige Hinweise darauf, dass AEA den Atemwegstonus bei Meerschweinchen modulieren kann. Die (patho)physiologische Bedeutung dieses Effekts ist jedoch unklar. Um die Rolle von AEA bei der Regulierung des Atemwegstonus zu klären, haben wir die Wirkung von AEA auf isolierte Atemwege (Trachealringe) der Maus und Präzisionsschnitte der Lunge (PCLS) *ex vivo* analysiert. Daneben haben wir die zugrundeliegenden Signalwege aufgedeckt sowie die *in vitro* beteiligten Zelltypen identifiziert. Abschließend bestimmten wir die *in vivo* Wirkung von AEA auf den Atemwegswiderstand und analysierten eine mögliche pathophysiologische Rolle von AEA im Mausmodell des Ovalbumin-induzierten Asthmas.

Experimente in den Tracheen und PCLS von Mäusen zeigten, dass AEA eine starke Bronchorelaxation hervorruft. Dieser Effekt war bei Cnr1<sup>-/-</sup>/Cnr2<sup>-/-</sup> Doppelknockout Mäusen unverändert, wurde aber bei Faah<sup>-/-</sup> Mäusen und C57BL/6J Tieren, die mit dem FAAH Inhibitor URB597 vorbehandelt wurden, stark abgeschwächt. Durch die Verwendung des nicht hydrolysierbaren AEA Analogons Met-AEA konnte die wichtige Rolle von FAAH-abhängigen Metaboliten für die bronchiale Relaxation bestätigt werden. Die Analyse der mRNA Expression zeigte hohe Level für Faah in der Trachea und der Lunge, was mit einer starken FAAH Aktivität in diesen Geweben korrelierte. Zusätzliche Kraftmessungen zeigten, dass auch der FAAH-abhängige AEA Metabolit Arachidonsäure eine Atemwegsrelaxation induziert. Mit dem Cyclooxygenase Inhibitor Indometacin konnten die relaxierenden Effekte von AEA und AA

stark minimiert werden. Außerdem verminderte eine Kombination von EP2 und EP4 Antagonisten die AEA-abhängige Atemwegsrelaxation, was darauf hindeutet, dass die AEA-abhängige Bronchorelaxation PGE2-abhängig ist. Tatsächlich führte die AEA Stimulation von Trachealringen, humanen trachealen Epithelzellen (hTEPC) und glatten bronchialen Muskelzellen (hASMC) zur Produktion von PGE2 und dessen nachgeschaltetem Mediator cAMP. Interessanterweise waren in den Lungen von OVA-sensibilisierten Mäusen die AEA Konzentrationen sowie die Expression der AEA Synthesenzyme im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren reduziert, was darauf hindeutet, dass eingeschränktes AEA Signaling zur Pathophysiologie von Asthma beitragen könnte. Schließlich führte die Applikation von AEA in asthmatischen Mäusen zu einer Bronchorelaxation in PCLS und auch zu einer Reduktion des Atemwegswiderstands *in vivo*, was auf eine potenzielle therapeutische Bedeutung des AEA Signalwegs auch bei obstruktiven Lungenerkrankungen hindeutet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit die wichtige Rolle der AEA/FAAH Achse bei der Regulierung des Atemwegstonus aufzeigt. Wir konnten AEA als wirksames Bronchorelaxans in gesunden und asthmatischen Mäusen identifizieren und die besondere physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Endocannabinoid Signalübertragung bei obstruktiven Lungenerkrankungen demonstrieren. Diese Erkenntnisse könnten mittelfristig zu neuen therapeutischen Ansätzen bei chronischen Lungenerkrankungen führen.

## Summary

Asthma and COPD are among the most common chronic diseases representing a leading cause of morbidity and mortality in children and adults worldwide. These obstructive lung diseases are characterized by elevated airway resistance, bronchial inflammation, thickening of the epithelium and increased mucus production. In particular bronchoconstriction is a major problem for patients and therefore the main target of current treatment strategies. Beta adrenergic agonists and anti-cholinergics are applied to lower airway tone, however, there are many patients that do not respond satisfactorily to these drugs or suffer from side effects. Hence, alternative drug targets are urgently required. In a previous study we found that the endocannabinoid system that is an endogenous biological system comprised of enzymes, receptors and lipid mediators, regulates vascular tone in the lung. Therefore, we now wondered if also airway tone can be affected by the endocannabinoid system. The best-characterized endocannabinoid is anandamide (AEA) and there are few hints that AEA can modulate airway tone in guinea pigs. However, the (patho)physiological relevance of this effect is still unclear. To clarify the role of AEA in airway tone regulation, we analyzed the effect of AEA on isolated airways and precision cut lung slices (PCLS) of mice *ex vivo*, uncovered the underlying signaling pathways and identified the cell types involved *in vitro*. Finally, we determined the *in vivo* effect of AEA on airway resistance and assessed a potential pathophysiological role of AEA in the mouse model of ovalbumin (OVA)-induced asthma.

Experiments in murine tracheas and PCLS revealed that AEA induces a strong bronchorelaxation. This effect was unaltered in *Cnr1*<sup>-/-</sup>/*Cnr2*<sup>-/-</sup> double knockout mice but it was strongly attenuated in *Faah*<sup>-/-</sup> mice and C57BL/6J mice pretreated with the FAAH inhibitor URB597. By use of the non-hydrolyzable AEA analogue Met-AEA the important role of FAAH-dependent metabolites for bronchorelaxation was confirmed. Analysis of mRNA expression demonstrated high *Faah* levels in trachea and lung, which correlates with a strong FAAH activity in these tissues. Additional force measurements show that also the FAAH-dependent AEA metabolite arachidonic acid induced airway relaxation, using the cyclooxygenase inhibitor indomethacin, the relaxing effects of AEA and AA were diminished. Furthermore, a combination of EP2 and EP4 antagonists strongly attenuated AEA-dependent airway relaxation indicating that PGE<sub>2</sub> is involved. In fact, stimulation of tracheal rings, human tracheal epithelial (hTEPC) and airway smooth muscle cells (hASMC) by AEA resulted in the production of the PGE<sub>2</sub> and its downstream mediator cAMP. Interestingly, in lungs of OVA-sensitized mice AEA levels as well as the expression of AEA synthesis enzymes were reduced

compared to healthy controls indicating that impaired AEA signaling could contribute to the pathophysiology of asthma. Finally, also in asthmatic mice AEA application induced airway relaxation in PCLS and also in airway resistance measurements *in vivo* suggesting a potential therapeutic capacity of AEA signaling

Summarized, this work reveals the important role of the AEA/FAAH axis in airway tone regulation. We establish AEA as an effective bronchorelaxant in healthy and asthmatic mice, which demonstrates the physiological and pathophysiological relevance of endocannabinoid signaling *in vivo*.

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung.....	13
1.1	Das Endocannabinoidsystem.....	13
1.1.1	Frühe Nachweise der Cannabis-Anwendung und Entdeckung des Endocannabinoidsystems.....	13
1.1.2	Cannabinoidrezeptoren.....	14
1.1.3	Physiologie des Endocannabinoidsystems (ECS).....	16
1.1.4	Biosynthese von AEA.....	16
1.1.5	Degradation von AEA.....	18
1.1.7	Struktur und Funktion der Endocannabinoide.....	22
1.1.8	Wirkung der Endocannabinoide im Gefäßsystem.....	24
1.1.9	Lunge und Bronchialsystem.....	25
1.1.10	Asthma bronchiale.....	26
1.2	Zielsetzung.....	29
2	Material.....	31
2.1	Software.....	31
2.2	Geräte.....	31
2.3	Chemikalien.....	33
2.4	Narkose- und Schmerzmittel.....	36
2.5	Verbrauchsmaterialien.....	36
2.6	Puffer und Lösungen.....	39
2.7	DNA-Polymerase Mastermix.....	39
2.8	Kits.....	40
2.9	Antikörper.....	40
2.10	Zellkultur.....	41
2.10.1	Zellkulturbedarf.....	41
2.10.2	Zellkulturmedien.....	41
2.11	Primer.....	42
2.11.1	Primer für realtime PCR.....	42
2.11.2	Primer für PCR.....	42
2.12	Versuchstiere.....	43
3	Methoden.....	44
3.1	Zellkultur.....	44
3.1.1	Kultivierung der Zelllinien.....	44

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.2	Passage der Zelllinien.....	44
3.1.3	Lentivirale Transduktion der HUVEC .....	45
3.1.4	Kryokonservierung von Zelllinien .....	45
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	45
3.2.1	RNA Isolation aus Zellen und Gewebe.....	45
3.2.2	Bestimmung der RNA Qualität.....	45
3.2.3	Reverse Transkription .....	46
3.2.4	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	47
3.2.4.1	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	48
3.3	Proteinbiochemische Methoden .....	49
3.3.1	Proteinisolation aus Lungengewebe der Maus.....	49
3.3.2	Proteinisolation aus humanen Zellen .....	49
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	50
3.4	Immunhistochemie .....	50
3.4.1	Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) .....	50
3.4.1.1	Fixierung von Zellen und Gewebe .....	50
3.4.2	Immunhistochemische Färbung von Zellen und Gewebe .....	51
3.4.3	Histologische Färbungen.....	51
3.4.3.1	Herstellung von Paraffinschnitten .....	51
3.4.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	52
3.4.3.3	Schnellfärbung zytologischer bronchoalveolärer Proben.....	53
3.5	Immunoassays .....	53
3.5.1	Stimulation der Zellen für cAMP und PGE <sub>2</sub> ELISA.....	53
3.5.2	cAMP ELISA .....	54
3.5.3	PGE <sub>2</sub> ELISA.....	54
3.6	Enzymaktivitätsassays .....	54
3.6.1	Stimulation von Zellen und Gewebe für FAAH Aktivitätsassays .....	54
3.6.2	FAAH Aktivitätsassay.....	55
3.6.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	56
3.7	<i>Ex vivo</i> Experimente .....	56
3.7.1	Isometrische Kraftmessungen am Myographen.....	56
3.7.1.1	Präparation.....	56
3.7.1.2	Einspannen der Trachealringe .....	56
3.7.1.3	Kalibrierung.....	57

---

3.7.1.4	Versuchsablauf .....	58
3.7.2	Funktionelle Lungenschnitte .....	58
3.7.2.1	Präparation funktioneller Lungenschnitte .....	59
3.7.2.2	Perfusion der funktionellen Lungenschnitte .....	60
3.7.2.3	Untersuchungen der Wirkung von AEA .....	61
3.8	<i>In vivo</i> Experimente .....	63
3.8.1	Experimentelles Asthma .....	63
3.8.1.1	Sensibilisierungsprotokoll für akutes und chronisches Asthma .....	63
3.8.1.2	Atemwegshyperreagibilität .....	64
3.8.1.3	Gewinnung der bronchoalveolären Lavage .....	65
3.8.2	Rechtsherzkatheter .....	66
3.9	Statistik .....	67
3.10	Kooperationsübersicht .....	67
4	Ergebnisse .....	68
4.1	AEA zeigt keinen Effekt auf den basalen Tonus von Trachealringen der Maus.....	68
4.2	AEA induziert eine starke Bronchorelaxation in vorkontrahierten Trachealringen..	68
4.3	Die AEA-induzierte Bronchorelaxation hat eine Epithel-abhängige sowie eine Epithel-unabhängige Komponente .....	71
4.4	Die AEA-induzierte Bronchorelaxation erfolgt durch Aktivierung der Prostaglandinrezeptoren EP2 und EP4 .....	72
4.5	AEA steigert die PGE2 und cAMP Produktion in bronchialen Epithelzellen sowie in glatten bronchialen Muskelzellen .....	74
4.6	AEA induziert eine Relaxation der intrapulmonalen Atemwege <i>ex vivo</i> .....	77
4.7	AEA reduziert den Atemwegswiderstand <i>in vivo</i> .....	80
4.8	Die AEA Konzentration ist in der Lunge asthmatischer Mäuse reduziert .....	83
4.9	AEA bewirkt eine starke Relaxation der Atemwegsmuskulatur und reduziert die Hyperreagibilität im OVA-induzierten Asthma Modell.....	85
5	Diskussion.....	92
6	Abkürzungsverzeichnis .....	97
7	Literaturverzeichnis .....	100
8	Abbildungsverzeichnis.....	114
9	Publikationsliste .....	115



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Endocannabinoidsystem

### 1.1.1 Frühe Nachweise der Cannabis-Anwendung und Entdeckung des Endocannabinoidsystems

Die Nutzung von Cannabis (botanisch *Cannabis sativa*) als Heil- und Nutzpflanze reicht geschichtlich weit zurück. Im ältesten bekannten Arzneibuch „Shen-nung Pen-ts'ao Ching“ (2800 v. Chr.) finden sich Eintragungen über die medizinischen Eigenschaften der Pflanze sowie psychotrope Nebenwirkungen bei exzessivem Gebrauch <sup>1,2</sup>. Medizinische Anwendung fand Cannabis bei der Versorgung von Wunden, der Therapie von Fieber sowie der Behandlung von Gicht oder Geistesabwesenheit. Des Weiteren wurde Cannabis bei sozialen und religiösen Ritualen sowie Zeremonien verwendet <sup>3</sup>. Erst ab dem 5 Jh. v. Chr. gelangte die Hanfpflanze nach Griechenland, wie die Aufzeichnungen des antiken griechischen Geschichtschreibers Herodot belegen. So verwendeten die Skyten, ein Reiternomadenvolk aus der eurasischen Steppe nördlich des schwarzen Meeres, Cannabis bei Beerdigungszeremonien. Sie versetzen sich durch Cannabisrauch in einen Trancezustand, um die Seelen der Verstorbenen ins Jenseits zu begleiten <sup>4</sup>. Im Mittelalter erhielten muslimische Ärzte durch Übersetzung der Werke Dioskurides und Dalens Kenntnis über die Verwendung und Wirkung verschiedener Arzneimittel, u.a. auch von Cannabis. So erwähnte der berühmte arabische Arzt Ibn Sina (Avicenna) den Gebrauch von Cannabis im „Canon medicinae“ <sup>5</sup>. Ende des 18. Jahrhunderts gelangte Cannabis durch Truppen Napoleon Bonapartes von Ägypten nach Europa und wurde zur Behandlung von Schmerzen, Schlafstörungen und Depressionen eingesetzt <sup>6</sup>. Erste Experimente zur pharmazeutischen Anwendung von Cannabis gehen auf den irischen Arzt O'Shaughnessy sowie den französischen Psychiater Moreau zurück <sup>7-9</sup>. Kaum Beachtung fand Cannabis Anfang des 20. Jahrhunderts, da zum Einen die Forschung nach alternativen Mitteln wie Opiaten und Barbituraten stark vorangetrieben wurde und zum Anderen die pharmakologischen Effekte von Cannabis keinem konkreten Wirkstoff zugeordnet werden konnten <sup>10</sup>. Zudem geriet Cannabis als Rohstofflieferant für Drogen in Verruf. Erst in den sechziger Jahren gelangte Cannabis wieder in den Fokus der Wissenschaft, da es gelungen war, das psychoaktive Cannabinoid  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC) aus der Cannabis Pflanze zu isolieren und seine Struktur zu analysieren <sup>11</sup>. In der Folge wurden weitere wirksame Bestandteile der Cannabis Pflanze isoliert, darunter Cannabidiol und Cannabinol. Strukturanalysen ergaben, dass alle Cannabinoide eine trizyklische Struktur bestehend aus einem zentralen Pyranring, einem Phenolring mit Pentylgruppe sowie einem mehrfach ungesättigten Cyclohexylring besitzen. Durch die intensive Erforschung von THC wurden die

beiden Cannabinoidrezeptoren Typ 1 (CB1 Rezeptor) und Typ 2 (CB2 Rezeptor) entdeckt<sup>12,13</sup>. Hierdurch gelang ein bedeutender Fortschritt in der Erforschung von *Cannabis sativa* als Pharmakon. Aus der Existenz beider Rezeptoren schloss man, dass neben exogenen Stoffen auch endogene Stoffe hieran binden können. Entsprechend wurden zwei Jahre später Endocannabinoide als neue Klasse zellulärer Botenstoffe identifiziert. Die Arbeitsgruppe um Devane konnte als erstes endogenes Cannabinoid N-Arachidonylethanolamid (Anandamid; AEA) aus dem Gehirn von Schweinen isolieren. Abgeleitet wurde der Name Anandamid von *Ananda*, dem Sanskrit-Wort für Freude oder reines Glück<sup>14</sup>. Mit der Entdeckung des Endocannabinoidsystems stieg das Interesse, dieses System systematisch und biomedizinisch eingehend zu erforschen.

### 1.1.2 Cannabinoidrezeptoren

Die Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 gehören zur Klasse der G Protein-gekoppelten Rezeptoren, deren 7 Transmembrandomänen über jeweils drei intra- sowie extrazelluläre Schleifen verbunden sind. Eine Aktivierung kann entweder durch pflanzliche Cannabinoide (THC, Cannabinol), endogene Cannabinoide (AEA, 2-Arachidonylglycerol (2-AG)) inklusive des synthetischen AEA-Analogons (R)-(+)-Methanandamid, synthetische Aminoalkylindole oder Indol-Derivate wie JWH-015, WIN 55,212-2 oder AM-1241 sowie CP55,940 aus der Gruppe der synthetischen nicht-klassischen Cannabinoide erfolgen<sup>15,16</sup>. Ursprünglich ging man davon aus, dass Cannabinoidrezeptoren in verschiedensten Geweben funktionell mit G Proteinen aus der G $\alpha$ i/o Familie gekoppelt sind. Eine Aktivierung bewirkt die Inhibierung der Adenylatcyclase, wodurch die intrazelluläre Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) stark verringert wird. Dieser verringerte cAMP Spiegel führt wiederum zu einer Abnahme der Proteinkinase A Aktivität, wodurch die Öffnung von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen vermindert wird. In einigen Studien wurde allerdings entdeckt, dass ebenfalls G Proteine der G $\alpha$ s-Familie funktionell mit den Cannabinoidrezeptoren assoziiert sind, dessen Aktivierung wiederum zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase führt<sup>17</sup>. Hinzu kommt, dass beide Cannabinoidrezeptoren die Phosphorylierung und Aktivierung verschiedener Mitglieder der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen regulieren<sup>18-20</sup>. Für CB1 Rezeptoren ist darüber hinaus bekannt, dass ihre Stimulation zu einer Aktivierung von Gq Proteinen führen kann<sup>18</sup>. CB1 Rezeptoren werden besonders stark in verschiedenen Strukturen des Gehirns exprimiert, in abnehmender Anzahl in Riechkolben, Kleinhirn, Hippocampus über Cortex und Amygdala bis hin zu Thalamus und Hirnstamm. Vornehmlich konzentriert sich hierbei die Expression auf präsynaptische Nervenenden glutamaterger und GABAerger Neurone<sup>21-23</sup>. Neben der neuronalen Expression findet sich der CB1 Rezeptor aber auch in nicht-neuronalen

Zellen wie Astrozyten. Eine Aktivierung des Rezeptors fördert gleichzeitig die neuronale Versorgung mit Metaboliten sowie die Entsorgung von Abfallprodukten. Als Teil der tripartiten Synapse, einer engen physikalischen und funktionellen Verbindung von präsynaptischer und postsynaptischer Membran sowie Astrozyten, spielen Astrozyten zudem eine Rolle bei der synaptischen Transmission und Plastizität<sup>24</sup>. Die Aktivierung des CB1 Rezeptors durch postsynaptische Freisetzung von Endocannabinoiden führt in Astrozyten über Gq/11 zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC), woraufhin es zu einer intrazellulären Erhöhung der Ca<sup>2+</sup> Konzentration und daraus resultierend zur Abgabe von Gliotransmittern kommt. Dies führt zum einen zur Potenzierung der synaptischen Transmission benachbarter Zellen durch Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren (mGluR1), zum anderen zur direkten Freisetzung des Transmitters Glutamat. Präsynaptische N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (NMDAR) werden aktiviert, was wiederum zu einer synaptischen Langzeit-Depression (long-term depression, LTD) führt<sup>25–28</sup>. Neben der Expression im Gehirn ist der CB1 Rezeptor ebenso im peripheren Nervensystem sowie in fast allen Säugetiergeweben und -organen, wie beispielsweise der glatten Muskulatur, Knochen, Haut, Herz, Leber oder Lunge nachweisbar<sup>29–33</sup>. Im Vergleich zum CB1 ist die Expression des CB2 Rezeptors im Gehirn sehr gering und beschränkt sich auf Mikroglia, die Immuneffektorzellen des zentralen Nervensystems<sup>34–36</sup>. Seine Funktion im Gehirn wird kontrovers diskutiert und ist Gegenstand intensiver Forschung. Im Gegensatz dazu ist die Expression des CB2 Rezeptors auf Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen oder B- und T-Zellen gut etabliert.<sup>13,37–40</sup> Eine Aktivierung des CB2 Rezeptors führt hier zu einer verminderten Abgabe proinflammatorischer Zytokine<sup>38</sup>. Im Pankreas<sup>41</sup>, der Leber<sup>42</sup>, den Knochen<sup>43,44</sup> sowie Hoden und Lunge<sup>13,39</sup> konnte die Expression des CB2 Rezeptors ebenfalls nachgewiesen werden. In der Lunge ist die genaue Lokalisation der Expression und Funktion beider Cannabinoidrezeptoren allerdings weiterhin unklar<sup>39,45,46</sup>. Im respiratorischen Epithel lassen sich beide Rezeptoren nachweisen, wobei hier die Expression des CB1 überwiegt<sup>47</sup>. Weiterhin werden beide Rezeptoren von den meisten Immunzellen der Lunge exprimiert<sup>48,49</sup>. Eine starke Expression des CB2 Rezeptors findet sich in eosinophilen Granulozyten und Monozyten, wobei in beiden Zellen auch die Expression des CB1 Rezeptors nachweisbar ist<sup>50–52</sup>. Studien belegen, dass eosinophile Granulozyten chemotaxisch auf Cannabinoide reagieren und eine selektive Stimulation des CB2 Rezeptors zu einer gesteigerten Chemotaxis führt<sup>45,53</sup>.

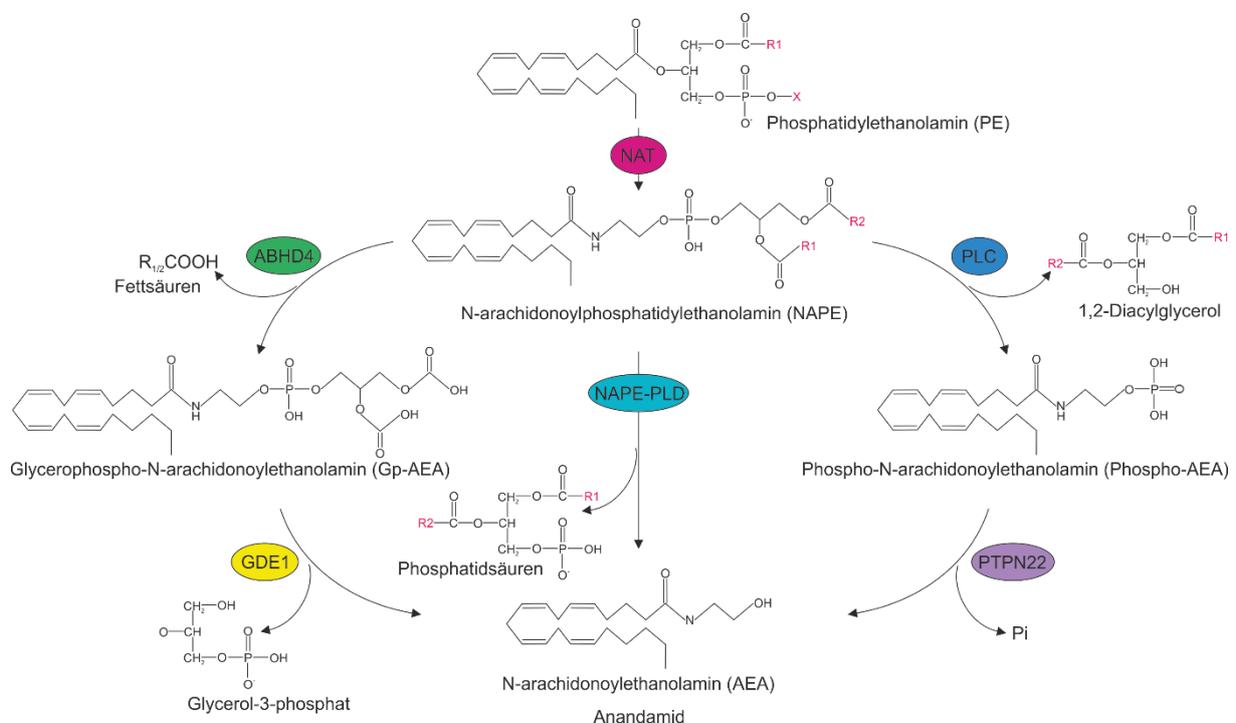
### 1.1.3 Physiologie des Endocannabinoidsystems (ECS)

Das ECS, bestehend aus den Cannabinoidrezeptoren, den dazugehörigen endogenen Liganden sowie Enzymen zur Synthese und Abbau von Endocannabinoiden, ist ein komplexes und bedeutendes physiologisches System im Körper. Nachweislich ist das ECS phylogenetisch sehr alt und evolutionär hochgradig konserviert<sup>54</sup>. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass alle untersuchten Vertebraten und Invertebraten – mit Ausnahme der Fruchtfliegen und des Fadenwurms – ein ECS besitzen<sup>55</sup>. Da das ECS nahezu in allen Organen vorkommt, spielt es eine bedeutende Rolle bei zahlreichen Stoffwechselfunktionen. So konnte bereits der Einfluss auf das Immunsystem, Stressreaktionen, die Regulation des Essverhaltens und Übelkeit, den Schlaf-Wach Rhythmus sowie auf kardiovaskuläre Funktionen beschrieben werden<sup>56-61</sup>. Darüber hinaus beeinflussen Endocannabinoide Lern- und Gedächtnisprozesse<sup>62-64</sup>.

### 1.1.4 Biosynthese von AEA

Die Speicherung von AEA erfolgt nicht, wie bei anderen Neurotransmittern üblich, in synaptischen Vesikeln. Vielmehr erfolgt die AEA Synthese nach Bedarf aus den inaktiven Vorstufen, den Membranphospholipiden<sup>65</sup>. Vorrangig getriggert wird die Synthese durch  $Ca^{2+}$  Einstrom in die Zelle. Für die Synthese ist die in der Plasmamembran verankerte N-Acylphosphatidylethanolaminphospholipase D (NAPE-PLD) verantwortlich, welche per enzymatischer Hydrolyse aus N-Acylphosphatidylethanolamin (NAPE) AEA bildet<sup>66-68</sup>. Es handelt sich um eine Zink-Metallohydrolase mit  $\beta$ -Lactamase-Faltung, die weder strukturell noch funktionell mit anderen Enzymen inklusive der Phospholipase D (PLD) vergleichbar ist. Allerdings deuten einige Studien an, dass NAPE-PLD zumindest in ihrer katalytischen Aktivität gegenüber Phospholipasen der Phosphatidylcholin-2-acylhydrolase A (PLA2) ähnelt<sup>69,70</sup>. Diese katalysiert die hydrolytische Spaltung von Membranphospholipiden, wie Phosphatidylethanolamin, in Arachidonsäure und andere Eicosanoide. Aktiviert wird die NAPE-PLD durch  $Ca^{2+}$  Influx<sup>71,72</sup>. Mit 89% Übereinstimmung innerhalb der Aminosäuresequenz ist NAPE-PLD in verschiedenen Spezies (Maus, Ratte, Mensch) gut konserviert<sup>73</sup>. Die NAPE-PLD Verteilung im Gehirn stimmt im Wesentlichen mit der des CB1 Rezeptors überein. So konnten höchste Konzentrationen von NAPE-PLD im Hippocampus oder den Basalganglien gefunden werden<sup>68</sup>. Ausgangspunkt der AEA Synthese bildet Phosphatidylethanolamin (PE), welches enzymatisch durch eine  $Ca^{2+}$ -abhängige N-Acyltransferase (NAT) in N-Acylphosphatidylethanolamin (NAPE) umgewandelt wird. NAPE selbst wird anschließend durch NAPE-PLD in Phosphatidsäuren und AEA hydrolysiert. Da jedoch Experimente an NAPE-PLD<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt haben, dass die AEA Konzentration im Gehirn dieser Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen nicht wesentlich reduziert ist, geht man

davon aus, dass AEA durch weitere Enzyme synthetisiert werden kann <sup>74</sup>. Entsprechende Studien konnten zeigen, dass für die Synthese von AEA neben NAPE-PLD die Enzyme  $\alpha/\beta$ -Hydrolase 4 (ABHD4), Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1 (GDE1) sowie die Protein Tyrosin Phosphatase Nicht-Rezeptor Typ 22 (PTPN 22) verantwortlich sein können. Durch ABHD4 werden beide Acyl-Gruppen von N-Acylphosphatidylethanolamin (NAPE) abgespalten, wodurch Glycerophospho-N-arachidonylethanolamin (Gp-AEA) entsteht. Dieses wiederum wird von der GDE1 in AEA und Glycerol-3-phosphat hydrolysiert <sup>75-77</sup>. Ferner wird NAPE durch eine Phospholipase C (PLC) zu Phospho-N-arachidonylethanolamin (Phospho-AEA) gespalten, welches wiederum durch PTPN22 dephosphoryliert wird <sup>78,79</sup> (Abb. 1).

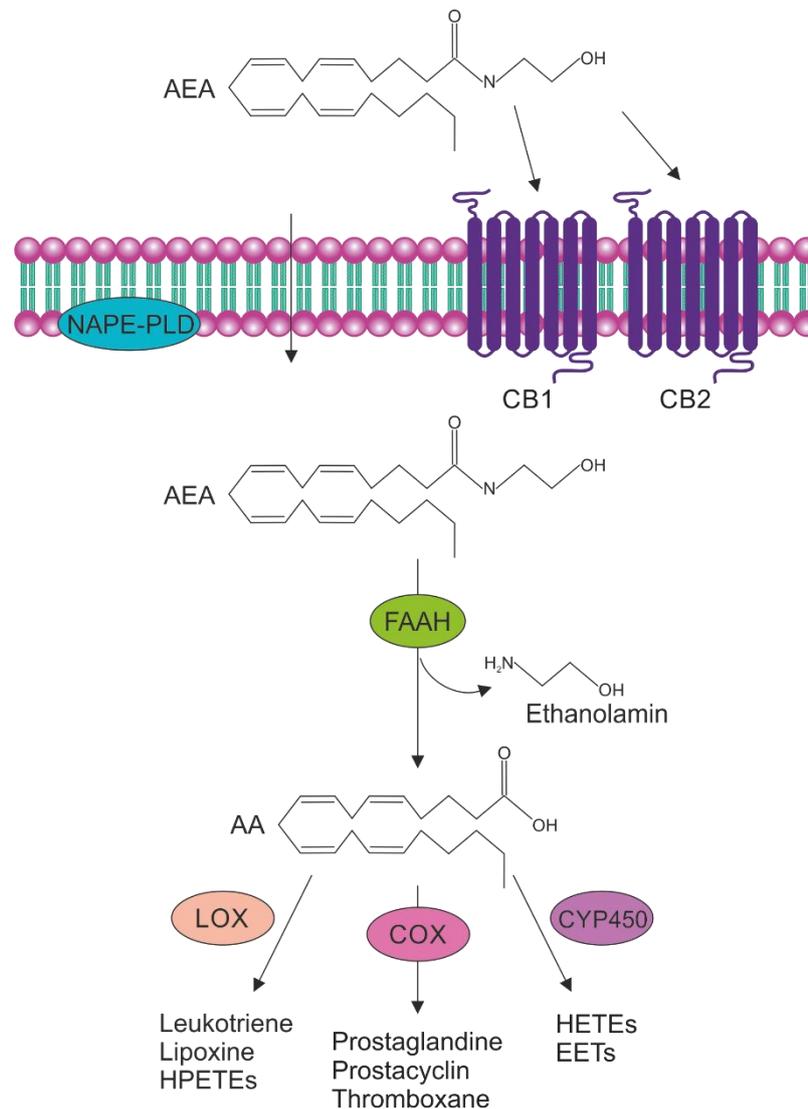


**Abbildung 1: Stoffwechselwege der Anandamid (AEA) -Synthese**

Startpunkt der AEA Biosynthese bilden Membranphospholipide, die durch die N-Acyltransferase (NAT) zu N-arachidonylphosphatidylethanolamin (NAPE) acyliert werden. NAPE wiederum kann dann über drei verschiedene Synthesewege zu N-arachidonylethanolamin (AEA) umgebaut werden. Durch die  $\alpha/\beta$ -Hydrolase 4 (ABHD4) wird NAPE durch Abspaltung beider Acyl-Gruppen zu Glycerophospho-N-arachidonylethanolamin (Gp-AEA) hydrolysiert und nachfolgend durch die Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1 (GDE1) unter Abspaltung von Glycerol-3-phosphat zu AEA dephosphoryliert. Über die N-Acylphosphatidylethanolaminphospholipase D (NAPE-PLD) wird NAPE direkt per Hydrolyse zu AEA umgewandelt. Die Phospholipase C (PLC) spaltet NAPE in 1,2-Diacylglycerol und Phospho-N-arachidonylethanolamin (Phospho-AEA). Über die nachfolgende Dephosphorylierung von Phospho-AEA durch die Protein Tyrosin Phosphatase Nicht-Rezeptor Typ 22 (PTPN 22) entsteht ebenfalls AEA.

### 1.1.5 Degradation von AEA

AEA wird nach der Synthese durch NAPE-PLD intrazellulär freigesetzt und gelangt über verschiedene Transportmechanismen in den Extrazellulärraum. Hier erfolgt die Bindung an CB1 und/oder CB2 Rezeptoren. Gleichfalls ist die Aufnahme extrazellulären AEAs aufgrund seines lipophilen Charakters durch Diffusion in die Zelle möglich<sup>80,81</sup>. Intrazellulär wird AEA typischerweise durch die Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) über hydrolytische Spaltung in Arachidonsäure (*arachidonic acid*, AA) und Ethanolamin umgewandelt. FAAH ist ein homodimeres Transmembranprotein mit einer N-terminalen Transmembrandomäne. 1985 wurde FAAH erstmals als AEA-abbauendes, membranständiges Enzym in der Rattenleber beschrieben<sup>82</sup>. Eine eingehendere molekulare Charakterisierung der FAAH gelang einige Jahre später in N18TG2 Neuroblastomzellen<sup>83</sup>, Gehirngewebe von Säugetieren<sup>84,85</sup> sowie transfizierten COS-7 Zellen<sup>86</sup>. Anhand weiterer Studien wurde deutlich, dass FAAH hoch konserviert innerhalb der Eukaryoten vorkommt<sup>87,88</sup> und entsprechend eine bedeutende Rolle im ECS spielt. Durch die Verwendung von *Faah*<sup>-/-</sup> Mäusen konnte gezeigt werden, dass bei fehlender FAAH die Hydrolyserate von AEA und anderen Fettsäureamiden (FAAs) innerhalb des Gehirns 50- bis 100-fach reduziert ist, weshalb eine bis zu 15-fach erhöhte AEA-Konzentration nachweisbar war. Dies verdeutlicht, dass die FAAH das Schlüsselenzym des hydrolytischen Abbaus darstellt<sup>89-91</sup>. Für die Untersuchung pharmakologischer Effekte durch die Inaktivierung der FAAH Aktivität wurden verschiedene Inhibitoren wie URB597 entwickelt. Anhand zahlreicher Studien zur Hydrolyseaktivität der FAAH konnte gezeigt werden, dass neben AEA weitere Amide wie OEA, PEA aber auch 2-AG durch die FAAH hydrolysiert werden können<sup>83,92-96</sup>. Nach der intrazellulären Hydrolyse von AEA durch FAAH zu AA und Ethanolamin erfolgt die weitere Metabolisierung der AA durch Lipoxygenasen (LOX), Cyclooxygenasen (COX) oder Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP450) (Abb. 2). Lipoxygenasen (LOX-5, LOX-8, LOX-12 und LOX-15) katalysieren die Umwandlung der AA zu Leukotrienen, Lipoxinen oder Hydroperoxyeikosatetraensäuren (HPETE)<sup>97</sup>. Durch Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) erfolgt die enzymatische Hydrolyse der AA über das Zwischenprodukt Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) zu Prostaglandinen (PG), Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) oder Thromboxanen (TXA)<sup>98,99</sup>. CYP 450 wiederum hydrolysieren AA zu Epoxyeikosatriensäure (EET) oder 20-Hydroxyeikosatetraensäure (20-HETE)<sup>100-102</sup>.

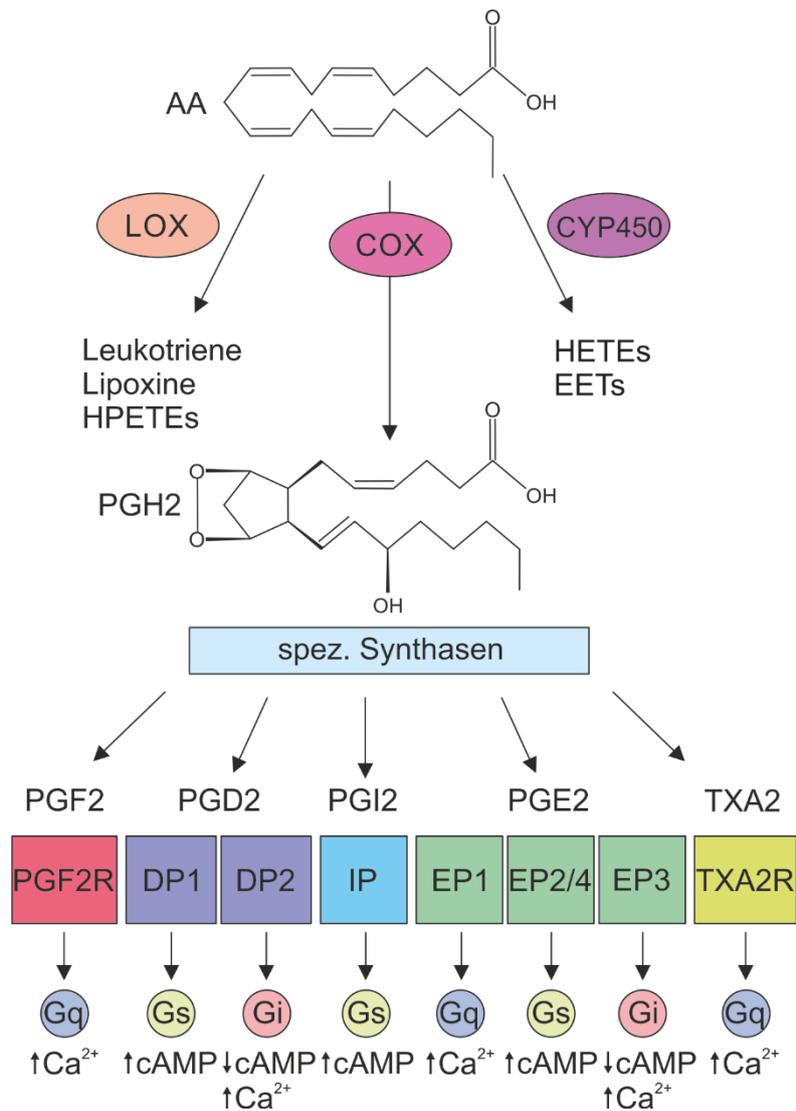


**Abbildung 2: Metabolisierung von AEA**

AEA kann entweder als extrazellulärer Agonist die Aktivierung der Cannabinoidrezeptoren 1 und 2 (CB1/CB2) initiieren oder intrazellulär durch die Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) zu Arachidonsäure (AA) und Ethanolamin hydrolysiert werden. Anschließend erfolgt die Umwandlung von AA durch Lipoxygenasen (LOX) zu Leukotrienen, Lipoxinen oder Hydroperoxyeicosatetraensäuren (HPETEs) oder durch Cyclooxygenasen (COX) über Prostaglandin H2 (PGH2) zu Prostaglandinen, Prostacyclin oder Thromboxanen. Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP450) hydrolysieren AA zu Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEs) oder Epoxyeicosatriensäuren (EETs).

Die ubiquitär exprimierte COX Isoform COX-1 ist ständig aktiv, wohingegen COX-2 nur bei Bedarf durch Zytokine aktiviert wird <sup>103-105</sup>. PGH2, das Produkt der COX-induzierten Hydrolyse der AA, ist das Substrat verschiedener nachgeschalteter Synthesen wie der Prostaglandin F Synthase (PGFS), Prostaglandin-H2 D-Isomerase (PGDS), Prostaglandin I Synthase (PGIS), drei verschiedener Prostaglandin E Synthase Isoformen sowie der Thromboxan-Synthase 1 (TXAS1). In Bezug auf die Prostaglandin E Synthase können drei verschiedenen Isoformen, die mPGES-1, mPGES-2 sowie die cPGES anhand ihrer Lokalisation oder Assoziation zu beiden COX-Isoformen unterschieden werden <sup>106</sup>. Die genannten spezifischen Synthesen wandeln PGH2 in die verschiedenen Prostaglandine bzw. Thromboxan

A2 um. Diese Prostaglandine wiederum üben durch Aktivierung membranständiger G Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) unterschiedliche teils sogar gegensätzliche Funktionen aus (Abb. 3). Innerhalb der Familie der Prostaglandin Rezeptoren sind acht verschiedene Rezeptoren bekannt, die entsprechend ihres bevorzugten Substrates benannt sind. Prostaglandin D2 (PGD2) aktiviert vornehmlich den Prostaglandin-D1-Rezeptor (DP1) oder Prostaglandin-D2-Rezeptor (DP2), Prostaglandin E2 (PGE2) hingegen die vier verschiedenen Prostaglandin-E-Rezeptoren (EP 1-4). Hinzu kommen noch Prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2) sowie Prostacyclin (PGI2) und Thromboxan A2 (TXA2), welche jeweils den Prostaglandin-F2 $\alpha$ - (PGF2R), Prostacyclin-I2- (IP) sowie Thromboxan-A2- (TXA2R) Rezeptor aktivieren. Die Aktivierung der Prostaglandin-Rezeptoren EP1, PGF2R sowie TXA2R führt über eine Gq und PLC Aktivierung zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration, infolgedessen beispielsweise in Gefäßen eine Kontraktion ausgelöst werden kann. Speziell für EP1 und EP3 ist bekannt, dass sie die Konstriktion der Atemwege induzieren <sup>107</sup>. Ferner führt eine Aktivierung des EP3 sowie EP2 über Aktivierung eines Gi Proteins zu einer Inhibierung der cAMP Produktion und/oder gleichzeitig über die PLC zu einer gesteigerten intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration. Demgegenüber führt die Aktivierung der Rezeptoren DP1, EP2, EP4 und IP über Aktivierung eines Gs Proteins zu einer Stimulation der Adenylylcyclase (AC). Hierdurch wird die vermehrte Produktion von cAMP initiiert, wodurch eine Relaxation induziert werden kann. Im Bezug auf die bronchiale Dilatation geht man von einer direkten Aktivierung des EP2 in den glatten Muskelzellen der Atemwege aus <sup>107</sup>.



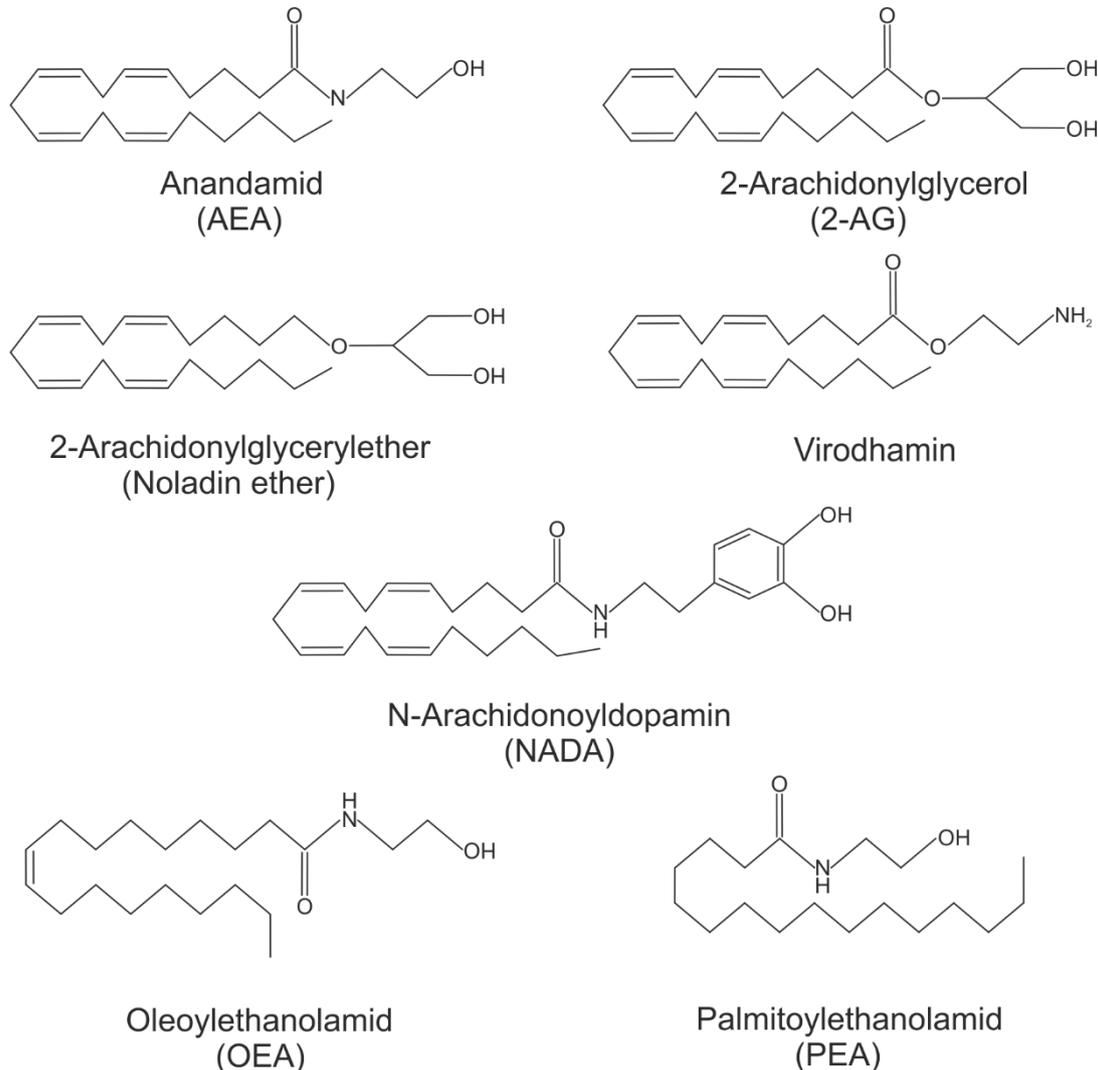
**Abbildung 3: Arachidonsäure Signalweg**

Die Umwandlung von AA zu Leukotrienen, Lipoxinen oder Hydroperoxyeikosatetraensäuren (HPETEs) erfolgt durch Lipoxygenasen (LOX). Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP450) hydrolysieren AA zu Hydroxyeikosatetraensäuren (HETEs) oder Epoxyeicosatriensäuren (EETs). Durch Cyclooxygenasen (COX) wird AA zu Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) umgewandelt, welches das Substrat verschiedener Synthasen darstellt. Die entstehenden Prostaglandine (PGF<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>), Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) oder Thromboxan (TXA<sub>2</sub>) aktivieren jeweils ihre spezifischen Rezeptoren, wodurch intrazellulär Gq, Gs oder Gi Proteine aktiviert werden. Über die Aktivierung eines Gq Proteins kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration, infolgedessen eine Konstriktion in Bronchien oder Gefäßen ausgelöst wird. Die Aktivierung eines Gs Proteins führt hingegen zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration und bewirkt nachfolgend eine Relaxation. Eine Aktivierung der Gi Proteine führt neben einer Senkung der cAMP Konzentration gleichzeitig zu einer Erhöhung der Ca<sup>2+</sup> Konzentration, wodurch ebenfalls eine Kontraktion ausgelöst wird.

### 1.1.7 Struktur und Funktion der Endocannabinoide

Endocannabinoide sind bioaktive lipophile Signalmoleküle, die aus einem ungesättigten Fettsäurerest mit C20-Grundkörper sowie einer über Amid-, Ester- oder Etherbindung verknüpften polaren Kopfgruppe bestehen. Sie gehören zur Klasse der Fettsäureamide (FAAs). Weiterhin können sie der Gruppe hydrophober hormonähnlicher Substanzen, den Eicosanoiden, zugerechnet werden. Ihre Funktion wurde zuerst im Nervensystem untersucht, wobei sich die Signalübertragung deutlich von denen klassischer Neurotransmittersysteme unterscheidet. Normalerweise werden durch Depolarisation der Präsynapse die in Vesikeln gespeicherten Neurotransmitter, wie Glutamat oder Gamma-Amino-Buttersäure (GABA), in den synaptischen Spalt abgegeben, um dann auf das postsynaptische Neuron zu wirken. Die Wirkung der Endocannabinoide verläuft hingegen retrograd. Im Zuge der Depolarisation der Postsynapse werden bei Bedarf Endocannabinoide synthetisiert und freigesetzt, damit sie an CB1 Rezeptoren in der präsynaptischen Membran binden. Durch die Aktivierung von Gi/o-Proteinen werden  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^{+}$ -Kanäle reguliert und die weitere Ausschüttung von Neurotransmittern verhindert. Diese Art der retrograden Wirkungsweise kommt sowohl bei exzitatorischen als auch inhibitorischen Neuronen vor<sup>108</sup>. Wie die Ausschüttung und der Transport der Endocannabinoide genau erfolgt, wird weiterhin intensiv untersucht. Man vermutet, dass Endocannabinoide aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften durch Zellmembranen hindurch diffundieren können<sup>109</sup>. Die beiden wichtigsten Endocannabinoide AEA und 2-AG sind nach heutigem Kenntnisstand bestens untersucht und pharmakologisch charakterisiert<sup>110,111</sup>. AEA ist ein hoch spezifischer partialer Agonist des CB1 Rezeptors ( $\text{K}_i$  61 nM) und zeigt nur schwache Affinität für den CB2 Rezeptor ( $\text{K}_i$  1930 nM). Im Vergleich dazu ist 2-AG ein Vollagonist beider Rezeptoren, allerdings mit moderater bis schwacher Affinität<sup>112–114</sup>. Für AEA konnte die höchste Konzentration im Gehirn, insbesondere im Hippocampus, gemessen werden<sup>67,115,116</sup>. Da jedoch das Basallevel von 2-AG im Gehirn 1000-mal höher ist als das von AEA, wird davon ausgegangen, dass 2-AG der primäre endogene Ligand der Cannabinoidrezeptoren ist<sup>114,117,118</sup>. Neben der Affinität von AEA für den CB1 Rezeptor können auch TRPV1 Rezeptoren aktiviert oder T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch AEA inhibiert werden<sup>119–121</sup>. Weiterhin reguliert AEA die Biosynthese sowie retrograd die physiologische Wirkung von 2-AG, wodurch die essentielle Bedeutung von AEA für die synaptische Transmission deutlich wird<sup>122</sup>. In den letzten Jahren wurden weitere Endocannabinoide wie Noladin ether (2-AGE), O-Arachidonoyl ethanolamid (Virodhamin) und N-arachidonoyl-dopamin (NADA) identifiziert und untersucht<sup>123–125</sup>. Zu den Eicosanoiden

gehören auch zwei weitere Endocannabinoid-ähnliche Substanzen, Palmitoylethanolamid (PEA) und Oleoylethanolamid (OEA) (Abb. 4).



**Abbildung 4: Chemische Strukturformeln verschiedener Eicosanoide**

Anandamid (AEA), 2-Arachidonylglycerol (2-AG), 2-Arachidonylglycerylether (Noladin ether), Virodhamin und N-Arachidonoyldopamin (NADA) sind Arachidonsäure-Derivate mit 20 Kohlenstoffatomen. Bei AEA ist Ethanolamin an das C1-Atom des Arachidonsäure-Grundkörpers gebunden. 2-AG besitzt an seinem C1-Atom als funktionelle Gruppe Glycerol, Noladin ether am C1-Atom Glycerylether. Virodhamin, auch als O-Arachidonylethanolamid bezeichnet, ist wie AEA ein Ethanolamin-Derivat der Arachidonsäure. N-Arachidonoyldopamin (NADA) besitzt Dopamin als funktionelle Gruppe. Oleoylethanolamid (OEA) und Palmitoylethanolamid (PEA) sind Fettsäureamide mit biogenetischer Ähnlichkeit zu den Eicosanoiden, jedoch nur geringer Affinität gegenüber den Cannabinoidrezeptoren.

Ihre Synthese und ihr Abbau erfolgen auf gleiche Weise wie bei AEA <sup>126</sup>, zudem zeigen beide Substanzen vergleichbare cannabimimetische Eigenschaften <sup>127,128</sup>. Aufgrund ihrer sehr geringen Affinität gegenüber beiden Cannabinoidrezeptoren gehören sie aber streng genommen nicht zu den Endocannabinoiden. Möglicherweise beeinflussen sie dennoch über den „*entourage effect*“ das Endocannabinoidsystem. Als „*entourage effect*“ bezeichnet man die synergetische Wirkung verschiedener Cannabinoide aber auch das Zusammenspiel von

Cannabinoiden und Terpenen, wodurch eine höhere Wirksamkeit und Verträglichkeit entstehen. Für PEA ist beispielsweise bekannt, dass es die Rezeptoraffinität erhöht, die endogene AEA Aktivität steigert und/ oder den enzymatischen Abbau von AEA verringert.<sup>127;</sup>  
<sup>129,130</sup>.

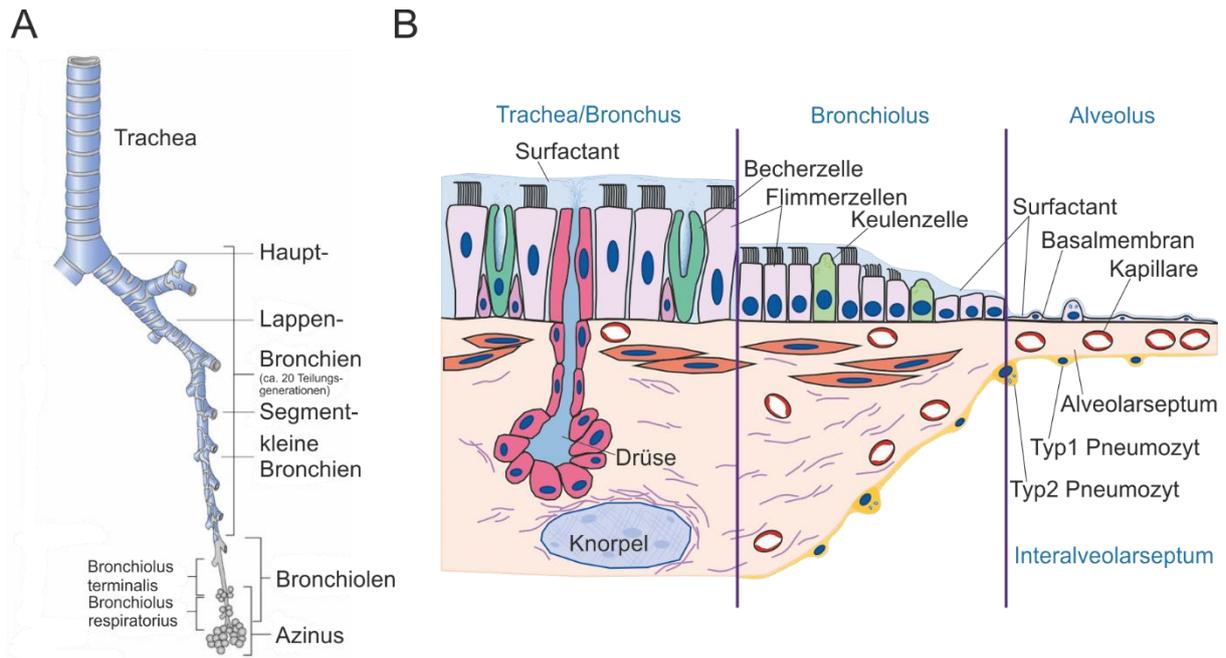
### 1.1.8 Wirkung der Endocannabinoide im Gefäßsystem

Das ECS ist maßgeblich an der Regulation physiologischer Abläufe sowohl im ZNS als auch in der Peripherie beteiligt. Die komplexen kardiovaskulären Effekte von Endocannabinoiden innerhalb verschiedener Spezies wurden eingehend durch Kunos et al. beleuchtet. So erfolgt nach intravenöser Injektion von AEA bei anästhesierten Ratten eine dreiphasige Blutdruckantwort bestehend aus einem vagal vermittelten ersten Blutdruckabfall gefolgt von einem Sympathikus-vermittelten Blutdruckanstieg und letztlich einer Hypotonie. Diese Hypotonie ist CB1 Rezeptor-abhängig, denn durch Verwendung des selektiven CB1 Rezeptor Antagonisten SR14176A konnte der Effekt vollständig inhibiert werden. Ebenso zeigen Experimente mit Cnr1<sup>-/-</sup> Mäusen, dass hier die AEA-vermittelte Hypotonie im Vergleich zu Wildtyp Tieren fehlt<sup>131</sup>. Zahlreiche Untersuchungen an anästhesierten Ratten belegen, dass Cannabinoide stark vasodilatierend auf koronare, zerebrale sowie renale Gefäße wirken<sup>132</sup>. Über welche komplexen Mechanismen die kardiovaskuläre Vasodilatation vermittelt wird, stellte die Arbeitsgruppe um Di Marzo anschaulich dar. Neben einer Aktivierung des Transienter Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie V, Subtyp 1 Rezeptors (TRPV1) auf perivaskulären Neuronen spielen vasodilatatorische Peptide, verschiedene Ca<sup>2+</sup>- und K<sup>+</sup>-Kanäle sowie die Metabolite der AEA Hydrolyse eine entscheidende Rolle<sup>133,134</sup>. Das ECS spielt aber nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Herzschlags und Blutdrucks Gesunder, sondern beeinflusst zudem die Herztätigkeit und das arterielle Gefäßsystem unter pathophysiologischen Bedingungen. So konnte für AEA erstmalig durch Untersuchungen an isolierten pulmonalen Arterien von Patienten mit Lungenkarzinom gezeigt werden, dass AEA nach Vorkontraktion der Gefäße eine konzentrationsabhängige Vasodilatation bewirkt<sup>135</sup>. Ein vergleichbarer AEA Effekt konnte ebenfalls an kontrahierten pulmonalen Arterien der Ratte gezeigt werden. Hier wurde zudem erstmalig festgestellt, dass die Vasodilatation Endothel-abhängig ist<sup>136</sup>. Dass AEA aber nicht nur vasodilatierend, sondern auch vasokonstringierend wirken kann, wurde mittels des Modells der isoliert-perfundierten Lunge (IPL) am Kaninchen nachgewiesen. Sowohl AEA als auch 2-AG führten hier zu einer konzentrationsabhängigen Vasokonstriktion<sup>132</sup>. Ein vergleichbarer konstringierender AEA Effekt konnte nachfolgend auch bei Mäusen nachgewiesen werden. In dieser Studie zeigte sich, dass der AEA/FAAH Signalweg auch eine Schlüsselrolle bei der hypoxischen pulmonalen

Vasokonstriktion spielt. Sowohl in Faah-/- Mäusen als auch in C57BL/6J Tieren, die mit dem FAAH Inhibitor URB597 behandelt wurden, war die Hypoxie-induzierte pulmonale Vasokonstriktion signifikant verringert. Zudem scheint die AEA/FAAH Achse auch bei der Entstehung der Hypoxie-vermittelten pulmonalen Hypertonie eine entscheidene Rolle zu spielen<sup>137</sup>. Diese Studien veranschaulichen, dass AEA im pulmonalen vaskulären System eine (patho)physiologische Rolle spielt. Im Gegensatz dazu fehlen detaillierte Untersuchungen zur Funktion von AEA im respiratorischen System.

### 1.1.9 Lunge und Bronchialsystem

Die Lunge, unser lebenswichtiges Atmungsorgan, dient dazu, Sauerstoff aus der Atemluft aufzunehmen und Kohlendioxid als Endprodukt des Körperstoffwechsels abzugeben. Sie ist unglaublich leistungsstark, pro Tag atmen wir etwa 12.000 Liter Luft. Angelegt als paariges Organ, aufgeteilt in rechte (*Pulmo dexter*) und linke Lunge (*Pulmo sinister*) füllt sie die gesamte Pleurahöhle vollständig aus. Im Gegensatz zum Menschen, bei dem die rechte Lunge in drei Lungenlappen (Ober-, Mittel- und Unterlappen) und die linke Lunge in zwei (Ober- und Unterlappen) aufgeteilt ist, besitzt die Maus vier rechte Lungenlappen und nur einen linken. Der innere Aufbau der Lunge wird durch die Aufzweigungen des Bronchialbaums bestimmt, denen die Lungenarterien folgen. Über die parallel verlaufenden Bronchien und Pulmonalarterien werden die kegelförmigen Lungensegmente versorgt, die durch oberflächliche Bindegewebssepten unvollständig getrennt sind. In ihrer Gesamtheit bilden die Lungensegmente eine funktionelle Einheit deren Abgrenzung makroskopisch nicht sichtbar ist. Der Bronchialbaum (Abb. 5, A) selbst entspringt aus der Trachea auf Höhe des 4. und 5. Brustwirbels und teilt sich in den rechten und linken Hauptbronchus auf. Hieraus verzweigen sich die Lappenbronchien, die sich wiederum in Segmentbronchien aufteilen. Nach weiteren 6 bis 12 Verzweigungsstufen sind die *Bronchioli* bereits knorpelfrei und gehen in die *Bronchioli terminalis* über. Aus diesen gehen die für den Gasaustausch wichtigen alveolentragenden *Bronchioli respiratorii* hervor. Über die Alveolargänge (*Ductus alveolares*) gelangt die Luft letztlich in die Alveolensäckchen (*Sacculi alveolares*), eine Gruppe von Alveolen, in denen der Gasaustausch stattfindet. Insgesamt gehen aus der Verzweigung des Bronchialbaums viele Millionen Alveolen hervor. Nicht nur makroskopisch lässt sich die Lunge in die jeweiligen Gebiete einteilen, sondern auch anhand mikroskopisch sichtbarer Veränderungen innerhalb des respiratorischen Epithels bis hin zum Alveolarepithel (Abb. 5, B).



**Abbildung 5: Anatomie der Atemwege**

A) Das Tracheobronchialsystem zeigt viele Verzweigungen mit abnehmendem Durchmesser. B) Entlang des Bronchialbaums verändert sich auch der mikroskopische Aufbau der Bronchialwand von zentral nach peripher. Die Trachea sowie die Hauptbronchien werden durch hufeisenförmige Knorpelspannen offengehalten. Das mehrreihige hochprismatische Trachealepithel besteht aus Basalzellen, Flimmerzellen und Becherzellen, wobei die Flimmerzellen in die wässrige Hypophase hineinragen und durch Zilienschlag den aufliegenden Schleim rachenwärts transportieren. Der Schleim wird von den Becherzellen sowie seromukösen Drüsen gebildet. Ausgehend vom Musculus trachealis bildet sich luminal des Knorpels die Tunica muscularis, eine kontinuierliche Schicht zirkulär verlaufender glatter Muskulatur. Das zylindrische Epithel besteht aus Flimmerzellen und zilienlosen Keulenzellen (Clara-Zellen), die Becherzellen und neuroendokrinen Drüsen befinden sich in verstreuten Clustern. Die rein luftleitenden Atemwege enden mit den Bronchioli terminales und gehen in die Bronchioli respiratorii und Alveolen über. Die Trennung der Alveolen erfolgt durch kapillarisierte Alveolarepten, die aus einem zentralen Kapillarnetz und umgebendem Bindegewebsgerüst bestehen. Auf der einen Seite befindet sich die Luft-Blut-Schranke bestehend aus Typ-I-Epithelzellen (Typ 1 Pneumozyten), Basalmembran sowie Kapillarendothel. Gegenüberliegend befindet sich zusätzlich das Bindegewebsskelett, weshalb der Diffusionsweg länger ist. Die Oberfläche der Alveolarepten ist von Typ-I-Epithelzellen bedeckt und mit Surfactant benetzt. Eingestreut zwischen den Typ-I-Epithelzellen sitzen Typ-2-Epithelzellen (Typ 2 Pneumozyten), die die Phospholipide und Proteine des Surfactants produzieren. A) <sup>138</sup>; B) verändert nach <sup>139</sup>.

Im Verlauf der Verzweigungsgenerationen der Atemwege wird der Durchmesser der Bronchien immer kleiner und der Anteil stabilisierendes Korpelgewebes nimmt ab. Gleichzeitig kommt es zu einer Zunahme glatter ringförmiger Muskulatur sowie elastischer Fasern. Diese Eigenschaften spielen eine wichtige Rolle bei aktiver und passiver Änderung des Bronchialdurchmessers und damit des Atemwegwiderstands.

## 1.1.10 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronische, anfallsartig auftretende entzündliche Erkrankung der Atemwege, bei der bronchiale Hyperreagibilität und variable Atemwegsobstruktion charakteristisch sind. Bereits vor 2.500 Jahren bezeichnete der griechische Arzt Hippokrates schweres, kurzes Atemholen oder Keuchen als Asthma (ἄσθμα). Laut dem *Global Asthma Report* litten 2020 weltweit 358 Millionen Menschen aller Altersgruppen an Asthma. Damit

zählt Asthma zu einer der häufigsten nicht-übertragbaren Erkrankungen (*Non-communicable diseases, NCD*) und führt jährlich zu etwa 495.000 Todesfällen<sup>140</sup>. In Deutschland leiden etwa 10 % der Kinder sowie 5 % aller Erwachsenen an Asthma, wobei im Kindesalter üblicherweise die allergische Form des Asthmas (extrinsisches Asthma) vorherrscht. Bei Erwachsenen tritt, vornehmlich ab dem 4. Lebensjahrzehnt, die nicht-allergische Form (intrinsisches Asthma) auf. Als Auslöser dieser Asthma Variante gelten unspezifische Reize wie Virus Infekte oder kalte Luft. Zugrunde liegt hierbei eine übermäßige Abwehrreaktion der Immunzellen<sup>141</sup>. Neben einer genetischen Prädisposition begünstigen verschiedenste Umweltfaktoren die Ausbildung von Asthma. Mehr als hundert verschiedene Genveränderungen sind mittlerweile bekannt, die je nach Genkonstellation das Risiko einer Asthma Entstehung erhöhen. Die Ausbildung der Asthmasymptome erfolgt allerdings erst, wenn bestimmte Umweltfaktoren, wie beispielsweise Pollen, Hausstaubmilben, Tierhaare aber auch Pilze oder chemische Gase einwirken. Als Frühreaktion auf die Exposition gegenüber einem Antigen kommt es bei allergischem Asthma zur verstärkten Bildung von Immunglobulin E (IgE). Nachfolgend tritt die allergische Spätreaktion mit den Asthma-typischen Beschwerden auf. Bei nicht-allergischem Asthma treten die typischen Beschwerden ohne vorangegangene Bildung von IgE auf. Die typische Entzündungs- und Abwehrbereitschaft der unteren Atemwege wird bereits durch harmlose Reize getriggert und führt zur krampfartigen Verengung der Bronchien und Bronchiolen. Hinzu kommt eine massive Schwellung der Bronchialwände durch verstärkte Durchblutung des entzündeten Gewebes sowie übermäßige Produktion zähen Schleims. Der verringerte Durchmesser der Bronchien (Obstruktion) behindert die freie Strömung der Luft beim Ein- und vor allem beim Ausatmen, wodurch die Atemmuskulatur stark beansprucht wird. Zudem verbleibt bei jedem Atemzug ein Teil der Ausatemluft in der Lunge, wodurch sich die Lungenbläschen bei jedem erneuten Atemzug etwas mehr mit Luft füllen und überdehnt werden (Lungenemphysem). Es treten die typischen Symptome wie pfeifende/brummende Atemgeräusche, trockener Husten, starkes Engegefühl in der Brust und Atemnot auf. Zur Diagnosestellung des Asthmas erfolgt eine körperliche Untersuchung mit umfangreicher Lungenfunktionsprüfung, bestehend aus Peak-Flow Messung und Spirometrie, einschließlich bronchialem Provokationstest mittels steigender Konzentration von Methacholin oder Histamin. Trotz intensiver Forschung sind die genauen Mechanismen der Krankheitsentstehung weiterhin unbekannt. Dennoch sind mittlerweile bis zu 100 verschiedene Botenstoffe identifiziert worden, die eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Asthma bronchiale spielen. Dazu zählt unter anderem Interleukin 4 (IL-4), welches vorwiegend von TH2-Zellen und Mastzellen produziert wird und die Differenzierung naiver T-Zellen zu TH2-Zellen

induziert<sup>142</sup>. Interleukin 13 (IL-13), ebenfalls ein Mediator der humoralen Immunantwort steht im Verdacht, allergische Reaktionen und insbesondere Asthma auszulösen. Die Produktion erfolgt ebenfalls durch TH2-Zellen und stimuliert die Differenzierung von B-Lymphozyten, wobei gleichzeitig die Aktivierung von Makrophagen inhibiert wird<sup>143</sup>. Etwa 83% aller Patienten mit schwerem Asthma leiden unter der sogenannten Typ-2-Entzündung, deren Schlüsselmediatoren IL-4 und IL-13 sind<sup>144–146</sup>. Neben der klassischen Behandlung von Asthma mittels kurzwirkender und langwirkender beta2 Sympathomimetika (SABA und LABA) in Kombination mit antientzündlich wirkenden inhalativen Cortisonpräparaten (ICS) gewinnen Medikamente an Bedeutung, deren Wirkmechanismus speziell auf die entzündungsfördernden Botenstoffe abgestimmt ist. Hierzu zählen spezielle Antikörperpräparate wie Dupilumab (IL-4/IL-13), Omalizumab (IgE) oder Mepolizumab (IL-5). Diese anti-IgE-Antikörperpräparate stellen für Patienten mit schwerer, persistierender Form des Asthma bronchiale, deren Ansprechen auf die übliche inhalative Glucocorticoid-Therapie ungenügend ist, eine wertvolle Alternative dar. Ihre Wirkung beruht darauf, dass frei zirkulierende IgE-Moleküle komplexiert werden und die Bindung an IgE-Rezeptoren auf Mastzellen verhindert wird<sup>141,147,148</sup>. Allerdings können alle genannten Präparate zu schweren Nebenwirkungen führen, da ihre Wirkung oftmals nicht lokal auf die Lunge begrenzt ist. Inhalative Glucocorticoide können beispielsweise den adrenergen Regelkreis, die Haut oder die Anzahl hämatologischer Zellen beeinflussen. Darüber hinaus stimulieren Corticoide die osteoklastäre Knochenresorption und hemmen gleichzeitig die osteoblastäre Knochenneubildung, wodurch es zur steroid-induzierten Osteoporose kommt.<sup>149–152</sup> Auch bei der Anwendung der oben beschriebenen Antikörperpräparate kann es beispielsweise zu Nebenwirkungen wie Konjunktivitis, oralem Herpes, Eosinophilie oder der Serumkrankheit kommen<sup>153–155</sup>. Neben Patienten, bei denen hauptsächlich die Entzündung als Ursache für die Hyperreagibilität angenommen wird, gibt es aber auch Patienten mit schwerem Asthma, bei denen eine starke Hyperreagibilität des Bronchialsystems auftritt, ohne dass dies vordergründig einer Entzündung zugeschrieben werden kann. Durch Corticosteroide lässt sich diese Form des Asthmas oft nicht gut kontrollieren<sup>156</sup>. So zeigen Studien, bei denen sowohl Atemwegshyperreagibilität wie auch das Auftreten von Entzündungszellen untersucht wurde, dass die Atemwegshyperreagibilität auch ohne Nachweis von Entzündungszellen im bronchialen Lumen oder der Mukosa auftrat<sup>157</sup>. Der Einfluss der verschiedenen Zelltypen, die bei allergisch-bedingter Entzündung des Bronchialgewebes vermehrt auftreten, ist größtenteils noch unklar. Eine Studie weist beispielsweise darauf hin, dass Atemwegshyperreagibilität und übermäßige Schleimproduktion mit dem Auftreten von TH2-Zellen aber nicht mit den

eosinophilen Granulozyten korreliert <sup>158</sup>. Durch die übermäßige bronchiale Hyperreaktivität kommt es bereits als Reaktion auf geringe, unspezifische Reize zu einer pathologischen Verengung der Atemwege (Obstruktion). Als Leitsymptom ist die Atemwegsobstruktion entscheidend für den Krankheitsverlauf, sodass eine medikamentöse Therapie vorzugsweise die Obstruktion reduzieren sollte. Standardmäßig werden zur Verminderung der bronchialen Hyperreagibilität inhalativ  $\beta$ -2-Agonisten eingesetzt, die allerdings bei einigen Patienten nur unzureichend Wirkung zeigen. Einen vielversprechenden Ansatz könnte in diesem Zusammenhang das Endocannabinoidsystem bieten. Einige Studien legen nahe, dass AEA den Kontraktionszustand der Bronchialmuskulatur beeinflussen kann. Bei Ratten und Meerschweinchen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass AEA den Husten und die Bronchienverengung nach Capsaizin-Provokation effektiv verhindert. Allerdings tritt der gegenteilige Effekt auf, sobald der verengende Einfluss des Vagusnervs ausgeschaltet wird. Beide Effekte ließen sich als CB1-Rezeptor-vermittelt identifizieren <sup>159,160</sup>.

### 1.2 Zielsetzung

Das Endocannabinoidsystem (ECS) ist von enormer physiologischer Bedeutung, da es sowohl im ZNS als auch anderen Organen in zahlreiche Stoffwechselfvorgänge regulatorisch eingreift. Für AEA konnte bereits gezeigt werden, dass es vasodilatatorisch auf pulmonale Gefäße wirkt. Weiterhin verhindert eine erhöhte AEA Konzentration die Entstehung pulmonaler Hypertonie unter hypoxischen Bedingungen <sup>137</sup>. Während eine (patho)physiologische Rolle des Endocannabinoids AEA im pulmonalen vaskulären System bereits gezeigt werden konnte, ist seine Wirkung auf die Tonusregulation der Atemwege nur unzureichend untersucht. Aufgrund der begrenzten Datenlage herrscht innerhalb der Forschungsgemeinschaft Uneinigkeit darüber, ob AEA bronchokonstringierend oder bronchodilatierend wirkt. Entsprechend sind hier eingehendere Untersuchungen zwingend notwendig. Aus dieser Kontroverse heraus ergab sich das Ziel dieser Arbeit, die physiologische und potentiell pathophysiologische Wirkung des AEA auf den Bronchialtonus im gesunden als auch murinen Asthma Modell eingehend zu untersuchen. Hauptaugenmerk lag hierbei darauf herauszufinden, ob AEA in der Lage ist, den Bronchialtonus zu beeinflussen und über welche Rezeptoren, Enzyme sowie Metabolite die intrazelluläre Signalweiterleitung erfolgt. Darüber hinaus sollte analysiert werden, welche Zelltypen der Atemwege an der AEA-induzierten Tonusregulation beteiligt sind. Hierfür wurden Faah<sup>-/-</sup>, Cnr1<sup>-/-</sup>/Cnr2<sup>-/-</sup> Doppelknockout und Balb/c Mäuse für *ex vivo* und *in vivo* Untersuchungen sowie humane glatte Muskelzellen der Atemwege und tracheale Epithelzellen für *in vitro* Versuche verwendet.

## **Einleitung**

---

Die gewonnenen Erkenntnisse könnten einen entscheidenden Beitrag dazu leisten, die molekularen Mechanismen von AEA in der Lunge besser zu verstehen und neue vielversprechende Angriffspunkte zur Behandlung des Asthma bronchiale zu identifizieren. Ebenso könnten die Ergebnisse den Grundstein dafür legen, die Entwicklung einer auf körpereigenen Stoffen basierenden Behandlung voranzutreiben.

## 2 Material

### 2.1 Software

**Tabelle 1**

Bezeichnung	Lieferant/Hersteller
Axiovision Release 4.8	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
BioRad CFX Manager 3.1	BioRad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
Citavi 6.4	Swiss Academic Software GmbH (Wädenswil, Schweiz)
Clone manager 9	Sci Ed Software LLC (Westminster, USA)
Corel Draw 2020	Corel Corporation (München, Deutschland)
flexiWare 7 und 8	Scireq (Montreal, Canada)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software (La Jolla, USA)
LabChart 7	ADInstruments (Oxford, Vereinigtes Königreich)
Microsoft Office 365	Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland)
Robotics 4	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Rotorgene-Q Series Software 1.7	Qiagen (Hilden, Deutschland)

### 2.2 Geräte

**Tabelle 2**

Bezeichnung	Lieferant/Hersteller
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
CO2-Inkubator Hera Cell 240i	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Cryotom CM3050S	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Druckkatheter Millar 1F (1/3 mm) SPR-1000	Millar (Houston, USA)
DUMONT - Pinzette	Plano GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Durchlichtmikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Elektrophorese-Netzteil PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
Feinwaage XS205	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
FireWire Kamera PixeLink PL-A662	Pixelink (Ottawa, Kanada)
FlexiVent®	Scireq (Montreal, Canada)
FlexiVent® Verneblungsbox Expo MS	Scireq (Montreal, Canada)
Gefrierschränke (-20°C, -80°C)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Geldokumentationssystem Intas GelStick	Intas (Göttingen, Deutschland)
Gelkammern für Elektrophorese (Mini-PROTEAN Tetra System)	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
Gewebeeinbettautomat Microm STP-120	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Gewebeeinbettstation Microm EC350-1	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Halogen-Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott AG (Mainz, Deutschland)
Heizhaube (Rotor Disc® Heat Sealer)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Horizontalschüttler	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)
Irisschere (rostfreier Stahl)	Plano GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Kathetersystem Millar Aria 1	Millar (Houston, USA)

## Material

Kühlbrutschrank Heratherm	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Kühlschränke (4°C)	Liebherr (Biberach an der Riss, Deutschland)
Laborzentrifuge Rotanta 460R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Lochzange (Ø 2 mm)	ZOONLAB GmbH (Castrop-Rauxel, Deutschland)
Magnetheizrührer	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Myograph 620M	Danish Myo Technology A/S (Hinnerup, Dänemark)
Mikrofluidik-Plattform Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikroskop Observer Z1 mit Apotome	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikrotiterplatten-Lesegerät iSpark	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite® 200 PRO	Tecan (Männedorf, Schweiz)
MiniVent Ventilator Model 845	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten, Deutschland)
Multipipette E3	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Multipipette Reference 2	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Operationsmikroskop Leica M651 MSD	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Paraffinstrecktisch HI1220	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Paraffin-Streckbad	Lauda-GFL (Burgwedel, Deutschland)
PCR Gerät Thermocycler Professional Trio	Biometra (Göttingen, Deutschland)
pH-Meter 765	Knick (Berlin, Deutschland)
Pipetten Pipetman	Gilson (Limburg, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe Pipetboy Pro	Integra Biosciences GmbH (Biebertal, Deutschland)
Pipettierhilfe Pipetboy2	Integra Biosciences GmbH (Biebertal, Deutschland)
Pipettierroboter Corbett CAS-1200	Qiagen (Hilden, Deutschland)
PowerLab 16/30	ADInstruments Ltd (Oxford, Vereinigtes Königreich)
Reagenzglas-Vortex-Schüttler	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Reagenzglasschüttler Vortex-Genie2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Realtime PCR Corbett Rotor-Gene 6000	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Schlittenmikrotom SM2000R	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Spektralphotometer Nanodrop ND-1000	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Stereolupe Wild M3	Wild Heerbugg (Gais, Schweiz)
Sterilbänke Hera Safe u. Hera Safe KS	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Stickstofftank	Tec-lab GmbH (Tausnusstein, Deutschland)
Thermoblock (Heiz-/Kühlfunktion) CH-100	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Thermomixer HLC (MKR13, MKR23)	Ditabis (Pforzheim, Deutschland)
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge 5702 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge 5425	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge 5424 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
TissueLyser LT	Qiagen (Hilden, Deutschland)

Ultraschallbad	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Ultraschall Vernebler Multisonic LS 290	Flores Medical (Probstzella, Deutschland)
VANNA´s Mikroschere	Plano GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Vakuumpumpe mit Filter	Vacuubrand (Wertheim, Deutschland)
Vaporiser Vapor 19.3 (Isofluran)	Drägerwerk AG & Co. KGaA (Lübeck, Deutschland)
Vibratom VT1200S	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Wippe Duomax 1030	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Zentrifuge VWR Mini Star	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Zytozentrifuge Cellspin® I	Tharmac GmbH (Wiesbaden, Deutschland)
Zählkammer, Neubauer	VWR (Darmstadt, Deutschland)

## 2.3 Chemikalien

Tabelle 3

Bezeichnung	Art. Nr.	Lieferant/Hersteller
1-Bromo-3-chloropropane	B9673	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
2-Mercaptoethanol	M3148	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
2-Propanol	A0900	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
17-Octadecynoic Acid (ODYA)	90270	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Aceton	CP40.3	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Acetyl-β-methylcholine chlorid (Methacholin; MCh)	A2251	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Agarose LE	6351.5	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose Standard	3810.3	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
AH6809 (AH)	14050	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Albumin from chicken egg	A5503	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ampuwa	B315475	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Anandamid	1339/S	Tocris by Bio-Techne GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
Anandamid in Tocrisolve	101710	Tocris by Bio-Techne GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
Arachidonsäure	90010	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Aqua Poly/Mount	18606	Polysciences Europe GmbH (Hirschberg an der Bergstrasse, Deutschland)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	C4901	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Cay10441 (CAY)	10005186	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)

## Material

CP-55,940	C1112	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	11873580001	Roche Deutschland Holding GmbH (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
D-(+)-Glucose	G7021	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D4540	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DNA-Leiter GeneRuler Express DNA Ladder, gebrauchsfertig	SM1553	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DNA-Leiter GeneRuler, gebrauchsfertig	SM0333	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Entellan®	107961	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Eosin G-Lösung 0,5 %, wässrig	X883.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Eserserum	017-000-121	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Ethanol 70 % v/v	27669	Otto Fischar GmbH & Co. KG (Saarbrücken, Deutschland)
Ethanol absolut für Molekularbiologie	A3678	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromidlösung 1 %	E1510	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	E4884	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Formaldehyd 3,7-4,0%	252931-1214	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Forskolin	F6886	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Gelatine	G2500	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Gelatine	G1890	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glycerol	49767	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glycin	G8898	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hämalaun Sauer nach Mayer	T865.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylinlösung A nach Weigert	X906.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	3029843	ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)
Hepes	H3375	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hoechst 33342, 1 mg/ml	B2261	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

IBMX	I5879	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Imject Alum Adjuvant	77161	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Indometacin	70270	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Invitrogen™ TE-Puffer	12090015	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Isofluran (Forene®)		Abbott GmbH & Co. KG (Wiesbaden, Deutschland)
Isopropanol	9866.5	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%	4976844	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	P9333	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L161,982 (L)	10011565	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	M8266	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
MorDiff-Quick Schnellfärbe Kit	15589.00250	MORPHISTO GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	3957.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	S7907	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	S8045	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Nordihydroguaiaretic Acid (NDGA)	70300	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Paraformaldehyd (PFA)	P6148	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Pierce™ BCA™ Protein-Assay		Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PTFE Paste	C50875	ÄRONIX Spezialschmierstoffe (Walldorf, Deutschland)
(R)-(+)-Methanandamid	1121	Tocris by Bio-Techne GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
RNAlater stabilization solution	AM7024	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RNAse Zap	R2020	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Roti-Histofix 4%	P087.5	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Serotonin Hydrochlorid (5-HT)	8367.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
TissueTek® O.C.T.™ Compound	4583	Sakura Finetek Germany GmbH (Staufen, Deutschland)
Tocrisolve	1684	Tocris by Bio-Techne GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)

## Material

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)	T5941	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA))
Triton X-100	T8787	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
TRIzol®	15596-018	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	P9416	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tween 80	P4780	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
UltraPure DNase/RNase freies Wasser	12060346	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
URB597	10046	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Xylol	251769.2714	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

## 2.4 Narkose- und Schmerzmittel

**Tabelle 4**

Bezeichnung	Wirkstoffgehalt	Hersteller
Fentanyl	0,1 mg/ 2 ml	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Ketamin	100 mg/ml	Covetrus DE GmbH (Hamburg, Deutschland)
Medetomidin (Cepetor)	1 mg/ml	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH (Burgdorf, Deutschland)
Midazolam	5 mg/ 5 ml	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Vecuronium Inresa	10 mg	Inresa Arzneimittel GmbH (Freiburg, Deutschland)
Xylazin	2%	Alvetra GmbH (Neumünster, Deutschland)

## 2.5 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 5**

Bezeichnung	Lieferant/Hersteller
Allzweckspritze BD Plastipak™ ohne Nadel	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Axygen® 0.2 ml Polypropylene PCR Gefäßstreifen, 8er-Streifen, flache Kappe	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
Axygen® 0.5 ml Thin Wall PCR Gefäße, flache Kappe	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
BD Discardit™ II Spritze, 2 ml	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
BD Discardit™ 2-teilige Einmalspritze (LUER), 20 ml	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)

BD Microlance 3™ Kanüle Nr.1 (20Gx11/2)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
BD Microlance 3™ Kanüle Nr.17 (24Gx1)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
BD Microlance 3™ Kanüle (27Gx1/2)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
BD Plastipak™ Insulinspritze mit Kanüle	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
BD Plastipak-Spritzen mit Luer-Lok-Ansatz, 5 ml	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Cellstar® Zellkulturschalen 60/15MM	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Combitips advanced® 0,5 ml, 1 ml, 5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Conductive Filter tips, 50 µl	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Conductive Robotic Barrier Filter tips, 200 µl	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG (Wasserburg, Deutschland)
Corning® Thermowell™ GOLD 0.2 ml Polypropylene PCR Tubes with Flat Cap	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
Cryoröhrchen 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Cytoträger Tharmac®, beschichtet	Tharmac GmbH (Wiesbaden, Deutschland)
Cytoträger Tharmac® Filterkarten	Tharmac GmbH (Wiesbaden, Deutschland)
Deckgläser, rechteckig (24x50 mm)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Deckgläser, rund (12 mm)	Labomedic GmbH (Bonn, Deutschland)
Deckgläser, rund (30 mm)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Einmalkanülen Henke-Ject® (0,7x25 mm, 22G)	Henke Sass Wolf GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Hard-Shell® 96-Well PCR Plates	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
HistoBond® adhäsive Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG (Lauda Königshofen, Deutschland)
Immersionsöl Immersol™ 518F	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Insulinspritzen Omnican® U-40	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Leukosilk®	BSN medical GmbH (Hamburg, Deutschland)
Medikamentenbecher Multisonic LS 290	Flores Medical GmbH (Probstzella, Deutschland)
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film, adhesive, optical	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
Minutiennadeln	Plano GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Mikrotomklingen C35	Pfm medical ag (Köln, Deutschland)
Mikrotomklingen R35	Pfm medical ag (Köln, Deutschland)
Objektträger StarFrost® unbeschichtet	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH (Braunschweig, Deutschland)
Omnifix Solo 20 ml, Luer-Lock-Ansatz, zentrisch	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Parafilm M	Bemis Company Inc. (Oshkosh, USA)
Pasteurpipetten Plastik, 3 ml	VWR (Darmstadt, Deutschland)

## Material

Pasteurpipetten Plastik, 1 ml	VWR (Darmstadt, Deutschland)
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0.2 ml, flache Kappe	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Perfusionsbesteck Surflo 21G grün, Größe 0,8 mm	Terumo Deutschland GmbH (Eschborn, Deutschland)
Petrischale, rund (60x150 mm)	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen (1, 20, 200, 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen m. Filter (10, 100, 200, 1250 µl)	Nerbe Plus (Winsen/Luhe, Deutschland)
Polyethylen-Schlauch BD Intramedic™ (0.0023x0.0038“)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Rasierklingen Rotbart extra dünn	Procter & Gamble Germany GmbH & Co Operations oHG (Schwalbach am Taunus, Deutschland)
Reagiergefäße, 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reagiergefäße, 1,5 ml mit SafeLock	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reagiergefäße, 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reagiergefäße, 2 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Rotor-Disc 100 (30)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Rotor-Disc Heat Sealing Film (60)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Rundpapierfilter GE Healthcare Grad 595 ½ (Ø 15 mm)	GE Healthcare Life Science (Freiburg, Deutschland)
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Sicherheitsverweilkatheter BD Saf-T Intima™ mit Y-Anschluss	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Stainless Steel Beads, 7 mm	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Tissue-Tek® Mega-Cassette™	Sakura Finetek Germany GmbH (Staufen, Deutschland)
Vasofix Safety Braunüle 22 G, 0,9 mm	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Whatman® Linsenreinigungstücher 105 (100x150 mm)	GE Healthcare Life Science (Freiburg, Deutschland)
Zellkulturplatte Falcon® Easy-Grip 35 mm	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
Zellkulturplatte Falcon®, 6 Well	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
Zellkulturplatte Falcon®, 24 Well	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
Zellkulturflasche Falcon®, 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen Falcon™, konisch 15 u. 50 ml	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)

## 2.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 6

Puffer	Zusammensetzung
PSS	118 mM NaCl 5 mM KCl 1,2 mM MgCl <sup>2</sup> 1,6 mM CaCl <sup>2</sup> 1,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sup>4</sup> 24 mM Hepes 10 mM D-Glukose in Aqua Dest. pH 7,4
PSS low Calcium	118 mM NaCl 5 mM KCl 1,2 mM MgCl <sup>2</sup> 0,16 mM CaCl <sup>2</sup> 1,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sup>4</sup> 24 mM Hepes 10 mM D-Glukose in Aqua Dest. pH 7,4
TAE-Puffer (50x)	40 mM Tris Base (242g) 20 mM Eisessig (57,1 ml) 1 mM EDTA (100 ml) 1 L Aqua Dest pH 7,6
RIPA-Puffer	2 mM EDTA 150 mM NaCl 25 mM Tris-HCl 10 % Glycerol 0,1 % Natriumdeoxycholat 1 % Nonidet P40 0,1 % SDS pH 7,5

## 2.7 DNA-Polymerase Mastermix

Tabelle 7

Bezeichnung	Lieferant/Hersteller
FIREPol® Master Mix	Solis BioDyne OÜ (Tartu, Estland)

**2.8 Kits**

**Tabelle 8**

Bezeichnung	Artikelnummer	Lieferant/Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	5067-1511	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
Agilent RNA 6000 Pico Kit	5067-1513	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
Direct cAMP ELISA Kit	ADI-900-066	Enzo Life Sciences GmbH (Lörrach, Deutschland)
Direct-zol™ RNA MiniPrep	R2051	Zymo Research Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)
Fatty Acid Amide Hydrolase Activity Assay Kit (Fluorometric)	ab252895	Abcam plc. (Cambridge, England)
Genra Puregene Tissue Kit	158622	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Pierce™ BCA™ Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Prostaglandin E <sub>2</sub> ELISA Kit-Monoclonal	514010	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
QuantiTect® SYBR Green PCR Kit	204074	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Superscript VILO cDNA Kit	1174-050	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

**2.9 Antikörper**

**Tabelle 9: Primärantikörper**

Bezeichnung	Lieferant/Hersteller
Fatty Acid Amide Hydrolase Polyclonal Antibody	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Anti- $\alpha$ -Smooth Muscle Actin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

**Tabelle 10: Sekundärantikörper**

Bezeichnung	Lieferant/Hersteller
Cy™3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, USA)
Cy™5-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, USA)

## 2.10 Zellkultur

### 2.10.1 Zellkulturbedarf

Tabelle 11

Bezeichnung	Artikelnummer	Lieferant/Hersteller
Airway epithelial cell growth medium (ACGM)	2030701	Provitro AG (Berlin, Deutschland)
Gibco™ Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	41965039	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gibco™ Dulbecco´s Phosphate-bufferd saline (DPBS) without Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	14190094	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
FBS (fetal bovine serum) Premium, heat inactivated	P30-1902	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Gibco™ MEM Non- essential Amino acids solution	11140-035	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gibco™ Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	15140122	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Accutase™ Cell detachment solution	SCR005	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Trypsin/EDTA 0,05 %, Phenolrot	25300-054	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

### 2.10.2 Zellkulturmedien

Tabelle 12

Bezeichnung	Verwendungszweck	Zusammensetzung
10 % DMEM	Kultivierung von humanen Muskelzellen der Atemwege (hASMC)	10 % FBS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,1 mM NEAA
Airway epithelial cell growth medium (ACGM)	Kultivierung von humanen trachealen Epithelzellen (hTEPC)	2000701 ACGM basal 2380701 Supplement 1 2380702 Supplement 2 2380703 Supplement 3
Einfriermedium für humane Zellen	Kryokonservierung von hTEPC/hASMC	20% DMSO (v/v) in FBS

## 2.11 Primer

### 2.11.1 Primer für realtime PCR

**Tabelle 13**

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
18S-rRNA-Primer (murin) Mm_RN18s_2_SG QuantiTect primer Assay	QT01036875	Qiagen (Hilden, Deutschland)
ABHD-Primer Mm_Abhd4_1_SG QuantiTect primer Assay	QT00112917	
CNR1-Primer Mm_Cnr1_1_SG QuantiTect primer Assay	QT00115395	
CNR2-Primer Mm_Cnr2_1_SG QuantiTect primer Assay	QT00159558	
FAAH-Primer Mm_Faah_1_SG QuantiTect primer Assay	QT00149520	
GDE-Primer Mm_Gde1_1_SG QuantiTect primer Assay	QT00160552	
NAPE-Primer Mm_Napepld_1_SG QuantiTect primer Assay	QT00141729	
PTPN-Primer Mm_Ptpn8_1_SG QuantiTect primer Assay	QT00103943	

### 2.11.2 Primer für PCR

Alle Primer, die in der nachfolgenden Tabelle dargestellt sind, wurden mit Hilfe von Clone manager designt und über Invitrogen bestellt.

**Tabelle 14**

Bezeichnung	Primer forward (5'→3')	Primer reverse (5'→3')	Annealing [°C]	Fragmentgröße [bp]
Murin Cnr1	TCGCTGCCTCTACCTTCTCC	TAGGCCAGGCTCAACGTGAC	60	346
Murin Cnr2	AGGACAAGGCTCCACAAGAC	GCTGCTGATGAACAGGTACG	60	319
Murin Faah	CTCTGGGTTTAGGACCTGAC	GAGTGGGACTGGTGTAGTTG	60	327
Murin Gapdh	GTGTTCCCTACCCCAATGTG	CTTGCTCAGTGCCTTGCTG	60	345
Human GAPDH	CCATCACTGCCACCCAGAAG	CCACCACCCTGTTGCTGTAC	60	438
Murin Ptgir (IPR)	CCAGTCTCATGGCCCTGTTG	CACCCAGCTCCCTTCCTTAG	60	473
Murin Ptger1 (EP1)	CCTCGTCTGCCTCATCCATC	GAAACCACTGTGCCGGGAAC	60	410
Human PTGER2 (EP2)	TTGTTCCACGTGCTGGTGAC	AGGATGGCAAAGACCCAAGG	60	758
Murin Ptger 2 (EP2)	GAAGAAGCCGCTGCGGATTG	ACTGGCACTGGACTGGGTAG	60	368
Murin Ptger 3 (EP3)	CTTCGCTGAACCAGATCTTG	CTTCACAGGAACCAGCTAAC	58	367 278
Human PTGER4 (EP4)	GATGAACGGCCTCAGGTCAG	CTCAGGCCTCAGATGTTTCAGG	59	479
Murin Ptger4 (EP4)	GATGAACGGCCTCAGGTCAG	CTCAGGCCTCAGATGTTTCAGG	59	479

## 2.12 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung der Tierschutzrichtlinien des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV) durchgeführt.

Neben C57BL/6J (JAX Stock #000664) und Balb/cAnNRj Mäusen wurden Cnr1-/-/Cnr2-/- Doppelknockout, sowie Faah-/- Knockout im Alter von 8 - 12 Wochen verwendet.

C57BL/6J Mäuse wurden käuflich bei Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) erworben. Es handelt sich um eine in der Forschung häufig genutzte Inzuchtlinie, bei der alle Mäuse genetisch identisch sind<sup>161</sup>. Balb/cAnNRj (Balb/c) Mäuse wurden bei Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) gekauft. Sie werden vornehmlich als klassisches Mausmodell zur Untersuchung von Asthma und COPD verwendet. Entwickelt und etabliert wurde das Mausmodell zur Untersuchung von Asthma von Vanoirbeek et al.<sup>162</sup>.

Die Cnr1-/-/Cnr2-/- Doppelknockout sowie Faah-/- Knockout Mäuse wurden uns freundlicherweise vom Institut für molekulare Psychiatrie des Universitätsklinikum Bonn zur Verfügung gestellt. Mäuse beider Linien sind gesund, fertil und weisen dieselbe Größe sowie ein vergleichbares Gewicht gegenüber Wildtyp Tieren auf<sup>89,163</sup>.

Zur Überprüfung des korrekten Genotyps beider Mauslinien wurden Gewebeproben verwendet, die im Zuge der Tiermarkierung mittels Ohrlochung anfielen. Die Isolation und Aufarbeitung der DNA erfolgte mit dem Genra Puregene Tissue Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland).

Die Haltung der Mäuse erfolgte in einem Tierstall mit 12h Hell-Dunkel Rhythmus bei einer Luftfeuchtigkeit von 45 – 65% und einer Temperatur zwischen 20 – 24 °C. Die Mäuse wurden in Gruppen zu maximal 5 Tieren in individuell ventilierten Käfigen (*individual ventilated cages, IVC*) unter keimarmen Bedingungen gehalten, wobei der Zugang zu Futter und Wasser jederzeit möglich war. Als Nestbaumaterial erhielten die Tiere Watte.

### 3 Methoden

#### 3.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene humane Zelllinien verwendet. Humane glatte Muskelzellen der Atemwege (hASMC) wurden zum einen käuflich von der Firma Provitro (Provitro AG, Berlin, Deutschland) erworben sowie uns freundlicherweise von Professor Ian Hall, Medical School of the Queen's Medical Centre in Nottingham, zur Verfügung gestellt. Unter Einhaltung der ethischen Vorgaben (EC00/165) wurden die Zellen mittels enzymatischem Kollagenase-Verdau aus zuvor chirurgisch entnommenem Bronchialgewebe vier verschiedener Patienten, ohne Hinweis auf asthmatische Erkrankung, gewonnen<sup>164,165</sup>. Die humanen trachealen Epithelzellen (hTEPC) sowie humane Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) wurden ebenfalls käuflich bei der Firma Provitro (Provitro AG, Berlin, Deutschland, Bestell.-Nr. 1210713) erworben und nach Herstellerangaben auf 25 cm<sup>3</sup> Zellkulturflaschen in supplementiertem Epithelzellmedium kultiviert.

##### 3.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Für die Kultivierung der hASMC wurden 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 15 ml DMEM Zellkulturmedium (Zusammensetzung, Kapitel 2.10.2) verwendet. Die Kultivierung der hTEPC und HUVEC erfolgte auf 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen in speziellem Epithelzellmedium der Firma Provitro (Zusammensetzung, Kapitel 2.10.2). Im Inkubator betrug Temperatur und Luftfeuchtigkeit konstant 37°C und 95%, der CO<sub>2</sub>-Gehalt lag bei 5%. Bei einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen passagiert.

##### 3.1.2 Passage der Zelllinien

Die Passage der Zelllinien erfolgte ab einer Konfluenz von 90%. Zuerst wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml DPBS gewaschen. Nach Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA Lösung (hASMC) bzw. 1,5 ml STEMCELL™ Accutase detachment solution (hTEPC, HUVEC) erfolgte die Inkubation der Zellen im Inkubator bei 37°C für 5 bis 10 min. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml frischem Medium gründlich resuspendiert. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der resuspendierten Zellsuspension auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen und die Zellen gezählt. Zur weiteren Kultivierung wurde die Zellsuspension aufgeteilt und auf die entsprechende Anzahl 75 cm<sup>2</sup> oder 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verteilt. Für weiterführende Versuche wurden die Zellen auf 6 Well- (1x10<sup>5</sup>) oder 24 Well- (2x10<sup>4</sup>) Zellkulturplatten mit 0,1% Gelatine (in DPBS) beschichteten Deckgläschen ausgesät.

### 3.1.3 Lentivirale Transduktion der HUVEC

Die humanen Endothelzellen der Nabelschnurvenen wurden mit einer Dichte von 20000 Zellen/Well auf Gelatine-beschichtete Deckgläschen ausgesät und nach 24h mit einem shFAAH Lentivirus (MOI 2.5, TL313109V) der Firma Amsbio (Abingdon, England) für 72h transduziert, um die FAAH herunterzuregulieren. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HUVEC sowie HUVEC, die mit einem Kontroll-shRNA Lentivirus transduziert wurden, verwendet. Nach der Transduktion wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch gefärbt.

### 3.1.4 Kryokonservierung von Zelllinien

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte in der Gasphase (-172°C) des Stickstofftanks.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden in 500 µl Medium und 500 µl gekühltem Einfriermedium, bestehend aus 20% DMSO in FBS, resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension in entsprechende Kryoröhrchen pipettiert und diese in einem mit Isopropanol gefüllten Nalgene® Mr. Frosty™ Gefrierbehälter bei -80°C eingefroren. Nach 2 Tagen wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 RNA Isolation aus Zellen und Gewebe

Zur Isolation von RNA sowohl aus Zellen als auch aus Mausgewebe wurde das Direct-zol™ RNA Miniprep Kit der Firma Zymo Research (Freiburg, Deutschland) verwendet. Um Kontaminationen des Probenmaterials mit RNAsen zu verhindern, wurden zuvor alle benötigten Geräte sowie der Arbeitsplatz mit RNase ZAP (Sigma Aldrich, Taufkirchen) behandelt. Für die RNA Isolation aus Gewebe wurden die Gewebestücke in einem 2 ml Reagiergefäß mit 1 ml Trizol und zwei 7 mm Metallkugeln (Qiagen, Hilden) im Gewebehomogenisator TissueLyser LT (Qiagen, Hilden) bei 50 Shakes/min für 8 min homogenisiert. Anschließend wurden die Proben bei 13000 rpm für 30 sec zentrifugiert, um Zellbruchstücke aus der Lösung zu entfernen. Die weitere Aufarbeitung der RNA erfolgte wie in der Bedienungsanleitung des Direct-zol™ RNA Miniprep Kit beschrieben. Mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Spektrophotometers oder des Tecan Spark Plattenlesegeräts wurde die RNA-Konzentration bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA Proben bei -80°C gelagert.

### 3.2.2 Bestimmung der RNA Qualität

Die Analyse der RNA Qualität erfolgte mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers sowie entsprechender Kits (Kapitel 2.8) nach Herstellerangaben. Das Prinzip dieser Untersuchung beruht auf einer automatisierten Elektrophorese der Biomoleküle mittels Lab-on-Chip-

Technologie, um die Konzentration und Größe sowie Integrität der RNA zu bestimmen. Ein Chip besteht auf der Oberseite aus verschiedenen Probenkammern, Gelkammern sowie einer extra Kammer für die Standardleiter. Auf der Unterseite befinden sich in Glas eingravierte Mikrokanäle, die ein untereinander verbundenes Netzwerk bilden. Im Zuge der Chip-Vorbereitung wurden diese Kanäle mit einem Netzpolymer und Fluoreszenzfarbstoff gefüllt. Anschließend wurde 1 µl Probenvolumen sowie 1 µl Standardleiter in die entsprechenden Kammern hinzugegeben. Nach Einsetzen des Chips in den Bioanalyser entstand durch die 16 Pinelektroden ein elektrisches Feld. Die Auftrennung der RNA Moleküle erfolgte anhand ihrer Größe entlang eines Spannungsgradienten vergleichbar mit einer Standardgelelektrophorese. Mittels Laser wurden die einzelnen Moleküle anhand des in die Fragmente interkalierten Fluoreszenzfarbstoffs detektiert und die Daten in ein Gelbild sowie Elektropherogramm umgewandelt. Anhand der Standardleiter, die Fragmente bekannter Größe und Konzentration enthält, wurde eine Standardkurve erstellt, mit Hilfe derer die Fragmentgröße berechnet werden konnte. Auf Basis der Fläche von Standardleiter sowie Gesamtproben-Fläche wurde das Verhältnis zwischen 18S-rRNA und 28S-rRNA gebildet, welches ein Indikator für die Integrität der RNA (RIN) ist. Hierbei entspricht eine RIN von 1 einer vollständig degradierten RNA und eine RIN von 10 einer vollständig intakten RNA <sup>166</sup>.

### 3.2.3 Reverse Transkription

Die Herstellung der benötigten cDNA (*complementary DNA*) aus zuvor gewonnener RNA erfolgte mittels des SuperScript Vilo cDNA-Synthesekits (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Für die reverse Transkription wurden die einzelnen Komponenten wie in Tabelle 15 dargestellt zusammenpipettiert, gevortext und kurz zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Transkription nach folgendem Programm im Thermocycler (Tab. 16). Die Lagerung der gewonnenen cDNA Proben erfolgte bei -20°C.

**Tabelle 15: Rezept für einen cDNA-Reaktionsansatz**

Komponente	Menge
RNA	200 ng
5x VILO™ Reaction Mix	4 µl
10x SuperScript® Enzym Mix	2 µl
Ampuwa®	bis 20 µl

**Tabelle 16: Thermocycler-Programm für die mRNA Transkription**

	Temperatur	Dauer
1	25°C	5 min
2	42°C	50 min
3	85°C	5 min
4	4°C	∞

### 3.2.4 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können kurze genau definierte Gen-Sequenzen eines DNA-Strangs enzymatisch vervielfältigt werden. In Tabelle 17 sind die verwendeten Komponenten sowie entsprechenden Volumina für einen PCR-Ansatz beispielhaft aufgeführt. Für die Amplifikation der DNA wurde der 5x Firepol® Master Mix der Firma Solis Biodyne (Tartu, Estland) sowie die in Kapitel 2.11.2 aufgeführten Primer-Sequenzen verwendet. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 18 dargestellt.

**Tabelle 17: PCR-Bestandteile**

PCR-Komponente	Menge [µl]
5x Firepol® Master Mix	4
Primer forward	1
Primer reverse	1
Ampuwa	12
cDNA/DNA	2

**Tabelle 18: PCR-Programm**

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	30 s	30
Annealing	58 – 60°C	1 min	
Elongation	72°C	30 sec – 2 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen wurde bei der Agarose-Gelelektrophorese der Größenstandard GeneRuler Express DNA Ladder der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) verwendet.

### 3.2.4.1 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die qPCR ist eine quantitative Vervielfältigungsmethode für cDNA. Für die Markierung der PCR-Produkte wurde das QuantiTect® SYBR Green PCR Kit sowie die in Kapitel 2.11.1 dargestellten QuantiTect® Primer der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. SYBR Green ist ein asymmetrischer Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner hohen Affinität zu doppelsträngiger DNA in diese eingelagert wird. Somit lässt sich die Zunahme der Menge des PCR-Produktes anhand des Fluoreszenzsignals mit einem entsprechenden PCR-Gerät in Echtzeit verfolgen. Als Template für die qPCR wurde die cDNA aus verschiedenen Mausgeweben wie Trachea oder Lunge verwendet. In der nachfolgenden Tabelle 19 sind die Komponenten für einen qPCR-Reaktionsansatz aufgeführt.

**Tabelle 19: qPCR-Komponenten**

PCR-Komponente	Menge [ $\mu$ l]
SYBR Green Master Mix	7,5
QuantiTect® Primer	1,5
cDNA (Verdünnung 1:10 $\approx$ 0,1 ng)	1
Ampuwa	5

Die Proben wurden mittels Pipettierroboter CAS 1200 (Qiagen, Hilden, Deutschland) entweder in die Multiwell PCR-Ring Gene-Disc™ 100 (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder die Hard-Shell® 96-Well PCR Plates (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) pipettiert. Hierfür wurden dem Roboter der SYBR Green Master Mix mit enthaltenem Primerpaar sowie die mit Ampuwa verdünnten cDNA Proben an entsprechender Position in der Roboterplattform bereitgestellt. Die Steuerung des Pipettierroboters erfolgte mit der Software Robotics 4. Nach Abschluss des Pipettiervorgangs wurden die PCR-Platten mit der entsprechenden Versiegelungsfolie verschlossen und in die PCR-Maschine Rotor-Gene™ 6000 (ehemals Corbet Research, jetzt Qiagen) oder das CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH überführt. Für die Amplifikation wurde das in Tabelle 20 dargestellte PCR-Programm verwendet. Im Anschluss an die Amplifikation erfolgte zur Kontrolle eine Schmelzkurvenanalyse.

Tabelle 20: qPCR-Programm CFX96 Touch

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 min	
Denaturierung	95	5 s	50
Annealing	60	10 s	
Schmelzkurve	60	5 s	
	95		

Die relative Quantifizierung der Amplifikate erfolgte, indem die Genexpression des Zielgens auf die Genexpression eines nicht regulierten „Housekeeping Gens“, die 18S ribosomale Untereinheit (18S rRNA), normiert wurde. Für die anschließende Berechnung des Expressionsunterschiedes wurde die  $\Delta\text{Ct}$ -Methode verwendet, wobei sich die relative Genexpression aus  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  ergibt. Ct ist definiert als Zyklusschwellenwert (Cycle Threshold), also der Schnittpunkt zwischen der Amplifikationskurve und der Schwellenwertlinie. Weiterhin ist  $\Delta\text{Ct}$  definiert als  $\text{Ct}(\text{Zielgen}) - \text{Ct}(\text{Referenzgen})$ . Zur besseren graphischen Darstellung wurde der  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  Wert mit  $10^{-6}$  multipliziert.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 Proteinisolation aus Lungengewebe der Maus

Für die Proteinisolation aus Lungengewebe der Maus wurde das Gewebe in einem 2 ml Reagiergefäß in 400  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer mit zwei 7 mm Metallkugeln im Gewebehomogenisator TissueLyser LT der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) bei 50 Shakes/min für 8 min homogenisiert. Um dem Proteinabbau durch Proteasen vorzubeugen, wurde der 2,5x RIPA-Puffer (20 ml) mit einer cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) versetzt. Anschließend wurden die Proben bei 13000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert, um Gewebereste aus der Lösung zu entfernen. Der Überstand wurde in ein frisches beschriftetes 1,5 ml Reagiergefäß überführt und die Proteinproben bei -80°C gelagert.

#### 3.3.2 Proteinisolation aus humanen Zellen

Für die Proteinisolation aus hASMCs sowie hTEPCs wurden diese für den jeweiligen Versuch auf 6 Well-Zellkulturplatten ausgesät und bei einer Konfluenz von 90% behandelt. Nach der Behandlung und dem Absaugen des Zellmediums erfolgte die Lyse der Zellen mit 400  $\mu\text{l}$  0,1 M Salzsäure (HCl) und 0,5% Triton X-100. Anschließend wurden die Zellen für 30 min im Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Mögliche Zellreste wurden vom Boden der 6 Well-Zellkulturplatte mittels umgebogener Pipettenspitze abgeschabt, die Lösung in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und bei -80°C gelagert. Vor der Proteinbestimmung wurden die bei

-80°C gelagerten Proben langsam auf Eis aufgetaut und bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Abschließend wurden die Proteinproben in einem eisgekühlten Ultraschallbad für 15 min lysiert.

### 3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Pierce™ BCA™ Protein-Assay Kits der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) nach Herstellerangaben. Für in RIPA-Puffer gelöste Proteinproben wurde nach Herstellerangaben eine Standardkurve aus dem Albumin Standard (BSA) sowie RIPA-Puffer hergestellt. Für in HCl gelöste Zellkulturproben wurde BSA mit 0,1 M HCl entsprechend der Verdünnungsreihe verdünnt. Die Messung der Absorption der Proben erfolgte in einer transparenten 96-Well Microplatte mit flachem Boden bei 562 nm mit dem Tecan Spark Plattenlesegerät der Firma Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz). Über die Standardkurve der Absorptionswerte wurde die Proteinkonzentration (mg/ml) der Proben in Excel berechnet.

## 3.4 Immunhistochemie

Für die Darstellung bestimmter Proteine oder Antigene in Zellen und Geweben werden Antikörper-gekoppelte Farbstoffe verwendet. Die Grundlage, auf der dieses Nachweisprinzip beruht, ist eine Antikörper-Antigen-Reaktion. Grundsätzlich lässt sich zwischen direkten Färbungen, bei denen der Primärantikörper direkt mit dem Marker gekoppelt ist, und indirekten Färbungen mit Primär- und Sekundärantikörper unterscheiden. Bei der indirekten Färbung bindet der mit einem Marker gekoppelte Sekundärantikörper an das F<sub>c</sub>-Fragment des Primärantikörpers. Als Marker kommen entweder Enzyme oder Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz. Bei Verwendung eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers kommt es durch Zugabe des Substrates zu einer Enzym-Substrat-Reaktion, bei der ein sichtbarer Farbstoff entsteht. Fluoreszenzfarbstoffe sind nicht mit dem bloßen Auge sichtbar, sondern müssen durch Licht entsprechender Wellenlängen angeregt werden. Dies erfolgt mit Hilfe spezieller Fluoreszenzmikroskope, bei denen hochspezifische Laser die entsprechenden Lichtwellenlängen emittieren und die Zell- bzw. Gewebestrukturen unter dem Mikroskop sichtbar werden lassen.

### 3.4.1 Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA)

#### 3.4.1.1 Fixierung von Zellen und Gewebe

Für die Fixierung von Zellen und Gewebeschnitten wurde eine 4%ige PFA Lösung verwendet. Die Fixierung von Zellen, die auf Deckgläschen gewachsenen waren, erfolgte in der Zellkulturplatte, die Objektträger mit Gewebeschnitten wurden horizontal in eine feuchte

Färbebox gelegt. Nach kurzem Waschen mit DPBS wurden die Zellen oder Gewebeschnitte für 20 min mit 4% PFA fixiert. Anschließend wurde erneut mit DPBS gewaschen und die fixierten Zellen mit 1 ml frischem DPBS überschichtet, die Zellkulturplatte mit Parafilm umwickelt und bei 4°C bis zur immunhistochemischen Färbung gelagert. Fixierte Gewebeschnitte wurden direkt immunhistochemisch gefärbt.

### 3.4.2 Immunhistochemische Färbung von Zellen und Gewebe

Um die Austrocknung der Präparate während der Färbung zu verhindern, wurden alle Färbeschritte in einer feuchten Färbekammer durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die Zellmembran durch 0,2% (v/v) Triton X-100 in DPBS für 10 min permeabilisiert, bevor durch die 20-minütige Inkubation mit 5% (v/v) Eselserum in DPBS unspezifische Antikörperbindungsstellen blockiert wurden. Die Primärantikörper zur Detektion der FAAH oder von asmac (Kapitel 2.9) wurden in einem Verhältnis von 1:100 (Gewebe 1:50) oder 1:800 mit der 5%igen Eselserum-DPBS Lösung verdünnt und die Präparate damit für 2 h bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Präparate 3 x 5 min mit DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Präparate mit den Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern (Kapitel 2.9) für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss. Diese Sekundärantikörper wurden zuvor in einer 1 µg/ml Hoechst 33342 Lösung 1:400 verdünnt. Hoechst ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Anfärbung von DNA genutzt wird und daher den Zellkern bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 430 nm blau erscheinen lässt. Nach einem erneuten Waschschrift mit DPBS wurden die Präparate mit dem Eindeckmedium Aqua-Poly/Mount der Firma Polysciences Europe GmbH (Hirschberg an der Bergstraße, Deutschland) eingedeckt und für 24 h bei RT unter Lichtabschluss getrocknet. Die langfristige Lagerung der gefärbten Präparate erfolgte bei 4°C ebenfalls unter Lichtabschluss.

### 3.4.3 Histologische Färbungen

#### 3.4.3.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Mauslungen wurden nach der Resektion in 4% ROTI®Histofix (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) 24 h bei 8°C im Kühlschrank fixiert. Am Folgetag wurden die Mauslungen aus dem Fixativ entnommen, in beschriftete Einbettkassetten (Tissue-Tek® Mega-Cassette™) überführt und für 1 h unter fließendem Wasser gespült. Bis zur Einbettung in Paraffin wurden die Einbettkassetten in 70% Isopropanol bei 8°C gelagert. Die weitere Verarbeitung der Gewebeproben erfolgte mit dem Gewebereinbettautomat Microm STP-120 (Thermo Scientific, Waltham, USA) durch das Team der Forschungsabteilung der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikum Bonn. Das Programm des

Gewebeeinbettautomaten bestand hierbei aus 12 verschiedenen Schritten, die in der nachfolgenden Tabelle 21 dargestellt sind.

**Tabelle 21: Programm des Gewebeeinbettautomaten**

Reagenzienbehälter	Lösung	Eintauchzeit [h]
1	70% Isopropanol	3
2	80% Isopropanol	1
3	80% Isopropanol	1
4	90% Isopropanol	1
5	90% Isopropanol	1
6	96% Isopropanol	2
7	100% Isopropanol	2
8	100% Isopropanol	2
9	Xylol	1
10	Xylol	1
11	Paraffin (Typ 3)	1
12	Paraffin (Typ 3)	1

Nach erfolgreichem Durchlauf des Programms wurden die Einbettkassetten aus dem Gewebeeinbettautomaten entnommen, die noch warmen Gewebeproben in die Einbettstation Microm EC350-1 (Thermo Scientific, Waltham, USA) überführt und dort in flüssigem Paraffin (60°C, 1:1 Typ 6 und 9) zwischengelagert. Anschließend wurden die Lungenlappen mit dem Hilus nach unten in kleine Edelstahlgießformen gesetzt und die Formen mit Paraffin aufgefüllt. Als Träger wurde die Einbettkassette aufgesetzt. Nach dem Aushärten des Paraffins auf einer Kühlplatte wurden die Paraffinblöcke aus den Formen gelöst und bis zur weiteren Verarbeitung in Gewebeboxen bei RT gelagert.

Für die Anfertigung der 5 µm dicken Gewebeschnitte wurde das Schlittenmikrotom SM2000R von Leica (Wetzlar, Deutschland) verwendet. Ein optimales Schneidergebnis des Gewebes wurde durch kurzzeitiges Herunterkühlen der Paraffinblöcke auf -20°C erreicht. Die angefertigten Gewebeschnitte wurden in einem Heißwasserbad (45°C) aufgefangen und gestreckt, um sie glatt auf einen Objektträger aufziehen zu können. Über Nacht wurden die Gewebeschnitte bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet und bis zur histologischen Färbung in Objektträgerboxen bei RT gelagert.

### 3.4.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) ist ein histologisches Färbeverfahren, bei dem alle basophilen Gewebestrukturen, z.B. Zellkern oder raues ER (rER), durch Hämalaun in saurem Milieu (pH 3) blau gefärbt werden. Acidophile Gewebestrukturen, darunter Proteine

des Zytoplasmas oder Mitochondrien, werden durch die wässrige schwach saure 0,5% Eosin G-Lösung nuanciert rot gefärbt.

Für die Färbung der Paraffinschnitte wurde das Gewebe entparaffiniert. Hierzu wurden die Objektträger für 3 x 10 min in Xylol inkubiert und anschließend über eine absteigende Alkoholreihe (2 x 100%, 90%, 70 % Isopropanol, jeweils 5 min) sowie in einem Bad in Aqua Dest. gewässert. Anschließend wurden die Objektträger für 2 min in der Hämatoxylin Färbelösung inkubiert und mit fließendem lauwarmem Leitungswasser (ca. 5 min) gebläut. Nach einem kurzen Bad in Aqua Dest. wurden die Objektträger für 3 min in Eosin G inkubiert und anschließend erneut kurz in Aqua Dest. gewaschen. Über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 2x 100% Isopropanol, jeweils 5 min.) wurden die Objektträger entwässert und für 3 x 5 min in Xylol inkubiert. Mit dem wasserfreien Eindeckmedium Entellan® wurden die Gewebeschnitte eingedeckt, getrocknet und zur Lagerung bei RT in Objektträgerboxen überführt.

### 3.4.3.3 Schnellfärbung zytologischer bronchoalveolärer Proben

Für die Anfärbung zytologischer Proben der bronchoalveolären Lavage (Kapitel 3.8.1.3) wurde das MorDiff-Quick Schnellfärbekit der Firma Morphisto GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden in einem ersten Schritt für 5 min mit dem MorDiff-Quick Fixativ fixiert und anschließend mit 2 Tropfen Eosin G-Lösung (MorDiff-Quick Lösung I) für 2 ½ min überschichtet. Nach der Inkubationszeit wurde die Eosin G-Lösung abgesaugt und durch 2 Tropfen Methylenblau-Lösung (MorDiff-Quick Lösung II) ersetzt. Nach 30 sec wurde die Färbelösung abgesaugt und die Objektträger kurz in Wasser gespült. Mit Hilfe von saugstarkem Papier wurden Flüssigkeitsreste vorsichtig entfernt und die Präparate an der Luft getrocknet. Zum Eindecken wurde Entellan® verwendet.

## 3.5 Immunoassays

### 3.5.1 Stimulation der Zellen für cAMP und PGE<sub>2</sub> ELISA

Die hASMCs sowie die hTEPCs wurden auf einer 6 Well-Zellkulturplatte (Falcon) bis zu einer Dichte von 90% im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert (Kapitel 3.1.1 u 3.1.2). Das Zellkulturmedium wurde für die Stimulation durch PSS Lösung ersetzt. Um die Aktivität der cAMP-abhängigen Phosphodiesterase zu hemmen, wurden die Zellen für 30 min mit 10 µM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, in PSS) im Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Stimulanzen Anandamid (10 µM), Ethanol (Kontrolle) und Forskolin (10 µM) in die PSS Lösung gegeben und die Zellen im Inkubator für weitere 30 oder 60 min inkubiert. Dann wurde der Überstand abpipettiert und in beschrifteten Reagiergefäßen auf Eis gelagert. Die Zellen

selbst wurden durch Zugabe von 400  $\mu$ l 0,1 M HCl mit Triton X-100 lysiert, diese Lösung ebenfalls in beschriftete ReagiergefäÙe überführt und auf Eis gelagert. Bis zur Weiterverarbeitung, d.h. Bestimmung der Protein, cAMP sowie PGE<sub>2</sub> Konzentration wurden die Proben bei -80°C gelagert.

### 3.5.2 cAMP ELISA

Für die Bestimmung der zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) Konzentration in Zell- und Gewebelysaten wurde das Direct cAMP ELISA Kit der Firma Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Erhöhung der Sensitivität (10-fach) wurden die Proben azetyliert. Die Absorption der ELISA Proben erfolgte bei 405 nm mit dem Tecan Spark reader der Firma Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz). Da es sich um einen kompetitiven ELISA handelt, ist eine erhöhte cAMP Konzentration anhand einer schwächeren Signalintensität erkennbar. Zur Berechnung der cAMP Konzentration (pg/ml) wurde eine Standardkurve erstellt. Um das Ablesen der Kurve zu erleichtern, wurde die x-Achse logarithmisch aufgetragen. Für die Normalisierung wurde die cAMP Konzentration durch das Gesamtprotein dividiert.

### 3.5.3 PGE<sub>2</sub> ELISA

Zur Bestimmung der Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) Konzentration im Überstand stimulierter Zellen und Trachealringe wurde das Prostaglandin E<sub>2</sub> ELISA Kit – Monoclonal (Cayman Chemical, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Bei diesem PGE<sub>2</sub> ELISA handelt es sich ebenfalls um einen kompetitiven ELISA. Die Berechnung der PGE<sub>2</sub> Konzentration in pmol/ml erfolgte auf gleiche Weise wie bei dem cAMP ELISA (Kapitel 2.6.2).

## 3.6 Enzymaktivitätsassays

### 3.6.1 Stimulation von Zellen und Gewebe für FAAH Aktivitätsassays

Für die funktionelle Analyse der FAAH wurden FAAH Enzymaktivitätsassays in humanen Zellenlysaten sowie verschiedenen Mausgewebenhomogenisaten durchgeführt. Die hASMC und hTEPC wurden bis zu einer Konfluenz von 95% in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Anschließend wurde das Medium durch PSS ersetzt und die Zellen für 1h im Inkubator mit oder ohne FAAH Inhibitor URB597 stimuliert. Erfolgte die Aktivitätsbestimmung der FAAH in Mausgeweben wie Gehirn, Trachea, Lunge oder Herz, so wurden diese Organe isoliert und in kleine Stücke (max. 5 mg) zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebe in PSS mit oder ohne URB597 für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen oder Gewebeproben in ein 2 ml Reagiergefäß mit 120  $\mu$ l Assay Puffer (mit oder ohne URB597) überführt und mittels zwei 7 mm Metallkugeln im TissueLyser LT (Qiagen, Deutschland)

lysiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 10000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Reagiergefäße überführt und die Proben direkt analysiert.

### 3.6.2 FAAH Aktivitätsassay

Die Bestimmung der FAAH Aktivität in den Zell- sowie Gewebelysaten erfolgte durch Verwendung des Fatty Acid Amide Hydrolase Activity Assay Kit (Fluorometric) der Firma abcam (Cambridge, England) nach Herstellerangaben. Das Fluoreszenzsignal der Proben wurde über einen Zeitraum von 100 min 1x pro min bei 37°C mit dem Tecan Infinite® 200 PRO der Firma Tecan Trading AG (Männedorf, Schweiz) erfasst. Durch die Hydrolyse eines nicht-fluoreszierenden Substrates entsteht 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC), ein fluoreszierender Farbstoff, der bei einer Extinktion und Emission von 360/465 nm gemessen werden kann. Für die Berechnung der FAAH Aktivität wurde zuerst die relative Fluoreszenz (RFU) des geringsten Standards (Standard 0) sowie die *background* Kontrolle von allen Fluoreszenzwerten abgezogen. Aus den Standardwerten wurde über eine Ausgleichsgerade eine lineare Funktion ermittelt, mit deren Hilfe die AMC-Konzentration berechnet werden konnte. Anschließend wurden für jede Probe im linearen Bereich der Sättigungskurve zwei Zeitpunkte (t1, t2) mit dazugehörigen RFU-Werten (RFU1, RFU2) definiert und  $\Delta t$  bzw.  $\Delta RFU$  berechnet.

$$\Delta RFU = RFU2 - RFU1 \text{ bzw. } \Delta t = t2 - t1$$

Mit Hilfe der linearen Funktion der AMC-Standardkurve konnte durch Einsetzen der  $\Delta RFU$ -Werte die AMC-Konzentration (B) zwischen den Zeitpunkten t1 und t2 ( $\Delta t$ ) berechnet werden. Für die finale Berechnung der FAAH Aktivität wurde die folgende Formel verwendet.

$$FAAH \text{ Aktivität} = \frac{B}{(\Delta t \times V)} \times D \left[ \frac{AMC \frac{pmol}{min}}{\mu l} \right]$$

B = AMC-Konzentration;  $\Delta t$  = gewählter Zeitraum zwischen t1 und t2 im linearen Kurvenbereich; V = Probenvolumen; D = Verdünnungsfaktor (unverdünnt = 1)

Für die Berechnung der spezifischen Aktivität wurde die FAAH Aktivität durch die Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe dividiert.

$$\text{spez. FAAH Aktivität} = \frac{FAAH \text{ Aktivität}}{\text{Gesamtproteinkonzentration}} \left[ \frac{AMC \frac{pmol}{min}}{mg} \right]$$

### 3.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Normalisierung der cAMP und PGE2 Konzentration sowie der FAAH Enzymaktivität auf das Gesamtprotein der jeweiligen Proben, wurde die Proteinkonzentration, wie bereits in Kapitel 3.3.3 beschrieben, bestimmt.

## 3.7 *Ex vivo* Experimente

### 3.7.1 Isometrische Kraftmessungen am Myographen

Isometrische Kraftmessungen an isolierten Tracheen im Drahtmyographen sind eine effektive *ex vivo* Methode zur funktionellen Analyse glatter Atemwegsmuskulatur. Darüber hinaus lassen sich sehr einfach verschiedenste Signalwege, die die Kontraktilität der glatten Muskulatur beeinflussen, untersuchen.

#### 3.7.1.1 Präparation

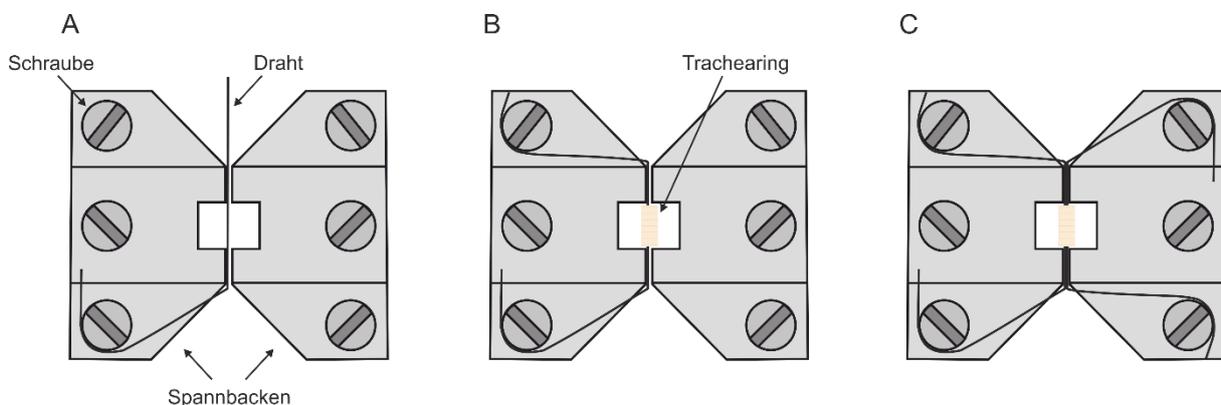
Für die Kraftmessungen wurden Tracheen von C57BL/6J, Faah<sup>-/-</sup> Knockout sowie Cnr1<sup>-/-</sup>/Cnr2<sup>-/-</sup> Doppelknockout Mäusen verwendet. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und anschließend zur Präparation der Trachea in Rückenlage auf einer Präparierunterlage fixiert. Mit einem paramedianen Längsschnitt in kranialer Richtung wurde das Abdomen geöffnet und das Zwerchfell durchtrennt. Anschließend folgte eine mediane Thorakotomie gefolgt von einem kranialen Einschnitt der Haut im Halsbereich. Die paarige Unterkieferspeicheldrüse wurde zur Seite gezogen und die Muskeln ventral sowie lateral der Trachea entfernt. Für die Entnahme des Herz-Lungen-Paketes wurde zuerst die Trachea oberhalb des Kehlkopfes durchtrennt und anschließend durch leichten kaudalen Zug das Paket von der dorsalen Thoraxwand gelöst. Zur weiteren Präparation wurde das Herz-Lungen-Paket in eiskalte physiologische Salzlösung mit geringem Kalziumgehalt (low Ca<sup>2+</sup> PSS) überführt. Die Feinpräparation erfolgte unter einer Stereolupe Wild M3 (Wild Heerbrugg, Gais, Schweiz) mit 6,4-facher Vergrößerung. Mit Hilfe feiner Insektennadeln wurde das Herz-Lungen-Paket in der silikonbeschichteten Präparierschale aufgespannt, der Thymus entfernt und die Trachea vorsichtig von umliegendem Binde- sowie Fettgewebe und dem parallel verlaufenden Ösophagus befreit. Für die Isolation der Trachea wurde diese kurz oberhalb der Bifurkation vom Herz-Lungen-Paket abgetrennt und der Kehlkopf entfernt. Abschließend wurde die Trachea mittels eines Messokulars in zwei jeweils 2 mm lange Segmente geschnitten.

#### 3.7.1.2 Einspannen der Trachealringe

Für die isometrischen Kraftmessungen wurde das Multi Myograph System 610M (Danish MyoTechnology, Aarhus, Dänemark) zusammen mit der LabChart 7 Pro Software (ADInstruments, Oxford, England) verwendet. Hiermit ist es möglich, auch geringe

Kraftänderungen von bis zu 0,01 mN zu messen und graphisch darzustellen. Pro Messung konnten jeweils 4 Trachealringe simultan untersucht werden.

Zum Einspannen der 2 mm langen Trachealringe zwischen die Spannbacken der Myograph-Kammern wurden 2,2 cm lange Stücke eines feinen rostfreien Drahtes mit einem Durchmesser von 40  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Myograph-Kammer wurde mit der low  $\text{Ca}^{2+}$  PSS Lösung gefüllt und ein Ende des Drahtes mit der unteren Schraube an der linken Spannbacke mittels Schraubenzieher leicht fixiert (Abb. 6 A). Über das lose Drahtende wurde der Trachealring aufgezogen und dieses Drahtende mit der oberen Schraube ebenfalls an der linken Spannbacke fixiert (Abb. 6 B).



**Abbildung 6: Einspannen eines Trachealrings in den Myographen**

Aufsicht auf die Spannbacken in der Myograph-Kammer. A) Der Draht wurde mit Hilfe der Fixierschrauben an der linken Spannbacke fixiert. B) Über das freie Drahtende wurde ein Trachealring aufgezogen, anschließend wurde das Drahtende mit der oberen Schraube gespannt und fixiert. C) Ein zweiter Draht wurde durch das Lumen des Trachealrings geführt und an der rechten Spannbacke befestigt.

Für die finale Spannung des Drahtes wurde die untere linke Schraube wieder gelöst, der Draht gespannt und final fixiert. Nun wurde die Myograph-Kammer um 180°C gedreht, ein zweiter Draht vorsichtig durch das Lumen des Trachealrings gezogen und, wie bereits beschrieben, an der rechten Spannbacke befestigt (Abb. 6 C). Bis zum Beginn der Messung wurden die Kammern im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

**3.7.1.3 Kalibrierung**

Die vier Myograph-Kammern wurden an das Myograph Multi System angeschlossen und die Absaugung sowie Sauerstoffzufuhr montiert. Zudem wurden zwei Plexiglaseinsätze verwendet, die das benötigte Kammervolumen auf 2 ml verringerten. Nun wurde die low  $\text{Ca}^{2+}$  PSS Lösung durch vorgewärmte PSS Lösung mit normalem Kalziumgehalt ausgetauscht und die Kammerheizung auf 37°C eingestellt. Da die Reaktivität der Trachealringe gegenüber verschiedenen Substanzen abhängig von der Vorspannung ist, mussten zur Vergleichbarkeit der Messungen die Trachealringe vor jedem Experiment entsprechend gespannt werden. Für

die optimale Kraftentwicklung wurde daher eine Vorspannung von 5 mN eingestellt<sup>167,168</sup>. Auf die Vorspannung der Trachealringe folgte eine 20-minütige Äquilibrationsphase.

### 3.7.1.4 Versuchsablauf

Nach der Äquilibrationsphase wurden die Trachealringe mit 10 µM Serotonin (5-HT) maximal kontrahiert und die Ausbildung eines Plateaus abgewartet. Anschließend wurde alle 2 min für insgesamt 10 min mit jeweils 2 ml 37°C warmer PSS Lösung gewaschen, sodass sich die Kraft wieder auf dem Basalniveau von 5 mN einpendelte.

Für den ersten Versuch wurden auf das Basalniveau 10 µM AEA appliziert und für 6 min inkubiert, dann wurde erneut fünfmal mit jeweils 2 ml PSS Lösung gewaschen. Anschließend wurden 10 µM MCh appliziert und die Ausbildung einer maximalen Kontraktion abgewartet.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, inwieweit ein relaxierender Effekt nach Applikation unterschiedlicher Substanzen auftritt und ob sich dieser durch Vorinkubation verschiedener Inhibitoren aufheben oder reduzieren lässt. Hierfür wurden die Trachealringe entweder direkt mit 3 µM 5-HT submaximal kontrahiert und die zu untersuchenden Substanzen ab Ausbildung eines Plateaus appliziert, oder die Inhibitoren wurden für 5 min vor der submaximalen Kontraktion in die PSS Lösung hinzugegeben. Die Kraft wurde jeweils 3 min nach Applikation der Substanzen gemessen.

Für die Untersuchungen der Trachealringe ohne Epithel wurde ein dünner Bindfaden durch das Lumen der leicht vorgespannten Trachealringe geführt. Durch mehrmaliges Drehen des Fadens, sowohl im Uhrzeigersinn als auch in Gegenrichtung, wurde das Epithel entfernt. Die Messung erfolgte anschließend auf gleiche Weise wie oben beschrieben.

### 3.7.2 Funktionelle Lungenschnitte

Die funktionelle Lungenschnitt-Technik stellt ein hervorragendes *in vivo* nahes Modell zur Untersuchung kleiner Atemwege im bronchialen Gewebeverband dar. *In vitro* bleibt die *in Situ* Organisation der Lunge sowie Kontraktilität über mehrere Tage erhalten. Durch die geringe Schichtdicke von 200 µm ist zudem eine optimale Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet<sup>169</sup>. Von essentieller Bedeutung ist, dass sich mit Hilfe von Präzisionsschnitten der Lunge (*precision cut lung slices, PCLS*) Bronchokonstriktionen unter Einbeziehung des umgebenden Parenchyms untersuchen lassen und ein Vergleich von Bronchien unterschiedlicher Größe möglich ist<sup>170</sup>. Durch digitale Aufzeichnungen von Videos und Fotos können Bronchokonstriktionen visualisiert und quantifiziert werden.

### 3.7.2.1 Präparation funktioneller Lungenschnitte

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet, in Rückenlage auf einer Präparierunterlage fixiert und mit 70% Ethanol desinfiziert. Über einen medianen Längsschnitt in kranialer Richtung wurde zuerst das Abdomen eröffnet, nachfolgend der Brustkorb. Nun wurde die Haut im Halsbereich ebenfalls mit einem kranialen Längsschnitt eröffnet und die laterale sowie ventrale Muskulatur um die Trachea entfernt. Durch einen kleinen Schnitt in der Trachea knapp unterhalb des Kehlkopfes wurde der Y-förmige BD Saf-T-Intima™ Sicherheitsverweilkatheter (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) vorsichtig in die Trachea geschoben, die Nadel entfernt und der Sicherheitsverweilkatheter mit einer zuvor gesetzten Ligatur fixiert. An einem Eingang des Y-Adapters wurde eine mit 1,2 ml Luft gefüllte 2 ml Spritze angebracht. Damit Luft aus dem Katheter entweichen konnte, wurde der Schlauch vor der Klemme mit einer Kanüle perforiert. Über den zweiten Eingang wurden nun 0,9 ml flüssige handwarme Low Melt Agarose (4%, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mittels 2 ml Spritze in die Lunge appliziert. Sofort wurde die Agarose durch schnelle Applikation von 1,2 ml Luft aus den Bronchien in umliegendes Alveolargewebe gepresst. Zügig wurde nun flüssige handwarme Gelatine (6%) über den rechten Ventrikel in den Lungenkreislauf appliziert. Zur Beschleunigung der Polymerisation wurde die Maus mit Zellstoff und Eis abgedeckt und im Kühlschrank bei 4°C bis zur vollständigen Aushärtung von Agarose und Gelatine gelagert. Im Anschluss wurde das Herz-Lungen-Paket entnommen, in kalte PBS Lösung überführt und die Lunge in ihre einzelnen Lungenlappen zerlegt. Mittels Sekundenkleber wurde ein Lungenlappen auf den magnetischen Probenhalter des Vibratoms VT1200 S (Leica, Wetzlar, Deutschland) geklebt und dieser Probenhalter im eisgekühlten PBS Bad fixiert. In den Klingenhalter wurde eine Rasierklinge (Rotbart extra dünn) eingesetzt, deren vertikale Auslenkung mit Hilfe des Leica Vibrocheck™ gemessen und kalibriert wurde. Dies ist von besonderer Bedeutung, da empfindliches Gewebe so vor mechanischer Beschädigung geschützt wird. Mit einer Geschwindigkeit von 0,08 bis 0,16 mm/s wurden 200 µm dicke Lungenschnitte angefertigt, die sofort in serumfreies DMEM überführt wurden (Tab. 22).

**Tabelle 22: Medium zur Kultivierung von PCLS**

Substanz	Menge
DMEM	50 ml
Penicillin/Streptomycin	50 µl
Non essential amino acids (NEAA)	50 µl
β-Mercaptoethanol	5 µl

Anschließend wurden die Lungenschnitte im Inkubator bei 37°C für 24 h inkubiert. In dieser Zeit konnte sich die Gelatine wieder verflüssigen, die Agarose verblieb jedoch in den Alveolen.

### 3.7.2.2 Perfusion der funktionellen Lungenschnitte

Für den Einsatz funktioneller Lungenschnitte zur Untersuchung der Tonusregulation von Bronchien wurde das inverse Mikroskop Axiovert 40C (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Über fünf 20 ml Spritzen, regulierbar über eine Ventilkappensteuerung, konnten die Lungenschnitte mit verschiedenen Substanzen mittels Schlauchsystem perfundiert werden. Die Enden der einzelnen Schläuche mündeten in einer gemeinsamen Pipettenspitze, sodass beim Umschalten der Substanzen keine Unterbrechung im Flüssigkeitsstrom auftrat. Die Halterung für die Perfusion der Lungenschnitte bestand aus einer gefrästen Platte, in die ein rundes 30 mm Deckgläschen eingesetzt wurde. Mit PTFE-Paste (Aeronix Spezialschmierstoffe, Walldorf, Deutschland) wurden mittels einer 2 ml Spritze und aufgesetzter Kanüle zwei parallele Pastenstreifen im Abstand von circa 1 cm auf das Deckgläschen gespritzt. Anschließend wurde ein Tropfen physiologische PSS Lösung (Tab. 23) auf das Deckgläschen zwischen die Pastenstreifen appliziert.

**Tabelle 23: Zusammensetzung der PSS Lösung**

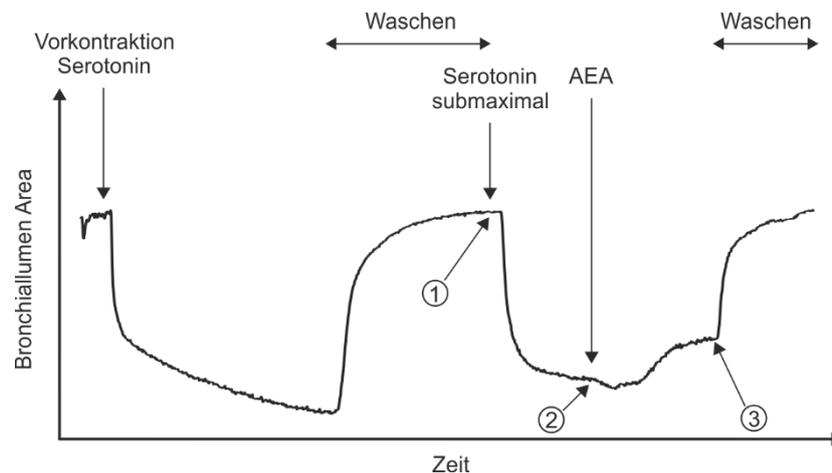
Substanz	Konzentration (mM)	Menge (g/l)
NaCl	118	6,891
KCl	5	0,373
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2	0,168
MgCl <sub>2</sub>	1,2	0,114
CaCl <sub>2</sub>	1,6	0,177
Hepes	24	5,719
D-Glucose	10	1,802

In den Tropfen PSS Lösung wurde anschließend ein Lungenschnitt gelegt und mit Hilfe eines feinen Netzquadrates leicht fixiert, in das zuvor ein kleines Loch für die mikroskopische Beobachtung geschnitten wurde. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde der Lungenschnitt unterhalb des Netzes vorsichtig so positioniert, dass innerhalb des Loches ein oder mehrere Bronchien gut erkennbar waren. Nun wurde ein rechteckiges Deckgläschen aufgelegt und die Perfusion mit PSS gestartet. Durch die Kapillarwirkung wurde die PSS Lösung zwischen beiden Deckgläschen entlang der PTFE-Paste hindurchgezogen und am anderen Ende abgesaut. Auf diese Weise wurde der Lungenschnitt kontinuierlich mit Lösung umströmt. Die Reaktion der Bronchien bei Applikation pharmakologischer Substanzen konnte über Phasenkontrastmikroskopie sowie die angeschlossene PixeLink Camera (PixeLink PL-A662) (Pixelink, Ottawa, Kanada) mit der Software PixeLink Capture live verfolgt werden. Mit dieser Software wurde pro Sekunde ein schwarz-weißes Bild (1280 x 1024) aufgenommen und gespeichert. Über den Schärfe- und Lichtregler des Mikroskopes wurden die optimalen

Einstellungen vorgenommen, sodass das Bronchienlumen möglichst schwarz erschien und alle umliegenden Strukturen so scharf wie möglich dargestellt wurden. Für die Aufnahme und Auswertung der Bilder kam die Software LumenCalc 2.4 zum Einsatz. Die in der Entwicklungsumgebung LabView programmierte Individualsoftware analysiert die Bilder pixelbasiert. Durch die sequenzielle Auswertung kann die Veränderung der Lumenfläche indirekt berechnet werden. Hierbei wird zunächst der zu analysierende Bereich durch manuelle Festlegung der Schwellenwerte (Threshold) im ersten Bild definiert. Die nachfolgenden Bilder werden vollautomatisch weiterverarbeitet und ihre Auswertung in eine Datenbasis übertragen. Das Ergebnis kann in Form eines Kurvenverlaufs nachverfolgt werden. Nach Abschluss der Messung können die Daten per Exportfunktion in eine Excel-Datei übertragen und weiterverarbeitet werden.

### 3.7.2.3 Untersuchungen der Wirkung von AEA

Zur Untersuchung der Wirkung des Endocannabinoids AEA auf die glatte Muskulatur wurde der im Mikroskop sichtbare Bronchus nach 30sekündiger Perfusion mit PSS durch Serotonin ( $10\ \mu\text{M}$ ) oder Methacholin ( $1\ \mu\text{M}$ ) maximal vorkontrahiert, was sich in der Reduktion der Lumenfläche zeigte. Nach Ausbildung eines Plateaus wurde so lange mit PSS gewaschen, bis die vollständige Relaxation des Bronchus erkennbar war. Darauffolgend wurde der Bronchus durch Serotonin ( $1\ \mu\text{M}$ ) oder Methacholin ( $0,1\ \mu\text{M}$ ) submaximal kontrahiert und ab Erreichen eines Plateaus zusätzlich AEA ( $10\ \mu\text{M}$ ) oder das Lösungsmittel EtOH über die Versuchsapparatur appliziert. Sobald sich während der Gabe von AEA oder EtOH ein neues Plateau ausbildete, wurde der Bronchus bis zur vollständigen Relaxation mit PSS gewaschen (Abb. 7).



**Abbildung 7: Versuchsablauf zur Untersuchung der Wirkung von AEA auf den Bronchialtonus anhand von Präzisionschnitten der Lunge**

Nach Vorkontraktion und nachfolgender Auswaschphase wurde der Bronchus submaximal kontrahiert (1). Ab Erreichen eines Kontraktions-Plateaus (2) erfolgte die Zugabe der zu untersuchenden Substanz (AEA). Stellte sich auch hier ein Plateau ein, wurde erneut mit PSS gewaschen (3).

Die Berechnung der Kontraktionsstärke bzw. Relaxation erfolgte über die Lumenfläche, die durch die Pixelanzahl bestimmt wird. Hierfür wurden jeweils die letzten 10 Bilder vor dem jeweiligen Umschaltzeitpunkt analysiert und die Pixelanzahl gemittelt (Abb. 7). Anschließend wurde durch Differenzbildung des gewählten lokalen Maximums und lokalen Minimums der Kurve, z.B. Punkt 1 und 2 im Kurvenverlauf, die relative Kontraktion prozentual berechnet. Weiterhin ließ sich auf gleiche Weise die durch eine applizierte Substanz bewirkte Relaxation des Bronchus ermitteln. Hierbei wurden für die Differenzbildung das Relaxationsniveau sowie das lokale Minimum herangezogen (Punkt 2 und 3, Abb. 7).

Kontraktion:

$$\begin{aligned} \text{Lumenfläche 1} - \text{Lumenfläche 2} &= \text{Differenz der Lumenfläche } x \\ \rightarrow \frac{\text{Differenz der Lumenfläche } x}{\text{Lumenfläche 1}} \times 100 &= \% \text{ Kontraktion} \end{aligned}$$

Relaxation:

$$\begin{aligned} \text{Lumenfläche 2} - \text{Lumenfläche 3} &= \text{Differenz der Lumenfläche } y \\ \rightarrow \frac{\text{Lumenfläche } y}{\text{Lumenfläche } x} \times (-100) &= \% \text{ Relaxation} \end{aligned}$$

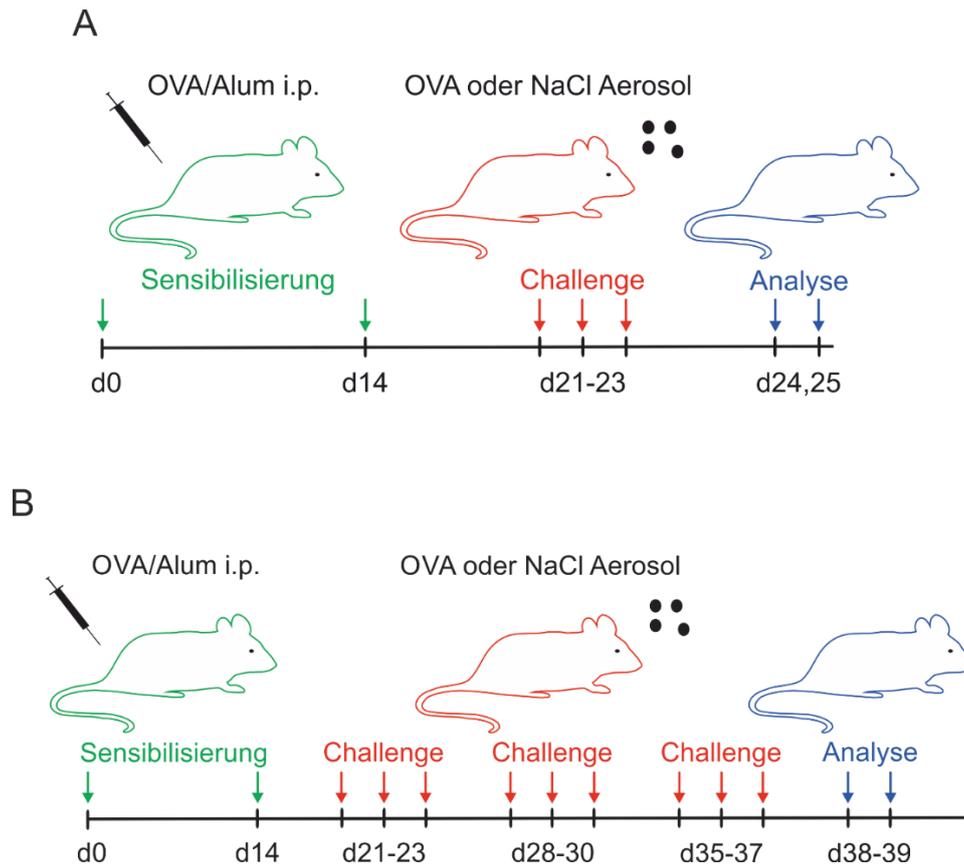
### 3.8 *In vivo* Experimente

#### 3.8.1 Experimentelles Asthma

Da Nager spontan kein Asthma entwickeln, ist für die Auslösung allergischer Reaktionen ein artifizielles Provokationsmodell erforderlich. Das Ovalbumin-induzierte allergische Asthma in Mäusen ist ein sehr gut charakterisiertes Modell, mit dessen Hilfe sich immunologische und entzündliche Krankheitsmechanismen der Lunge untersuchen lassen<sup>171–173</sup>. Für die Allergenprovokation werden Mäuse über vier bis sechs Wochen, je nachdem ob akutes oder chronisches Asthma ausgelöst werden soll, wiederholt gegenüber Ovalbumin exponiert. Diese Exposition führt zur Ausbildung wesentlicher Kennzeichen menschlichen Asthmas. Neben einer allergischen Entzündung des Lungengewebes mit Einwanderung eosinophiler Granulozyten lässt sich eine bronchiale Hyperreagibilität nachweisen<sup>174,175</sup>. Über die Messung des Atemwegswiderstands kann die durch einen Provokationstest hervorgerufene Bronchokonstriktion untersucht werden.

##### 3.8.1.1 Sensibilisierungsprotokoll für akutes und chronisches Asthma

Für die Induktion des akuten Asthmaphänotyps wurden 8 Wochen alte Balb/c Mäuse (Kapitel 2.12) verwendet. Die Sensibilisierung der Tiere erfolgte an Tag 0 und 14 durch intraperitoneale Injektion (100 µl) von Ovalbumin (20 µg) und Aluminium-Hydroxid (Imject Alum, 2 mg). Kontrolltiere erhielten eine Injektion bestehend aus NaCl und Aluminium-Hydroxid. Das akute Asthma wurde durch wiederholte 30-minütige Antigenexposition mit einem feinen Aerosol aus 1% Ovalbumin gelöst in 5 ml 0,9% NaCl an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 21 – 23) in einer luftdichten Kammer (SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc., Montreal, Kanada) ausgelöst. Zur Auslösung des chronischen Asthmaphänotyps wurden die Tiere für 30 min an drei Tagen von jeweils drei aufeinander folgenden Wochen (Tag 21 – 23, 28 – 30, 35 – 37) mit dem Ovalbumin-Aerosol behandelt. Die Kontrolltiere wurden jeweils 5 ml 0,9% NaCl Aerosol ausgesetzt. Für die Aerosolbildung wurde der Ultraschall-Vernebler Multisonic LS 290 der Firma Flores Medical (Probstzella, Deutschland) verwendet. Akut asthmatische Tiere wurden an Tag 24 und 25, chronisch asthmatische Tiere an Tag 38 und 39 analysiert. Hierfür wurden funktionelle Lungenschnitte hergestellt oder Veränderungen des Atemwiderstands im Zuge der Lungenfunktionsmessungen mittels FlexiVent Systems der Firma SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc. (Montreal, Kanada) untersucht (Abb. 8).



**Abbildung 8: Schema zur Induktion akuten und chronischen Asthmas**

A) Zur Asthma Induktion wird den Tieren an d0 und d14 OVA+Alum intraperitoneal injiziert. Die Challenge, d.h. inhalative Aufnahme von 1% OVA erfolgt beim akuten Asthmamodell an d21 bis d23 . B) Für das chronische Asthmamodell werden die Tiere repetitiv an jeweils drei Tagen drei aufeinander folgender Wochen (d21 - d23, d28 - d30, d35 - 37) einem 1%igen OVA-Aerosol ausgesetzt. Die Analyse des Atemwegswiderstands mittels FlexiVent erfolgt an d24 und d25 (akut) bzw. d38 und d39 (chronisch) (A, B).

### 3.8.1.2 Atemwegshyperreagibilität

Die Untersuchung der Atemwegshyperreagibilität (AHR) infolge einer Ovalbumin-Induktion erfolgte mit Hilfe des FlexiVent System. Für die Lungenfunktionsmessung wurden die Mäuse mit einer Kombination aus Fentanyl (50 µg/kg), Medetomidin (0,5 mg/kg) und Midazolam (5 mg/kg) anästhesiert. Vor intraperitonealer Applikation des Narkosegemisches wurde den Mäusen zur Schmerzausschaltung Carprofen (5 mg/kg) subkutan injiziert. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde durch Ausbleiben des Lid- sowie Zwischenzehenreflexes festgestellt. Die Maus wurde in Rückenlage auf der 37°C warmen Wärmeplatte fixiert und die Haut ab dem Schultergürtel kaudal eröffnet. Mit zwei Pinzetten wurde die paarige Unterkieferspeicheldrüse (*Glandula submandibularis*) mittig auseinandergezogen und seitlich rechts und links am Mauskopf abgelegt. Mit einer Pinzette wurde nun die Zungenbeinmuskulatur (infrahyale Muskulatur) angehoben und mit einer Schere ab dem Zungenbein (*Os hyoideum*) bis zum Schlüsselbein-Brustbeingelenk (*Articulatio sternoclavicularis*) entfernt. Anschließend wurde eine Ligatur unterhalb der Trachea hindurchgeführt, die der späteren Fixierung der

Beatmungskanüle diente. Nun wurde der Beatmungsmodus des FlexiVent Systems eingeschaltet. Unterhalb des Kehlkopfes wurde die Trachea eingeschnitten und die Beatmungskanüle des FlexiVent Systems mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig in die Trachea geschoben und mit der Ligatur fixiert. Die kontinuierliche Beatmung der Mäuse erfolgte mit einem Atemminutenvolumen von 10 ml/kg (250  $\mu$ l/Atemzug) bei einer Frequenz von 150 Atemzügen pro Minute und einem positiven endexpiratorischen Druck von 2,5 cmH<sub>2</sub>O. Als Muskelrelaxans wurde der Maus unmittelbar vor der Lungenfunktionsmessung Vecuronium (0,1 mg/kg) intraperitoneal injiziert. Durch ein Recruitment-Manöver der Lunge (Lachmann Manöver) zu Beginn jeder Messung wurden kollabierte Lungenbereiche geöffnet. Im Zuge des Lungenfunktionstests wurde eine Lösung aus AEA (1  $\mu$ g/Maus, 20  $\mu$ l, 1% EtOH in 0.9% NaCl, 10 s) in 25 mg/ml 5-HT verwendet. Diese Lösung wurde als Aerosol über den an das FlexiVent System angeschlossenen Aeroneb Ultraschallvernebler in die Lunge appliziert. Den Kontrolltieren wurde EtOH (20  $\mu$ l, 1% EtOH in 0.9% NaCl, 10 s) in 25 mg/ml 5-HT verabreicht. Veränderungen des Atemwegswiderstands wurden während der inhalativen Applikation mit Hilfe des FlexiVent Systems aufgezeichnet und analysiert. Als Atemwegshyperreagibilität wird eine gesteigerte Empfindlichkeit der glatten Atemwegsmuskulatur auf unterschiedliche Stimuli, die eine Obstruktion der Atemwege zur Folge haben, bezeichnet. Im Anschluss an die Messungen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, eine bronchoalveoläre Lavage (Kapitel 3.8.1.3) durchgeführt sowie die Lunge für histologische Untersuchungen (Kapitel 3.4) entnommen und in 4% ROTI®Histofix fixiert.

### 3.8.1.3 Gewinnung der bronchoalveolären Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) erfolgte direkt im Anschluss an die Lungenfunktionsmessungen an Tag 24 und 25 bei akutem Asthma bzw. an Tag 38 und 39 bei chronischem Asthma. Für die visuelle Kontrolle der Lavage wurde der Bauch sowie der Brustkorb der getöteten Mäuse durch einen medianen Längsschnitt geöffnet und das Zwerchfell durchtrennt. Über den bereits bei der Lungenfunktionsmessung gesetzten Schnitt in der Trachea wurde ein feiner, über eine 27G Kanüle gezogener Polyethylen-Schlauch (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) in die Trachea geführt und mit der Ligatur fixiert. Mit einer 1 ml Luer Tuberkulinspritze wurde die Lunge drei Mal mit 1 ml PBS/EDTA-Lösung gespült und die gewonnenen Proben bis zur weiteren Verarbeitung in 15 ml Zentrifugenröhrchen auf Eis gelagert. Die Zentrifugation der Proben erfolgte bei 4°C für 5 min und 600 rpm. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml frischer PBS/EDTA-Lösung resuspendiert. Mittels Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die

Gesamtzellzahl berechnet. Zur Bestimmung der einzelnen Zelltypen wurde die Zellsuspension mittels der Zytocentrifuge Cellspin®I auf spezielle Zytoträger (beides Tharmac GmbH, Wiesbaden, Deutschland) zentrifugiert (6 min, 600 rpm). Nach einer Trocknungszeit von 24h wurden die Proben mittels MorDiff-Quick Schnellfärbekit der Firma Morphisto GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) (Kapitel 3.4.3.3) angefärbt und die verschiedenen Zelltypen anhand morphologischer Merkmale im Lichtmikroskop ausgezählt.

### 3.8.2 Rechtsherzkatheter

Für die Rechtsherzkatheter-Messungen zum Nachweis der Wirkung des AEAs auf den pulmonalen Druck wurden 8 Wochen alte C57BL/6J Mäuse verwendet.

Zur Narkoseeinleitung wurde die Maus in einer Plexiglasbox mit 5 Vol% Isofluran (Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) betäubt, welches über einen Isofluran Vaporiser (VetMed Vapor, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland) durch 0,6 l/min O<sub>2</sub> ausgewaschen und in die Box eingeleitet wurde. Anschließend wurde die narkotisierte Maus intubiert und erhielt eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (50 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg). Die Maus wurde in Rückenlage auf einer 37°C Wärmeplatte fixiert und zur Aufrechterhaltung der Narkose über den Tubus mit 1,5 Vol% Isofluran (100% O<sub>2</sub>) durch den angeschlossenen MiniVent Ventilator (MiniVent Model 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) mit einem Atemzugvolumen von 300 µl und 180 Atemzügen/min beatmet. Für die Applikation der Testsubstanzen wurde der Nebulizer Aerogen Pro (Aerogen, Irland) zwischen den Tubus und den MiniVent plaziert. Nun wurde die Maus im Bereich des Brustkorbs enthaart und dieser über eine Sternotomie eröffnet. Der Perikardbeutel wurde entfernt und das freigelegte Herz mit einer stumpfen Pinzette an der Herzspitze fixiert. Mit Hilfe einer 26G Kanüle wurde der rechte Ventrikel punktiert. Zur Messung des rechtsventrikulären Drucks wurde ein 1F (1/3mm) Druckkatheter der Firma Millar (SPR-1000, Houston, Texas) über die punktierte Stelle in den rechten Ventrikel des Herzens eingeführt und optimal platziert. Über das Millar Aria 1 System (Millar, Houston, Texas), das mit dem PowerLab 16/30 (ADInstruments, Oxford, Vereinigtes Königreich) verbunden war, wurde der rechtsventrikuläre Druck kontinuierlich aufgezeichnet und mit der Software LabChart visualisiert. Nach Aufzeichnung des basalen Drucks wurden mit Hilfe des Nebulizers entweder AEA (0.5 µg/Maus, 50 µl 1% EtOH in 0,9% NaCl) oder EtOH (1% in 0,9 % NaCl) direkt in die Lunge appliziert und parallel die Druckveränderungen im rechten Ventrikel gemessen. Zur Kontrolle der Funktionstüchtigkeit des Verneblers wurde als Positivkontrolle 5 min später

Serotonin (5-HT, 50 mg/ml, 50 µl) vernebelt, wodurch es zu einem maximalen Druckerhöhung kam. Nach Beendigung der Messungen wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet.

Zur Auswertung der Druckveränderungen innerhalb des rechten Ventrikels durch AEA oder EtOH wurde der rechtsventrikuläre Druck 3 min nach Applikation herangezogen und mit dem basalen Druck verglichen. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde der Mittelwert des rechtsventrikulären Drucks über 8 sec ermittelt und für den Vergleich verwendet.

### 3.9 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet. Zur Untersuchung einer Signifikanz wurde der Student`s t-Test (unpaired two-tailed student`s t-test) sowie eine One Way oder Two Way ANOVA mit den Posttests Bonferroni`s oder Tukey`s durchgeführt. Alle dargestellten Diagramm Daten sind als arithmetisches Mittel ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Darstellung der Signifikanzen ist folgendermaßen definiert: \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.10 Kooperationsübersicht

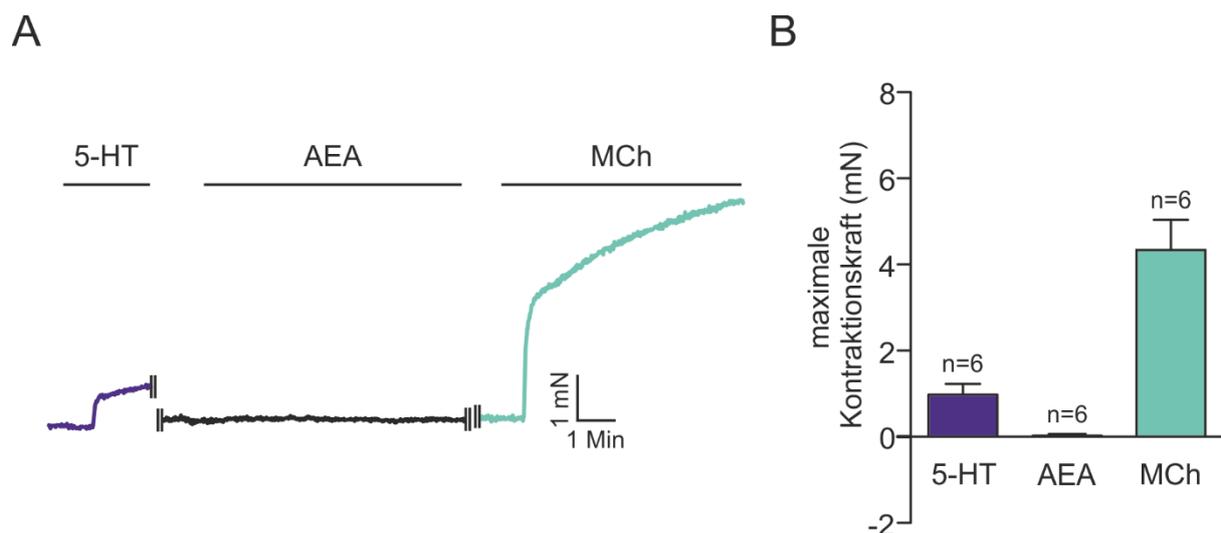
Tabelle 24

	durchgeführt von	Institut
Immunhistochemische Färbungen von Mastrachea und hASMC/hTEPC	Dr. Michaela Matthey	Institut für Physiologie, Abt. Systemphysiologie, Ruhr-Universität Bochum
Transduktion HUVEC	Dr. Sarah Rieck	Institut für Physiologie 1, Universität Bonn
LC-MS/MS	Dr. Laura Bindila	Institut für Physiologische Chemie, Lipidomics Arbeitsgruppe, Universität Mainz
Paraffinschnitte, H&E-Färbung	Astrid Markert	Institut für Physiologie 1, Universität Bonn
Rechtsherzkatheter-Messungen	Alexander Seidinger	Institut für Physiologie, Abt. Systemphysiologie, Ruhr-Universität Bochum
Unterstützung bei FlexiVent Messungen	Jennifer Dietrich	Institut für Physiologie 1, Universität Bonn

### 4 Ergebnisse

#### 4.1 AEA zeigt keinen Effekt auf den basalen Tonus von Trachealringen der Maus

Zuerst wurde anhand isometrischer Kraftmessungen an Trachealringen der Maus untersucht, inwieweit die Gabe einer AEA Einzeldosis den Basaltonus beeinflusst (Abb. 9 A). Hierfür wurden Trachealringe von C57BL/6J Mäusen im Drahtmyographen analysiert. Nach Kalibrierung und Vorspannung wurde zunächst eine Kontraktion mit Serotonin ( $10 \mu\text{M}$ ) induziert, nach dem Auswaschen erfolgte die Applikation von AEA ( $10 \mu\text{M}$ ) auf den Basaltonus. Hierbei zeigte sich kein Effekt (Abb. 9 B). Als Vitalitätskontrolle wurde im Anschluss der starke Bronchokonstriktor Methacholin ( $10 \mu\text{M}$ ) appliziert, wodurch eine starke Kontraktion der Trachea ausgelöst wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass AEA weder einen kontrahierenden noch relaxierenden Effekt auf den basalen Tonus der Atemwegsmuskulatur besitzt. Folglich sollte untersucht werden, welche Wirkung AEA auf die kontrahierte Atemwegsmuskulatur entfaltet.



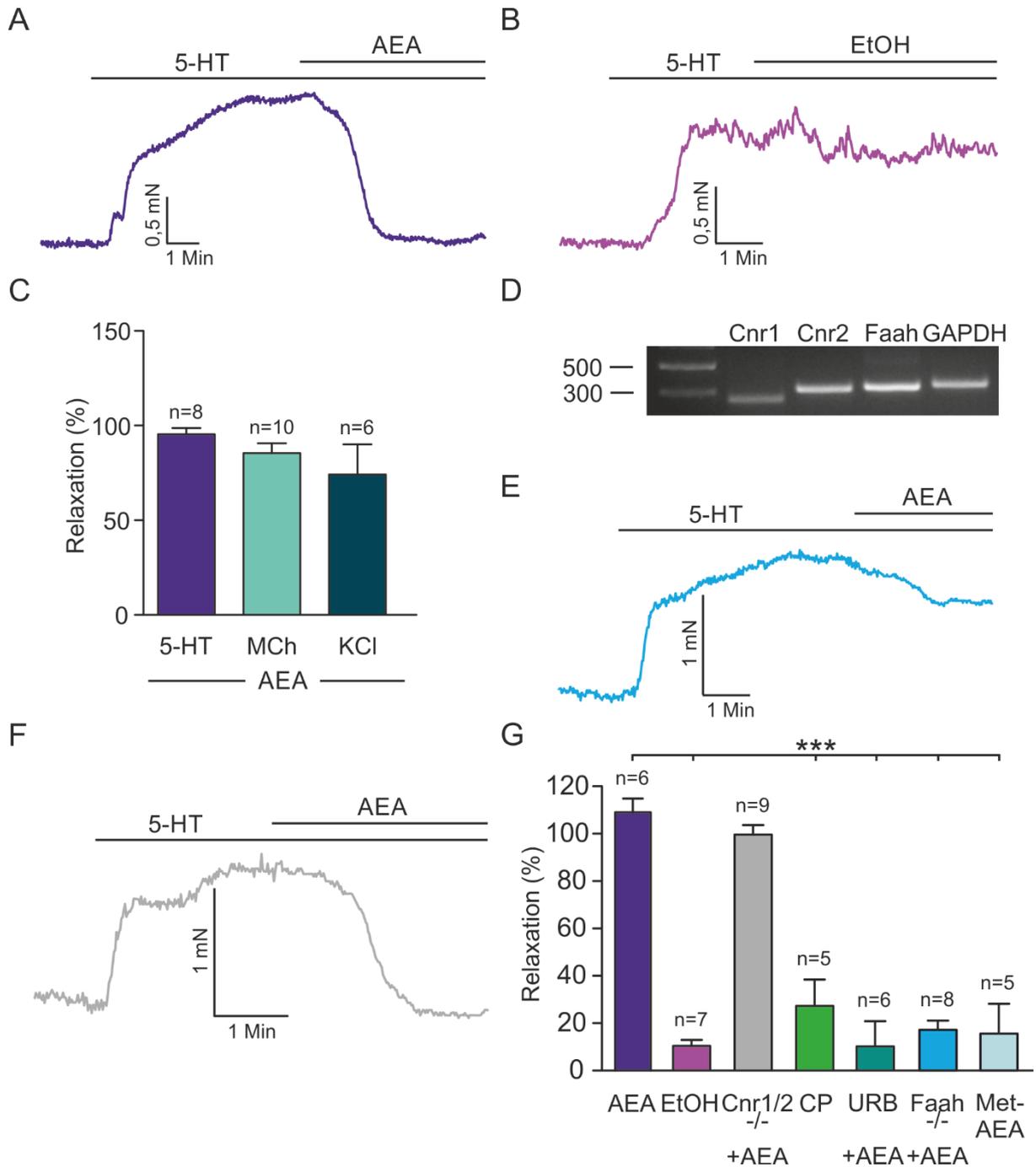
**Abbildung 9: Untersuchung des Effekts von AEA auf den Basaltonus muriner Trachealringe**

A) Originalkurve einer isometrischen Kraftmessung am Myographen bei Applikation von Serotonin (5-HT,  $10 \mu\text{M}$ ), Anandamid (AEA,  $10 \mu\text{M}$ ) und Methacholin (MCh,  $10 \mu\text{M}$ ). B) Statistische Analyse der maximalen Kontraktionskraft bei Applikation der verschiedenen Konstriktoren oder von AEA.

#### 4.2 AEA induziert eine starke Bronchorelaxation in vorkontrahierten Trachealringen

Für die Untersuchung des Effekts von AEA auf die vorkontrahierte Atemwegsmuskulatur wurde AEA auf die durch 5-HT hervorgerufene submaximale Kontraktion der Trachealringe appliziert. Es zeigte sich, dass AEA eine vollständige Relaxation ( $109,9 \pm 4,9\%$ ,  $n=5$ ) der Trachea bewirkt. Im Vergleich hierzu zeigte sich bei Applikation der Lösungsmittels EtOH nur eine geringfügige Relaxation von  $11,4 \pm 1,6\%$ ,  $n=7$ ,  $***p < 0,001$  (Abb. 10 A,B,G). Um zu

zeigen, dass AEA unabhängig von der Art des für die Vorkontraktion verwendeten Bronchokonstriktors relaxierend wirkt, wurde der Effekt von AEA (10  $\mu$ M) nach submaximaler Kontraktion durch 5-HT (3  $\mu$ M), MCh (100 nM) oder dem Rezeptor-unabhängigen Konstriktor KCl (28 mM) verglichen. Hierbei zeigte sich eine vergleichbar starke AEA-Relaxation unabhängig von der Art des Konstriktors. (Abb. 10 C). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass AEA stark relaxierend auf die Atemwegsmuskulatur wirkt. Im Folgenden sollte eingehender untersucht werden, über welche molekularen Mechanismen die Relaxation induziert wird. Um den Signalweg der AEA-induzierten Bronchorelaxation zu bestimmen, wurde zuerst die Expression der Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 sowie des Enzyms Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) in Trachealgewebe mittels PCR untersucht. Hierbei zeigte sich eine eher geringe Expression des CB1 Rezeptors und eine vergleichsweise stärkere Expression von CB2 Rezeptor und des Enzyms FAAH in Trachealgewebe (Abb. 10 D). Um nun herauszufinden, ob die AEA-vermittelte Relaxation der Atemwegsmuskulatur über die Aktivierung der Cannabinoidrezeptoren oder den Abbau von AEA durch das Enzym FAAH vermittelt wird, wurden weitere Messungen an Trachealringen von Cnr1-/-/Cnr2-/- Doppelknockout und Faah-/- Mäusen im Drahtmyographen durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine unverändert starke AEA-induzierte Relaxation in Cnr1-/-/Cnr2-/- Doppelknockout Mäusen (100,5 $\pm$ 3,0%, n=9), wohingegen diese Relaxation in Faah-/- Mäusen signifikant auf 18,2 $\pm$ 2,9%, n=8, \*\*\*p<0,001 vs AEA verringert war (Abb. 10 E - G). Um eine Beteiligung der Cannabinoidrezeptoren an der AEA-induzierten Relaxation weiter auszuschließen, wurde der synthetische, nicht-selektive Cannabinoidrezeptor-Agonist CP55,940 (10  $\mu$ M) verwendet. Dieser bewirkte lediglich eine Relaxation von 28,2 $\pm$ 10,2%, n=5, \*\*\*p<0,001 vs AEA (Abb. 10 G). Da diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass FAAH-abhängige Metaboliten für die AEA-induzierte Relaxation verantwortlich sind, wurde in weiteren Versuchen an Trachealringen der C57BL/6J Mäuse die Wirkung des pharmakologischen FAAH Inhibitors URB597 sowie des nicht-hydrolysierbaren AEA Analogons Methanandamid (Met-AEA) untersucht. Durch die Verwendung des FAAH Inhibitors konnte die AEA-induzierte Relaxation ähnlich deutlich wie in Faah-/- Mäusen verringert werden. Lediglich eine Relaxation von 11,1 $\pm$ 8,8%, n=6, \*\*\*p<0,001 vs AEA ließ sich feststellen. Auch die Applikation von Met-AEA führte nur zu einer Relaxation von 16,5 $\pm$ 8,7%, n=5, \*\*\*p<0,001 vs AEA (Abb. 10 G). Somit können wir zeigen, dass AEA eine Bronchorelaxation auslöst, die FAAH-abhängig ist.

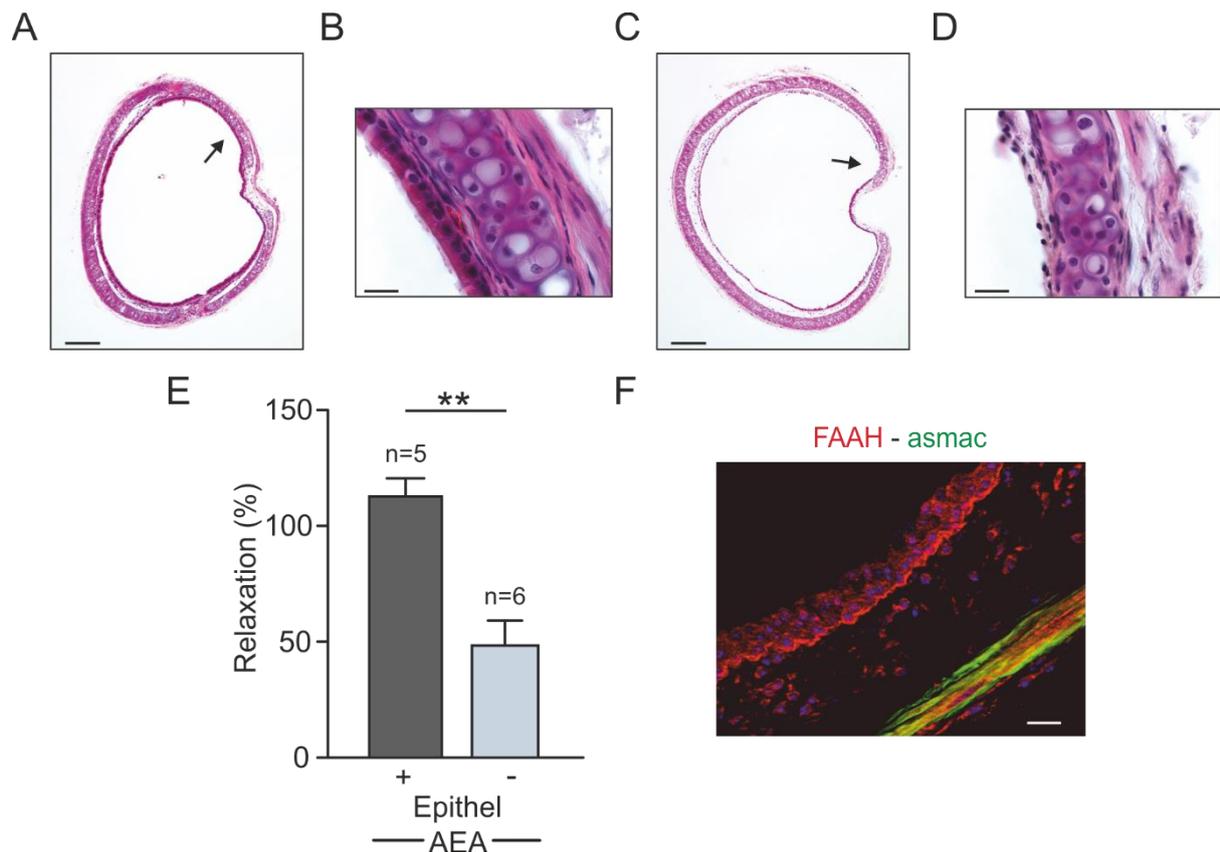


**Abbildung 10: Analyse der AEA-induzierten Relaxation in der Trachea der Maus**

A, B) Originalkurven isometrischer Kraftmessungen am Myographen bei Applikation des Bronchokonstriktors 5-HT und nachfolgender Gabe von AEA (10  $\mu$ M, A) oder des Lösungsmittels EtOH (B). C) Statistische Analyse des relaxierenden Effekts von AEA auf die Kontraktion durch 5-HT (3  $\mu$ M), MCh (0,1  $\mu$ M) und KCl (28 mM). D) Expressionsnachweis der Cannabinoidrezeptoren 1 und 2 (Cnr1, Cnr2) sowie des Enzyms Fettsäureamid-Hydrolase (Faah) auf mRNA-Ebene. Als Positivkontrolle wurde GAPDH verwendet. E, F) Originalkurven der isometrischen Kraftmessung in einer Trachea von Faah<sup>-/-</sup> (E) und Cnr1<sup>-/-</sup>/Cnr2<sup>-/-</sup> Doppelknockout (F) Tieren. G) Statistische Analyse der relaxierenden Wirkung von AEA (10  $\mu$ M), CP 55,940 (10  $\mu$ M), URB597 (URB, 10  $\mu$ M) und Methanandamid (Met-AEA, 10  $\mu$ M), \*\*\*p<0,001. G) One way ANOVA, Tukey's post hoc test.

### **4.3 Die AEA-induzierte Bronchorelaxation hat eine Epithel-abhängige sowie eine Epithel-unabhängige Komponente**

Zur Identifikation der Zelltypen, die die AEA-induzierte Relaxation vermitteln, wurden erneut Trachealringe von C57BL/6J Mäusen verwendet. Bei einigen Ringen wurde das tracheale Epithel mit Hilfe eines Bindfadens mechanisch entfernt, sodass nur noch die Schicht der glatten Muskelzellen vorhanden war. Danach wurde die AEA-induzierte Relaxation am Drahtmyographen untersucht und anschließend die Trachealringe für H&E-Färbungen zum Nachweis der erfolgreichen Epithelentfernung in Paraffin eingebettet (Abb. 11 A - D). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Relaxationsstärke zwischen den Trachealringen mit intaktem Epithel ( $112,7 \pm 7,8\%$ ,  $n=5$ ) und denjenigen ohne Epithel ( $48,4 \pm 10,6\%$ ,  $n=6$ ,  $**p < 0.01$ ) (Abb. 11 E). Demnach führte die mechanische Entfernung des Epithels zu einer Reduktion der Relaxation um etwa 60%, woraus geschlossen werden kann, dass sowohl das Epithel als auch eine Epithel-unabhängige Komponente, wahrscheinlich die glatte Muskulatur, an der Relaxation beteiligt sind. Dies belegt auch der immunhistochemische Nachweis von FAAH, denn sowohl im Epithel als auch in der glatten Muskulatur konnte eine deutliche FAAH Protein Expression mit Hilfe von entsprechenden Antikörpern detektiert werden (Abb. 11 F).

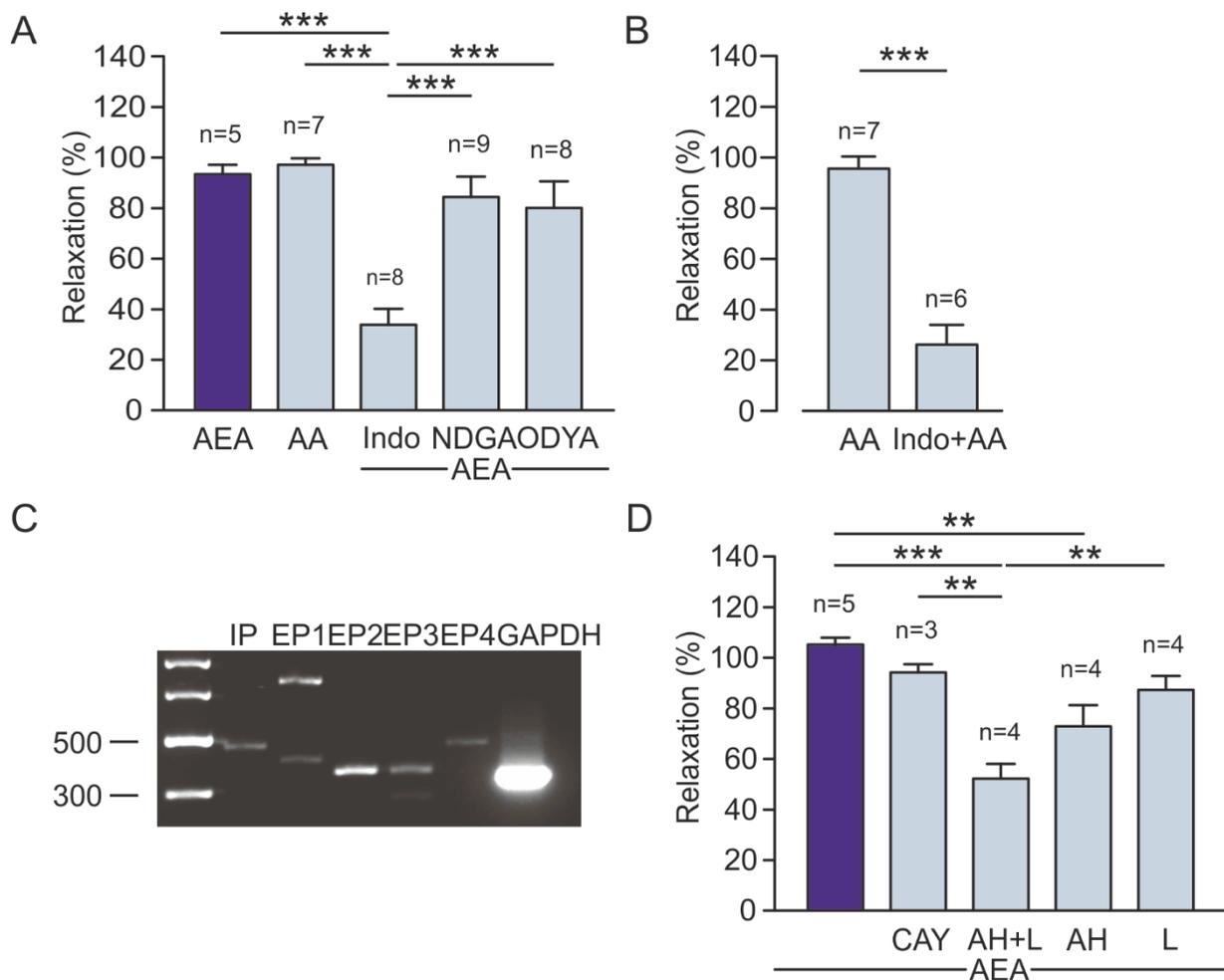


**Abbildung 11: Nachweis der Beteiligung des Epithels an der AEA-induzierten Bronchorelaxation**  
 A-D) H&E-Färbungen von Trachealringen zum Nachweis des intakten Epithels (A, B) sowie nach erfolgreicher mechanischer Entfernung (C, D), Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{m}$  (B,D) und Maßstabsbalken = 200  $\mu\text{m}$  (A,C). E) Statistische Analyse der Relaxation durch AEA in isometrischen Kraftmessungen an Trachealringen mit intaktem Epithel sowie nach mechanischer Entfernung des Epithels,  $**p < 0,01$ . F) Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der FAAH Expression in Epithelzellen sowie in glatter Muskulatur einer Trachea (rot = FAAH, grün = alpha smooth muscle actin), Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{m}$ . E) Unpaired two-tailed student's t-test.

#### 4.4 Die AEA-induzierte Bronchorelaxation erfolgt durch Aktivierung der Prostaglandinrezeptoren EP2 und EP4

Für einen detaillierten Nachweis, welche FAAH-abhängigen AEA Metabolite die Relaxation der Atemwegsmuskulatur vermitteln, wurde zuerst die Wirkung des direkten AEA Metaboliten Arachidonsäure (AA, 10  $\mu\text{M}$ ) an C57BL/6J Trachealringen mittels Drahtmyograph untersucht. Es zeigte sich, dass durch Applikation von AA (97,1 $\pm$ 3,2%, n=7) eine vergleichbar starke Muskelrelaxation induziert werden konnte wie mittels AEA (93,3 $\pm$ 3,7%, n=5) (Abb. 12 A). Dies weist deutlich darauf hin, dass die AEA-induzierte Relaxation über AA und evtl. ihre Abbauprodukte vermittelt wird. Da bekannt ist, dass die weitere Metabolisierung von AA durch Cyclooxygenasen (COX), 5-Lipoxygenase (5-LOX) oder Cytochrom 450 Monooxygenasen (CYP450) erfolgen kann, wurden in den nachfolgenden Versuchen am Drahtmyographen pharmakologische Inhibitoren für diese Enzyme verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die Applikation des COX Inhibitors Indometacin (Indo, 10  $\mu\text{M}$ ) zu einer signifikanten Reduktion

der AEA-induzierten Relaxation auf  $33,9 \pm 6,2\%$ ,  $n=8$ ,  $***p < 0,001$  vs AEA führt. Im Gegensatz dazu konnte keine Veränderung der Relaxation durch Applikation des 5-LOX Inhibitors Nordihydroguaiaretinsäure (NDGA,  $10 \mu\text{M}$ ,  $84,4 \pm 8,5\%$ ,  $n=9$ ) oder des Cytochrom P450 Monooxygenasen Inhibitors 17-Octadecinsäure (ODYA,  $1 \mu\text{M}$ ,  $80,1 \pm 10,5\%$ ,  $n=8$ ) detektiert werden (Abb. 12 A). Als zusätzlichen Nachweis, dass die AEA-induzierte Relaxation eine Folge der Hydrolyse durch FAAH ist und AEA nicht direkt durch COX metabolisiert wird, wurde der Effekt von Indometacin auf die AA-induzierte Bronchorelaxation untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Indometacin die AA-vermittelte Relaxation im selben Maße wie die durch AEA hervorgerufene Relaxation zu inhibieren vermochte, was wiederum auf die Beteiligung von FAAH/AA hindeutet (Abb. 12 B). Bekannt ist, dass aus der Metabolisierung von AA durch Cyclooxygenasen die relaxierend wirkenden Eicosanoide Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) gebildet werden. Diese Eicosanoide vermitteln ihren Effekt durch Bindung an den Prostacyclin-Rezeptor (IP) oder die vier verschiedenen Prostaglandin-Rezeptoren EP1 bis EP4. Die Expression aller genannten Rezeptoren in Trachealgewebe konnte mittels PCR nachgewiesen werden (Abb. 12 C). Da die Aktivierung von IP, EP2 und EP4 Rezeptoren jeweils eine Relaxation vermitteln kann, wurde nachfolgend ihre jeweilige Rolle bei der AEA-vermittelten Relaxation untersucht. Verwendet wurden hierfür der IP-Rezeptor Antagonist CAY10441, der EP/DP Antagonist AH6809 sowie der selektive EP4-Rezeptor Antagonist L161,982. Hierbei zeigte sich, dass durch die Applikation des IP-Rezeptor Antagonisten CAY10441 ( $3 \mu\text{M}$ ) die AEA-vermittelte Relaxation nicht beeinflusst werden konnte ( $94,2 \pm 3,3\%$ ,  $n=3$ ). Im Gegensatz dazu bewirkte die Applikation des EP/DP Antagonisten AH6809 sowie vor allem die Kombination von AH6809 ( $10 \mu\text{M}$ ) mit dem EP4 Antagonisten L161,982 ( $2 \mu\text{M}$ ) eine signifikante Reduktion der AEA-vermittelten Relaxation um 48% auf  $56 \pm 5,1\%$ ,  $n=4$ ,  $***p < 0,001$  vs AEA) (Abb. 12 D). Dies deutet darauf hin, dass die AEA-induzierte Bronchorelaxation über die Aktivierung der Prostaglandin-Rezeptoren EP2 und EP4 vermittelt wird.



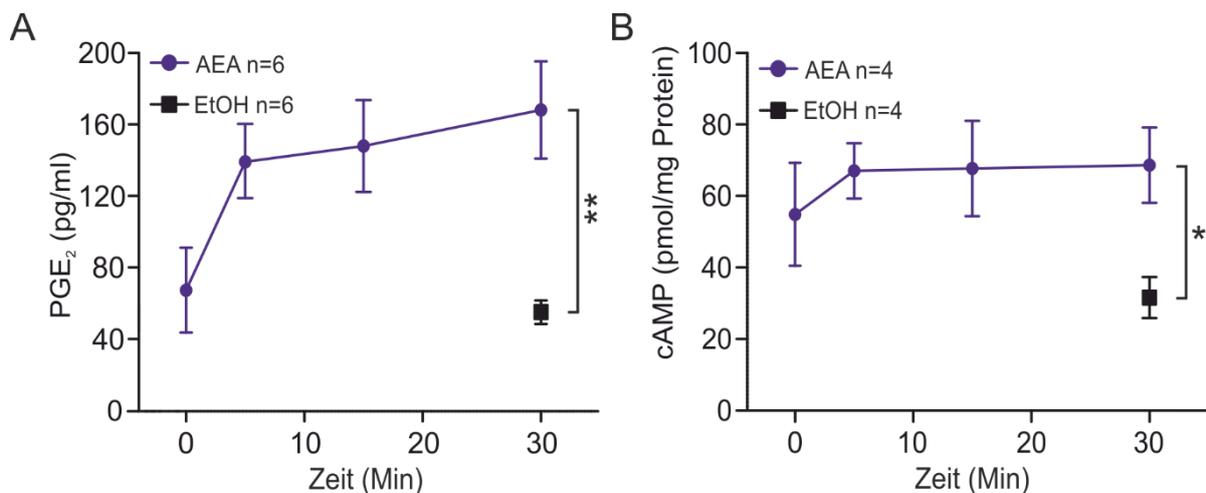
**Abbildung 12: Analyse der durch AEA Stimulation induzierten intrazellulären Signalkaskade**

A) Statistische Analyse der AEA-induzierten Relaxation in isometrischen Kraftmessungen im Vergleich zu Arachidonsäure (AA, 10  $\mu$ M) sowie unter Verwendung der Inhibitoren Indometacin (Indo, 10  $\mu$ M), Nordihydroguajaretinsäure (NDGA, 10  $\mu$ M) sowie 17-Octadecensäure (ODYA, 10  $\mu$ M). B) Statistische Analyse der durch AA hervorgerufenen Relaxation unter Verwendung des COX Inhibitors Indometacin (Indo, 10  $\mu$ M). C) Nachweis der mRNA Expression des Prostacyclin-Rezeptors (IP) sowie der 4 bekannten Prostaglandin-Rezeptoren (EP1 – EP4). D) Statistische Analyse der AEA-induzierten Relaxation in isometrischen Kraftmessungen unter Verwendung der Inhibitoren CAY10441 (CAY, 3  $\mu$ M), AH6809 (AH, 10  $\mu$ M) sowie L161,982 (L, 2  $\mu$ M). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . A, D) One way ANOVA, Tukey`s post hoc test. B) Unpaired two-tailed student`s t-test.

#### 4.5 AEA steigert die PGE2 und cAMP Produktion in bronchialen Epithelzellen sowie in glatten bronchialen Muskelzellen

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Prostaglandin-Rezeptoren EP2 und EP4 eine wesentliche Rolle bei der AEA-vermittelten Relaxation der Atemwege spielen. Aktiviert werden diese Rezeptoren endogen durch Prostaglandin E2 (PGE2), weshalb nachfolgend mittels ELISA die PGE2 Produktion des Trachealgewebes unter AEA Stimulation untersucht wurde. Hierfür wurden Trachealringe in Krebs-Henseleit Puffer mit AEA (10  $\mu$ M) oder dem Lösungsmittel EtOH stimuliert, nach 0, 5, 15 und 30 Minuten wurde der Überstand abgenommen und die PGE2 Konzentration mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass die

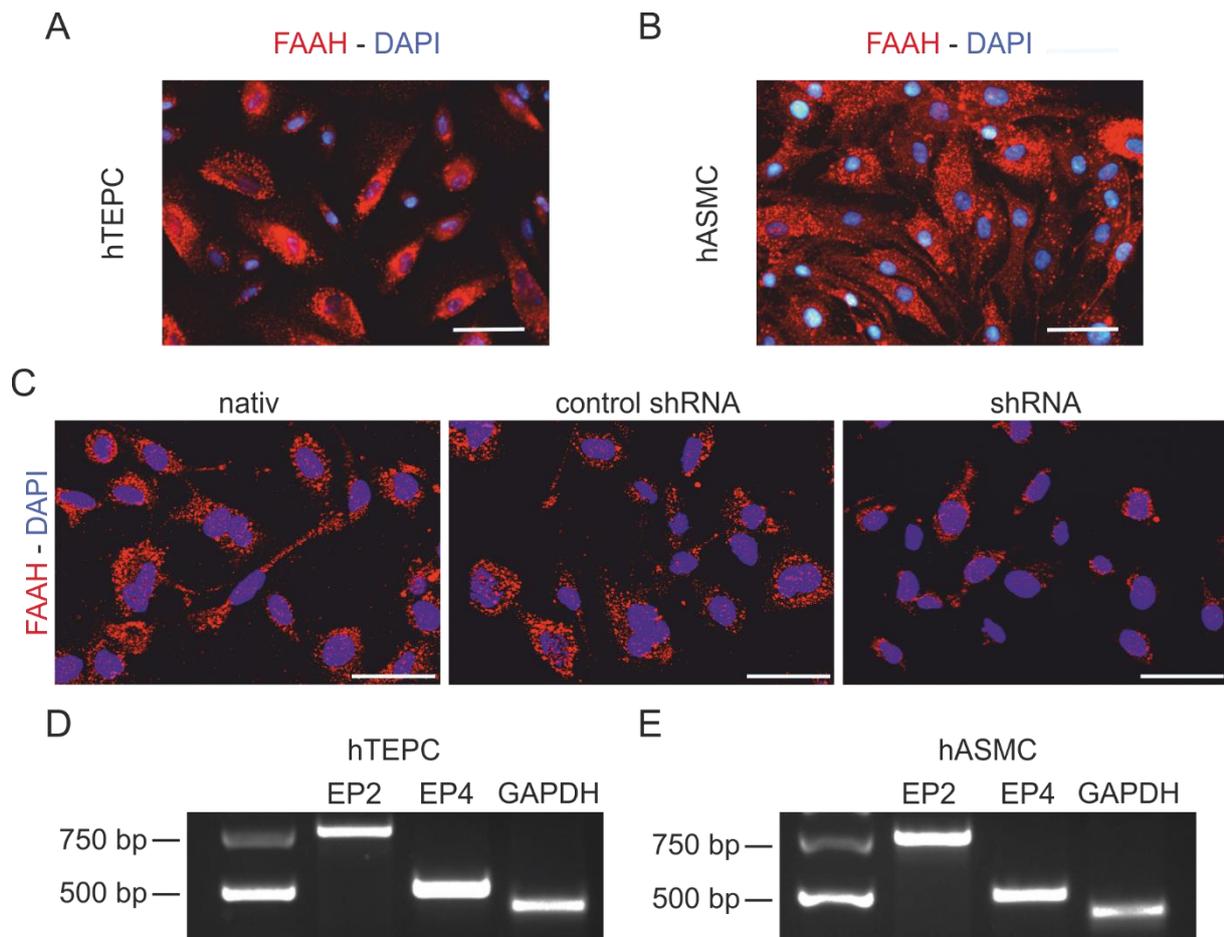
PGE<sub>2</sub> Konzentration unter AEA Stimulation zeitabhängig angestiegen ist. Nach 30-minütiger Stimulation betrug die PGE<sub>2</sub> Konzentration nach AEA Stimulation 168,5±27,1 pg/ml, n=6 im Vergleich zur Kontrolle mit EtOH 55,5±6,6 pg/ml, n=6, \*\*p<0,01 (Abb. 13 A). Da bekannt ist, dass die Aktivierung der EP2 und EP4 Rezeptoren durch PGE<sub>2</sub> zu einer Erhöhung des cAMP Spiegels führt, wurde aus denselben Trachealringen zusätzlich die cAMP Produktion unter AEA Stimulation untersucht. Nach 30-minütiger AEA Stimulation war der cAMP Spiegel im Vergleich zur Kontrolle signifikant angestiegen (AEA: 69,1±9,1 pmol/mg Protein, n=4 vs Kontrolle: 32,1±4,9 pmol/mg Protein, n=4, \*p<0,05) (Abb. 13 B).



**Abbildung 13: Analyse der PGE<sub>2</sub> und cAMP Produktion nach AEA Stimulation von Trachealringen**

A) Nachweis der PGE<sub>2</sub> Konzentration im Überstand von Trachealringen mittels PGE<sub>2</sub> ELISA. B) Analyse der cAMP Produktion in trachealem Gewebehomogenisat mittels cAMP ELISA. \*p<0,05, \*\*p<0,01. A) Unpaired two-tailed t-test with Welch correction. B) Unpaired two-tailed student's t-test.

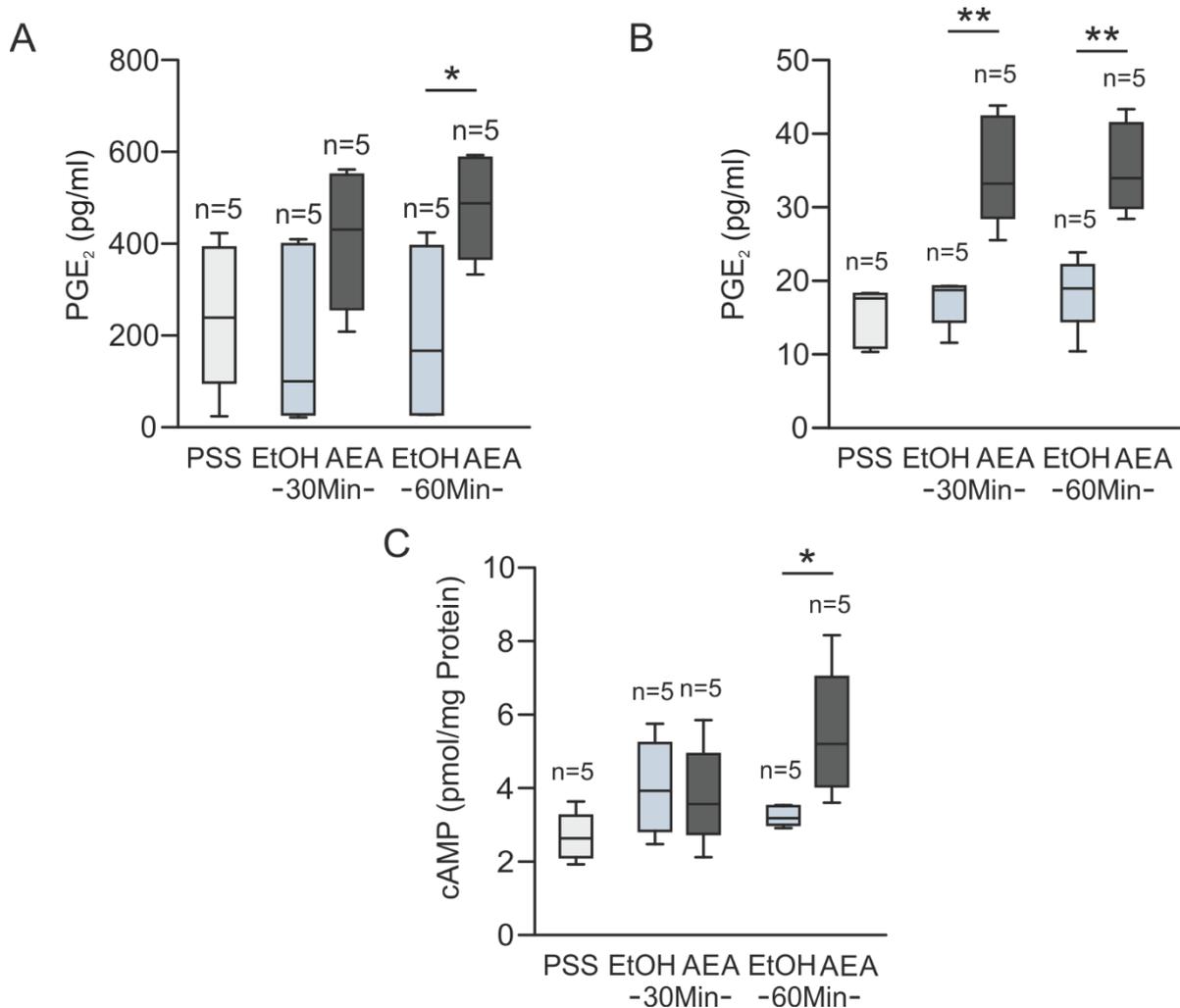
Um herauszufinden, welcher tracheale Zelltyp für die PGE<sub>2</sub> Produktion verantwortlich ist und um unsere Ergebnisse im humanen System zu verifizieren, wurden für weitere Untersuchungen humane tracheale Epithelzellen (hTEPC) sowie humane glatte Muskelzellen der Atemwege (hASMC) analysiert. In immunhistochemischen Färbungen konnte die FAAH Expression in beiden Zelltypen nachgewiesen werden (Abb. 14 A, B). Zum Nachweis, dass der FAAH Antikörper tatsächlich das FAAH Protein anfärbt, wurden Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) mit FAAH shRNA sowie Kontroll shRNA transduziert und anschließend anhand der immunhistochemischen Färbung die FAAH Expression überprüft. Hierbei zeigte sich die erwartete deutliche Reduktion der Antikörperfärbung nach Herunterregulation mittels Faah mRNA im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 14 C). Somit können wir zeigen, dass der FAAH Antikörper spezifisch das Enzym FAAH detektiert. In PCR Analysen ließ sich zudem belegen, dass die Prostaglandin-Rezeptoren EP2 und EP4 in den humanen Zellen exprimiert werden (Abb. 14 D, E).



**Abbildung 14: Analyse der FAAH- und Prostaglandin-Rezeptorexpression in humanen Zellen**

A, B) Immunhistochemische Färbung humaner trachealer Epithelzellen (hTEPC, A) und glatter Muskelzellen der Atemwege (hASMC, B) zum Nachweis von FAAH (rot). Darstellung der Zellkerne mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Höchst 33342 (blau). Maßstabsbalken = 50  $\mu$ m. C) Nachweis der FAAH Antikörperspezifität anhand immunhistochemischer Färbungen transduzierter HUVEC. Maßstabsbalken = 50  $\mu$ m. D, E) mRNA Expression der Prostaglandin-Rezeptoren 2 und 4 (EP2, EP4) in hTEPC und hASMC.

Nachfolgend wurde zudem untersucht, ob eine AEA Stimulation auch in hTEPC sowie hASMC zu einer verstärkten PGE<sub>2</sub> sowie cAMP Produktion führt. Hierfür wurden die Zellen jeweils für 30 und 60 Minuten mit AEA (10  $\mu$ M) oder dem Lösungsmittel (EtOH) stimuliert und der Überstand sowie das Zellhomogenisat für ELISA Untersuchungen verwendet. Eine erhöhte PGE<sub>2</sub> Produktion konnte im Überstand stimulierter hTEPC nach 60 Minuten (479,4 $\pm$ 45 pg/ml, n=5) (Abb. 15 A) sowie im Überstand der hASMC (Abb. 15 B) nach 30 (35 $\pm$ 3,3 pg/ml, n=5) und 60 Minuten (35,3 $\pm$ 2,7 pg/ml, n=5) nachgewiesen werden. Dies belegt, dass die AEA Stimulation die PGE<sub>2</sub> Produktion in beiden Zelltypen induziert. Ein erhöhter cAMP Spiegel ließ sich nach 60-minütiger AEA Stimulation in hASMC (5,5 $\pm$ 0,7 pmol/ml Protein, n=5) messen und zeigt, dass die bronchiale Relaxation über die Bildung des second messengers cAMPs in bronchialen Muskelzellen vermittelt wird (Abb. 15 C).

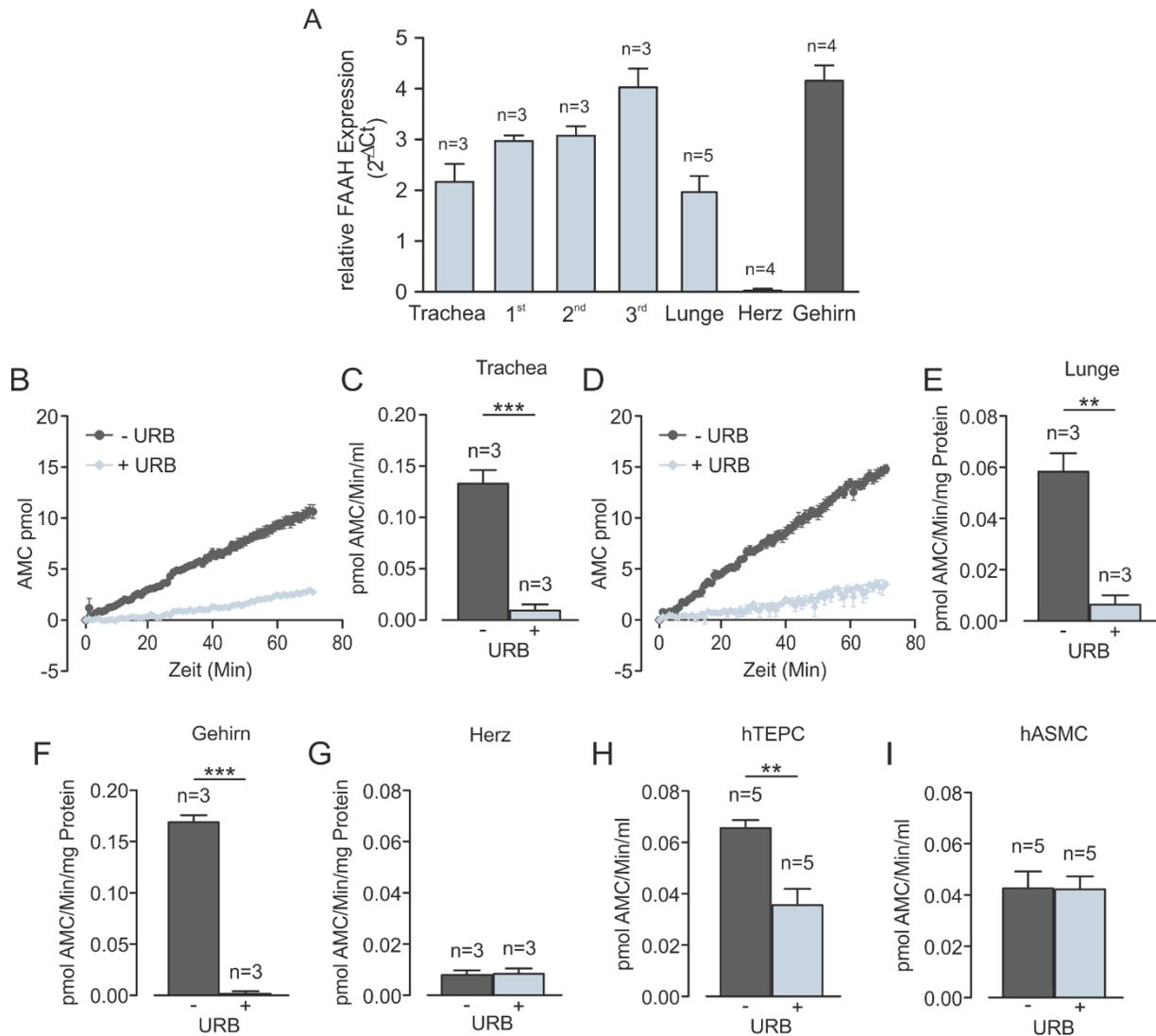


**Abbildung 15: Analyse der PGE<sub>2</sub> und cAMP Produktion in humanen Zellen**

A, B) Nachweis der PGE<sub>2</sub> Produktion nach AEA Stimulation im Überstand von hTEPC (A) und hSMC (B) mittels PGE<sub>2</sub> ELISA. C) Bestimmung der cAMP Produktion im Zelllysate der hSMC mittels cAMP ELISA. \*p<0,05, \*\*p<0,01. A-C) Two Way ANOVA, Bonferroni`s post hoc test.

#### 4.6 AEA induziert eine Relaxation der intrapulmonalen Atemwege *ex vivo*

Die oben beschriebenen Untersuchungen konnten zeigen, dass AEA eine starke Relaxation der Trachealmuskulatur bewirkt. Weiterführend sollte untersucht werden, ob AEA auch in kleineren Bronchien und Bronchiolen eine Relaxation der glatten Muskulatur auslöst. Hierfür wurde zuerst die Faah Expression in verschiedenen Abschnitten der Atemwege der Maus mittels qPCR untersucht. Eine deutliche Faah Expression ließ sich in den Hauptbronchien, Lappenbronchien aber vor allem den kleinen Segmentbronchien nachweisen. Dabei zeigte sich ein ähnlich hohes Faah Expressionslevel in den Segmentbronchien wie in der Positivkontrolle, dem Gehirn. Insgesamt konnte entlang des gesamten Atemwegssystems im Vergleich zur Negativkontrolle, dem Herzen, eine starke Faah Expression detektiert werden (Abb. 16 A).

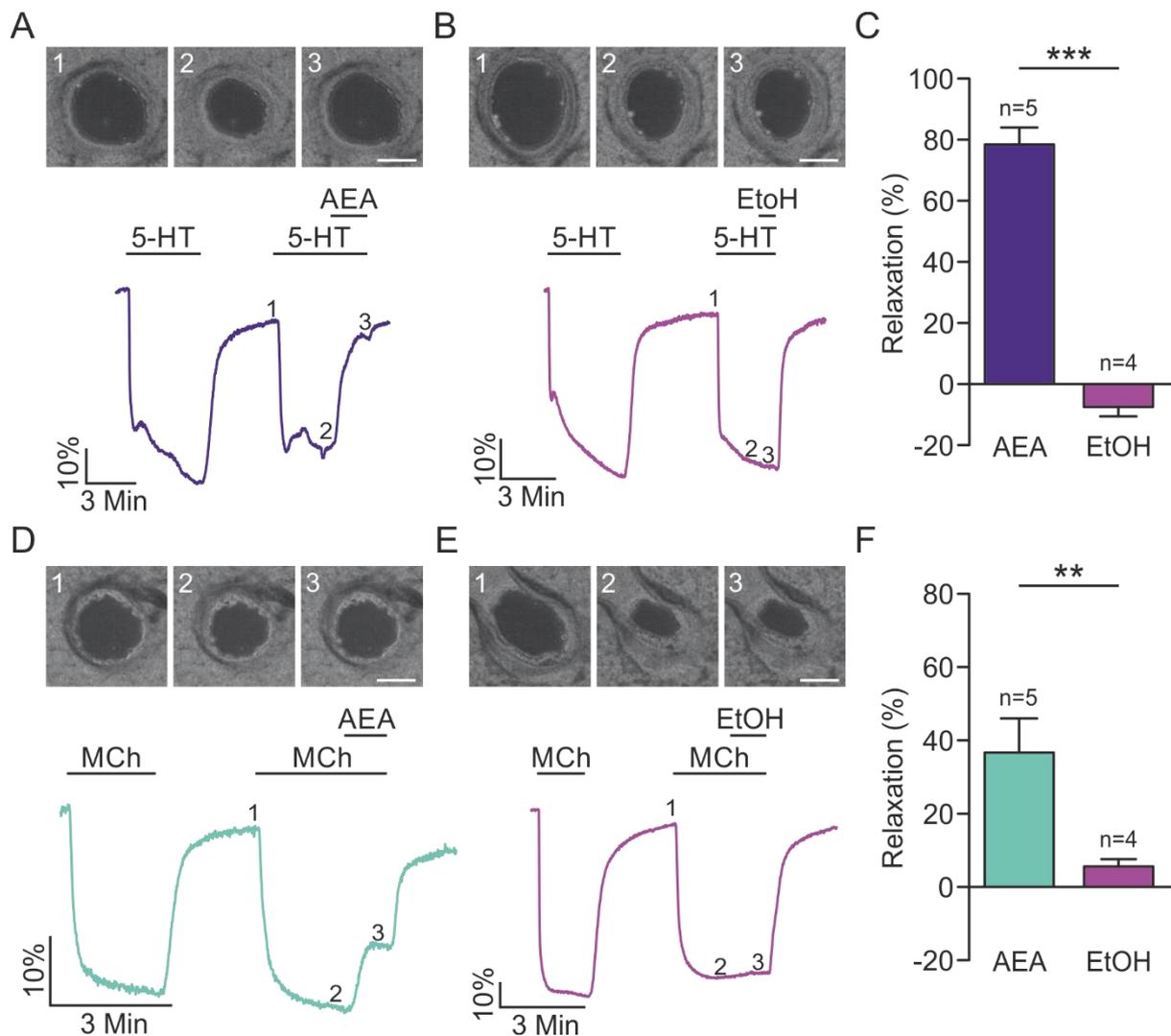


**Abbildung 16: Nachweis der FAAH Aktivität in verschiedenen Mausegeweben und humanen Zellen**

A) Quantitativer Expressionsnachweis von Faah in den unterschiedlichen Abschnitten des Bronchialsystems (1st = Hauptbronchien; 2nd = Lappenbronchien; 3rd = Segmentbronchien) im Vergleich zum Herzen (Negativkontrolle) sowie zum Gehirn (Positivkontrolle). B - E) Darstellung der enzymatischen FAAH Aktivität in Trachea und Lunge als Originalkurve (B, C) sowie die statistische Auswertung (C, E), jeweils unbehandelt und unter Verwendung des spezifischen FAAH Inhibitors URB597 (10  $\mu$ M). F, G) Nachweis der FAAH Aktivität für Gehirn (Positivkontrolle) und Herz (Negativkontrolle), nativ und unter Verwendung von URB597 (10  $\mu$ M). H, I) Analyse der FAAH Aktivität in hTEPC und hASM C nativ und unter Verwendung von URB597 (10  $\mu$ M). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . (C, E, F, H) Unpaired two-tailed student's t-test.

Da die Faah Expression nicht zwangsläufig mit der FAAH Aktivität korreliert, wurde die enzymatische Aktivität dieses Enzyms in verschiedenen Mausegeweben sowie hTEPC und hASM C untersucht (Abb. 16 B - I). Unsere Daten zeigen, dass sowohl in Trachea, Lunge und vor allem dem Gehirn (Positivkontrolle) eine deutliche FAAH Aktivität nachweisbar ist (Abb. 16 B - F). Mit Hilfe des FAAH Inhibitors URB597 konnte diese Aktivität jeweils nahezu vollständig aufgehoben werden. Interessanterweise konnte im Herzen keine FAAH Aktivität nachgewiesen werden, was sich sehr gut mit der fehlenden Faah Expression im Herzen deckt. Weiterhin konnte in den hTEPC die Aktivität der FAAH dokumentiert werden, während in den

hASMC wahrscheinlich ein zu geringes Faah Expressionslevel vorliegt, um die Aktivität mittels eines Fluoreszenz-basierten Assays messen zu können (Abb. 16 H - I). Für die funktionelle Analyse der AEA-vermittelten Relaxation in den kleinen Bronchien wurden Präzisionsschnitte der Lunge (*Precision cut lung slices, PCLS*) von Mäusen generiert. Diese können mit pharmakologischen Substanzen perfundiert werden, während die Lumenänderung der angeschnittenen Bronchiolen mittels Phasenkontrastmikroskopie verfolgt wird. Als Bronchokonstriktoren wurden 5-HT (1  $\mu$ M) oder MCh (0,1  $\mu$ M) verwendet. Nach submaximaler Konstriktion der Bronchialmuskulatur, die durch eine Abnahme der bronchialen Lumenfläche gekennzeichnet ist, wurden AEA (10  $\mu$ M) oder das Lösungsmittel EtOH appliziert. Hierbei zeigte sich, dass AEA nach 5-HT Vorkonstriktion zu einer fast vollständigen Relaxation der Bronchialmuskulatur führt (81,5% $\pm$ 4,5, n=5), wohingegen die Kontrollsubstanz EtOH (-7,2% $\pm$ 1,8, n=4, \*\*\*p<0,001) keinen Effekt zeigte (Abb. 17 A - C). Eine etwas schwächere AEA Relaxation ließ sich nach MCh Vorbehandlung feststellen (Abb. 17 D - F). Die Untersuchungen belegen, dass AEA relaxierend sowohl auf die Tracheal- als auch Bronchialmuskulatur wirkt.



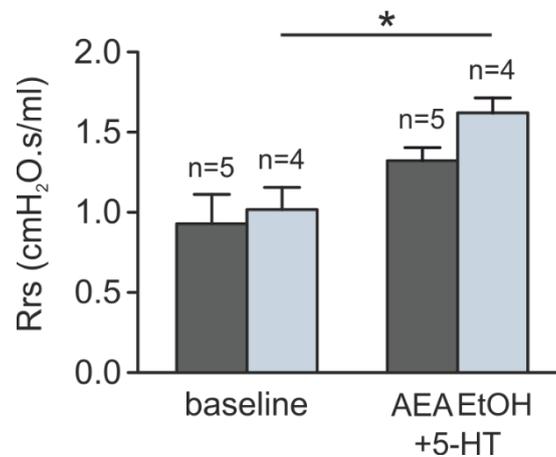
**Abbildung 17: Nachweis der AEA-vermittelten Relaxation in Bronchien und Bronchiolen gesunder C57BL/6J Mäuse**

A, B, D, E) Die Originalkurven mit dazugehörigen Originalaufnahmen gesunder C57BL/6J Mäuse repräsentieren die Veränderung der Lumenfläche an den Zeitpunkten (1, 2, 3), Maßstabsbalken = 50 μm. Jeweils nach Vorkontraktion mit 5-HT (10 μM) oder MCh (1 μM) und Auswaschen erfolgte die submaximale Kontraktion durch 5-HT (1 μM) oder MCh (0,1 μM) gefolgt von der Applikation von 5-HT (1 μM) oder MCh (0,1 μM) in Kombination mit AEA (10 μM) oder der Kontrolle EtOH. C, F) Statistische Analyse der AEA-induzierten Relaxation der intrapulmonalen Bronchien nach Vorkontraktion durch 5-HT (C) bzw. MCh (F) im Vergleich zu EtOH. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. C, F) unpaired two-tailed student`s t-test.

#### 4.7 AEA reduziert den Atemwegswiderstand *in vivo*

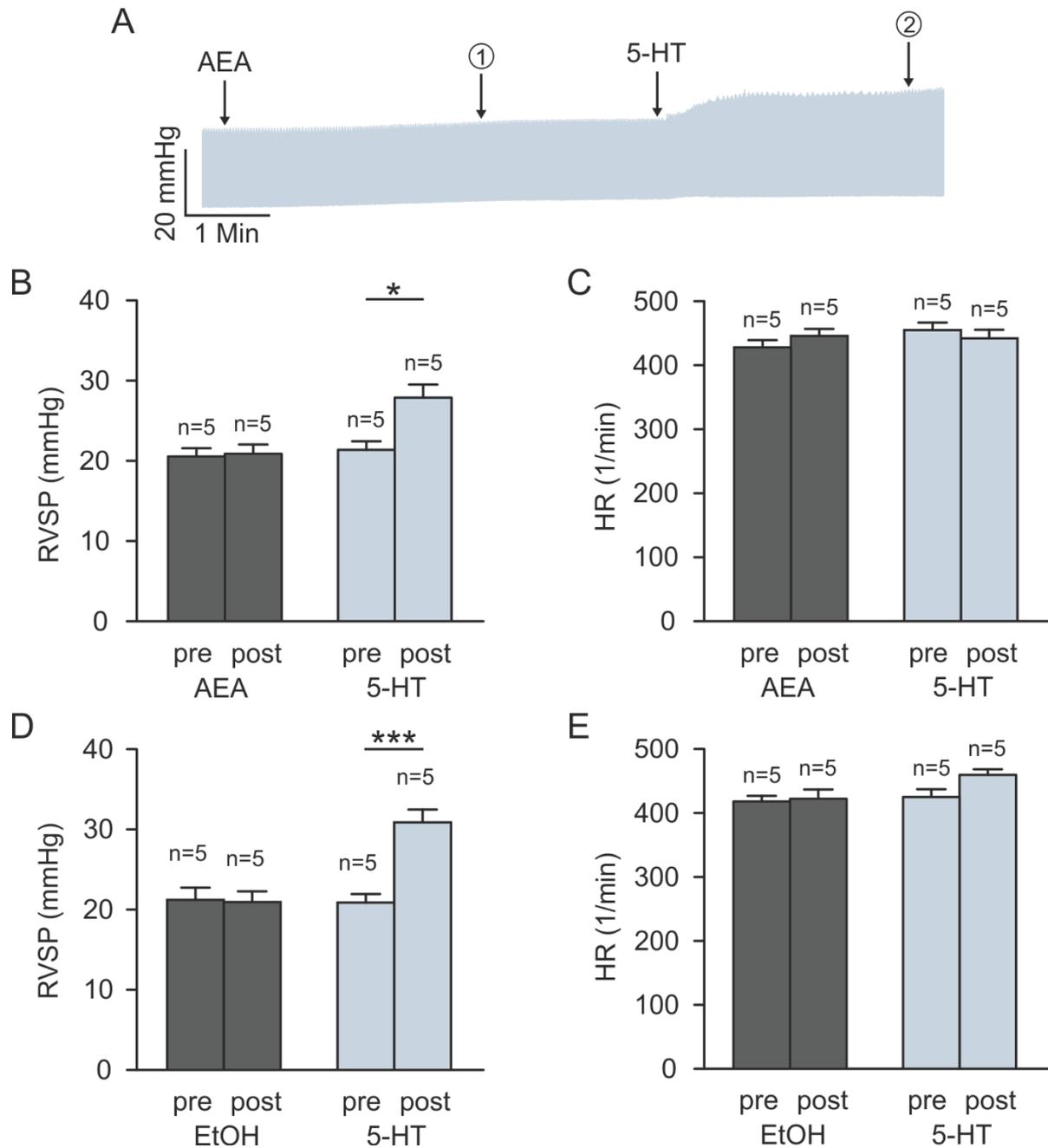
Die zuvor beschriebenen Versuche konnten zeigen, dass AEA *ex vivo* stark relaxierend auf die Muskulatur von Trachea und kleineren Bronchien wirkt. Weiterführend sollte daher der Effekt von AEA auf den Atemwegswiderstand (*Resistance, Rrs*) von C57BL/6J Tieren *in vivo* untersucht werden. Hierfür wurde das FlexiVent System zur Messung der Atemmechanik an der narkotisierten Maus verwendet. AEA (0,5 μg/Maus) oder das Lösungsmittel EtOH wurden jeweils zusammen mit dem Bronchokonstriktor 5-HT (25 mg/ml) als Aerosol während eines Atemmanövers in die Lunge appliziert und die Änderungen der Atemmechanik gemessen.

Hierbei zeigte sich, dass AEA den Anstieg des Atemwegswiderstands im Vergleich zum Lösungsmittel deutlich reduziert (Abb. 18).



**Abbildung 18: Analyse des Atemwegswiderstands gesunder C57BL/6J Mäuse unter 5-HT Provokation**  
Darstellung der Änderung des Atemwegswiderstands (Rrs) durch kombinierte Applikation von 5-HT+AEA im Vergleich zu 5-HT+EtOH. \* $p < 0,05$ ; Two Way ANOVA, Bonferroni's post hoc test.

Um auszuschließen, dass die lokale Applikation von AEA zu Nebenwirkungen insbesondere im Lungenkreislauf führt, wurden zudem Rechtsherz-Kathetermessungen zur Bestimmung des rechtsventrikulären Drucks (*Right ventricular systolic pressure, RVSP*) und der Herzfrequenz (*Heart rate, HR*) durchgeführt (Abb. 19 A).



**Abbildung 19: Untersuchung möglicher Nebenwirkungen der inhalativen AEA Applikation im pulmonal-vaskulären System**

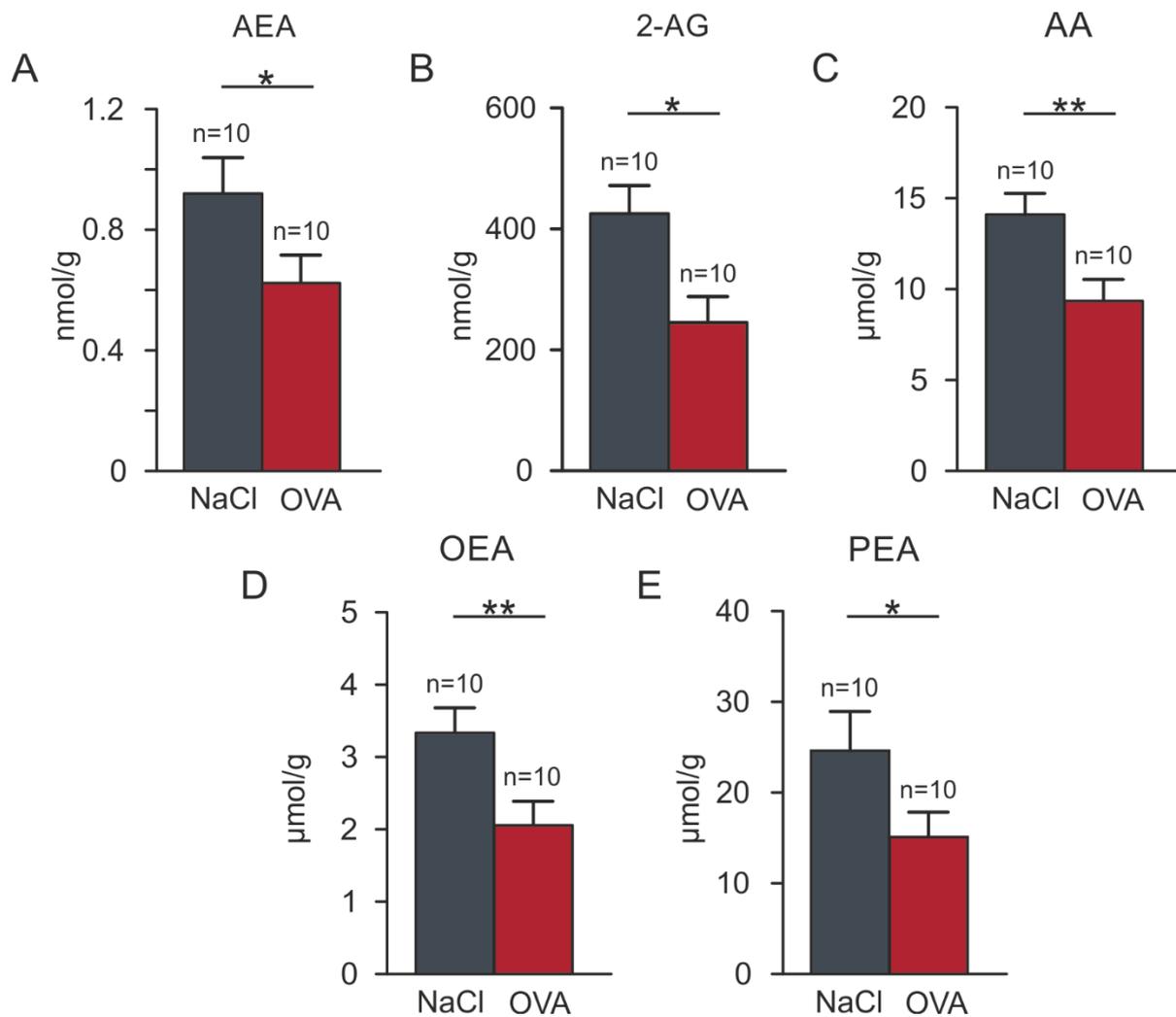
A) Beispielkurve des Druckverlaufs in der Kathetermessung zur Verdeutlichung des Versuchsablaufes, wobei der Druck jeweils an den Punkten 1 und 2 bestimmt wurde. B-E) Statistische Analyse des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSP, B, D) sowie der Herzfrequenz (HR) (C, E) vor und nach Inhalation von AEA (0.5 mg pro Maus), des Lösungsmittels EtOH oder der Positivkontrolle 5-HT (50 mg/ml). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01. A-D) Two Way ANOVA, Bonferroni`s post hoc test.

AEA (0,5 µg/Maus) oder EtOH wurden hierfür mittels Vernebler direkt in die Lunge einer narkotisierten und beatmeten Maus appliziert. Gleichzeitig wurden der rechtsventrikuläre systolische Druck sowie die Herzfrequenz mittels eines kleinen Millar-Katheters im rechten Ventrikel gemessen. Die Analyse ergab, dass weder AEA noch EtOH in der entsprechenden Konzentration zu Änderungen des rechtsventrikulären systolischen Drucks führen (Abb. 19 B, D). Im Vergleich dazu stieg nach Applikation von 5-HT (50 mg/ml, Positivkontrolle) der

rechtsventrikuläre systolische Druck (Abb. 19 B, D) aber nicht die Herzfrequenz (Abb. 19 C, E). Dies belegt, dass die Aerosol Applikation erfolgreich war. Somit induziert die Aerosol Applikation von AEA in der bronchorelaxierenden Konzentration keine kardiovaskulären Nebenwirkungen.

### **4.8 Die AEA Konzentration ist in der Lunge asthmatischer Mäuse reduziert**

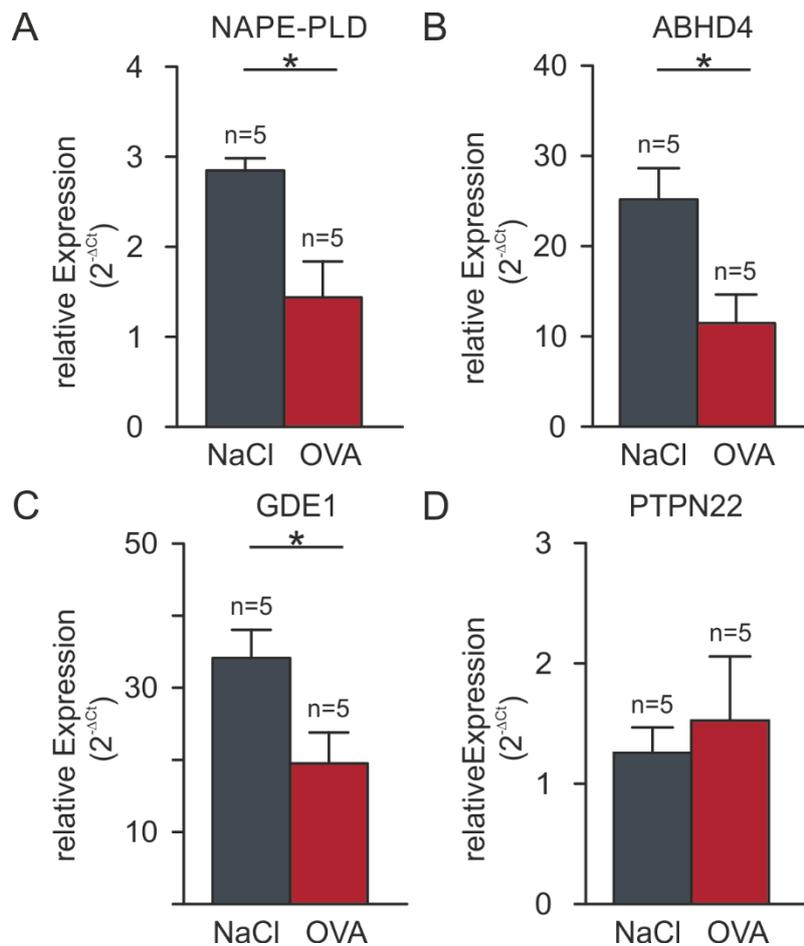
Da wir zeigen konnten, dass AEA als starker Bronchodilatator wirkt, stellte sich die Frage, ob AEA und andere Endocannabinoid-artige Substanzen auch eine pathophysiologische Rolle in der Lunge spielen. Um dies zu überprüfen, haben wir das Ovalbumin-induzierte Asthma-Modell verwendet und die Konzentration verschiedener Endocannabinoid- bzw. Endocannabinoid-ähnlicher Substanzen mittels der Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS) in den Lungen gesunder und asthmatischer Mäuse durch die Lipidomics Arbeitsgruppe des Instituts für Physiologische Chemie der Universität Mainz quantifizieren lassen. Hierbei zeigte sich, dass die Konzentration von AEA, aber auch von 2-Arachidonylglycerol (2-AG), AA sowie von Oleoylethanolamid (OEA) und Palmitoylethanolamid (PEA) im asthmatischem Lungengewebe gegenüber gesundem Gewebe signifikant reduziert war (Abb. 20 A - E).



**Abbildung 20: Quantitative Bestimmung verschiedener Endocannabinoide und Fettsäureamide in murinem Lungengewebe mittels LC-MS/MS**

A-E) Analyse der Konzentration von Anandamid (AEA, A), 2-Arachidonylglycerol (2-AG, B), Arachidonsäure (AA, C), Oleoylethanolamid (OEA, D) sowie Palmitoylethanolamid (PEA, E) in Lungenhomogenisaten gesunder sowie OVA-induzierter asthmatischer Mäuse mittels LC-MS/MS. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . A-E) Unpaired two-tailed student's t-test.

Um zu überprüfen, ob die reduzierte Konzentration von AEA in den Lungen asthmatischer Tiere durch eine verminderte Expression der Synthese Enzyme vermittelt wird, haben wir deren Expression mittels qPCR untersucht. Sowohl für N-Acylphosphatidylethanolaminphospholipase D (NAPE-PLD),  $\alpha/\beta$ -Hydrolase 4 (ABHD4) sowie die Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1 (GDE1) konnte eine signifikant verringerte Expression in asthmatischem Lungengewebe nachgewiesen werden (Abb. 21 A-C). Einzig die Expression der Protein Tyrosin Phosphatase Nicht-Rezeptor Typ 22 (PTPN22) war in beiden Geweben vergleichbar (Abb. 21 D).

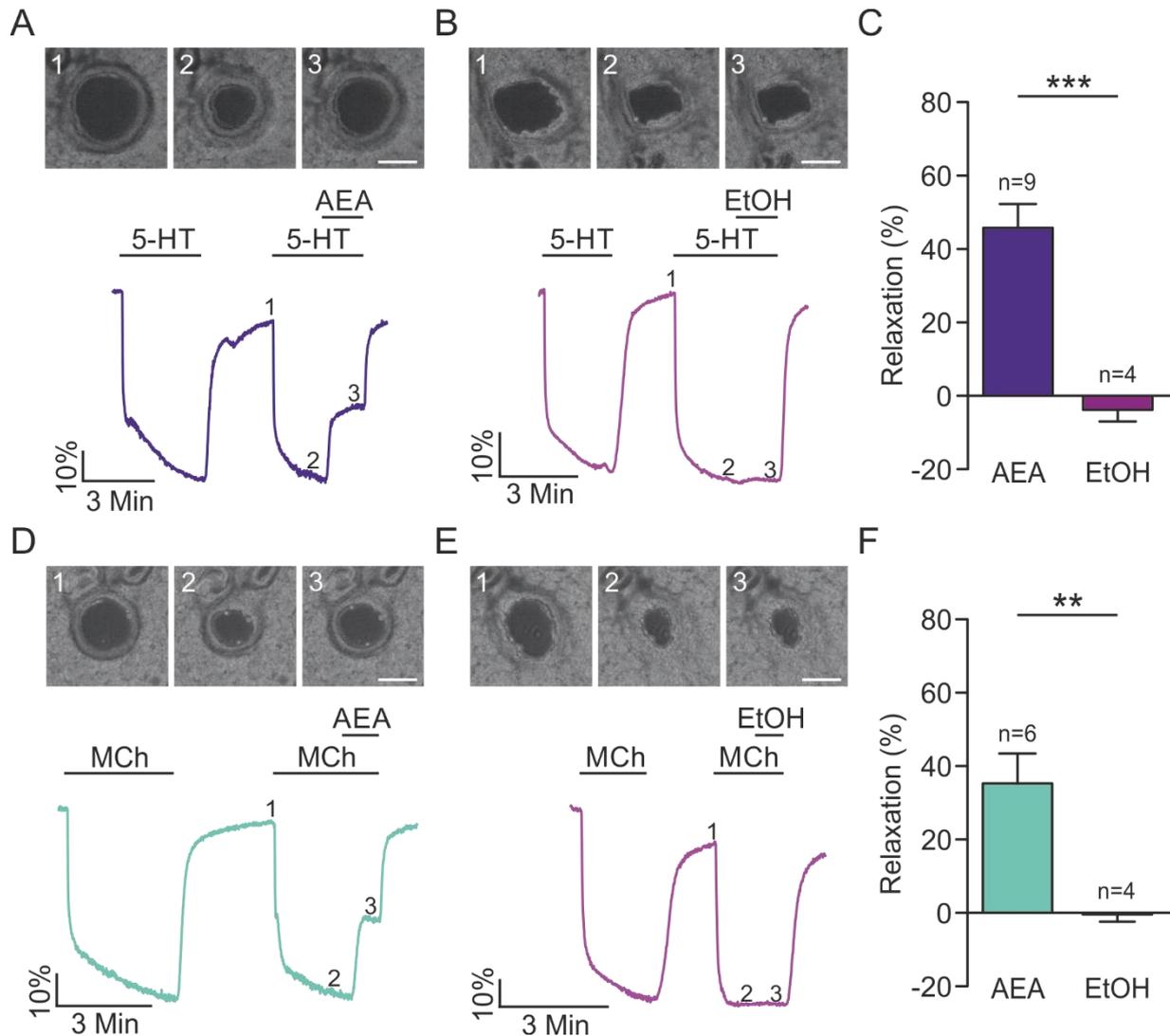


**Abbildung 21: Expressionsnachweis verschiedener AEA Synthese Enzyme in Lungenhomogenisaten gesunder sowie OVA-induzierter Mäuse mit akutem Asthma**

A-D) Quantitativer Expressionsnachweis der AEA-bildenden Enzyme NAPE-PLD, ABHD4, GDE1 sowie PTPN22 in Lungengewebe gesunder sowie OVA-induzierter Mäuse mit akutem Asthma. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . A-D) Unpaired two-tailed student's t-test.

#### 4.9 AEA bewirkt eine starke Relaxation der Atemwegsmuskulatur und reduziert die Hyperreagibilität im OVA-induzierten Asthma Modell

Die reduzierte Expression der AEA Synthese Enzyme sowie die verringerte AEA Konzentration in asthmatischem Lungengewebe könnten wichtige Faktoren bei der Ausbildung der bronchialen Hyperreaktivität bei Asthma bronchiale darstellen. Dementsprechend sollte nachfolgend untersucht werden, ob die therapeutische Applikation von AEA auch in asthmatischem Gewebe zu einer Relaxation der Atemmuskulatur führt und zu einer Verringerung der bronchialen Hyperreagibilität *in vivo* beitragen kann. In einem ersten Schritt wurde die Wirkung von AEA *ex vivo* an PCLS gesunder Balb/c Mäuse getestet, da Untersuchungen zur Pathogenese des Asthma bronchiale üblicherweise in dieser Mauslinie durchgeführt werden. Wie bereits in C57BL/6J Mäusen konnte auch in den Balb/c Mäusen eine starke AEA-induzierte Relaxation der Atemwegsmuskulatur nachgewiesen werden (Abb. 22 A - F).

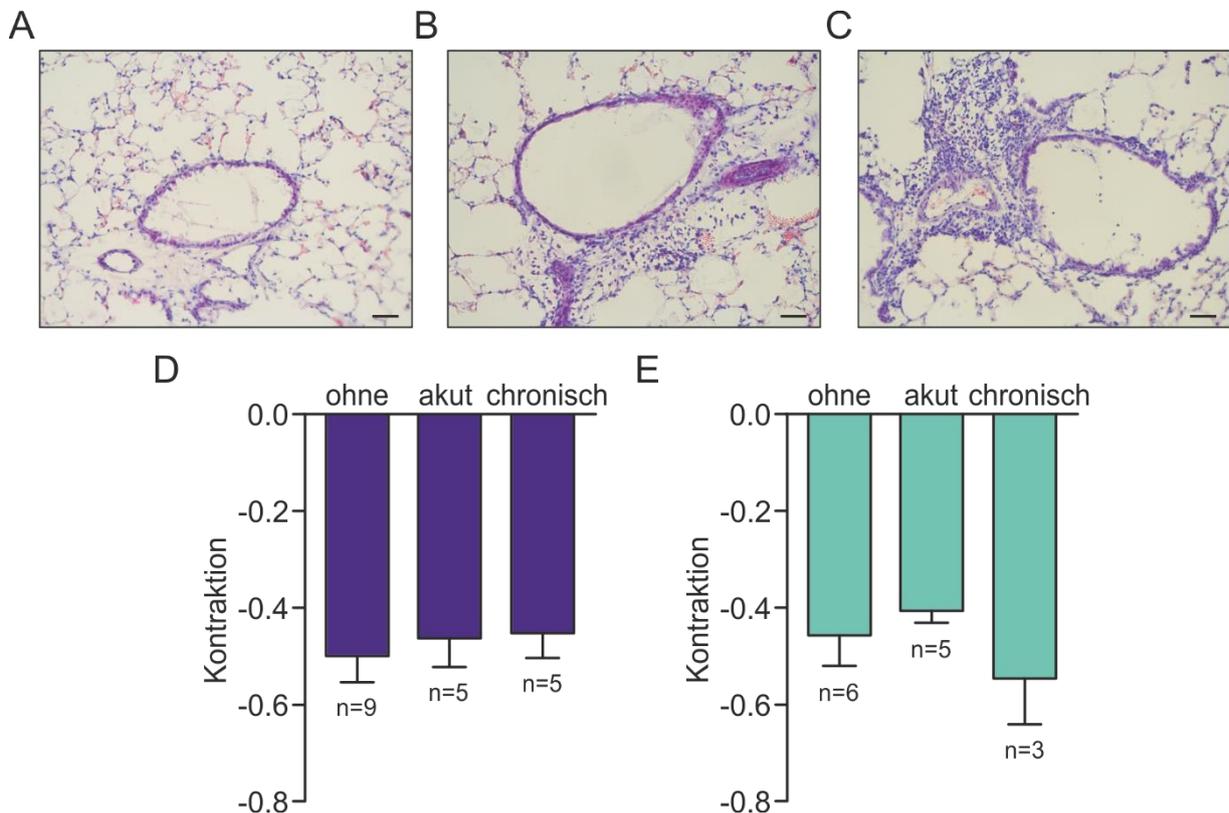


**Abbildung 22: Analyse der AEA-vermittelten Relaxation in Bronchien und Bronchiolen gesunder Balb/c Mäuse**

A, B, D, E) Originalkurven der Perfusion von Lungenschnitten gesunder Balb/c Mäuse mit dazugehörigen Originalaufnahmen zur Verdeutlichung der Lumenänderung an den in der Originalspur gekennzeichneten Zeitpunkten (1, 2, 3), Maßstabsbalken = 50  $\mu$ m. Nach der Vorkontraktion mit 5-HT (10  $\mu$ M) oder MCh (1  $\mu$ M) und Auswaschen erfolgte die submaximale Kontraktion mit 5-HT (1  $\mu$ M) oder MCh (0,1  $\mu$ M) in Kombination mit AEA (10  $\mu$ M) oder der Kontrolle EtOH. C, F) Statistische Analyse der AEA-induzierten Relaxation der Bronchien im Vergleich zum Lösungsmittel EtOH nach Vorkontraktion durch 5-HT (C) oder MCh (F). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . C, F) unpaired two-tailed student's t-test.

Anschließend erfolgte die Bestimmung des Effekts von AEA an PCLS von Mäusen mit akutem oder chronischem OVA Asthma. Hierfür wurde zuerst mit Hilfe histologischer Gefrierschnitte untersucht, ob die Infiltration von Entzündungszellen in der Nachbarschaft der Bronchien und Bronchiolen als typisches Zeichen des OVA Asthma Modells nachweisbar ist. Diese Infiltration der Entzündungszellen war im Vergleich zu normalem Gewebe (Abb. 23 A) sowohl bei akutem (Abb. 23 B) als auch chronischem Asthma (Abb. 23 C) deutlich erkennbar. Als ein weiterer klassischer funktioneller Nachweis des Asthma bronchiale wird die gesteigerte Reizbarkeit der Bronchien, auch als bronchiale Hyperreaktivität bezeichnet, herangezogen. Im Verlauf der

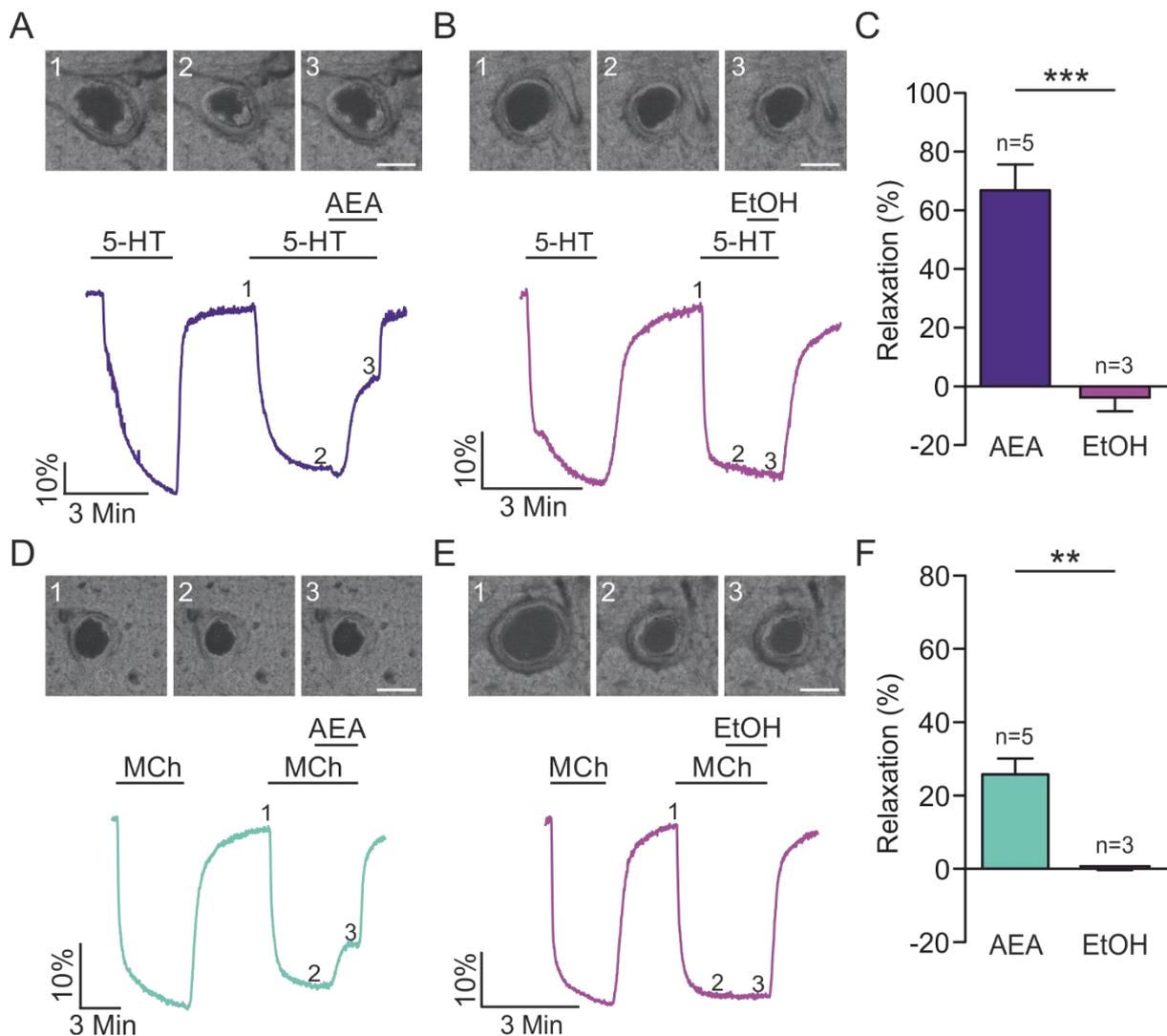
Analysen konnte jedoch weder durch Applikation von 5-HT noch von MCh eine gesteigerte Bronchokonstriktion in asthmatischen PCLS gegenüber gesundem Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 23 D, E). Da die Infiltration der Entzündungszellen eine erfolgreiche Asthma Induktion zeigt, ist die fehlende Hyperreagibilität der Bronchien offenbar auf die Analyse-Methode der PCLS zurückzuführen.



**Abbildung 23: Analyse der erfolgreichen Asthma Induktion mittels H&E-Färbung sowie Untersuchung der pulmonalen Hyperreagibilität**

A - C) H&E-Färbung von Gefrierschnitten der gesunden (A) sowie akut (B) und chronisch (C) asthmatischen Mäuse. Maßstabsbalken = 20 μm. D, E) Statistische Analyse der maximalen Kontraktion der Bronchien während der Perfusion mit 5-HT (10 μM, D) oder MCh (1 μM, E) bei gesunden sowie OVA-induzierten Mäusen mit akutem und chronischem Asthma.

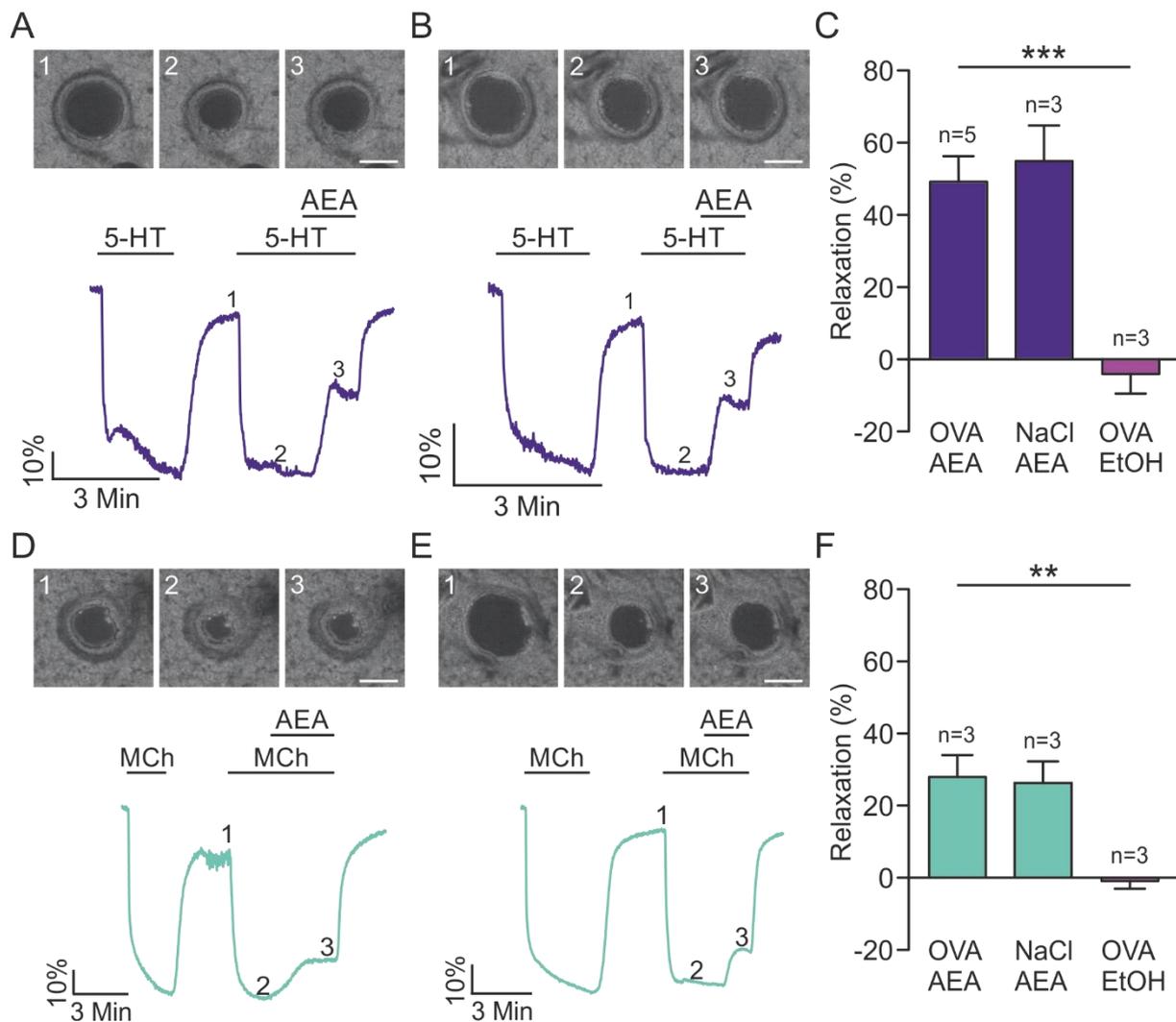
Für die Analyse der AEA Wirkung auf die Atemwegsmuskulatur von Mäusen mit akutem Asthma wurde in PCLS eine Konstriktion der Atemwegsmuskulatur durch 5-HT (1 μM) oder MCh (0,1 μM) hervorgerufen. Nach Ausbildung des Kontraktions-Plateaus erfolgte die Applikation von AEA (10 μM) oder des Lösungsmittels EtOH. Es konnte eine starke AEA-induzierte Relaxation der Atemmuskulatur bei Mäusen mit akutem Asthma festgestellt werden (Abb. 24 A-F).



**Abbildung 24: Analyse der AEA-vermittelten Relaxation in Bronchien und Bronchiolen von Balb/c Mäusen mit akutem Asthma**

A, B, D, E) Originalkurven der Perfusion von Lungenschnitten OVA-induzierter Balb/c Mäuse mit akutem Asthma. Die dazugehörigen Originalaufnahmen dienen der Verdeutlichung der Lumenänderung an den in der Originalspur gekennzeichneten Zeitpunkten (1, 2, 3), Maßstabsbalken = 50  $\mu\text{m}$ . Nach der Vorkontraktion mit 5-HT (10  $\mu\text{M}$ ) oder MCh (1  $\mu\text{M}$ ) und Auswaschen erfolgte die submaximale Kontraktion mit 5-HT (1  $\mu\text{M}$ ) oder MCh (0,1  $\mu\text{M}$ ) gefolgt von der Applikation von 5-HT (1  $\mu\text{M}$ ) oder MCh (0,1  $\mu\text{M}$ ) in Kombination mit AEA (10  $\mu\text{M}$ ) oder der Kontrolle EtOH. (C, F) Statistische Analyse der AEA-induzierten Relaxation der Bronchien im Vergleich zum Lösungsmittel EtOH nach Vorkontraktion mit 5-HT (C) oder MCh (F). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . C, F) Unpaired two-tailed student's t-test.

Gleichermaßen zeigte sich auch eine starke AEA-induzierte Relaxation der Bronchiolen in PCLS von Balb/c Mäusen mit chronischem Asthma. Für die Tiere mit chronischem Asthma konnte nach 5-HT Konstriktion eine Relaxation von  $48,9 \pm 5,8\%$ ,  $n=5$  nachgewiesen werden. Bei den Kontrolltieren, denen lediglich NaCl statt OVA injiziert wurde, bewirkte AEA eine Relaxation von  $53,7 \pm 6,3\%$ ,  $n=3$  im Vergleich zur EtOH Kontrolle ( $-4,8 \pm 4,8\%$ ,  $n=3$ , \*\*\* $p < 0,001$ ) (Abb. 25 A - F). Die starke AEA Relaxation in OVA Tieren beweist, dass die Wirkung von AEA auch im Krankheitsmodell erhalten bleibt.



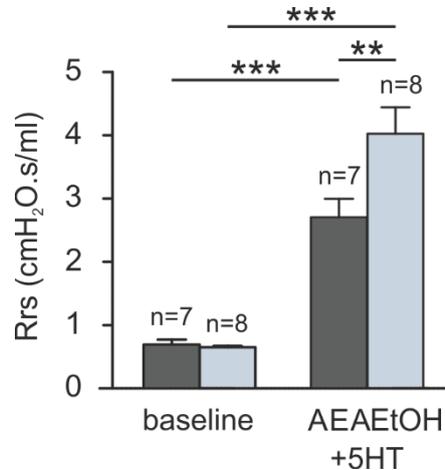
### Abbildung 25: Analyse der AEA-vermittelten Relaxation in Bronchien und Bronchiolen von Balb/c Mäusen mit chronischem Asthma

A, B, D, E) Originalkurven der Perfusion von Lungenschnitten OVA-induzierter Balb/c Mäuse mit chronischem Asthma. Die dazugehörigen Originalaufnahmen dienen der Verdeutlichung der Lumenänderung an den in der Originalspur gekennzeichneten Zeitpunkten (1, 2, 3), Maßstabsbalken = 50  $\mu\text{m}$ . Nach der Vorkontraktion mit 5-HT (10  $\mu\text{M}$ ) oder MCh (1  $\mu\text{M}$ ) und Auswaschen erfolgte die submaximale Kontraktion mit 5-HT (1  $\mu\text{M}$ ) oder MCh (0,1  $\mu\text{M}$ ) gefolgt von der Applikation von 5-HT (1  $\mu\text{M}$ ) in Kombination mit AEA (10  $\mu\text{M}$ ) oder der Kontrolle EtOH. C, F) Statistische Analyse der AEA-induzierten Relaxation der Bronchien im Vergleich zu EtOH nach Vorkontraktion mit 5-HT (C) oder MCh (F). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . (C, F) One Way ANOVA, Tukey's post hoc test.

Da wir erfolgreich zeigen konnten, dass AEA auch im Krankheitsmodell *ex vivo* eine starke relaxierende Wirkung besitzt, sollte nachfolgend untersucht werden, ob AEA auch *in vivo* den Atemwegswiderstand bei asthmatischen Tieren senken kann. Hierfür wurde mittels FlexiVent der Atemwegswiderstand OVA-induzierter Balb/c Mäuse mit akutem Asthma bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass AEA den durch 5-HT induzierten Anstieg des Atemwegswiderstands signifikant verringert (Abb. 26). Durch simultane Applikation von AEA und 5-HT (5-HT, 25 mg/ml) konnte ein reduzierter Atemwegswiderstand von  $2,7 \pm 0,3 \text{ cmH}_2\text{O.s/ml}$ ,  $n=7$ , \*\* $p < 0,01$

## Ergebnisse

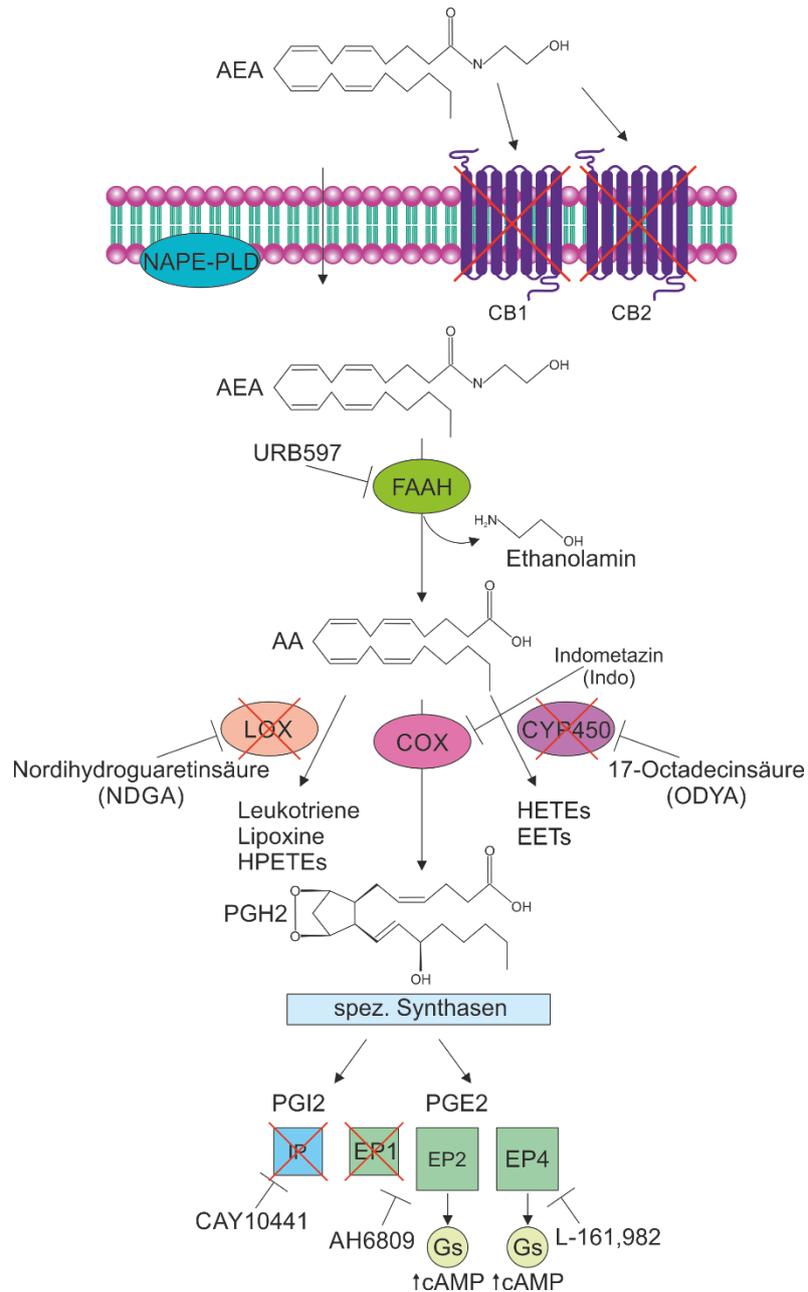
gegenüber  $4,02 \pm 0,4$  cmH<sub>2</sub>O.s/ml, n=8 nach Applikation von EtOH und 5-HT gemessen werden.



**Abbildung 26: Analyse des Atemwegswiderstands OVA-induzierter Balb/c Mäuse mit akutem Asthma unter 5-HT Provokation**

Darstellung der Änderung des Atemwegswiderstands (Rrs) durch kombinierte Applikation von 5-HT+AEA im Vergleich zu 5-HT+EtOH. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; Two Way ANOVA, Bonferroni's post hoc test.

Zusammenfassend zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse deutlich, dass AEA eine stark relaxierende Wirkung sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* im Bronchialsystem gesunder sowie asthmatischer Mäuse besitzt. Eingeleitet wird die relaxierende Wirkung hierbei über den enzymatischen Abbau von AEA durch FAAH zu AA. Weiterführend wird anschließend AA über COX zu PGE<sub>2</sub> umgewandelt. PGE<sub>2</sub> bewirkt nachfolgend die Aktivierung der Prostaglandin-Rezeptoren EP<sub>2</sub> und EP<sub>4</sub>, wodurch es zu einer verstärkten Synthese von cAMP in den glatten Muskelzellen der Bronchien kommt (Abb. 27). Dieser starke relaxierenden Effekt ließ sich sowohl *ex vivo* anhand von Kraftmessungen am Drahtmyographen und Präzisionschnitten der Lunge sowie *in vivo* über die Reduzierung des Atemwegswiderstands unter 5-HT Provokation bei gesunden C57BL/6J und Balb/c Mäusen nachweisen. Massenspektrometrische Analysen zeigen zudem, dass die Konzentration verschiedener Endocannabinoide und endocannabinoid-ähnlicher Stoffe im asthmatischem Lungengewebe deutlich reduziert ist, was auf eine pathophysiologische Bedeutung schließen lässt. In asthmatischen Tieren konnte ebenfalls eine AEA-induzierte Relaxation der Bronchien und Bronchiolen *ex vivo* und *in vivo* dokumentiert werden. Somit können wir zeigen, dass das Endocannabinoid AEA ein starkes Bronchorelaxans in gesundem aber auch asthmatischem Gewebe darstellt, was in Zukunft evtl. auch von therapeutischem Interesse bei obstruktiven Lungenerkrankungen sein könnte.



**Abbildung 27: Signalkaskade der AEA-induzierten Relaxation in der glatten Muskulatur des Bronchialsystems**

AEA wird intrazellulär durch FAAH zu AA und Ethanolamin hydrolysiert. Nachfolgend wird die AA durch COX zu PGH2 hydrolysiert und mit Hilfe spezifischer Synthasen in PGE2 umgewandelt. PGE2 aktiviert seinerseits die Prostaglandin-E2-Rezeptoren 2 und 4 (EP2, EP4), wodurch es über die Aktivierung eines Gs Proteins zur vermehrten Bildung von cAMP kommt. Diese erhöhte cAMP Konzentration bewirkt final die Relaxation der glatten Muskulatur. Eine Beteiligung anderer Enzyme und Rezeptoren konnte durch Verwendung spezifischer Inhibitoren ausgeschlossen werden (rote Kreuze).

### 5 Diskussion

Obstruktive Lungenerkrankungen wie Asthma und COPD gehören zu den häufigsten chronischen Erkrankungen bei Kindern und Erwachsenen weltweit. Ihre Prävalenz ist in den letzten Jahren stark gestiegen. Allein von 1990 bis 2017 nahmen chronische Atemwegserkrankungen weltweit um 39% zu <sup>176</sup>. In den Industrienationen aber auch vielen Schwellenländern stellen diese Erkrankungen wirtschaftlich bedeutsame Gesundheitsprobleme dar. Dennoch werden die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig verstanden. Somit war es Ziel dieser Arbeit, neue Signalwege zu identifizieren, die zur Tonusregulation der Bronchien beitragen, um mittelfristig neue therapeutische Konzepte für obstruktive Lungenerkrankungen zu entwickeln. Eine frühere Studie unserer Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass Endocannabinoide eine wichtige Rolle bei der Tonusregulation von pulmonalen Gefäßen unter (patho)physiologischen Bedingungen spielen <sup>137</sup>. Somit wollten wir in der gegenwärtigen Arbeit überprüfen, ob das Endocannabinoidsystem auch den Tonus von Bronchien reguliert. Bereits in der traditionellen asiatischen, aber auch afrikanischen Medizin, wurde Cannabis in Form von Samen, Wurzeln, Früchten, Blättern und weiblichen Blüten zur Behandlung verschiedener Erkrankungen, darunter Bronchitis und Asthma, eingesetzt <sup>10</sup>. Neueste Studien weisen darauf hin, dass THC, die stärkste Wirksubstanz der Cannabispflanze, positiven Einfluss auf das Asthmageschehen hat. So konnte die Arbeitsgruppe um Tashkin nachweisen, dass THC als Aerosol einen akuten bronchorelaxierenden Effekt bei Gesunden sowie Patienten mit chronischem Asthma oder experimentell induzierter Bronchokonstriktion bewirkt. Sie wiesen zudem nach, dass weder eine sympathische Aktivierung noch die Blockierung muskarinerger Acetylcholinrezeptoren diesem Effekt zugrunde liegt. Entsprechend schrieben sie den Cannabinoiden einen eigenständigen therapeutischen Wert zu <sup>177,178</sup>. Gleichwohl zeigen sich aber auch nachteilige Effekte beim Genuss von Marihuana, den getrockneten Blüten der weiblichen Hanfpflanze, denn die Cannabispflanze enthält neben THC und THC-ähnlichen Komponenten viele weitere Bestandteile, die toxisch auf das respiratorische Gewebe wirken. Hierzu zählen vor allem Kohlenmonoxid und Teer, die durch das Rauchen von Cannabis in die Lunge gelangen <sup>179,180</sup>. Durch die histopathologischen Veränderungen in den Atemwegen und dem Lungenparenchym kann es zu chronischem Husten mit vermehrter Schleimbildung, keuchenden Atemgeräuschen sowie Kurzatmigkeit kommen <sup>181–183</sup>. Einmaliger Genuss von Marihuana bewirkt hingegen eine Bronchodilatation, die dem THC zugeschrieben wird <sup>178,183,184</sup>. Für ein weiteres pflanzliches Cannabinoid, das Cannabidiol (CBD), konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sein *in vivo* Einsatz bei OVA-induziertem Asthma in der Maus zu einem reduzierten Atemwegswiderstand, vermindertem Remodeling sowie Abnahme der

entzündlichen Prozesse in der Lunge der Tiere führt<sup>185</sup>. Wie diese Studien belegen, scheinen spezifische Wirksubstanzen der Cannabispflanze, die Cannabinoide, einen positiven Effekt auf den Bronchialtonus zu haben, weshalb ihr tonusregulierendes Potential bei obstruktiven Lungenkrankheiten eingehender untersucht werden sollte.

Interessanterweise sind Cannabinoide nicht nur in Pflanzen zu finden, sondern werden auch endogen im menschlichen Körper produziert und metabolisiert. Das sogenannte Endocannabinoidsystem (ECS), das sowohl Mediatoren als auch die entsprechenden Rezeptoren und Enzyme umfasst, ist in vielen Spezies konserviert<sup>54</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass das ECS an den verschiedensten physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, wie synaptische Plastizität und Gedächtnis, Essverhalten und Neurogenese, Reproduktion aber auch Stress und Schmerzen sowie der Behandlung von Krebs beteiligt ist<sup>186–194</sup>. Allerdings ist sehr wenig über die Rolle der Endocannabinoide im respiratorischen System bekannt<sup>159,195–197</sup>. Daher wollten wir mit dieser Arbeit untersuchen, inwieweit das Endocannabinoid AEA die Physiologie der bronchialen Tonusregulation beeinflusst. Einige Studien liefern bereits entsprechende Hinweise, dass Endocannabinoide den Bronchialtonus unter bestimmten Voraussetzungen modulieren. Allerdings ist unklar, wie dieser tonusregulierende Effekt therapeutisch nutzbar sein könnte<sup>159,198</sup>. Unsere *ex* und *in vivo* Ergebnisse am murinen Mausmodell demonstrieren zum ersten Mal, dass AEA die Fähigkeit besitzt, eine vorbestehende Atemwegskonstriktion im gesunden und auch kranken Tier signifikant zu vermindern. Vermittelt wird die AEA-induzierte Atemwegsdilatation hierbei über FAAH-abhängige Metabolite. Ursprünglich ging man davon aus, dass FAAH hauptsächlich AEA inaktiviert und nicht zu wirksamen Metaboliten hydrolysiert. Mittlerweile herrscht jedoch eine allgemeine Übereinkunft darüber, dass Metabolite der AEA Hydrolyse an wichtigen Signalwegen beteiligt sind<sup>137,199</sup>. Eine Beteiligung der Cannabinoidrezeptoren an der AEA-vermittelten Atemwegsdilatation konnten wir durch verschiedene Experimente am Drahtmyographen unter Verwendung von *Faah*<sup>-/-</sup>, *Cnr1*<sup>-/-/2</sup><sup>-/-</sup> Doppelknockout Mäusen sowie pharmakologischen Aktivatoren/Inhibitoren ausschließen. In den wenigen Studien, die ebenfalls die Wirkung des AEA auf die Bronchialmuskulatur untersucht haben, werden die pharmakologischen Effekte des AEA der Aktivierung der CB1/2 oder TRPV Rezeptoren zugeschrieben. So inhibiert AEA bei Meerschweinchen den durch den TRPV Agonisten Capsaizin hervorgerufenen Bronchialspasmus mit begleitendem Husten sehr stark, induziert jedoch nach Entfernung des vagal-induzierten konstriktiven Tonus auch einen starken Bronchialspasmus<sup>159</sup>. Im Gegensatz dazu beschreiben Jia et al., dass AEA in Meerschweinchen konzentrationsabhängig Husten auslöst, dieser konnte allerdings durch vorherige Gabe von

Capsaizin inhibiert werden. Dies zeigte, dass der Husten-auslösende Mechanismus TRPV1-vermittelt war <sup>160</sup>. Da es sich bei diesen Untersuchungen jeweils um Experimente an Meerschweinchen handelt, können die Ergebnisse nicht zwangsläufig auf unseren Modellorganismus Maus übertragen werden. Ein weiterer Beleg dafür, dass die FAAH ein Schlüsselenzym für die AEA-induzierte Relaxation ist, sind unsere mRNA- und Protein-Expressionsanalysen in humanen Epithel- und Muskelzellen sowie im murinen Lungengewebe. Sie zeigen eindeutig, dass die Faah im Lungengewebe ähnlich stark exprimiert ist wie im Gehirn. Üblicherweise findet sich im Gehirn eine besonders starke Faah Expression <sup>200</sup>. Dass die Expression der Faah innerhalb der Organe sowie zwischen unterschiedlichen Spezies variiert, ist gut belegt. So wird beispielsweise durch Giang und Cravatt beschrieben, dass in verschiedenen Organen von Mensch, Ratte und Maus ein unterschiedliches Faah mRNA-Expressionslevel nachzuweisen ist <sup>86</sup>. Die Relevanz der FAAH für die tonusregulierende Signalweiterleitung der Atemwege konnten wir durch FAAH Aktivitätsassays in trachealem und pulmonalem Gewebe der Maus, aber auch in humanen bronchialen Epithelzellen nachweisen. Hierbei zeigte sich in der Lunge eine sehr starke FAAH Aktivität, wobei in früheren Studien eine solch starke Aktivität in der Lunge nicht detektiert werden konnte <sup>201,202</sup>. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass es sich in jenen Untersuchungen hauptsächlich um Experimente an isolierten Mikrosomen handelte, die keinesfalls die gesamte Zellfunktion widerspiegeln. Somit verdeutlichen unsere Ergebnisse, dass die FAAH ein entscheidendes Molekül in der AEA-induzierten bronchialen Relaxationskaskade ist. Weiterhin ist bekannt, dass FAAH AEA zu Arachidonsäure (AA) hydrolysiert, welche anschließend durch Cyclooxygenasen (COX), Lipoxygenasen (LOX) oder CYP450 Monooxygenasen zu verschiedenen Eicosanoiden umgewandelt wird <sup>203,204</sup>. Als direkte Mediatoren der Relaxation konnten wir durch COX generiertes PGE2 und cAMP identifizieren. PGE2 ist als Ligand der Prostaglandin-Rezeptoren EP2 und EP4 beschrieben <sup>205,206</sup> und gilt als starkes Atemwegsrelaxans bei Mensch, Maus, Schwein oder Affe <sup>207-209</sup>. Als Folge der Aktivierung der Rezeptoren EP2 und EP4 durch PGE2 wird die intrazelluläre Konzentration von cAMP erhöht, wodurch typischerweise eine Relaxation glatter Muskulatur initiiert wird <sup>210</sup>. Diesen Anstieg der cAMP Konzentration konnten wir in unseren Experimenten unter AEA Stimulation ebenfalls nachweisen. Die pathophysiologische Relevanz des AEA/FAAH Signalwegs zeigte sich in unserer Studie daran, dass wir reduzierte Konzentrationen von AEA und anderen Fettsäureamiden in Lungengewebe asthmatischer Mäuse identifizieren konnten. Welche Bedeutung eine solche Reduktion der Substanzen und/oder ihrer Metabolite auf die Atemwegsfunktion hat, ob dies beispielsweise ursächlich für die gesteigerte Hyperreaktivität

der Atemwege auf verschiedene Reize ist, sollte in weiterführenden Studien näher untersucht werden. Als eine akute Reaktion auf eine Allergenexposition beim Menschen konnte allerdings eine erhöhte Konzentration von AEA im Bronchialsekret innerhalb der ersten 24 Stunden nachgewiesen werden<sup>49</sup>. In Anbetracht unserer Ergebnisse könnte es sich hierbei um eine akute Reaktion der Lunge zur Limitierung der Tonuserhöhung handeln. Als Ursache für die verringerte AEA Konzentration in asthmatischem Lungengewebe konnten wir eine reduzierte Expression der AEA Synthesenzyme wie NAPE-PLD, ABHD4 oder GDE1 nachweisen. Dies ist im Einklang mit einer früheren Studie in Makrophagen, in der ebenfalls eine verminderte Transkription von NAPE-PLD als Antwort auf entzündliche Prozesse festgestellt wurde<sup>211</sup>. Da Endocannabinoide den Bronchialtonus reduzieren, könnte durch die Gabe von AEA oder eines der FAAH-abhängigen Metabolite einer verminderten Gewebekonzentration von AEA bei akuter Bronchokonstriktion entgegengewirkt werden. Mögliche kardiovaskuläre Nebenwirkungen einer lokalen therapeutischen Applikation von AEA in die Lunge konnten wir durch Kathetermessungen ausschließen. Vielmehr zeigen unsere Experimente an PCLS sowie in FlexiVent Messungen, dass AEA ein starkes Bronchorelaxans *ex* und *in vivo* darstellt. Interessanterweise zeigt sich durch Hypoxie ein ähnlich relaxierender Effekt in Bronchien<sup>212,213</sup>, wobei wir in einer früheren Studie demonstrieren konnten, dass Hypoxie zu einer Erhöhung der AEA-Konzentration im pulmonalen Gewebe führen kann<sup>137</sup>. Somit könnte ein Hypoxie-induzierter Anstieg der AEA Konzentration die Hypoxie-abhängige Bronchorelaxation vermitteln. Ein AEA Anstieg in der Lunge führte in unseren früheren Versuchen in pulmonalen Arterien im Gegensatz zu dem hier gezeigten relaxierenden Effekt in Bronchien zu einer Vasokonstriktion<sup>137</sup>. Weshalb AEA auf unterschiedliche Weise den Tonus im pulmonal vaskulären sowie respiratorischen System moduliert, ist unklar. In ergänzenden Studien wäre es daher interessant zu untersuchen, welche Ursachen dieser unterschiedlichen Wirkung zugrunde liegen. Eine Möglichkeit könnte die unterschiedliche Aktivität der COX, LOX und CYP450 Enzyme sein. Durch unsere Analysen konnten wir die AEA/FAAH Achse als endogenen Regulationsmechanismus des Atemwegstonus identifizieren, der auch von möglicher (patho)physiologischer Relevanz ist. Mit unseren Untersuchungen erbringen wir erstmals den Nachweis, dass das Endocannabinoid AEA sowohl *ex vivo* wie auch *in vivo* die Ovalbumin-induzierte Atemwegskonstriktion bei Asthma signifikant reduziert. Die Bedeutung des AEA Signalings sollte zukünftig auch bei anderen Pathophysiologien der Lunge, wie Entzündung oder Remodeling, ermittelt werden.

Unsere Analysen beschreiben somit, dass die AEA/FAAH Achse als bedeutender Regulator des Atemwegstonus angesehen werden kann und insbesondere AEA ein starkes

## Diskussion

---

Bronchorelaxans für große und kleine Atemwege darstellt. Diese Erkenntnis könnte auch von therapeutischer Relevanz sein. Obwohl in aktuellen Behandlungsschemata von obstruktiven Lungenerkrankungen eine Tonusreduktion der Bronchien mithilfe von beta2 Sympathomimetika induziert werden kann, treten oft Desensitisierung bzw. erhebliche Nebenwirkungen auf<sup>214-217</sup>. Somit ist es essenziell, die Forschung nach neuen Behandlungsmethoden voranzutreiben. Für eine potenzielle therapeutische Anwendung sollte in zukünftigen Studien genauer untersucht werden, ob sich AEA oder einer der AEA Metabolite am besten zur inhalativen Applikation eignet. Langfristig könnten unsere Ergebnisse einen Beitrag dazu leisten, die Entwicklung neuer Endocannabinoid-basierter Therapien zur Behandlung obstruktiver Lungenkrankheiten zu etablieren.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2-AG	2-Arachidonylglycerol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
AA	Arachidonsäure (engl. Arachidonic acid)
Abb.	Abbildung
ABHD4	Abhydrolase Domain Containing 4
AC	Adenylylzyklase
A.dest	Aqua destillata (Destilliertes Wasser)
AEA	Anandamid (Arachidonylethanolamid)
AH	AH6809 (EP/DP Antagonist)
AHR	Atemwegshyperreagibilität
Alum	Aluminiumhydroxid
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
ANOVA	Varianzanalyse (engl. analysis of variance)
asmac	Alpha-Aktinin glatter Muskelzellen (engl. alpha-smooth muscle actin)
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	Circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAY	CAY10441 (IP-Rezeptor Antagonist)
CB1	Cannabinoidrezeptor 1
CB2	Cannabinoidrezeptor 2
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. Complementary Desoxyribonucleic acid)
cmH <sub>2</sub> O	Zentimeter Wassersäule
Cnr1	Cannabinoidrezeptor 1 Gen
Cnr2	Cannabinoidrezeptor 2 Gen
Cnr1 <sup>-/-</sup> /Cnr2 <sup>-/-</sup>	Cannabinoidrezeptor 1 und 2 Doppelknockout Maus
CP	CP55,940 (Synthetisches Cannabinoid)
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX	Cyclooxygenasen
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
Ct	Cycle Threshold
CYP450	Cytochrom P450 Monooxygenasen
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleic acid)
DP	Prostaglandin-D2-Rezeptor
DPBS	Dulbecco's Phosphat Buffered Saline
ECS	Endocannabinoidsystem
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EP1 - 4	Prostaglandin-Rezeptor 1 bis 4

## Abkürzungsverzeichnis

Et al.	Et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FAAH	Fettsäureamidhydrolase Protein
Faah	Fettsäureamidhydrolase Gen
Faah -/-	Fettsäureamidhydrolase Knockout Maus
FBS	Fötale Kälberserum (engl. Fetal bovine serum)
FSK	Forskolin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDE1	Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
h	Stunde
hASMC	Humane glatte Muskelzellen der Atemwege (engl. Human airway smooth muscle cells)
HCl	Salzsäure
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HR	Herzfrequenz (engl. Heart rate)
hTEPC	Humane tracheale Epithelzellen (engl. Human tracheal epithelial cells)
HUVEC	Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (engl. Human umbilical vein endothelial cells)
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IgE	Immunglobulin E
IL-4	Interleukin 4
IL-13	Interleukin 13
Indo	Indometacin
IP	Prostazyklin-Rezeptor
i.p.	intraperitoneal
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
L	L161,982 (EP4 Antagonist)
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LOX	Lipoxygenasen
MCh	Methacholin
Met-AEA	Methanandamid
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mN	Millinewton
mRNA	messenger-RNA
msec	Millisekunde
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NAPE	N-Arachidonoyl-Phosphatidylethanolamin

NAPE-PLD	N-Acylphosphatidylethanolaminphospholipase D
NAT	N-Acetyltransferase
NDGA	Nordihydroguaiaretinsäure (engl. Nordihydroguaiaretic acid)
nM	Nanomolar
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ODYA	17-Octadecinsäure (engl. 17-Octadecynoic acid)
OEA	Oleoylethanolamid
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PCLS	Präzisionsschnitte der Lunge (engl. Precision cut lung slices)
PE	Phosphatidylethanolamin
PEA	Palmitoylethanolamid
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PLC	Phospholipase C
pmol	Pikomol
post	nach
pre	vor
PSS	Physiologische Salzlösung
PSS low Ca <sup>2+</sup>	Physiologische Salzlösung mit geringer Calciumkonzentration
PTFE	Polytetrafluorethylen
PTPN22	Protein Tyrosin Phosphatase Nicht-Rezeptor Typ 22
rER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RFU	Relative Fluoreszenz
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer
RIN	RNA-Integritätsnummer
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. Revolutions per minute)
Rrs	Atemwiderstand (engl. Airway resistance)
RT	Raumtemperatur
RT qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RVSP	Rechtsventrikulärer systolischer Druck (engl. Right ventricular systolic pressure)
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. Standard error of the mean)
shRNA	Small hairpin RNA
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline +0,1% Tween 20
THC	Delta-9-Tetrahydrocannabinol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPV1	Transienter Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie V, Subtyp 1 (engl. Transient receptor potential vanilloid 1)

### 7 Literaturverzeichnis

1. Li, H.-L. Hallucinogenic Plants in Chinese Herbals. *Journal of Psychedelic Drugs* **10**, 17–26; 10.1080/02791072.1978.10471863 (1978).
2. Murray, R. M., Morrison, P. D., Henquet, C. & Di Forti, M. Cannabis, the mind and society: the hash realities. *Nature reviews. Neuroscience* **8**, 885–895; 10.1038/nrn2253 (2007).
3. Mechoulam, R. (ed.). *Cannabinoids as therapeutic agents. The pharmacohistory of Cannabis sativa* (CRC Press, Boca Raton, 2019).
4. Meuli, K. Scythica. *Hermes* **70**, 121–176 (1935).
5. Fankhauser, M. Cannabis in der Medizin - ein Rückblick in die Geschichte. *Pharmakon*, 95–102; 10.1691/pn.20170009 (2017).
6. Nicoll RA, A. B. E. *Das Gehirn und sein Marihuana* (Spektrum der Wissenschaft, 2005).
7. Mikuriya, T. H. Marijuana in medicine: past, present and future. *California medicine* **110**, 34–40 (1969).
8. Moreau, J. J. *Du Hachisch Et de L'Alienation Mentale: Etudes Psychologiques* (Nabu Press, 1845).
9. O'Shaughnessy, W. B. On the cannabis indica or Indian hemp. *Pharmacol.*
10. Zuardi, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)* **28**, 153–157; 10.1590/s1516-44462006000200015 (2006).
11. Gaoni, Y. & Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1646–1647; 10.1021/ja01062a046 (1964).
12. Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. & Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**, 561–564; 10.1038/346561a0 (1990).
13. Munro, S., Thomas, K. L. & Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61–65; 10.1038/365061a0 (1993).
14. Devane, W. A. *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, N.Y.)* **258**, 1946–1949; 10.1126/science.1470919 (1992).
15. Lindsey, K. P., Glaser, S. T. & Gatley, S. J. Imaging of the brain cannabinoid system. *Handbook of experimental pharmacology*, 425–443; 10.1007/3-540-26573-2\_14 (2005).
16. Iannotti, F. A., Di Marzo, V. & Petrosino, S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Progress in lipid research* **62**, 107–128; 10.1016/j.plipres.2016.02.002 (2016).
17. Howlett, A. C. Cannabinoid receptor signaling. *Handbook of experimental pharmacology*, 53–79; 10.1007/3-540-26573-2\_2 (2005).
18. Bosier, B., Muccioli, G. G., Hermans, E. & Lambert, D. M. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochemical Pharmacology* **80**, 1–12; 10.1016/j.bcp.2010.02.013 (2010).
19. Howlett, A. C. The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiology of disease* **5**, 405–416; 10.1006/nbdi.1998.0215 (1998).
20. Turu, G. & Hunyady, L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *Journal of molecular endocrinology* **44**, 75–85; 10.1677/JME-08-0190 (2010).

21. Herkenham, M. *et al.* Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* **11**, 563–583; 10.1523/JNEUROSCI.11-02-00563.1991 (1991).
22. Egertová, M., Giang, D. K., Cravatt, B. F. & Elphick, M. R. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **265**, 2081–2085; 10.1098/rspb.1998.0543 (1998).
23. Elphick, M. R. & Egertová, M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **356**, 381–408; 10.1098/rstb.2000.0787 (2001).
24. Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. & Haydon, P. G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences* **22**, 208–215; 10.1016/s0166-2236(98)01349-6 (1999).
25. Navarrete, M. & Araque, A. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* **57**, 883–893; 10.1016/j.neuron.2008.01.029 (2008).
26. Navarrete, M. & Araque, A. Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* **68**, 113–126; 10.1016/j.neuron.2010.08.043 (2010).
27. Stella, N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* **58**, 1017–1030; 10.1002/glia.20983 (2010).
28. Oliveira da Cruz, J. F., Robin, L. M., Drago, F., Marsicano, G. & Metna-Laurent, M. Astroglial type-1 cannabinoid receptor (CB1): A new player in the tripartite synapse. *Neuroscience* **323**, 35–42; 10.1016/j.neuroscience.2015.05.002 (2016).
29. Howlett, A. C. *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews* **54**, 161–202; 10.1124/pr.54.2.161 (2002).
30. Mackie, K. Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Molecular and cellular endocrinology* **286**, S60-5; 10.1016/j.mce.2008.01.022 (2008).
31. Alger, B. E. Endocannabinoids at the synapse a decade after the dies mirabilis (29 March 2001): what we still do not know. *The Journal of physiology* **590**, 2203–2212; 10.1113/jphysiol.2011.220855 (2012).
32. Talwar, R. & Potluri, V. K. Cannabinoid 1 (CB1) receptor--pharmacology, role in pain and recent developments in emerging CB1 agonists. *CNS & neurological disorders drug targets* **10**, 536–544; 10.2174/187152711796235005 (2011).
33. Matias, I. & Di Marzo, V. Endocannabinoid synthesis and degradation, and their regulation in the framework of energy balance. *Journal of endocrinological investigation* **29**, 15–26 (2006).
34. Demuth, D. G. & Molleman, A. Cannabinoid signalling. *Life sciences* **78**, 549–563; 10.1016/j.lfs.2005.05.055 (2006).
35. Liu, Q.-R. *et al.* Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes, Brain, and Behavior* **8**, 519–530; 10.1111/j.1601-183X.2009.00498.x (2009).
36. Atwood, B. K. & Mackie, K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *British journal of pharmacology* **160**, 467–479; 10.1111/j.1476-5381.2010.00729.x (2010).

37. Staiano, R. I. *et al.* Human lung-resident macrophages express CB1 and CB2 receptors whose activation inhibits the release of angiogenic and lymphangiogenic factors. *Journal of leukocyte biology* **99**, 531–540; 10.1189/jlb.3HI1214-584R (2016).
38. Matias, I. & Di Marzo, V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **18**, 27–37; 10.1016/j.tem.2006.11.006 (2007).
39. Galiègue, S. *et al.* Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European journal of biochemistry* **232**, 54–61; 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x (1995).
40. Iannotti, F. A. *et al.* Analysis of the "endocannabinoidome" in peripheral tissues of obese Zucker rats. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **89**, 127–135; 10.1016/j.plefa.2013.06.002 (2013).
41. Juan-Picó, P. *et al.* Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell calcium* **39**, 155–162; 10.1016/j.ceca.2005.10.005 (2006).
42. Julien, B. *et al.* Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* **128**, 742–755; 10.1053/j.gastro.2004.12.050 (2005).
43. Karsak, M. *et al.* The cannabinoid receptor type 2 (CNR2) gene is associated with hand bone strength phenotypes in an ethnically homogeneous family sample. *Human genetics* **126**, 629–636; 10.1007/s00439-009-0708-8 (2009).
44. Ofek, O. *et al.* Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 696–701; 10.1073/pnas.0504187103 (2006).
45. Turcotte, C., Blanchet, M.-R., Laviolette, M. & Flamand, N. Impact of Cannabis, Cannabinoids, and Endocannabinoids in the Lungs. *Frontiers in Pharmacology* **7**, 317; 10.3389/fphar.2016.00317 (2016).
46. Grassin-Delyle, S. *et al.* Cannabinoids inhibit cholinergic contraction in human airways through prejunctional CB1 receptors. *British journal of pharmacology* **171**, 2767–2777; 10.1111/bph.12597 (2014).
47. Fantauzzi, M. F. *et al.* Expression of endocannabinoid system components in human airway epithelial cells: impact of sex and chronic respiratory disease status. *ERJ open research* **6**; 10.1183/23120541.00128-2020 (2020).
48. Giannini, L. *et al.* Activation of cannabinoid receptors prevents antigen-induced asthma-like reaction in guinea pigs. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **12**, 2381–2394; 10.1111/j.1582-4934.2008.00258.x (2008).
49. Zoerner, A. A. *et al.* Allergen challenge increases anandamide in bronchoalveolar fluid of patients with allergic asthma. *Clinical pharmacology and therapeutics* **90**, 388–391; 10.1038/clpt.2011.94 (2011).
50. Oka, S. *et al.* 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces the migration of EoL-1 human eosinophilic leukemia cells and human peripheral blood eosinophils. *Journal of leukocyte biology* **76**, 1002–1009; 10.1189/jlb.0404252 (2004).
51. Montecucco, F., Burger, F., Mach, F. & Steffens, S. CB2 cannabinoid receptor agonist JWH-015 modulates human monocyte migration through defined intracellular signaling pathways. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **294**, H1145-55; 10.1152/ajpheart.01328.2007 (2008).

52. Han, K. H. *et al.* CB1 and CB2 cannabinoid receptors differentially regulate the production of reactive oxygen species by macrophages. *Cardiovascular research* **84**, 378–386; 10.1093/cvr/cvp240 (2009).
53. Frei, R. B. *et al.* Cannabinoid receptor 2 augments eosinophil responsiveness and aggravates allergen-induced pulmonary inflammation in mice. *Allergy* **71**, 944–956; 10.1111/all.12858 (2016).
54. Salzet, M., Breton, C., Bisogno, T. & Di Marzo, V. Comparative biology of the endocannabinoid system possible role in the immune response. *European journal of biochemistry* **267**, 4917–4927; 10.1046/j.1432-1327.2000.01550.x (2000).
55. Elphick, M. R. The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**, 3201–3215; 10.1098/rstb.2011.0394 (2012).
56. Mendizábal, V. E. & Adler-Graschinsky, E. Cannabinoid system as a potential target for drug development in the treatment of cardiovascular disease. *Current vascular pharmacology* **1**, 301–313; 10.2174/1570161033476583 (2003).
57. Klein, T. W. *et al.* The cannabinoid system and immune modulation. *Journal of leukocyte biology* **74**, 486–496; 10.1189/jlb.0303101 (2003).
58. Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B. & Pasquali, R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocrine reviews* **27**, 73–100; 10.1210/er.2005-0009 (2006).
59. Donvito, G. *et al.* The Endogenous Cannabinoid System: A Budding Source of Targets for Treating Inflammatory and Neuropathic Pain. *Neuropsychopharmacology* **43**, 52–79; 10.1038/npp.2017.204 (2018).
60. Pandey, R., Mousawy, K., Nagarkatti, M. & Nagarkatti, P. Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacological research* **60**, 85–92; 10.1016/j.phrs.2009.03.019 (2009).
61. Kesner, A. J. & Lovinger, D. M. Cannabinoids, Endocannabinoids and Sleep. *Frontiers in molecular neuroscience* **13**, 125; 10.3389/fnmol.2020.00125 (2020).
62. Reibaud, M. *et al.* Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. *European journal of pharmacology* **379**, R1–R2; 10.1016/S0014-2999(99)00496-3 (1999).
63. Hohmann, A. G., Martin, W. J., Tsou, K. & Walker, J. Inhibition of noxious stimulus-evoked activity of spinal cord dorsal horn neurons by the cannabinoid WIN 55,212-2. *Life sciences* **56**, 2111–2118; 10.1016/0024-3205(95)00196-D (1995).
64. Li, J. *et al.* The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 mesylate blocks the development of hyperalgesia produced by capsaicin in rats. *Pain* **81**, 25–33; 10.1016/S0304-3959(98)00263-2 (1999).
65. Di Marzo, V. & Deutsch, D. G. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiology of disease* **5**, 386–404; 10.1006/nbdi.1998.0214 (1998).
66. Di Marzo, V. *et al.* Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **372**, 686–691; 10.1038/372686a0 (1994).
67. Bisogno, T. *et al.* Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochemical and biophysical research communications* **256**, 377–380; 10.1006/bbrc.1999.0254 (1999).

68. Morishita, J. *et al.* Regional distribution and age-dependent expression of N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D in rat brain. *Journal of neurochemistry* **94**, 753–762; 10.1111/j.1471-4159.2005.03234.x (2005).
69. Mock, E. D. *et al.* Discovery of a NAPE-PLD inhibitor that modulates emotional behavior in mice. *Nature chemical biology* **16**, 667–675; 10.1038/s41589-020-0528-7 (2020).
70. Zarrow, J. E. *et al.* Selective measurement of NAPE-PLD activity via a PLA1/2-resistant fluorogenic N-acyl-phosphatidylethanolamine analog. *Journal of lipid research* **63**, 100156; 10.1016/j.jlr.2021.100156 (2022).
71. Ueda, N., Liu, Q. & Yamanaka, K. Marked activation of the N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phosphodiesterase by divalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1532**, 121–127; 10.1016/S1388-1981(01)00120-2 (2001).
72. Wang, J., Okamoto, Y., Tsuboi, K. & Ueda, N. The stimulatory effect of phosphatidylethanolamine on N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D (NAPE-PLD). *Neuropharmacology* **54**, 8–15; 10.1016/j.neuropharm.2007.06.001 (2008).
73. Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T. & Ueda, N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 5298–5305; 10.1074/jbc.M306642200 (2004).
74. Leung, D., Saghatelian, A., Simon, G. M. & Cravatt, B. F. Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry* **45**, 4720–4726; 10.1021/bi060163l (2006).
75. Simon, G. M. & Cravatt, B. F. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 26465–26472; 10.1074/jbc.M604660200 (2006).
76. Ueda, N., Tsuboi, K. & Uyama, T. Metabolism of endocannabinoids and related N-acylethanolamines: canonical and alternative pathways. *The FEBS journal* **280**, 1874–1894; 10.1111/febs.12152 (2013).
77. Rahman, I. A. S., Tsuboi, K., Uyama, T. & Ueda, N. New players in the fatty acyl ethanolamide metabolism. *Pharmacological research* **86**, 1–10; 10.1016/j.phrs.2014.04.001 (2014).
78. Liu, J. *et al.* A biosynthetic pathway for anandamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 13345–13350; 10.1073/pnas.0601832103 (2006).
79. Liu, J. *et al.* Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* **54**, 1–7; 10.1016/j.neuropharm.2007.05.020 (2008).
80. Ehehalt, R. *et al.* Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane – lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Molecular and cellular biochemistry* **284**, 135–140; 10.1007/s11010-005-9034-1 (2006).
81. Boorman, E., Zajkowska, Z., Ahmed, R., Pariante, C. M. & Zunszain, P. A. Crosstalk between endocannabinoid and immune systems: a potential dysregulation in depression? *Psychopharmacology* **233**, 1591–1604; 10.1007/s00213-015-4105-9 (2016).
82. Schmid, P. C., Zuzarte-Augustin, M. L. & Schmid, H. H. Properties of rat liver N-acylethanolamine amidohydrolase. *The Journal of Biological Chemistry* **260**, 14145–14149 (1985).

83. Deutsch, D. G. & Chin, S. A. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochemical Pharmacology* **46**, 791–796; 10.1016/0006-2952(93)90486-g (1993).
84. Desarnaud, F., Cadas, H. & Piomelli, D. Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 6030–6035; 10.1074/jbc.270.11.6030 (1995).
85. Ueda, N., Kurahashi, Y., Yamamoto, S. & Tokunaga, T. Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 23823–23827; 10.1074/jbc.270.40.23823 (1995).
86. Giang, D. K. & Cravatt, B. F. Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 2238–2242; 10.1073/pnas.94.6.2238 (1997).
87. Shrestha, R., Dixon, R. A. & Chapman, K. D. Molecular identification of a functional homologue of the mammalian fatty acid amide hydrolase in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 34990–34997; 10.1074/jbc.M305613200 (2003).
88. McKinney, M. K. & Cravatt, B. F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annual review of biochemistry* **74**, 411–432; 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133450 (2005).
89. Cravatt, B. F. *et al.* Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 9371–9376; 10.1073/pnas.161191698 (2001).
90. Clement, A. B., Hawkins, E. G., Lichtman, A. H. & Cravatt, B. F. Increased Seizure Susceptibility and Proconvulsant Activity of Anandamide in Mice Lacking Fatty Acid Amide Hydrolase. *J. Neurosci.* **23**, 3916–3923; 10.1523/JNEUROSCI.23-09-03916.2003 (2003).
91. Cravatt, B. F. *et al.* Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10821–10826; 10.1073/pnas.0401292101 (2004).
92. Patricelli, M. P. & Cravatt, B. F. Fatty acid amide hydrolase competitively degrades bioactive amides and esters through a nonconventional catalytic mechanism. *Biochemistry* **38**, 14125–14130; 10.1021/bi991876p (1999).
93. Fowler, C. J., Jonsson, K.-O. & Tiger, G. Fatty acid amide hydrolase: biochemistry, pharmacology, and therapeutic possibilities for an enzyme hydrolyzing anandamide, 2-arachidonoylglycerol, palmitoylethanolamide, and oleamide. Abbreviations: AEA, anandamide, arachidonyl ethanolamide; PEA, palmitoylethanolamide, N-(2-hydroxyethyl) hexadecamide; FAAH, fatty acid amide hydrolase; CB, cannabinoid; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; MAFP, methyl arachidonyl fluorophosphonate; methAEA, arachidonyl-1'-hydroxy-2'-propylamide; and NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology* **62**, 517–526; 10.1016/S0006-2952(01)00712-2 (2001).
94. Cravatt, B. F. *et al.* Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty acid amides. *Nature* **384**, 83–87; 10.1038/384083a0 (1996).
95. Di Marzo, V., Bisogno, T., Sugiura, T., Melck, D. & Petrocellis, L. de. The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochemical Journal* **331** ( Pt 1), 15–19; 10.1042/bj3310015 (1998).

96. Goparaju, S. K., Ueda, N., Yamaguchi, H. & Yamamoto, S. Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Letters* **422**, 69–73; 10.1016/S0014-5793(97)01603-7 (1998).
97. Smith, W. L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochemical Journal* **259**, 315–324; 10.1042/bj2590315 (1989).
98. Hamberg, M. & Samuelsson, B. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**, 899–903; 10.1073/pnas.70.3.899 (1973).
99. Hamberg, M., Svensson, J. & Samuelsson, B. Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, 3824–3828; 10.1073/pnas.71.10.3824 (1974).
100. Capdevila, J. H. & Falck, J. R. Biochemical and molecular properties of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases. *Prostaglandins & other lipid mediators* **68-69**, 325–344; 10.1016/S0090-6980(02)00038-2 (2002).
101. Harder, D. R., Campbell, W. B. & Roman, R. J. Role of cytochrome P-450 enzymes and metabolites of arachidonic acid in the control of vascular tone. *Journal of vascular research* **32**, 79–92; 10.1159/000159080 (1995).
102. Makita, K., Falck, J. R. & Capdevila, J. H. Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **10**, 1456–1463; 10.1096/fasebj.10.13.8940291 (1996).
103. FitzGerald, G. A. & Patrono, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *The New England journal of medicine* **345**, 433–442; 10.1056/NEJM200108093450607 (2001).
104. Liu, J. *et al.* Prostaglandin endoperoxide H synthases: peroxidase hydroperoxide specificity and cyclooxygenase activation. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 18233–18244; 10.1074/jbc.M701235200 (2007).
105. Marnett, L. J., Rowlinson, S. W., Goodwin, D. C., Kalgutkar, A. S. & Lanzo, C. A. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 22903–22906; 10.1074/jbc.274.33.22903 (1999).
106. Choudhary, S. & Pilbeam, C. Prostaglandins and bone metabolism. In *Principles of bone biology*, edited by J. P. Bilezikian (Acad. Press, San Diego [u.a.], 2020), pp. 1247–1269.
107. Tilley, S. L. *et al.* Receptors and pathways mediating the effects of prostaglandin E2 on airway tone. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **284**, L599–606; 10.1152/ajplung.00324.2002 (2003).
108. Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M. & Watanabe, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological reviews* **89**, 309–380; 10.1152/physrev.00019.2008 (2009).
109. Fowler, C. J. Transport of endocannabinoids across the plasma membrane and within the cell. *The FEBS journal* **280**, 1895–1904; 10.1111/febs.12212 (2013).
110. Okamoto, Y., Wang, J., Morishita, J. & Ueda, N. Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chemistry & biodiversity* **4**, 1842–1857; 10.1002/cbdv.200790155 (2007).

111. Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S. & Gokoh, M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Progress in lipid research* **45**, 405–446; 10.1016/j.plipres.2006.03.003 (2006).
112. Thakur, G. A., Nikas, S. P. & Makriyannis, A. CB1 cannabinoid receptor ligands. *Mini reviews in medicinal chemistry* **5**, 631–640; 10.2174/1389557054368772 (2005).
113. Pertwee, R. G. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>. *Pharmacological reviews* **62**, 588–631; 10.1124/pr.110.003004 (2010).
114. Di Marzo, V. & Petrocellis, L. de. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**, 3216–3228; 10.1098/rstb.2011.0382 (2012).
115. Felder, C. C. *et al.* Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Letters* **393**, 231–235; 10.1016/0014-5793(96)00891-5 (1996).
116. Sugiura, T. & Waku, K. Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *Journal of biochemistry* **132**, 7–12; 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003200 (2002).
117. Katona, I. & Freund, T. F. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nature medicine* **14**, 923–930; 10.1038/nm.f.1869 (2008).
118. Murataeva, N., Straiker, A. & Mackie, K. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *British journal of pharmacology* **171**, 1379–1391; 10.1111/bph.12411 (2014).
119. Clapham, D. E., Runnels, L. W. & Strübing, C. The TRP ion channel family. *Nature reviews. Neuroscience* **2**, 387–396; 10.1038/35077544 (2001).
120. Kagaya, M., Lamb, J., Robbins, J., Page, C. P. & Spina, D. Characterization of the anandamide induced depolarization of guinea-pig isolated vagus nerve. *British journal of pharmacology* **137**, 39–48; 10.1038/sj.bjp.0704840 (2002).
121. Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Nargeot, J. & Lory, P. Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *The EMBO Journal* **20**, 7033–7040; 10.1093/emboj/20.24.7033 (2001).
122. Maccarrone, M. *et al.* Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nature neuroscience* **11**, 152–159; 10.1038/nn2042 (2008).
123. Hanus, L. *et al.* 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 3662–3665; 10.1073/pnas.061029898 (2001).
124. Porter, A. C. *et al.* Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **301**, 1020–1024; 10.1124/jpet.301.3.1020 (2002).
125. Huang, S. M. *et al.* An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 8400–8405; 10.1073/pnas.122196999 (2002).
126. Schmid, H. H. O. & Berdyshev, E. V. Cannabinoid receptor-inactive N-acylethanolamines and other fatty acid amides: metabolism and function. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **66**, 363–376; 10.1054/plef.2001.0348 (2002).

127. Lambert, D. M. & Di Marzo, V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas : are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Current medicinal chemistry* **6**, 757–773 (1999).
128. Appendino, G. *et al.* Conformationally constrained fatty acid ethanolamides as cannabinoid and vanilloid receptor probes. *Journal of medicinal chemistry* **52**, 3001–3009; 10.1021/jm900130m (2009).
129. Jonsson, K. O., Vandevoorde, S., Lambert, D. M., Tiger, G. & Fowler, C. J. Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *British journal of pharmacology* **133**, 1263–1275; 10.1038/sj.bjp.0704199 (2001).
130. LoVerme, J., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A. & Piomelli, D. The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life sciences* **77**, 1685–1698; 10.1016/j.lfs.2005.05.012 (2005).
131. Kunos, G. *et al.* Endocannabinoids as cardiovascular modulators. *Chemistry and Physics of Lipids* **108**, 159–168; 10.1016/S0009-3084(00)00194-8 (2000).
132. Wahn, H., Wolf, J., Kram, F., Frantz, S. & Wagner, J. A. The endocannabinoid arachidonyl ethanolamide (anandamide) increases pulmonary arterial pressure via cyclooxygenase-2 products in isolated rabbit lungs. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **289**, H2491-6; 10.1152/ajpheart.00718.2005 (2005).
133. Montecucco, F. & Di Marzo, V. At the heart of the matter: the endocannabinoid system in cardiovascular function and dysfunction. *Trends in pharmacological sciences* **33**, 331–340; 10.1016/j.tips.2012.03.002 (2012).
134. Pacher, P. *et al.* Hemodynamic profile, responsiveness to anandamide, and baroreflex sensitivity of mice lacking fatty acid amide hydrolase. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **289**, H533-41; 10.1152/ajpheart.00107.2005 (2005).
135. Kozłowska, H. *et al.* Identification of the vasodilatory endothelial cannabinoid receptor in the human pulmonary artery. *Journal of hypertension* **25**, 2240–2248; 10.1097/HJH.0b013e3282ef7a0a (2007).
136. Baranowska-Kuczko, M., MacLean, M. R., Kozłowska, H. & Malinowska, B. Endothelium-dependent mechanisms of the vasodilatory effect of the endocannabinoid, anandamide, in the rat pulmonary artery. *Pharmacological research* **66**, 251–259; 10.1016/j.phrs.2012.05.004 (2012).
137. Wenzel, D. *et al.* Endocannabinoid anandamide mediates hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 18710–18715; 10.1073/pnas.1308130110 (2013).
138. Kirchner, J. *Trainer Thoraxdiagnostik. Systematische kardiopulmonale Bildanalyse*. 2nd ed. (Thieme, Stuttgart, 2018).
139. Tschanz, S. A. *et al.* Der gesunde Respirationstrakt. In *Pädiatrische Pneumologie*, edited by C. Rieger, H. von der Hardt, F. H. Sennhauser, U. Wahn & M. Zach (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2004), pp. 1–122.
140. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2020 Available from: [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org). Online Appendix **2020**.
141. Ukena, D., Fishman, L. & Niebling, W.-B. Bronchial asthma: diagnosis and long-term treatment in adults. *Deutsches Arzteblatt international* **105**, 385–394; 10.3238/arztebl.2008.0385 (2008).

142. Cohn, L., Tepper, J. S. & Bottomly, K. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **161**, 3813–3816 (1998).
143. Corren, J. Role of interleukin-13 in asthma. *Current allergy and asthma reports* **13**, 415–420; 10.1007/s11882-013-0373-9 (2013).
144. Seys, S. F. *et al.* Cluster analysis of sputum cytokine-high profiles reveals diversity in T(h)2-high asthma patients. *Respiratory research* **18**, 39; 10.1186/s12931-017-0524-y (2017).
145. Tran, T. N. *et al.* Overlap of atopic, eosinophilic, and TH2-high asthma phenotypes in a general population with current asthma. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* **116**, 37–42; 10.1016/j.anai.2015.10.027 (2016).
146. Robinson, D. *et al.* Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **47**, 161–175; 10.1111/cea.12880 (2017).
147. Holgate, S. T. & Polosa, R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature reviews. Immunology* **8**, 218–230; 10.1038/nri2262 (2008).
148. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H., Ruth, P. & Schäfer-Korting, M. Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. *Endo-Praxis* **24**, 29; 10.1055/s-0028-1085717 (2008).
149. Ebeling, P. R., Erbas, B., Hopper, J. L., Wark, J. D. & Rubinfeld, A. R. Bone mineral density and bone turnover in asthmatics treated with long-term inhaled or oral glucocorticoids. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **13**, 1283–1289; 10.1359/jbmr.1998.13.8.1283 (1998).
150. Bartkowiak-Emeryk, M. *et al.* Skuteczność i bezpieczeństwo stosowania propionianu flutikazonu w leczeniu astmy oskrzelowej u dzieci. Część II. Bezpieczeństwo stosowania propionianu flutikazonu w lezeniu astmy oskrzelowej u dzieci. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* **17 Suppl 2**, 11–18 (2004).
151. Mak, V. H., Melchor, R. & Spiro, S. G. Easy bruising as a side-effect of inhaled corticosteroids. *The European respiratory journal* **5**, 1068–1074 (1992).
152. EVANS, P., OCONNOR, B., FULLER, R., BARNES, P. & FANCHUNG, K. Effect of inhaled corticosteroids on peripheral blood eosinophil counts and density profiles in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **91**, 643–650; 10.1016/0091-6749(93)90270-P (1993).
153. Novartis Europharm Limited. Xolair, INN-omalizumab. ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS, 16.12.2021.
154. sanofi-aventis group. Dupixent, INN-dupilumab. ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS. Pharma, 13.05.2022.
155. GlaxoSmithKline Trading Services Limited. Nucala, INN-mepolizumab. ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS. GlaxoSmithKline Manufacturing S.P.A, 11.05.2022.
156. Manni, M. L. *et al.* The complex relationship between inflammation and lung function in severe asthma. *Mucosal immunology* **7**, 1186–1198; 10.1038/mi.2014.8 (2014).

157. Crimi, E. *et al.* Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **157**, 4–9; 10.1164/ajrccm.157.1.9703002 (1998).
158. Kearley, J., Buckland, K. F., Mathie, S. A. & Lloyd, C. M. Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *American journal of respiratory and critical care medicine* **179**, 772–781; 10.1164/rccm.200805-666OC (2009).
159. Calignano, A. *et al.* Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids. *Nature* **408**, 96–101; 10.1038/35040576 (2000).
160. Jia, Y. *et al.* Anandamide induces cough in conscious guinea-pigs through VR1 receptors. *British journal of pharmacology* **137**, 831–836; 10.1038/sj.bjp.0704950 (2002).
161. The Jackson Laboratory. C57BL/6J (Stock No: 000664). Inbred Strain. Available at <https://www.jax.org/strain/000664> (2020).
162. Vanoirbeek, J. A. J. *et al.* Respiratory response to toluene diisocyanate depends on prior frequency and concentration of dermal sensitization in mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **80**, 310–321; 10.1093/toxsci/kfh155 (2004).
163. Járαι, Z. *et al.* Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14136–14141; 10.1073/pnas.96.24.14136 (1999).
164. Singh, S. R. & Hall, I. P. Airway myofibroblasts and their relationship with airway myocytes and fibroblasts. *Proceedings of the American Thoracic Society* **5**, 127–132; 10.1513/pats.200706-070VS (2008).
165. Liu, B., Peel, S. E., Fox, J. & Hall, I. P. Reverse mode Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange mediated by STIM1 contributes to Ca<sup>2+</sup> influx in airway smooth muscle following agonist stimulation. *Respiratory research* **11**, 168; 10.1186/1465-9921-11-168 (2010).
166. Agilent Technologies. 2100 Expert Software User's Guide. Agilent 2100 Bioanalyzer System. Available at [www.agilent.com](http://www.agilent.com) (2020).
167. Sausbier, M. *et al.* Reduced rather than enhanced cholinergic airway constriction in mice with ablation of the large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 812–822; 10.1096/fj.06-7167com (2007).
168. Semenov, I., Herlihy, J. T. & Brenner, R. In vitro measurements of tracheal constriction using mice. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2012).
169. Martin, C., Uhlig, S. & Ullrich, V. Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *The European respiratory journal* **9**, 2479–2487; 10.1183/09031936.96.09122479 (1996).
170. Wohlsen, A., Uhlig, S. & Martin, C. Immediate allergic response in small airways. *American journal of respiratory and critical care medicine* **163**, 1462–1469; 10.1164/ajrccm.163.6.2007138 (2001).
171. Weigt, H. *et al.* Efficacy of macrophage-activating lipopeptide-2 combined with interferon-gamma in a murine asthma model. *American journal of respiratory and critical care medicine* **172**, 566–572; 10.1164/rccm.200411-1490OC (2005).

172. Duechs, M. J. *et al.* TLR agonist mediated suppression of allergic responses is associated with increased innate inflammation in the airways. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* **24**, 203–214; 10.1016/j.pupt.2010.12.009 (2011).
173. Winkler, C. *et al.* Impact of a Met(11)Thr single nucleotide polymorphism of surfactant protein D on allergic airway inflammation in a murine asthma model. *Experimental lung research* **40**, 154–163; 10.3109/01902148.2014.891062 (2014).
174. Rückert, R. *et al.* Blocking IL-15 prevents the induction of allergen-specific T cells and allergic inflammation in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174**, 5507–5515; 10.4049/jimmunol.174.9.5507 (2005).
175. Hoymann, H. G. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **55**, 16–26; 10.1016/j.vascn.2006.04.006 (2007).
176. Soriano, J. B. *et al.* Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Respiratory Medicine* **8**, 585–596; 10.1016/S2213-2600(20)30105-3 (2020).
177. Tashkin, D. P., Shapiro, B. J., Reiss, S., Olsen, J. L. & Lodge, J. W. Bronchial Effects of Aerosolized Delta-9-Tetrahydrocannabinol. In *The Therapeutic Potential Of Marijuana*, edited by S. Cohen & R. C. Stillman (Springer US, Boston, MA, 1976), pp. 97–109.
178. Tashkin, D. P., Shapiro, B. J. & Frank, I. M. Acute pulmonary physiologic effects of smoked marijuana and oral (Delta)9 -tetrahydrocannabinol in healthy young men. *The New England journal of medicine* **289**, 336–341; 10.1056/NEJM197308162890702 (1973).
179. Wu, T. C., Tashkin, D. P., Djahed, B. & Rose, J. E. Pulmonary hazards of smoking marijuana as compared with tobacco. *The New England journal of medicine* **318**, 347–351; 10.1056/NEJM198802113180603 (1988).
180. Tashkin, D. P. *et al.* Effects of varying marijuana smoking profile on deposition of tar and absorption of CO and delta-9-THC. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **40**, 651–656; 10.1016/0091-3057(91)90377-E (1991).
181. Tashkin, D. P. Effects of marijuana smoking on the lung. *Annals of the American Thoracic Society* **10**, 239–247; 10.1513/AnnalsATS.201212-127FR (2013).
182. Dudášová, A., Keir, S. D., Parsons, M. E., Molleman, A. & Page, C. P. The effects of cannabidiol on the antigen-induced contraction of airways smooth muscle in the guinea-pig. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* **26**, 373–379; 10.1016/j.pupt.2013.02.002 (2013).
183. Tetrault, J. M. *et al.* Effects of marijuana smoking on pulmonary function and respiratory complications: a systematic review. *Archives of internal medicine* **167**, 221–228; 10.1001/archinte.167.3.221 (2007).
184. Williams, S. J., Hartley, J. P. & Graham, J. D. Bronchodilator effect of delta1-tetrahydrocannabinol administered by aerosol of asthmatic patients. *Thorax* **31**, 720–723; 10.1136/thx.31.6.720 (1976).
185. Vuolo, F. *et al.* Cannabidiol reduces airway inflammation and fibrosis in experimental allergic asthma. *European journal of pharmacology* **843**, 251–259; 10.1016/j.ejphar.2018.11.029 (2019).
186. Hillard, C. J. The Endocannabinoid Signaling System in the CNS: A Primer. *International review of neurobiology* **125**, 1–47; 10.1016/bs.irn.2015.10.001 (2015).

187. Xu, J.-Y. & Chen, C. Endocannabinoids in synaptic plasticity and neuroprotection. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **21**, 152–168; 10.1177/1073858414524632 (2015).
188. Drumond, A., Madeira, N. & Fonseca, R. Endocannabinoid signaling and memory dynamics: A synaptic perspective. *Neurobiology of learning and memory* **138**, 62–77; 10.1016/j.nlm.2016.07.031 (2017).
189. Chianese, R. *et al.* Impact of Dietary Fats on Brain Functions. *Current neuropharmacology* **16**, 1059–1085; 10.2174/1570159X15666171017102547 (2018).
190. Oddi, S., Scipioni, L. & Maccarrone, M. Endocannabinoid system and adult neurogenesis: a focused review. *Current Opinion in Pharmacology* **50**, 25–32; 10.1016/j.coph.2019.11.002 (2020).
191. Scarante, F. F. *et al.* Cannabinoid Modulation of the Stressed Hippocampus. *Frontiers in molecular neuroscience* **10**, 411; 10.3389/fnmol.2017.00411 (2017).
192. Buisseret, B., Alhouayek, M., Guillemot-Legris, O. & Muccioli, G. G. Endocannabinoid and Prostanoid Crosstalk in Pain. *Trends in molecular medicine* **25**, 882–896; 10.1016/j.molmed.2019.04.009 (2019).
193. Meccariello, R., Battista, N., Bradshaw, H. B. & Wang, H. Updates in reproduction coming from the endocannabinoid system. *International journal of endocrinology* **2014**, 412354; 10.1155/2014/412354 (2014).
194. Moreno, E., Cavic, M., Krivokuca, A., Casadó, V. & Canela, E. The Endocannabinoid System as a Target in Cancer Diseases: Are We There Yet? *Frontiers in Pharmacology* **10**, 339; 10.3389/fphar.2019.00339 (2019).
195. Spicuzza, L. *et al.* Characterization of the effects of cannabinoids on guinea-pig tracheal smooth muscle tone: role in the modulation of acetylcholine release from parasympathetic nerves. *British journal of pharmacology* **130**, 1720–1726; 10.1038/sj.bjp.0703497 (2000).
196. Stengel, P. W., Cockerham, S. L. & Silbaugh, S. A. Inhaled anandamide reduces leukotriene D4-induced airway obstruction in guinea pigs. *European journal of pharmacology* **557**, 66–68; 10.1016/j.ejphar.2006.11.025 (2007).
197. Tucker, R. C., Kagaya, M., Page, C. P. & Spina, D. The endogenous cannabinoid agonist, anandamide stimulates sensory nerves in guinea-pig airways. *British journal of pharmacology* **132**, 1127–1135; 10.1038/sj.bjp.0703906 (2001).
198. Wortley, M. A. *et al.* Targeting fatty acid amide hydrolase as a therapeutic strategy for antitussive therapy. *The European respiratory journal* **50**; 10.1183/13993003.00782-2017 (2017).
199. Jacobs, J. A. & Sehgal, A. Anandamide Metabolites Protect against Seizures through the TRP Channel Water Witch in *Drosophila melanogaster*. *Cell reports* **31**, 107710; 10.1016/j.celrep.2020.107710 (2020).
200. Romero, J., Hillard, C. J., Calero, M. & Rábano, A. Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study. *Molecular Brain Research* **100**, 85–93; 10.1016/S0169-328X(02)00167-5 (2002).
201. Rivera, P. *et al.* Pharmacological blockade of the fatty acid amide hydrolase (FAAH) alters neural proliferation, apoptosis and gliosis in the rat hippocampus, hypothalamus and striatum in a negative energy context. *Frontiers in cellular neuroscience* **9**, 98; 10.3389/fncel.2015.00098 (2015).

202. Glaser, S. T. & Kaczocha, M. Temporal changes in mouse brain fatty acid amide hydrolase activity. *Neuroscience* **163**, 594–600; 10.1016/j.neuroscience.2009.06.043 (2009).
203. Maccarrone, M. Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. *Frontiers in molecular neuroscience* **10**, 166; 10.3389/fnmol.2017.00166 (2017).
204. Biringer, R. G. The rise and fall of anandamide: processes that control synthesis, degradation, and storage. *Molecular and cellular biochemistry* **476**, 2753–2775; 10.1007/s11010-021-04121-5 (2021).
205. Biringer, R. G. The enzymology of the human prostanoid pathway. *Molecular biology reports* **47**, 4569–4586; 10.1007/s11033-020-05526-z (2020).
206. Woodward, D. F., Liang, Y. & Krauss, A. H.-P. Prostanoids (prostaglandin-ethanolamides) and their pharmacology. *British journal of pharmacology* **153**, 410–419; 10.1038/sj.bjp.0707434 (2008).
207. Norel, X. *et al.* Prostanoid receptors involved in the relaxation of human bronchial preparations. *British journal of pharmacology* **126**, 867–872; 10.1038/sj.bjp.0702392 (1999).
208. Lan, R. S., Knight, D. A., Stewart, G. A. & Henry, P. J. Role of PGE(2) in protease-activated receptor-1, -2 and -4 mediated relaxation in the mouse isolated trachea. *British journal of pharmacology* **132**, 93–100; 10.1038/sj.bjp.0703776 (2001).
209. Buckley, J. *et al.* EP4 receptor as a new target for bronchodilator therapy. *Thorax* **66**, 1029–1035; 10.1136/thx.2010.158568 (2011).
210. Bai, Y. & Sanderson, M. J. Airway smooth muscle relaxation results from a reduction in the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations induced by a cAMP-mediated inhibition of the IP<sub>3</sub> receptor. *Respiratory research* **7**, 34; 10.1186/1465-9921-7-34 (2006).
211. Zhu, C. *et al.* Proinflammatory stimuli control N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase D expression in macrophages. *Molecular pharmacology* **79**, 786–792; 10.1124/mol.110.070201 (2011).
212. Lindeman, K. S., Fernandes, L. B., Croxton, T. L. & Hirshman, C. A. Role of potassium channels in hypoxic relaxation of porcine bronchi in vitro. *The American journal of physiology* **266**, L232-7; 10.1152/ajplung.1994.266.3.L232 (1994).
213. Wetzel, R. C., Herold, C. J., Zerhouni, E. A. & Robotham, J. L. Hypoxic bronchodilation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **73**, 1202–1206; 10.1152/jappl.1992.73.3.1202 (1992).
214. Lefkowitz, R. J. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 18677–18680; 10.1074/jbc.273.30.18677 (1998).
215. Ferguson, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews* **53**, 1–24 (2001).
216. Salpeter, S. R., Ormiston, T. M. & Salpeter, E. E. Cardiovascular effects of beta-agonists in patients with asthma and COPD: a meta-analysis. *Chest* **125**, 2309–2321; 10.1378/chest.125.6.2309 (2004).
217. Billington, C. K., Penn, R. B. & Hall, I. P.  $\beta_2$  Agonists. *Handbook of experimental pharmacology* **237**, 23–40; 10.1007/164\_2016\_64 (2017).

### 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stoffwechselwege der Anandamid (AEA) -Synthese .....	17
Abbildung 2: Metabolisierung von AEA .....	19
Abbildung 3: Arachidonsäure Signalweg.....	21
Abbildung 4: Chemische Strukturformeln verschiedener Eicosanoide.....	23
Abbildung 5: Anatomie der Atemwege.....	26
Abbildung 6: Einspannen eines Trachealrings in den Myographen.....	57
Abbildung 7: Versuchsablauf zur Untersuchung der Wirkung von AEA auf den Bronchialtonus anhand von Präzisionsschnitten der Lunge .....	62
Abbildung 8: Schema zur Induktion akuten und chronischen Asthmas.....	64
Abbildung 9: Untersuchung des Effekts von AEA auf den Basaltonus muriner Trachealringe ....	68
Abbildung 10: Analyse der AEA-induzierten Relaxation in der Trachea der Maus.....	70
Abbildung 11: Nachweis der Beteiligung des Epithels an der AEA-induzierten Bronchorelaxation .....	72
Abbildung 12: Analyse der durch AEA Stimulation induzierten intrazellulären Signalkaskade... 74	
Abbildung 13: Analyse der PGE2 und cAMP Produktion nach AEA Stimulation von Trachealringen.....	75
Abbildung 14: Analyse der FAAH- und Prostaglandin-Rezeptorexpression in humanen Zellen..	76
Abbildung 15: Analyse der PGE2 und cAMP Produktion in humanen Zellen.....	77
Abbildung 16: Nachweis der FAAH Aktivität in verschiedenen Mausgeweben und humanen Zellen.....	78
Abbildung 17: Nachweis der AEA-vermittelten Relaxation in Bronchien und Bronchiolen gesunder C57BL/6J Mäuse .....	80
Abbildung 18: Analyse des Atemwegswiderstands gesunder C57BL/6J Mäuse unter 5-HT Provokation .....	81
Abbildung 19: Untersuchung möglicher Nebenwirkungen der inhalativen AEA Applikation im pulmonal-vaskulären System .....	82
Abbildung 20: Quantitative Bestimmung verschiedener Endocannabinoide und Fettsäureamide in murinem Lungengewebe mittels LC-MS/MS .....	84
Abbildung 21: Expressionsnachweis verschiedener AEA Synthese Enzyme in Lungenhomogenisaten gesunder sowie OVA-induzierter Mäuse mit akutem Asthma .....	85
Abbildung 22: Analyse der AEA-vermittelten Relaxation in Bronchien und Bronchiolen gesunder Balb/c Mäuse.....	86
Abbildung 23: Analyse der erfolgreichen Asthma Induktion mittels H&E-Färbung sowie Untersuchung der pulmonalen Hyperreagibilität .....	87
Abbildung 24: Analyse der AEA-vermittelten Relaxation in Bronchien und Bronchiolen von Balb/c Mäusen mit akutem Asthma .....	88
Abbildung 25: Analyse der AEA-vermittelten Relaxation in Bronchien und Bronchiolen von Balb/c Mäusen mit chronischem Asthma.....	89
Abbildung 26: Analyse des Atemwegswiderstands OVA-induzierter Balb/c Mäuse mit akutem Asthma unter 5-HT Provokation .....	90
Abbildung 27: Signalkaskade der AEA-induzierten Relaxation in der glatten Muskulatur des Bronchialsystems.....	91

## 9 Publikationsliste

### Veröffentlichungen

Simon A, Von Einem T, Seidinger A, Matthey M, Bindila L, Wenzel D. The endocannabinoid anandamide is an airway relaxant in health and disease. *Nat Commun.* 2022 Sep. In Review

Neumann V, Knies R, Seidinger A, Simon A, Lorenz K, Matthey M, Breuer J, Wenzel D. The  $\beta_2$  agonist terbutaline specifically decreases pulmonary arterial pressure under normoxia and hypoxia via  $\alpha$  adrenoceptor antagonism. *FASEB J.* 2018 May;32(5):2519-2530. doi: 10.1096/fj.201700684RR. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29295855.

Jovancevic N, Khalfaoui S, Weinrich M, Weidinger D, Simon A, Kalbe B, Kernt M, Kampik A, Gisselmann G, Gelis L, Hatt H. Odorant Receptor 51E2 Agonist  $\beta$ -ionone Regulates RPE Cell Migration and Proliferation. *Front Physiol.* 2017 Nov 30;8:888. doi: 10.3389/fphys.2017.00888. PMID: 29249973; PMCID: PMC5714887.

Matthey M, Roberts R, Seidinger A, Simon A, Schröder R, Kuschak M, Annala S, König GM, Müller CE, Hall IP, Kostenis E, Fleischmann BK, Wenzel D. Targeted inhibition of Gq signaling induces airway relaxation in mouse models of asthma. *Sci Transl Med.* 2017 Sep 13;9(407):eaag2288. doi: 10.1126/scitranslmed.aag2288. PMID: 28904224.

Maßberg D, Jovancevic N, Offermann A, Simon A, Baniahmad A, Perner S, Pungsrinont T, Luko K, Philippou S, Ubrig B, Heiland M, Weber L, Altmüller J, Becker C, Gisselmann G, Gelis L, Hatt H. The activation of OR51E1 causes growth suppression of human prostate cancer cells. *Oncotarget.* 2016 Jul 26;7(30):48231-48249. doi: 10.18632/oncotarget.10197. PMID: 27374083; PMCID: PMC5217014.

Maßberg D, Simon A, Häussinger D, Keitel V, Gisselmann G, Conrad H, Hatt H. Monoterpene (-)-citronellal affects hepatocarcinoma cell signaling via an olfactory receptor. *Arch Biochem Biophys.* 2015 Jan 15;566:100-9. doi: 10.1016/j.abb.2014.12.004. Epub 2014 Dec 13. PMID: 25513961.

### Vorträge

Simon, Annika; Seidinger, Alexander; Matthey, Michaela; Bindila, Laura; Wenzel, Daniela (2022): Anandamide is a strong bronchorelaxant in health and obstructive airway disease. *Europhysiology 2022, Oral Session 17 – Respiratory Physiology, Copenhagen, Denmark, 2022*

Simon, Annika; Seidinger, Alexander; Matthey, Michaela; Bindila, Laura; Wenzel, Daniela (2021): The endocannabinoid anandamide is an airway relaxant in health and disease. *100<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Physiological Society, Oral Session 3 – Pulmonary Physiology and Hypoxia: Take a Breath, Frankfurt, Germany, 2021*

### Posterpräsentationen

Simon, Annika; Matthey, Michaela; Dietrich, Jennifer; Wenzel, Daniela (2018): Effect of the endocannabinoid anandamide on airway tone in healthy and asthmatic mice. *Europhysiology 2018, The Physiological Society, London, United Kingdom, 2018*

## **Danksagungen**

Mein großer Dank gilt Frau Prof. Dr. Daniela Wenzel für die stetige Unterstützung und enge hervorragende Betreuung dieses wundervollen Projektes. Für die tollen Kongressreisen nach London, Frankfurt oder Kopenhagen möchte ich mich ebenfalls bedanken, da ich hier die Ergebnisse meiner Doktorarbeit bereits vielen interessierten Zuhörern und Zuhörerinnen vorstellen konnte. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Jörg Höfeld sehr für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt meinen vielen lieben Kollegen des Instituts für Physiologie 1 der Universität Bonn. Während meiner Doktorandenzeit bei euch habt ihr mich alle freundschaftlich begleitet und mir eine schöne Zeit bereitet. Vor allem haben wir als tolles Team viele gemeinsame fröhliche Stunden bei Franks Dinnerpartys, verschiedenen Hauspartys, Yokes Grillpartys oder Ela's Clubpartys sowie den gemeinsamen Weihnachtsfeiern verlebt. Es war eine wundervolle Zeit mit euch.

Ganz besonders hervorheben möchte ich die Arbeitsgruppe Wenzel, bestehend aus Jennifer Dietrich, Leonard Lebender, Alexander Seidinger, Sarah Rieck sowie Ela Matthey und natürlich unseren Medizindoktoranden Laura Pallos, Christian Biederbick und Florian Winkler. Vielen lieben Dank für eure unschätzbare Unterstützung, den Zusammenhalt sowie die vielen lustigen Gespräche in unserem Büro. Die gemeinsamen Ausflüge sowie die Konferenz in London haben unheimlich Spaß gemacht, es war eine aufregende Zeit!

Den vielen lieben Kollegen der Abteilung für Systemphysiologie der Ruhr-Universität möchte ich auch ganz besonders danken. Von euch allen wurden wir „Bonner“ mit herzlichen Armen empfangen und haben uns zu einem wunderbaren Team zusammengefunden. Im Laboralltag, unseren Mittagspausen aber auch den vielen tollen Praktika für Mediziner haben wir immer sehr viel Spaß zusammen. Es ist und bleibt eine großartige Zeit mit euch.

Zum Schluss möchte ich mich herzlich bei meinen Freunden und meiner Familie für die stetige Motivation und emotionale Unterstützung bedanken. Ohne Euch wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen. Ihr seid wunderbar.

Mein allerletzter und riesigster Dank gilt Kai, der mich über alle die Jahre in allen Situationen uneingeschränkt unterstützt, begleitet und ermutigt hat. Du bist das Großartigste was mir passieren konnte.