

**Der CB2-Rezeptor auf myeloischen Zellen
vermittelt die atherogenen Effekte des
Endocannabinoids 2-Arachidonylglycerol**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Elina Avraamidou

aus Lefkosia/Zypern

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Julian Jehle
2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Zimmer

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.03.2026

Aus der Medizinische Klinik und Poliklinik II

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Deutsche Zusammenfassung	7
1.1 Einleitung	7
1.2 Material und Methoden	17
1.3 Ergebnisse	26
1.4 Diskussion	37
1.5 Zusammenfassung	41
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	44
2. Veröffentlichungen	52
3. Erklärung zum Eigenanteil	53
4. Danksagung	55
5. Publikationen (PDF-Version)	56

Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonylglycerol
AA	Arachidonsäure
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
AEA	Anandamid
ANOVA	Varianzanalyse (<i>ANalysis Of VAriance</i>)
ApoE	Apolipoprotein E
CAD	koronare Herzkrankheit
CB1	Cannabinoid-Rezeptor 1
CB2	Cannabinoid-Rezeptor 2
CD36	Cluster of Differentiation 36
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
CYBB	Cytochrome b-245 heavy chain
CYBA	Cytochrome b-245 light chain
DAGL	Diacylglycerol-Lipase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eCB	Endocannabinoide
FAAH	Fettsäureamid-Hydrolase
FBS	fetal bovine serum
GPR55	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 55

HCAEC	human coronary artery endothelial cells
HCASMC	human coronary artery smooth muscle cells
HLSEC	human liver sinusoidal endothelial cells
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
I/R	Ischämie-Reperfusionsschaden
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
JZL184	irreversibler Inhibitor der Monoacylglycerol-Lipase
LDL	Low-density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LTB ₄	Leukotrien B ₄
Ly6G	Lymphozytenantigen-6-Komplex, Locus G
MAGL	Monoacylglycerol-Lipase
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
NOX	NADPH-Oxidase
NOX2	NADPH-Oxidase 2
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
oxLDL	oxidiertes Low-Density-Lipoprotein
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PCI	perkutane Koronarintervention

PLD	Phospholipase D
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
TEM	transendotheliale Migration
TIMP	Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen
THP-1	human monocytic leukemia cell line
VSMC	vascular smooth muscle cells

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

1.1.1 Das Endocannabinoid-System

Endocannabinoide (eCB) sind Lipidmediatoren, welche von Immunzellen synthetisiert und sezerniert werden und Immunprozesse regulieren, indem sie Cannabinoid-Rezeptoren aktivieren. Zu den Endocannabinoiden gehören Anandamid (AEA) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG). 2-AG wird von Membranphospholipiden durch Ca^{2+} -sensitive sn-2-selektive DAG-Lipasen (DAGL- α und DAGL- β) synthetisiert. Die eCB-Aktivität wird häufig durch Hydrolyse der Arachidongruppe beendet. Die Hydrolyse des 2-AG erfolgt hauptsächlich durch Monoacylglycerol-Lipase (MAGL). Die durch die Hydrolyse freigesetzte Arachidonsäure kann als Substrat für Cyclooxygenasen (COXs) zur Produktion von Prostaglandinen (z.B. PGE_2) dienen (Chang et al., 2001; Chiurchiù et al., 2015; Lu und Mackie, 2021). Ebenfalls können AEA und 2-AG aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Arachidonsäure (AA) als Substrat für Cyclooxygenasen und Lipooxygenasen dienen (Chang et al., 2001).

Frühere Studien zeigten eine immunsuppressive Wirkung von Cannabinoiden. Dazu gehört die Hemmung der Lymphozytenproliferation, der Antikörperproduktion, der Aktivität natürlicher Killerzellen und Makrophagen, der Chemotaxis und der *ex vivo* Produktion von Zytokinen (Chang et al., 2001; Chouinard et al., 2011). Andere Studien zeigten eine proinflammatorische Funktion von 2-AG durch Aktivierung der Zelladhäsion, Chemotaxis, Phagozytose und Freisetzung von Zytokinen von myeloischen Zellen, aber auch Aktivierung von Endothelzellen und Hemmung der Endothelfunktion und -reparatur durch Aktivierung der Cannabinoid-Rezeptoren, oder als Folge der Hydrolyse und De-novo-Leukotrien-Biosynthese (Chouinard et al., 2011; Gasperi et al., 2014; Gokoh et al., 2005a; Gokoh et al., 2005b; Hou et al., 2021; Kishimoto et al., 2003; Kishimoto et al., 2004).

1.1.2 Cannabinoid-Rezeptoren

Zu den bestcharakterisierten Cannabinoid-Rezeptoren gehören der CB1- und der CB2-Rezeptor.

Beide Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit hauptsächlichlicher Kopplung an Proteine der heterotrimeren $G_{\alpha i}$ -Proteine, welche nach Aktivierung die Adenylylcyclase-Aktivität hemmt und dadurch den cAMP-Spiegel senkt und die Proteinkinase A inaktiviert. Ferner werden verschiedene mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen), wie die p38-MAP-Kinase (vermittelt durch $G_{\alpha i}$), die p42/44-MAPK (ERK1/2; vermittelt durch G_i -gekoppelte $\beta\gamma$ -Untereinheiten) sowie die Rho-assoziierte Proteinkinase aktiviert. Diese Kinasen sind in Signalkaskaden eingebunden, die unter anderem die Migration von Immunzellen beeinflussen (Gokoh et al., 2005b; Kishimoto et al., 2003).

Der CB1-Rezeptor gehört zu den am stärksten exprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im Gehirn, ist jedoch auch in peripheren Organen exprimiert, die an der Regulation des Energiestoffwechsels beteiligt sind, darunter Leber, Schilddrüse, Gastrointestinaltrakt, Adipozyten und Bauchspeicheldrüse (Pagotto et al., 2006). Immunzellen exprimieren ebenfalls den CB1-Rezeptor, wobei die Expression des CB2-Rezeptors in Immungewebe im Vergleich zu der des CB1-Rezeptors das 10- bis 100-fache beträgt (Buckley, 2008; Pacher und Steffens, 2009; Sugamura et al., 2009).

Andererseits wird der CB2-Rezeptor hauptsächlich in Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert (Buckley, 2008). Die Expression von CB2-mRNA konnte in eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Monozyten sowie B- und T-Lymphozyten nachgewiesen werden, wobei die Expression in eosinophilen Granulozyten und B-Lymphozyten am höchsten war (Montecucco et al., 2008; Simard et al., 2022). Das Vorhandensein von CB1- und CB2-Rezeptoren wurde ebenfalls in verschiedenen peripheren Geweben, wie dem Myokard, glatten Muskelzellen und humanen Endothelzellen der Koronararterien, gezeigt (Pacher und Steffens, 2009; Rajesh et al., 2008; Sugamura et al., 2009).

1.1.3 Koronare Herzerkrankung

Koronare Herzerkrankung ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Koronararterien, die durch atherosklerotische Läsionen charakterisiert ist, welche aus Lipiden, Immunzellen, glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix bestehen. Eine verstärkte Aktivierung von Entzündungsprozessen, Lipidpathologie und -akkumulation

und der durch die Bildung überschüssiger reaktiver Sauerstoffspezies verursachte oxidative Stress sind Kennzeichen der Atherosklerose (Kattoor et al., 2017; Paramel Varghese et al., 2016).

In den frühen Stadien der Atherosklerose führt ein atherogenes Milieu zur Aktivierung von Endothelzellen, zur Leukozytenadhäsion und zur transendothelialen Migration (TEM) (Libby, 2021).

Erhöhte Cholesterinspiegel, insbesondere des LDL, führen zur subendothelialen Lipidakkumulation. LDL wird durch verschiedene Enzymsysteme oxidiert. Dazu gehört die NADPH-Oxidase (NOX), ein membrangebundener Enzymkomplex, der von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs), Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen exprimiert wird und Superoxid-Anionen erzeugt. Weitere beteiligte Enzymsysteme sind Lipoxygenasen, die Xanthinoxidase und die Myeloperoxidase (MPO), welche von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen sezerniert wird, und das LDL (möglicherweise dessen ApoB-100), durch das MPO/H₂O₂/Cl⁻-System unter Bildung von hypochloriger Säure (HOCl) oxidativ modifiziert. MPO-modifiziertes LDL bindet an LDL, co-präzipitiert damit und stellt eine pathophysiologisch relevante Form von oxidiertem LDL (oxLDL) dar (Frangie und Daher, 2022; Jeradeh et al., 2024). Ferner gehören die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die mitochondriale Elektronentransportkette zu den wichtigen ROS-produzierenden Systemen der Gefäßwand (Förstermann et al., 2017).

Die MPO beeinträchtigt zudem HDL (wandelt HDL in eine dysfunktionale Form um), verringert die Bioverfügbarkeit von NO, aktiviert MMPs (inaktiviert Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMP)), was zur Instabilität in atherosklerotischen Plaques führt. Darüber hinaus induziert MPO die Produktion von Interleukinen (IL) wie IL-6 und IL-8 in Endothelzellen und führt zu einer endothelialen Dysfunktion (Frangie und Daher, 2022; Kamanna et al., 2013). Ein erhöhter MPO-Spiegel ist mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert und prognostiziert das Risiko für Myokardinfarkt und Herztod bei akutem Koronarsyndrom (Kamanna et al., 2013).

Adhäsion und TEM von Monozyten stellen die Anfangsstadien der Zellrekrutierung in atherosklerotische Läsionen dar (Rajesh et al., 2007a; Steffens et al., 2005; Steffens und Pacher, 2012).

Oxidiertes LDL, insbesondere, wenn in größeren Partikeln aggregiert (Agg-oxLDL), wird von Makrophagen phagozytiert, welche sich zu ‚Schaumzellen‘ umwandeln, in einem Prozess, an dem PLD2 und CD36, ein Scavenger-Rezeptor verantwortlich für den Cholesterineinstrom, beteiligt sind. Diese Akkumulation erhöht die Aktivität der Focal adhesion kinase (FAK) und beeinflusst so die Migration und Akkumulation von Schaumzellen in der Intima, was zur atheromatösen Plauebildung führt (Ganesan et al., 2018). Dies löst ebenfalls die Apoptose dieser Zellen aus und kann in fortgeschrittenen Läsionen die Plauestabilität reduzieren (Steffens und Pacher, 2012).

Die Ansammlung von oxidiertem LDL (oxLDL), die Bildung von dysfunktionalem High-Density-Lipoprotein (HDL) und eine durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verstärkte Entzündung fördern die Apoptose von Makrophagen und eine fehlerhafte Efferozytose (die Fähigkeit von Makrophagen, abgestorbene Zellen zu beseitigen) und vergrößern so den nekrotischen Kerns (NC), ein Schlüsselmerkmal vulnerabler Plaques (Linton et al., 2016).

Ferner sind die Proliferation und Migration der vaskulären glatten Muskulatur (induziert durch inflammatorische Zytokine wie TNF- α) an der Entwicklung und dem Fortschreiten der Atherosklerose beteiligt (Rajesh et al., 2008).

Studien weisen darauf hin, dass humane atherosklerotische Läsionen und insbesondere symptomatische Läsionen NLRP3-Inflammasome enthalten, welche mit den mRNA-Spiegel des Makrophagen-Markers CD68 korrelieren (Paramel Varghese et al., 2016). IL-1 β ist ein zentrales Zytokin für Entzündungsreaktionen, welches den IL-6-Signalweg aktiviert. IL-1 β -mRNA ist in atherosklerotischen Läsionen hochreguliert. Die Inflammasome werden unter anderem durch Cholesterinkristalle, NETs, Gewebehypoxie, ATP-, oder TLR4-Aktivierung aktiviert und erzeugen durch Caspase-1-Aktivität die aktive Form von IL-1 β , die anschließend freigesetzt wird (Duell et al., 2010; Rajamäki et al., 2010; Xiao et al., 2013). Die Freisetzung von IL-1 β spielt eine Schlüsselrolle bei der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und fördert dadurch ein entzündliches Milieu in

atherosklerotischen Plaques (Paramel Varghese et al., 2016). Die Bedeutung von IL-1 β bei der Atherogenese wird dadurch bestätigt, dass ein IL-1 β -Mangel bei ApoE-Knockout- (ApoE^{-/-})-Mäusen die Plaqueentwicklung abschwächt und dass eine antiinflammatorische Therapie mit Canakinumab (monoklonaler Antikörper gegen IL-1 β) zu selteneren kardiovaskulären Ereignissen führt (Kirii et al., 2003; Ridker et al., 2017).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass IL-6 eine zentrale Rolle bei der Ausbreitung einer Entzündungsreaktion spielt, die für die Atherosklerose verantwortlich ist (Hartman und Frishman, 2014). Der IL-6-Plasmaspiegel ist bei Patienten mit instabiler Angina Pectoris erhöht und korreliert mit dem Outcome von Betroffenen mit akutem Koronarsyndrom. Allerdings führte ein IL-6-Mangel bei ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer verstärkten Bildung atherosklerotischer Läsionen, einem erhöhten Cholesterinspiegel sowie gleichzeitig zu einer reduzierten Rekrutierung von Makrophagen und Leukozyten und einem verminderten Kollagenstoffwechsel. In diesem Modell war die Synthese von IL-10 reduziert. Dies deutet darauf hin, dass das Gleichgewicht zwischen IL-6 und IL-10 für die Plaquebildung und -morphologie entscheidend sein könnte (Schieffer et al., 2004).

Die Zerstörung der extrazellulären Matrix ist eine wichtige Ursache atherosklerotischer Plaque-Rupturen (Newby, 2015).

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie von mindestens 23 aktiven Proteinasen, welche von Makrophagen, Endothelzellen, VSMCs und neutrophilen Granulozyten exprimiert werden. Sie spielen einerseits bei der Intimaverdickung, welche Plaques stabilisiert, und andererseits bei der Zerstörung der extrazellulären Matrix, die zur Plaque-Ruptur führt, eine Rolle. Die Überproduktion von MMPs trägt zur Plaque-Ruptur und zum Myokardinfarkt bei (Newby, 2015).

Bei der Reperfusion wirken entzündliche Zytokine wie TNF- α als kontinuierliche Stimuli für die Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen, die Produktion von Chemokinen sowie die Infiltration und Aktivierung neutrophiler Granulozyten, was eine Rolle bei der Reperfusionsverletzung des Myokards nach Ischämie spielt (Rajesh et al., 2007a).

1.1.4 Das Endocannabinoid-System und kardiovaskuläre Erkrankungen

Mehrere Studien konnten nachweisen, dass das Endocannabinoidsystem an der chronisch-entzündlichen atherosklerotischen Erkrankung beteiligt ist und dass dessen Aktivierung mit mehreren kardiometabolischen Risikofaktoren wie Fettleibigkeit in Verbindung steht (Engeli et al., 2005; Osei-Hyiaman et al., 2005; Jiang et al., 2009; Jourdan et al., 2013).

Endocannabinoid-Plasmaspiegel und kardiovaskuläre Erkrankungen

Es wurde gezeigt, dass der 2-AG- und AEA-Plasmaspiegel bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung (≥ 1 stenotische Koronararterie mit $> 50\%$ Stenose in der Koronarangiographie) deutlich höher sind als bei gesunden Probanden (Sugamura et al., 2009). In einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass der 2-AG-Spiegel in der Koronararterie nach der Culprit-Läsion bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) im Vergleich zu Patienten mit chronischem Koronarsyndrom (CCS) ($> 50\%$ Lumenverengung der linken Koronararterie, $> 70\%$ in anderen Koronararterien, frühere PCI) höher war. Außerdem war der 2-AG-Spiegel in der Koronararterie bei ACS-Patienten höher als die in ihrem peripheren Blut gemessenen Werte, was auf eine lokale Produktion oder Freisetzung von 2-AGs durch zirkulierende oder läSIONALE Immunzellen hinweist (Jehle et al., 2019). Dies weist auch darauf hin, dass das Endocannabinoid 2-AG eine Rolle bei der Modulation der lokalen Entzündung in KoronarläSIONen während des Infarkts spielt.

Eine andere Studie zeigte einen erhöhten AEA-Spiegel in der den Infarkt verursachenden Koronararterie (Maeda et al., 2009).

Frühere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe deuten auf einen proatherogenen Effekt eines erhöhten 2-AG-Spiegels bei ApoE^{-/-}-Mäusen hin. ApoE^{-/-}-Mäuse wiesen infolge eines erhöhten 2-AG-Spiegels eine vermehrte atherosklerotische Plaquebildung auf, begleitet von einem signifikanten Anstieg infiltrierender Makrophagen innerhalb der atherosklerotischen Gefäßwand. *In vitro* führte 2-AG zu einer verstärkten Migration von B6MCL-Makrophagen, die durch CB1/CB2-Antagonisten abgeschwächt wurde. Ferner führte 2-AG zur verstärkten Transkription von CCR1, ICAM-1 und CD36 in B6MCL Makrophagen (Jehle et al., 2018). Außerdem führte ein erhöhter 2-AG-Spiegel zu einer

Beeinträchtigung der Endothelreparatur *in vivo* nach elektrischer Verletzung der Arteria carotis communis. Passend dazu konnte *in vitro* gezeigt werden, dass ein erhöhter 2-AG-Spiegel zu einer verminderten Proliferation von Endothelzellen führt. Ferner führte eine Vorbehandlung von HCAEC mit 2-AG zu einer erhöhten Monozytenadhäsion. Dies könnte durch eine verminderte eNOS-Expression erklärt werden (Jehle et al., 2021). Eine Zunahme des atherosklerotischen Plaquevolumens wurde ebenfalls bei ApoE^{-/-}-MAGL^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen (mit erhöhtem 2-AG-Spiegel) beobachtet. Interessanterweise berichteten Vujic et al. (2016) über erhöhte Spiegel von CCL2- und IL-1 β -mRNA in der Bauchorta von ApoE^{-/-}-MAGL^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen, was auf eine verstärkte Gefäßentzündung hinweisen könnte. Darüber hinaus wurde ein deutlich erhöhter Kollagengehalt der atherosklerotischen Plaques bei Mäusen mit erhöhtem 2-AG-Spiegel beobachtet.

Expression der CB-Rezeptoren bei kardiovaskulären Erkrankungen

Das Vorhandensein des CB2-Rezeptors konnte sowohl in humanen atheromatösen Plaques als auch in atherosklerotischen Läsionen des murinen Aortenbogens und der Aortenwurzel nachgewiesen werden. In atherosklerotischen Läsionen wurde der CB2-Rezeptor vorwiegend von Makrophagen und T-Lymphozyten exprimiert (Steffens et al., 2005). Bei Patienten mit instabiler Angina pectoris war die Expression des CB1-Rezeptors in den Koronararterien signifikant höher als bei Patienten mit stabiler Angina pectoris. Diese Expression war in lipidreichen atheromatösen Plaques höher als in fibrösen Plaques. Die Mehrheit der CB1-positiven Zellen war CD86-positiv, was darauf hinweist, dass Makrophagen in atheromatösen Plaques CB1-Rezeptoren exprimieren. In dieser Studie war der CB1-Rezeptor in fortgeschrittenen Atheromen stärker exprimiert als der CB2-Rezeptor (Sugamura et al., 2009). Interessanterweise wurde in der Arteria abdominalis von ApoE^{-/-}-MAGL^{-/-}-Mäusen (erhöhter 2-AG-Spiegel) eine verringerte Expression von CB1- und CB2-Rezeptoren beobachtet (Vujic et al., 2016).

1.1.5 Funktionelle Bedeutung der CB-Rezeptoren im Kontext der Atherogenese

Rolle des CB1-Rezeptors

Das Vorhandensein des CB1-Rezeptors wird überwiegend mit proinflammatorischen und kardiometabolisch dysfunktionalen Prozessen wie Entzündung, Zelltod,

Herzfunktionsstörung, Adipositas/metabolischem Syndrom und Diabetes in Verbindung gebracht (Rajesh et al., 2012; Tiyerili et al., 2010).

Jiang et al. (2009) zeigten, dass oxidiertes LDL in Makrophagen *in vitro* die Produktion von 2-AG und AEA erhöht und die Expression von CB1 und CB2 induziert. Co-Inkubation mit dem synthetischen Cannabinoid WIN55,212-2 förderte die zelluläre Cholesterinakkumulation in Makrophagen, was mit einer erhöhten CD36-Expression und einer verminderten Expression von ABCA1 -einem zentralen Transporter für die zelluläre Cholesterinabgabe- über PPAR γ verbunden war. AM251, ein selektiver CB1-Rezeptorantagonist, hatte entgegengesetzte Effekte. Diese Befunde unterstützen eine CB1-abhängige Cholesterinakkumulation und damit eine proatherogene Rolle des CB1-Rezeptors.

Hinweise auf atheroprotektive Effekte des CB2-Rezeptors

In früheren Studien vermittelte die Aktivierung des CB2-Rezeptors eine antiinflammatorische Wirkung und somit einen atheroprotektiven Effekt (Bátkai et al., 2007; Buckley et al., 2000; Di Filippo et al., 2004; Hoyer et al., 2011; Molica et al., 2012; Rajesh et al., 2007a; Rajesh et al., 2007b; Steffens et al., 2005; Zhao et al., 2010a; Zhao et al., 2010b).

Die potenzielle Auswirkung des CB2-Rezeptors auf die Atherosklerose wurde erstmals demonstriert, nachdem die orale Verabreichung von THC, dem Hauptbestandteil von Marihuana, eine Verringerung der Entwicklung und Progression atherosklerotischer Läsionen in ApoE-Knockout-Mäusen sowie eine Verringerung der Makrophagenadhäsion und -infiltration verursachte, während die Anwesenheit des CB2-Rezeptorantagonisten diesen Effekt aufhob (Steffens et al., 2005).

Die Deletion des CB2-Gens (CB2-Knockout-Mäuse) führte zu einer vermehrten Infiltration von Makrophagen, Monozyten und glatten Muskelzellen in atherosklerotischen Plaques, zu einer gesteigerten Superoxidproduktion, zu einer reduzierten endothelabhängigen Vasodilatation sowie zu einer verringerten Plaquestabilität. Entsprechend zeigten Mäuse, die mit dem selektiven CB2-Agonisten JWH-133 behandelt wurden, eine verringerte Bildung atherosklerotischer Läsionen, eine reduzierte Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen in atherosklerotische Plaques, eine verbesserte Endothelfunktion und

reduzierte Mengen an ROS. Ähnliche Effekte konnten auch *in vitro* beobachtet werden: Die CB2-Aktivierung verringerte *in vitro* die oxLDL-induzierte ROS-Produktion in HUVEC, während eine Vorbehandlung mit JWL-133 die Angiotensin-II-induzierte ROS-Produktion in VSMC reduzierte (Buckley et al., 2000; Hoyer et al., 2011). Diese Daten unterstützen eine antiatherogene Wirkung des CB2-Rezeptors.

Rajesh et al. (2007a; 2008) zeigten, dass die Stimulation des CB2-Rezeptors die TNF- α -induzierte Aktivierung von Endothelzellen, die transendotheliale Migration von Monozyten, die Monozyten-Endothel-Adhäsion sowie die Proliferation und Migration menschlicher glatter Gefäßmuskelzellen abschwächt. Im Einzelnen hemmten die CB2-Agonisten (HU-308/JWH-133) dosisabhängig die TNF α - oder LPS-induzierte HCAEC-Expression von ICAM-1 und VCAM-1. Dieser Effekt wurde durch die CB2-Antagonisten SR144528 und AM-630 abgeschwächt. Ferner hemmten die CB2-Agonisten die durch TNF- α -Vorbehandlung von HCAEC induzierte transendotheliale Monozytenmigration, die Monozytenadhäsion, die RhoA- und NF- κ B-Aktivierung und MCP-1(CCL2)-Expression in HCAEC (Rajesh et al., 2007a). Interessanterweise führte die Stimulation mit 2-AG in einer Studie unserer Arbeitsgruppe zu keiner Veränderung der HCAEC-Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin (Jehle et al., 2021).

Die CB2-Agonisten HU-308/JWH-133 reduzierten ebenfalls die TNF- α -induzierte Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und inhibierten die Aktivierung von Akt, Ras und MAPK. TNF- α führte zu einer erhöhten CB2-Expression in HCASMC (Rajesh et al., 2008).

Ferner konnte die Aktivierung des CB2-Rezeptors mittels WIN55,212-2 auch vor myokardialen Ischämie-Reperfusionsschäden schützen (Di Filippo et al., 2004). In dieser Studie konnte eine Verringerung von IL-1 β und CXCL8 sowie eine Abschwächung der MPO-Aktivität nach CB2-Aktivierung festgestellt werden. Dies wurde durch Studien untermauert, die nach HU-308-/JWH-133-vermittelter Aktivierung des CB2-Rezeptors einen Schutz vor hepatischem I/R-Schaden durch verringerte TNF- α -, CCL3- und CXCL2-Spiegel sowie eine verminderte Expression von ICAM-1, eine reduzierte Lipidperoxidation und eine geringere Infiltration von Neutrophilen *in vivo* zeigten. Der CB2-Rezeptoragonist dämpfte die TNF- α -induzierte ICAM-1- und VCAM-1-Expression von HLSEC sowie die

Adhäsion neutrophiler Granulozyten auf HLSEC *in vitro* (Bátkai et al., 2007; Rajesh et al., 2007b).

Hinweise auf proatherogene Effekte des CB2-Rezeptors

Andere Daten deuten jedoch darauf hin, dass 2-AG Atherosklerose fördern kann und dass der CB2-Rezeptor die Monozyten-Chemotaxis, -Infiltration und -Aktivierung auslösen sowie die Anfälligkeit von Makrophagen für oxLDL-induzierte Apoptose erhöhen kann (Freeman-Anderson et al., 2008; Jehle et al., 2018; Kishimoto et al., 2003; Miller und Stella, 2008; Montecucco et al., 2008; Steffens et al., 2005; Vujic et al., 2016).

Der CB2-Rezeptor-Antagonist SR144528 hemmte in früheren Studien die 2-AG-induzierte Migration differenzierter HL-60-Zellen (Kishimoto et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass der CB2-Rezeptor an der 2-Arachidonylglycerol-induzierten Migration beteiligt ist. Passend dazu zeigten *in-vitro*-Daten unserer Arbeitsgruppe eine verstärkte Migration von B6MCL-Makrophagen nach Stimulation mit 2-AG, welche durch CB1/CB2-Antagonisten abgeschwächt wurde (Jehle et al., 2018).

Vujic et al. (2016) zeigten einen CB2-abhängigen Anstieg der Leukozytenzahl in ApoE^{-/-}-MAGL^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen (erhöhter 2-AG-Spiegel) während die CB2-Rezeptor-Antagonisierung zu reduzierter Plaquegröße führte. Freeman-Anderson et al. (2008) zeigten, dass die CB2-Expression die Anfälligkeit von Makrophagen für oxLDL-induzierte Apoptose erhöht und dass CB2 die Atherosklerose beeinflussen kann, indem es die läSIONALE Makrophagen-Apoptose moduliert.

Weitere immunmodulatorische Funktionen

In der Studie von Saroz et al. (2019) wird eine immunmodulatorische Wirkung des CB2-Rezeptors mit einem Potenzial für sowohl entzündungsfördernde als auch entzündungshemmende Funktionen postuliert. Die CB2-Aktivierung von PBMCs durch HU-308 induzierte die Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-10. Dieser Effekt wurde hauptsächlich durch G_{αs}-Aktivierung vermittelt, vermutlich über Phosphorylierung des zellulären Transkriptionsfaktors CREB. Die durch HU-308 induzierte Sekretion von IL-6 und IL-10 war allerdings 10-mal geringer als von LPS.

Ferner gibt es Hinweise, dass der CB2-Rezeptor die Rekrutierung von Neutrophilen reguliert. Die Matrix-Metalloproteinase MMP-9, die eine Rolle bei der Migration von Neutrophilen spielt, war im Serum von CB2-Knockout-Tieren in einem Mausmodell der Endotoxämie signifikant hochreguliert. CB2-Mangel führte zu mehr Neutrophilen (und weniger Monozyten) im Knochenmark. Eine CB2-abhängige Unterdrückung der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Milz wurde in diesem Endotoxämie-Modell beobachtet (Kapellos et al., 2017).

1.1.6 Fragestellung der vorliegenden Publikationsdissertation

Vorarbeiten zeigten, dass das Endocannabinoidsystem in der vaskulären Inflammation und der Atherogenese eine kausale Rolle spielt. Diese Arbeiten legten nahe, dass das Endocannabinoid 2-AG die Migration von Monozyten und Makrophagen steigern und so die vaskuläre Inflammation verstärken könnte. Die vorliegende Promotionsarbeit untersucht daher den Einfluss des 2-AG auf die Atherogenese *in vitro* und *in vivo* und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen. Den durchgeführten Experimenten liegen die folgenden Hypothesen zugrunde:

Erhöhte 2-AG-Plasmaspiegel, welche durch die Gabe des MAGL-Inhibitors JZL184 induziert werden können, erhöhen das Ausmaß der vaskulären Inflammation und die atherosklerotische Plaquelast in ApoE^{-/-}-Mäusen.

Der myeloisch exprimierte CB2-Rezeptor vermittelt die proinflammatorischen und proatherogenen Effekte des 2-AG.

2-AG beeinflusst über den myeloisch exprimierten CB2-Rezeptor die Plaquekomposition (Lipid- und Kollagengehalt, Akkumulation von Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten).

2-AG vermittelt seine proinflammatorischen Effekte über inflammatorische Zytokine, sowie über die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies.

1.2 Material und Methoden

Die Tierversuchsgenehmigung wurde durch das Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen erteilt (Referenznummer 84-02.04.2014.A419).

1.2.1 Genetischer Hintergrund der verwendeten Mäuse, Behandlung mit JZL184/DMSO und atherogene Diät

Zwei Mausmodelle mit einem atherogenen Hintergrund (ApoE^{-/-}; C57BL/6J genetischer Hintergrund; Charles River, Wilmington, USA) und unterschiedlichen zellspezifischen Knockouts des CB2-Rezeptors (CB2-Gen) entweder auf myeloischen Zellen (ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl}) oder Endothelzellen (ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}) wurden unter Verwendung des Cre-Lox-Systems erzeugt. Als Kontrollgruppen für jedes Mausmodell dienten Mäuse ohne den zellspezifischen Knockout (ApoE^{-/-}CB2^{fl/fl}). Bei diesen Tieren handelt es sich um die Geschwistertiere der Knockout-Tiere. Es wurden männliche und weibliche Tiere verwendet.

Im Detail wurden 31 Mäuse mit (ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl}) und 33 Mäuse ohne den myeloischen Knockout des CB2-Rezeptors (ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl}) eingesetzt. In der ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} Gruppe wurden 17 weibliche und 16 männliche Tiere, in der ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl} Gruppe 16 weibliche und 15 männliche Tiere verwendet.

Die *in vivo*-Experimente mit Mäusen mit (ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}) und ohne den endothelialen Knockout des CB2-Rezeptors (ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl}) sind Teil der Promotionsarbeit von Dr. med. Melina Danisch aus unserer Arbeitsgruppe. Die Daten sind Teil der Publikation Avraamidou et al., 2023 und werden zum besseren Verständnis ergänzend dargestellt. In Detail wurden 27 Mäuse mit (ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}) und 32 Mäuse ohne den endothelialen Knockout (ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl}) verwendet. Davon wurden 15 weibliche und 17 männliche Tiere in der ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl} Gruppe, 14 weibliche und 13 männliche Tiere in der ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl} Gruppe eingesetzt.

Zu Versuchsbeginn waren die Mäuse 12 Wochen alt. Die Mäuse wurden über vier Wochen mit einer fettreichen (21 %) und cholesterinreichen (1,25 %) Diät (Ssniff, Soest, Germany) gefüttert. Währenddessen wurde die Hälfte mit intraperitonealen Injektionen von 5 mg/kgKG des MAGL-Inhibitors JZL184 (Selleckchem, München, Deutschland) behandelt (welches den Abbau von 2-AG verhindert) und die andere Hälfte mit dem gleichen Volumen des Vehikels PBS/Kolliphor/DMSO (AppliChem, Darmstadt, Deutschland).

Zusammengefasst wurden in dieser Arbeit insgesamt vier Genotypen untersucht: ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} (myeloidspezifischer CB2-Knockout), ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl} (myeloider CB2-Wildtyp), ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl} (endothelspezifischer CB2-Knockout) und ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl} (endothelialer CB2-Wildtyp). Diese Genotypen wurden jeweils mit und ohne pharmakologische Behandlung mit JZL184 (MAGL-Inhibitor; erhöhter 2-AG-Spiegel) verglichen. Daraus ergeben sich insgesamt acht experimentelle Gruppen. Die folgende Tabelle bietet einen Überblick über diese acht Gruppen:

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten vier Genotypen und die daraus resultierenden acht experimentellen Gruppen.

	Behandlung mit DMSO	Behandlung mit JZL184
ApoE ^{-/-} LysM ^{cre} CB2 ^{fl/fl} (myeloidspezifischer CB2-Knockout)	Kontrolle	Erhöhter 2-AG Spiegel
ApoE ^{-/-} LysM ^{wt} CB2 ^{fl/fl} (myeloider CB2-Wildtyp)	Kontrolle	Erhöhter 2-AG Spiegel
ApoE ^{-/-} Tie2 ^{cre} CB2 ^{fl/fl} (endothelspezifischer CB2-Knockout)	Kontrolle	Erhöhter 2-AG Spiegel
ApoE ^{-/-} Tie2 ^{wt} CB2 ^{fl/fl} (endothelialer CB2-Wildtyp)	Kontrolle	Erhöhter 2-AG Spiegel

Am Ende der vierwöchigen Behandlungsperiode wurden die Mäuse unter 5 % (v/v) Isoflurananästhesie (Abbott Laboratories, Chicago, USA) durch zervikale Dislokation geopfert und unter anderem das Herz, die A. thoracalis, A. abdominalis und Blut extrahiert.

1.2.2 Histologische Charakterisierung atherosklerotischer Plaques auf Höhe der Aortenklappe

Nach der Entnahme wurde das Herz in Gefriereinbettmedium (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) eingebettet und bei -80 °C schockgefroren. Auf Höhe der Aortenklappe wurden mit einem Kryostaten (Leica CM 1900, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) 8 µm dicke Schnitte angefertigt und auf insgesamt zehn Objektträger überführt, sodass benachbarte Schnitte auf demselben Objektträger einem Abstand von 80 µm im Gewebe entsprachen.

Zur Bestimmung des atherosklerotischen Plaquevolumens wurden die Aortenklappenschnitte mit Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte nach dem Trocknen mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit 60 % (v/v) Isopropanol dehydriert, bevor sie mit einer Oil-Red-O-Lösung gefärbt und anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt wurden.

Zur Plaquecharakterisierung und zur Quantifizierung der Leukozytenextravasation in die atheromatösen Plaques wurden Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten mittels immunfluoreszenter Färbung dargestellt. Monozyten und Makrophagen wurden durch eine Immunfluoreszenzfärbung gegen CD68 detektiert. Hierfür wurden die Schnitte über Nacht mit einem α -CD68-Ratten-IgG2a-Antikörper (1:200, SM1550PS, Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland) inkubiert, anschließend gewaschen und mit dem Sekundärantikörper Cy3 AffiniPure Donkey anti-Rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) inkubiert.

Zur Quantifizierung der Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in den Plaques wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Ly6G durchgeführt. Hierfür wurde der primäre Ly6G-Antikörper (1:100, BD551459, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) sowie der Cy3-red Donkey anti-Rat-Sekundärantikörper verwendet.

Der Kollagengehalt wurde mittels Picosiriusrot-Färbung (Direct Red 80, Sigma-Aldrich) bestimmt. Dazu wurden die Schnitte in Ethanol absteigender Konzentrationen fixiert und in deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt und erneut gewaschen. Die Kollagenfasern wurden anschließend 15 Minuten lang mit Direct Red gefärbt. Abschließend wurden die Schnitte in Ethanol und Xylol fixiert und mit Entellan (Sigma-Aldrich) eingedeckelt.

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) unter Verwendung der Axiovision 4.8 Software (Carl Zeiss Jena GmbH) angefertigt. Für die Plaqueanalyse wurden ausschließlich Schnitte berücksichtigt, die alle drei Taschen der Aortenklappe enthielten. Pro Herz wurden durchschnittlich vier Schnitte analysiert. Die Kollagenmenge innerhalb der atherosklerotischen Plaques (Querschnittsfläche) wurde mittels Bildanalyse mit der Zen Blue Pro Mikroskopiesoftware (Carl Zeiss Jena GmbH) quantifiziert.

1.2.3 Messung der L-012-induzierten Chemilumineszenz der Aorta thoracalis

Um die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Gewebe zu erfassen, wurde an den entnommenen Abschnitten der Aorta thoracalis die durch L-012 induzierte Chemilumineszenz als indirektes Maß für die ROS-Produktion gemessen. Die präparierten Abschnitte der kaudalen thorakalen Aorta wurden mit 100 µl einer 100 µM L-012-Lösung (8-Amino-5-chloro-7-phenyl-pyrido[3,4-d]pyridazin-1,4(2H,3H)dion) versetzt. Die daraus resultierende Chemilumineszenz wurde 5 und 10 Minuten nach der Entnahme mit dem Lumat LB 9507 Röhren-Luminometer (Berthold Technologies GmbH, Deutschland) erfasst. Die Hintergrundchemilumineszenz wurde subtrahiert und alle Messwerte auf das Gewicht der jeweiligen Gewebeprobe normalisiert.

1.2.4 Messung der IL-1β- und IL-6-Spiegel in murinen Plasmaproben

Die Konzentration der Zytokine IL-1β und IL-6 in murinen Plasmaproben wurde mithilfe eines ProcartaPlex-Multiplex-Assays (PPX-02-MX323DE; Thermo Fisher Scientific, Wien, Österreich) bestimmt. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Zunächst wurden 50 µl magnetischer Beads in jedes Well einer 96-Well-Platte eingebracht, durch eine Magnetplatte fixiert und mit Waschpuffer gewaschen. Aus dem Antigenstandard wurde eine Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve hergestellt. Die Plasmaproben wurden zentrifugiert (10.000 × g, 10 Minuten, 4 °C). Anschließend wurden 25 µl jeder Probe in 25 µl universellem Assaypuffer verdünnt und auf die Wells verteilt. Die Platte wurde über Nacht inkubiert (4 °C, Schütteln bei 500 rpm). Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte eine Inkubation mit dem Detektionsantikörper-Mix für 30 Minuten (Schütteln bei 500 rpm, Raumtemperatur). Nach erneutem zweimaligem Waschen wurde Streptavidin-PE hinzugefügt, über 30 Minuten inkubiert (Schütteln bei 500 rpm, Raumtemperatur) und abschließend zweimal gewaschen. Nach Entfernung des Überstands wurden 120 µl Lesepuffer in jedes Well gegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubation (Schütteln, 500 rpm, Raumtemperatur) wurden die Daten mit dem Luminex™ FLEXMAP 3D™ Instrument System (APX1342, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) erfasst.

Mittels massenspektrometrischer Analyse (LC-MRM) wurde die Endocannabinoidkonzentration im Blut und in der Aorta abdominalis quantifiziert. Dies

erfolgte durch das Institut für Physiologische Chemie der Universität Mainz unter der Leitung von Professor Dr. B. Lutz.

1.2.5 Nachweis reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies in THP-1-Zellen nach Behandlung mit 2-AG

Die durch 2-AG-induzierte Produktion von ROS und RNS wurde *in vitro* mithilfe humaner Monozyten der THP-1-Zelllinie (CLS Cell Lines Services GmbH, Deutschland) und des Cellular ROS/Superoxide Detection Assay Kits (ab139476; Abcam, Cambridge, UK) untersucht.

Die THP-1-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in RPMI-1640-Medium (1x) mit L-Alanin-L-Glutamin (GlutaMax-Supplement) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), ergänzt mit 10 % FBS sowie 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Experimente mit Zelldichten von etwa 1 × 10⁶ Zellen/ml durchgeführt.

Um die durch 2-AG-induzierte Produktion von ROS und RNS zu bestimmen, wurden 100 µl der THP-1-Zellsuspension in jedes Well einer schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte mit transparentem Boden (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) pipettiert. Eine Gruppe von acht Wells (acht technische Replikate, wie vom Hersteller empfohlen), die Kontrollgruppe, erhielt zusätzlich 100 µl des Antioxidans N-Acetyl-L-Cystein [2,5 mM]. Nach einer Inkubationsphase von einer Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Platte zentrifugiert (400 × g, 5 Minuten). Der Überstand wurde durch Umkippen der Platte über einem Blatt Papier entfernt. Anschließend wurden alle Wells mit 200 µl 1x-Puffer gespült; die Platte wurde erneut zentrifugiert (400 × g, 5 Minuten) und der Überstand wie oben aufgeführt entfernt. Anschließend wurden 100µl ROS/Superoxid-Nachweismedium in jedes Well pipettiert. Dies wurde hergestellt, indem das Oxidativ-Stress-Nachweisreagenz (grün) und das Superoxid-Nachweisreagenz (orange) aus dem Cellular ROS/Superoxide Detection Assay Kit (ab139476; Abcam, Cambridge, UK) jeweils mit 60 µl 99,8 % (v/v) wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (DMF; Merck, Darmstadt, Deutschland) rekonstituiert wurden. Anschließend wurden jeweils 4 µl der beiden Fluoreszenzreagenzien zu 10 ml RPMI-Medium gegeben. Im nächsten Schritt wurden die jeweiligen experimentellen Zusätze (2-AG [1 µM], 2-AG [5 µM], 2-AG [10 µM], 2-AG

[10µM] + CB2-Antagonist AM630 [5 µM]) in entsprechenden Gruppen von 8 Wells (jeweils acht Replikate) gegeben. Die Kontrollgruppe, die vorab mit N-Acetyl-L-Cystein vorbehandelt worden war, erhielt in diesem Schritt RPMI-Medium. Pyocyanin, ein bekannter ROS-Induktor, wurde ebenfalls nach Rekonstitution in DMF eingesetzt.

Die Platte wurde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, und die Fluoreszenz wurde nach 1, 4, 24 und 48 Stunden mit dem Infinite M200 Mikroplatten-Reader (Tecan, Männedorf, Schweiz) erfasst. Der 490/525 nm Ex/Em-Filter wurde zur Detektion von ROS (Wasserstoffperoxid H₂O₂, Peroxynitrit (ONOO⁻), Hydroxylradikale (·OH), Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxyradikal (ROO·)) verwendet, während der 550/620 nm Ex/Em-Filter zur Erfassung von Superoxid (O₂⁻) diente.

1.2.6 Bestimmung der MPO-Freisetzung in Überständen von THP-1-Zellen nach Behandlung mit 2-AG

Um die Freisetzung von MPO nach Stimulation mit 2-AG sowie der Kombination aus 2-AG mit dem selektiven CB2-Rezeptor-Antagonisten AM630 zu bestimmen, wurden THP-1-Zellen mit RPMI-Medium, 2-AG [1 µM], 2-AG [10 µM] sowie 2-AG [10 µM] + AM630 [5 µM] behandelt. Die Platten wurden 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten zentrifugiert (2000 × g, 10 Minuten) und die Überstände gesammelt und, falls erforderlich, bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde die MPO-Konzentration in den Überständen mittels ELISA unter Verwendung des Human-Myeloperoxidase-Kits ab195212 (Abcam, Cambridge, UK) bestimmt.

1.2.7 Quantifizierung der NOX1-, NOX2-, NOX4- und NOX5-mRNA in THP-1-Zellen nach Behandlung mit 2-AG

Um die Transkription von NOX1, NOX2 (CYBA und CYBB-Untereinheiten), NOX4 und NOX5 nach 2-AG Behandlung zu quantifizieren wurden THP-1-Zellen mit RPMI-Medium oder 2-AG [1 µM] behandelt und anschließend vier Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Platten zentrifugiert (1500 × g, 8 Minuten) und die Überstände entfernt. Zur Lyse der Zellen wurde Trizol (Thermo Fisher Scientific) eingesetzt. Für die RNA-Isolation wurde Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben, und die Proben wurden zentrifugiert (18.000 × g, 4 °C, 15 Minuten). Die obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt,

das Isopropanol zur RNA-Fällung enthielt. Nach der Fällung wurde die RNA unter Verwendung von Ethanol gereinigt, anschließend getrocknet und schließlich in RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde mit einem NanoDrop2000-Spektrophotometer bestimmt. Aus der RNA wurde mittels Omniscript RT-Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) cDNA synthetisiert; hierfür erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Die qPCR wurde anschließend unter Verwendung des TaqMan Gene Expression Master Mix, der entsprechenden Sonden für NOX1 (Hs01071088_m1), NOX2 (Cytochrome b-245 light chain (CYBA) (Hs03044361_m1), NOX2 Cytochrome b-245 heavy chain (CYBB) (Hs00166163_m1), NOX4 (Hs01379108_m1) und NOX5 (Hs00225846_m1) sowie eines 7500 Fast Real-Time PCR Systems und der 7500 Software v2.0.6 (alle Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

1.2.8 Messung der IL-1 β -Freisetzung in PBMC-Überständen nach Co-Stimulation mit 2-AG

Die durch 2-AG-induzierte Freisetzung von IL-1 β in vitro wurde mithilfe humaner peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs), welche aus venösem Blut von gesunden Probanden isoliert wurden, untersucht. Das peripherenvenöse Blut wurde in Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin-(CPDA)-Puffer entnommen. Die Zelltrennung erfolgte mittels Ficoll-Dichtegradient und Zentrifugation bei 800 \times g für 8 Minuten. PBMCs wurden in RPMI-1640 resuspendiert, welches mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin supplementiert war und anschließend in einer 96-Well-Platte bei einer Endkonzentration von 1 \times 10⁶ Zellen/300 μ l ausgesät. Danach erfolgte eine Behandlung der Zellen mit DMSO, 2-AG [1 μ M] oder 2-AG [10 μ M] mit anschließender Inkubation für 4 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen mit LPS (0,002 ng/ml, 0,02 ng/ml oder 0,2 ng/ml) co-stimuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (10 Minuten, 2000 \times g, 4 °C) wurden die Überstände gesammelt. 100 μ l der Überstände wurden auf eine vorbeschichtete Platte (R&D Systems, Minneapolis, USA) pipettiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Nachweisantikörper zugegeben. Nach Inkubation über 1 Stunde wurden die Wells erneut gewaschen und für 1 Stunde mit HRP-Streptavidin inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurde die Substratlösung zugegeben, und die Reaktion nach 20 Minuten

mit Stopplösung beendet. Die optische Dichte wurde anschließend mit dem Tecan M200 ELISA-Reader bei 450 nm bestimmt.

1.2.9 Messung der Sekretion von MMP-1 und MMP-9 in Überständen humaner Monozyten nach Behandlung mit 2-AG

Die durch 2-AG induzierte Sekretion von Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) und Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) wurde an CD14⁺-Monozyten untersucht, die aus PBMCs mittels positiver Selektion isoliert wurden. Die Selektion erfolgte unter Verwendung magnetischer Kügelchen (CD14 MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Anschließend wurden die Zellen in einer 12-Well-Platte bei einer Endkonzentration von 6×10^5 Zellen pro Well ausgesät und entweder mit 2-AG [1 μ M] oder einer DMSO-Kontrolle stimuliert. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Überstände gesammelt. Die Konzentrationen von MMP-1 und MMP-9 wurden mithilfe von R-Plex-Assays (Meso Scale Diagnostics, Rockville, Maryland, USA) wie folgt bestimmt: Vorbeschichtete Streptavidin-Platten wurden mit 25 μ l biotinyliertem Capture-Antikörper beschichtet und 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden 25 μ l Assay-Diluent in jedes Well gegeben. Anschließend wurden sowohl der Kalibratorstandard als auch die Proben auf die Wells verteilt. Nach einer weiteren 1-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten gewaschen und 50 μ l des Detektionsantikörpers zugegeben. Abschließend wurden nach einer weiteren 1-stündigen Inkubation und drei weiteren Waschschriften 150 μ l Reading Buffer in jedes Well pipettiert. Die Platten wurden mit dem MSD-Gerät (Meso Scale Diagnostics) ausgelesen.

1.2.10 Statistische Auswertungen

Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Sie wurden mit Microsoft Excel sowie der GraphPad-Prism-Software (GraphPad Software, San Diego, USA) analysiert. Für den Vergleich kontinuierlicher und normalverteilter Variablen zwischen zwei Gruppen wurde ein ungepaarter zweiseitiger t-Test angewendet. Für den Vergleich von drei oder mehr Gruppen und normalverteilten Variablen wurde eine einfaktorielle ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Bei fehlender Gaußscher Verteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test für den Vergleich zwischen zwei Gruppen und

Kruskal-Wallis-Test mit Mehrfachvergleichen nach Dunn für nichtparametrische Daten durchgeführt. p-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

1.3 Ergebnisse

Bei den unter 1.3.1 und 1.3.3 aufgeführten Ergebnissen von Mäusen mit (ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}) und ohne den endothelialen Knockout des CB2-Rezeptors (ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl}) handelt es sich um Daten aus der Promotionsarbeit von Dr. med. Melina Danisch aus unserer Arbeitsgruppe. Diese Daten sind Teil der Publikation Avraamidou et al., 2023, und werden zum besseren Verständnis des Gesamtdatensatzes hier ergänzend dargestellt.

1.3.1 Anstieg des 2-AG-Plasmaspiegels nach Behandlung mit JZL184

Durch intraperitoneale Injektionen von JZL184 wurde die Monoacylglycerol-Lipase (MAGL), welche hauptsächlich für die Hydrolyse, d.h. den Abbau des Endocannabinoids 2-AG, verantwortlich ist, gehemmt. Die Messung des 2-AG Plasmaspiegels bestätigte diesen Effekt bei den mit JZL184 behandelten Tieren im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrolltieren. Die mit JZL184 behandelten Tiergruppen zeigten einen signifikant erhöhten 2-AG-Plasmaspiegel im Vergleich zu den DMSO-behandelten Tieren. Dieser Effekt war unabhängig vom Vorhandensein des myeloischen oder endothelialen CB2-Rezeptors. Die Konzentrationen von Arachidonsäure und PEA wurden durch die Behandlung nicht beeinflusst. Die folgenden 2-AG Plasmakonzentrationen wurden in den einzelnen Tiergruppen gemessen:

Die 2-AG-Konzentration betrug bei Mäusen mit fehlendem myeloischen CB2-Rezeptor (ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl}) $59,4 \pm 7,0$ pmol/ml nach Behandlung mit JZL184 vs. $16,9 \pm 2,2$ pmol/ml nach Behandlung mit DMSO (n = 16 – 17; p < 0,0001). In der Wildtyp-Kontrolle (ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl}) konnte derselbe Effekt beobachtet werden. Die 2-AG-Konzentration betrug $58,0 \pm 5,2$ pmol/ml in der mit JZL184 behandelten Gruppe und $18,5 \pm 3,0$ pmol/ml in der mit DMSO behandelten Gruppe (n = 15 – 16; p < 0,0001). Die 2-AG-Plasmakonzentration stieg ebenfalls bei den mit JZL184 behandelten Mäusen ohne den endothelialen CB2-Rezeptor (ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}) und deren Kontrollgruppe (ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl}). Die 2-AG-Konzentration betrug $73,1 \pm 6,4$ pmol/ml bei ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl} Mäusen behandelt mit JZL184 vs. $33,5 \pm 2,9$ pmol/ml (DMSO; n = 13 – 14; p < 0,0001)

sowie $71,4 \pm 5,1$ pmol/ml (ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl} behandelt mit JZL184) vs. $42,7 \pm 3,3$ pmol/ml (DMSO; n = 14 – 17; p < 0,0001).

Nicht nur im Plasma, sondern auch im Aortengewebe von ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl} Mäusen und deren Kontrollgruppe konnte nach Behandlung mit JZL184 eine erhöhte 2-AG-Konzentration nachgewiesen werden ($239,5 \pm 36,2$ pmol/ml JZL184, vs. $61,0 \pm 14,1$ pmol/ml DMSO; n = 13 – 14; p = 0,0001 ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}) ($173,2 \pm 20,0$ pmol/ml, JZL184 vs. $68,9 \pm 13,2$ pmol/ml, DMSO; n = 15 – 17; p = 0,0002; ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl}).

1.3.2 Die 2-AG-induzierte Atherogenese wird in Mäusen ohne myeloische CB2-Rezeptor-Expression aufgehoben

ApoE-Knockout-Mäuse mit erhöhtem 2-AG-Spiegel (ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl}, Behandlung mit JZL184) verfügten über eine deutlich höhere atherosklerotische Plaquelast im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Tieren ($39,6 \pm 2,1$ % JZL184 vs. $32,6 \pm 2,4$ % DMSO; n = 14 - 15; p < 0,05 ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl}). Bei Mäusen mit fehlendem myeloischen CB2-Rezeptor (ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl}) ergab sich hingegen kein signifikanter Unterschied der Plaquelast zwischen den JZL184- und DMSO-behandelten Tieren ($35,0 \pm 1,9$ % JZL184 vs. $34,0 \pm 2,5$ % DMSO; n = 14 - 16; p = 0,75) (Abb. 1a, d).

Diese Daten zeigen eine erhöhte Plaquelast in JZL184-behandelten Mäusen mit intaktem myeloischen CB2-Rezeptor, während dieser Effekt bei Mäusen ohne myeloischen CB2-Rezeptor nicht nachweisbar war.

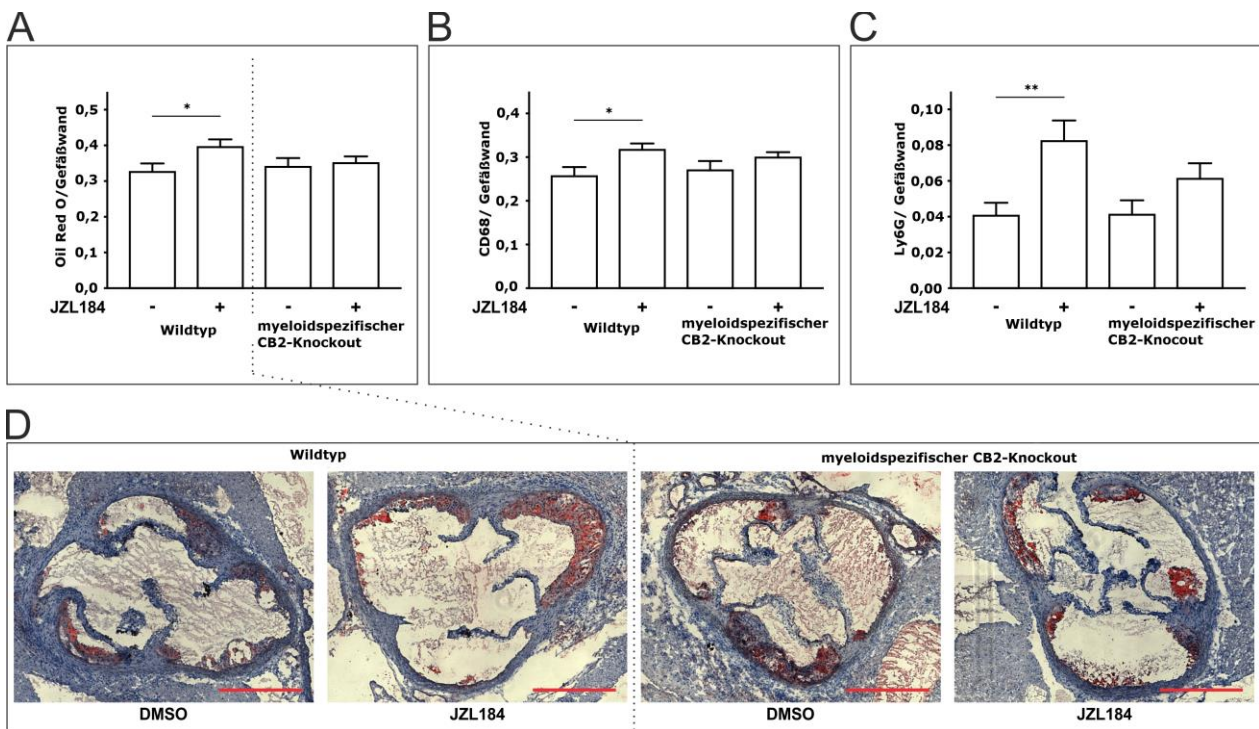


Abb. 1: Färbung von Aortenklappenabschnitten bei Mäusen mit myeloidspezifischem Knockout des CB2-Rezeptors (Myeloid CB2 KO) und den entsprechenden Wildtypkontrollen nach Behandlung mit JZL184 (irreversibler Inhibitor der MAGL, erhöhter 2-AG Spiegel) oder DMSO (Kontrolle). Modifiziert nach Avraamidou et al. (2023), Figure 1. (A, D) Färbung mit Oil Red O zur Quantifizierung des Plaquevolumens (B) Immunhistochemische Färbung zur Quantifizierung der Extravasation von Monozyten/Makrophagen (CD68) (C) und Neutrophilen (Ly6G). Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt; ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl} Behandlung mit DMSO, n=15; ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl} Behandlung mit JZL184, n = 14; ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} Behandlung mit DMSO, n = 16, ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} Behandlung mit JZL184, n = 14; * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01, ermittelt mittels t-Test; CB2 KO: Cannabinoid-Rezeptor-2-Knockout; CD68: Cluster of Differentiation 68; DMSO, Dimethylsulfoxid; JZL184: irreversibler Inhibitor der Monoacylglycerol-Lipase (MAGL); Ly6G: Lymphozytenantigen-6-Komplex, Locus G

Darüber hinaus führte die Behandlung mit JZL184 zur verstärkten Akkumulation von Monozyten und Makrophagen in der Gefäßwand ($32,3 \pm 2,2$ % JZL184 vs. $24,5 \pm 2,4$ % DMSO; n = 13; p < 0,05) bei Cre-negativen Mäusen (ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl}). Dieser Effekt konnte bei Mäusen mit fehlendem myeloischen CB2-Rezeptor (ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl}) nicht beobachtet werden ($29,9 \pm 1,2$ % JZL184 vs. $27,0 \pm 2,1$ % DMSO; n = 14 - 17; p = 0,27) (Abb. 2).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Akkumulation von Monozyten und Makrophagen in der Gefäßwand nur in JZL184-behandelten Mäusen mit intaktem myeloischem CB2-Rezeptor erhöht war, während dieser Effekt bei Mäusen ohne myeloischen CB2-Rezeptor ausblieb.

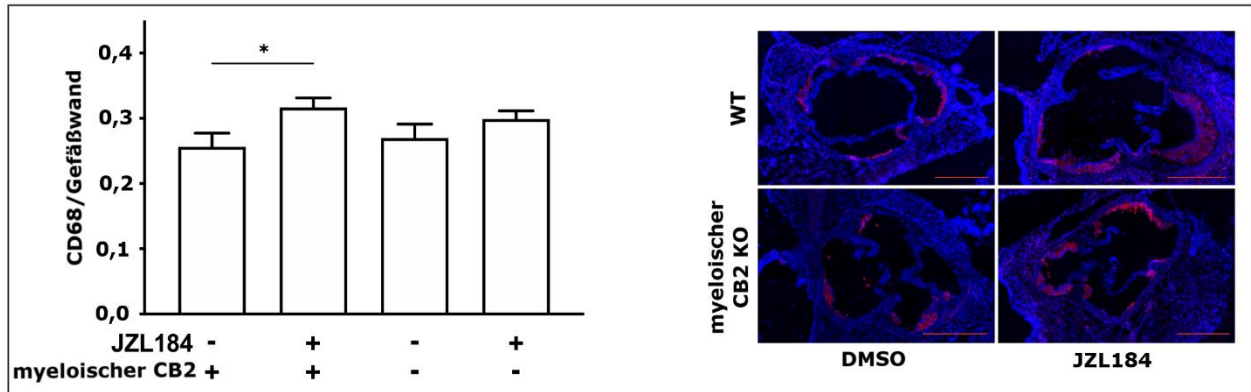


Abb. 2: Immunhistochemische Färbung mit CD68 zur Quantifizierung der Extravasation von Monozyten/Makrophagen in Aortenklappenabschnitten bei Mäusen mit und ohne myeloidspezifischen CB2-Rezeptor nach Behandlung mit JZL184 (irreversibler Inhibitor der MAGL, erhöhter 2-AG Spiegel) oder DMSO (Kontrolle). Modifiziert nach Avraamidou et al. (2023), Supplementary Figure 1. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt; ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl} Behandlung mit DMSO, n = 15; ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl} Behandlung mit JZL184, n = 16; ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} Behandlung mit DMSO, n = 17; ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} Behandlung mit JZL184, n = 14; * p \leq 0,05, ermittelt mittels t-Test; CB2: Cannabinoid-Rezeptor-2; CB2 KO: Cannabinoid-Rezeptor-2-Knockout; CD68: Cluster of Differentiation 68; DMSO: Dimethylsulfoxid; JZL184: irreversibler Inhibitor der Monoacylglycerol-Lipase (MAGL); WT: Wildtyp

Gleichermaßen konnte mittels Ly6G-Färbung eine vermehrte Akkumulation von neutrophilen Granulozyten nach Behandlung mit JZL184 bei Mäusen mit erhaltenem myeloischen CB2-Rezeptor (ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl}) festgestellt werden ($8,2 \pm 1,2$ % JZL184 vs. $4,1 \pm 0,7$ % DMSO; n = 12 - 16; p < 0,01). Bei Mäusen mit fehlendem myeloischen CB2-Rezeptor wurde der Effekt abgeschwächt ($6,1 \pm 0,9$ % JZL184 vs. $4,1 \pm 0,8$ % DMSO; n = 13 - 17; p = 0,11) (Abb. 3).

Die Ergebnisse zeigen, dass nur JZL184-behandelte Mäuse mit intaktem myeloischem CB2-Rezeptor eine erhöhte Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der Gefäßwand aufwiesen, während dieser Effekt bei Mäusen ohne myeloischen CB2-Rezeptor ausblieb.

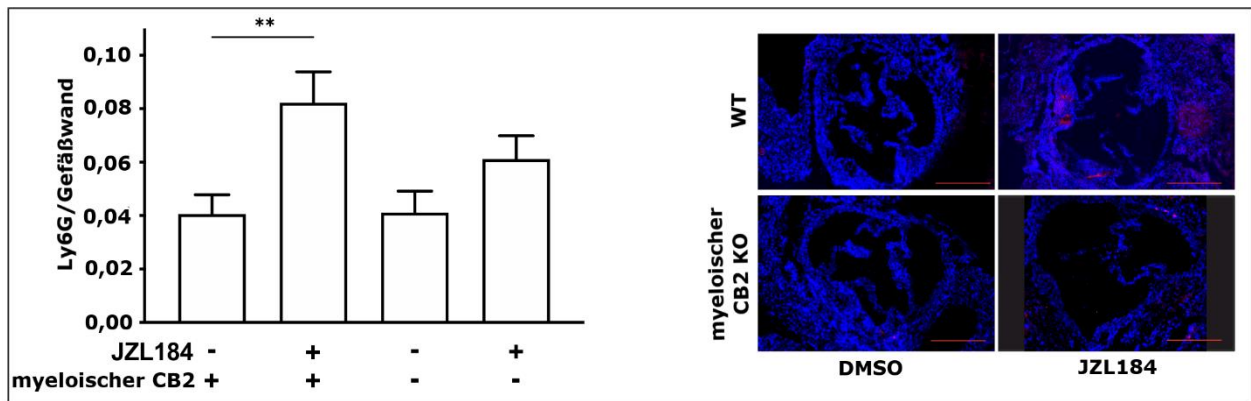


Abb. 3: Immunhistochemische Färbung mit Ly6G zur Quantifizierung der Extravasation von neutrophilen Granulozyten in Aortenklappenabschnitten bei Mäusen mit und ohne myeloidspezifischen CB2-Rezeptor nach Behandlung mit JZL184 (irreversibler Inhibitor der MAGL, erhöhter 2-AG-Spiegel) oder DMSO (Kontrolle). Modifiziert nach Avraamidou et al. (2023), Supplementary Figure 1b. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt; ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl} Behandlung mit DMSO, n = 12; ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl} Behandlung mit JZL184, n = 16; ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} Behandlung mit DMSO, n = 17, ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} Behandlung mit JZL184, n = 12; ** p \leq 0.01, ermittelt mittels t-Test; CB2: Cannabinoid-Rezeptor-2; CB2 KO: Cannabinoid-Rezeptor-2-Knockout; DMSO: Dimethylsulfoxid; JZL184: irreversibler Inhibitor der Monoacylglycerol-Lipase (MAGL); Ly6G: Lymphozytenantigen-6-Komplex, Locus G; WT: Wildtyp

Der Kollagengehalt der atherosklerotischen Plaques wurde mittels der Picro-Siriusrot-Färbung quantifiziert. Interessanterweise führte die Behandlung von Mäusen, die den myeloiden CB2-Rezeptor exprimierten (ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl}) mit JZL184 zu einem Anstieg des Kollagengehalts innerhalb der atherosklerotischen Plaques ($2,75 \pm 0,51$ % JZL184 vs. $1,10 \pm 0,19$ % DMSO; p < 0,01; n = 11 - 12). In Mäusen mit fehlendem myeloischen CB2-Rezeptor (ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl}) war kein Unterschied des Kollagengehalts nachzuweisen ($1,41 \pm 0,22$ % JZL184 vs. $1,55 \pm 0,32$ % DMSO; p > 0,99; n = 14) (Abb. 4).

Damit war der Kollagengehalt der Gefäßwand ausschließlich in JZL184-behandelten Mäusen mit funktionellem myeloischen CB2-Rezeptor erhöht, während dieser Effekt in Mäusen ohne myeloischen CB2-Rezeptor ausblieb.

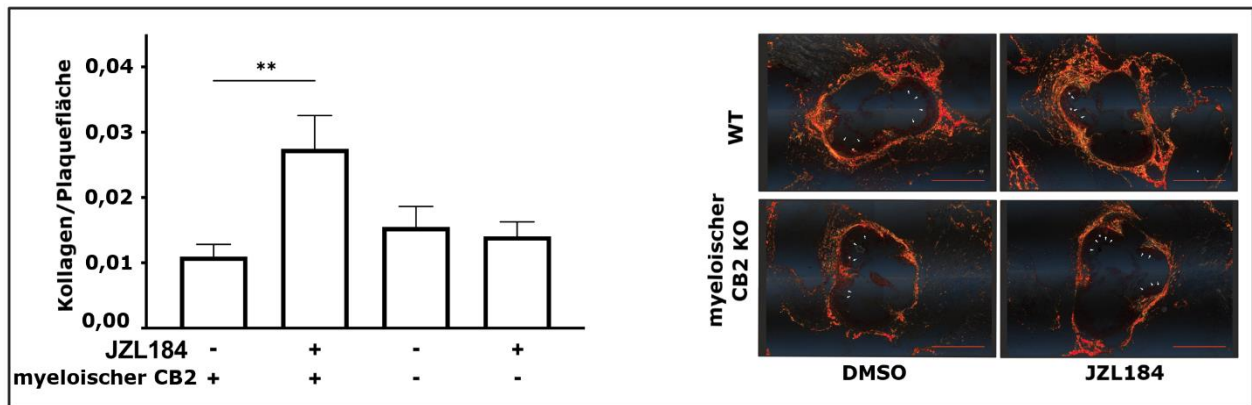


Abb. 4: Picro-Siriusrot-Färbung zur Quantifizierung des Kollagengehalts in Aortenklappenabschnitten bei Mäusen mit und ohne myeloidspezifischen CB2-Rezeptor nach Behandlung mit JZL184 (irreversibler Inhibitor der MAGL, erhöhter 2-AG-Spiegel) oder DMSO (Kontrolle). Modifiziert nach Avraamidou et al. (2023), Supplementary Figure 1c. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt; ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl} Behandlung mit DMSO, n = 11; ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl} Behandlung mit JZL184, n = 12; ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} Behandlung mit DMSO, n = 14; ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} Behandlung mit JZL184, n = 14; ** p \leq 0,01, ermittelt mittels t-Test; CB2: Cannabinoid-Rezeptor-2; CB2 KO: Cannabinoid-Rezeptor-2-Knockout; DMSO: Dimethylsulfoxid; JZL184: irreversibler Inhibitor der Monoacylglycerol-Lipase (MAGL)

1.3.3 Die 2-AG-induzierte Atherogenese bei ApoE-Knockout-Mäusen war von der endothelialen CB2-Expression nicht beeinflusst

Wie durch die Oil Red O-Färbung quantifiziert, führte die Behandlung von ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl}-Mäusen mit JZL184 zu einer signifikanten Erhöhung der atherosklerotischen Plaquebelastung ($29,5 \pm 3,3$ % JZL184 vs. $20,7 \pm 2,1$ % DMSO; p < 0,05; n = 14). Bei Mäusen mit fehlender Expression des CB2-Rezeptors (ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}) war ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Plaquebelastung nach Behandlung mit JZL184 zu beobachten ($37,1 \pm 3,1$ % JZL184 vs. $20,9 \pm 2,6$ % DMSO; n = 10 - 12; p < 0,001) (Figure 2a,d in Avraamidou et al., 2023). Diese Daten zeigen, dass erhöhte 2-AG-Spiegel die Plaquebelastung unabhängig vom Vorhandensein des endothelzellspezifischen CB2-Rezeptors erhöhen.

Darüber hinaus führte die Behandlung mit JZL184 zur verstärkten Akkumulation von Monozyten und Makrophagen in der Gefäßwand von cre-negativen (ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl}) Mäusen ($32,3 \pm 2,2$ % JZL184 vs. $24,5 \pm 2,4$ % DMSO; n = 13; p < 0,05). Bei cre-

positiven (ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}) Mäusen konnte kein signifikanter Anstieg der Akkumulation nach der Behandlung mit JZL184 festgestellt werden (35,3 ± 1,8 % JZL184 vs. 29,5 ± 2,8 % DMSO; n = 9 - 12; p = 0,13). Die Ergebnisse zeigen, dass die Akkumulation von Monozyten und Makrophagen in der Gefäßwand ausschließlich in JZL184-behandelten Mäusen mit intaktem endothelzellspezifischem CB2-Rezeptor erhöht war, während dieser Effekt bei Mäusen ohne endothelzellspezifischen CB2-Rezeptor ausblieb.

Gleichermaßen konnte eine vermehrte Akkumulation von neutrophilen Granulozyten nach Behandlung mit JZL184 bei Mäusen mit erhaltenem endothelzellspezifischem CB2-Rezeptor (ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl}) festgestellt werden (8,1 ± 1,4 % JZL184 vs. 3,9 ± 0,7 % DMSO; n = 13 - 14; p < 0,05). Bei Mäusen mit fehlendem endothelzellspezifischem CB2-Rezeptor konnte kein signifikanter Unterschied nach Behandlung mit JZL184 festgestellt werden (8,3 ± 1,9 % JZL184 vs. 4,8 ± 0,8 % DMSO; n = 10 - 12; p = 0,095) (Supplementary Figure 1d,e in Avraamidou et al., 2023).

1.3.4 ROS-Produktion in der Aorta thoracalis *ex vivo*

Die L-012-induzierte Chemilumineszenz der thorakalen Aorta wurde *ex vivo* als Marker für die Bildung von Superoxid-dominierten reaktiven Sauerstoffspezies (v. a. Superoxid (O₂⁻) und Peroxynitrit (ONOO⁻)) in der Gefäßwand verwendet.

Bei Mäusen mit myeloischem CB2-Rezeptor (ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl}), welche mit JZL184 behandelt wurden, wurden die höchsten Lumineszenzwerte gemessen. Diese erreichte im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Mäusen keine Signifikanz (JZL184: 181,7 ± 40,1 RLU/s vs. DMSO: 118,7 ± 32,9 RLU/s; n = 15 - 16; p > 0,99). Die Chemilumineszenz der ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} Tiere wurde wie folgt gemessen: JZL184: 117,7 ± 25,7 RLU/s vs. DMSO: 93,9 ± 32,0 RLU/s; n = 15 - 16 (p > 0,99) (Abb. 5).

Damit zeigte sich in keiner der untersuchten Gruppen ein signifikanter Unterschied der ROS-Produktion in der Aorta thoracalis. Die höchsten Lumineszenzwerte wurden zwar bei JZL184-behandelten Mäusen mit vorhandenem myeloischem CB2-Rezeptor beobachtet, diese erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Um den Einfluss des myeloidspezifischen CB2-Rezeptors auf die Produktion von ROS/RNS weiter zu untersuchen, wurden ergänzend Experimente *in vitro* durchgeführt.

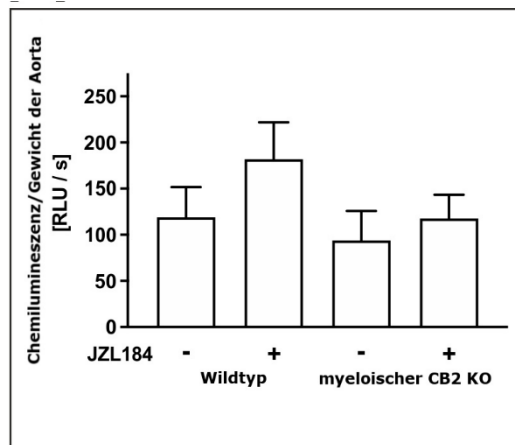


Abb. 5: Bestimmung der L-012-induzierten Chemilumineszenz der extrahierten Aorta thoracalis als Hinweis auf die ROS-Produktion bei Mäusen mit myeloidspezifischem Knockout des CB2-Rezeptors (Myeloid CB2 KO) und den entsprechenden Wildtypkontrollen nach Behandlung mit JZL184 (irreversibler Inhibitor der MAGL, erhöhter 2-AG-Spiegel) oder DMSO (Kontrolle). Modifiziert nach Avraamidou et al. (2023), Figure 3a. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt; ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl} Behandlung mit DMSO, n = 15; ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl} Behandlung mit JZL184, n = 16; ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} Behandlung mit DMSO, n:15, ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} Behandlung mit JZL184, n = 16; n = 11-14; ermittelt mittels Kruskal-Wallis-Test mit Mehrfachvergleichen nach Dunn; CB2 KO: Cannabinoid-Rezeptor-2-Knockout; JZL184: irreversibler Inhibitor der Monoacylglycerol-Lipase (MAGL); RLU/s: relative Lichteinheiten pro Sekunde

1.3.5 2-AG [10 μ M] erhöht die ROS- und RNS-Produktion *in vitro*

Die *in vivo* beobachtete numerische Differenz der Chemilumineszenz von mit JZL184 behandelten CB2-Wildtyp-Mäusen wurde weiter *in vitro* untersucht. THP-1-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von 2-AG stimuliert. Ferner erfolgte eine Co-Stimulation mit dem inversen CB2-Rezeptoragonisten AM630.

Die Stimulation von THP-1-Zellen verursachte einen dosisabhängigen Anstieg der Superoxid- und RNS-Produktion eine Stunde nach Stimulation (2-AG [10 μ M]: $1,09 \pm 0,019$, n = 17, p < 0,01; 2-AG [5 μ M]: $1,025 \pm 0,010$, n = 17, p < 0,05) (Abb. 6). Co-Stimulation mit AM630 verursachte in den ersten 48 Stunden nach Stimulation keinen signifikanten Unterschied der ROS/RNS-Produktion (2-AG [10 μ M]: $4,43 \pm 1,05$ vs. 2-AG [10 μ M] + AM630: $4,20 \pm 1,03$; n = 13; p > 0,99).

Diese Daten deuten darauf hin, dass erhöhte 2-AG-Konzentrationen [10 μM] die ROS/RNS-Produktion im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen signifikant steigern, während der inverse CB2-Rezeptoragonist AM630 keinen relevanten Einfluss auf diesen Effekt hat.

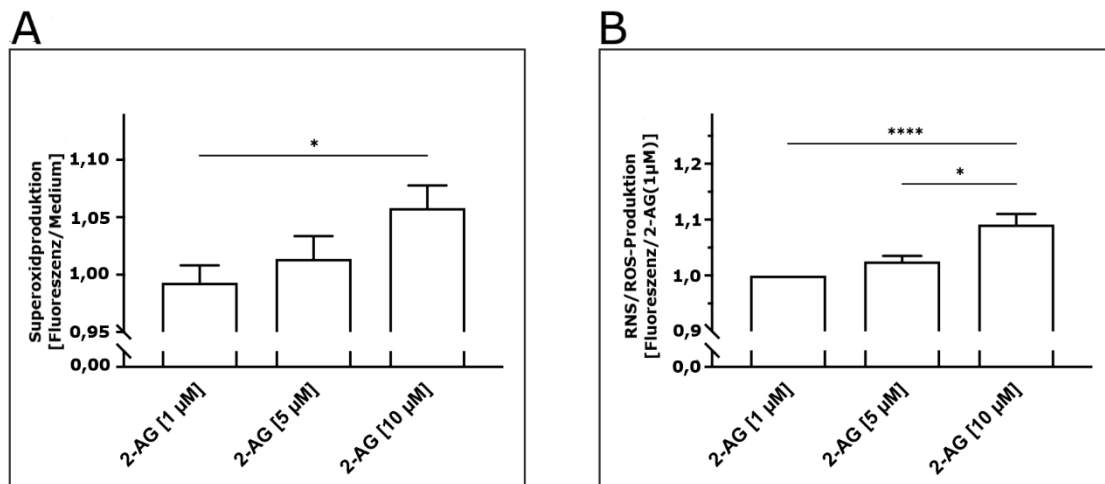


Abb. 6: Quantifizierung der 2-AG-induzierten Produktion von Superoxiden, ROS und RNS mithilfe eines kolorimetrischen Tests. Modifiziert nach Avraamidou et al. (2023), Figure 3b und c. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt; $n = 17$; * $p \leq 0,05$, **** $p \leq 0,0001$; ermittelt mittels ANOVA und nachfolgender Bonferroni-Korrektur; 2-AG: 2-Arachidonylglycerol; RNS: reaktive Stickstoffspezies; ROS: reaktive Sauerstoffspezies

1.3.6 Die Freisetzung von MPO und die Transkription von NADPH-Oxidase sind für den Anstieg von ROS und RNS nicht ursächlich

Um den beobachteten Anstieg der ROS/RNS-Produktion mechanistisch einzuordnen, wurden zwei potenziell beteiligte Enzymsysteme untersucht: die Myeloperoxidase (MPO) und die NADPH-Oxidase (NOX).

MPO katalysiert die Bildung von Hypochlorit (ClO^-) aus Chloridionen und ist maßgeblich an der oxidativen Modifikation von LDL beteiligt. Ferner wandelt MPO HDL in eine dysfunktionale Form um, verringert die Bioverfügbarkeit von NO und aktiviert MMPs, was zur Instabilität atherosklerotischer Plaques führt. Darüber hinaus induziert MPO die Produktion von Interleukinen (IL) wie IL-6 und IL-8 in Endothelzellen und führt zu einer endothelialen Dysfunktion (Frangie und Daher, 2022; Kamanna et al., 2013).

Die NADPH-Oxidase (NOX) ist ein membrangebundener Enzymkomplex, welcher Superoxidanionen erzeugt und ebenfalls LDL oxidiert. Obwohl reaktive Sauerstoffspezies in Makrophagen aus vielen Quellen stammen können, gilt die NADPH-Oxidase 2 (NOX2) als die Hauptquelle für ROS in Makrophagen (Wang et al., 2023).

Die MPO-Konzentration wurde in den Zellüberständen von THP1-Zellen 48 Stunden nach Stimulation mit 2-AG [1 µM], 2-AG [10 µM], 2-AG [10 µM] + AM630 [5 µM] oder Medium gemessen. Es zeigte sich kein relevanter Unterschied in der MPO-Freisetzung nach Stimulation mit 2-AG im Vergleich zum Medium (2-AG [1 µM]: $0,96 \pm 0,06$, $n = 5$, $p > 0,99$; 2-AG [10 µM]: $0,87 \pm 0,09$, $n = 5$; $p = 0,74$). Die Co-Stimulation mit dem inversen Agonisten AM630 reduzierte die MPO-Freisetzung (2-AG [10 µM] + AM630 [5 µM]: $0,57 \pm 0,02$, $n = 3$, $p < 0,05$).

Zudem wurde die Transkription der NOX2-Untereinheiten CYBA und CYBB nach Stimulation mit 2-AG untersucht. Die Stimulation von THP-1-Zellen mit 2-AG [1 µM] führte zu keinen relevanten Veränderungen der Transkriptionsraten (CYBA: $1,06 \pm 0,49$; $n \geq 3$; $p = 0,90$; CYBB: $0,98 \pm 0,53$; $n \geq 3$; $p = 0,97$).

1.3.7 Stimulation mit 2-AG [10µM] erhöht die LPS-induzierte IL-1β-Produktion *in vitro*

Frühere Studien zeigten, dass die NLRP3-Inflammasom-mRNA und die IL-1β-mRNA in humanen atherosklerotischen Läsionen hochreguliert sind und dass das NLRP3-Inflammasom mit dem mRNA-Spiegel des Makrophagen-Markers CD68 korreliert (Paramel Varghese et al., 2016).

Die IL-1β-Konzentration wurde in den Zellüberständen von PBMCs nach Co-Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von 2-AG ([1 µM] und [10 µM]) oder DMSO und LPS in unterschiedlichen Konzentrationen (0,002 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,2 µg/ml) bestimmt. Es zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg der IL-1β-Freisetzung nach Stimulation mit 2-AG und LPS (2-AG [10 µM]: $1864,0 \pm 168,2$ pg/ml; $n = 12$; $p < 0,01$; 2-AG [1 µM]: $1383,0 \pm 58,9$ pg/ml; $n = 12$; $p < 0,05$; DMSO: $1329,0 \pm 101,5$ pg/ml) (Abb. 7). Während 2-AG [10µM] die LPS-induzierte IL-1β signifikant verstärkt, zeigt 2-AG [1µM] keinen signifikanten Zusatzeffekt gegenüber DMSO.

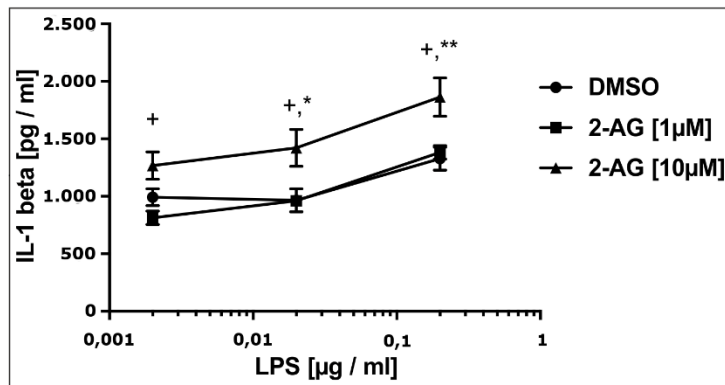


Abb. 7: Quantifizierung der 2-AG-induzierten Produktion von 1IL-1 β . Modifiziert nach Avraamidou et al. (2023), Figure 4a. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt; n = 12; * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01 im Vergleich zu DMSO, + p \leq 0,05 im Vergleich zu 2-AG [1 μ M], ermittelt mittels ANOVA und nachfolgender Bonferroni-Korrektur; 2-AG: 2-Arachidonylglycerol; DMSO: Dimethylsulfoxid; IL-1 β : Interleukin-1 β ; LPS: Lipopolysaccharid

1.3.8 IL-6-Spiegel blieb unverändert nach Behandlung der Mäuse mit JZL184

Der IL-6-Spiegel wurde in den Plasmaproben der vier Behandlungsgruppen bestimmt. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl} JZL184: 14,3 \pm 3,4 pg/ml vs. DMSO 20,1 \pm 6,4 pg/ml; n = 4 - 6; p = 0,41; ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl}: JZL184: 17,0 \pm 3,6 pg/ml vs. DMSO 25,1 \pm 6,1 pg/ml; n = 8 - 12; p = 0,33). Dieser Befund zeigt, dass die Hemmung der Monoacylglycerollipase durch JZL184 und der daraus resultierende Anstieg des 2-AG-Spiegels keinen Einfluss auf die systemische IL-6-Produktion hatten.

1.3.9 Verstärkte Freisetzung von MMP-1 und MMP-9 nach Stimulation mit 2-AG [1 μ M]

Um den beobachteten Anstieg des Kollagengehalts in JZL184-behandelten Mäusen mit funktionellem myeloischen CB2-Rezeptor einzuordnen, wurde *in vitro* die Freisetzung von MMP-1 und MMP-9 aus PBMCs nach Behandlung mit 2-AG untersucht.

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie von mindestens 23 aktiven Proteinasen, welche unter anderem von Makrophagen exprimiert werden. Sie spielen

einerseits bei der Intimaverdickung, welche Plaques stabilisiert, und andererseits bei der Zerstörung der extrazellulären Matrix, die zur Plaque-Ruptur führt, eine Rolle. Die Überproduktion von MMPs spielt eine Rolle bei der Plaque-Ruptur und beim Myokardinfarkt (Newby, 2015). In einer Studie verringerte die Expression von MMP-1 in den Makrophagen von ApoE-Knockout-Mäusen die Bildung atherosklerotischer Läsionen (Lemaître et al., 2001). Dies könnte auf eine verminderte Retention von oxLDL aufgrund einer geringeren Menge fibrillärer Kollagene zurückzuführen sein.

Nach Stimulation von PBMCs mit 2-AG [1 μ M] zeigte sich eine signifikant erhöhte Sekretion von MMP-1 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (2-AG: $1,30 \pm 0,133$; $n = 7$; $p < 0,01$). Auch die Konzentration von MMP-9 in den Überständen war gegenüber der DMSO-Kontrolle erhöht (2-AG: $1,04 \pm 0,02$; $n = 10$; $p < 0,01$).

1.4 Diskussion

Chronische Entzündung ist ein Schlüsselement in der Pathogenese der Atherosklerose. Klinische Daten zeigen, dass eine Reduktion der Entzündung ohne Senkung des Cholesterinspiegels zu einer Verringerung von wiederkehrenden kardiovaskulären Ereignissen führen kann. Eine antiinflammatorische Therapie mit Canakinumab (monoklonaler Antikörper gegen $1L-1\beta$) mit anschließender Reduktion von hs-CRP und IL-6 führte zu geringeren kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit vorangegangenem Myokardinfarkt (Ridker et al., 2017). In anderen Studien führte die Einnahme von Colchicin zu einem geringeren Risiko ischämischer kardiovaskulärer Ereignisse im Vergleich zu Placebo (Nidorf et al., 2013; Nidorf et al., 2020; Tardif et al., 2019).

Aufgrund der Hinweise auf eine 2-AG-vermittelte Modulation der lokalen Entzündung in Koronarläsionen wurde die vorliegende Studie konzipiert, um den Einfluss von 2-AG und des myeloischen CB2-Rezeptors zu untersuchen.

Unsere Daten zeigen eine erhöhte Plaquelast in JZL184-behandelten Mäusen mit intaktem myeloischen CB2-Rezeptor. Dieser Effekt war hingegen bei Mäusen ohne myeloischen CB2-Rezeptor nicht nachweisbar. Folglich vermittelt der myeloisch exprimierte CB2-Rezeptor die atherogenen Effekte erhöhter 2-AG-Spiegel, während der endothelial exprimierte CB2-Rezeptor unter denselben Bedingungen keine bedeutende

Rolle spielt. Dies weist auf eine proatherogene Wirkung des myeloischen und nicht des endothelialen CB2-Rezeptors im Kontext erhöhter 2-AG-Spiegel hin.

Unsere Befunde deuten darauf hin, dass sowohl der myeloidspezifische als auch der endothelspezifische CB2-Rezeptor zu einer erhöhten Akkumulation von Monozyten und Makrophagen in atherosklerotischen Plaques im Kontext erhöhter 2-AG-Spiegel beitragen können. Diese Daten bestätigen frühere Ergebnisse aus unserer Gruppe, die zeigten, dass ein erhöhter 2-AG-Spiegel mit einer erhöhten Plaquelast und einem signifikanten Anstieg infiltrierender Makrophagen innerhalb der atherosklerotischen Gefäßwand sowie mit einer gesteigerten Migration von Makrophagen *in vitro* einhergeht (Jehle et al., 2018). *In vitro* wurde die Makrophagen-Migration durch CB2-Blockierung abgeschwächt, passend zu unseren Ergebnissen *in vivo* (Jehle et al., 2018).

Unsere *in-vitro*-Daten zeigen, dass die Behandlung von PBMCs mit 2-AG [10 µM] die LPS-induzierte IL-1β-Produktion signifikant verstärkt. Dies könnte eine Rolle bei der beobachteten Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in atherosklerotischen Plaques nach Behandlung mit JZL184 spielen. Allerdings konnte die Stimulation mit 2-AG [1 µM] keinen zusätzlichen Effekt gegenüber der DMSO-Kontrolle bewirken. Diese Beobachtung wird durch jüngste Daten unterstützt: Eine Stimulation von CD14⁺-Monozyten mit 2-AG [1 µM] führte ebenfalls zu keiner relevanten Induktion der IL-1β-mRNA (Nöthel et al., 2025).

In vivo blieb der IL-1β-Plasmaspiegel in allen untersuchten Gruppen unterhalb des niedrigsten Nachweisbereichs. Dieses Ergebnis schließt eine lokal gesteigerte IL-1β-Produktion in der Gefäßwand jedoch nicht aus, insbesondere da IL-1β eine sehr kurze Halbwertszeit im Plasma aufweist (Lopez-Castejon und Brough, 2011). Unterstützend berichteten Vujic et al. (2016), dass ApoE^{-/-}-MAGL^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäuse mit erhöhten 2-AG-Spiegeln eine vermehrte Expression von CCL2- und IL-1β-mRNA in der Aorta aufweisen als Hinweis auf eine verstärkte lokale IL-1β-Expression im Kontext erhöhter 2-AG Spiegel.

Schließlich können auch IL-1β-unabhängige Effekte von 2-AG zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beitragen. Hierzu zählen beispielsweise die 2-AG-induzierte Aktivierung endothelialer Adhäsionsmoleküle wie P- und E-Selektin über CB2-abhängige

Signalwege (Gasperi et al., 2014), die durch hohe 2-AG-Konzentrationen induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, sowie die Akkumulation oxidiertes Lipide in der Gefäßwand. Ein Mangel des CB2-Rezeptors und die damit verbundene verringerte Expression von Adhäsionsmolekülen, die durch den CB2-Rezeptor vermittelt werden, könnten für die geringere Akkumulation von Neutrophilen in den Mäusen mit endothelialelem Knockout des CB2-Rezeptors verantwortlich sein.

Darüber hinaus zeigten Chouinard et al. (2011), dass 2-AG neutrophile Granulozyten aktivieren und die Leukotrien-B4-(LTB4)-Biosynthese stimulieren kann oder selbst durch 5-Lipoxygenase zum Leukotrien B4 metabolisiert werden kann. Da LTB4 zu den stärksten neutrophilen Chemoattraktanten zählt, kann dieser Mechanismus – unabhängig von CB-Rezeptoren – ebenfalls zu einer verstärkten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beitragen.

Der Kollagengehalt der Gefäßwand war ausschließlich in JZL184-behandelten Mäusen mit funktionellem myeloischen CB2-Rezeptor erhöht, während dieser Effekt in Mäusen ohne myeloischen CB2-Rezeptor ausblieb. Dies weist auf einen CB2-abhängigen Anstieg des Kollagengehalts in der Gefäßwand im Kontext erhöhter 2-AG-Spiegel hin. Dieser Befund legt nahe, dass der myeloische CB2-Rezeptor eine regulatorische Rolle im Kollagenmetabolismus innerhalb atherosklerotischer Plaques im Kontext erhöhter 2-AG-Spiegel übernimmt. Der beobachtete Anstieg des Kollagengehalts könnte durch eine gesteigerte Kollagenproduktion – beispielsweise vermittelt durch einen reparativen, M2-ähnlichen Makrophagenphänotyp – oder durch einen reduzierten Kollagenabbau, etwa über eine verminderte Aktivität kollagenabbauender Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), erklärt werden.

Frühere Studien berichten ebenfalls über eine Erhöhung des Kollagengehalts in atherosklerotischen Läsionen in einem Doppel-Knockout-Mausmodell mit fehlender MAGL-Aktivität und daraus resultierendem erhöhtem 2-AG-Spiegel (Vujic et al., 2016). In dieser Studie wurde eine erhöhte Anzahl glatter Muskelzellen sowie eine gesteigerte Transkription von TIMP-1 und TIMP-2 (Inhibition der MMPs) als Ursache für den beobachteten Effekt angesehen. Dieser Plaque-Phänotyp wurde nach Stimulation mit

dem CB2-Antagonisten SR144528 aufgehoben, was darauf hinweist, dass der beobachtete Phänotyp auf die CB2-Rezeptoraktivierung zurückzuführen ist.

Unsere *in-vitro*-Daten zeigen eine signifikante Steigerung der MMP-1- und MMP-9-Sekretion nach Behandlung mit 2-AG. Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich am ehesten durch die Unterschiede zwischen isolierten PBMCs und plaqueansässigen Makrophagen erklären. Zudem wurde in dieser Studie die Konzentration, allerdings nicht die enzymatische Aktivität von MMPs sowie die Regulation der MMP-Aktivität durch TIMPs berücksichtigt.

Es ist bekannt, dass die ROS-Produktion mit endothelialer Dysfunktion und Entzündung verbunden ist und eine entscheidende Rolle bei der Atherogenese spielt (Kattoor et al., 2017). Darüber hinaus liefern mehrere Studien Hinweise darauf, dass das ECS an der Modulation der ROS/RNS-Produktion beteiligt ist (Lipina und Hundal, 2016).

Ex vivo zeigte sich in den untersuchten Gruppen kein signifikanter Unterschied der L-012-induzierten Chemilumineszenz (Marker für die Bildung von Superoxid-dominierten reaktiven Sauerstoffspezies). Die höchsten Lumineszenzwerte wurden bei JZL184-behandelten Mäusen mit vorhandenem myeloischem CB2-Rezeptor beobachtet.

In vitro führte die Behandlung von THP-1-Zellen mit 2-AG [10 µM] zum signifikanten Anstieg der ROS/RNS-Produktion im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen, während der inverse CB2-Rezeptoragonist AM630 keinen relevanten Einfluss auf diesen Effekt hatte. Dies deutet darauf hin, dass die durch 2-AG induzierte ROS/RNS-Produktion in diesem Modellsystem überwiegend CB2-unabhängig vermittelt wird.

Aus den vorliegenden Daten geht zudem hervor, dass weder die MPO-Freisetzung noch die Transkription von NOX2-Untereinheiten CYBA und CYBB durch 2-AG wesentlich beeinflusst werden. Somit scheint der beobachtete Anstieg der ROS/RNS-Produktion nach 2-AG-Behandlung nicht auf eine erhöhte MPO-Freisetzung oder eine gesteigerte NOX2-Transkription zurückzuführen zu sein.

Zu möglichen alternativen Mechanismen für den beobachteten Anstieg der ROS/RNS-Produktion zählen metabolische 2-AG-Abbauprodukte welche als Substrate für COX und Lipoxygenasen dienen können und zur Entstehung oxidativer Lipidmediatoren führen

können, alternative Rezeptorsysteme wie GPR55 oder membranphysikalische Effekte wie die Veränderungen der Membranfluidität oder der Aktivität von Ionenkanälen.

Obwohl die Behandlung mit 2-AG keinen Unterschied in der MPO-Freisetzung von THP-1-Zellen bewirkte, führte die Co-Stimulation mit dem inversen CB2-Agonisten AM630 zu einer Reduktion der MPO-Freisetzung im Vergleich zu 2-AG [10 µM] allein. Eine Limitation dieser Versuche besteht darin, dass differenzierte THP-1-Zellen (nicht polarisierte MΦs - Makrophagen-) ein verändertes genotypisches Profil im Vergleich zu undifferenzierten THP-1-Monozyten aufweisen, die in dieser Studie zur Bestimmung der MPO-Freisetzung eingesetzt wurden (Jeradeh et al., 2024; Scobie et al., 2023). Eine weitere Einschränkung besteht darin, dass Monozyten geringere Mengen an MPO enthalten als neutrophile Granulozyten (Klebanoff, 2005), was die Interpretation kleiner Unterschiede erschweren kann.

In den untersuchten Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede in dem IL-6 Plasmaspiegel festgestellt werden. Dieser Befund zeigt, dass die Hemmung der Monoacylglycerollipase durch JZL184 und der daraus resultierende Anstieg des 2-AG-Spiegels keinen Einfluss auf die systemische IL-6-Produktion hatten. Dies spricht dafür, dass die beobachteten 2-AG-abhängigen Effekte – wie verstärkte Infiltration myeloider Zellen oder Veränderungen der Plaquezusammensetzung – vorwiegend lokal innerhalb der atherosklerotischen Läsionen stattfinden.

1.5 Zusammenfassung

Die vorliegende Promotionsarbeit untersucht den Einfluss von 2-Arachidonylglycerol auf die Atherogenese sowie die Rolle des myeloischen Cannabinoid-Rezeptors 2 bei den dabei beobachteten Effekten *in vivo* und *in vitro*. Die Rolle des CB2-Rezeptors wird *in vivo* mithilfe eines zellspezifischen Knockout-Mausmodells untersucht. Die beobachteten Effekte wurden in humanen Zellmodellen *in vitro* mechanistisch aufgearbeitet.

Unsere Daten zeigen, dass 2-Arachidonylglycerol die Atherogenese sowie die Migration und Akkumulation von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in unserem Mausmodell fördert. Diese Effekte werden durch das Fehlen des myeloischen Cannabinoid-Rezeptors 2 abgeschwächt. Der Kollagengehalt der Gefäßwand war ausschließlich in JZL184-behandelten Mäusen mit funktionellem myeloischem CB2-

Rezeptor erhöht, während dieser Effekt in Mäusen ohne myeloischen CB2-Rezeptor ausblieb.

In vitro führte die Behandlung von THP-1-Zellen mit 2-Arachidonylglycerol [10 µM] zu einem signifikanten Anstieg der Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS) im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen. Die Co-Stimulation mit dem inversen CB2-Agonisten AM630 hatte keinen relevanten Einfluss auf diesen Effekt. Dies deutet darauf hin, dass die durch 2-AG induzierte ROS/RNS-Produktion in diesem Modellsystem überwiegend CB2-unabhängig vermittelt wird.

Weder die Freisetzung der Myeloperoxidase (MPO) noch die Transkription der Untereinheiten CYBA und CYBB der NADPH-Oxidase 2 (NOX2) wurden nach Behandlung von THP-1-Zellen mit 2-Arachidonylglycerol wesentlich beeinflusst. Der beobachtete Anstieg der Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS) lässt sich somit nicht auf Veränderungen der MPO-Freisetzung oder der NOX2-Transkription zurückführen. Interessanterweise führte jedoch die Co-Stimulation mit dem inversen Cannabinoid-Rezeptor-2-Agonisten AM630 zu einer Reduktion der MPO-Freisetzung im Vergleich zu 2-Arachidonylglycerol [10 µM] allein.

Zudem wurde *in vitro* eine erhöhte Sekretion der Matrix-Metalloproteinasen 1 und 9 nach Stimulation mit 2-Arachidonylglycerol beobachtet. 2-Arachidonylglycerol [10 µM] verstärkte außerdem die LPS-induzierte Produktion von Interleukin-1β (IL-1β) in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs), während 2-AG [1 µM] keinen zusätzlichen Effekt gegenüber der DMSO-Kontrolle zeigte.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass der myeloisch exprimierte Cannabinoid-Rezeptor 2 die atherogenen Effekte von 2-Arachidonylglycerol vermittelt. Hierzu zählen die Zunahme der atherosklerotischen Plaquelast sowie die verstärkte Infiltration von Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in die Gefäßwand. Darüber hinaus weisen unsere Ergebnisse auf einen myeloisch-CB2-Rezeptor-vermittelten Anstieg des Kollagengehalts in der Gefäßwand im Kontext erhöhter 2-AG-Spiegel hin. Im Gegensatz dazu wurde *in vitro* nach Behandlung mit 2-Arachidonylglycerol [1 µM] eine erhöhte Sekretion der Matrix-Metalloproteinasen 1 und 9 beobachtet. Die durch 2-AG [10 µM] induzierte ROS/RNS-Produktion in diesem

Modellsystem wird überwiegend CB2-unabhängig vermittelt und konnte nicht durch eine verstärkte MPO-Freisetzung oder Veränderungen der NOX2-Transkription erklärt werden. Die LPS-induzierte IL-1 β -Produktion wurde nur durch höhere 2-AG-Konzentrationen [10 μ M] signifikant verstärkt, während niedrigere Konzentrationen keinen zusätzlichen Effekt zeigten.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Avraamidou E, Nöthel M, Danisch M, Bindila L, Schmidt SV, Lutz B, Nickenig G, Jehle J. Myeloid But Not Endothelial Expression of the CB2 Receptor Promotes Atherogenesis in the Context of Elevated Levels of the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *J Cardiovasc Transl Res* 2023; 16: 491–501

Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Pan H, ..., Pacher P. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J* 2007; 21: 1788–1800

Buckley NE. The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 309–318

Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol* 2000; 396: 141–149

Chang YH, Lee ST, Lin WW. Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. *J Cell Biochem* 2001; 81: 715–723

Chiurchiù V, Battistini L, Maccarrone M. Endocannabinoid signalling in innate and adaptive immunity. *Immunology* 2015; 144: 352–364

Chouinard F, Lefebvre JS, Navarro P, Bouchard L, Ferland C, Lalancette-Hébert M, Marsolais D, Laviolette M, Flamand N. The endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol activates human neutrophils: critical role of its hydrolysis and de novo leukotriene B4 biosynthesis. *J Immunol* 2011; 186: 3188–3196

Di Filippo C, Rossi F, Rossi S, D'Amico M. Cannabinoid CB2 receptor activation reduces mouse myocardial ischemia-reperfusion injury: involvement of cytokine/chemokines and PMN. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 453–459

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, ..., Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010; 464: 1357–1361

Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, ..., Jordan J. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005; 54: 2838–2843

Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res* 2017; 120: 713–735

Frangie C, Daher J. Role of myeloperoxidase in inflammation and atherosclerosis (Review). *Biomed Rep* 2022; 16: 53

Freeman-Anderson NE, Pickle TG, Netherland CD, Bales A, Buckley NE, Thewke DP. Cannabinoid (CB2) receptor deficiency reduces the susceptibility of macrophages to oxidized LDL/oxysterol-induced apoptosis. *J Lipid Res* 2008; 49: 2338–2346

Ganesan R, Henkels KM, Wrenshall LE, Kanaho Y, Di Paolo G, Frohman MA, Gomez-Cambronero J. Oxidized LDL phagocytosis during foam cell formation in atherosclerotic plaques relies on a PLD2-CD36 functional interdependence. *J Leukoc Biol* 2018; 103: 867–883

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. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 51: 79–88

Gokoh M, Kishimoto S, Oka S, Metani Y, Sugiura T. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, enhances the adhesion of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes. *FEBS Lett* 2005a; 579: 6473–6478

Gokoh M, Kishimoto S, Oka S, Mori M, Waku K, Ishima Y, Sugiura T. 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid actin polymerization in HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells. *Biochem J* 2005b; 386: 583–589

Hartman J, Frishman WH. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiol Rev* 2014; 22: 147–151

Hou L-J, Xie M-Y, Ye W, Zhao G-J. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol inhibits endothelial function and repair through cannabinoid 1 (CB1) receptor. *Int J Cardiol* 2021; 328: 176

Hoyer FF, Steinmetz M, Zimmer S, Becker A, Lütjohann D, Buchalla R, Zimmer A, Nickenig G. Atheroprotection via cannabinoid receptor-2 is mediated by circulating and vascular cells in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51: 1007–1014

Jehle J, Eich L, Danisch M, Bagheri S, Avraamidou E, Pfeifer P, Tiyerili V, Bindila L, Lutz B, Nickenig G. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol inhibits endothelial function and repair. *Int J Cardiol* 2021; 323: 243–250

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, Schöne B, Bagheri S, ..., Nickenig G. Elevated levels of 2-arachidonoylglycerol promote atherogenesis in ApoE^{-/-} mice. *PLoS One* 2018; 13: e0197751

Jeradeh E, Frangie C, Bazzi S, Daher J. The in vitro effect of myeloperoxidase oxidized LDL on THP-1 derived macrophages. *Innate Immun* 2024; 30: 82–89

Jiang L, Pu J, Han Z, Hu L, He B. Role of activated endocannabinoid system in regulation of cellular cholesterol metabolism in macrophages. *Cardiovasc Res* 2009; 81: 805–813

Jourdan T, Godlewski G, Cinar R, ..., Kunos G. Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nat Med* 2013; 19: 1132–1140

Kamanna VS, Ganji SH, Kashyap ML. Myeloperoxidase and Atherosclerosis. *Curr Cardiovasc Risk Rep* 2013; 7: 102–107

Kapellos TS, Recio C, Greaves DR, Iqbal AJ. Cannabinoid Receptor 2 Modulates Neutrophil Recruitment in a Murine Model of Endotoxemia. *Mediators Inflamm* 2017; 2017: 4315412

Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2017; 19: 42

Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 656–660

Kishimoto S, Gokoh M, Oka S, Muramatsu M, Kajiwara T, Waku K, Sugiura T. 2-arachidonoylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB2 receptor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2003; 278: 24469–24475

Kishimoto S, Kobayashi Y, Oka S, Gokoh M, Waku K, Sugiura T. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces accelerated production of chemokines in HL-60 cells. *J Biochem* 2004; 135: 517–524

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 598–625

Lemaître V, O'Byrne TK, Borczuk AC, Okada Y, Tall AR, D'Armiento J. ApoE knockout mice expressing human matrix metalloproteinase-1 in macrophages have less advanced atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107: 1227–1234

Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature* 2011; 472: 524–533

Linton MF, Babaev VR, Huang J, Linton EF, Tao H, Yancey PG. Macrophage Apoptosis and Efferocytosis in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ J* 2016; 80: 2259–2268

Lipina C, Hundal HS. Modulation of cellular redox homeostasis by the endocannabinoid system. *Open Biol* 2016; 6: 150276

Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22: 189–195

Lu H-C, Mackie K. Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging* 2021; 6: 607–615

Maeda N, Osanai T, Kushibiki M, ..., Okumura K. Increased serum anandamide level at ruptured plaque site in patients with acute myocardial infarction. *Fundam Clin Pharmacol* 2009; 23: 351–357

Miller AM, Stella N. CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 299–308

Molica F, Matter CM, Burger F, Pelli G, Lenglet S, Zimmer A, Pacher P, Steffens S. Cannabinoid receptor CB2 protects against balloon-induced neointima formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302: H1064-1074

Montecucco F, Burger F, Mach F, Steffens S. CB2 cannabinoid receptor agonist JWH-015 modulates human monocyte migration through defined intracellular signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H1145-1155

Newby AC. Metalloproteinases promote plaque rupture and myocardial infarction: A persuasive concept waiting for clinical translation. *Matrix Biol* 2015; 44-46: 157–166

Nidorf SM, Eikelboom JW, Budgeon CA, Thompson PL. Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiology* 2013; 61: 404–410

Nidorf SM, Fiolet ATL, Mosterd A, ..., LoDoCo2 Trial Investigators. Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *N Engl J Med* 2020; 383: 1838–1847

Nöthel M, Dorer F, Odainic A, ..., Jehle J. Unbiased assessment of 2-arachidonoylglycerol in cardiovascular inflammation. *Sci Rep* 2025; 15: 41469

Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, ..., Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; 115: 1298–1305

Pacher P, Steffens S. The emerging role of the endocannabinoid system in cardiovascular disease. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 63–77

Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 2006; 27: 73–100

Paramel Varghese G, Folkersen L, Strawbridge RJ, ..., Sirsjö A. NLRP3 Inflammasome Expression and Activation in Human Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2016; 5: e003031

Rajamäki K, Lappalainen J, Oörni K, Välimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, Eklund KK. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PloS One* 2010; 5: e11765

Rajesh M, Bátkai S, Kechrid M, ..., Pacher P. Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2012; 61: 716–727

Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, ..., Pacher P. 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* 2007a; 293: H2210-2218

Rajesh M, Mukhopadhyay P, Haskó G, Huffman JW, Mackie K, Pacher P. CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF-alpha-induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 347–357

Rajesh M, Pan H, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Haskó G, Liaudet L, Gao B, Pacher P. Cannabinoid-2 receptor agonist HU-308 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *J Leukoc Biol* 2007b; 82: 1382–1389

Ridker PM, Everett BM, Thuren T, ..., CANTOS Trial Group. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 2017; 377: 1119–1131

Saroz Y, Kho DT, Glass M, Graham ES, Grimsey NL. Cannabinoid Receptor 2 (CB2) Signals via G-alpha-s and Induces IL-6 and IL-10 Cytokine Secretion in Human Primary Leukocytes. *ACS Pharmacol Transl Sci* 2019; 2: 414–428

Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, ..., Drexler H. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 2004; 110: 3493–3500

Scobie MR, Abood A, Rice CD. Differential Transcriptome Responses in Human THP-1 Macrophages Following Exposure to T98G and LN-18 Human Glioblastoma Secretions: A Simplified Bioinformatics Approach to Understanding Patient-Glioma-Specific Effects on Tumor-Associated Macrophages. *Int J Mol Sci* 2023; 24

Simard M, Rakotoarivelo V, Di Marzo V, Flamand N. Expression and Functions of the CB2 Receptor in Human Leukocytes. *Front Pharmacol* 2022; 13: 826400

Steffens S, Pacher P. Targeting cannabinoid receptor CB(2) in cardiovascular disorders: promises and controversies. *Br J Pharmacol* 2012; 167: 313–323

Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Staub C, Karsak M, Zimmer A, Frossard J-L, Mach F. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature* 2005; 434: 782–786

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

Tardif J-C, Kouz S, Waters DD, ..., Roubille F. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2019; 381: 2497–2505

Tiyerili V, Zimmer S, Jung S, Wassmann K, Naehle CP, Lütjohann D, Zimmer A, Nickenig G, Wassmann S. CB1 receptor inhibition leads to decreased vascular AT1 receptor expression, inhibition of oxidative stress and improved endothelial function. *Basic Res Cardiol* 2010; 105: 465–477

Vujic N, Schlager S, Eichmann TO, ..., Kratky D. Monoglyceride lipase deficiency modulates endocannabinoid signaling and improves plaque stability in ApoE-knockout mice. *Atherosclerosis* 2016; 244: 9–21

Wang Y, Liu X-Y, Zhao W-X, Li F-D, Guo P-R, Fan Q, Wu X-F. NOX2 inhibition stabilizes vulnerable plaques by enhancing macrophage efferocytosis via MertK/PI3K/AKT pathway. *Redox Biol* 2023; 64: 102763

Xiao H, Lu M, Lin TY, ..., Shyy JYJ. Sterol regulatory element binding protein 2 activation of NLRP3 inflammasome in endothelium mediates hemodynamic-induced atherosclerosis susceptibility. *Circulation* 2013; 128: 632–642

Zhao Y, Liu Y, Zhang W, Xue J, Wu YZ, Xu W, Liang X, Chen T, Kishimoto C, Yuan Z. WIN55212-2 ameliorates atherosclerosis associated with suppression of pro-inflammatory responses in ApoE-knockout mice. *Eur J Pharmacol* 2010a; 649: 285–292

Zhao Y, Yuan Z, Liu Y, Xue J, Tian Y, Liu W, Zhang W, Shen Y, Xu W, Liang X, Chen T. Activation of cannabinoid CB2 receptor ameliorates atherosclerosis associated with suppression of adhesion molecules. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010b; 55: 292–298

2. Veröffentlichungen

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde.

Avraamidou E, Nöthel M, Danisch M, Bindila L, Schmidt SV, Lutz B, Nickenig G, Jehle J. Myeloid But Not Endothelial Expression of the CB2 Receptor Promotes Atherogenesis in the Context of Elevated Levels of the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 2023; 16: 491–501

<https://doi.org/10.1007/s12265-022-10323-z>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in biomedizinischem Zentrum I des UKB unter Betreuung von PD Dr. Julian Jehle durchgeführt.

Die Konzeption der wissenschaftlichen Arbeit erfolgte durch PD Dr. Julian Jehle in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Georg Nickenig.

Im Verlauf der wissenschaftlichen Arbeit wurden weitere Experimente (ROS/RNS Produktion, MPO-Freisetzung und Transkription von NADPH Oxidasen *in vitro*) zur Bestimmung der zugrundeliegenden Mechanismen von mir eigenständig geplant. Die Quantifizierung des Kollagengehaltes der atherosklerotischen Plaques, der IL-1 β und Matrix-Metalloproteinasen Produktion *in vitro* wurden ebenfalls zur Ergänzung der Arbeit im Verlauf von mir eigenständig geplant.

Die Durchführung der *in vivo*-Experimente (Behandlung der Mäuse mit (ApoE^{-/-} LysM^{cre}CB2^{fl/fl}) und ohne den myeloischen Knockout des CB2-Rezeptors (ApoE^{-/-} LysM^{wt}CB2^{fl/fl}) mit intraperitonealen Injektionen, Erhebung von Blutdruck, Herzfrequenz und Körpergewicht) wurden nach Einarbeitung durch PD Dr. Julian Jehle von mir eigenständig durchgeführt. Die Extraktion des zur Analyse benötigten Gewebes (Herz, Aorta thoracalis, Aorta abdominalis, Plasma) und die Messung der L-012-induzierten Chemilumineszenz *ex vivo* wurde von mir eigenständig durchgeführt.

Die Anfertigung der Aortenklappenschnitte (von Mäusen mit und ohne den myeloischen Knockout) *ex vivo*, die Färbung mittels Oil Red O, Ly6G, Piko-Siriusrot und anti-CD68, die Quantifizierung der ROS/RNS Produktion, der MPO-Freisetzung und Transkription von NADPH Oxidasen *in vitro* wurden nach Einarbeitung durch PD Dr. Julian Jehle von mir eigenständig durchgeführt.

Die Datenerhebung der Plaquelast und der Plaquemorphologie (von Mäusen mit und ohne den myeloischen Knockout) wurden von mir mittels Axiovision 4.8 Software eigenständig durchgeführt.

Die Quantifizierung der Endocannabinoidkonzentration im Blut und der Aorta abdominalis erfolgte durch das Institut für Physiologische Chemie der Universität Mainz unter der Leitung von Professor Dr. B. Lutz.

Die statistische Auswertung und Interpretation der L-012-induzierten Chemilumineszenz der extrahierten Aorta thoracalis, der ROS/RNS Produktion, der MPO-Freisetzung und Transkription von NADPH Oxidasen erfolgte eigenständig durch mich.

Die statistische Auswertung und Interpretation der Plaquelast, des Anteils an neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in den atherosklerotischen Plaques (von Mäusen mit und ohne den myeloischen Knockout) erfolgte von mir in Zusammenarbeit mit PD Dr. Julian Jehle. Die Auswertung und Interpretation des IL-6 Spiegels, der IL-1 β und MMP-1 und MMP-9 Freisetzung erfolgte von mir in Zusammenarbeit mit PD Dr. Julian Jehle und Dr. Moritz Nöthel.

Die Durchführung der *in vivo*-Experimente mit Mäusen mit (ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}) und ohne den endothelialen Knockout des CB2-Rezeptors (ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}), die Anfertigung der Aortenklappenschnitte und Färbungen *ex vivo* wurden von Dr. Melina Danisch durchgeführt. Diese Daten aus der Promotionsarbeit von Dr. med. Melina Danisch aus unserer Arbeitsgruppe sind Teil der Publikation Avraamidou et al., 2023 und werden zum besseren Verständnis des Gesamtdatensatzes ergänzend dargestellt.

Bei der Erstellung dieser Arbeit wurde ChatGPT verwendet, um die Lesbarkeit und Sprache des Manuskripts zu verbessern. Die entsprechenden Passagen wurden überprüft und bearbeitet und ich übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

Herrn Professor Dr. Georg Nickenig und Priv.-Doz. Dr. Julian Jehle möchte ich für die freundliche Überlassung dieses spannenden Themas, die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen sowie die professionelle Betreuung und gewissenhafte Unterrichtung im wissenschaftlichen Arbeiten herzlich danken.

Ich danke ihnen für die uneingeschränkte Unterstützung und den kompetenten Rat in jeder Phase meiner Arbeit und die richtungsweisenden Anregungen, welche zum Gelingen und zur Weiterentwicklung der Arbeit führten.

Herrn Dr. Moritz Nöthel möchte ich für die professionelle und ausgezeichnete Zusammenarbeit sowie für die wertvolle wissenschaftliche Unterstützung herzlich danken. Frau Dr. Melina Danisch möchte ich für die hervorragende wissenschaftliche Zusammenarbeit im Rahmen des Projektes herzlich danken. Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Dr. Sayeh Bagheri für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und ihre hilfsbereite Unterstützung bedanken.

Ich möchte mich bei den Mitarbeiterinnen der molekularen Kardiologie der Universitätsklinik Bonn, Dr. Sandra Adler und Katharina Groll, für die zuverlässige und freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke Herrn Professor Dr. B. Lutz und Dr. Laura Bindila aus dem Institut für Physiologische Chemie der Universität Mainz sowie Dr. rer. nat. Susanne V. Schmidt aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie der Universitätsklinik Bonn für die hervorragende wissenschaftliche Kooperation.

Ferner möchte ich mich herzlich bei der Deutschen Herzstiftung e. V. für die Förderung meines Projektes bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir auch während der Doktorarbeit immerzu unterstützend zur Seite standen.

5. Publikationen (PDF-Version)

Journal of Cardiovascular Translational Research (2023) 16:491–501
<https://doi.org/10.1007/s12265-022-10323-z>

ORIGINAL ARTICLE



Myeloid But Not Endothelial Expression of the CB2 Receptor Promotes Atherogenesis in the Context of Elevated Levels of the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol

Elina Avraamidou¹ · Moritz Nöthel¹ · Melina Danisch¹ · Laura Bindila² · Susanne V. Schmidt³ · Beat Lutz² · Georg Nickenig¹ · Julian Jehle¹

Received: 29 March 2022 / Accepted: 13 September 2022 / Published online: 30 September 2022
 © The Author(s) 2022

Abstract

The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) is an inflammatory mediator and ligand for the cannabinoid receptors CB1 and CB2. We investigated the atherogenic mechanisms set in motion by 2-AG. Therefore, we created two atherosclerotic mouse models with distinct cell-specific knockouts of the CB2 receptor on either myeloid or endothelial cells. These mice were treated with JZL184, resulting in elevated plasma levels of 2-AG. After a high-fat high-cholesterol diet, atherosclerotic plaques were analyzed. The atherogenic effect of 2-AG was abrogated in mice lacking myeloid expression of the CB2 receptor but not in mice lacking endothelial expression of the CB2 receptor. In vitro, treatment of human monocytes with 2-AG led to the increased production of reactive oxygen species (ROS) and IL-1 β . In conclusion, 2-AG shows an atherogenic effect in vivo, dependent on the presence of the CB2 receptor on myeloid cells. In addition, our in vitro data revealed 2-AG to promote inflammatory signalling in monocytes.

Keywords Cannabinoid receptor type 2 · Atherosclerosis · Reactive oxygen species · Endocannabinoid system · 2-Arachidonoylglycerol · JZL184

Abbreviations

2-AG	2-Arachidonoylglycerol	MPO	Myeloperoxidase
eCB	Endocannabinoids	ROS	Reactive oxygen species
CB2	Cannabinoid receptor 2	RNS	Reactive nitrogen species
JZL184	Inhibitor of monoacylglycerol lipase	NOX	NADPH oxidase
MAGL	Monoacylglycerol lipase	NOX2	NADPH oxidase 2 (p91-PHOX/cytochrome b (-245) heavy chain)
MMP	Matrix metalloproteinase	CYBB	Cytochrome b-245 heavy chain
		CYBA	Cytochrome b-245 alpha polypeptide/cytochrome b-245 light chain (p22-PHOX)
		IL-6	Interleukin 6
		IL-1 β	Interleukin 1 β

Associate Editor Joost Sluijter oversaw the review of this article

Elina Avraamidou and Moritz Nöthel have contributed equally to the work.

✉ Moritz Nöthel
 moritz.noethel@ukbonn.de

¹ Department of Internal Medicine II Cardiology, Pneumology, Angiology, University Hospital Bonn, Venusberg-Campus 1, Building 13, 53127 Bonn, Germany

² Institute of Physiological Chemistry, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Duesbergweg 6, 55128 Mainz, Germany

³ Institute of Innate Immunity, Medical Faculty, University of Bonn, 53127 Bonn, NRW, Germany

Introduction

The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) is a mediator of inflammation and ligand to the cannabinoid receptors CB1 and CB2, which are expressed on peripheral myeloid and human vascular endothelial cells [3, 31]. The CB2 receptor has traditionally been considered to exert anti-inflammatory and atheroprotective effects, such as decreasing macrophage accumulation in lesions, decreasing smooth muscle cell content in lesions, and decreasing apoptosis [28,

31, 32]. However, some conflicting data suggest that 2-AG can actually promote atherosclerosis and that the CB2 receptor may initiate inflammation as well as monocyte chemotaxis, infiltration, and activation under certain experimental conditions [5, 7, 9, 12, 22, 24, 30, 40]. Multiple molecular pathways that promote atherogenesis have been discovered to date, yet the molecular effects of 2-AG in atherogenesis still need further exploration. Such molecular mechanisms include the generation of reactive oxygen species, the secretion of myeloperoxidase, and the activation of the IL-6/IL-1 β /CRP axis [2, 6, 14, 16, 26, 27, 33, 35, 36, 39].

In the present study, we investigated the role of the CB2 receptor on myeloid and vascular endothelial cells in promoting atherosclerosis under elevated 2-AG levels. This was investigated by using two cell-specific CB2 knockout mouse models. Both mouse models had an atherogenic background (*ApoE*^{-/-}) and, additionally, distinct cell-specific knockouts of the CB2 receptor on either myeloid (*ApoE*^{-/-}*LysM*^{cre}*CB2*^{fl/fl}) or endothelial (*ApoE*^{-/-}*Tie2*^{cre}*CB2*^{fl/fl}) cells. Mice were treated with intraperitoneal injections of JZL184, an inhibitor of the 2-AG-degrading enzyme monoacylglycerol lipase (MAGL), which led to elevated 2-AG levels. Meanwhile, they were fed a high-fat and high-cholesterol diet for 4 weeks. The volume and composition of the plaques formed were analyzed. In vitro, human monocytes were stimulated with 2-AG and a CB2 receptor antagonist. We investigated the production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS), the transcription of NADPH oxidases (NOX), the release of myeloperoxidase (MPO), and the production of IL-1 β under stimulatory conditions.

Materials and Methods

A detailed materials and methods section including a graphical summary of the experimental plan is available as an online supplement. In brief, two mouse models with an atherogenic background (*ApoE*^{-/-}; *C57BL/6 J* genetic background; Charles River, Wilmington, USA) and distinct cell-specific knockouts of the CB2 receptor (CB2 gene) on either myeloid (*ApoE*^{-/-}*LysM*^{cre}*CB2*^{fl/fl}) or endothelial (*ApoE*^{-/-}*Tie2*^{cre}*CB2*^{fl/fl}) cells were created using the cre-lox system. Littermates without cell-specific cre-recombinase activity, and thus without any CB2 knockout (*ApoE*^{-/-}*CB2*^{fl/fl}), served as the control groups for both knockout strains. For each strain, the mice were divided into two groups, one of which was treated with 5 mg/kg body weight i.p. of the MAGL inhibitor JZL184 (Selleckchem, Munich, Germany), while the other group received the same volume of the vehicle PBS/Kolliphor/DMSO (AppliChem, Darmstadt, Germany) for 4 weeks. We chose a short treatment period of 4 weeks because we expected an increased

plaque burden after treatment with JZL184. This protocol was established and validated in an earlier trial [12]. Approval was granted by the responsible German authority, the North Rhine Westphalian State Agency for Nature, Environment and Consumer Protection (reference number 84–02.04.2014.A419).

After 4 weeks of a high-fat (21% (w/w)) and high-cholesterol (1.25% (w/w)) diet S0279-S011 (Ssniff, Soest, Germany), mice were sacrificed, and the atherosclerotic plaques were analyzed by using Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), CD68 (α -CD68 rat-IgG2a antibody; Acris antibodies GmbH, Herford, Germany), and Ly6G (Ly6G purified clone 1A8, BD551459; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) stainings. Ex vivo, ROS production was measured using the L-012 method (Berthold Technologies GmbH, Germany), and plasma levels of IL-6 and IL-1 β were quantified using a ProcartaPlex assay (PPX-02-MX323DE; Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria). In vitro, human monocytes were treated with 2-AG (Tocris Bioscience, Bristol, England), and the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) was studied using a fluorescent assay kit (ab139476; abcam, Cambridge, UK). Production of IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, USA) and MPO (ab195212; abcam, Cambridge, UK) was measured by ELISA. Concentrations of MMPs 1 and 9 were quantified by R-Plex (Meso Scale Diagnostics, Rockville, Maryland, USA). Transcription of NOX1, NOX2 (CYBA, CYBB subunits), NOX4, and NOX5 was quantified by qPCR (Thermo Fischer Scientific Inc., Massachusetts, USA). Details of the TaqMan probes used in this study are listed in Supplementary Table S1.

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 and normally distributed variables, a one-way ANOVA and subsequent Bonferroni correction were performed. In case of lacking Gaussian distribution, Kolmogorov–Smirnov test was applied for the comparison of two groups, and Kruskal–Wallis test with subsequent Dunn's multiple comparisons for nonparametric testing was performed for three or more groups. *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

In vivo, the impact of elevated 2-AG levels on atherogenesis was assessed in ApoE-deficient-mice (*ApoE*^{-/-}) combined with a distinct cell-specific knockout of the CB2 receptor on

either myeloid ($ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl}$) or endothelial cells ($ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}$). The effects of 2-AG in vitro were examined in human monocytes.

Pharmacological Inhibition of MAGL Increases 2-AG Levels in Both Myeloid and Endothelial CB2 Receptor Knockout Models

Two different mouse models with cell-specific knockouts of the CB2 receptor in either myeloid cells ($ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl}$) or endothelial cells ($ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}$) were treated with the MAGL inhibitor JZL184 or vehicle for 4 weeks. Cre-negative littermates ($ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl}$ and $ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl}$) served as controls. All animals were fed a high-fat and high-cholesterol diet for the duration of the treatment.

As anticipated, inhibition of MAGL by JZL184 led to a significant increase in the plasma levels of 2-AG compared to the vehicle-treated control animals:

For mice lacking the myeloid CB2 receptor ($ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl}$), the concentrations of 2-AG in the plasma were 59.4 ± 7.0 pmol/ml (JZL184 treatment) vs. 16.9 ± 2.2 pmol/ml (with DMSO; $n = 16-17$; $p < 0.0001$). This increase was also observed in the wildtype control group, where 2-AG yielded 58.0 ± 5.2 pmol/ml (JZL184 treatment) and 18.5 ± 3.0 pmol/ml (with DMSO; $n = 15-16$; $p < 0.0001$) (Supplementary Table S2).

Congruent results were seen in mice lacking the endothelial CB2 receptor ($ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}$) as well as in their cre-negative littermates ($ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl}$) after pharmacological inhibition of MAGL with JZL184. The plasma concentrations for the CB2 knockout mice were 73.1 ± 6.4 pmol/ml (JZL184 treatment) vs. 33.5 ± 2.9 pmol/ml (with DMSO; $n = 13-14$; $p < 0.0001$). The control animals displayed an equivalent increase in 2-AG concentrations (71.4 ± 5.1 pmol/ml after JZL184 treatment vs. 42.7 ± 3.3 pmol/ml with DMSO; $n = 14-17$; $p < 0.0001$). Similar effects were seen in the aortic tissue of $ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}$ animals (239.5 ± 36.2 pmol/ml, JZL184 vs. 61.0 ± 14.1 pmol/ml, DMSO; $n = 13-14$; $p = 0.0001$), just as was seen in their cre-negative littermates (173.2 ± 20.0 pmol/ml, JZL184 vs. 68.9 ± 13.2 pmol/ml, DMSO; $n = 15-17$; $p = 0.0002$) (Supplementary Table S2).

Meanwhile, the plasma concentrations of arachidonic acid, as well as palmitoylethanolamide, were unaffected by JZL184 treatment (Supplementary Table S3).

Blood Pressure, Heart Rate, and Body Weight

Several clinical parameters, blood pressure, heart rate, and body weight, were acquired for mice of all genotypes and treatments. None of them, neither for the myeloid CB2

knockouts, the endothelial CB2 knockouts, nor the cre-negative animals, was affected by JZL184 treatment, as detailed in Supplementary Table S4.

2-AG-Induced Atherogenesis in ApoE-Deficient Mice Is Abrogated in Mice Lacking Myeloid CB2 Receptor Expression

The atherosclerotic plaque burden was visualized by Oil Red O staining of the aortic root. Oil Red O-positive areas were normalized to the size of the vessel wall (Fig. 1a, d). $ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl}$ mice treated with JZL184 showed a significant increase in their atherosclerotic plaque burden ($39.6 \pm 2.1\%$ after JZL184 treatment vs. $32.6 \pm 2.4\%$ with DMSO; $n = 14-15$; $p < 0.05$) (Fig. 1a). This effect of JZL184 was blunted in mice lacking the myeloid CB2 receptor ($ApoE^{-/-}LysM^{cre}CB2^{fl/fl}$), with no significant difference in the atherosclerotic plaque burden between JZL184- and DMSO-treated animals ($35.0 \pm 1.9\%$, JZL184 vs. $34.0 \pm 2.5\%$, DMSO; $n = 14-16$; $p = 0.75$).

To detect infiltrating macrophages in the aortic vessel wall, immunohistochemical staining of CD68 was performed (Fig. 1b and in further detail in Supplementary Fig. S1a). Macrophage infiltration was significantly elevated in the cre-negative animals after JZL treatment (JZL184 $31.6 \pm 1.5\%$ vs DMSO $25.6 \pm 2.1\%$; $n = 14-15$; $p < 0.05$) but not in their cre-positive littermates, lacking the myeloid CB2 receptor (JZL184 $29.9 \pm 1.2\%$ vs DMSO $27.0 \pm 2.1\%$; $n = 14-17$; $p = 0.27$).

For further characterization of the plaques, neutrophils within the atherosclerotic vessel wall were detected by immunofluorescent staining of Ly6G (Fig. 1c and in further detail in Supplementary Fig. S1b). Treatment with JZL184 showed an increase in neutrophil granulocytes in cre-negative mice compared to DMSO controls (JZL184 $8.2 \pm 1.2\%$ vs DMSO $4.1 \pm 0.7\%$; $n = 12-16$; $p < 0.01$). Again, this effect was attenuated in cre-positive mice lacking the myeloid CB2 receptor ($6.1 \pm 0.9\%$, JZL184 vs. $4.1 \pm 0.8\%$, DMSO; $n = 13-17$; $p = 0.11$).

Collagen deposition was studied using Picrosirius red staining (Supplementary Fig. S1c). Interestingly, treatment with JZL184 of mice expressing the myeloid CB2 receptor resulted in a significantly increased collagen content within the atherosclerotic plaque (DMSO vs. JZL184, $1.10 \pm 0.19\%$ vs. $2.75 \pm 0.51\%$; $p < 0.01$; $n = 11-12$). This effect was abolished in mice lacking the myeloid CB2 receptor (DMSO vs. JZL184, $1.55 \pm 0.32\%$ vs. $1.41 \pm 0.22\%$; $p > 0.99$; $n = 14$).

2-AG-Induced Atherogenesis in ApoE-Deficient Mice Was Unaffected in Mice Lacking Endothelial CB2 Receptor Expression

To evaluate the effects of the cell-specific knockout of the CB2 receptor in endothelial cells ($ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}$) on

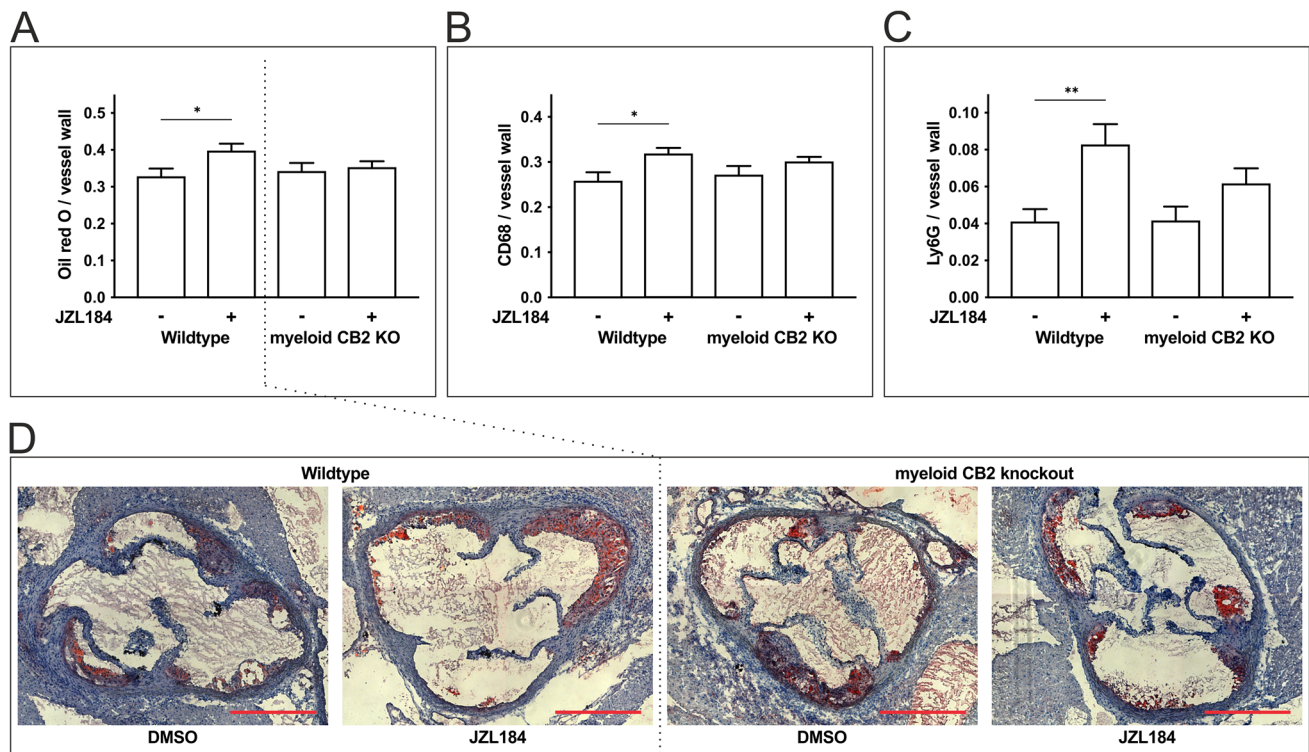


Fig. 1 Assessment of atherogenic effects in mice lacking the myeloid CB2 receptor and in wildtype animals after treatment with JZL184. Staining of aortic valve sections in mice with a myeloid-specific knockout of the CB2 receptor and the respective wildtype controls. **a**, **d** Atherosclerotic plaque volume (Oil Red), **b** monocyte/macrophage

(CD68), and **c** neutrophil (Ly6G) extravasation in mice with and without myeloid CB2 receptor expression. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean; $n=12-17$; * ≤ 0.05 , ** $p \leq 0.01$, as assessed by Student's *t* test. Scale bar, 500 μ m. DMSO, dimethyl sulfoxide; JZL184, inhibitor of monoacylglycerol lipase

the development of atherosclerotic plaques, Oil Red O staining of the aortic wall was performed. The treatment of cre-negative animals ($ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl}$) with JZL184 led to a significant increase in the atherosclerotic plaque burden ($29.5 \pm 3.3\%$ after JZL184 treatment vs. $20.7 \pm 2.1\%$ with DMSO; $n=14$; $p < 0.05$) (Fig. 2a, d). Interestingly, the effect of JZL184 was not attenuated in mice lacking the endothelial CB2 receptor ($ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}$) compared to DMSO controls ($37.1 \pm 3.1\%$ after JZL184 treatment vs. $20.9 \pm 2.6\%$ with DMSO; $n=10-12$; $p < 0.001$) (Fig. 2a).

For further characterization of the atherosclerotic plaque morphology, a CD68 staining was performed to identify monocytes and macrophages (Fig. 2b and in further detail in Supplementary Fig. S1d). JZL184 significantly enhanced the accumulation of monocytes and macrophages within the vessel wall (JZL184 $32.3 \pm 2.2\%$ vs. DMSO $24.5 \pm 2.4\%$; $n=13$; $p < 0.05$) in cre-negative mice ($ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl}$). This effect was mildly impaired in the cre-positive animals ($ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}$) lacking the endothelial CB2 receptor (JZL184 $35.3 \pm 1.8\%$ vs. DMSO $29.5 \pm 2.8\%$; $n=9-12$; $p=0.13$).

Finally, Ly6G staining was performed to identify neutrophils infiltrating the vessel wall (Fig. 2c and detailed in

Supplementary Fig. S1e). Elevated levels of 2-AG after JZL184 injection led to an increased infiltration of neutrophils in the cre-negative mice ($ApoE^{-/-}Tie2^{wt}CB2^{fl/fl}$), compared to vehicle-treated mice (JZL184 $8.1 \pm 1.4\%$ vs DMSO $3.9 \pm 0.7\%$; $n=13-14$; $p < 0.05$). In mice lacking the endothelial CB2 receptor ($ApoE^{-/-}Tie2^{cre}CB2^{fl/fl}$), this effect was less pronounced (JZL184 $8.3 \pm 1.9\%$ vs DMSO $4.8 \pm 0.8\%$; $n=10-12$; $p=0.095$).

Ex Vivo Assessment of Reactive Oxygen Species

In order to gain further mechanistic insights into the effects of 2-AG on atherogenesis, the formation of reactive oxygen species (ROS), as a marker of local inflammation, was measured in mice with/without elevated 2-AG levels in the presence and absence of the CB2 receptor on myeloid cells.

Mice expressing the CB2 receptor ($ApoE^{-/-}LysM^{wt}CB2^{fl/fl}$) showed numerically higher ROS levels, when treated with JZL184 compared to DMSO-treated controls. However, this effect did not reach statistical significance (JZL184 181.7 ± 40.1 RLU/s vs. DMSO 118.7 ± 32.9 RLU/s; $n=15-16$; $p > 0.99$) (Fig. 3a). This numerical difference was not observed in mice lacking the myeloid CB2 receptor

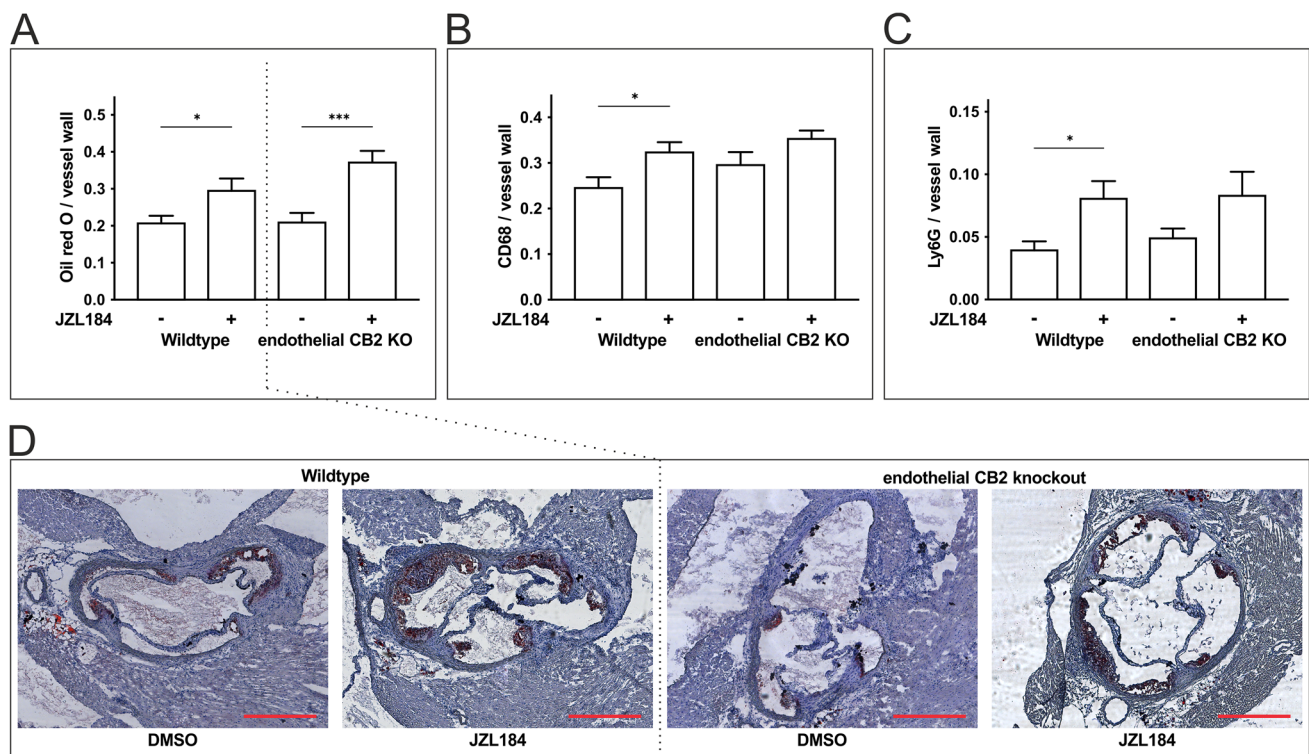


Fig. 2 Assessment of atherogenic effects in mice lacking the endothelial CB2 receptor and in wildtype animals after treatment with JZL184. Staining of aortic valve sections in mice with an endothelial-specific knockout of the CB2 receptor and the respective wildtype controls. **a, d** Atherosclerotic plaque volume (Oil Red), **b** monocyte/macrophage (CD68), and **c** neutrophil (Ly6G) extravasation in mice

with and without the endothelial CB2 receptor expression. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean; $n=9-14$; * ≤ 0.05 , *** $p \leq 0.001$, as assessed by Student's t test. Scale bar, 500 μm . DMSO, dimethyl sulfoxide; JZL184, inhibitor of monoacylglycerol lipase

(*ApoE*^{-/-}*LysM*^{cre}*CB2*^{fl/fl}, JZL184 117.7 ± 25.7 RLU/s vs. DMSO 93.9 ± 32.0 RLU/s; $n=15-16$; $p > 0.99$) (Fig. 3a).

vs. 2-AG [10 μM] + AM630, 4.20 ± 1.03 ; $n=13$; $p > 0.99$) (Fig. 3d).

2-AG Increases ROS and RNS Production In Vitro

These differences in ROS production in vivo prompted us to examine the influence of 2-AG on ROS and RNS production in vitro. Therefore, we stimulated THP-1 cells with increasing concentrations of 2-AG and measured the ROS/RNS as well as superoxide production. Further, we aimed to determine the effect of CB2 on ROS/RNS production by the co-stimulation of THP-1 cells with 2-AG in combination with AM630, which is an inverse agonist for the CB2 receptor.

Stimulation of THP-1 cells with 2-AG [10 μM] caused a slight, yet significant, dose-dependent increase in superoxide (Fig. 3b) and ROS/RNS production (2-AG [10 μM], 1.09 ± 0.019 , $n=17$, $p < 0.01$; 2-AG [5 μM], 1.025 ± 0.010 , $n=17$, $p < 0.05$) (Fig. 3c).

Co-stimulation with AM630 did not attenuate the effect within 48 h of observation, and no significant differences in ROS/RNS production between 2-AG [10 μM] with or without AM630 could be measured (2-AG [10 μM], 4.43 ± 1.05

Neither the Release of MPO Nor the Transcription of NADPH Oxidase Seems To Be Responsible for the Increase of ROS and RNS

To further investigate the pathological mechanism behind the 2-AG dependent elevation of ROS/RNS and superoxide, we took a closer look at the generation of these species. Molecular oxygen is converted to superoxide by the NADPH oxidase 2 (NOX-2) or through its subunits cytochrome b-245 light chain (CYPA) and cytochrome b-245 heavy chain (CYBB). After the conversion of superoxide to hydrogen peroxide, it is converted to ROS by myeloperoxidase (MPO). Therefore, we measured CYBA, CYBB, and MPO concentration in the supernatants of THP-1 cells after stimulation with 2-AG.

Stimulation of THP-1 with 2-AG [1 μM] for 1 h did not change the expression of CYBA (2-AG [1 μM] 1.06 ± 0.49 , $n \geq 3$; $p = 0.90$) (Fig. 3e). Similarly, stimulation with 2-AG [1 μM] did not affect the expression of CYBB (0.98 ± 0.53 after 2-AG [1 μM], $n \geq 3$; $p = 0.97$) (Fig. 3f).

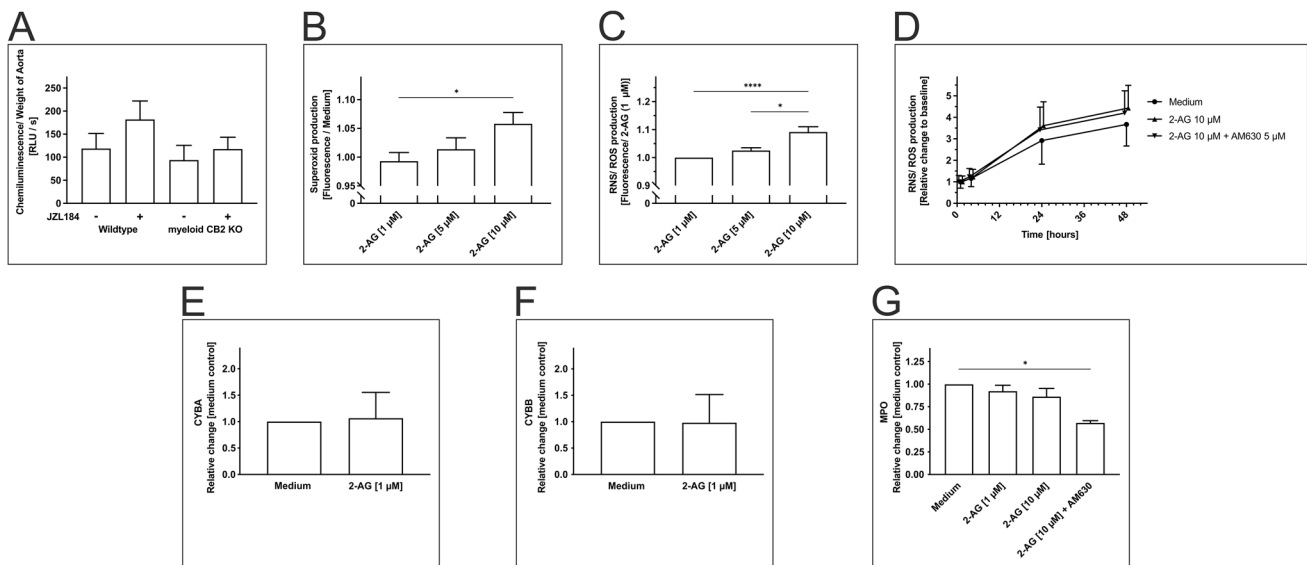


Fig. 3 ROS production and quantification of the transcription of the key regulating enzymes CYBA, CYBB, and MPO by 2-AG in THP-1 cells. **a** L-012 chemiluminescence of aortic tissue. **b** Superoxide and **c**, **d** ROS and RNS production by THP-1 cells, **e**, **f** NADPH oxidase 2 (CYBA, CYBB) transcription, and **g** MPO in cell supernatants after stimulation with 2-AG. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean; $n \geq 3$; * ≤ 0.05 , *** $p \leq 0.001$, assessed by

ANOVA and Bonferroni correction or Kruskal–Wallis test with subsequent Dunn’s multiple comparison for nonparametric testing. 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; AM630, selective inhibitor of CB2; CYBA, cytochrome b-245 alpha polypeptide/cytochrome b-245 light chain; CYBB, cytochrome b-245 heavy chain; DMSO, dimethyl sulfoxide; JZL184, inhibitor of monoacylglycerol lipase; MPO, myeloperoxidase; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species

Additionally, MPO in cell supernatants of THP-1 cells was measured 48 h after stimulation with 2-AG [1 μ M], 2-AG [10 μ M], 2-AG [10 μ M] + AM630 [5 μ M], or medium. No difference compared to medium control was detected after stimulation with 2-AG (2-AG [1 μ M], 0.96 ± 0.06 , $n = 5$, $p > 0.99$; 2-AG [10 μ M], 0.87 ± 0.09 , $n = 5$; $p = 0.74$) (Fig. 3g). Yet, co-stimulation with AM630 attenuated the basal MPO production (2-AG [10 μ M] + AM630 [5 μ M], 0.57 ± 0.02 , $n = 3$, $p < 0.05$) (Fig. 3g).

Stimulation with 2-AG Increases the Concentration of IL-1 β In Vitro

The IL-1 β /IL-6 axis is an important signaling pathway for human and murine atherosclerosis. Earlier studies have shown a link between IL-1 β and the ECS for inflammatory diseases other than atherosclerosis as well as neurological diseases [18, 34]. This prompted us to examine whether the IL-1 β /IL-6 pathway is involved in mediating endocannabinoid-associated effects in the presented cellular and murine models: IL-1 β was measured in supernatants from PBMC after co-stimulation with 2-AG and LPS in various concentrations. We observed a dose-dependent increase in IL-1 β release upon stimulation with 2-AG and LPS (2-AG [10 μ M], 1864 ± 168.2 pg/ml, $n = 12$, $p < 0.01$; 2-AG [1 μ M], 1383 ± 58.9 pg/ml, $n = 12$, $p < 0.05$; DMSO, 1329 ± 101.5 pg/ml) (Fig. 4a).

Levels of Circulating IL-6 Are Not Altered in Mice Lacking the Myeloid CB2 Receptor After Treatment with JZL184

Given this increase in IL-1 β upon stimulation with 2-AG in vitro, we measured the levels of IL-1 β and IL-6 in murine plasma samples. However, no differences in IL-6 were detected between the treatment groups (*ApoE*^{-/-}*LysM*^{cre}*CB2*^{fl/fl}, JZL184 14.3 ± 3.4 pg/ml vs. DMSO 20.1 ± 6.4 pg/ml, $n = 4-6$, $p = 0.41$; *ApoE*^{-/-}*LysM*^{wild}*CB2*^{fl/fl}, JZL184 17.0 ± 3.6 pg/ml vs. DMSO 25.1 ± 6.1 pg/ml, $n = 8-12$, $p = 0.33$) (Fig. 4b). The concentration of IL-1 β remained below the lowest detection range in all animals.

Release of MMP-1 and MMP-9 from Monocytes Is Enhanced After Stimulation with 2-AG

After stimulation with 2-AG [1 μ M], the release of matrix metalloproteinase (MMP)-1 from monocytes into the supernatant significantly increased compared to DMSO control (2-AG, 1.30 ± 0.133 -fold; $n = 7$; $p < 0.01$) (Fig. 4c). Additionally, the concentration of MMP-9 in the supernatant was enhanced compared to DMSO control. This effect was statistically significant, but the relative change appears to be negligible (2-AG, 1.04 ± 0.02 -fold; $n = 10$; $p < 0.01$) (Fig. 4d).

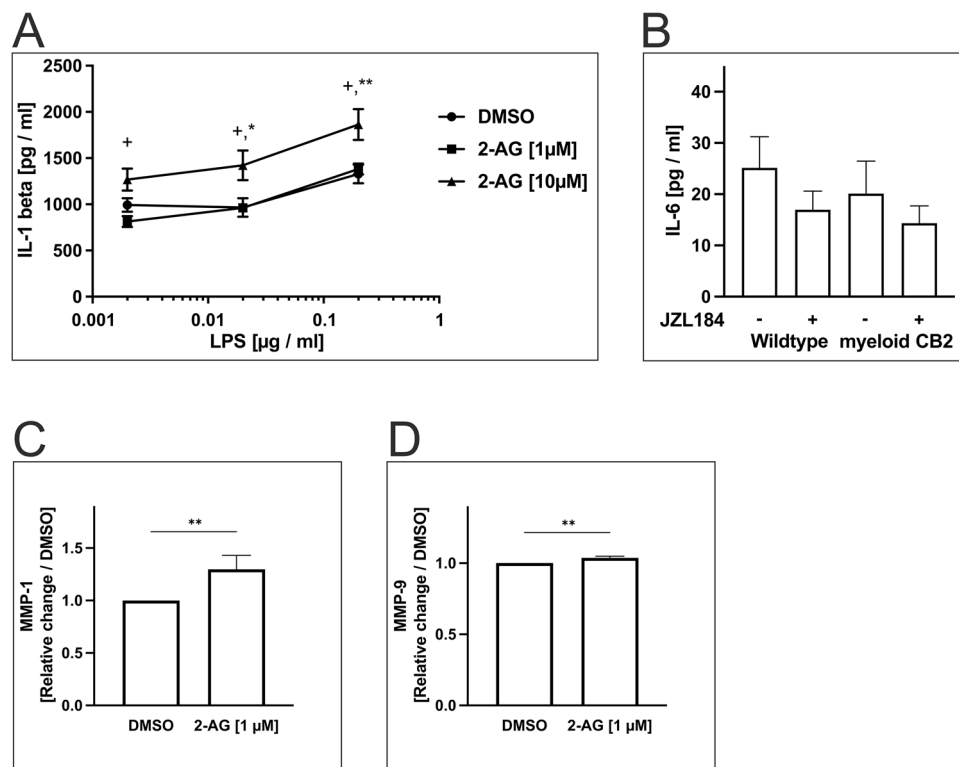


Fig. 4 Quantification of 2-AG-induced production of IL-1 β in vitro and IL-6 in vivo. **a** IL-1 β production by THP-1 cells after co-stimulation with LPS and 2-AG. **b** IL-6 plasma concentration in mice with and without the myeloid CB2 receptor after receiving JZL184 or DMSO treatment. **c** Release of MMP-1 into the supernatants of human monocytes after stimulation with 2-AG. **d** Release of MMP-9 into the supernatants of human monocytes after stimulation with

2-AG. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean. $n=4-12$; * ≤ 0.05 , ** $p \leq 0.01$ compared to DMSO; + $p \leq 0.05$ compared to 2-AG [1 μ M], assessed by ANOVA and Bonferroni correction or Kolmogorov–Smirnov test for nonparametric testing; DMSO, dimethyl sulfoxide; IL, interleukin; JZL184, inhibitor of monoacylglycerol lipase; LPS, lipopolysaccharide; MMP, matrix metalloproteinase; THP-1, human monocytic cell line

Discussion

The present study aimed to elucidate the influence of 2-AG and its receptor CB2 on atherosclerosis. In the early stages of atherosclerosis, an atherogenic environment leads to activation of endothelial cells and increases leukocyte adhesion, while later on, monocytes are guided into the intima by chemokines and sustain continuous inflammation [20]. In the present study, we demonstrated that elevated concentrations of the endocannabinoid 2-AG promote atherosclerosis in ApoE-deficient mice, accompanied by a significant increase in macrophages and neutrophils infiltrating the vessel wall. In the applied in vivo model, the effect of 2-AG was mitigated in animals lacking the myeloid CB2 receptor. In those mice, the plaque burden decreased, as did the number of infiltrating immune cells. These findings corroborate previous data by our own group and by others, where 2-AG was also reported to expedite atherosclerosis, whereas inhibition of the CB2 receptor abolished this effect [12].

In our present study, pharmacological inhibition of MAGL also resulted in a higher collagen content in murine

atherosclerotic plaques. Myeloid-specific depletion of the CB2 receptor abolished this effect. These data agree with previous findings by Vujic et al., where a constitutional knockout of MAGL in ApoE^{-/-} mice (with subsequently elevated 2-AG plasma levels) led to an increased collagen content in atherosclerotic plaques [40].

However, an increased collagen content in atherosclerotic plaques must not be mistaken as a surrogate for an increased plaque stability in rodent models. There are counteracting roles of MMPs, either beneficial by mediating intimal thickening or harmful by thinning the extracellular matrix. Besides, there are several differences in the expression patterns and the pathophysiological role between humans and mice. For example, while MMP-1 is abundantly expressed in human endothelial cells and monocytes and contributes to plaque instability, MMP-1 expression in mice is sparse. However, in one study, artificial expression of human MMP-1 in ApoE^{-/-} mice resulted in smaller atherosclerotic plaques [19, 25]. These data are supported by the present study, where MMP-1 release from human monocytes increased upon stimulation with 2-AG, whereas 2-AG

enhanced collagen deposition in WT mice. Therefore, the question whether a higher collagen content translates into increased plaque stability will have to be assessed in future experiments using the appropriate animal models or virtual histology studies in humans.

Interestingly, CB2 receptor deficiency in endothelial cells did not provide any benefit towards the plaque burden during the pharmacological elevation of 2-AG, although levels of infiltrating monocytes and neutrophils were found to be decreased. Thus, myeloid, and not endothelial, expression of the CB2 receptor appears to promote atherogenesis in the context of elevated 2-AG levels.

In an earlier study, we demonstrated that 2-AG promotes endothelial dysfunction and leukocyte recruitment [8]. 2-AG might contribute to atherosclerosis via endothelial cell activation, but in our present study, endothelial CB2 receptor activation does not appear to modulate the atherosclerotic plaque burden. One possible explanation might be that the endothelial damage in the present ApoE knockout mouse model is already so pronounced and that endothelial CB2 activation has little or no further impact on endothelial dysfunction. Meanwhile, CB2 receptor activation appears to be a fundamental mechanism in the activation of myeloid cells in the context of atherogenesis. This might explain why the knockout of endothelial CB2 receptor expression does not change the overall atherosclerotic plaque burden, while the knockout of myeloid CB2 receptor expression does so.

Treatment with JZL184 increased the amount of neutrophils within atherosclerotic plaques compared to DMSO control, even though this effect was not statistically significant in mice lacking the endothelial or myeloid CB2 receptor. While past studies on CB receptor expression on neutrophils were inconclusive, there is growing consensus that neutrophils do not express CB1 and CB2 receptors [4, 37]. However, murine CB2 receptor depletion increased neutrophil recruitment in a murine model of endotoxemia, probably mediated by expanded MMP-9 secretion [15]. Another study demonstrated that 2-AG activates human neutrophils, which promotes the transmigration of additional neutrophils independent of the CB receptors [4]. Altogether, the observed accumulation of neutrophils might be a CB receptor-independent effect.

The CB1 and the CB2 receptors are both subject to autoinduction by their respective ligands [1, 11]. In line with these data, we demonstrated in an earlier study that a decrease in 2-AG results in reduced CB2 receptor expression in vascular tissue of ApoE^{-/-} mice. However, CB1 receptor expression in vascular tissue was marginal in this trial and not dependent on 2-AG levels [11]. On the contrary, another

study demonstrated that the CB2 activity upregulates CB1 receptor expression in Jurkat cells [1]. Altogether, evidence about the interplay between CB1 and CB2 receptors in the context of elevated endogenous ligands is scarce [1]. Further research is needed, taking into account the cell-specific expression patterns of the respective receptors.

We and others have reported 2-AG to induce macrophage migration in vitro in a CB2-dependent fashion, which might explain the in vivo effects from our current study [12, 17]. Moreover, the present study introduces two possible triggers for the atherogenic effect of 2-AG that are independent of the CB2 receptor: the production of ROS and the secretion of IL-1 β .

It is well-known that ROS production is associated with endothelial dysfunction and inflammation and plays a crucial part in atherogenesis [16, 36]. In addition, several studies provide evidence that the ECS is involved in the modulation of ROS/RNS production [21]. Therefore, we decided to quantify ROS production in murine aortic tissue and in cultured human monocytes. While 2-AG promoted ROS production in vitro, this effect was less pronounced in vivo. In vitro, the inverse CB2 receptor agonist AM630 attenuates basal MPO production, while 2-AG stimulation had no effect.

Several studies have underlined the importance of the IL-1 β /IL-6 axis in atherosclerotic disease. For example, the CANTOS trial showed beneficial effects of targeting IL-1 β [33]. For IL-6, a distinct homeostasis appears to be necessary to prevent atherosclerosis: high levels of IL-6 are clearly connected to atherosclerosis, but on the other hand, atherosclerosis is enhanced in IL-6-deficient mice [6, 36]. The endocannabinoid system influences the expression of IL-6 in several ways. While Chang et al. postulated that 2-AG hampers the expression of IL-6, Saroz et al. showed that activation of the CB2 receptor increases the induction of IL-6 [2, 35]. We measured the levels of IL-6 in mice treated with JZL184. Interestingly, we could not detect any effect on IL-6 levels in JZL184-treated animals.

Meanwhile, our in vitro data suggest that 2-AG activates the NLRP3 inflammasome in a dose-dependent and CB receptor-independent fashion, leading to the liberation of proinflammatory IL-1 β . While this is, to our knowledge, the first report to link 2-AG to NLRP3 activation, one previous study has demonstrated that the endocannabinoid *N*-arachidonylethanolamine (AEA) promotes the excretion of IL-1 β in a diabetic mouse model [13].

We subsequently measured IL-1 β in plasma samples of atherosclerotic mice, but IL-1 β levels remained consistently below the assay's lower limit of detection. Therefore, the activation of the IL-1 β /IL-6 axis by 2-AG is an interesting novel finding in vitro, but it remains unlikely to be a driver of atherosclerosis in our mouse model.

The current study underlines the importance of the endocannabinoid system to the pathophysiology of atherosclerosis in a murine model. Several studies by our lab and by others have also highlighted the importance of the endocannabinoid system to human cardiovascular disease [10, 23, 29, 30, 38]. However, the endocannabinoid system is difficult to use as a drug target, given its ubiquitous expression and its cell- and tissue-specific effects in various pathologies. Thus, cell-specific analyses of ECS effects are warranted to pave the way for the development of targeted therapies. Our present study may represent the first step in this quest.

Study Limitations

In the present study, we examined cellular and molecular effects that are crucial for the development of atherosclerosis. All data were generated in vivo in mice and in vitro in human models. Although those models are established and well-studied, the mechanisms may still vary in humans.

Conclusions

Taken together, data from the present study demonstrate that 2-AG promotes atherogenesis, whereas the absence of the myeloid CB2 receptor attenuates this effect. On the other hand, the endothelial CB2 receptor appears not to be involved in this mechanism. Three potential atherogenic effects of 2-AG were substantiated by our in vitro experiments: the increase in macrophage migration, the production of ROS, and the activation of the NLRP3 inflammasome. Meanwhile, the pathophysiological relevance of these effects in human atherosclerosis remains to be elucidated.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12265-022-10323-z>.

Acknowledgements We owe gratitude to Professor Dr. A. Zimmer from the Institute of Molecular Psychiatry at the University of Bonn (Bonn, Germany) for providing us with *CB2^{fl/fl}* mice, which are the foundation of the current study. We thank Dr. Sandra Adler, Katharina Groll, and Claudia Schwitter for their excellent technical assistance. We thank Dr. Meghan Lucas for the thoughtful revision of this manuscript.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was supported by the BONFOR program (scholarship to JJ) and by the German Heart Foundation (scholarships to EA and MD).

Declarations

Ethics Approval No human studies were carried out by the authors for this article. All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed and approved by the responsible German authority, the North Rhine Westphalian State Agency for Nature, Environment and Consumer Protection (reference number 84–02.04.2014.A419).

Conflict of Interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

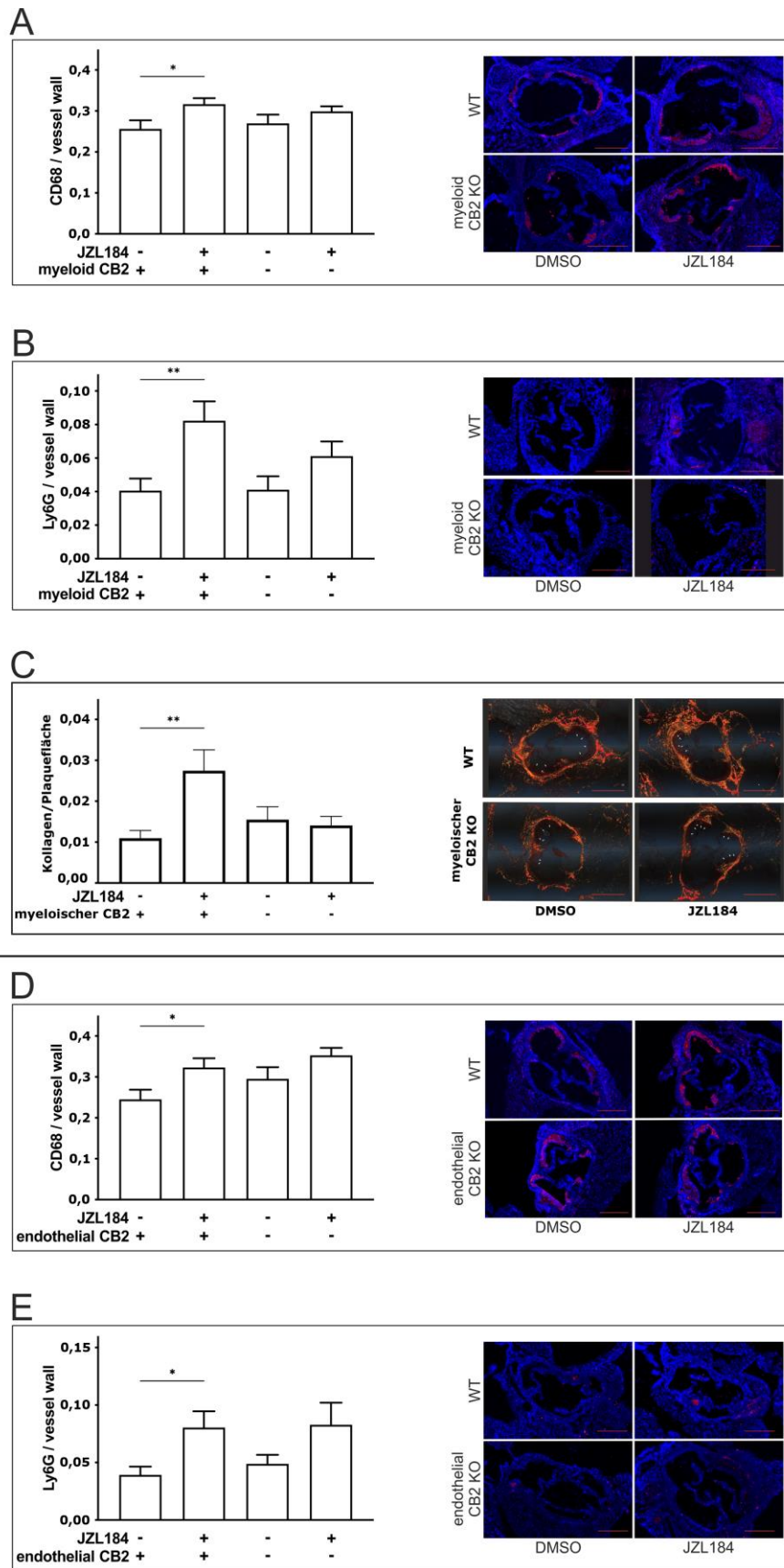
References

1. Börner C, Höllt V, Sebald W, Kraus J. Transcriptional regulation of the cannabinoid receptor type 1 gene in T cells by cannabinoids. *J Leukoc Biol.* 2007;81:336–43. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306224>.
2. Chang YH, Lee ST, Lin WW. Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. *J Cell Biochem.* 2001;81:715–23. <https://doi.org/10.1002/jcb.1103>.
3. Chiurchiù V, Battistini L, Maccarrone M. Endocannabinoid signalling in innate and adaptive immunity. *Immunology.* 2015;144:352–64. <https://doi.org/10.1111/imm.12441>.
4. Chouinard F, Lefebvre JS, Navarro P, Bouchard L, Ferland C, Lalancette-Hébert M, Marsolais D, Laviolette M, Flamand N. The endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol activates human neutrophils: critical role of its hydrolysis and de novo leukotriene B4 biosynthesis. *J Immunol.* 2011;186:3188–96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002853>.
5. 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. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;51:79–88. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.028>.
6. Hartman J, Frishman WH. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiol Rev.* 2014;22:147–51. <https://doi.org/10.1097/crd.0000000000000021>.
7. Hou LJ, Xie MY, Ye W, Zhao GJ. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol inhibits endothelial function and repair through cannabinoid 1 (CB1) receptor. *Int J Cardiol.* 2021;328:176. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.11.027>.
8. Jehle J, Eich L, Danisch M, Bagheri S, Avraamidou E, Pfeifer P, Tiyerili V, Bindila L, Lutz B, Nickenig G. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol inhibits endothelial function and repair. *Int J Cardiol.* 2020;323:243–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.08.042>.

9. Jehle J, Eich L, Nöthel M, Avraamidou E, Pfeifer P, Nickenig G. Reply to “The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol inhibits endothelial function and repair through cannabinoid 1 (CB1) receptor.” *Int J Cardiol.* 2021;330:178. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2021.01.033>.
10. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227142>.
11. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146267>.
12. 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–e0197751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197751>.
13. Jourdan T, Godlewski G, Cinar R, Bertola A, Szanda G, Liu J, Tam J, Han T, Mukhopadhyay B, Skarulis MC, Ju C, Aouadi M, Czech MP, Kunos G. Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nat Med.* 2013;19:1132–40. <https://doi.org/10.1038/nm.3265>.
14. Kamanna VS, Ganji SH, Kashyap ML. Myeloperoxidase and atherosclerosis. *Curr Cardiovasc Risk Rep.* 2013;7:102–7. <https://doi.org/10.1007/s12170-013-0291-3>.
15. Kapellos TS, Recio C, Greaves DR, Iqbal AJ. Cannabinoid receptor 2 modulates neutrophil recruitment in a murine model of endotoxemia. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:4315412. <https://doi.org/10.1155/2017/4315412>.
16. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative stress in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19:42. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>.
17. Kishimoto S, Gokoh M, Oka S, Muramatsu M, Kajiwara T, Waku K, Sugiura T. 2-Arachidonoylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB2 receptor-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2003;278:24469–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301359200>.
18. Krishnan G, Chatterjee N. Endocannabinoids alleviate proinflammatory conditions by modulating innate immune response in Muller glia during inflammation. *Glia.* 2012;60:1629–45. <https://doi.org/10.1002/glia.22380>.
19. Lemaître V, O’Byrne TK, Borczuk AC, Okada Y, Tall AR, D’Armiento J. ApoE knockout mice expressing human matrix metalloproteinase-1 in macrophages have less advanced atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107:1227–34. <https://doi.org/10.1172/jci9626>.
20. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature.* 2021;592:524–33. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03392-8>.
21. Lipina C, Hundal HS. Modulation of cellular redox homeostasis by the endocannabinoid system. *Open Biol.* 2016;6:150276–150276. <https://doi.org/10.1098/rsob.150276>.
22. Lusini M, Nenna A, Chello M. Endocannabinoid system: a new player in the percutaneous and surgical treatment of coronary artery disease? *Int J Cardiol.* 2021;322:211–2. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.08.075>.
23. Maeda N, Osanai T, Kushibiki M, Fujiwara T, Tamura Y, Oowada S, Higuma T, Sasaki S, Yokoyama J, Yoshimachi F, Matsunaga T, Hanada H, Okumura K. Increased serum anandamide level at ruptured plaque site in patients with acute myocardial infarction. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009;23:351–7. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00679.x>.
24. Miller AM, Stella N. CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *Br J Pharmacol.* 2008;153:299–308. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707523>.
25. Newby AC. Metalloproteinases promote plaque rupture and myocardial infarction: a persuasive concept waiting for clinical translation. *Matrix Biol.* 2015;44–46:157–66. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.015>.
26. Nidorf SM, Eikelboom JW, Budgeon CA, Thompson PL. Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:404–10. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.10.027>.
27. Nidorf SM, Fiolet ATL, Mosterd A, Eikelboom JW, Schut A, Opstal TSJ, The SHK, Xu XF, Ireland MA, Lenderink T, Latchem D, Hoogslag P, Jerzewski A, Nierop P, Whelan A, Hendriks R, Swart H, Schaap J, Kuijper AFM, van Helsen MWJ, Saklani P, Tan I, Thompson AG, Morton A, Judkins C, Bax WA, Dirksen M, Alings M, Hankey GJ, Budgeon CA, Tijssen JGP, Cornel JH, Thompson PL. Colchicine in patients with chronic coronary disease. *N Engl J Med.* 2020;383:1838–47. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021372>.
28. Pacher P, Steffens S. The emerging role of the endocannabinoid system in cardiovascular disease. *Semin Immunopathol.* 2009;31:63–77. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0145-8>.
29. Quercioli A, Pataky Z, Montecucco F, Carballo S, Thomas A, Staub C, Di Marzo V, Vincenti G, Ambrosio G, Ratib O, Golay A, Mach F, Harsch E, Schindler TH. Coronary vasomotor control in obesity and morbid obesity: contrasting flow responses with endocannabinoids, leptin, and inflammation. *J Am Coll Cardiol Img.* 2012;5:805–15. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2012.01.020>.
30. Quercioli A, Pataky Z, Vincenti G, Makoundou V, Di Marzo V, Montecucco F, Carballo S, Thomas A, Staub C, Steffens S, Seimbille Y, Golay A, Ratib O, Harsch E, Mach F, Schindler TH. Elevated endocannabinoid plasma levels are associated with coronary circulatory dysfunction in obesity. *Eur Heart J.* 2011;32:1369–78. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr029>.
31. 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. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H2210–2218. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00688.2007>.
32. Rajesh M, Mukhopadhyay P, Haskó G, Huffman JW, Mackie K, Pacher P. CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF-alpha-induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol.* 2008;153:347–57. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707569>.
33. 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. *N Engl J Med.* 2017;377:1119–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914>.
34. Rossi S, Sacchetti L, Napolitano F, De Chiara V, Motta C, Studer V, Musella A, Barbieri F, Bari M, Bernardi G, Maccarrone M, Uziel A, Centonze D. Interleukin-1 β causes anxiety by interacting with the endocannabinoid system. *J Neurosci.* 2012;32:13896–905. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1515-12.2012>.
35. Saroz Y, Kho DT, Glass M, Graham ES, Grimsey NL. Cannabinoid receptor 2 (CB(2)) signals via G-alpha-s and induces IL-6 and IL-10 cytokine secretion in human primary leukocytes. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2019;2:414–28. <https://doi.org/10.1021/acspci.9b00049>.

36. Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heene-man S, Daemen MJ, Drexler H. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation*. 2004;110:3493–500. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000148135.08582.97>.
37. Simard M, Rakotoarivelo V, Di Marzo V, Flamand N. Expression and functions of the CB(2) receptor in human leukocytes. *Front Pharmacol*. 2022;13:826400. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.826400>.
38. 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. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.108.811992>.
39. Tardif JC, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, Pinto FJ, Ibrahim R, Gamra H, Kiwan GS, Berry C, López-Sendón J, Ostadal P, Koenig W, Angoulvant D, Grégoire JC, Lavoie MA, Dubé MP, Rhainds D, Provencher M, Blondeau L, Orfanos A, L'Allier PL, Guertin MC, Roubille F. Efficacy and safety of low-dose colchicine after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2019;381:2497–505. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1912388>.
40. 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. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.109>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Supplementary Figure 1.