

**Molekulare Mechanismen der
2-Arachidonylglycerol-vermittelten Atherogenese in
humanen koronar-arteriellen Endothelzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Lukas Jakob Eich

aus Haan (Rhld)

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Julian Jehle
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Becker

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.10.2022

Aus der Medizinische Klinik und Poliklinik II -Kardiologie, Angiologie und Pneumologie,
Oberarzt PD Dr. med. Julian Jehle

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Deutsche Zusammenfassung.....	5
1.1 Einleitung.....	5
1.2 Material und Methoden	8
1.3 Ergebnisse.....	14
1.4 Diskussion	19
1.5 Zusammenfassung	21
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung.....	22
2. Veröffentlichung.....	33
Abstract	33
Introduction.....	33
Material and methods	34
Results.....	36
Discussion	39
Conclusion.....	40
References	40
2.1 Ergänzende Daten der Publikation	41
3. Danksagung	49

Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonylglycerol
AEA	<i>N</i> -Arachidonylethanolamid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DES	Drug-eluting Stent
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
HCAEC	Humane koronararterielle Endothelzelle
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
ICAM-1	Intercellular cell-adhesion molecule 1
KHK	Koronare Herzkrankheit
LPS	Lipopolysaccharide
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
VCAM-1	Vascular cell-adhesion molecule 1

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Atherosklerose stellt mit ihren Folgeerkrankungen Herzinfarkt und Schlaganfall die häufigste Todesursache in Deutschland sowie weltweit dar (Nowbar et al., 2014; Plass et al., 2014; Saß et al., 2015; Wang et al., 2016). Die Entstehung der Atherosklerose beginnt nach der „Response-to-injury“-Hypothese mit lokalen Schäden des Gefäßendothels (Gimbrone und García-Cardeña, 2016; Ross, 1993). In der Folge präsentieren Endothelzellen Adhäsionsmoleküle an denen wiederum Leukozyten adhären (Gimbrone und García-Cardeña, 2016; Hansson, 2005; Kinlay und Ganz, 1997; Ross, 1993). Letztere migrieren anschließend in das Gewebe und rufen eine lokale Entzündungsreaktion hervor (Hansson, 2005; Libby et al., 2002; Ross, 1993). Cholesterinablagerungen sowie die Einwanderung und lokale Rekrutierung von Immunzellen und glatten Muskelzellen bedingen eine lokale Verbreiterung der Intima (Hansson, 2005; Libby et al., 2002; Libby et al., 2016). Hierbei kommt es im weiteren Verlauf über die Entstehung so genannter Schaumzellen und lokaler Gewebsumstrukturierung zur Ausbildung der atherosklerotischen Plaques in der Gefäßwand. Die Endothelialisierung der Plaques verhindert die Thrombosierung des Gefäßes und den damit einhergehenden Infarkt (Gimbrone und García-Cardeña, 2016; Hansson, 2005).

In den folgenden Unterkapiteln wird auf die Rolle des Endocannabinoidsystems sowie der Endothelzellen eingegangen bis schließlich die Fragestellung der vorliegenden Arbeit herausgestellt wird.

1.1.1 Endocannabinoidsystem in der Atherogenese

Die lokale, chronische Inflammation ist seit den 1990er Jahren immer stärker in den Fokus der Atheroskleroseforschung gerückt (Hansson, 2005; Libby et al., 2016; Ross, 1993). Durch eine Hemmung der Entzündung konnten Atherosklerose und Herzinfarkte bei Patienten reduziert werden (Ridker et al., 2017). Das Endocannabinoidsystem stellt einen bekannten Modulator des Immunsystems dar (Henry et al., 2016; Ho und Kelly, 2017). Komponenten des Endocannabinoidsystems werden auch auf koronaren Endothelzellen exprimiert (Montecucco et al., 2009; Rajesh et al., 2007). Hauptkomponen-

ten sind die Cannabinoidrezeptoren 1 und 2 sowie deren endogene Liganden mit den Hauptvertretern *N*-Arachidonylethanolamid (AEA) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG; Devane et al., 1988; Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995; Montecucco et al., 2009; Abbildung 1). Der Abbau von 2-AG erfolgt hauptsächlich über die Monoacylglycerin-Lipase, ist aber auch über zahlreiche weitere, ubiquitär im Körper vorkommende Enzyme möglich (Blankman et al., 2007; Dinh et al., 2002; J arai et al., 2000; Miller et al., 2016; Navia-Paldanius et al., 2012; van Tienhoven et al., 2002; Xie et al., 2010).

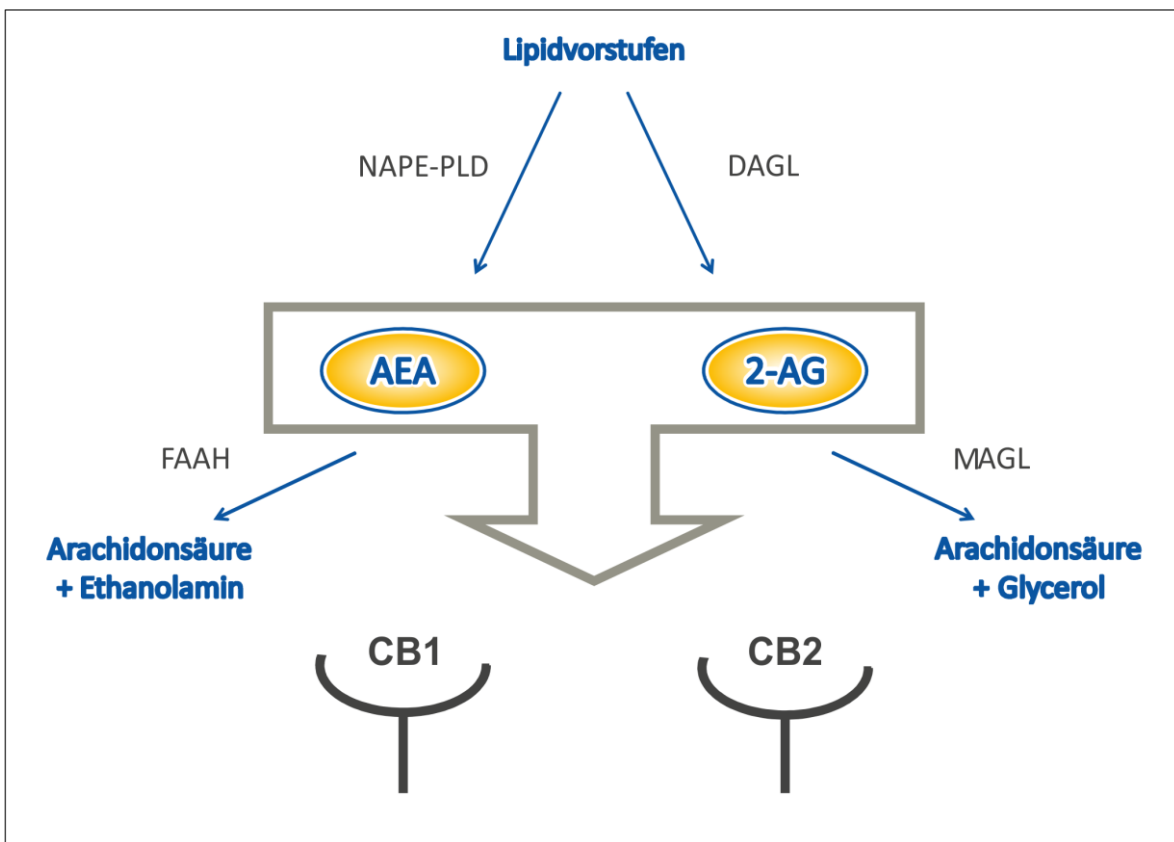


Abb. 1: Schema Endocannabinoidsystem

Die beiden Endocannabinoide 2-AG und AEA werden aus Lipidvorl aufern durch die Enzyme NAPE-PLD und DAGL synthetisiert. Sie werden durch FAAH und MAGL zu Arachidons ure und entsprechenden Resten hydrolysiert. Beide Endocannabinoide sind Agonisten der beiden Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2. 2-AG, 2-Arachidonylglycerol; AEA, *N*-Arachidonylethanolamid; CB1, CB2 Cannabinoidrezeptoren 1 und 2; DAGL, Diacylglycerol-Lipase; FAAH, Fetts ureamid-Hydrolase; MAGL, Monoacylglycerin-Lipase; NAPE-PLD, *N*-Acylphosphatidylethanolamin spezifische-Phospholipase D.

Atherogene Effekte des Endocannabinoids 2-AG werden von vielen Autoren berichtet (Jehle et al., 2016; Jehle et al., 2018; Montecucco et al., 2009; Vujic et al., 2016; vgl. Seite 33 der Veröffentlichung). Durch eine verminderte Produktion des Endocannabinoids ließen sich diese Effekte aufheben (Jehle et al., 2016). Ein pharmakologischer Eingriff in die Balance des Endocannabinoidsystems wird von verschiedenen Autoren als potentieller antiatherosklerotischer Therapieansatz diskutiert (Jones, 2008; Le Foll et al., 2009; Liu et al., 2021; Nissen et al., 2008). Der Einfluss von 2-AG auf Endothelzellen und die molekularen Grundlagen dieses Einflusses wurden hingegen erst unzureichend bearbeitet (vgl. Veröffentlichung, S. 34).

1.1.2 Endothelzellen in der Atherogenese

Die Rolle der Endothelzellen von der frühen Atherogenese bis zum manifesten Infarkt ist zunehmend in den Vordergrund gerückt (Gimbrone und García-Cardena, 2016; Libby et al., 2016). Hierbei kommt Adhäsionsmolekülen eine zentrale Bedeutung zu. Selektine, wie E-Selektin, begünstigen dabei das „Rolling“ von Leukozyten an der Gefäßwand (Kinlay und Ganz, 1997; Ley et al., 1991; Shimizu et al., 1992; Mulligan et al., 1991). Schließlich kommt es zur festen Adhäsion durch Zelladhäsionsmoleküle (Arfors et al., 1987; Dustin und Springer, 1988; Kinlay und Ganz, 1997; Rice et al., 1990; Shimizu et al., 1992). Darüber hinaus wurde das Vascular cell-adhesion molecule 1 (VCAM-1) mit atherosklerotischen Plaques assoziiert (Li et al., 1993; Cybulsky et al., 2001). Das lösliche Intercellular cell-adhesion molecule 1 (ICAM-1) konnte als prädiktiv für den Myokardinfarkt identifiziert werden (Ridker et al., 1998).

Den genannten Adhäsionsmolekülen kommen, über die Atherosklerose hinaus, entscheidende Bedeutungen in weiteren inflammatorischen Krankheitsprozessen zu. Diese erstrecken sich von Asthma bronchiale über rheumatologische Krankheitsbilder bis hin zum Diabetes mellitus (Dowlatshahi et al., 2013; Hasegawa et al., 1994; Qiu et al., 2019; Yusuf-Makagiansar et al., 2002). Sollte das Endocannabinoid 2-AG die Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf HCAEC induzieren, könnte dieses Ergebnis ebenfalls einen Therapieansatz für zahlreiche weitere inflammatorisch bedingte Krankheiten liefern.

1.1.3 Fragestellung der vorliegenden Publikationsdissertation

Inflammation, als grundlegender Baustein der Atherogenese, lässt sich durch Endocannabinoiden modulieren (s. 1.1.1). Trotz des Wissens um die atherogenen Effekte des Endocannabinoids 2-AG, ist dessen Wirkung auf die Endothelzellen der humanen Koronararterien noch nicht beschrieben. Die Leukozytenadhäsion von THP-1-Monozyten an HCAEC durch 2-AG wurde in ersten Daten unserer Arbeitsgruppe beobachtet (s. Veröffentlichung, Seite 39). Weiterhin wurden die Adhäsionsmoleküle E-Selektin und P-Selektin auf humanen venösen Endothelzellen durch 2-AG induziert (Gasperi et al., 2014). Somit ergibt sich folgende Fragestellung für die Arbeit:

Lässt sich die gesteigerte THP-1-Monozytenadhäsion an humanen koronararteriellen Endothelzellen durch das Endocannabinoid 2-AG bestätigen? Werden die Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf humanen koronararteriellen Endothelzellen durch das Endocannabinoid 2-AG induziert? Im Fall einer Induktion, welche der Adhäsionsmoleküle können für die gesteigerte THP-1-Monozytenadhäsion identifiziert werden? Zur Überprüfung der Fragestellung wurden HCAEC im Zellkulturmodell per Fluoreszenzmikroskopie sowie per Durchflusszytometrie untersucht.

1.2 Material und Methoden

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von humanen koronararteriellen Endothelzellen (HCAEC, PromoCell GmbH, Heidelberg). Diese wurden auf die Interaktion mit THP-1-Monozyten sowie der Präsentation von Adhäsionsmolekülen durchflusszytometrisch untersucht.

1.2.1 THP-1-Monozyten-Adhäsionsassay

Es wurden HCAEC (männlich, p6, PromoCell GmbH) auf T25 Zellkulturflaschen (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) aufgetaut und bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ im Inkubator (SANYO Electric Co. Ltd., Moriguchi, Japan) gehalten. Deckgläschen (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen) wurden in 24-Well-Zellkulturplatten (Techno Plastic Products AG) vorgelegt. Anschließend wurden die HCAEC aus der T25 Zellkulturflasche auf die 24-Well-Platte gegeben.

Bei einer Konfluenz der Zellen von circa 80 % wurden diese mit 1 μM sowie 10 μM 2-AG inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente das Lösungsmittel 0,1 $\mu\text{l/ml}$ Dimethylsulfoxid (DMSO, AppliChem GmbH, Darmstadt). 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde als Positiv-Kontrolle verwendet. Alle Gruppen wurden bei 37 °C und 5 % (v/v) CO_2 für vier Stunden inkubiert.

THP-1 Monozyten (CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim) wurden in RPMI-Medium (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA) in T75 Zellkulturflaschen (Techno Plastic Products AG) bei 37°C und 5% (v/v) CO_2 gehalten. Die Zellen wurden in 1 ml je 10^6 Zellen Diluent C (Sigma-Aldrich) resuspendiert und in 1 ml je 10^6 Zellen 0,4 % (v/v) PKH26 (Sigma-Aldrich) gefärbt. Diese wurden bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Die Färbung wurde mit 1 ml je 10^6 Zellen RPMI-Medium gestoppt und bei Raumtemperatur bei 400 xg für fünf Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) (Gibco, Life Technologies) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in HCAEC-Medium ohne „Supplement mix“ (Endothelial Cell Growth Medium MV; PromoCell GmbH) resuspendiert und 10^5 THP-1-Zellen je Well zu den vorinkubierten HCAEC gegeben. Diese wurden bei 37 °C und 5 % (v/v) CO_2 für 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in DPBS erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4 % (v/v) Paraformaldehyd (AppliChem GmbH) für zehn Minuten.

Die Deckgläschen wurden mit einem Tropfen 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-haltigem Vectashield mounting medium (Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA) auf einen Objektträger gegeben. An fünf zufällig gewählten Bereichen wurden Aufnahmen mit dem Inversen Mikroskop Axio Observer 7 (Carl Zeiss AG, Oberkochen) aufgenommen. Die Bilder wurden im DAPI-Kanal, für alle Zellkerne sowie im AF546-Kanal für die PKH26-Membranfärbung der THP-1 Monozyten aufgenommen und mit der Zeiss ZEN 2.3-lite-Software (Carl Zeiss AG) aufgearbeitet.

1.2.2 Durchflusszytometrie der HCAEC

Um molekulare Grundlagen der gesteigerten Monozytenadhäsion genauer zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. HCAEC wurden mit 2-AG stimuliert und anschließend mit Antikörpern gegen Intercellular cell-adhesion molecule 1

(ICAM-1), Vascular cell-adhesion molecule 1 (VCAM-1) und E-Selektin gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden daraufhin per Durchflusszytometrie eingemessen.

Zunächst wurde das Versuchsmodell etabliert um eine ausreichende Sensitivität und Spezifität sicherzustellen. Das finale Versuchsprotokoll wird in 1.2.2.3 beschrieben.

1.2.2.1 Dissoziation der HCAEC

Die adhären auf der Zellkulturschale wachsenden Endothelzellen, müssen in Suspension gebracht werden, um durchflusszytometrisch untersucht werden zu können. Die zur Dissoziation verwendeten Enzyme schneiden hierbei die Adhäsionsmoleküle der Zellen, um die Zellen von der Zellkulturschale lösen zu können. Folglich wurden Versuche durchgeführt, wie die Zellen möglichst schonend und unter Erhalt der zu messenden Oberflächenmoleküle in Suspension gebracht werden können. Hierbei wurden HCAEC mit unterschiedlichen Dissoziationsmethoden abgelöst und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (vor bzw. nach der Dissoziation) gefärbt. In der Literatur wird u.a. die Antikörperfärbung im Well und anschließende Dissoziation mittels 0,04 % (v/v) Trypsin/ 0,03 % (v/v) EDTA (PromoCell GmbH) beschrieben (wie unter 1.2.2.3 beschrieben; Gräbner et al., 2000). Diese wurde mit verschiedenen Dissoziationsmethoden verglichen, in denen HCAEC zunächst mittels 0,04 % (v/v) Trypsin/ 0,03 % (v/v) EDTA, Accutase™ (StemPro™ Accutase™ Cell Dissociation Reagent, Thermo Fischer, Waltham, USA), einer Vorbehandlung auf Eis mit anschließender mechanischer Dissoziation oder unmittelbarer mechanischer Dissoziation mit Zellschabern (SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht) abgelöst wurden. Zusätzlich wurden die HCAEC in den vorbehandelten Gruppen über unterschiedlich lange Zeiten den Dissoziationsreagenzien ausgesetzt (Accutase™ für 1, 3, 6 und 10 Minuten; 0,04 % (v/v) Trypsin/ 0,03 % (v/v) EDTA für 1, 3 und 6 Minuten; Eis für 1 und 3 Minuten;). Die Trypsinwirkung wurde nach den entsprechenden Zeiten mit Trypsin neutralizing solution abgestoppt (0,05 % (v/v) Trypsin Inhibitor/ 0,1 % (v/v) Bovines Serum Albumin, PromoCell GmbH). Es folgte die Antikörperfärbung im FACS-Röhrchen (SARSTEDT AG & Co.) entsprechend den Herstellerangaben mittels Fc-Block (Human TruStain, BioLegend, San Diego, USA) und ICAM-1-Antikörper (PerCP/Cy5.5 anti-human CD54 Antibody Clone HA58, BioLegend), VCAM-1-Antikörper (BB515 Mouse Anti-Human CD106 Clone 51-10C9 (RUO), BD Biosciences, Franklin Lakes,

USA) sowie E-Selektin-Antikörper (APC anti-human CD62E Antibody Clone HAE-1f, BioLegend).

Die Zugabe des Todfarbstoffs Zombie Yellow Fixable Viability Kit (gelöst in DMSO, BioLegend) erfolgte in allen Gruppen als letzter Schritt vor der Einmessung entsprechend den Herstellerangaben. Hierdurch konnte zwischen unterschiedlichen Lebend-Tot-Raten differenziert werden, bedingt durch die vorangegangenen Färbe- und Dissoziations-schritte. Die Versuche wurden als technische Triplikate durchgeführt.

Zusätzlich wurde in zahlreichen Versuchsdurchläufen versucht, P-Selektin als weiteres Adhäsionsmolekül mittels der dargestellten Methodik zu quantifizieren. Zur Antigendarstellung wurde der Brilliant Violet 421™ anti-human CD62P (P-Selectin) Antibody Clone AK4 (BioLegend) verwendet. Neben verschiedenen Dissoziationsprotokollen wurden in der Literatur beschriebene Stimulanzen wie LPS und TNF α auf den HCAEC getestet (Baron et al., 2010; Gasperi et al., 2014; Weller et al., 1992). Außerdem wurden weitere Stimulationszeiten von zehn Minuten bis zu vier Stunden geprüft. Da keine der beschriebenen Methoden bei unseren Zellen zu einer verwertbaren Induktion des P-Selektins führten, wurde es von den folgenden Untersuchungen ausgeschlossen.

In weiteren Untersuchungen wurden Faktoren wie die Verwendung des Mediums der Antikörperlösung und die Konfluenz der Zellen zu Versuchsbeginn untersucht. Marazzi et al. (2011) beschreiben Störeffekte durch Endocannabinoide im fötalen bovines Serum in frischen Versuchsmedien. Um den Einfluss genannter Hintergrundeffekte im Verhältnis zum zugegebenen 2-AG zu verringern, wurden die Zellkulturmedien untersucht. Die Versuche wurden als technische Triplikate geführt. Es wurde eine Stimulation im HCAEC-Medium etabliert, in welchem die Zellen bereits 21- 24 Stunden im Voraus gewachsen sind.

1.2.2.2 Antikörpertitrationsen

Schließlich wurden die verwendeten Antikörper titriert. Hierzu wurden die verwendeten HCAEC zur einen Hälfte unstimuliert gelassen, während die andere Hälfte mit 100 ng/ml LPS bei 37 °C bei 5 % (v/v) CO₂ für vier Stunden vorstimuliert wurde. Dadurch entstand die maximal anzunehmende Differenz der Adhäsionsmolekülpräsentation zwischen den beiden Gruppen. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen der beiden Grup-

pen mit absteigender Dosierung der Antikörper gefärbt. Die weiteren Schritte der Einmessung fanden nach dem unter 1.2.2.3 beschriebenen Protokoll statt. Die Versuche wurden als technisches Triplikat durchgeführt.

1.2.2.3 Versuchsprotokoll

In den Versuchsdurchläufen wurden HCAEC auf 6-Well-Platten (Techno Plastic Products AG) aufgetaut. Am Folgetag wurden 70-90 % konfluente Zellen für den Versuch ausgewählt. Dazu wurde die Hälfte des HCAEC-Mediums (Endothelial Cell Growth Medium MV) abgenommen und die Substanzen entsprechend zweifach konzentriert im gebrauchten HCAEC-Medium angesetzt. Es wurde 1 μM sowie 10 μM 2-AG (TOCRIS BIOSCIENCE, Bristol, England), gelöst in DMSO eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle diente 0,1 $\mu\text{l/ml}$ DMSO und entspricht damit der 1 μM 2-AG Konzentration. 100 ng/ml LPS wurde als Positiv-Kontrolle verwendet. Anschließend wurden die Substanzen auf die Zellen gegeben und bei 37 °C und 5 % (v/v) CO_2 für vier Stunden im Inkubator stimuliert.

Unmittelbar nach der Stimulation wurden die Zellen im Well gefärbt. Hierzu wurde das HCAEC-Medium abgenommen und die Zellen mit 0,5 ml 30 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) gepufferte Salzlösung (PromoCell GmbH) je Well gewaschen. Danach wurden 200 μl 1 % v/v Fc-Block, gelöst in 30 mM HEPES gepufferte Salzlösung, je Well hinzugegeben und die Zellen bei 37 °C und 5 % (v/v) CO_2 für drei Minuten inkubiert. Zu dem im Well vorhandenen Fc-Block wurden dann 100 μl der Antikörpermischung hinzugegeben. Diese bestand, auf Basis von 30 mM HEPES gepufferte Salzlösung, aus folgenden Antikörpern: 0,375 % (v/v) ICAM-1-Antikörper, 0,75 % (v/v) VCAM-1-Antikörper und 1 % (v/v) E-Selektin-Antikörper. Die Antikörper wurden bei 37 °C und 5 % (v/v) CO_2 für fünf Minuten auf den Zellen inkubiert. Anschließend wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und die Zellen mit 0,5 ml 30 mM HEPES gepufferte Salzlösung pro Well gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin mit 0,5 ml 0,04 % (v/v) Trypsin/ 0,03 % (v/v) EDTA je Well bei 37 °C und 5 % (v/v) CO_2 für vier Minuten inkubiert. Die Dissoziation wurde danach durch Klopfen an der 6-Well-Platte unter mikroskopischer Kontrolle unterstützt. Die Abstopfung der Trypsinwirkung erfolgte mit Trypsin neutralizing solution (0,05 % (v/v) Trypsin Inhibitor/ 0,1 % (v/v) Bovines Serum Albumin).

Die Zellsuspension wurde in ein FACS-Röhrchen gegeben und bei 4 °C und 200 xg für zehn Minuten in der Eppendorf centrifuge 5810R (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Im Anschluss wurden die HCAEC mit 1 ml DPBS (Gibco, Life Technologies) gewaschen und erneut bei 4 °C bei 200 xg für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden abgekippt und 50 µl je Probe 0,2 % (v/v) Zombie Yellow Fixable Viability Kit (gelöst in DMSO, BioLegend) zugegeben und bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 1 ml DPBS und konsekutiver Zentrifugation bei 4 °C bei 200 xg für zehn Minuten. Nach Abkippen des Überstands wurde 100 µl DPBS hinzugegeben und die Zellen wurden eingemessen. Für die Erstellung der Lebend-Tot-Kompensationsprobe wurden die Hälfte der HCAEC bei 70 °C für 15 Minuten im Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf AG) abgetötet. Anschließend erfolgt die Zugabe des Zombiefarbstoffes und die Proben wurden eingemessen. Zusätzlich wurden Fluorescence-minus-one-Kontrollen für jeden Antikörper geführt. Hierbei handelt es sich um mit 100 ng/ml LPS stimulierte HCAEC, die mit allen bis auf jeweils einen Antikörper gefärbt sind.

Die Messung erfolgte in der Core Facility (Institute of Molecular Medicine and Experimental Immunology, Flow Cytometry Medizinische Fakultät Bonn) am BD FACS Canto II Flow Cytometer (BD Biosciences). Hier wurden täglich neue Cytometer-Setup-and-Tracking-Einstellungen erstellt. Für die Messungen wurden Kompensationen mit HCAEC erstellt und für maximal 15 Tage für die Messungen verwendet. Zur Auswertung wurde die FlowJo Data Analysis Software V10 (FlowJo LLC, Ashland, USA) verwendet. Es wurden mindestens 40.000 Events je Probe eingemessen. Jede Probe wurde als technisches Triplikat angefertigt. Der geschilderte Versuch wurde in fünf voneinander unabhängigen Durchläufen wiederholt.

1.2.3 Statistische Analysen

Die Statistischen Analysen wurden mit Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) sowie GraphPad-Prism-Software (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt, wobei p-Werte von $\leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet wurden. Die Daten werden als arithmetisches Mittel \pm den Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die Daten des THP-1-Adhäsionsassays sowie der durchflusszytometrischen Quantifizierung der Adhäsionsmoleküle wurden mit dem D'Agostino-Pearson Test auf ihre Normalverteilung

getestet. Bei gegebener Normalverteilung wurden die Werte als einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgender Bonferroni-Korrektur auf Signifikanz untersucht.

1.3 Ergebnisse

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigte sich bereits vor Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit, dass durch das Endocannabinoid 2-AG verschiedene atherogene Mechanismen in Endothelzellen moduliert werden können. In diesen Vorarbeiten zeigte sich durch die Erhöhung des 2-AG Spiegels insbesondere eine Verschlechterung endothelialer Reparaturmechanismen *in vivo* und eine gesteigerte THP-1-Monozytenadhäsion an HCAEC *in vitro*. Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, den Einfluss des 2-AG auf die Monozytenadhäsion zu bestätigen (1.3.1) und den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus aufzuzeigen (1.3.2).

1.3.1 THP-1-Monozytenadhäsionsassay

HCAEC wurden mit 2-AG stimuliert und im Anschluss wurde die Adhäsion von THP-1-Monozyten an den stimulierten Endothelzellen quantifiziert. 2-AG führte zu einer mehr als zweifach gesteigerten THP-1-Monozytenadhäsion auf HCAEC (s. Veröffentlichung, S. 39). Die Ergebnisse sind in Figure 3 der Veröffentlichung (s. S. 37) dargestellt. Die Ergebnisse wurden um Daten weiterer Mitglieder der Arbeitsgruppe ergänzt.

1.3.2 Durchflusszytometrie der HCAEC

1.3.2.1 Dissoziation der HCAEC

Um die molekularen Grundlagen der Adhäsion genauer zu untersuchen wurden durchflusszytometrische Analysen der HCAEC angeschlossen. Die verwendete Gating-Strategie ist in Figure 4A-F der Veröffentlichung dargestellt (s.S. 38). Zunächst wurden geeignete Färbe- und Dissoziationsstrategien miteinander verglichen. Die höchste Viabilität der Zellen bei der Einmessung wurde bei der Antikörperfärbung im Well (91,45 %) beobachtet. Im Gegensatz dazu gingen alle Methoden, bei welchen die Zellen zunächst dissoziiert wurden, mit verminderten Lebend-Raten einher (Accutase™: 35,07 % (1 Minute), 22,50 % (3 Minuten), 28,80 % (6 Minuten), 22,28 % (10 Minuten); Trypsin: 59,00 % (1 Minute), 21,17 % (3 Minuten), 35,72 % (6 Minuten); Vorbehandlung mit Eis: 21,33 %

(1 Minute), 31,73 % (3 Minuten); direkte mechanische Dissoziation: 38,3 %; n = 1). Die Ergebnisse der Versuche sind exemplarisch in Abbildung 2 der vorliegenden Arbeit dargestellt. Aufgrund der deutlich überlegenen Überlebensrate der Zellen entschieden wir uns für eine Färbung im Well. Darüber hinaus blieben bei dieser Färbestrategie die Adhäsionsmoleküle am besten erhalten.

1.3.2.2 Antikörpertitration

Zusätzlich wurde eine Antikörpertitration der verwendeten Antikörper durchgeführt. Ziel der Titration war die Ermittlung einer Antikörperkonzentration oberhalb der erforderlichen Mindestmenge, um die Antigene markieren zu können. Andererseits sollte eine Antikörperüberladung und daraus resultierende falsch positive Zellen als Hintergrundrauschen vermieden werden. Exemplarisch sind hier die Ergebnisse der VCAM-1-Antikörpertitration dargestellt (LPS-stimulierte HCAEC: 87,43 % (60 µl/ml Anti-VCAM-1), 85,47 % (30 µl/ml Anti-VCAM-1), 69,60 % (7,5 µl/ml Anti-VCAM-1), 38,53 % (3 µl/ml Anti-VCAM-1); HCAEC-Kontrolle: 5,63 % (60 µl/ml Anti-VCAM-1), 4,17 % (30 µl/ml Anti-VCAM-1), 0,83 % (7,5 µl/ml Anti-VCAM-1), 0,80 % (3 µl/ml Anti-VCAM-1); Quotient der LPS-stimulierten HCAEC/ HCAEC-Kontrolle: 15,54 (60 µl/ml Anti-VCAM-1), 20,51 (30 µl/ml Anti-VCAM-1), 83,52 (7,5 µl/ml Anti-VCAM-1), 47,97 (3 µl/ml Anti-VCAM-1); n = 1 ; s. Abbildung 3). Die Antikörpertitrationen des ICAM-1-Antikörpers und des E-Selektin-Antikörpers wurden äquivalent durchgeführt. Aufgrund der maximalen Quotienten zwischen LPS-stimulierten HCAEC und der Kontrollgruppen wurden optimale Antikörperkonzentrationen von 3,75 µl/ml ICAM-1-Antikörper, 7,5 µl/ml VCAM-1-Antikörper sowie 10 µl/ml E-Selektin-Antikörper festgelegt.

1.3.2.3 2-AG induziert keines der untersuchten Adhäsionsmoleküle

HCAEC wurden mit 2-AG stimuliert und per Durchflusszytometrie auf ihre Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin analysiert. Die Oberflächenpräsentation der untersuchten Adhäsionsmoleküle wurde durch die Stimulation mit 2-AG nicht beeinflusst. ICAM-1 ($17,0 \pm 0,6$ % (1 µM 2-AG); $18,2 \pm 0,6$ % (10 µM 2-AG); $18,2 \pm 0,8$ % (DMSO); n = 5; p >0,9999), VCAM-1 ($19,1 \pm 2,0$ % (1 µM 2-AG); $18,1 \pm 1,9$ % (10 µM 2-AG); $19,6 \pm 1,7$ % (DMSO); n = 5; p >0,9999) und E-Selektin ($1,3 \pm 0,5$ % (1 µM 2-AG); $1,1 \pm 0,3$ % (10 µM 2-AG); $1,1 \pm 0,2$ % (DMSO); n = 5; p >0,9999) wiesen keinen Unterschied im

Vergleich zu der Molekülpräsentation der Kontrollgruppe auf (s. Veröffentlichung, S. 39). Hingegen hat sich die Positivkontrolle in allen Adhäsionsmolekülen hochsignifikant von den anderen Gruppen abgehoben (ICAM-1: $38,3 \pm 0,7$ %; VCAM-1: $40,4 \pm 1,6$ %; E-Selektin: $11,5 \pm 1,0$ %; $n = 5$; $p < 0,0001$, s.Abb. 4 beziehungsweise Figure 4G-I der Veröffentlichung, S. 38).

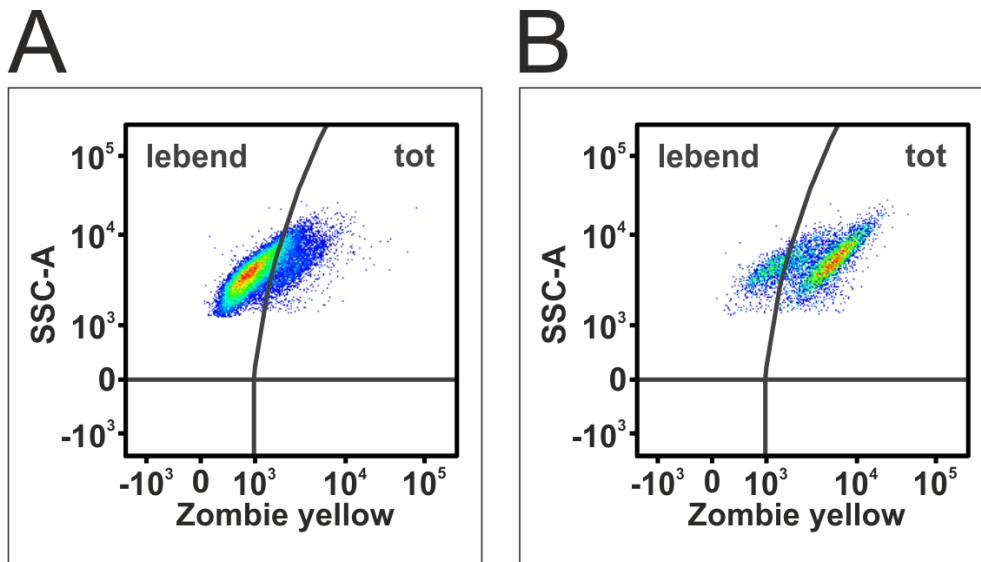


Abb. 2: Dissoziationsprotokolle

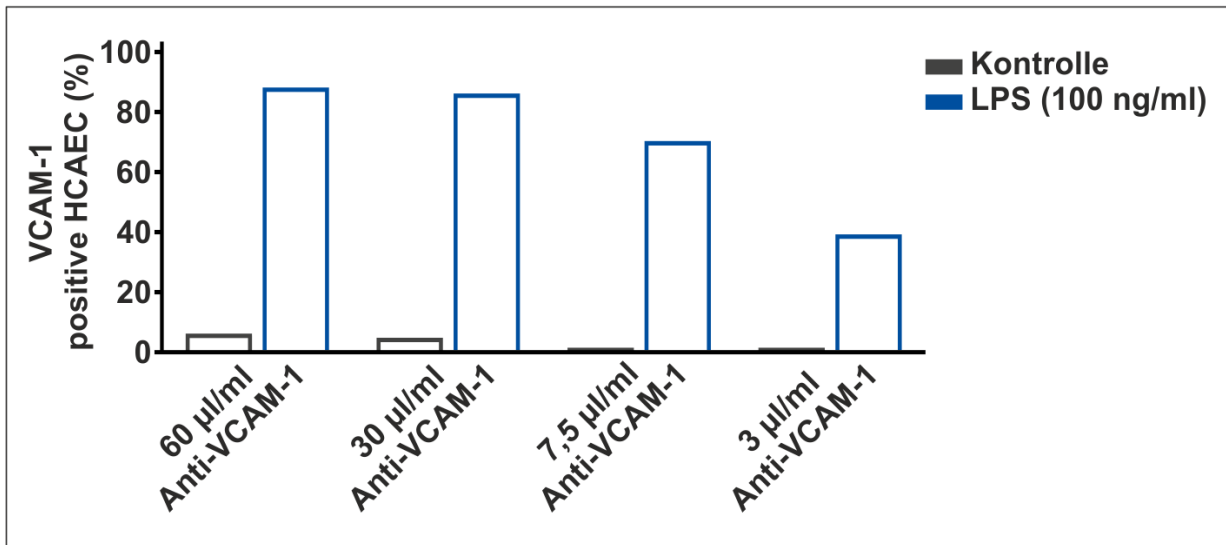
Dargestellt sind Pseudocolor-Plots der durchflusszytometrischen Analysen verschiedener Dissoziationsprotokolle. Es wurden HCAEC jeweils verschiedenen Dissoziations- und Färbungsprotokollen unterzogen:

A: Die HCAEC wurden im Well auf Adhäsionsmoleküle gefärbt und erst im Anschluss dissoziiert.

B: Die HCAEC wurden mit Accutase™ vom Well gelöst und im Anschluss im FACS-Röhrchen mit Antikörpern gefärbt. Die Dissoziation mit Trypsin, Eis sowie mechanischer Dissoziation ergab vergleichbare Ergebnisse zu denen der Accutase™.

Die Färbung der Adhäsionsmoleküle im Well mit anschließender Dissoziation ergab deutlich höhere Lebend-Raten, als alle übrigen Dissoziations- und Färbemethoden. FACS, Fluorescence activated cell-sorting; HCAEC, humane koronararterielle Endothelzellen; SSC-A, Sidescatter.

A



B

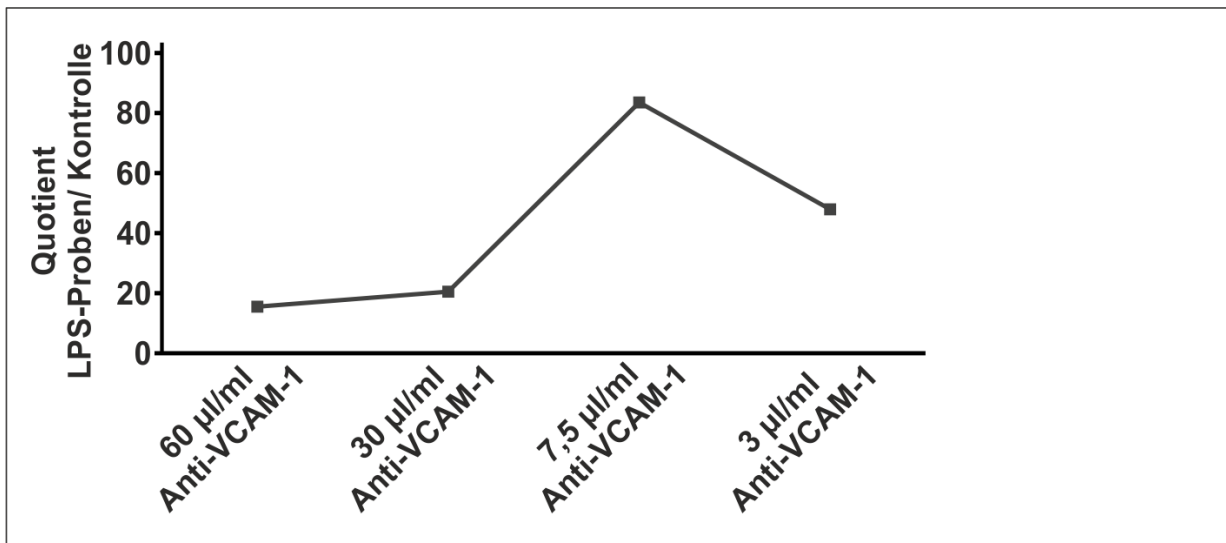


Abb. 3: VCAM-1-Antikörpertitration

A: Dargestellt ist die Titration des VCAM-1-Antikörpers gegen den Anteil VCAM-1-positiver HCAEC in %. Es wurden HCAEC mit 100 ng/ml LPS (blau) für vier Stunden stimuliert. In Grau sind die jeweiligen Kontrollen dargestellt. Im Anschluss wurden die Zellen gruppenweise mit entsprechenden Antikörperkonzentrationen gefärbt und per Durchflusszytometrie eingemessen.

B: Dargestellt ist die Titration des VCAM-1-Antikörpers gegen den Quotienten der LPS-stimulierten- und Kontrollproben. Hierdurch ergibt sich ein maximales Verhältnis zwischen stimulierten und unstimulierten HCAEC bei einer Antikörperkonzentration von 7,5 µl/ml. Die Verbindungslinie dient der Visualisierung.

Dargestellt sind die arithmetischen Mittel, technischer Triplikate. $n = 1$. HCAEC, humane koronararterielle Endothelzellen; LPS, Lipopolysaccharide; VCAM-1, Vascular cell-adhesion molecule 1.

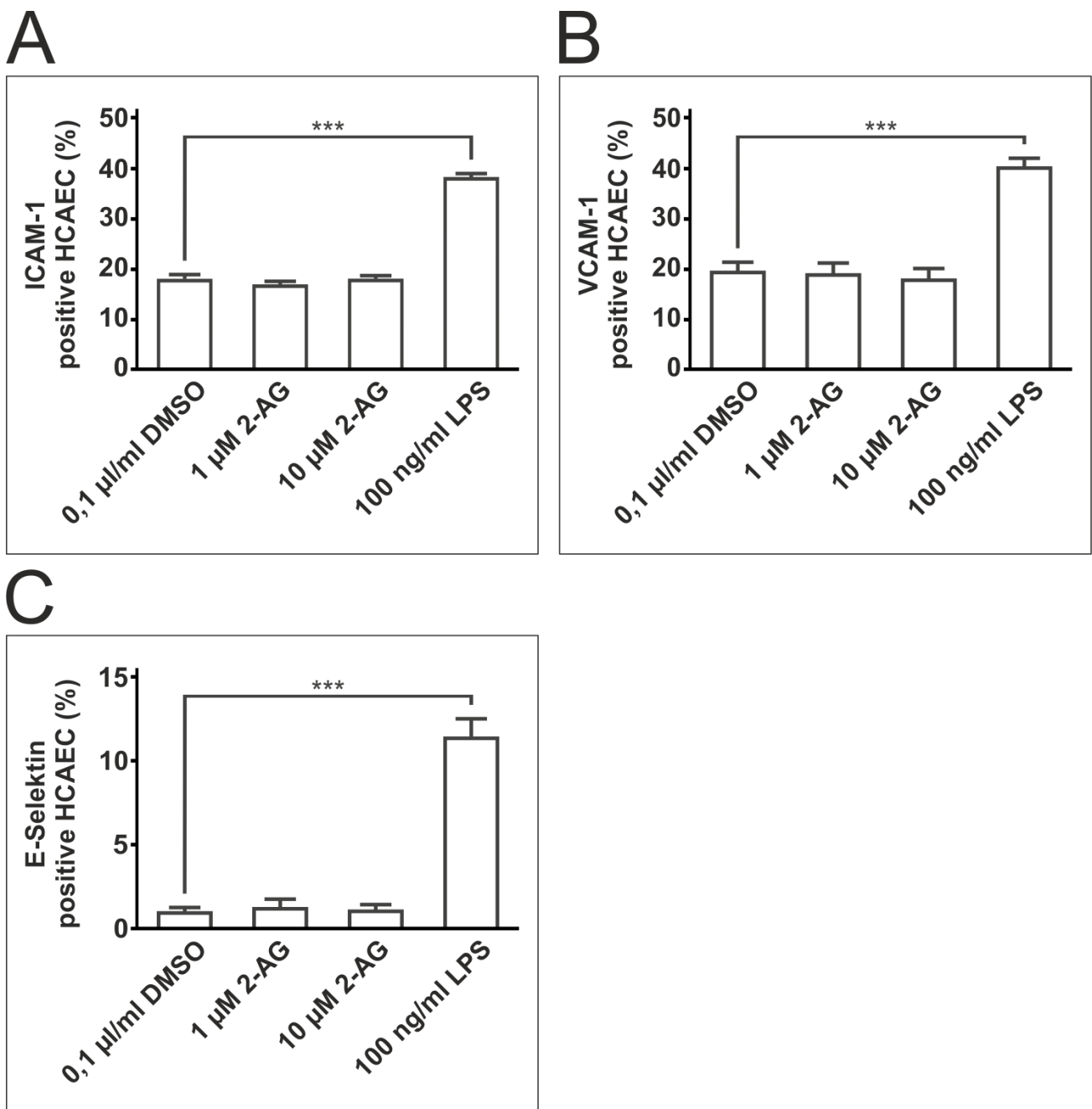


Abb. 4: Adhäsionsmoleküle

Dargestellt sind die unterschiedlich stimulierten HCAEC gegen den Anteil positiver Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (A), VCAM-1 (B) und E-Selektin (C) in der Durchflusszytometrie. Keines der untersuchten Adhäsionsmoleküle wurde durch 2-AG-Stimulation signifikant gesteigert präsentiert. Die Daten sind als arithmetisches Mittel \pm Statistischem Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. $n = 5$; ***, $p < 0,001$ ausgewertet als einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgender Bonferroni-Korrektur. Abbildung aus Figure 4G-I der Veröffentlichung, S. 38; modifiziert nach Lukas Eich. 2-AG, 2-Arachidonylglycerol; DMSO, Dimethylsulfoxid; HCAEC, humane koronararterielle Endothelzellen; ICAM-1, Intercellular cell-adhesion molecule 1; LPS, Lipopolysaccharide; VCAM-1, Vascular cell-adhesion molecule 1.

1.4 Diskussion

1.4.1 Effekte von 2-AG auf Monozytenadhäsion und Adhäsionsmoleküle

Die Monozytenadhäsion wurde im Zellkulturmodell an HCAEC untersucht, welche zuvor mittels 2-AG stimuliert worden waren. Es wurde eine signifikant gesteigerte Adhäsion humaner Monozyten an HCAEC festgestellt. Die Adhäsion von Leukozyten, in diesem Fall von Monozyten, am Gefäßendothel stellt einen frühen Schritt der Atherogenese dar. Durch die darauffolgende Invasion in das umgebende Gewebe kann durch eine lokale Inflammation die Atherosklerose voranschreiten (Gimbrone und García-Cardeña, 2016; Hansson, 2005; Kinlay und Ganz, 1997; Libby et al., 2002; Libby et al., 2016).

Schließlich stellte sich die Frage, ob 2-AG die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 sowie E-Selektin auf HCAEC induziert. Die Endothelzellen wurden per Durchflusszytometrie untersucht, wobei 2-AG erstaunlicherweise keines der genannten Adhäsionsmoleküle in den Endothelzellen induzierte. Da sich die Positiv-Kontrolle hingegen hochsignifikant von den übrigen Proben abhebt, ist ein Versuchsfehler der Zellaufbereitung nicht anzunehmen. Durch das Fehlen einer direkten 2-AG-bedingten Induktion von Adhäsionsmolekülen bleibt ein weiterer Einfluss des Endocannabinoids auf bekannte inflammatorische Kaskaden der Endothelzellen aus. Eine zusätzliche Translation auf weitere Krankheitsprozesse, die im Zusammenhang mit den untersuchten Adhäsionsmolekülen stehen, lässt sich nicht herleiten. Weshalb die Monozytenadhäsion trotzdem in HCAEC gesteigert ist, bleibt unklar.

Eine Erklärung könnte durch die erniedrigte eNOS-Expression durch 2-AG in HCAEC gegeben werden (vgl. Veröffentlichung, S. 39). Die Aufgabe dieses Enzyms liegt in der Bereitstellung von Stickstoffmonoxid (NO), welches durch parakrine Effekte benachbarte Zellen beeinflusst (Förstermann und Münzel, 2006; Freed und Gutterman, 2017). Dazu zählen neben der physiologischen Vasomotorik auch ein Abweisen von Leukozyten (Anderson, 1999; Cebová et al., 2016; Kubes et al., 1991). Kubes et al. (1991) beobachteten eine durch NO ausgelöste Suppression der Leukozyten-eigenen Adhäsionsmoleküle CD11/ CD18. Bei der erniedrigten eNOS in HCAEC ist mit verminderten Spiegeln an NO zu rechnen, wodurch sich die Adhäsionsmoleküle CD11/ CD18 auf den Monozy-

ten im Umkehrschluss erhöhen könnten. Dies könnte die gesteigerte Monozytenadhäsion an HCAEC erklären, die ihrerseits zuvor mit 2-AG stimuliert wurden.

1.4.2 Ausblick der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird die Interaktion zwischen Leukozyten und koronararteriellen Endothelzellen erarbeitet. Auch wenn der molekulare Mechanismus nicht genau definiert werden kann, wird eine gesteigerte THP-1-Monozytenadhäsion durch 2-AG auf HCAEC nachgewiesen. Vor dem Hintergrund 2-AG-induzierter gesteigerter Monozytenzahlen im Blut, erlangen diese Ergebnisse eine zusätzliche Wertigkeit (Schloss et al., 2019). Zusätzlich wurden verminderte endotheliale Reparatur und Viabilität im Zusammenhang mit erhöhten 2-AG-Spiegeln in der Veröffentlichung berichtet (vgl. S. 36 ff.). Auch diese Ergebnisse bestärken den Verdacht atherogener Effekte des 2-AG. Hierzu passen die berichteten Beobachtungen der 2-AG-induzierten Atherogenese *in vivo* (Jehle et al., 2016; Jehle et al., 2018; Montecucco et al., 2009; Vujic et al., 2016). Der atherogene Einfluss von 2-AG sollte in zukünftigen Forschungsprojekten in humanen Modellen weiter evaluiert werden.

Erhöhte 2-AG-Plasmaspiegel konnten erschwerend bei KHK-Patienten, insbesondere bei NSTEMI-Patienten, eruiert werden (Jehle et al., 2019; Sugamura et al., 2009). Ein therapeutischer Eingriff in das Endocannabinoidsystem könnte sich positiv auf das Outcome der Patienten auswirken (Després et al., 2009; Guillaumat-Prats et al., 2019; Jones, 2008; Le Foll et al., 2009). Tatsächlich gab es bereits medikamentöse Therapien, welche über eine Blockade der CB1-Rezeptoren das atherogene Risikoprofil und das absolute Plaquevolumen verbesserten (Després et al., 2009; Nissen et al., 2008). Da die Medikamente allerdings systemisch verabreicht wurden, scheiterten diese vor allem durch den Eingriff in das Endocannabinoidsystem des zentralen Nervensystems (Jones, 2008; Le Foll et al., 2009).

Je nach Lokalisation und Zielorgan übt das Endocannabinoidsystem fundamental unterschiedliche Funktionen aus (Le Foll et al., 2009). Ein weiterer molekularer Einblick wird mit der vorliegenden Arbeit gegeben: Während 2-AG Adhäsionsmoleküle, wie E-Selektin, auf humanen venösen Endothelzellen der Nabelschnur induziert, blieben humane koronararterielle Endothelzellen unter diesen Bedingungen unbeeinflusst (Gasperi

et al., 2014). Hier liegt offensichtlich ein Unterschied der beiden Gefäßbetten vor. Durch die lokale Produktion und dessen schnelle Degradierung entfaltet 2-AG auch im Organismus lokal divergierende Wirkungen (Howlett et al., 2011; Járαι et al., 2000). Eine lokalisierte Medikamentenapplikation mittels Drug-eluting Stent bietet sich folglich an. Hier könnten Inhibitoren des Endocannabinoidsystems nach Stenteinlage die endotheliale Reparatur unterstützen, die ihrerseits für das Langzeit-Outcome der Patienten nach Stenteinlage ausschlaggebend ist (vgl. Veröffentlichung, S. 39; Joner et al., 2006; Nakazawa et al., 2008).

In der Gesamtzusammenschau hat die durchgeführte Arbeit das mechanistische Verständnis des Endocannabinoids 2-AG in der Atherogenese entscheidend vorangebracht. Die Auswirkungen auf die Entwicklung einer medikamentösen Therapie insbesondere dem Einsatz mittels Drug-eluting Stent wurden diskutiert und sollten in weiteren Forschungsprojekten weiter exploriert werden.

1.4.3 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Bei humanen Zellkulturversuchen sollte beachtet werden, dass die Zellen von einzelnen Spendern gewonnen wurden. Eine Generalisierung auf die Allgemeinbevölkerung sollte kritisch hinterfragt werden. Es soll betont werden, dass die Effekte von 2-AG auf die Atherogenese zurzeit noch kontrovers diskutiert werden (Guillamat-Prats et al., 2019; Ho und Kelly, 2017). Bei den Versuchen, in denen 2-AG als Stimulanz genutzt wurde, ist der Abbau zu Arachidonsäure beziehungsweise deren Derivaten zu bedenken (Fowler et al., 2017). Pro- und antiinflammatorische Effekte nach Stimulation mit 2-AG können stets auch durch Abbauprodukte des 2-AG und durch Derivate der Arachidonsäure hervorgerufen sein.

1.5 Zusammenfassung

Die vorliegende Publikationsdissertation befasst sich mit den Effekten des Endocannabinoids 2-Arachidonylglycerol (2-AG) auf Endothelzellen im Hinblick auf die Atherogenese. Hier wird die Fragestellung beantwortet, ob die Monozytenadhäsion sowie die Adhäsionsmoleküle E-Selektin, Intercellular cell-adhesion molecule 1 und Vascular cell-adhesion molecule 1 durch 2-AG beeinflusst werden. Dazu wurden humane koronarar-

terielle Endothelzellen fluoreszenzmikroskopisch auf die Leukozyten-Endothelzellinteraktion sowie per Durchflusszytometrie untersucht. Zunächst wurde das Versuchsmodell etabliert und mit seinen Zwischenergebnissen erläutert. Die Arbeit kommt zu dem Ergebnis, dass die Monozytenadhäsion gesteigert, die untersuchten Adhäsionsmoleküle jedoch unbeeinflusst bleiben. Schließlich werden die Ergebnisse im Zusammenhang der Veröffentlichung sowie im Hinblick auf Atherogenese und Stentimplantation beleuchtet. 2-AG wird hier als Treiber der Atherosklerose und als mögliches Therapieziel diskutiert.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *Journal of the American College of Cardiology* 1999; 34: 631–638

Arfors KE, Lundberg C, Lindbom L, Lundberg K, Beatty PG, Harlan JM. A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* 1987; 69: 338–340

Baron RM, Lopez-Guzman S, Riascos DF, Macias AA, Layne MD, Cheng G, Harris C, Chung SW, Reeves R, Andrian UH von, Perrella MA. Distamycin A inhibits HMGA1-binding to the P-selectin promoter and attenuates lung and liver inflammation during murine endotoxemia. *PloS one* 2010; 5: e10656

Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chemistry & biology* 2007; 14: 1347–1356

Cebová M, Košútová M, Pecháňová O. Cardiovascular effects of gasotransmitter donors. *Physiological research* 2016; 65: S291-S307

Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation* 2001; 107: 1255–1262

Després J-P, Ross R, Boka G, Alméras N, Lemieux I. Effect of rimonabant on the high-triglyceride/ low-HDL-cholesterol dyslipidemia, intraabdominal adiposity, and liver fat: the

ADAGIO-Lipids trial. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009; 29: 416–423

Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology* 1988; 34: 605–613

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, N.Y.)* 1992; 258: 1946–1949

Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 10819–10824

Dowlatshahi EA, van der Voort EAM, Arends LR, Nijsten T. Markers of systemic inflammation in psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *The British journal of dermatology* 2013; 169: 266–282

Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *The Journal of cell biology* 1988; 107: 321–331

Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006; 113: 1708–1714

Fowler CJ, Doherty P, Alexander SPH. Endocannabinoid Turnover. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* 2017; 80: 31–66

Freed JK, Gutterman DD. Communication Is Key: Mechanisms of Intercellular Signaling in Vasodilation. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2017; 69: 264–272

Gasperi V, Evangelista D, Chiurchiù V, Florenzano F, Savini I, Oddi S, Avigliano L, Catani MV, Maccarrone M. 2-Arachidonoylglycerol modulates human endothelial cell/leukocyte interactions by controlling selectin expression through CB1 and CB2 receptors. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2014; 51: 79–88

Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation research* 2016; 118: 620–636

Gräbner R, Till U, Heller R. Flow cytometric determination of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular cell adhesion molecule-1 in formaldehyde-fixed endothelial cell monolayers. *Cytometry* 2000; 40: 238–244

Guillamat-Prats R, Rami M, Herzig S, Steffens S. Endocannabinoid Signalling in Atherosclerosis and Related Metabolic Complications. *Thrombosis and haemostasis* 2019; 119: 567–575

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine* 2005; 352: 1685–1695

Hasegawa Y, Yokono K, Taki T, Amano K, Tominaga Y, Yoneda R, Yagi N, Maeda S, Yagita H, Okumura K. Prevention of autoimmune insulin-dependent diabetes in non-obese diabetic mice by anti-LFA-1 and anti-ICAM-1 mAb. *International immunology* 1994; 6: 831–838

Henry RJ, Kerr DM, Finn DP, Roche M. For whom the endocannabinoid tolls: Modulation of innate immune function and implications for psychiatric disorders. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 2016; 64: 167–180

Ho WSV, Kelly MEM. Cannabinoids in the Cardiovascular System. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* 2017; 80: 329–366

Howlett AC, Reggio PH, Childers SR, Hampson RE, Ulloa NM, Deutsch DG. Endocannabinoid tone versus constitutive activity of cannabinoid receptors. *British journal of pharmacology* 2011; 163: 1329–1343

Járai Z, Wagner JA, Goparaju SK, Wang L, Razdan RK, Sugiura T, Zimmer AM, Bonner TI, Zimmer A, Kunos G. Cardiovascular effects of 2-arachidonoyl glycerol in anesthetized mice. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 2000; 35: 679–684

Jehle J, Goerich H, Bindila L, Lutz B, Nickenig G, Tiyerili V. Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is elevated in the coronary circulation during acute coronary syndrome. *PloS one* 2019; 14: e0227142

Jehle J, Hoyer FF, Schöne B, Pfeifer P, Schild K, Jenniches I, Bindila L, Lutz B, Lütjohann D, Zimmer A, Nickenig G. Myeloid-Specific Deletion of Diacylglycerol Lipase α Inhibits Atherogenesis in ApoE-Deficient Mice. *PLoS one* 2016; 11: e0146267

Jehle J, Schöne B, Bagheri S, Avraamidou E, Danisch M, Frank I, Pfeifer P, Bindila L, Lutz B, Lütjohann D, Zimmer A, Nickenig G. Elevated levels of 2-arachidonoylglycerol promote atherogenesis in ApoE^{-/-} mice. *PLoS one* 2018; 13: e0197751

Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, Kutys R, Skorija K, Gold HK, Virmani R. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 48: 193–202

Jones D. End of the line for cannabinoid receptor 1 as an anti-obesity target? *Nature reviews. Drug discovery* 2008; 7: 961–962

Kinlay S, Ganz P. Role of Endothelial Dysfunction in Coronary Artery Disease and Implications for Therapy. *The American Journal of Cardiology* 1997; 80: 111-161

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88: 4651–4655

Le Foll B, Gorelick DA, Goldberg SR. The future of endocannabinoid-oriented clinical research after CB1 antagonists. *Psychopharmacology* 2009; 205: 171–174

Ley K, Gaehtgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD. Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* 1991; 77: 2553–2555

Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* 1993; 13: 197–204

Libby P, Bornfeldt KE, Tall AR. Atherosclerosis: Successes, Surprises, and Future Challenges. *Circulation research* 2016; 118: 531–534

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135–1143

Liu J, Li T, Wang H. 2-arachidonoylglycerol might be a novel therapeutic target in the treatment of cardiovascular disease. *International journal of cardiology* 2021; 332: 162

Marazzi J, Kleyer J, Paredes JMV, Gertsch J. Endocannabinoid content in fetal bovine sera - unexpected effects on mononuclear cells and osteoclastogenesis. *Journal of immunological methods* 2011; 373: 219–228

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology* 1995; 50: 83–90

Miller MR, Mannowetz N, Iavarone AT, Safavi R, Gracheva EO, Smith JF, Hill RZ, Baustista DM, Kirichok Y, Lishko PV. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science (New York, N.Y.)* 2016; 352: 555–559

Montecucco F, Matias I, Lenglet S, Petrosino S, Burger F, Pelli G, Brauersreuther V, Mach F, Steffens S, Di Marzo V. Regulation and possible role of endocannabinoids and related mediators in hypercholesterolemic mice with atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009; 205: 433–441

Mulligan MS, Varani J, Dame MK, Lane CL, Smith CW, Anderson DC, Ward PA. Role of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) in neutrophil-mediated lung injury in rats. *The Journal of clinical investigation* 1991; 88: 1396–1406

Nakazawa G, Finn AV, Joner M, Ladich E, Kutys R, Mont EK, Gold HK, Burke AP, Kolodgie FD, Virmani R. Delayed arterial healing and increased late stent thrombosis at culprit sites after drug-eluting stent placement for acute myocardial infarction patients: an autopsy study. *Circulation* 2008; 118: 1138–1145

Navia-Paldanius D, Savinainen JR, Laitinen JT. Biochemical and pharmacological characterization of human α/β -hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12). *Journal of lipid research* 2012; 53: 2413–2424

Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K, Rodés-Cabau J, Cannon CP, Deanfield JE, Després J-P, Kastelein JJP, Steinhilb SR, Kapadia S, Yasin M, Ruzyllo W, Gaudin C, Job B, Hu B, Bhatt DL, Lincoff AM, Tuzcu EM. Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 299: 1547–1560

Nowbar AN, Howard JP, Finegold JA, Asaria P, Francis DP. 2014 global geographic analysis of mortality from ischaemic heart disease by country, age and income: statistics from World Health Organisation and United Nations. *International journal of cardiology* 2014; 174: 293–298

Plass D, Vos T, Hornberg C, Scheidt-Nave C, Zeeb H, Krämer A. Trends in disease burden in Germany: results, implications and limitations of the Global Burden of Disease study. *Deutsches Arzteblatt international* 2014; 111: 629–638

Qiu S, Cai X, Liu J, Yang B, Zügel M, Steinacker JM, Sun Z, Schumann U. Association between circulating cell adhesion molecules and risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. *Atherosclerosis* 2019; 287: 147–154

Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Haskó G, Liaudet L, Huffman JW, Csiszar A, Ungvari Z, Mackie K, Chatterjee S, Pacher P. CB2-receptor stimulation attenuates TNF-alpha-induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2007; 293: H2210-8

Rice GE, Munro JM, Bevilacqua MP. Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18-independent adhesion mechanism. *The Journal of experimental medicine* 1990; 171: 1369–1374

Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *The New England journal of medicine* 2017; 377: 1119–1131

Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *The Lancet* 1998; 351: 88–92

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801–809

Saß A-C, Lampert T, Prütz F, Seeling S, Starker A, Kroll LE, Rommel A, Ryl L, Ziese T. Wie steht es um unsere Gesundheit? In: Robert Koch-Institut, Hrsg. Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin: H. Heenemann GmbH & Co.KG; 2015: 45

Schloss MJ, Horckmans M, Guillaumat-Prats R, Hering D, Lauer E, Lenglet S, Weber C, Thomas A, Steffens S. 2-Arachidonoylglycerol mobilizes myeloid cells and worsens heart function after acute myocardial infarction. *Cardiovascular research* 2019; 115: 602–613

Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunology Today* 1992; 13: 106–112

Sugamura K, Sugiyama S, Nozaki T, Matsuzawa Y, Izumiya Y, Miyata K, Nakayama M, Kaikita K, Obata T, Takeya M, Ogawa H. Activated endocannabinoid system in coronary artery disease and antiinflammatory effects of cannabinoid 1 receptor blockade on macrophages. *Circulation* 2009; 119: 28–36

van Tienhoven M, Atkins J, Li Y, Glynn P. Human neuropathy target esterase catalyzes hydrolysis of membrane lipids. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277: 20942–20948

Vujic N, Schlager S, Eichmann TO, Madreiter-Sokolowski CT, Goeritzer M, Rainer S, Schauer S, Rosenberger A, Woelfler A, Doddapattar P, Zimmermann R, Hoefler G, Lass A, Graier WF, Radovic B, Kratky D. Monoglyceride lipase deficiency modulates endocannabinoid signaling and improves plaque stability in ApoE-knockout mice. *Atherosclerosis* 2016; 244: 9–21

Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, Casey DC, Charlson FJ, Chen AZ, Coates MM, Coggeshall M, Dandona L, Dicker DJ, Erskine HE, Ferrari AJ,

Fitzmaurice C, Foreman K, Forouzanfar MH, Fraser MS, Fullman N, Gething PW, Goldberg EM, Graetz N, Haagsma JA, Hay SI, Huynh C, Johnson CO, Kassebaum NJ, Kinfu Y, Kulikoff XR, Kutz M, Kyu HH, Larson HJ, Leung J, Liang X, Lim SS, Lind M, Lozano R, Marquez N, Mensah GA, Mikesell J, Mokdad AH, Mooney MD, Nguyen G, Nsoesie E, Pigott DM, Pinho C, Roth GA, Salomon JA, Sandar L, Silpakit N, Sligar A, Sorensen RJD, Stanaway J, Steiner C, Teeple S, Thomas BA, Troeger C, VanderZanden A, Vollset SE, Wanga V, Whiteford HA, Wolock T, Zoeckler L, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abera SF, Abreu DMX, Abu-Raddad LJ, Abyu GY, Achoki T, Adelekan AL, Ademi Z, Adou AK, Adsuar JC, Afanvi KA, Afshin A, Agardh EE, Agarwal A, Agrawal A, Kiadaliri AA, Ajala ON, Akanda AS, Akinyemi RO, Akinyemiju TF, Akseer N, Lami FHA, Alabed S, Al-Aly Z, Alam K, Alam NKM, Alasfoor D, Aldhahri SF, Aldridge RW, Alegretti MA, Aleman AV, Alemu ZA, Alexander LT, Alhabib S, Ali R, Alkerwi A, Alla F, Allebeck P, Al-Raddadi R, Alsharif U, Altirkawi KA, Martin EA, Alvis-Guzman N, Amare AT, Amegah AK, Ameh EA, Amini H, Ammar W, Amrock SM, Andersen HH, Anderson BO, Anderson GM, Antonio CAT, Aregay AF, Ärnlöv J, Arsenijevic VSA, Artaman A, Asayesh H, Asghar RJ, Atique S, Avokpaho EFGA, Awasthi A, Azzopardi P, Bacha U, Badawi A, Bahit MC, Balakrishnan K, Banerjee A, Barac A, Barker-Collo SL, Bärnighausen T, Barregard L, Barrero LH, Basu A, Basu S, Bayou YT, Bazargan-Hejazi S, Beardsley J, Bedi N, Beghi E, Belay HA, Bell B, Bell ML, Bello AK, Bennett DA, Bensenor IM, Berhane A, Bernabé E, Betsu BD, Beyene AS, Bhala N, Bhalla A, Bidargilign S, Bikbov B, Abdulhak AAB, Biroscak BJ, Biryukov S, Bjertness E, Blore JD, Blosser CD, Bohensky MA, Borschmann R, Bose D, Bourne RRA, Brainin M, Brayne CEG, Brazinova A, Breitborde NJK, Brenner H, Brewer JD, Brown A, Brown J, Brugha TS, Buckle GC, Butt ZA, Calabria B, Campos-Nonato IR, Campuzano JC, Carapetis JR, Cárdenas R, Carpenter DO, Carrero JJ, Castañeda-Orjuela CA, Rivas JC, Catalá-López F, Cavalleri F, Cercy K, Cerda J, Chen W, Chew A, Chiang PP-C, Chibalabala M, Chibueze CE, Chimed-Ochir O, Chisumpa VH, Choi J-YJ, Chowdhury R, Christensen H, Christopher DJ, Ciobanu LG, Cirillo M, Cohen AJ, Colistro V, Colomar M, Colquhoun SM, Cooper C, Cooper LT, Cortinovis M, Cowie BC, Crump JA, Damsere-Derry J, Danawi H, Dandona R, Daoud F, Darby SC, Dargan PI, das Neves J, Davey G, Davis AC, Davitoiu DV, Castro EF de, Jager P de, Leo D de, Degenhardt L, Dellavalle RP, Deribe K, Deribew A, Dharmaratne SD, Dhillon PK, Diaz-Torné C, Ding EL, dos Santos KPB,

Dossou E, Driscoll TR, Duan L, Dubey M, Duncan BB, Ellenbogen RG, Ellingsen CL, Elyazar I, Endries AY, Ermakov SP, Eshрати B, Esteghamati A, Estep K, Faghmous IDA, Fahimi S, Faraon EJA, Farid TA, Farinha CSeS, Faro A, Farvid MS, Farzadfar F, Feigin VL, Fereshtehnejad S-M, Fernandes JG, Fernandes JC, Fischer F, Fitchett JRA, Flaxman A, Foigt N, Fowkes FGR, Franca EB, Franklin RC, Friedman J, Frostad J, Fürst T, Futran ND, Gall SL, Gambashidze K, Gamkrelidze A, Ganguly P, Gankpé FG, Gebre T, Gebrehiwot TT, Gebremedhin AT, Gebru AA, Geleijnse JM, Gessner BD, Ghoshal AG, Gibney KB, Gillum RF, Gilmour S, Giref AZ, Giroud M, Gishu MD, Giussani G, Glaser E, Godwin WW, Gomez-Dantes H, Gona P, Goodridge A, Gopalani SV, Gosselin RA, Gotay CC, Goto A, Gouda HN, Greaves F, Gugnani HC, Gupta R, Gupta R, Gupta V, Gutiérrez RA, Hafezi-Nejad N, Haile D, Hailu AD, Hailu GB, Halasa YA, Hamadeh RR, Hamidi S, Hancock J, Handal AJ, Hankey GJ, Hao Y, Harb HL, Harikrishnan S, Haro JM, Havmoeller R, Heckbert SR, Heredia-Pi IB, Heydarpour P, Hilderink HBM, Hoek HW, Hogg RS, Horino M, Horita N, Hosgood HD, Hotez PJ, Hoy DG, Hsairi M, Htet AS, Htike MMT, Hu G, Huang C, Huang H, Huiart L, Hussein A, Huybrechts I, Huynh G, Iburg KM, Innos K, Inoue M, Iyer VJ, Jacobs TA, Jacobsen KH, Jahanmehr N, Jakovljevic MB, James P, Javanbakht M, Jayaraman SP, Jayatilleke AU, Jeemon P, Jensen PN, Jha V, Jiang G, Jiang Y, Jibat T, Jimenez-Corona A, Jonas JB, Joshi TK, Kabir Z, Kamal R, Kan H, Kant S, Karch A, Karema CK, Karimkhani C, Karletsos D, Karthikeyan G, Kasaeian A, Katibeh M, Kaul A, Kawakami N, Kayibanda JF, Keiyoro PN, Kemmer L, Kemp AH, Kengne AP, Keren A, Kereselidze M, Kesavachandran CN, Khader YS, Khalil IA, Khan AR, Khan EA, Khang Y-H, Khera S, Khoja TAM, Kieling C, Kim D, Kim YJ, Kissela BM, Kisseon N, Knibbs LD, Knudsen AK, Kokubo Y, Kolte D, Kopec JA, Kosen S, Koul PA, Koyanagi A, Krog NH, Defo BK, Bicer BK, Kudom AA, Kuipers EJ, Kulkarni VS, Kumar GA, Kwan GF, Lal A, Lal DK, Laloo R, Lallukka T, Lam H, Lam JO, Langan SM, van Lansingh C, Larsson A, Laryea DO, Latif AA, Lawrynowicz AEB, Leigh J, Levi M, Li Y, Lindsay MP, Lipshultz SE, Liu PY, Liu S, Liu Y, Lo L-T, Logroscino G, Lotufo PA, Lucas RM, Lunevicius R, Lyons RA, Ma S, Machado VMP, Mackay MT, MacLachlan JH, Razek HMAE, Magdy M, Razek AE, Majdan M, Majeed A, Malekzadeh R, Manamo WAA, Mandisarisa J, Mangalam S, Mapoma CC, Marcenes W, Margolis DJ, Martin GR, Martinez-Raga J, Marzan MB, Masiye F, Mason-Jones AJ, Massano J, Matzopoulos R, Mayosi BM, McGarvey ST, McGrath JJ, McKee M, McMaha-

on BJ, Meaney PA, Mehari A, Mehndiratta MM, Mejia-Rodriguez F, Mekonnen AB, Melaku YA, Memiah P, Memish ZA, Mendoza W, Meretoja A, Meretoja TJ, Mhimbira FA, Micha R, Milllear A, Miller TR, Mirarefin M, Misganaw A, Mock CN, Mohammad KA, Mohammadi A, Mohammed S, Mohan V, Mola GLD, Monasta L, Hernandez JCM, Montero P, Montico M, Montine TJ, Moradi-Lakeh M, Morawska L, Morgan K, Mori R, Mozaffarian D, Mueller UO, Murthy GVS, Murthy S, Musa KI, Nachega JB, Nagel G, Naidoo KS, Naik N, Naldi L, Nangia V, Nash D, Nejjari C, Neupane S, Newton CR, Newton JN, Ng M, Ngalesoni FN, Dieu Ngirabega J de, Le Nguyen Q, Nisar MI, Pete PMN, Nomura M, Norheim OF, Norman PE, Norrving B, Nyakarahuka L, Ogbo FA, Ohkubo T, Ojelabi FA, Olivares PR, Olusanya BO, Olusanya JO, Opio JN, Oren E, Ortiz A, Osman M, Ota E, Ozdemir R, PA M, Pain A, Pandian JD, Pant PR, Papachristou C, Park E-K, Park J-H, Parry CD, Parsaeian M, Caicedo AJP, Patten SB, Patton GC, Paul VK, Pearce N, Pedro JM, Stokic LP, Pereira DM, Perico N, Pesudovs K, Petzold M, Phillips MR, Piel FB, Pillay JD, Plass D, Platts-Mills JA, Polinder S, Pope CA, Popova S, Poulton RG, Pourmalek F, Prabhakaran D, Qorbani M, Quame-Amaglo J, Quistberg DA, Rafay A, Rahimi K, Rahimi-Movaghar V, Rahman M, Rahman MHU, Rahman SU, Rai RK, Rajavi Z, Rajsic S, Raju M, Rakovac I, Rana SM, Ranabhat CL, Rangaswamy T, Rao P, Rao SR, Refaat AH, Rehm J, Reitsma MB, Remuzzi G, Resnikoff S, Ribeiro AL, Ricci S, Blancas MJR, Roberts B, Roca A, Rojas-Rueda D, Ronfani L, Roshandel G, Rothenbacher D, Roy A, Roy NK, Ruhago GM, Sagar R, Saha S, Sahathevan R, Saleh MM, Sanabria JR, Sanchez-Niño MD, Sanchez-Riera L, Santos IS, Sarmiento-Suarez R, Sartorius B, Satpathy M, Savic M, Sawhney M, Schaub MP, Schmidt MI, Schneider IJC, Schöttker B, Schutte AE, Schwebel DC, Seedat S, Sepanlou SG, Servan-Mori EE, Shackelford KA, Shaddick G, Shaheen A, Shahraz S, Shaikh MA, Shakh-Nazarova M, Sharma R, She J, Sheikhabaei S, Shen J, Shen Z, Shepard DS, Sheth KN, Shetty BP, Shi P, Shibuya K, Shin M-J, Shiri R, Shiue I, Shrimel MG, Sigfusdottir ID, Silberberg DH, Silva DAS, Silveira DGA, Silverberg JI, Simard EP, Singh A, Singh GM, Singh JA, Singh OP, Singh PK, Singh V, Soneji S, Søreide K, Soriano JB, Sposato LA, Sreeramareddy CT, Stathopoulou V, Stein DJ, Stein MB, Stranges S, Stroumpoulis K, Sunguya BF, Sur P, Swaminathan S, Sykes BL, Szoeki CEI, Tabarés-Seisdedos R, Tabb KM, Takahashi K, Takala JS, Talongwa RT, Tandon N, Tavakkoli M, Taye B, Taylor HR, Ao BJT, Tedla BA, Tefera WM, Have M ten, Terkawi AS, Tesfay FH, Tessema GA, Thomson AJ, Thorne-

Lyman AL, Thrift AG, Thurston GD, Tillmann T, Tirschwell DL, Tonelli M, Topor-Madry R, Topouzis F, Towbin JA, Traebert J, Tran BX, Truelsen T, Trujillo U, Tura AK, Tuzcu EM, Uchendu US, Ukwaja KN, Undurraga EA, Uthman OA, van Dingenen R, van Donkelaar A, Vasankari T, Vasconcelos AMN, Venketasubramanian N, Vidavalur R, Vijayakumar L, Villalpando S, Violante FS, Vlassov VV, Wagner JA, Wagner GR, Wallin MT, Wang L, Watkins DA, Weichenthal S, Weiderpass E, Weintraub RG, Werdecker A, Westerman R, White RA, Wijeratne T, Wilkinson JD, Williams HC, Wiysonge CS, Woldeyohannes SM, Wolfe CDA, Won S, Wong JQ, Woolf AD, Xavier D, Xiao Q, Xu G, Yakob B, Yalew AZ, Yan LL, Yano Y, Yaseri M, Ye P, Yebyo HG, Yip P, Yirsaw BD, Yonemoto N, Yonga G, Younis MZ, Yu S, Zaidi Z, Zaki MES, Zannad F, Zavala DE, Zeeb H, Zeleke BM, Zhang H, Zodpey S, Zonies D, Zuhlke LJ, Vos T, Lopez AD, Murray CJL. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* 2016; 388: 1459–1544

Weller A, Isenmann S, Vestweber D. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of biological chemistry* 1992; 267: 15176–15183

Xie S, Borazjani A, Hatfield MJ, Edwards CC, Potter PM, Ross MK. Inactivation of lipid glyceryl ester metabolism in human THP1 monocytes/macrophages by activated organophosphorus insecticides: role of carboxylesterases 1 and 2. *Chemical research in toxicology* 2010; 23: 1890–1904

Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray JS, Siahaan TJ. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Medicinal research reviews* 2002; 22: 146–167

2. Veröffentlichung

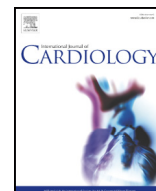
International Journal of Cardiology 323 (2021) 243–250



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Cardiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijcard



The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol inhibits endothelial function and repair☆

Julian Jehle^{a,1,*}, Lukas Eich^{a,1}, Melina Danisch^a, Sayeh Bagheri^a, Elina Avraamidou^a, Philipp Pfeifer^a, Vedat Tiyerili^a, Laura Bindila^b, Beat Lutz^b, Georg Nickenig^a

^a Department of Internal Medicine II Cardiology, Pneumology, Angiology, University Hospital Bonn, Venusberg-Campus 1, Bonn 53127, Germany

^b Institute of Physiological Chemistry, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Duesbergweg 6, Mainz 55128, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 March 2020

Received in revised form 18 June 2020

Accepted 7 August 2020

Available online 15 August 2020

Keywords:

Endothelial repair

Atherosclerosis

Leukocyte–endothelial cell adhesion

Endocannabinoid system

2-arachidonoylglycerol

JZL184

ABSTRACT

Background: Endothelial dysfunction promotes atherogenesis, vascular inflammation, and thrombus formation. Reendothelialization after angioplasty is required in order to prevent stent failure. Previous studies have highlighted the role of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in murine experimental atherogenesis and in human coronary artery disease. However, the impact of 2-AG on endothelial repair and leukocyte–endothelial cell adhesion is still unknown.

Methods: Endothelial repair was studied in two treatment groups of wildtype mice following electrical injury of the common carotid artery. One group received the monoacylglycerol lipase (MAGL)-inhibitor JZL184, which impairs 2-AG degradation and thus causes elevated 2-AG levels, the other group received DMSO (vehicle). The effect of 2-AG on human coronary artery endothelial cell (HCAEC) viability, leukocyte–endothelial cell adhesion, surface expression of adhesion molecules, and expression of endothelial NO synthase (NOS3) was studied *in vitro*.

Results: Elevated 2-AG levels significantly impaired reendothelialization in wildtype mice following electrical injury of the common carotid artery. *In vitro*, 2-AG significantly reduced viability of HCAEC. Additionally, 2-AG promoted adhesion of THP-1 monocytes to HCAEC following pre-treatment of the HCAEC with 2-AG. Adhesion molecules (*E*-selectin, ICAM-1 and VCAM-1) remained unchanged in arterial endothelial cells, whereas 2-AG suppressed the expression of NOS3 in HCAEC.

Conclusion and translational aspect: Elevated 2-AG levels hamper endothelial repair and HCAEC proliferation, while simultaneously facilitating leukocyte–endothelial cell adhesion. Given that 2-AG is elevated in patients with coronary artery disease and non-ST-segment elevation myocardial infarction, 2-AG might decrease reendothelialization after angioplasty and thus impact the clinical outcomes.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Endothelial dysfunction promotes atherogenesis, vascular inflammation, and thrombus formation (reviewed by [1]). Cardiovascular risk factors can disturb the integrity of endothelial cells, which facilitates the adhesion of leukocytes and promotes atherosclerosis and atherothrombosis [1–4]. Most therapeutic strategies that are used against

clinically relevant atherosclerosis are based on the reduction of cardiovascular risk factors and on the control of local vascular inflammation [5,6]. However, as atherosclerosis wears on, ischemia often necessitates angioplasty and stent implantation, which in turn, denudes the arteries from their endothelium [7]. As a result, reendothelialization of the denuded vessel and endothelialization of an implanted stent are required in order to restore vascular function and to prevent stent thrombosis [7].

The endocannabinoid system (ECS), which comprises the two cannabinoid receptors (CB1 and CB2) and their endogenous ligands *N*-arachidonylethanolamide (anandamide, AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), is an important regulator of vascular inflammation [8–11]. Previous work by our group and by others has demonstrated the influence of the ECS on vascular inflammation and atherogenesis, both in humans and in mouse models [12–17]. This previous work has emphasized the influence of endocannabinoids on inflammatory cells in the context of atherosclerosis. Meanwhile, the impact of endocannabinoids on

Abbreviations list: 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; eCB, Endocannabinoids; eNOS, Endothelial nitric oxygen synthase (NOS3); ICAM-1, Intercellular adhesion molecule 1; JZL184, Inhibitor of monoacylglycerol lipase; LC-MRM, Liquid chromatography–multiple reaction monitoring; MAGL, Monoacylglycerol lipase; VCAM-1, Vascular cell adhesion molecule 1.

☆ All authors take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

* Corresponding author at: Venusberg-Campus 1, Building 13, Bonn 53127, Germany.

E-mail address: julian.jehle@ukbonn.de (J. Jehle).

¹JJ and LE contributed equally to this work.

endothelial repair and endothelial activation has not been well studied. Only few studies have focused on the effects of the ECS on endothelial cells: The group of Pál Pacher has identified a functional ECS in human coronary artery endothelial cells (HCAEC). They demonstrated that synthetic agonists of the CB2 receptor attenuated the inflammatory response of HCAEC induced by TNF α [18]. Xu and co-workers have demonstrated similar effects in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) for an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and endocannabinoid-like compound *N*-oleoylethanolamine (OEA) [19]. Other groups have found the ECS to be involved in vasomotor control via the TRPV4 cation channel and nitrergic signaling [20]; (reviewed by [21]).

However, the influence of endocannabinoids on reendothelialization and on HCAEC viability has not been investigated so far. Furthermore, the impact of endocannabinoids on leukocyte–endothelial cell adhesion, which facilitates early atherogenesis, is unknown.

2. Materials and methods

A detailed description of the applied materials and methods is available as supplementary material. Reendothelialization and neointima formation was studied in wildtype mice. Blood pressure, heart rate, body weight, and plasma eCB concentrations were assessed as previously described [14,22].

2.1. Electrical denudation of the common carotid artery in wildtype mice

The influence of elevated 2-AG levels on arterial reendothelialization was studied in wildtype mice of the C57BL/6 J genetic background (Charles River), as previously reported [Carmeliet et al., 1997]. Following a small median cervical incision, the left common carotid artery was exposed. Four overlapping bursts of 2 W, with a duration of 5 s each, were then applied to the common carotid artery resulting in complete endothelial denudation with a length of 3 mm. The skin was then closed with a simple interrupted suture and the endothelial gap was allowed to heal for 5 days. During this period of time, murine 2-AG levels were artificially enhanced by giving daily intraperitoneal injections of the selective MAGL inhibitor JZL 184 (5 mg/kg body weight, solubilized in 1% (v/v) DMSO and 5% (v/v) Kolliphor (Sigma Aldrich) in sterile PBS). Mice from the control cohort received injections of vehicle only (1% (v/v) DMSO and 5% (v/v) Kolliphor in sterile PBS). On day five, the residual endothelial gap was stained by a single i.v. injection of 50 μ l Evan's blue (Sigma-Aldrich) for one minute.

2.2. Induction of neointimal hyperplasia by ligation of the common carotid artery

Formation of neointimal hyperplasia was studied in wildtype mice following the ligation of the common carotid artery as previously reported [24]. To this end, the left common carotid artery was exposed as described above. The artery was then ligated with a single knot placed immediately proximal to the carotid bifurcation, which resulted in a complete disruption of arterial blood flow distal to the ligation. The wound was closed with a simple interrupted suture and neointima formation occurred during the 28 days that followed the surgical ligation. During these 28 days, mice were treated with i.p. injections of either JZL184 or vehicle. After the treatment period, mice were sacrificed by cutting through the abdominal aorta. The left common carotid artery was carefully exposed and excised. The artery was embedded in a tissue-freezing medium. The tissue was sectioned beginning at its distal, ligated end, at a thickness of 10 μ m per section, using a Leica CM 1900 cryostat (Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Germany).

2.3. Histological quantification of neointimal volume and composition

The vascular ultrastructures and the neointimal hyperplasia were visualized upon hematoxylin and eosin staining. In brief, the sections were exposed to a descending series of alcohol concentrations. Hereafter, the slides were stained with hematoxylin 2% (w/v) for 30 s and with eosin 0.2% (w/v) for 30 s. Finally, sections were exposed to an ascending series of alcohol concentrations: 80% (v/v), 90% (v/v), and 100% (v/v) ethanol, and the slides were sealed with Entellan mounting medium (Merck, Darmstadt, Germany). Neointima was defined as the tissue between the luminal endothelial cell layer and the internal elastic lamina (IEL).

Smooth muscle cells were stained using a monoclonal anti-actin antibody (α -SMA; Anti-Actin, α -Smooth Muscle – Cy3 antibody, Sigma-Aldrich) and macrophages were detected by immunofluorescent staining of CD68 (primary antibody: α -CD68 rat IgG2a, Acris antibodies GmbH, Herford, Germany) as described [15].

Microscopic pictures were obtained using a Zeiss Axiovert 200 M microscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany) and Axiovision 4.8 software (Carl Zeiss Jena GmbH). Neointima formation was quantified by length and by cross-sectional area. The length of the neointimal lesion was considered to be the distance between the ligation site and the most proximal section that was free of neointimal changes. The cross-sectional area of the neointimal cone was quantified at a distance of 500 μ m proximal to the ligation and was calculated as $\frac{IEL-lumen}{IEL} \times 100\%$.

2.4. Cell culture experiments using human coronary artery endothelial cells

2.4.1. Cell culture

Primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) were purchased from PromoCell (Heidelberg, Germany) and cultivated at 37 °C and 5% (v/v) CO₂. The cells were split at 100% confluence by 1:3. All experiments were conducted at 80% confluence and at passages six to eight, unless otherwise indicated.

2.4.2. XTT viability assay

HCAEC were seeded into a 6-well plate at a density of 40,000 cells per well. Immediately after the split, cells were exposed to either JZL184 [10 μ M], DMSO [0.1% (v/v)], which served as the vehicle control, or starvation medium with an FBS content that is reduced to 2% (v/v). After 24 h, HCAEC viability was assessed using the 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide salt (XTT) assay (Invitrogen, Eugene, USA). 10 μ l of Phenazine methosulfate (PMS) solution were added to every 4 ml of XTT solution and HCAEC were incubated with the PMS/XTT solution for 2 h before the absorbance at 450 nm was measured using a microplate reader (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Switzerland).

2.4.3. TUNEL assay

Double-strand DNA breaks, indicative of apoptosis, were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick-end labeling (TUNEL). HCAEC were grown on cover slips in 24-well plates. At 80% confluence, the cells were treated with JZL184 [10 μ M] or DMSO [0.1% (v/v)]. After 24 h of incubation, each well was stained with 50 μ l TUNEL reaction mixture for 1 h. The nuclei were stained using Vectashield mounting medium with DAPI.

2.4.4. Scratch assay

HCAEC migration was assessed using an *in vitro* wound-healing assay. At 100% confluence, cells were starved overnight to minimize HCAEC proliferation. Hereafter, a straight, narrow gap was scratched into the cell layer using a pipet tip. Subsequently, the cells were stimulated with 2-AG [10 μ M]; DMSO [0.1% (v/v)] served as a control. Pictures were taken of the cells at 0, 1, 3, 5, 7, and 9 h. The area of the residual gap was quantified.

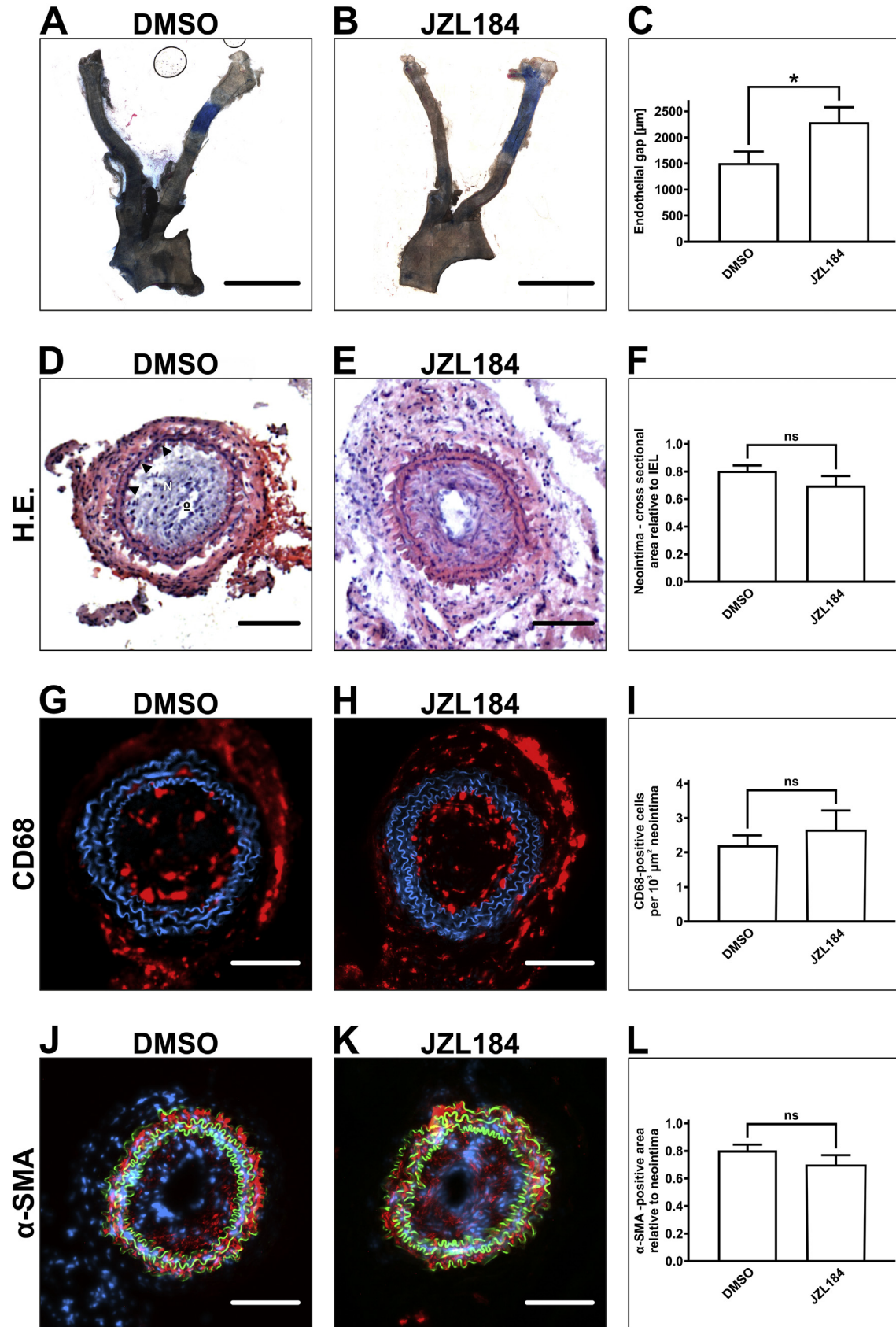


Fig. 1. Quantification of reendothelialization and assessment of neointima formation in wildtype mice. The left common carotid artery was injured electrically in two treatment groups of wildtype mice. On day five, the residual endothelial gap was stained with Evan's blue (A-B). The residual endothelial gap was significantly larger in the JZL184 treatment group compared to the DMSO control group (C). Initial lesion size 3 mm; daily injections of JZL184 [5 mg/kg bw i.p.]. Ligation of the left common carotid artery promoted neointima formation in wildtype mice. Neointima (N) is the thickening of the intimal layer between the internal elastic lamina (black arrow heads) and the lumen (\odot). Neointimal hyperplasia was visualized upon hematoxylin and eosin staining (D-E). The cross-sectional area of the neointima was quantified at a distance of 500 μm proximal to the ligation and showed no differences in the two treatment groups (F). Macrophages were identified using an immunofluorescent staining of CD68 (G-H; macrophages, red; elastic laminae, blue). Neointimal presence of macrophages was similar between the two groups (I). α -SMA staining identified the percentage of smooth muscle cells in the neointima (J-K; smooth muscle cells, red; nuclei, blue; elastic laminae, green), which was no different between the two groups (L). Data are presented as the mean \pm standard error of the mean; $n = 11-19$; *, $p < .05$; ns, $p > .05$, assessed by student's t -test. Scale bar (A-C), 2000 μm ; scale bar (D-L), 100 μm . α -SMA, Anti-Actin α -Smooth Muscle; CD68, Cluster of Differentiation 68; DMSO, dimethyl sulfoxide; H.E., hematoxylin and eosin; JZL184, inhibitor of monoacylglycerol lipase.

2.4.5. THP-1 adhesion assay

Adhesion of THP-1 monocytes to HCAEC was measured. HCAEC were grown to 90% confluence on cover slips in 24-well plates. Then, HCAEC were stimulated with DMSO [0.1% (v/v)] or 2-AG [1–10 μ M] for four hours; lipopolysaccharide (LPS) [100 ng/ml] served as a positive control. Meanwhile, THP-1 monocytes were labeled with the red fluorescent dye PKH26 (Sigma-Aldrich). At the end of the HCAEC stimulation, the stimulation medium was removed from the HCAEC and they were exposed to the medium containing THP-1 cells for 30 min. Hereafter, the non-adherent cells were washed off with PBS and all remaining cells were fixed with 4% (w/v) PFA.

2.4.6. Flow cytometric quantification of cellular adhesion molecules

The cellular adhesion molecules on HCAEC were quantified using flow cytometry. HCAEC were stimulated with DMSO [0.01% (v/v)] or 2-AG [1–10 μ M] for four hours; LPS [100 ng/ml] served as a positive control. After four hours, cells were stained with fluorescent antibodies targeting the adhesion molecules ICAM-1 (PerCP/Cy5.5 anti-human CD54 Antibody Clone HA58, BioLegend, San Diego, USA), VCAM-1 (BB515 Mouse Anti-Human CD106 Clone 51-10C9 (RUO), BD Biosciences), and E-selectin (APC anti-human CD62E Antibody Clone HAE-1f, BioLegend as reported [25]). Each experiment was carried out in triplicate while each sample was measured with at least 40,000 events. Antibody binding was quantified using a BD FACS Canto II Flow Cytometer and the data were analyzed with the FlowJo Data Analysis Software V10 (Tree Star, Ashland, USA). Gates were controlled with fluorescence-minus-one-controls of LPS- [100 ng/ml] treated cells. The instrument was CST (Cytometer Setup and Tracking) -calibrated each day and compensations were used for a maximum of 15 days.

2.4.7. Quantification of endothelial NO synthase (eNOS) mRNA expression by qPCR

HCAEC were stimulated with DMSO [0.01% (v/v)] or 2-AG [1 μ M] for four hours. The eNOS inducer bradykinin [1 mM] served as a positive control. Hereafter, cells were lysed and the RNA was isolated and qPCR was performed as reported earlier [14].

2.5. Statistical analyses

Data are presented as the mean \pm SEM. Data were analyzed using Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) and GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, USA). Normality criteria were checked using the D'Agostino & Pearson normality test and the Shapiro-Wilk normality test. For the comparison of continuous and normally distributed variables between two groups, an unpaired Student's two-sided *t*-test was applied. For the comparison of three or more groups, a one-way ANOVA and subsequent Bonferroni correction was performed. Non-normally distributed variables between two groups were compared using the Mann-Whitney test. *P*-values <.05 were considered statistically significant. The sample size was calculated using G*Power software (Franz Faul, University of Kiel, Germany) with a prespecified alpha error probability of 0.05 and a prespecified power (1 - beta error probability) of 0.80. For the *in vivo* experiments, we

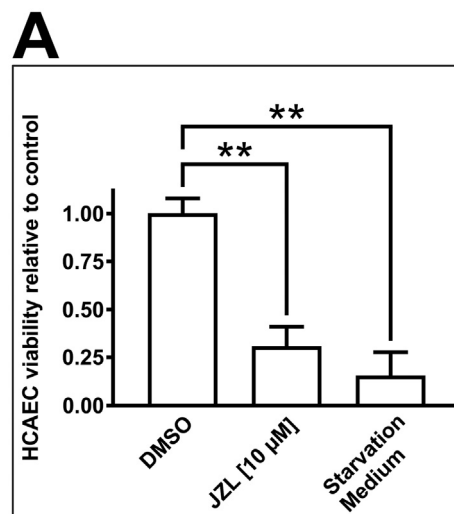


Fig. 2. Quantification of HCAEC viability. The effect of 2-AG on human coronary artery endothelial cell (HCAEC) viability was assessed *in vitro* by using an XTT- (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide salt) based assay. Cells were exposed to DMSO (control), JZL184 [10 μ M], or to starvation medium with an FBS content that is reduced to 2% (v/v) for 24 h. JZL184-treated cells showed a significantly decreased viability relative to the control. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean; *n* = 3; **, *p* < .01, assessed by a one-way ANOVA and subsequent Bonferroni correction. DMSO, dimethyl sulfoxide; JZL, JZL184, inhibitor of monoacylglycerol lipase.

estimated a biological difference between the means of either group of 40% and a standard deviation of 50% in each group. This estimate yielded an effect size *d* of 0.90 and a required sample size of *n* = 16. The primary endpoint, which was used for the sample-size calculation, was the residual gap within the endothelium measured at day 5 after electrical injury. A co-primary endpoint was the length of the neointimal lesion, measured from the ligation to its proximal end, at day 28 after ligation.

3. Results

The impact of elevated 2-AG levels on vascular repair was assessed in two *in vivo* models of reendothelialization and neointimal hyperplasia. *In vitro*, the effects of 2-AG on endothelial cell viability, migration, and on leukocyte-endothelial cell adhesion were measured in HCAEC.

3.1. Treatment with JZL184 increases the 2-AG plasma concentration without affecting AA levels

Treatment of wildtype mice with the MAGL-inhibitor JZL184 [5 mg/kg] led to a significant increase in plasma levels of 2-AG compared to the vehicle-treated control animals. The concentrations of 2-AG in the plasma were 468 \pm 57 pmol/ml (JZL184 treatment) vs. 128 \pm 35 pmol/ml (with DMSO; *n* = 16–17; *p* < .0001). Plasma levels of arachidonic acid were unaffected by JZL184 treatment and were

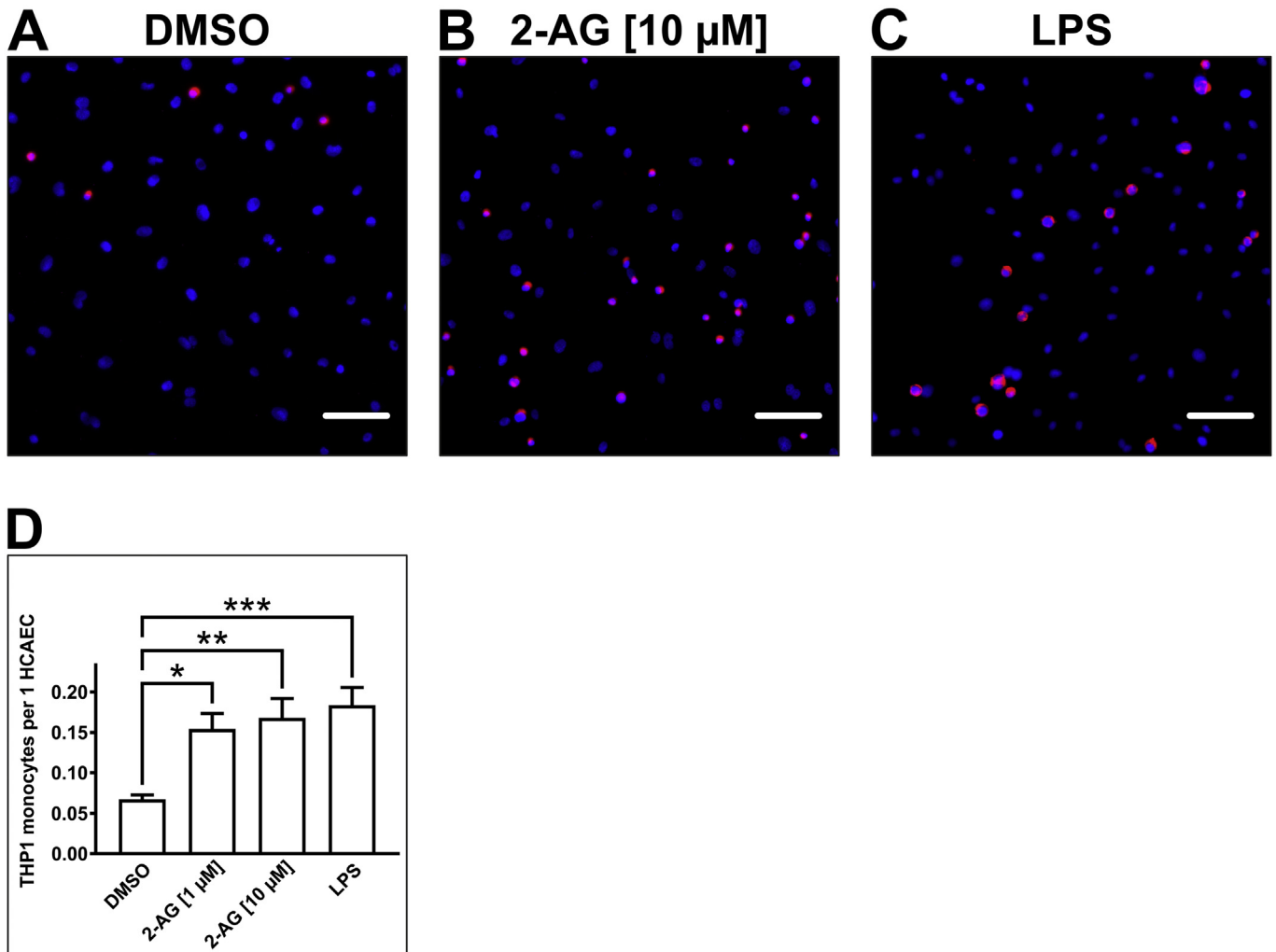


Fig. 3. Leukocyte-endothelial cell adhesion assay. THP-1 monocytes were labeled with the red fluorescent dye PKH26 and allowed to adhere to pretreated human coronary artery endothelial cell (HCAEC) for 30 min. Hereafter, nuclei of HCAEC and THP-1 monocytes were stained blue using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, A-C). Pretreatment with 2-AG [1 μM, 10 μM] for four hours led to a significant increase in leukocyte-endothelial cell adhesion compared to DMSO controls. LPS [100 ng/ml] served as a positive control. Data are presented as the mean ± standard error of the mean; $n = 15$; *, $p < .05$; **, $p < .01$; ***, $p < .001$, assessed by a one-way ANOVA and subsequent Bonferroni correction. Scale bar, 100 μm. 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; DMSO, dimethyl sulfoxide; LPS, lipopolysaccharide.

found to be 16.8 ± 2.7 pmol/ml (JZL184) vs. 17.3 ± 1.7 pmol/ml (DMSO; $n = 16-17$; $p = .8777$). Plasma concentrations of AEA were unaltered upon treatment with JZL184 1.05 ± 0.04 pmol/ml (JZL184) vs. 0.96 ± 0.06 pmol/ml (DMSO; $n = 16-17$; $p = .2264$). Parameters such as blood pressure, heart rate, and body weight were unaffected by JZL184 treatment, as detailed in Supplementary Table S1.

3.2. JZL184 reduces endothelial repair in the murine electrical injury model

Treatment with JZL184 significantly impaired reendothelialization in the electrically injured left common carotid artery. Five days after electrical injury, the residual gap within the endothelium measured 2291 ± 286 μm in the JZL184-treated group compared to 1505 ± 223 μm in the DMSO-treated control group ($n = 18-19$; $p = .0363$; Fig. 1A-C).

3.3. JZL184 does not alter neointima formation in the carotid artery ligation model

The impact of elevated 2-AG levels on the formation of neointimal hyperplasia was assessed after the ligation of the left common carotid

artery for 28 days. Treatment with JZL184 did not change the formation of neointima in these mice. Both the length of the neointimal lesion, measured from the ligation to its proximal end, and the neointimal cross-sectional area at 500 μm proximal to the ligation remained unchanged by JZL184 treatment. The neointimal length was 2010 ± 355 μm (JZL184) versus 2139 ± 291 μm (DMSO, $n = 14-16$; $p = .7876$). The cross-sectional area of the neointima covered $65.2 \pm 8.0\%$ of the area within the IEL (JZL184) versus $80.6 \pm 4.0\%$ in the control group ($n = 14-15$; $p = .1035$; Fig. 1D-F).

3.4. JZL184 does not alter the cellular composition of the neointima

Subsequently, the cellular composition of the neointima was analyzed by performing immunohistochemical stainings. We found no differences in the ultrastructural composition of the hyperplastic tissue between the two groups. Macrophages reached a similar density in both groups of $2.7 \times 10^{-3} \pm 0.6 \times 10^{-3}$ cells per μm² (JZL184) vs. $2.2 \times 10^{-3} \pm 0.3 \times 10^{-3}$ cells per μm² (DMSO; $n = 13-14$; $p = .4666$; Fig. 1G-I). Smooth muscle cells represented $92 \pm 4.2\%$ (JZL184) and $90 \pm 4.0\%$ (DMSO) of the neointimal cross sectional area ($n = 11-15$; $p = .7895$; Fig. 1J-L).

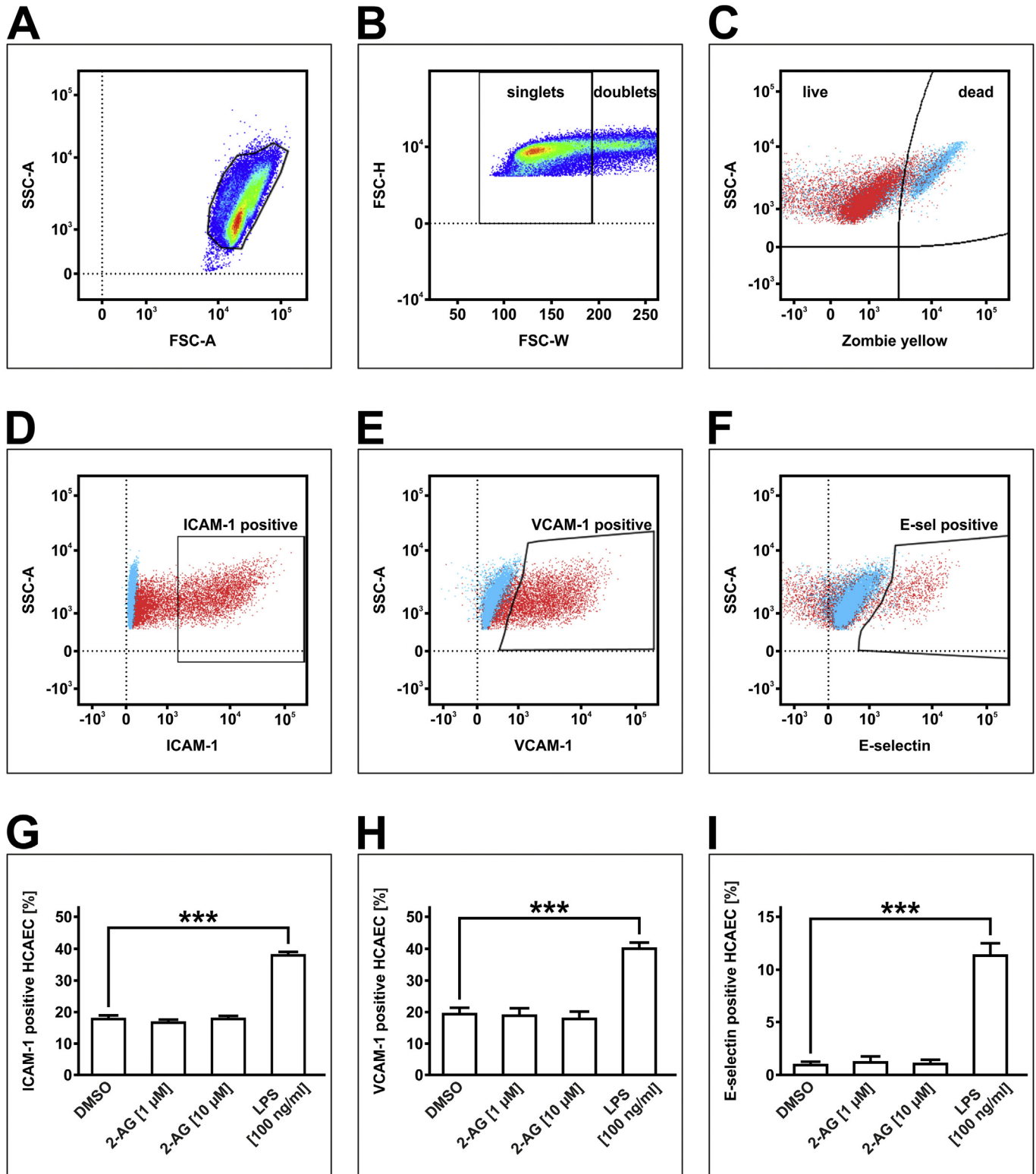


Fig. 4. Gating strategy for FACS analysis and assessment of the surface expression of adhesion molecules in HCAEC. Human coronary artery endothelial cells (HCAEC) were stimulated with DMSO [0.01% (v/v)], 2-AG [1–10 μM], or LPS [100 ng/ml] for four hours. Cells were stained for adhesion molecules (*E*-selectin, ICAM-1 and VCAM-1) and detached. Live single cells were identified by applying the gating strategy depicted in panels (A–C). The surface expression of the aforementioned adhesion molecules was quantified in stimulated cells (red) as depicted in panels (D–F). Gates were controlled with fluorescence-minus-one-controls of LPS- [100 ng/ml] treated cells (blue, D–F). Stimulation with 2-AG did not increase the surface expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and *E*-selectin. Data are presented as the mean ± standard error of the mean; $n = 5$; ***, $p < .001$, assessed by a one-way ANOVA and subsequent Bonferroni correction. 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; DMSO, dimethyl sulfoxide; FSC, forward scatter; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; LPS, lipopolysaccharide; SSC, side scatter; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1.

3.5. JZL184 reduces HCAEC viability without inducing apoptosis

Because we found that elevated 2-AG levels impaired endothelial repair *in vivo*, we assessed whether 2-AG affected endothelial cell viability, apoptosis, and migration *in vitro*. HCAEC were exposed to DMSO [0.1% (v/v)], starvation medium [2% (v/v) FBS], or JZL184 [10 μ M] immediately after they were split, and cell viability was assessed 24 h after this by using the XTT assay. Stimulation with JZL184 led to a significant decrease in cell viability relative to the control (0.60 ± 0.10 vs. 1.00 ± 0.07 ; $n = 3$; $p = .0054$). The starvation medium treatment was used as a positive control and saw reduced viability of HCAEC to an extent similar to that of JZL184 treatment (0.51 ± 0.10 ; $n = 3$; $p = .0020$; Fig. 2).

Notably, JZL184 did not reduce HCAEC viability in confluent cells, which points to the inhibition of proliferation being the underlying cause of the reduced viability in proliferating cells, rather than the induction of apoptosis or cell death. We subsequently conducted a TUNEL assay to assess if JZL184 induces apoptosis in HCAEC, however, the rates of apoptosis were similar between JZL184- and DMSO-treated cells ($3.22 \pm 2.52\%$ (JZL184) vs. $0.70 \pm 0.70\%$ (DMSO); $n = 4$; $p = .7143$, assessed by Mann-Whitney test).

3.6. 2-AG does not alter HCAEC migration

HCAEC migration was measured using a scratch assay. After 9 h, the gap was narrowed by 0.20 ± 0.03 mm² in 2-AG-treated HCAEC vs. 0.25 ± 0.02 mm² in DMSO-treated cells ($n = 6$; $p = .1433$), thus HCAEC migration is not altered by 2-AG (Supplementary Fig. S1).

3.7. Stimulation of HCAEC with 2-AG increases THP1 monocyte adhesion

The influence of 2-AG on the interaction between endothelial cells and monocytes was assessed by using an adhesion assay. HCAEC were stimulated with DMSO [0.1% (v/v)], LPS [100 ng/ml], or 2-AG [1–10 μ M], and the adhesion of fluorescently labeled THP-1 monocytes was quantified. Monocyte adhesion to HCAEC increased by more than two-fold upon 2-AG treatment (DMSO: 0.07 ± 0.01 THP1/HCAEC; LPS: 0.18 ± 0.02 THP1/HCAEC ($n = 15$; $p < .001$) 2-AG [1 μ M]: 0.15 ± 0.02 THP1/HCAEC ($n = 9$; $p = .0138$); 2-AG [10 μ M]: 0.17 ± 0.02 THP1/HCAEC ($n = 9$; $p = .0031$); Fig. 3).

3.8. Adhesion molecules

Surface expression of adhesion molecules on HCAEC was assessed by flow cytometry following stimulation with 2-AG. The applied gating strategy is depicted in Fig. 4A–F. Interestingly, stimulation with 2-AG did not increase the surface expression of any of the adhesion molecules studied, namely ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin. ICAM-1 expression was detected in $17.0 \pm 0.6\%$ (2-AG [1 μ M]), $18.2 \pm 0.6\%$ (2-AG [10 μ M]), and $18.2 \pm 0.8\%$ (DMSO) of the analyzed cells ($n = 5$; $p > .9999$; Fig. 4G). For VCAM-1, surface expression was detected in $19.1 \pm 2.0\%$ (2-AG [1 μ M]), $18.1 \pm 1.9\%$ (2-AG [10 μ M]), and in $19.6 \pm 1.7\%$ (DMSO) of the analyzed cells ($n = 5$; $p > .9999$; Fig. 4H). Surface expression of E-selectin was detected in $1.3 \pm 0.5\%$ (2-AG [1 μ M]), $1.1 \pm 0.3\%$ (2-AG [10 μ M]), and $1.1 \pm 0.2\%$ (DMSO; $n = 5$; $p > .9999$; Fig. 4I) of the analyzed cells. Meanwhile, LPS [100 ng/ml] was used as a positive control and showed a marked increase in surface expression of all three adhesion molecules (ICAM-1: $38.3 \pm 0.7\%$; VCAM-1: $40.4 \pm 1.6\%$; E-selectin: $11.5 \pm 1.0\%$; $n = 5$; $p < .0001$; Fig. 4G–I).

3.9. Stimulation of HCAEC with 2-AG decreases eNOS mRNA expression

The impact of 2-AG on the expression of eNOS was assessed by qPCR. Stimulation with 2-AG led to a significant downregulation of eNOS mRNA in HCAEC (0.79 ± 0.06 -fold versus 1.00 ± 0.04 -fold (control);

$n = 8–9$; $p = .0189$). Bradykinin, which served as a positive control, induced a significant upregulation of eNOS mRNA expression. (1.49 ± 0.03 -fold versus 1.0 ± 0.04 -fold (control); $n = 5$; $p < .0001$).

4. Discussion

The present study aimed to elucidate the influence of the endocannabinoid 2-AG on endothelial cell function in the context of endothelial repair and endothelial cell activation, both *in vivo* and *in vitro*.

Using the electrical injury model for reendothelialization introduced by Carmeliet and colleagues, we were able to demonstrate that elevated levels of the endocannabinoid 2-AG led to an impairment of endothelial repair. In HCAEC, higher levels of 2-AG reduced endothelial cell proliferation, while cell migration and apoptosis remained unchanged. In the applied *in vivo* model, proliferation of endothelial cells is one of the main contributors to endothelial repair [23], thus inhibition of endothelial cell proliferation by 2-AG might explain the inhibition of reendothelialization *in vivo*. This finding may be of clinical relevance, given that impaired reendothelialization facilitates both atherogenesis and stent failure after angioplasty [1,7]. In a recent study, we reported that levels of 2-AG are increased in the coronary circulation of patients during non-ST-segment elevation myocardial infarction (NSTEMI) [26]. Impairment of endothelial repair by 2-AG might thus be of relevance to NSTEMI patients.

Surprisingly, in the present study, elevated 2-AG levels which were associated with less endothelial repair did not influence neointima formation *in vivo*. While the formation of neointimal hyperplasia is (like atherogenesis) partially dependent on endothelial infirmity, additional mechanisms have been reported to regulate neointima formation. These mechanisms include proliferation and hypertrophy of vascular smooth muscle cells, activation of adventitial cells, and secretion of distinct cytokines (reviewed by [27]); [28]. Possibly, these mechanisms are not altered by administration of JZL184 in the present experimental setting.

Endothelial cells are integral regulators of vascular function and health. Their activation facilitates monocyte adhesion, which, in turn, fosters vascular inflammation and atherogenesis. In the present study, pretreatment of HCAEC with 2-AG promoted monocyte adhesion. This finding adds to the mechanistic understanding of earlier reports by our group and by others that correlate elevated 2-AG levels with an increased atherosclerotic plaque burden in the apolipoprotein E-deficient mouse model [14–16]. Concomitantly, our present findings add to the complexity of the role of endocannabinoids during atherogenesis, which remains a controversial matter of debate [17,18]. In an attempt to identify the adhesion molecules that promote monocyte adhesion to endothelial cells, flow cytometric analyses of endothelial cells after stimulation with 2-AG were performed. One previous study, by Gasperi et al., reported differential regulation of the adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) after stimulation with 2-AG [29]. These same adhesion molecules were examined in the arterial HCAEC in the present study but showed no differential regulation upon stimulation with 2-AG. This observation underlines the differences between the arterial and the venous vascular beds. Differences in endocannabinoid signaling in either of these compartments will have to be determined in future studies. Interestingly, secretion of nitric oxide (NO) has been demonstrated to hamper leukocyte–endothelial cell adhesion. Secretion of NO from endothelial cells inhibits the surface expression of two functional leukocyte adhesion molecules (CD11 and CD18) on monocytes [30]. Our data demonstrate that 2-AG inhibits eNOS expression in endothelial cells, which might induce CD11 and CD18 expression on monocytes and thus increase monocyte adhesion to HCAEC.

The current study provides a mechanistic rationale for the investigation of 2-AG's impact on reendothelialization after angioplasty in patients with coronary artery disease and myocardial infarction – elevated 2-AG levels might hamper endothelial repair in these patients and thus might impact the clinical outcomes.

Study limitations.

The present study describes cellular and molecular effects that are crucial to endothelial repair and reendothelialization after angioplasty. Data were generated in murine *in vivo*- and in human *in vitro* models. Effects might differ in CAD- and NSTEMI patients and will have to be evaluated in clinical studies.

5. Conclusions

Taken together, the present study demonstrates that 2-AG impairs endothelial repair and promotes leukocyte–endothelial cell adhesion. Both of these mechanisms may foster early atherosclerotic changes and might, therefore, be of clinical relevance after angioplasty and stent implantation.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.08.042>.

Declarations of Competing Interest

None.

Acknowledgements

We thank Dr. Sandra Adler, Katharina Groll, Anna Flender, and Claudia Schwitter for excellent technical assistance. We thank Dr. Meghan Campbell for the thoughtful revision of this manuscript.

This work was supported by the Bonfor program (scholarship to JJ) and by the German Heart Foundation (scholarships to LE, MD, SB, and EA).

References

- [1] P. Libby, M. Aikawa, M.K. Jain, Vascular endothelium and atherosclerosis, *Handb Exp Pharmacol* 176 Pt 2 (2006) 285–306.
- [2] H.B. Peng, P. Libby, J.K. Liao, Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 14214–14219, <https://doi.org/10.1074/jbc.270.23.14214>.
- [3] S. SenBanerjee, Z. Lin, G.B. Atkins, D.M. Greif, R.M. Rao, et al., KLF2 is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation, *J. Exp. Med.* 199 (2004) 1305–1315, <https://doi.org/10.1084/jem.20031132>.
- [4] M.A. Gimbrone Jr., G. García-Cardena, Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis, *Circ. Res.* 118 (2016) 620–636, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>.
- [5] P.M. Ridker, B.M. Everett, T. Thuren, J.G. MacFadyen, W.H. Chang, et al., CANTOS trial group. Antiinflammatory therapy with Canakinumab for atherosclerotic disease, *N. Engl. J. Med.* 377 (2017) 1119–1131, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914>.
- [6] Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, et al.; ESC Scientific Document Group, ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes, *Eur Heart J.* (2019) <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz425> pii:ehz425.
- [7] T. Inoue, K. Croce, T. Morooka, M. Sakuma, K. Node, et al., Vascular inflammation and repair: implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis, *JACC Cardiovasc Interv.* 4 (2011) 1057–1066, <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2011.05.025>.
- [8] W. Devane, F.A. Dysarz 3rd, M.R. Johnson, L.S. Melvin, A.C. Howlett, Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain, *Mol. Pharmacol.* 34 (1988) 605–613 [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-d](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-d).
- [9] W.A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R.G. Pertwee, L.A. Stevenson, et al., Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor, *Science.* 258 (1992) 1946–1949, <https://doi.org/10.1126/science.1470919>.
- [10] R. Mechoulam, S. Ben-Shabat, L. Hanus, M. Ligumsky, N.E. Kaminski, et al., Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors, *Biochem. Pharmacol.* 50 (1995) 83–90, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-d](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-d).
- [11] F. Montecucco, I. Matias, S. Lenglet, S. Petrosino, F. Burger, et al., Regulation and possible role of endocannabinoids and related mediators in hypercholesterolemic mice with atherosclerosis, *Atherosclerosis.* 205 (2009) 433–441, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.12.040>.
- [12] K. Sugamura, S. Sugiyama, T. Nozaki, Y. Matsuzawa, Y. Izumiya, et al., Activated endocannabinoid system in coronary artery disease and antiinflammatory effects of cannabinoid 1 receptor blockade on macrophages, *Circulation.* 119 (2009) 28–36, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.811992>.
- [13] F.F. Hoyer, M. Khoury, H. Slomka, M. Kebschull, R. Lerner, et al., Inhibition of endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase increases atherosclerotic plaque vulnerability in mice, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 66 (2014) 126–132, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.013>.
- [14] J. Jehle, F.F. Hoyer, B. Schöne, P. Pfeifer, K. Schild, et al., Myeloid-specific deletion of Diacylglycerol lipase α inhibits Atherogenesis in ApoE-deficient mice, *PLoS One* 11 (2016), e0146267 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146267>.
- [15] J. Jehle, B. Schöne, S. Bagheri, E. Avraamidou, M. Danisch, et al., Elevated levels of 2-arachidonoylglycerol promote atherogenesis in ApoE $^{-/-}$ mice, *PLoS One* 13 (2018), e0197751 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197751>.
- [16] N. Vujic, S. Schlager, Eichmann TO, C.T. Madreiter-Sokolowski, M. Goeritzer, et al., Monoglyceride lipase deficiency modulates endocannabinoid signaling and improves plaque stability in ApoE-knockout mice, *Atherosclerosis.* 244 (2016) 9–21, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.109>.
- [17] R. Guillaumat Prats, M. Rami, L. Ring, P. Rinne, E. Lauer, S. Lenglet, et al., Deficiency of Monoacylglycerol lipase enhances IgM plasma levels and limits Atherogenesis in a CB2-dependent manner, *Thromb. Haemost.* 119 (2019) 348–351, <https://doi.org/10.1055/s-0038-1676769>.
- [18] M. Rajesh, P. Mukhopadhyay, S. Bátkai, G. Haskó, L. Liaudet, et al., CB2-receptor stimulation attenuates TNF-alpha-induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293 (2007) H2210–H2218, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00688.2007>.
- [19] X. Xu, H. Guo, Z. Jing, L. Yang, C. Chen, et al., N-Oleylethanolamine reduces inflammatory cytokines and adhesion molecules in TNF- α -induced human umbilical vein endothelial cells by activating CB2 and PPAR- α , *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 68 (2016) 280–291, <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000413>.
- [20] W.S. Ho, X. Zheng, D.X. Zhang, Role of endothelial TRPV4 channels in vascular actions of the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 5251–5264, <https://doi.org/10.1111/bph.13312>.
- [21] C. Lipina, H.S. Hundal, The endocannabinoid system: 'NO' longer anonymous in the control of nitric signalling? *J. Mol. Cell Biol.* 9 (2017) 91–103, <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjx008>.
- [22] E. Lomazzo, L. Bindila, F. Remmers, R. Lerner, C. Schwitter, et al., Therapeutic potential of inhibitors of endocannabinoid degradation for the treatment of stress-related hyperalgesia in an animal model of chronic pain, *Neuropsychopharmacology.* 40 (2015) 488–501, <https://doi.org/10.1038/npp.2014.198>.
- [23] P. Carmeliet, L. Moons, J.M. Stassen, M. De Mol, A. Bouché, et al., Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice, *Am. J. Pathol.* 150 (1997) 761–776 [https://doi.org/10.1016/S0005-9526\(97\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0005-9526(97)00041-3).
- [24] A. Kumar, V. Lindner, Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1997) 2238–2244, <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.10.2238>.
- [25] R. Gräbner, U. Till, R. Heller, Flow Cytometric determination of E-selectin, vascular cell adhesion Molecule-1, and intercellular cell adhesion Molecule-1, in formaldehyde-fixed endothelial cell monolayers, *Cytometry.* 40 (2000) 238–244, [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20000701\)40:3<238::aid-cyto9>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20000701)40:3<238::aid-cyto9>3.0.co;2-3).
- [26] J. Jehle, H. Goerich, L. Bindila, B. Lutz, G. Nickenig, et al., Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is elevated in the coronary circulation during acute coronary syndrome, *PLoS One* 14 (2019), e0227142 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227142>.
- [27] C. Chaabane, F. Otsuka, R. Virmani, M.L. Bochaton-Piallat, Biological responses in stented arteries, *Cardiovasc. Res.* 99 (2013) 353–363, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt115>.
- [28] J. Dutzmann, A. Koch, S. Weisheit, K. Sonnenschein, L. Korte, et al., Sonic hedgehog-dependent activation of adventitial fibroblasts promotes neointima formation, *Cardiovasc. Res.* 113 (2017) 1653–1663, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx158>.
- [29] V. Gasperi, D. Evangelista, V. Chiurchiù, F. Florenzano, I. Savini, et al., 2-Arachidonoylglycerol modulates human endothelial cell/leukocyte interactions by controlling selectin expression through CB1 and CB2 receptors, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 51 (2014) 79–88, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.028>.
- [30] U. Förstermann, T. Münzel, Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace, *Circulation.* 113 (13) (2006) 1708–1714, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532>.

2.1 Ergänzende Daten der Publikation

The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol inhibits endothelial function and repair

Julian Jehle^{1,+,*}, Lukas Eich^{1,+}, Melina Danisch¹, Sayeh Bagheri¹, Elina Avraamidou¹, Philipp Pfeifer¹, Vedat Tiyerili¹, Laura Bindila², Beat Lutz², and Georg Nickenig¹

Department of Internal Medicine II Cardiology, Pneumology, Angiology, University Hospital Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany

Institute of Physiological Chemistry, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Duesbergweg 6, 55128 Mainz, Germany

2. Materials and methods

Animals were housed at a room temperature of 22°C and a 12-hour dark-light cycle. Mice were granted unrestricted access to drinking water and rodent chow. Laboratory animal use and all experimental procedures were in accordance with the institutional guidelines and German animal protection laws. Approval was granted by the North Rhine Westphalian State Agency for Nature, Environment and Consumer Protection (reference number 84-02.04.2014.A419), which considered all aspects of ethics and animal welfare in their approval.

2.1 Assessment of endocannabinoid levels, blood pressure, heart rate, and body weight

Liquid chromatography/multiple reaction monitoring (LC/MRM):

Plasma eCB concentrations were quantified by using LC/MRM as previously described [22]. Briefly, blood was drawn from the inferior vena cava and centrifuged immediately in a precooled Eppendorf 5810R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 2,000xg and 4°C for 10 minutes. The plasma phase was carefully transferred into precooled

(4°C) 1.5 ml reaction tubes and then snap frozen in liquid nitrogen. Prior to LC/MRM, the plasma was enriched with 50 µl of a stock solution of internal standards and 250 µl ethyl acetate/n-hexane (9:1, v/v). The samples were vortexed under strict temperature control and centrifuged (10 minutes; 16,000xg; 4°C). Hereafter, the plasma samples were incubated at -20°C for another 10 minutes. The upper organic phase was transferred to 96-well plates, evaporated to dryness, and the residue was reconstituted in 50 µl acetonitrile/H₂O (1:1, v/v) for LC/MRM analysis.

Blood pressure, heart rate, and body weight:

Blood pressure and heart rate were measured with a non-invasive tail cuff device Coda 6 (Kent Scientific Corporation, Torrington, USA). Mice were acclimated to the device for 20 minutes a day on three consecutive days. On the three consecutive days that followed the habituation period, the blood pressure and heart rate were recorded for each of the mice. Mice were weighed weekly using a Kern EW 3000-2M balance (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Germany).

2.2 Electrical denudation of the common carotid artery in wildtype mice

The influence of elevated 2-AG levels on arterial reendothelialization was studied in wildtype mice of the C57BL/6J genetic background (Charles River), as previously reported [Carmeliet et al., 1997]. Briefly, mice were anesthetized using Xylazine-hydrochloride (16 mg/kg bodyweight i.p., Rompun, Ceva) and Ketamine-hydrochloride (100 mg/kg bodyweight i.p., Ketanest, Riemsler). Following a small median cervical incision, the left common carotid artery was exposed by blunt dissection of the adjacent nerves and connective tissue. Four overlapping bursts of 2 Watts, with a duration of 5 seconds each, were then applied to the common carotid artery resulting in complete endothelial denudation with a length of 3 mm. The skin was then closed with a simple interrupted suture and the endothelial gap was allowed to heal for 5 days. During this period of time, murine 2-AG levels were artificially enhanced by giving daily intraperitoneal injections of the selective MAGL inhibitor JZL 184 (5 mg/kg body weight, solubilized in 1% (v/v) DMSO and 5% (v/v) Kolliphor (Sigma Aldrich) in sterile PBS). Mice from the control

cohort received injections of vehicle only (1% (v/v) DMSO and 5% (v/v) Kolliphor in sterile PBS). On day five, the residual endothelial gap was stained by a single i.v. injection of 50 µl Evan's blue (Sigma-Aldrich) for one minute. Hereafter, mice were sacrificed by cutting through the abdominal aorta. Excess Evan's blue was washed off with 2 ml of NaCl 0.9% (w/v), and the left and right common carotid arteries, as well as the aortic arch, were excised en bloc and embedded on microscopic slides using Aquatex mounting medium. The residual lesion size was measured using a Zeiss Axiovert 200M microscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany) and Axiovision 4.8 software (Carl Zeiss Jena GmbH).

2.3 Induction of neointimal hyperplasia by ligation of the common carotid artery

Formation of neointimal hyperplasia was studied in wildtype mice following the ligation of the common carotid artery as previously reported [24]. To this end, the left common carotid artery was exposed by blunt dissection under general anesthesia, as described above. The artery was then ligated with a single knot placed immediately proximal to the carotid bifurcation, which resulted in a complete disruption of arterial blood flow distal to the ligation. The wound was closed with a simple interrupted suture and neointima formation occurred during the 28 days that followed the surgical ligation of the left common carotid artery. During these 28 days, mice were treated daily with i.p. injections of either JZL184 or vehicle. After the treatment period, blood was drawn from the inferior vena cava under general anaesthesia and the mice were sacrificed by cutting through the abdominal aorta. The left common carotid artery was carefully exposed and excised in its full length from its aortic origin until beyond the carotid bifurcation. The artery was embedded horizontally in a tissue-freezing medium and was snap frozen at -80°C. The tissue was sectioned beginning at its distal, ligated end, at a thickness of 10 µm per section, using a Leica CM 1900 cryostat (Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Germany). The zero point was defined as the first intact section proximal to the knot. Ten sections were placed on one object slide so that one set of 10 object slides covered a length of 1,000 µm proximal to the ligation.

2.4 Histological quantification of neointimal volume and composition

The vascular ultrastructures and the neointimal hyperplasia were visualized upon hematoxylin and eosin staining. In brief, the sections were exposed to a descending series of alcohol concentrations: 100% (v/v), 90% (v/v), and 80% (v/v) ethanol for 3 minutes at each concentration. Hereafter, the slides were stained with hematoxylin 2% (w/v) for 30 seconds and with eosin 0.2% (w/v) for 30 seconds. Finally, sections were exposed to an ascending series of alcohol concentrations: 80% (v/v), 90% (v/v), and 100% (v/v) ethanol, and the slides were sealed with Entellan mounting medium (Merck, Darmstadt, Germany). Neointima was defined as the tissue between the luminal endothelial cell layer and the internal elastic lamina (IEL).

Smooth muscle cells were stained using a monoclonal anti-actin antibody (α -SMA; Anti-Actin, α -Smooth Muscle – Cy3 antibody, Sigma-Aldrich). The slides were dried and exposed to 100% (v/v) acetone for 20 minutes. Then, excess acetone was washed off the slides using PBS. Non-specific antibody binding sites were blocked with 2% (w/v) BSA in PBS. The slides were incubated with the Cy3-conjugated anti-actin antibody at room temperature for 1 hour. Finally, the nuclei were stained and tissue samples were sealed using Vectashield mounting medium with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vector Laboratories, Burlingame, USA).

Macrophages within the vessel wall were detected by immunofluorescent staining of CD68 (primary antibody: α -CD68 rat IgG2a, Acris antibodies GmbH, Herford, Germany; secondary antibody: Cy3 AffiniPure Donkey anti-Rat IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). The slides were fixed in acetone for 20 minutes, and the non-specific binding sites were blocked with 1% (w/v) BSA in PBS. Then, the sections were incubated with the primary antibody (1:100) at 4°C overnight and the secondary antibody (1:500) at room temperature for 1 hour. The nuclei were stained using Vectashield mounting medium with DAPI.

Microscopic pictures were obtained using a Zeiss Axiovert 200M microscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany) and Axiovision 4.8 software (Carl Zeiss Jena GmbH). Neointima formation was quantified by length and by cross-sectional area. The length of the neointimal lesion was considered to be the distance between the ligation site and the most proximal section that was free of neointimal changes. The cross-sectional area of the neointimal cone was quantified at a distance of 500 μm proximal to the ligation and was calculated as $\frac{IEL-lumen}{IEL} \times 100\%$.

2.5 Cell culture experiments using human coronary artery endothelial cells

2.5.1 Cell culture

Primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) were purchased from PromoCell (Heidelberg, Germany) and cultivated at 37°C and 5% (v/v) CO₂. The cells were split at 100% confluence by 1:3. All experiments were conducted at 80% confluence and at passages six to eight, unless otherwise indicated.

2.5.2 XTT viability assay

HCAEC were seeded into a 6-well plate at a density of 40,000 cells per well. Immediately after the split, cells were exposed to either JZL184 [10 μM], DMSO [0.1% (v/v)], which served as the vehicle control, or starvation medium with an FBS content that is reduced to 2% (v/v). After 24 hours, HCAEC viability was assessed using the 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide salt (XTT) assay (Invitrogen, Eugene, USA). Phenazine methosulfate (PMS; Acros organics, New Jersey, USA) was used as an intermediate electron carrier to facilitate the reduction of XTT to the colored formazan derivative. PMS was prepared as a 10 mM solution in PBS and the XTT reagent was prepared as a 0.1% (w/v) solution in cell culture medium. 10 μl of PMS solution were added to every 4 ml of XTT solution and HCAEC were incubated with the PMS/XTT solution for 2 hours before the absorbance at 450 nm was measured using a microplate reader (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Switzerland).

2.5.3 TUNEL assay

Double-strand DNA breaks, indicative of apoptosis, were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick-end labeling (TUNEL). HCAEC were grown on cover slips in 24-well plates. At 80% confluence, the cells were treated with JZL184 [10 μ M] or DMSO [0.1% (v/v)]. After 24 hours of incubation, cells were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) and permeabilized with 0.1% (w/v) Triton-X-100 and 0.1% (w/v) sodium citrate in PBS. Hereafter, each well was stained with 50 μ l TUNEL reaction mixture for 1 hour at 37°C and 5% (v/v) CO₂. Coverslips were then washed three times with PBS and transferred onto object slides. The nuclei were stained using Vectashield mounting medium with DAPI. Microscopic pictures were obtained using a Zeiss Axiovert 200M microscope.

2.5.4 Scratch assay

HCAEC migration was assessed using an *in vitro* wound-healing assay. At 100% confluence, cells were starved overnight to minimize HCAEC proliferation. Hereafter, a straight, narrow gap was scratched into the cell layer using a pipet tip. Subsequently, the cells were stimulated with 2-AG [10 μ M]; DMSO [0.1% (v/v)] served as a control. Pictures were taken of the cells at 0, 1, 3, 5, 7, and 9 hours. The area of the residual gap was quantified.

2.5.5 THP-1 adhesion assay

Adhesion of THP-1 monocytes to HCAEC was measured. HCAEC were grown to 90% confluence on cover slips in 24-well plates. Then, HCAEC were stimulated with DMSO [0.1% (v/v)] or 2-AG [1-10 μ M] for four hours; lipopolysaccharide (LPS) [100 ng/ml] served as a positive control. Meanwhile, THP-1 monocytes were labeled with the red fluorescent dye PKH26 (Sigma-Aldrich): 4 μ l of PKH26 were diluted in 1 ml of diluent that was supplied with the kit. 1 ml of this staining solution was used per 1×10^7 monocytes. Stained monocytes were reconstituted in HCAEC cell culture medium at a con-

centration of 1×10^5 monocytes per 1 ml medium. At the end of the HCAEC stimulation, the stimulation medium was removed from the HCAEC and they were exposed to the medium containing THP-1 cells for 30 minutes. Hereafter, the non-adherent cells were washed off with PBS and all remaining cells were fixed with 4% (w/v) PFA. The cover slips were transferred onto object slides and the nuclei were stained using Vectashield mounting medium with DAPI. Microscopic pictures were obtained using a Zeiss Axiovert 200M microscope.

2.5.6 Flow cytometric quantification of cellular adhesion molecules

The cellular adhesion molecules on HCAEC were quantified using flow cytometry. HCAEC were stimulated with DMSO [0.01% (v/v)] or 2-AG [1-10 μ M] for four hours; LPS [100 ng/ml] served as a positive control. After four hours, the medium was removed, cells were washed with PBS and stained with fluorescent antibodies targeting the adhesion molecules ICAM-1 (PerCP/Cy5.5 anti-human CD54 Antibody Clone HA58, BioLegend, San Diego, USA), VCAM-1 (BB515 Mouse Anti-Human CD106 Clone 51-10C9 (RUO), BD Biosciences), and E-selectin (APC anti-human CD62E Antibody Clone HAE-1f, BioLegend). Cells were stained prior to dissociation as previously reported [25]. After dissociation, the cells were stained with Zombie Yellow™ Fixable Viability Kit (BioLegend). Each experiment was carried out in triplicate while each sample was measured with at least 40,000 events. Antibody binding was quantified using a BD FACS Canto II Flow Cytometer and the data were analyzed with the FlowJo Data Analysis Software V10 (Tree Star, Ashland, USA). Gates were controlled with fluorescence-minus-one-controls of LPS- [100 ng/ml] treated cells. The instrument was CST (Cytometer Setup and Tracking) -calibrated each day and compensations were used for a maximum of 15 days.

2.5.7 Quantification of endothelial NO synthase (eNOS) mRNA expression by qPCR

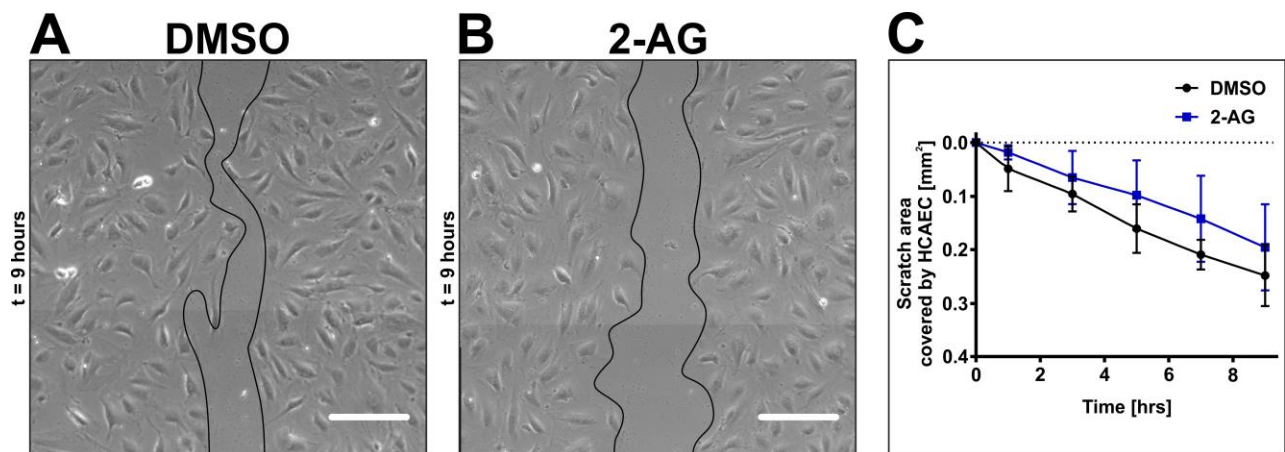
HCAEC were stimulated with DMSO [0.01% (v/v)] or 2-AG [1 μ M] for four hours. The eNOS inductor bradykinin [1 mM] served as a positive control. Hereafter, cells were lysed and the RNA was isolated and reversely transcribed as reported earlier [Jehle et

al., 2018]. qPCR analyses were conducted using a TaqMan® probe for eNOS (NOS3, Hs01574665; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) and the appropriate master mix. Fold-changes in the mRNA expression were derived using the delta-delta-CT method.

2.6 Statistical analyses

Data are presented as the mean \pm SEM. Data were analyzed using Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) and GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, USA). For the comparison of continuous and normally distributed variables between two groups, an unpaired Student's two-sided t-test was applied. For the comparison of three or more groups, a one-way ANOVA and subsequent Bonferroni correction was performed. P-values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results



Supplementary Fig. S1. Quantification of HCAEC migration.

A straight, narrow gap was scratched into the human coronary artery endothelial cell (HCAEC) layer at $t = 0$. Cells were stimulated with DMSO [0.1% (v/v)] or 2-AG [10 μ M]. Panels A and B depict the residual gap in each group at $t = 9$ hours. Panel C illustrates the time course of HCAEC migration. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean; $n = 6$; $p > 0.05$, assessed by student's t-test. Scale bar, 200 μ m. 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; DMSO, dimethyl sulfoxide.

3. Danksagung

Mein besonderes Dankeschön gilt meinem Doktorvater und Betreuer Priv.-Doz. Dr. med. Julian Jehle. Vielen lieben dank dir, für die offene und ausführliche Betreuung von Anfang an bis zum Schluss! Du hast nicht nur schon vor Beginn die Arbeit einzigartig durchdacht sondern standst mir bei jeglichen Hürden zur Beratung zur Verfügung, nach der man immer eine gute Idee zum weiteren Vorgehen hatte. Besonders erwähnen möchte ich deine Fähigkeit zur Begeisterung!

Mein Dank gilt auch sehr dem kompletten Team, das mich bei der Arbeit unterstützt hat. Hervorzuheben sind Dr. rer. nat. Sandra Adler und Katharina Groll und auch die weiteren TAs. Vielen Dank euch, für die saubere Einarbeitung beim Arbeiten im Labor. Ebenfalls danken möchte ich den Mitarbeitern der Core-Facility in Bonn, die die Durchflusszytometer instand gehalten und hier täglich neue Cytometer-Setup-and-Tracking-Einstellungen erstellt haben. Darüber hinaus standen auch sie zur fachkundigen Beratung zur Verfügung. Außerdem bedanke ich mich bei dem Team der Doktoranden, unter denen wir uns gegenseitig gut austauschen und so manche Abende im Labor erträglicher gemacht haben.

Ein zusätzliches Dankeschön gilt der Deutschen Herzstiftung e. V., die die Arbeit finanziell unterstützt hat.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinem Bruder und meiner gesamten Familie. Vielen Dank für die Geduld, Motivation und Anregungen zum kritischen, wissenschaftlichen Denken. Nicht zuletzt möchte ich auch für das Korrekturlesen der Arbeit danken. Besonders erwähnen möchte ich hier meine Cousine Ruth Paas. Du hast mich nicht nur als Vorbild inspiriert, sondern schließlich auch die Abfassung gründlich überdacht.

Schließlich möchte ich ebenfalls meiner Freundin und meinen Freunden danken, die für den nötigen Ausgleich gesorgt haben. Vielen Dank auch euch für die Unterstützung und Anregungen- nicht nur während der letzten Jahre.