

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

Abteilung Medizinische Zellbiologie

Direktor: Prof. Dr. Ralf Kinscherf

des Fachbereichs für Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die Bedeutung von PACAP (Pituitary Adenylate
Cyclase-Activating Polypeptide) bzw. seines
Rezeptors PAC1 für die Entwicklung und
Progression der Atherosklerose in 10 Wochen
mit Cholesterin-gefütterten ApoE-defizienten
Mäusen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Philip Neudert

aus Alsfeld

Marburg 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Ralf Kinscherf

1. Koreferent: Prof. Dr. Jürgen Schäfer

Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1 PACAP und PACAP-Rezeptoren	1
1.1.1 PACAP	1
1.1.2 PACAP-Rezeptoren	4
1.1.3 Funktion	9
1.2 Lipidstoffwechsel und (Apo)lipoproteine.....	11
1.2.1 Lipoproteine	11
1.2.2 Transport exogener Lipide	12
1.2.3 Transport endogener Lipide	13
1.2.4 Reverser Cholesterintransport	14
1.2.5 Apolipoproteine	14
1.2.6 Apolipoprotein E.....	15
1.3 Kardiovaskuläres System.....	18
1.3.1 Kreislaufsystem.....	18
1.3.2 Pathologien (Atherosklerose, KHK, Myokardinfarkt)	19
1.3.3 ApoE / PACAP / PAC1 und Atherosklerose	21
1.4 Immunhistochemische Marker atherosklerotischer Plaques	23
1.4.1 Morphologische Marker.....	23
1.4.2 Remodelling Marker der atherosklerotischen Plaque.....	25
1.4.3 Inflammationsmarker.....	27
1.5 Zielsetzung der Arbeit	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Antikörper, Chemikalien, Geräte und Materialien	32
2.1.1 Antikörper.....	32
2.1.2 Chemikalien	33
2.1.3 Geräte und Material	34

2.1.4	Oligonukleotide	35
2.2	Mäuse	35
2.2.1	Generierung	35
2.2.2	Genotypen	36
2.2.3	Fütterung, Gewebe- und Blutentnahme	36
2.2.4	Bestimmung der Plasmalipid- und -cholesterolspiegel.....	37
2.3	Histologie	37
2.3.1	Chromalaunbeschichtung der Objektträger.....	37
2.3.2	Herstellung der Histologieschnitte.....	38
2.3.3	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	38
2.3.4	Protokoll für Immunhistochemische Färbungen	39
2.3.5	Verdünnungen der verwendeten Antikörper.....	40
2.4	Auswertung	40
2.4.1	Immunhistochemie und Histomorphometrie.....	40
2.4.2	Statistische Auswertung	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Körpergewicht und Tibialänge.....	42
3.1.1	Körpergewicht	42
3.1.2	Tibialänge	43
3.2	Plasma-Analysen	44
3.2.1	Plasma-Cholesterinspiegel	44
3.2.2	Plasma-Triglyceridspiegel	45
3.3	Lumenstenose.....	46
3.4	Morphologische Marker	47
3.4.1	MoMa-2 (Monozyten & Makrophagen).....	47
3.4.2	sm- α -Actin (glatte Muskelzellen)	47
3.5	Remodeling Marker	50
3.5.1	ATG5.....	50

3.5.2 Ki-67 (Proliferation)	50
3.5.3 Caspase 3, RIP3	50
3.6 Inflammationsmarker	55
3.6.1 Interleukin-6	55
3.6.2 Interleukin 1 β , COX-2, TNF- α	55
4 Diskussion	60
4.1 Körpergewicht und Tibialänge	60
4.2 Plasma-Cholesterin- und –Triglyceridspiegel	61
4.3 Lumenstenose	62
4.4 Immunhistochemie	63
4.4.1 Morphologische Marker	63
4.4.2 Remodeling-Marker	65
4.4.3 Inflammationsmarker	69
4.5 Diskussion der Methoden und Ausblick	73
5 Zusammenfassung	74
5 Summary	76
6 Literatur	78
7 Anhang	113
8 Liste der akademischen Lehrer	117
9 Ehrenwörtliche Erklärung	- 118 -
10 Danksagung	- 119 -
11 Lebenslauf	- 120 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Organisation des menschlichen PACAP-Gens und der PACAP-mRNA.....	2
Abbildung 2: Primärstruktur von PACAP38 und die jeweiligen Funktionen der Domänen.....	3
Abbildung 3: Vergleich der Aminosäuresequenzen von PACAP aus verschiedenen Wirbeltierarten.....	4
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege der VIP/PACAP-Rezeptoren.....	5
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bindung des Neuropeptids VIP an einem VPAC1-Rezeptor.	7
Abbildung 6: Schematische Darstellung der intrazellulären Mechanismen und der Vermittlung neurotropher Effekte.....	8
Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Lipoproteinmizells.....	11
Abbildung 8: Größe und Zusammensetzung der Lipoproteine	12
Abbildung 9: Strukturmodell des Apolipoprotein E.....	17
Abbildung 10: Wandaufbau der arteriellen und venösen Blutgefäße.....	19
Abbildung 11: Entstehung atherosklerotischer Läsionen Gefäßwand	20
Abbildung 12: Herstellung von PACAP- bzw. PAC1-defizienter Mäuse	35
Abbildung 13: durchschnittliches Körpergewicht	42
Abbildung 14: durchschnittliche Tibialänge	43
Abbildung 15: durchschnittlicher Plasma-Cholesterinspiegel	44
Abbildung 16: durchschnittlicher Plasma-Triglyceridspiegel.....	45
Abbildung 17: Lumenstenose	46
Abbildung 18: MoMa-2	48
Abbildung 19: sm- α -Actin	49
Abbildung 20: ATG5	51
Abbildung 21: Ki-67	53
Abbildung 22: RIP3.....	54
Abbildung 23: RIP3.....	54
Abbildung 24: Interleukin-6.....	56
Abbildung 25: Interleukin-1 β	57
Abbildung 26: Interleukin-1 β	57
Abbildung 27: TNF- α	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lipoproteine	12
Tabelle 2: Eigenschaften der menschlichen Apolipoproteine	15
Tabelle 3: verwendete Primärantikörper	32
Tabelle 4: verwendete Sekundärantikörper	32
Tabelle 5: Verdünnung der Primärantikörper	40
Tabelle 6: Verdünnung der Sekundärantikörper	40

Abkürzungsverzeichnis

ABCA1: ATP-bindender Kassetten Transporter A1 (engl. „ATP-binding cassette transporter A1“)

ANP: Atriales Natriuretisches Peptid

AQP: Aquaporin

AS: Aminosäure

ATP: Adenosin Triphosphat

BCA: Bicinchoninsäure (engl. „bicinchoninic acid“)

Bcl-2: B-Zell Lymphom 2 Protein (engl. „B-cell lymphoma 2 protein“)

bp: Basenpaare

BSA: Rinder-Serum-Albumin (engl. „bovine serum albumin“)

cAMP: zyklisches Adenosin Monophosphat (engl. „cyclic adenosine monophosphate“)

cDNA: zyklische Desoxyribonukleinsäure (engl. „cyclic deoxyribonucleic acid“)

cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat (engl. „cyclic guanosine monophosphate“)

CETP: Cholesterinester Transfertprotein

COX-2: Cyclooxygenase 2

CO: Kohlenmonoxid

CRE: cAMP empfindlicher Bereich (engl. „cAMP response element“)

DAB: Diaminobenzidin

dest.: destilliert

ER/ rER: Endoplasmatisches Retikulum / raues Endoplasmatisches Retikulum

FS: Fettsäure

HDL: Lipoprotein hoher Dichte (engl. „High-Density Lipoprotein“)

HE: Hämatoxylin-Eosin

HRP: Meerrettich-Peroxidase-Komplex (engl. „horseradish peroxidase complex“)

ICAM: Interzelluläres Adhäsions Molekül (engl. „intercellular adhesion molecule“)

IDL: Lipoprotein mittlerer Dichte (engl. „Intermediate Density Lipoprotein“)

IF: Interferon

Ig: Immunglobulin

IL: Interleukin

KC (CXCL1): Chemokin Ligand 1

LCAT: Lecithin Cholesterin Acyltransferase

LDL: Lipoprotein niedriger Dichte (engl. „Low Density Lipoprotein“)

MAPK: Mitogen aktivierte Protein Kinase

MCP: Monozyten Lockstoff Protein (engl. „monocyte chemoattractant protein“)

MIP: Makrophagen Inflammatorisches Protein

MOMA: Monozyten/Makrophagen

mRNA: Boten-Ribonukleinsäure (engl. „messenger ribonucleic acid“)

n-ted: N-terminale Ektodomäne

Ncl.: Nukleus (engl. „Nucleus“)

NO: Stickstoffmonoxid (engl. „nitrogen oxid“)

NPC1L1: Niemann-Pick C1 ähnliches Protein 1 (engl. „Niemann-Pick C1 like 1“)

ORF: Offener Leserahmen (engl. „open reading frame“)

PACAP: Hypophysen-Adenylat-Cyclase-aktivierendes Polypeptid (engl. „Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide“)

PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. „Phosphate Buffered Saline“)

PECAM-1: Thrombozytäres Endotheliales Zelladhäsionsmolekül 1 (engl. „Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule“)

PFA: Paraformaldehyd

PGF: Plazentarer Wachstumsfaktor (engl. „placental growth factor“)

PKC: Proteinkinase C

POD: Peroxidase

PRP: PACAP-verwandtes Peptid (engl. „PACAP-related Peptide“)

RCX: Ramus circumflexus

RE: Rheumatische Erkrankung

Rhod: Rhodamin

RIVA: Ramus interventricularis anterior

SEM: Standardfehler des Mittelwertes (engl. „standard error of the mean“)

TAG: Triacylglycerine

TAMM40: Translokase der äußeren Mitochondrienmembran (engl. „translocase of outer mitochondrial membrane 40“)

TNF: Tumornekrosefaktor

TRE: 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Azetat empfindliche Region (engl. „12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate response molecule“)

VCAM: Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. „Vascular Cell Adhesion Molecule“)

VEGF: Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. „Vascular Endothelial Growth Factor“)

VIP: Vasoaktives Intestinales Polypeptid

VLDL: Lipoprotein sehr niedriger Dichte (engl. „very-low-density lipoprotein“)

1. Einleitung

1.1 PACAP und PACAP-Rezeptoren

1.1.1 PACAP

ADCYAP1 (= „Adenylate Cyclase Activating Polypeptide 1“), auch bekannt als PACAP, das Hypophysen-Adenylat-Cyclase-aktivierende Peptid, wurde erstmals 1989 aus Hypothalamusgewebe von Schafen isoliert (Miyata et al., 1989). Es gehört heute zu den am häufigsten untersuchten Neuropeptiden, was durch die beeindruckende Anzahl an Publikationen über PACAP (aktuell fast 4000) verdeutlicht wird. Die Eigenschaft, den intrazellulären cAMP-Spiegel über die Aktivierung der Adenylatcyclase zu erhöhen, war namensgebend für das aus 38 Aminosäuren bestehende Peptid (Miyata et al., 1989). Ein Jahr später gelang es Miyata et al., eine kürzere Form mit nur 27 Aminosäuren (PACAP-27) zu isolieren, welches nahezu identische Eigenschaften wie PACAP-38 besaß (Miyata et al., 1990). PACAP wurde zwar kurz nach seiner Entdeckung hauptsächlich als Neuropeptid verstanden, wird aber mittlerweile als ein pleiotrop wirkendes Peptid angesehen (Vaudry et al., 2000), nachdem es in zahlreichen Organsystemen (beispielsweise Herz-Kreislaufsystem, Gastrointestinaltrakt, Geschlechtsorganen) nachgewiesen wurde.

1.1.1.1 Genetik

Die Nukleotidsequenz des humanen PACAP konnte erstmals 1992 isoliert und bestimmt werden. Beim Menschen codiert die cDNA für ein Präpro-Protein mit 176 Aminosäuren, welches ein Signalpeptid mit 24 Aminosäuren beinhaltet (Hosoya et al., 1992). Das Gen selbst trägt die Bezeichnung „ADCYAP1“ (Cai et al., 1995). Seine Promotorsequenz lässt sich in die beiden Teile P1 / P2 aufteilen und enthält knapp 400bp; in beiden Abschnitten finden sich eine „initiator-like“- und eine CT-reiche Region (Jankowski and Dixon, 1987; Ohkubo et al., 1992).

Das PACAP-Gen besteht aus fünf Exons und 4 Introns und befindet sich auf der p11-Region des 18. Chromosoms (Hosoya et al., 1992; Chang et al., 1993; Larsen et al., 1996). Es ähnelt darüber hinaus in seiner Struktur dem Gen des verwandten VIP (Lamperti et al., 1991), wodurch auch die Vorläuferproteine große Ähnlichkeit aufweisen.

Das Vorläuferpeptid beinhaltet neben der Aminosäuresequenz für PACAP38, welche am C-Terminale Ende liegt, ein weiteres Peptid mit 29 Aminosäuren. Dieses befindet sich in Richtung des N-Terminus und wird als PACAP-verwandtes Peptid (engl. „PACAP-related Peptide“; PRP) bezeichnet. Dabei liegt die Geninformation für PRP auf dem Exon 4, jene für PACAP38 auf Exon 5 (s. Abb.1) (Vaudry et al., 2009). Aus dem Vorläuferpeptid wird posttranslational durch unterschiedliche Prozessierung PACAP38 [Pro-PACAP (131-168)] und PACAP27 [Pro-PACAP (131-151)] hergestellt. (Grimaldi and Cavallaro, 1999)

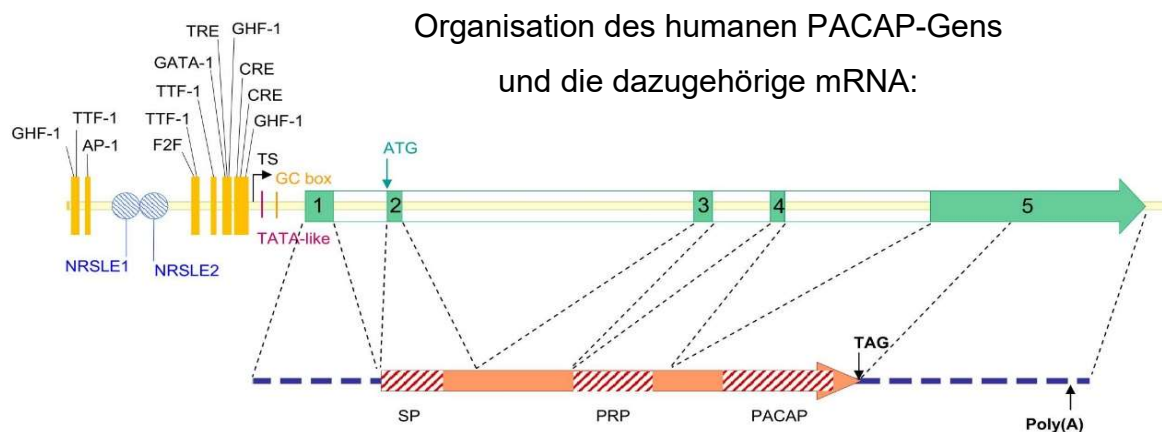


Abbildung 1: Organisation des menschlichen PACAP-Gens und der PACAP-mRNA. Die fünf Exons sind grün umrandet und nummeriert. Die nicht übersetzten Regionen von Exon 1 und 5 sind durch eine blaue gestrichelte Linie gekennzeichnet. Exon-Domänen, die SP, PRP und PACAP codieren, sind rot schraffiert. AP-1, Aktivatorprotein-1; Inr-ähnliches, initiatorähnliches Element; NRSLE, neuronales restriktives Schalldämpfer-ähnliches Element; SP, Signalpeptid; TRE, 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat-Antwortelement; TS, Transkription (aus: Vaudry et al., 2009; modifiziert)

Die enorme Bedeutung von PACAP bei Säugetieren kommt einmal mehr im genetischen Aspekt zum Vorschein, denn die Nukleotidsequenzen von humanen und beispielsweise Schaf-cDNAs, die für die jeweiligen Vorläufer codieren, sind selbst in der nicht codierenden Region sehr homolog. Die PACAP-Vorläufer sind darüber hinaus in der Aminosäuresequenz und der Gesamtstruktur sehr ähnlich (Ohkubo et al., 1992).

1.1.1.2 Regulierung der Expression

PACAP wird konstitutiv exprimiert und die Transkription des PACAP-Gens kann durch verschiedene Einflüsse moduliert werden. Eine verstärkte Transkription konnte durch cAMP, 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA), Thyroid-spezifischen Transkriptionsfaktor 1, Dexamethason, Progesteron und sogar durch PACAP selbst induziert werden (Suzuki et al., 1994; Ha et al., 2000; Hashimoto et al., 2000; Kim et al., 2002; Lo Chi-Wei et al., 2007; Yang et al.,

2007). Die Promotorsequenz des PACAP-Gens besitzt außerdem response-Elements für cAMP (CRE) und TPA, weshalb durch diese Liganden eine Aktivierung erfolgen kann (Bodner et al., 1988; Dollé et al., 1990).

1.1.1.3 Struktur

Die Primärstruktur von PACAP wurde neben Menschen und Mäusen bereits in diversen weiteren Säugetieren bestimmt (Miyata et al., 1989). Sieben verschiedene Prohormonkonvertasen sind für die Prozessierung von PACAP38 und dem PRP aus dem Vorläufer-Protein verantwortlich (Seidah et al., 1994; Seidah et al., 1998). PACAP27 besitzt eine ungeordnete N-terminale Sequenz von acht AS, auf die vier unterschiedliche strukturierte Domänen folgen. Dabei umfasst die erste Domäne (AS 9-12) eine β -Schleife, während die drei anderen (AS 12-14; AS 15-20; AS 22-24) α -Helices darstellen (INOOKA et al., 1992). PACAP 38 besitzt die gleiche Grundstruktur wie PACAP27, am C-Terminus schließt sich jedoch eine weitere Helix an, welche in Richtung des N-Terminus abknickt (Wray et al., 1993). PACAP27 kann durch die Spaltung des Tripeptids Gly¹⁵⁸-Lys¹⁵⁹-Arg¹⁶⁰ aus Pro-PACAP (131-151) generiert werden, während diese Spaltung bei der Herstellung von PACAP 38 aus Pro-PACAP (131-168) nicht erfolgt (Okazaki et al., 1992). PACAP38 und PACAP27 werden posttranslational von Peptidylglycin α -amidierenden Monooxygenasen (PAM) an dem jeweiligen C-Terminus α -amidiert, wodurch sie in ihre aktive Form übergehen (Eipper et al., 1992a; Eipper et al., 1992b). Die Struktur von PACAP38 lässt sich mit den verschiedenen Funktionen des Peptids in Verbindung bringen (s. Abb. 2). Es zeigen sich Domänen, die für die Erkennung, Aktivierung und Selektivität der Rezeptoren verantwortlich sind (Bourgault et al., 2009):

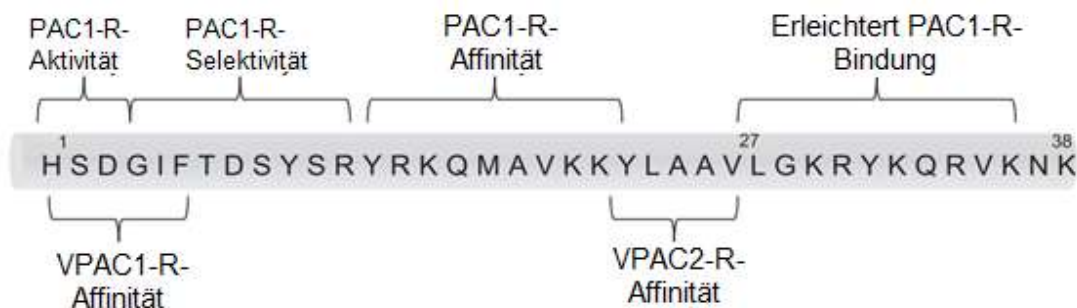


Abbildung 2: Primärstruktur von PACAP38 und die jeweiligen Funktionen der Domänen. Die Buchstaben stehen für die Aminosäuren, die Zahlen zeigen die Position an. (Vaudry et al., 2009)

Die ähnliche Affinität an die Rezeptoren VPAC1 und VPAC2 von PACAP und VIP lässt sich durch die großen Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen der jeweiligen Peptidhormone erklären (INOOKA et al., 1992). Die N-Terminale Region 1-27, die hauptsächlich für die biologische Aktivität verantwortlich ist (Gonzalez et al., 1998), zeigt in verschiedenen Lebensformen (Säugetiere, Amphibien, Fische...) große Übereinstimmungen und ist im Laufe der Evolution über diverse Spezies hinweg konserviert, während die C-Terminale Region, welche keine bedeutende biologische Funktion innehat, einige Variablen aufzeigt (Abb.3). Die Bedeutung der N-Terminale Region wird durch die Folgen einer Deletion der Aminosäure His¹ veranschaulicht: ohne His¹ sinkt die Affinität von PACAP27 an den humanen PAC1-Rezeptor um 50% (Gourlet et al., 1991; Bitar and Coy, 1993).

Mensch, Rind, Schaafl, Schwein, Maus, Ratte	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVL <u>G</u> KRYKQRVKNK	100 %
Huhn	-I----- <u> </u> -----	97 %
Eidechse	----- <u> </u> -----	100 %
Frosch	----- <u> </u> -----I---	97%
Lungenfisch	----- <u> </u> -----K-----	97%
Goldfisch-a	----- <u> </u> -----R-----	97%
Goldfisch-b	----- <u> </u> -----R--I---	95%
Lachs	----- <u> </u> -----R--YR--	92 %
Katzenfisch	----- <u> </u> -----R--R--FR--	89 %

Abbildung 3: Vergleich der Aminosäuresequenzen von PACAP aus verschiedenen Wirbeltierarten und einem Protochordat. Prozentsätze zeigen die Aminosäureidentität zwischen PACAP38 von verschiedenen Nicht-Säugetier-Wirbeltieren und Säugetier-PACAP38, zwischen dem Manteltier PACAP27 und dem Säugetier-PACAP27 an. -: Aminosäuren, die mit denen von PACAP von Menschen übereinstimmen. Die potentiellen Spalt-Amidierungsstellen sind unterstrichen. (aus: Vaudry et al., 2009; modifiziert)

1.1.2 PACAP-Rezeptoren

Bisher wurden zwei verschiedene PACAP-Rezeptortypen identifiziert, die sich in ihrer Affinität zu PACAP und VIP unterscheiden (Shivers et al., 1991). Die Rezeptoren für PACAP und VIP wurden 1998 von der IUPHAR (International Union of Pharmacology) nach ihrer Bindungsaffinität für die verschiedenen Liganden eingeteilt. Unterschieden wird zwischen Rezeptoren, die sowohl PACAP als auch VIP mit hoher Affinität binden (VPAC1 und VPAC2), und solche, die PACAP nahezu selektiv stimuliert (PAC1) (Harmar et al., 1998). Davor sprach man von den Bindungstypen I und II. Die Rezeptoren gehören zur Klasse B der

G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die sich schon in vor 700 Millionen Jahren lebenden eukaryontischen Lebewesen nachweisen lassen (Tatsuno et al., 1990; Nguyen et al., 1993). PACAP-Rezeptoren finden sich zum einen in diversen peripheren Geweben, wie zum Beispiel Blutgefäßen, Nieren, Lungen und Duodenum (Gottschall et al., 1990; Shivers et al., 1991; Reubi, 2000), zum anderen aber auch in hoher Dichte in Organen des ZNS, darunter Hypothalamus, Hypophyse, Bulbus olfactorius und in Granulozyten des Kleinhirns (Hashimoto et al., 1996; Shioda et al., 1997). Außerdem finden sie sich in verschiedenen Immunzellen, zum Beispiel in Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen, Mikroglia und Mastzellen (Delgado et al., 2004).

1.1.2.1 Typ-I-PACAP-Rezeptor (PAC1)

PAC1 ist ein Mitglied der B1-Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Harmar, 2001) und konnte erstmals 1990 in Pankreaskarzinomzellen einer Ratte gefunden werden (Buscail et al., 1990). Schnell wurde nachgewiesen, dass es für PACAP38 und PACAP27 spezifische, hochselektive Bindungsstellen gibt, da sie andere Liganden aus der Glukagon-VIP-PACAP-Superfamilie nur sehr schwach binden (s. Abb. 4). Diese Bindungsstellen nannte man daher Typ-I-Bindungsstellen (Gottschall et al., 1990). Verschiedene Subtypen des PAC1-Rezeptors binden PACAP38 und PACAP27 dabei unterschiedlich stark (Cauvin et al., 1991; Robberecht et al., 1991). Bindet PACAP an PAC1, wird über die

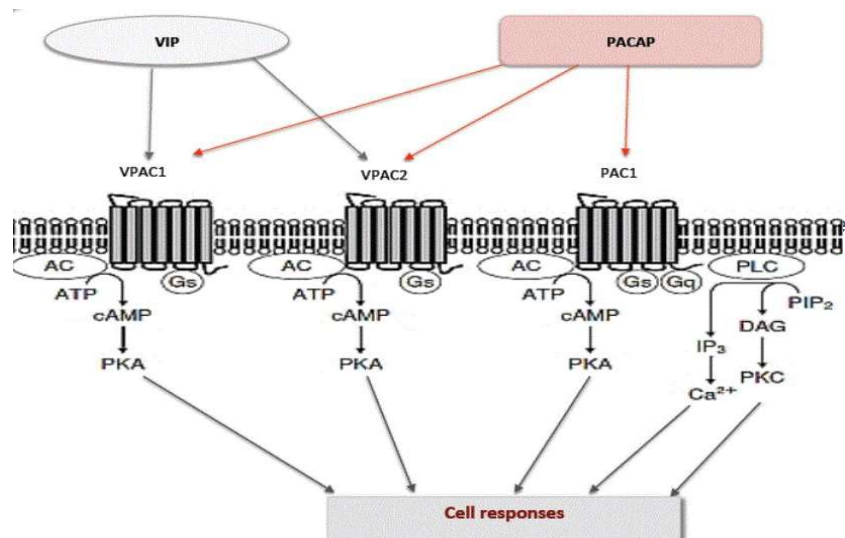


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege der VIP/PACAP-Rezeptoren. VIP: Vasoactives Intestinales Peptid; PAC1: spezifischer PACAP-Rezeptor 1; VPAC1: Rezeptor 1 für VIP & PACAP; VPAC2: Rezeptor 2 für VIP & PACAP; AC: Adenylatcyclase; DAG: Diacylglycerol; IP3: Inositol Trisphosphate; PKA: Protein-Kinase A; PKC: Protein-Kinase C; cAMP: cyclisches Adenosin Monophosphat; ATP: Adenosin Triphosphat; PIP2: Phosphatidylinositol Biphosphat. (aus: Diané et al., 2014; modifiziert)

Adenylatcyclase mittels eines Gs-Signalweg (G-Protein stimulatorisch) der intrazelluläre cAMP-Spiegel erhöht (Delporte et al., 1995). Beachtenswert ist, dass der PACAP-Rezeptor PAC1 neben der Adenylatzyklase auch die Phospholipase C über einen Gq-Signalweg (G-Protein chemotaktisch) stimuliert, da unter den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren Effekte über verschiedene Signalwege selten sind (Pisegna and Wank, 1996).

1.1.2.2 Typ-II-PACAP-Rezeptor (VPAC1 und VPAC2)

Kurz nach der Entdeckung von PACAP wurde festgestellt, dass für PACAP und das schon länger bekannte VIP Rezeptoren mit sehr ähnlicher Bindungsaffinität existieren (Typ-II-Rezeptoren) (Gottschall et al., 1990). Diese Rezeptoren wurden in den folgenden Jahren weiter untersucht und in zwei Untertypen eingeteilt, deren Exprimierungsorte und -dichten sich nur gering voneinander unterscheiden: Der Rezeptor VPAC1 konnte 1992 zuerst aus Rattenlungen isoliert werden (Ishihara et al., 1992), sein humanes Homolog ein Jahr später aus einer Kolonkarzinom-Zelllinie (Sreedharan et al., 1993) und wurde im Jahr 1996 schließlich in Mäusen entdeckt (Johnson et al., 1996). Die Klonierung von VPAC2 erfolgte erstmals 1993 aus dem Bulbus olfactorius einer Ratte (Lutz et al., 1993), ein Jahr später bei Menschen und Mäusen (Inagaki et al., 1994; Svoboda et al., 1994).

1.1.2.3 Genetik

Das Gen des PAC1-Rezeptors weist mehr als 50kb auf und ist in 18 Exons unterteilt (Aino et al., 1995). In der humanen DNA befindet es sich auf Chromosom 7 in der Region p15-p14 (Stoffel et al., 1994; Brabet et al., 1996). Die proximale Promotorregion enthält eine CCAAT-Box und zwei potenzielle Protein-1-Bindungsstellen, die durch Koppelung von Transkriptionsfaktoren die Synthese von PAC1 aktivieren können (Dyanan and Tjian, 1983; Skak and Michelsen, 1999). Die humane VPAC1-cDNA wurde erstmals aus Zellen eines Adenokarzinoms des Kolons isoliert (Sreedharan et al., 1993). Das Gen ist 22kb lang und enthält 13 Exons (Sreedharan et al., 1995; Pei, 1997). Es befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 in der Region p22 (Sreedharan et al., 1995). Das Gen des humanen VPAC 2 dagegen liegt auf Chromosom in der q36-Region (Mackay et al., 1996). Mit seinen 117kb ist es zwar mehr als fünfmal so

lang wie das VPAC1-Gen, enthält jedoch genau wie dieses 13 Exons (Lutz et al., 1999).

1.1.2.4 Struktur

Die cDNA des Rezeptors PAC1 kodiert für ein Protein mit 495 Aminosäuren, welches sieben membranständige Domänen besitzt und den cDNA-Sequenzen der Rezeptoren anderer Mitglieder der Glukagon-Sekretin-Superfamilie ähnelt (Pisegna and Wank, 1993). Die Molekülmasse beträgt bei Ratten 65 kDa (Buscaill et al., 1990). Durch alternatives Spleißen können sechs verschiedene Varianten des Proteins entstehen, welche sich in ihrer Aktivierung der Adenylatzyklase und Phospholipase C unterscheiden (Spengler et al., 1993; Journot et al., 1995). Bei den Spleißvarianten können die Exons „hip“ und „hop“ entweder fehlen oder vorhanden sein, was zu jeweils unterschiedlichen Eigenschaften der Rezeptoren führt (Journot et al., 1995). Für die Bindung von PACAP an seinen Rezeptor PAC1 ist die N-terminale Ektodomäne (= N-ted) des Proteins verantwortlich (Dejda et al., 2011). Diese Eigenschaft lässt sich auch bei anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Klasse B beobachten (Laburthe and Couvineau, 2002; Laburthe et al., 2007; Couvineau et al., 2012; Couvineau and Laburthe, 2012). Die Proteinstruktur enthält eine wichtige „Sushi-Domäne“, die durch zwei antiparallele β -Faltblätter gekennzeichnet ist und zwischen den aromatischen Ringen zweier Tryptophanreste stabilisiert ist. Die PACAP-Rezeptoren binden ihren Liganden auf eine Weise, die für das zwei-Domänen-Bindungsmodell G-Protein gekoppelter Rezeptoren der Klasse B typisch ist (s. Abb. 5): der Rezeptor wird aktiviert, indem der C-terminale und der zentrale α -helikale Teil des Peptidhormons mit der Sushi-Domäne in der N-terminalen Ektodomäne (N-ted) interagieren. Dadurch wird der N-Terminus des Ligand so positioniert, dass er

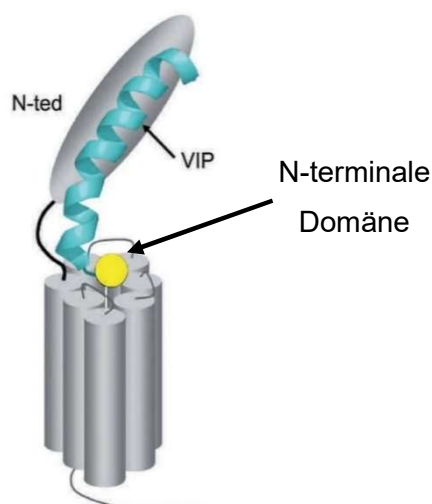


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bindung des Neuropeptids VIP an einem VPAC1-Rezeptor. Es erfolgt eine Interaktion der N-terminalen Ektodomäne (N-ted) mit zentralen Strukturen des Peptidhormons (blau), wodurch dessen N-terminale Domäne (gelb) am Rezeptorkern positioniert wird. Dadurch wird dieser aktiviert. (aus: Laburthe et al., 2007; modifiziert)

die Transmembranregion seines Rezeptors kontaktieren kann, was schließlich zu dessen Aktivierung führt (Laburthe und Couvineau, 2002; Laburthe et al., 2007; Bourgault et al., 2009; Couvineau und Laburthe, 2012). Wie auch PAC1 besitzen die unselektiven PACAP-Rezeptoren VPAC1 und VPAC2 ähnliche strukturelle Eigenschaften wie andere Mitglieder der G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Klasse B, wobei die cDNA des humanen VPAC1 für ein 457 AS langes und 52 kDA schweres Protein kodiert (Sreedharan et al., 1993) und die cDNA von VPAC2 für eines mit 438 AS und einem Gewicht von 49,5 kDa (Adamou et al., 1995). Die Aktivierung von PAC1 induziert eine dosisabhängige Stimulation der Produktion von cAMP und Phosphoinositoltriphosphat (Gonzalez et al., 1994; Basille et al., 1995; Favit et al., 1995; Villalba et al., 1997). Zum einen stimuliert PACAP Phospholipase-C-vermittelt die Calciummobilisierung und eine Blockade von Kaliumkanälen (Zerr and Feltz, 1994; Gonzalez et al., 1996; Mei, 1999), wodurch es an der Apoptose beteiligt ist (Colom et al., 1998; Kobayashi and Mori, 1998; Krebs, 1998). Auf der anderen Seite folgt die c-AMP-Synthese der Aktivierung der Adenylatcyclase, die wiederum durch ein Gs-Protein stimuliert wird, welches an PAC1 gekoppelt ist. cAMP aktiviert die Proteinkinase A, die daraufhin die MAP-Kinase durch eine Phosphorylierung aktiviert (Villalba et al., 1997). Die Aktivierung der MAP-Kinase führt zu einer erhöhten Expression der c-fos-Gene, durch welche beispielsweise die neurotrophen Effekte in Granulozyten vermittelt werden (Vaudry et al., 1998b; Vaudry et al., 1998a). In Abbildung 6 sind die intrazellulären Effekte dargestellt, die infolge einer PAC1-Stimulation durch PACAP ausgelöst werden:

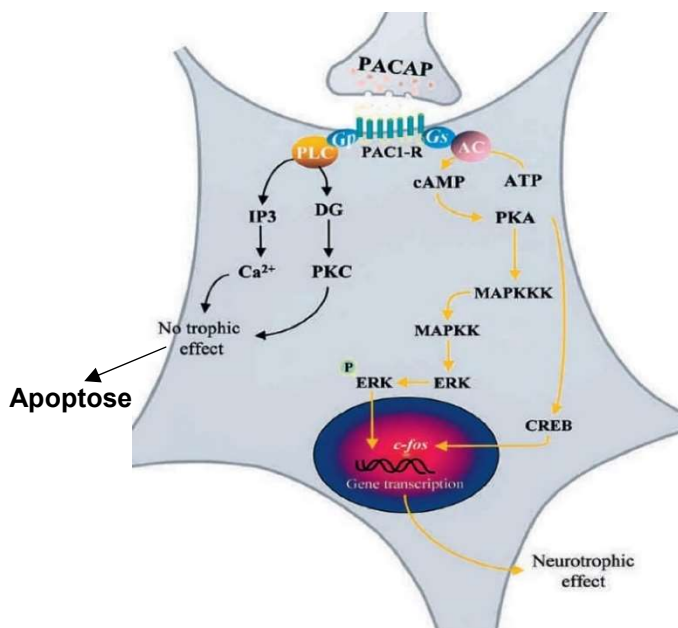


Abbildung 6: Schematische Darstellung der intrazellulären Mechanismen und der Vermittlung neurotropher Effekte am Beispiel einer zerebellären Körnerzelle. AC: Adenylatcyclase, DG: Diacylglycerol, IP3: Inositoltriphosphat, MAPKK: Mitogen-assoziierte Protein-Kinase-Kinase, MAPKKK: MAPKK-Kinase (aus: Vaudry et al., 2000; modifiziert)

1.1.3 Funktion

Die verbreitete Anwesenheit von PACAP und seinem selektiven Rezeptor PAC1 in kardialen Gewebe sowie Blutgefäßen zeigt deren wichtige Rolle im kardiovaskulären System (Nandha et al., 1991a; Gasz et al., 2006; Rácz et al., 2007; Merriam et al., 2013). Im Herzen und an der Aorta existieren die drei PACAP-Rezeptoren VPAC1, VPAC2 und PAC1 (Adamou et al., 1995; Wei and Mojsov, 1996b, 1996a; Miyata et al., 1998; Wong et al., 1998). PACAP zeigt am Herzen protektive Wirkungen gegen reperfusionsinduzierte Apoptose in Kardiomyozyten und durch oxidativen Stress induzierte Apoptose in Endothelzellen (Rácz et al., 2007; Roth et al., 2009). PAC1 Defizienz verursacht bei Mäusen nach der Geburt eine Rechtsherzinsuffizienz, was die Wichtigkeit der PAC1-vermittelten Funktionen für der Aufrechterhaltung einer normalen Herz-Kreislauf-Funktion im frühen postnatalen Verlauf zeigt (Otto et al., 2004). Außerdem konnte in weiteren Versuchen gezeigt werden, dass PACAP-defiziente Welpen, die frühzeitig starben, Lipdablagerungen in metabolisch aktiven Zellen (u.a. Herz- und Leberzellen) zeigten, was ebenfalls darauf hinweist, dass PACAP eine kardioprotektive Wirkung besitzt (Gray et al., 2001). Die Wände der Blutgefäße enthalten eine große Anzahl an Nervenfasern, aus denen lokal PACAP freigesetzt werden kann (Köves et al., 1990; Cardell et al., 1991; Baeres et al., 2004). Im Vordergrund steht wie bei dem verwandten VIP eine vasodilatative Funktion (Hirata et al., 1985; Ross-Ascuitto et al., 1993; Tong et al., 1993; Ascuitto et al., 1996). Dies geschieht hauptsächlich durch eine relaxierende Wirkung des Peptids an Glattmuskulzellen der Gefäßwand (Huang et al., 1993; Naruse et al., 1993; Steenstrup et al., 1996; Bruch et al., 1997). Die Vasodilatation durch PACAP erfolgt wahrscheinlich durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, der zu einer Relaxation der Glattmuskulzellen führt (Steer, 1976; Korenman and Krall, 1977; Farah, 1983). Weitere durch PACAP beeinflusste Mechanismen, die zur Entspannung der Gefäßmuskulatur führen, sind die Modulation von L-Typ-Kalzium-Kanälen (Chik et al., 1996), eine Ausschüttung von Prostaglandinen (u.a. PGF₂-α) (Anzai et al., 1995) und eine erhöhte Synthese des Wachstumsfaktors VEGF (Gloddek et al., 1999). Die Auswirkungen auf die Vasodilatation sind dabei mit einer dosisabhängigen Erhöhung des Blutflusses und einem verminderten arteriellen mittleren Blutdruck verbunden, wobei schon sehr geringe Konzentrationen (0,01-10pmol/min) einen

entsprechenden Effekt haben (Nandha et al., 1991b; Ishizuka et al., 1992; 1992b; Warren et al., 1992a; Naruse et al., 1993, 1993; Santiago and Kadowitz, 1993; Mirfendereski et al., 1997; Whalen et al., 1999a; 1999c; 1999b). Im in-vitro Modell erhöhte PACAP signifikant die Produktion von anti-atherosklerotischen Substanzen durch Endothelzellen, inhibierte die Proliferation von glatten Muskelzellen und reduzierte die Produktion von oxidiertem LDL unter hyperlipidämischen Bedingungen, was die antiatherosklerotische Bedeutung des Peptids verdeutlicht (Chang, 1997). Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass PACAP weitreichende regulatorische Effekte auf das kardiovaskuläre System ausübt, weshalb therapeutische Möglichkeiten für PACAP- oder PAC1R-Agonisten beispielsweise gegen Herzinsuffizienz oder Atherosklerose bestehen könnten (Diané, 2014).

Verschiedene Einflüsse von PACAP lassen sich außerdem im Immunsystem nachweisen. Beispielsweise erhöht es über seine Rezeptoren den intrazellulären cAMP-Spiegel in Monozyten (Chedeville et al., 1993). Ebenfalls stimuliert es die Ausschüttung von Histamin und Serotonin durch kultivierte Mastzellen (Schmidt-Choudhury et al., 1999b; Schmidt-Choudhury et al., 1999a). Auf die Freisetzung des Zytokins IL-10 durch Milz- und Thymuszellen wirkt es durch eine cAMP-Erhöhung andererseits inhibierend (Martinez et al., 1996; Wang et al., 1999). In unstimulierten Makrophagen hemmt es die über die Aktivierung der Proteinkinasen A und C die Ausschüttung des proinflammatorischen TNF- α , erhöht jedoch die Produktion von IL-6 (Delgado et al., 1998; Martínez-Fuentes et al., 1998; Soares et al., 1998; Delgado et al., 1999b; Delgado et al., 1999e). Im Gegensatz dazu hemmt es die Freisetzung von IL-6, IL-12 und TNF- α in Makrophagen, die durch Lipopolysaccharide stimuliert wurden (Martinez et al., 1998; Martínez et al., 1998; Delgado et al., 1999b; Delgado et al., 1999a). Vielmehr erhöhte es hier die Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-10 (Delgado et al., 1999c). Darüber hinaus verringerte es durch eine Hemmung der NO-Freisetzung aus Makrophagen deren zytotoxische Wirkung (Laskin and Pendino, 1995; Delgado et al., 1999d).

1.2 Lipidstoffwechsel und (Apo)lipoproteine

Das Apolipoprotein E (ApoE) Knockout-Mausmodell ist für vergleichende Studien auf dem Gebiet der Atherosklerose-Forschung gut etabliert. Mäuse, denen dieses Gen fehlt, entwickeln typischerweise innerhalb von einigen Wochen atherosklerotische Läsionen, wobei Größe und Schweregrad von der Art der Ernährung abhängen. Für die vorliegende Studie wurden daher ApoE-Knockout-Mäuse verwendet.

1.2.1 Lipoproteine

Lipoproteine setzen sich zusammen aus Lipiden und Proteinen. Sie bilden einen unpolaren hydrophoben Kern, der aus Cholesterinestern und Triacylglyceriden besteht und einer hydrophilen Hülle aus freiem Cholesterin, Phospholipiden und Proteinen. Der Proteinanteil der Lipoproteine, der diverse Aufgaben übernimmt, wird als Apolipoprotein bezeichnet (Jakubke and Jeschkeit, 1982). Der schematische Aufbau eines Lipoproteins ist in Abbildung 7 dargestellt:

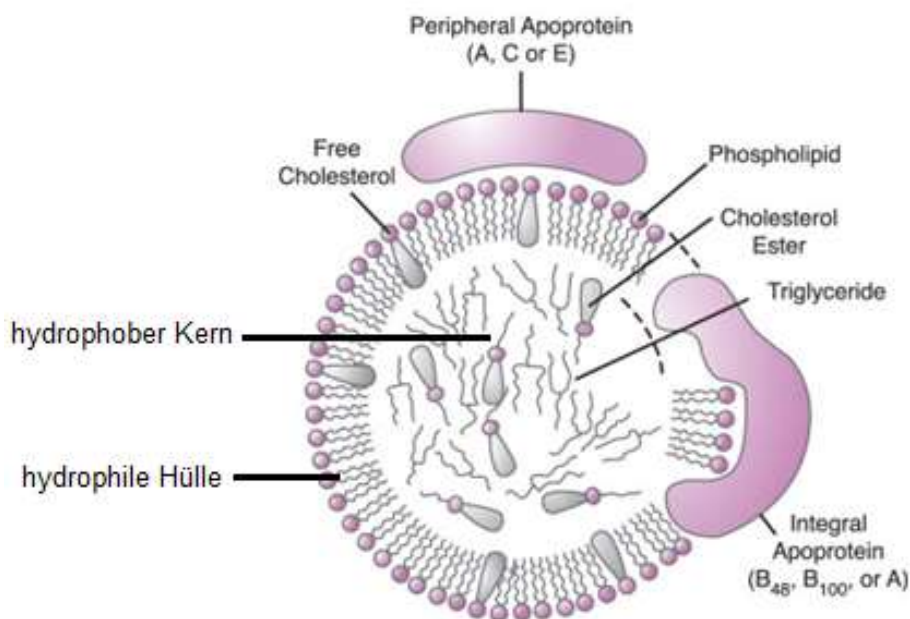


Abb. 7: Schematischer Aufbau eines Lipoproteinmizells. Hydrophober Kern mit Triacylglyceriden und Cholesterinestern. Hydrophile Hülle mit Apolipoproteinen, freiem Cholesterin und Phospholipiden (Engelking, 2015)

Die verschiedenen Arten der Lipoproteine können anhand ihrer biochemischen Eigenschaften in fünf Hauptgruppen eingeteilt werden (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Lipoproteine. Dichte, Elektrophoreseeigenschaften, Durchmesser, Hauptlipidanteil, Apolipoproteine, TAG (Triacylglycerine). (Miller, 1979)

Klasse	Dichte (g/ml)	Elektrophoreseeigenschaften	Durchmesser (nm)	Hauptlipidanteil (% d. Gesamtmasse)	Apolipoproteine
Chylomikronen	<1,006	Ursprung	120-1100	TAG 85%	C, B, A
VLDL	<1,006	Prä-β	30-90	TAG 50%	C, B, E
IDL	<1,019	β	25-30	TAG 25%	B, C, E
LDL	1,019-1,063	β	21-25	Cholesterinester 40%	B
HDL	1,063-1,21	α	7-10	Phospholipide 25% Cholesterinester 15%	A, C, E

Die enthaltenen Apolipoproteine stabilisieren die Lipid-Protein-Aggregate und übernehmen u.a. Aufgaben in den Funktionen in der Signalübertragung für die damit verbundene Steuerung der Lipoproteine zu ihrem Zielgewebe. Abbildung 8 veranschaulicht die Unterschiede zwischen den einzelnen Lipoproteinen:

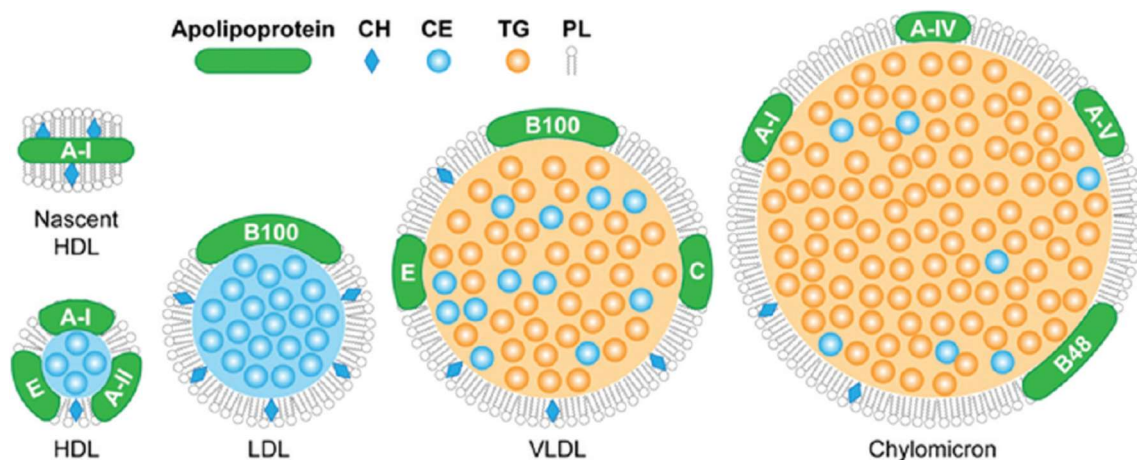


Abb. 8: Illustration der relativen Größe und Zusammensetzung der unterschiedlichen Lipoproteine im Vergleich. HDL: High Density Lipoprotein = Lipoprotein hoher Dichte; LDL: Low Density Lipoprotein = Lipoprotein niedriger Dichte; VLDL: Very Low Density Lipoprotein = Lipoprotein sehr niedriger Dichte; CH: Cholesterin; CE: Cholesterinester; TG: Triglyceride; PL: Phospholipide (aus: Bricarello et al., 2011; modifiziert)

1.2.2 Transport exogener Lipide

Nach der Aufnahme der Nahrungsfette werden diese in Monoacylglycerine und freie Fettsäuren gespalten. Daraufhin liegen langkettige Fettsäuren, Monoacylglycerine und andere Lipide im Lumen als Mizellen vor, während sich

Glycerin und kurzkettige Fettsäuren frei in Lösung befinden (Rassow et al., 2016). Im endoplasmatischen Retikulum (ER) der Enterozyten werden die vorher im Darmlumen gespaltenen Produkte als Triacylglycerine resynthetisiert (Pan and Hussain, 2012). Danach werden sie durch strukturelle Umbauvorgänge am Golgiapparat sowie den Einbau der Apolipoproteine ApoB48 und ApoAI als Chylomikronen verpackt und in das Lymphsystem übertragen (Mansbach and Siddiqi, 2010; Siddiqi et al., 2010; Yáñez et al., 2011). Von dort gelangen sie über den Ductus Thoracicus ins Blut. Aufgrund des hohen Lipidanteils haben die Chylomikronen die geringste Dichte aller Lipoproteine. Im Blut übertragen die Lipoproteine mit hoher Dichte (engl. „High-Density Lipoprotein“; HDL) verschiedene Apolipoproteine auf die Chylomikronen (Ramasamy, 2014). Dabei wirkt beispielsweise ApoCI dem Abbau der Chylomikronen entgegen, während ApoCII die Spaltung der TAG durch Lipoproteinlipasen am Zielgewebe fördert, um die darin enthaltenen Fettsäuren und Monoacylglycerine zum Beispiel in Muskeln und Fettgewebe aufzunehmen (Shachter, 2001).

1.2.3 Transport endogener Lipide

Im ER der Leber werden Lipoproteine mit sehr geringer Dichte (engl. „Very-Low-Density Lipoproteins“; VLDL) gebildet, die vor allem TAG (55 %) und Cholesterin (20 %) enthalten. Durch die Spaltung im peripheren Gewebe werden VLDL durch den Verlust der Fettsäuren über einen Zwischenschritt, in dem sie als Lipoproteine mittlerer Dichte (engl. „Intermediate-Density Lipoproteins“; IDL) vorliegen, zu Lipoproteinen geringer Dichte (engl. „Low-Density Lipoproteins“; LDL) abgebaut. Diese verfügen nur noch über ein Protein je Molekül, das Apolipoprotein B100 (Cladaras et al., 1986; T. J. Knott et al., 1986). LDL enthalten außerdem lediglich einen TAG-Anteil von etwa 6 %, dafür aber einen sehr hohen Cholesterinanteil (45%), da dieser durch die Spaltung der TAG steigt (Rassow et al., 2016). Dadurch werden 60-70 % des Gesamtcholesterins im Plasma von LDL transportiert (Myant, 1982). Die Aufgabe von LDL besteht also darin, Cholesterin im Körper zu verteilen. Dafür ist der LDL-Rezeptor von großer Bedeutung: er wird von jeder Körperzelle gebildet und vermittelt eine ApoB100-abhängige Endozytose des LDL-Partikels (Rassow et al., 2016). Die Expression des LDL-Rezeptors kann von den aufnehmenden Zellen je nach Bedarf reguliert werden. LDL, welches nicht in peripherem Gewebe aufgenommen wird, nimmt die Leber wieder auf (Rassow et al., 2016).

1.2.4 Reverser Cholesterintransport

Der Protagonist im reversen Transport von Cholesterin aus der Peripherie zur Leber ist HDL (Glomset, 1968; Peter P. Toth, 2003). Durch seinen niedrigen TAG-Anteil (4%) ist HDL das Lipoprotein mit der höchsten Dichte (bis 1,2 g/ml) (Rassow et al., 2016). HDL besteht neben einem kleinen Anteil ApoE zu etwa 70% aus ApoAI (Weisgraber and Mahley, 1980), welches von der Leber und der Darmwand als lipidarmes Protein synthetisiert und ins Blut abgegeben wird (Timmins et al., 2005). An peripheren Zellen erfolgt die Abgabe von Phospholipiden und überschüssigem Cholesterin auf das lipidarme ApoAI (Oram and Vaughan, 2006). Das hierbei entstehende, unreife prä- β -HDL wird von der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), die von ApoAI aktiviert wird, modifiziert: LCAT verestert das von den HDL aufgenommene Cholesterin mit Fettsäuren. Daraufhin sammeln sich die Cholesterinester im Partikelkern des HDL an, wodurch das kugelförmige reife α -HDL entsteht (Francone et al., 1989). Dieses spheroidale HDL stellt diejenige HDL-Hauptform dar, welche verantwortlich für den Cholesterintransport zur Leber ist (Lund-Katz and Phillips, 2010). Über das Cholesterinester Transferprotein (CETP) können Cholesterinester von HDL auf LDL übertragen werden, woraufhin das cholesterinbeladene LDL von der Leber aufgenommen wird (Chapman et al., 2010). Des Weiteren existieren an der Leber und an steroidhormonproduzierenden Organen wie der Nebennierenrinde Scavenger Rezeptoren der Klasse BI (SR-BI) (Murao et al., 1997), über die Cholesterinester auch direkt von HDL in die entsprechenden Zellen aufgenommen werden können (Krieger, 1999).

1.2.5 Apolipoproteine

Apolipoproteine binden an Lipide, um Lipoproteine zu bilden. Durch ihre Funktion als Lipidträger wirken Apolipoproteine als Liganden für Zellmembranrezeptoren, Cofaktoren von Enzymen und Strukturkomponenten von Lipoproteinen (Rassow et al., 2016). Die vielfältigen Funktionen von Apolipoproteinen werden durch ihre speziellen modularen Strukturen definiert, die genetisch festgelegt sind (s. Tab. 2) (Jonas and Phillips, 2008). Sie werden hauptsächlich in Leber und Darm synthetisiert (Kastelein et al., 2008). In der Leber wird die Synthese durch Alkoholkonsum, Arzneimittel, Ernährung und verschiedene Hormone beeinflusst.

Im Darm wird die Synthese von Apolipoproteinen vorwiegend durch den Lipidgehalt in der Nahrung gesteuert (Marcil et al., 2002). Sie werden im Allgemeinen in zwei große Kategorien unterteilt: Die nicht austauschbaren und austauschbaren Apolipoproteine. ApoB-48 und ApoB-100, die Hauptkomponenten von LDL, VLDL und Chylomikronen, gehören zu den nicht austauschbaren Apolipoproteinen (Jonas and Phillips, 2008). Obwohl über 90 % aller Apolipoproteine auf Lipoproteinen zirkulieren, kann ein kleiner Teil der austauschbaren Proteine vorübergehend von der Lipidoberfläche dissoziieren, was sowohl während einer Entzündung als auch während des normalen Metabolismus von Lipoproteinen auftreten kann (Rye and Barter, 2004; Mulya et al., 2008; Jayaraman et al., 2012). Außerdem können sie zwischen Lipoproteinmolekülen wechseln und dabei Lipide aufnehmen (Jonas and Phillips, 2008). Zahlreiche Studien haben bereits gezeigt, dass Apolipoproteine eine wichtige Rolle bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie der Atherosklerose spielen (Chan and Watts, 2006; Kastelein et al., 2008; Di Angelantonio et al., 2009).

Tabelle 2: Eigenschaften der menschlichen Apolipoproteine. LCAT = Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase; LDLR = LDL-Rezeptor; SRB1 = Scavenger Rezeptor B1. (Wasan et al., 2008)

Apolipoprotein	Plasmakonzentration (mg / dL)	enthalten in Chylomikronen	Verteilung in Lipoproteinen im nüchternen Zustand (%)			Molekulargewicht (kDa)	Funktion
			VLDL	LDL	HDL		
ApoA1	130	Zeitweise	0	0	100	29,0	LCAT-Aktivator; Substrat für SRB1
ApoA2	40	Nein	0	0	100	17,4	Struktur; Hepatische-Lipase-Inhibitor; Substrat für SRB1
ApoA4	15	Ja	0	0	0	44,5	LCAT-Aktivator
ApoB48	Zeitweise	Ausschließlich	0	0	0	241	Chylomikron-Struktur
ApoB100	80-250	Nein	6-12	88-94	0	512	Struktur; Rezeptorligand
ApoC1	3-6	Nein	3	0	97	6,6	LCAT-Aktivator
ApoC2	3-12	Nein	40	0	60	9,0	Lipoproteinlipase Aktivator
ApoC3	12	Nein	30	10	60	9,0	Hepatische-Lipase-Inhibitor
ApoD	10-12	Nein	0	0	100	19,0	Viele beschrieben
ApoE	5-7	Ja	40	10	50	34,0	Substrat für LDLR; Chylomikronremnant Rezeptor

1.2.6 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E, welches erstmals 1973 isoliert wurde, ist Bestandteil von VLDL, IDL, Chylomikron-Remnants und einigen Subspezies von HDL (Shore and

Shore, 1973; Mahley and Innerarity, 1983). Humanes ApoE ist ein Molekül mit 299 AS, das mehrere amphipathische α -Helices enthält, was ein charakteristisches Merkmal austauschbarer Lipoproteine ist (Rall et al., 1982b; Segrest et al., 1992). Es ist als Komponente dieser Lipoproteine am Transport von Lipiden zwischen Zellen verschiedener Organe und Geweben beteiligt (Mahley, 1988). ApoE spielt weiterhin eine Schlüsselrolle bei der Entfernung der Lipoproteine aus dem Plasma, indem es als Ligand für die Bindung an spezifische Zelloberflächenrezeptoren dient, einschließlich der Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie und Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) (Mahley, 1988; Weisgraber, 1994; Mahley and Huang, 1999). Neben der Leber, die 75 % des gesamten ApoE des menschlichen Organismus produziert, ist das Gehirn der zweitwichtigste Syntheseort des Proteins (Elshourbagy et al., 1985). Auch hier fungiert es als Lipidtransportprotein im Liquorraum, reguliert Zellstoffwechselfvorgänge und den Zytoskelettbau in Nervenzellen (Mahley and Rall, 2000; Lahiri et al., 2004). Seine Synthese wird durch verschiedene Stressoren und Stimuli induziert (Xu et al., 2006; Xu et al., 2008). Des Weiteren findet die Synthese ApoE auch in Makrophagen statt, wobei die Menge des produzierten ApoE durch Endotoxine negativ beeinträchtigt werden kann (Brown et al., 1980; Basu et al., 1981; Werb and Chin, 1983a, 1983b; Kayden et al., 1985). Es enthält zwei voneinander unabhängig gefaltete Domänen, die über eine sogenannte „hinge-Region“ aus 20-30 AS miteinander verbunden sind (s. Abb. 9) (Wetterau et al., 1988; Weisgraber, 1994). Die N-terminale Domäne (Position 1-191) bildet ein Bündel aus vier Helices (Wilson et al., 1991). Die Positionen 136-150 und Arg-172 der N-terminalen Domäne, welche viele basische AS (vor allem Lysin, Arginin und Histidin) enthalten, definieren die Region, die für die Interaktion mit Mitgliedern der LDL-Rezeptorfamilie verantwortlich ist (Wilson et al., 1991; Morrow et al., 2000, 2000; Hatters et al., 2006). Die Region zwischen 171-183 ist darüber hinaus für die Stabilisierung der Bindung zwischen Protein und LDL-Rezeptor von Bedeutung (A Lalazar and R W Mahley, 1989). Zusätzlich zur Bindung an saure Reste des LDL-Rezeptors können die Arginin- und Lysin-Reste der Positionen 135 bis 150 auch mit hoher Affinität an saure Sulfatgruppen auf HSPG binden (Libeu et al., 2001), die eine vom LDL-Rezeptor unabhängige Aufnahme von ApoE-reichen VLDL- und LDL-Partikeln ermöglichen (Mulder et al., 1992; Z S Ji et al., 1993). Die Bindung mit

Lipiden ist für ApoE wichtig, um den LDL-Rezeptor an den entsprechenden Zielorganen zu erkennen (Weisgraber, 1994). Die C-terminale Region (Positionen 216–299) enthält hochaffine Lipidbindungsstellen und ist auch für die Selbstassoziation von ApoE in Abwesenheit von Lipiden verantwortlich (Rall et al., 1982a; Westerlund and Weisgraber, 1993; Weisgraber, 1994). Bei der Bindung an Lipide kommt es zu Strukturveränderungen in den Helices, wodurch das elektrostatische Potential in der Rezeptorbindungsregion von ApoE erhöht und seine Bindung mit hoher Affinität an den LDL-Rezeptor ermöglicht wird (Lund-Katz et al., 2000; Raussens et al., 2003; Saito et al., 2004).

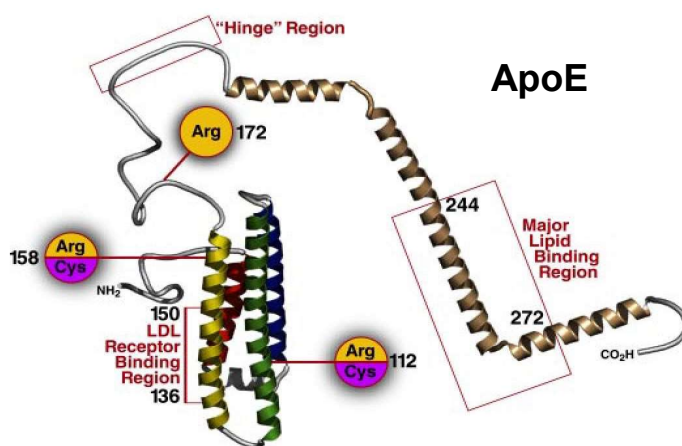


Abbildung 9: Strukturmodell des Apolipoprotein E. N-terminale Domäne mit LDL-Rezeptorbindungsregion und variablen Positionen 112 und 158; Hinge-Region und C-terminales Ende mit Lipidbindungsregion. (aus: Zhong and Weisgraber, 2009; modifiziert)

ApoE spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Cholesterinhomöostase durch Vermittlung der Aufnahme von VLDL, IDL und Chylomikron-Remnants in die Leber (Mahley and Innerarity, 1983; Mahley, 1988). Es vermittelt die Aufnahme und den Abbau von Lipoproteinen durch seine Fähigkeit, mit hoher Affinität an die LDL-Rezeptoren auf parenchymalen Hepatozyten zu binden (Mahley and Rall, 2000). ApoE bindet darüber hinaus auch an den LDL-verwandten Rezeptor (engl. „LDL-Receptor-related Protein“; LRP), über den die hepatische Aufnahme von Chylomikron-Remnants abläuft (Linton et al., 1998). Zusätzlich kann ApoE an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) binden (Libeu et al., 2001), wodurch eine LDL-Rezeptor-unabhängige Aufnahme von ApoE-reichen VLDL- und LDL-Partikeln möglich ist (Mulder et al., 1992; Z S Ji et al., 1993; Robert W. Mahley and Zhong-Sheng Ji, 1999). Weiterhin ist es in der Lage, die VLDL- und Triglyceridproduktion bzw. deren Sekretion in der Leber direkt zu stimulieren (Kuipers et al., 1997; Huang et al., 1998). Es wirkt über eine Aktivierung verschiedener Enzyme, die am Lipidstoffwechsel beteiligt sind,

darunter die Lipoproteinlipase, LCAT und CETP (Thuren et al., 1992; M Kinoshita et al., 1993; Pauw et al., 1995). ApoE stimuliert ebenfalls den reversen Cholesterintransport durch HDL, indem es dessen Bildung, Stabilität und Cholesterinaufnahme fördert (Koo et al., 1985). Auch im ZNS spielt ApoE eine wichtige Rolle und seine Isoform ApoE4 ist als bedeutender Faktor in der Entstehung des M. Alzheimer bekannt (Herz and Beffert, 2000; Bu, 2009).

1.3 Kardiovaskuläres System

1.3.1 Kreislaufsystem

Neben dem Herzen sind die Blutgefäße die wichtigsten anatomischen und funktionellen Strukturen dieses Systems. Eingeteilt werden die Blutgefäße je nach Flussrichtung in Bezug auf das Herz in Arterien (vom Herzen zur Peripherie) und Venen (aus der Peripherie zum Herzen) (Aumüller et al., 2020). Die Wände der Blutgefäße werden auf histologischer Ebene aufgebaut aus Tunica Externa, Tunica Media und Tunica Intima (s. Abb. 10). Die Externa besteht aus lockerem Bindegewebe und enthält elastische Fasern und Kollagen. Ihre Funktion besteht in der Verankerung der Gefäße in der Umgebung und in der Führung von autonomen Nervenfasern. Die Media setzt sich aus glatten Muskelzellen, Kollagenfasern und elastischen Fasern zusammen. In den größeren Arterien werden Media und Externa zusätzlich durch eine weitere Schicht elastischer Fasern (Membrana elastica externa) getrennt. Die Intima besteht aus dem einschichtigen Endothel, welches ein einschichtiges Plattenepithel darstellt, und einer dünnen subendothelialen Schicht aus Bindegewebe (Aumüller et al., 2020).

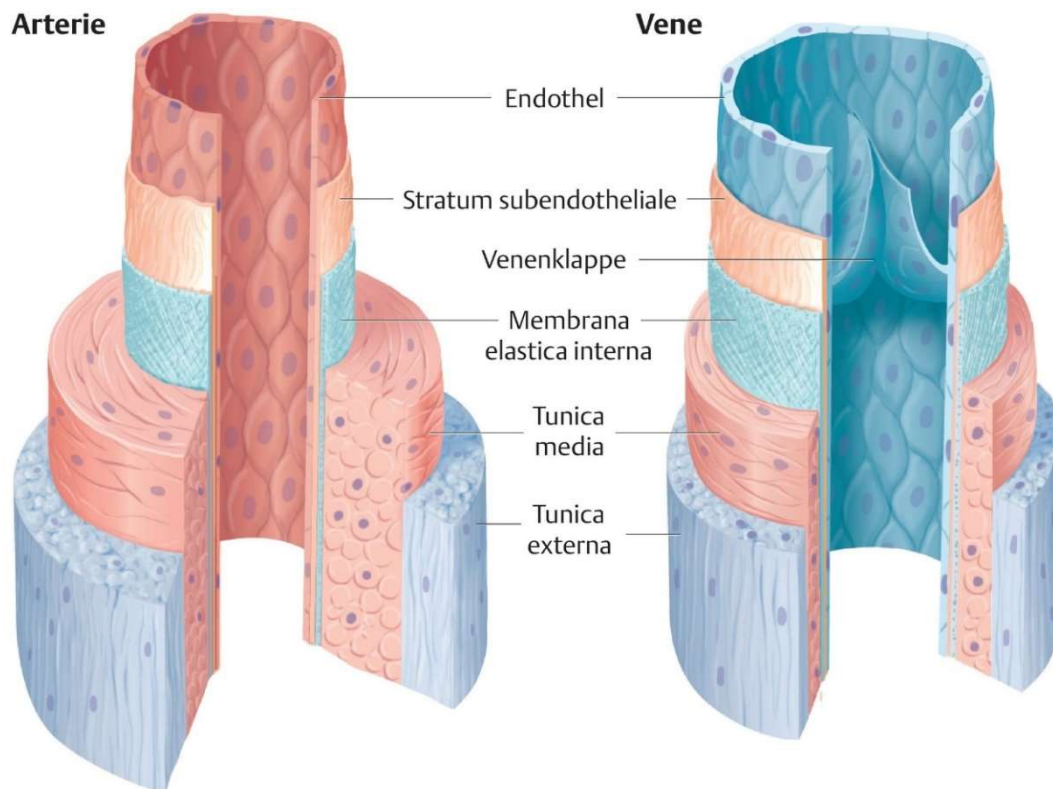


Abbildung 10: Wandaufbau der arteriellen und venösen Blutgefäße mit Tunica externa, Tunica media, Membrana elastica interna, Stratum subendotheliale und Endothel. (Aumüller et al., 2020)

1.3.2 Pathologien (Atherosklerose, KHK, Myokardinfarkt)

Atherosklerose ist die häufigste Ursache stenosierender Gefäßpathologien und beschreibt ein lokal entstehendes Atherom der Gefäßintima. Abzugrenzen davon ist die Arteriosklerose, die eine Sklerosierung eines kompletten Gefäßes auf der Grundlage atherosklerotischer Läsionen darstellt. Zu den wichtigsten Risikofaktoren gehören die arterielle Hypertonie, Tabakrauch, Dyslipidämie, Diabetes mellitus, Übergewicht, Bewegungsmangel, familiäre Vorbelastung, männliches Geschlecht und ein hohes Alter (Grundy et al., 1993; Ross, 1999). Sie ist die Grundlage für die häufigsten Todesursachen in Industrienationen (Arastéh et al., 2018, 2018).

In der Frühphase der Atherosklerose reichern sich oxidierte LDL-Partikel (ox-LDL) in der Intima an, wodurch eine lokale Entzündung ausgelöst wird. Eingewanderte Monozyten (~ Makrophagen) nehmen Lipide und ox-LDL auf, sodass aus ihnen Schaumzellen entstehen (s. Abb. 11) (Morel et al., 1983; Khoo et al., 1992; Navab et al., 1996; Griendling and Alexander, 1997; Han et al., 1997; Steinberg, 1997). Die Aktivierung dieser Zellen führt zur Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, Zytokinen wie TNF- α und IL-6, Chemokinen und

Wachstumsfaktoren (Fuster et al., 2015). Besonders gefährdet für die Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion sind Gefäßverzweigungen wie beispielsweise der Truncus brachiocephalicus, da durch Strömungsturbulenzen eine zusätzliche Belastung auf die Gefäßwände wirkt. Infolge der lokalen Entzündungsreaktion der Intima kommt es zu einer Dysfunktion des Endothels (Arastéh et al., 2018). Zur Bildung einer atherosklerotischen Plaque kommt es durch hintereinander geschaltete Vorgänge in der Intima: durch die Schaumzellen werden glatte Muskelzellen zur Proliferation und Bildung einer extrazellulären Matrix angeregt. Aus nekrotischen Schaumzellen werden Lipide freigesetzt, die zusammen mit den Zellabfällen (Zelldetritus) den Lipidkern der Plaque bilden. Durch Bindegewebsvermehrung um diesen Kern bildet sich die klassische Plaque. Durch ein zu Beginn extraluminales Wachstum kommt es erst in späteren Stadien zu einer Stenosierung (Arastéh et al., 2018).

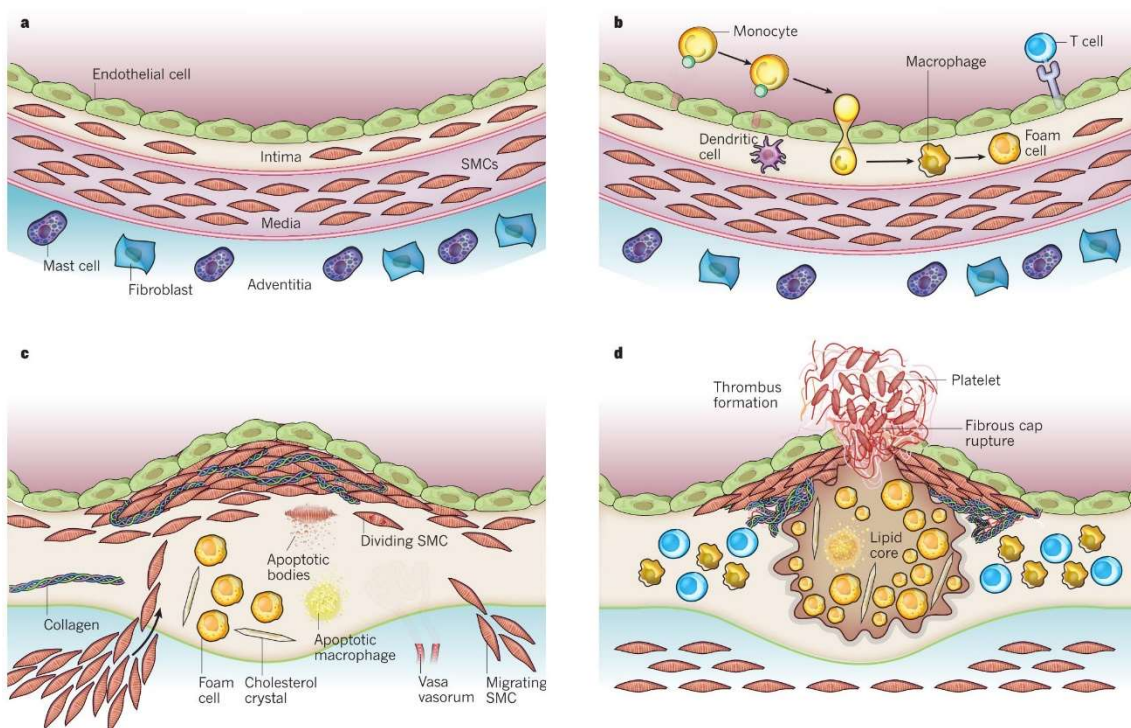


Abbildung 11: Entstehung atherosklerotischer Läsionen an einer arteriellen Gefäßwand a: physiologischer Zustand, Aufbau aus Endothel, Intima, Media und Adventitia mit Fibroblasten, Mastzellen, Monozyten und glatten Muskelzellen. b: Adhäsion und Migration der Monozyten in die Intima mit Bildung von Schaumzellen. c: Proliferation und Migration glatter Muskelzellen, Neoangiogenese der Intima, Degeneration und Nekrose des Subendothels mit Lipidaggregation und resultierender Abnahme des Lumens. d: Ruptur der Plaque und Thrombusformation. (Libby et al., 2011)

1.3.3 ApoE / PACAP / PAC1 und Atherosklerose

1.3.3.1 ApoE und Atherosklerose

Mehrere Hinweise deuten auf eine starke anti-atherogene Rolle von ApoE hin. Es wurde festgestellt, dass eine verminderte Expression von ApoE beim Menschen mit einem pro-atherogenen Lipoproteinprofil und einem höheren Risiko für atherosklerotische Erkrankungen verbunden ist (Ghiselli et al., 1981; Schaefer et al., 1986). ApoE-Knockout-Mäuse (ApoE^{-/-}) weisen im Vergleich zum Wildtyp eine starke Hypercholesterinämie auf. Selbst mit einer fettarmen Diät entwickeln ApoE^{-/-}-Mäuse komplexe atherosklerotische Läsionen, da sich bei ApoE-Defizienz Lipoprotein-Remnants im Organismus ansammeln (Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992; Zhang et al., 1994). Die ApoE-Expression findet in atherosklerotischen Plaques hauptsächlich in lokalen Makrophagen statt (Rosenfeld et al., 1993). Interessanterweise scheint lokal von Makrophagen produziertes ApoE seine antiatherogenen Eigenschaften nur am Syntheseort auszuüben und keine Auswirkungen auf die Plasma-Lipidspiegel zu haben (Fazio et al., 1997; William A. Boisvert and Linda K. Curtiss, 1999; van Eck et al., 2000). ApoE vermittelt die Aufnahme und den Abbau von Lipoproteinen durch seine Fähigkeit, mit hoher Affinität an LDL-Rezeptoren und das LRP auf parenchymalen Leberzellen zu binden, wodurch es den Plasmaspiegel atherogener Lipoproteine positiv beeinflussen kann (Linton et al., 1998; Robert W. Mahley and Zhong-Sheng Ji, 1999b; Mahley and Rall, 2000). Weiterhin kann es die VLDL- und Triglyceridproduktion in der Leber direkt stimulieren und über HDL den reversen Cholesterintransport aus der Peripherie zur Leber fördern (Kuipers et al., 1997; Mahley and Rall, 2000). Außerdem aktiviert ApoE am Lipoproteinstoffwechsel beteiligte Enzyme, darunter die Lipoproteinlipase, CETP und LCAT (Thuren et al., 1992; M Kinoshita et al., 1993; Pauw et al., 1995). Des Weiteren hemmt es die Lipidoxidation, wodurch die Akkumulation von ox-LDL verhindert werden kann (Palinski et al., 1994; Miyata and Smith, 1996). Neben den Einflüssen auf den Lipoproteinstoffwechsel hat ApoE noch weitere antiatherogene Eigenschaften. Beispielsweise wirkt es antiinflammatorisch, indem es die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten unterdrückt (D Y Hui and J A Harmony, 1980; E M Avila et al., 1982; Kelly et al., 1994). ApoE hemmt über eine Aktivierung der NO-Synthase auch die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, die durch Zytokine, Wachstumsfaktoren

und ox-LDL induziert werden (Ishigami et al., 2000; Swertfeger and Hui, 2001; Kothapalli et al., 2004).

1.3.3.2 PACAP / PAC1 und Atherosklerose

Ob PACAP oder dessen Rezeptoren einen Einfluss auf die Entstehung und Progression von Atherosklerose haben, ist noch unklar und Gegenstand aktueller Forschung. PACAP und sein selektiver Rezeptor PAC1 finden sich im Herzen und in Blutgefäßen, was auf seine wichtige Rolle im kardiovaskulären System hinweist (Nandha et al., 1991a; Gasz et al., 2006). Es besitzt durch die Hemmung von Zellproliferation sowie der protektiven Wirkung auf Endothel- und glatten Muskelzellen Eigenschaften, die positive Einflüsse auf die Entstehung einer Atherosklerose haben (Chang, 1997). Weiterhin ist zu beachten, dass PACAP Rezeptoren auch von Makrophagen und anderen Immunzellen exprimiert werden, wodurch eine immunmodulatorische Wirkung in der Entstehung und im Fortschreiten der Atherosklerose naheliegt (Delgado et al., 1999e; Ganea and Delgado, 2001; Waschek, 2013). Den Rezeptoren PAC1, VPAC1 und VPAC2 sind an der cAMP-Synthese durch die Adenylatcyclase beteiligt, wodurch sie Effekte auf Proliferation, Differenzierung, Remodelling und das Überleben haben (Holighaus et al., 2011; May and Parsons, 2017). Von daher ist die bedeutende Stellung der Makrophagen in der Pathophysiologie der Atherosklerose hervorzuheben, da die Atherosklerose als entzündliche Krankheit verstanden wird (Bentzon et al., 2014). Das Fortschreiten dieser Erkrankung bis zur hämodynamisch relevanten Lumenstenose wird durch eine komplexe Wechselwirkung von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen sowie durch subendotheliale Lipidablagerung bedingt (Tabas et al., 2007; Moore et al., 2013; Bentzon et al., 2014). Neuere Studien zeigen folgerichtig, dass ein Mangel an PACAP bei ApoE-defizienten Mäusen proatherogen wirkt (Rasbach et al., 2019). Eine weitere Perspektive auf den Zusammenhang von PACAP und Atherosklerose lässt sich durch einen Blick auf die Wirkung von VIP gewinnen, dem nächsten verwandten Peptid von PACAP: VIP senkt die T-Zell-vermittelte Entzündung bei atherosklerotischen Mäusen, verringert die Bildung atherosklerotischer Plaques, reduziert die Entstehung von Schaumzellen, hemmt die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und wirkt dadurch in hohem Maße protektiv im Hinblick auf die Entstehung der Atherosklerose (Benitez et al., 2018). Interessanterweise deuten neueste Ergebnisse darauf hin, dass PAC1-

Defizienz, im Kontrast zur PACAP-Defizienz, die Progression der Atherosklerose bei ApoE-defizienten hyperlipidämischen Mäusen vermindert (Splitthoff et al., 2020).

1.4 Immunhistochemische Marker atherosklerotischer Plaques

1.4.1 Morphologische Marker

1.4.1.1 MoMa-2 (Monozyten & Makrophagen)

Die Infiltration von Makrophagen in den subendothelialen Raum der Arterienwand und deren Aktivierung durch ox-LDL ist ein wesentlicher Prozess in der Pathogenese der Atherosklerose. Die Makrophagen produzieren darüber hinaus Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren, durch welche die Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion initiiert werden kann (Ross, 1999; Yamada et al., 2018). MoMa-2 Antikörper binden an ein intrazelluläres Antigen von Mausmakrophagen und -monozyten, welches in zytoplasmatischen Komponenten sowie Teilen der Zellmembranen fast aller Monozyten, Makrophagen und deren Subtypen vorkommt (Kraal et al., 1987; Leenen et al., 1994). Die entzündlichen Reaktionen bei Atherosklerose werden in jedem Stadium der Krankheit durch Makrophagen und spezifische Subtypen von T-Lymphozyten vermittelt (Jonasson et al., 1986; van der Wal et al., 1989; Yamada et al., 2018). Makrophagen entstehen aus Monozyten, die durch Adhäsionsmoleküle wie das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül (engl. „vascular cell adhesion molecule 1“; VCAM-1) rekrutiert werden, welche von stimulierten Endothelzellen vermehrt ausgeschüttet werden (Dong et al., 1998). Makrophagen sind in der Lage, in atherosklerotischen Plaques lokal ApoE zu produzieren, wodurch dessen antiatherogenen Eigenschaften direkt am Syntheseort wirken können (Fazio et al., 1997; William A. Boisvert and Linda K. Curtiss, 1999; van Eck et al., 2000).

1.4.1.2 sm- α -Actin (Glattmuskelzellen)

α -Actin findet sich hauptsächlich in Glattmuskelzellen (SMCs), die für die Motilität der Darmwand und Tonusregulation der Blutgefäße verantwortlich sind. Aus Actin-Filamenten wird das für die Zellstabilität, -form und -migration relevante Zytoskelett gebildet (Cherng et al., 2008). α -Actin der glatten Muskulatur

(sm- α -Actin) ist die Actin-Isoform, die in SMCs dominiert und eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus spielt (Hanson and Lowy, 1963; Vandekerckhove and Weber, 1979; Schildmeyer et al., 2000; Kawasaki et al., 2008). SMCs sind der vorherrschende Zelltyp in der prä-atherosklerotischen Intima und in allen weiteren Stadien der atherosklerotischen Plaque (Dubland and Francis, 2016). Sie sind nicht endgültig differenziert und können ihren Phänotyp als Reaktion auf Umwelteinflüsse ändern (Owens et al., 2004). Mit der Progression atherosklerotischer Läsionen tritt jedoch eine phänotypische Modulation von intimalen SMCs auf, bei dem eine verstärkte Proliferation, ein Verlust der Kontraktilität und einer verringerten Expression von typischen Markern glatter Muskulatur, einschließlich sm- α -Actin, zu beobachten ist (Orekhov et al., 1998; Mulvihill et al., 2004; Owens et al., 2004). Innerhalb der atherosklerotischen Plaque bilden die glatten Muskelzellen verschiedene Phänotypen aus, zum Beispiel in Form von Makrophagen-ähnlichen Schaumzellen, was zu einer falschen Identifizierung führen kann (Katsuda et al., 1992; Schwartz et al., 1995; Owens et al., 2004; Allahverdian et al., 2014; Shankman et al., 2015; Dubland and Francis, 2016). Sie stellen mindestens 50% der Atheromschaumzellen bei ApoE^{-/-}-Mäusen dar, die über einen längeren Zeitraum eine cholesterinreiche Ernährung und Normalfutter erhielten (Wang et al., 2019). SMCs der fibrösen Kappe der Plaque exprimieren dagegen weiterhin die für sie typischen Marker wie sm- α -Actin (Feil et al., 2014; Albarrán-Juárez et al., 2016; Chappell et al., 2016; Perisic et al., 2016). Dabei ist eine größere Menge SMCs in atherosklerotischen Läsionen mit einer erhöhten Plaquestabilität vergesellschaftet (Lee and Libby, 1997; Virmani et al., 2000; Watanabe et al., 2007). Die Mehrheit der intimalen SMCs in atherosklerotischen Läsionen stammen von Glattmuskelzellen der Media ab, die eine phänotypische Modulation und Migration in die Intima durchlaufen, wo sie sich vermehren, eine extrazelluläre Matrix produzieren und an der Bildung der fibrösen Kappe teilnehmen (Ross, 1993, 1999). In atheromatösen Läsionen bei Menschen und Tieren ist eine deutliche Abnahme des Gehalts an sm- α -Actin in SMCs zu beobachten (Gabbiani et al., 1984). SMCs sind die am häufigsten vorkommenden Zellen in menschlichen atherosklerotischen Läsionen und die Mediae in normalen Aortae enthalten überwiegend sm- α -Actin-positive SMCs mit einer homogenen Lamina Elastica, während deren Degeneration durch

Störungen von sm- α -Actin-positiven SMCs gekennzeichnet ist (Zhang et al., 2003; Virmani et al., 2005).

1.4.2 Remodelling Marker der atherosklerotischen Plaque

1.4.2.1 ATG5 (Autophagie)

Autophagie ist ein hochkonservierter homöostatischer Prozess in fast allen Lebewesen und leitet sich vom griechischen „Selbst“ (auto) und „Essen“ (phagos) ab. Autophagie beschreibt den regulierten Abbau bestimmter intrazellulärer Moleküle und Organellen (Deter and Duve, 1967). Im Allgemeinen tritt sie bei Säugetieren unter physiologischen Bedingungen auf, kann jedoch auch durch Hunger oder durch verschiedene Pathologien wie ischämischen, toxischen, immunologischen und oxidativen Stress hochreguliert werden (Tanida, 2011). Das Herunterfahren oder Ausschalten von ATG5 kann zu einer Herunterregulierung oder vollständigen Hemmung der Autophagie führen (Pierdominici et al., 2012). Dadurch spielt ATG5 im Rahmen der Autophagie ebenfalls bei der Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen als entzündlicher Prozess mit oxidativem Stress eine wichtige Rolle und verlangsamt ein Fortschreiten der Erkrankung, was insbesondere auf die Autophagie-Aktivität der lokalen Makrophagen zurückzuführen ist (Razani et al., 2012). Allerdings ist die Rolle der Autophagie in der Atherosklerose noch nicht endgültig geklärt.

1.4.2.2 Aktivierte Caspase 3 (Apoptose)

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods, die bei allen wichtigen Zelltypen atherosklerotischer Plaques auftritt und an der Entwicklung sowie dem Fortschreiten der Krankheit beteiligt ist (Kockx, 1998; Mallat and Tedgui, 2001; Stoneman and Bennett, 2004). Der apoptotische Prozess wird von Cystein-Aspartat-spezifischen Proteasen gesteuert, die als Caspasen bezeichnet werden (Nicholson and Thornberry, 1997). Nach Aktivierung der Caspasen werden Zellproteine und die DNA degradiert und gespalten. Apoptose kann durch proinflammatorische (z.B. TNF- α), prooxidative (ROS) und zytotoxische (Hypoxie und Cholesterinüberladung) Stimuli induziert werden, die in atherosklerotischen Plaques anzutreffen sind (Kockx, 2000; Mallat and Tedgui, 2000; Stoneman and Bennett, 2004). Eine beeinträchtigte Phagozytose apoptotischer Zellen kann zu entzündungsbedingten Pathologien oder Autoimmunitäten führen (Kourtzelis et al., 2020). Die Apoptose glatter Muskelzellen destabilisiert die Plaque sowohl bei

frühen als auch bei fortgeschrittenen Läsionen durch Zerfall der schützenden Kollagenkappe (Clarke et al., 2006; Daghem et al., 2020), während die Apoptose der Makrophagen das Plaque-Wachstum bei frühen Läsionen durch Hemmung der Entzündungsreaktion begrenzt (Arai et al., 2005; Stoneman et al., 2007; Gautier et al., 2009). Bei fortgeschrittenen Läsionen fördert die Makrophagenapoptose jedoch die Bildung eines großen nekrotischen Kerns, während durch Entzündungen (in Form von Makrophageninfiltration), Angiogenese, Plaque-Blutung und Mikroverkalkungen die Plaque-Stabilität negativ beeinflusst wird (Stoneman et al., 2007; Gautier et al., 2009; Daghem et al., 2020). Eine erhöhte Apoptoserate phagozytisch aktiver Zellen wie den Makrophagen stört darüber hinaus die Entfernung anderer apoptotischer Zellen in der Läsion und fördert wiederum das Plaquewachstum (van Vré et al., 2012).

1.4.2.3 Ki-67 (Proliferation)

Ki-67 wird in größeren Mengen hauptsächlich von Zellen exprimiert, die sich in der mitotischen Teilung befinden (Gerdes et al., 1984; Gerdes et al., 1987; Dowsett et al., 2011). Neben der Apoptose der Makrophagen scheint auch deren Proliferation eine wichtige Rolle in der Atherogenese zu spielen: Ki-67 konnte bei proliferierenden Makrophagen in allen Stadien atherosklerotischer Läsionen sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen nachgewiesen werden (Lhoták et al., 2016). Das komplexe und gleichzeitig dynamische Gleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation von Makrophagen ist daher ein entscheidender Faktor für die Progression und Stabilität atherosklerotischer Plaques (Zhou et al., 2005; Andrés et al., 2012; Murphy and Tall, 2014), bei dem die Proliferation dieser Zellen einen wesentlichen Anteil am Wachstum der Läsionen hat (Robbins et al., 2013).

PACAP hemmt die Zellproliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen, wodurch es eine protektive Wirkung auf die Entstehung einer Atherosklerose besitzt (Chang, 1997). Ki67-positive proliferierende Makrophagen kommen häufig in atherosklerotischen Plaques von ApoE^{-/-}-Mäusen vor (Yamada et al., 2018). Dabei verstärkt Ox-LDL die Makrophagenproliferation, indem seine Aufnahme über den „Scavenger“-Rezeptor zur Aktivierung einer Signalkaskade führt, an deren Ende eine gesteigerte Proliferation der Makrophagen steht (Yamada et al., 2018).

1.4.2.4 RIP3 (Nekroptose)

Zelltod ist eine der Hauptursachen für Entzündungen und die Bildung eines Nekrosekerns in der atherosklerotischen Plaque (van Vré et al., 2012). Nekrose wurde lange als unkontrollierter Zelltod angesehen, der durch physikalische oder chemische Traumata verursacht wird (Vanlangenakker et al., 2012). Plaque-Makrophagen erfahren eine sogenannte Nekroptose (Nekrose + Apoptose), welche als neue Form des programmierten Zelltods identifiziert wurde (Karunakaran et al., 2016; Leeper, 2016). Ähnlich wie bei der sekundären Nekrose ist die Nekroptose durch die Freisetzung intrazellulärer Komponenten gekennzeichnet, durch die eine Immunantwort ausgelöst wird. Nekroptose hängt von der Rezeptor-interagierenden Proteinkinase 3 (RIPK3) und der Phosphorylierung ihres MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein) ab, welches die Plasmamembran durchdringt (Dhuriya and Sharma, 2018). Diese Art des programmierten Zelltods ist oft mit Immunzellen assoziiert und mehrere Studien zeigen, dass Wildtyp-Makrophagen sehr anfällig für Nekroptose sind, während RIP3^{-/-}-Makrophagen davor geschützt sind (Karunakaran et al., 2016). Die Nekroptose von Makrophagen spielt in der Entstehung und Progression der Atherosklerose eine wichtige Rolle (Tabas, 2010). In Studien linderte ein RIP3-Mangel die Makrophagen-Nekrose in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen bei ApoE^{-/-}-Mäusen, was darauf hinweist, dass die RIP3-abhängige Nekroptose eine Schlüsselkomponente für Entzündungen bei Atherosklerose ist (Lin et al., 2013). Es wird bereits ein gezielter klinischer Einsatz von RIP3 vorgeschlagen, um den Schweregrad der Atherosklerose pharmakologisch zu verringern (Zhe-Wei et al., 2018).

1.4.3 Inflammationsmarker

Die Atherosklerose ist unter anderem gekennzeichnet von einer lokalen Entzündungsreaktion, die durch verschiedene Mediatoren objektiviert werden kann. Diese Entzündung wird durch die verschiedenen pathologischen Prozesse in der Entwicklung atherosklerotischer Plaques hervorgerufen und spielt dadurch auch eine wesentliche Rolle in der Progression der Atherosklerose.

1.4.3.1 COX-2

Cyclooxygenasen (COX) regulieren die Produktion von Eicosanoiden, welche die pathophysiologischen Prozesse in der Gefäßwand modulieren, die zu

Atherosklerose und Thrombose führen (Cipollone und Fazio, 2006). Dazu gehören Thrombozytenaggregation, Kontrolle des Gefäßtonus und lokale Entzündungsreaktionen (Linton und Fazio, 2002). COX-1 wird in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert und vermittelt verschiedene physiologische Funktionen der Zellen (Wu, 1998). Die Expression von COX-2 wird durch verschiedene Zytokine reguliert und kann in verschiedenen Geweben beispielsweise durch Interleukin-1 β (IL-1 β) maßgeblich induziert werden (Giunta et al., 2015). Proinflammatorische Stoffe wie Interleukin-1 und TNF- α können die COX-2-Expression in Monozyten und Makrophagen, sowie Schaumzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen in atherosklerotischen Läsionen stimulieren, weshalb dem Enzym eine besondere Bedeutung in atherogenen Vorgängen beigemessen wird (Crofford, 1997; Baker et al., 1999; Schönbeck et al., 1999). Studien zeigen eine Hemmung der IL-1 β -abhängigen COX-2-Expression durch PACAP im Ratten-Arthrose-Modell (Giunta et al., 2015). Klinisch werden daher schon seit längerer Zeit COX-Inhibitoren wie Acetylsalicylsäure eingesetzt, um die lokale Entzündungsreaktion in atherosklerotischen Gefäßwänden einzuschränken (Bennett et al., 2016; Papageorgiou et al., 2016).

1.4.3.2 Interleukin-1 β

Interleukine sind parakrine, autokrine und systemische Mediatoren von Entzündungsreaktionen. Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches zum Großteil von aktivierten Makrophagen und Monozyten, Schlüsselzellen in der Atherogenese, produziert wird (Bezold et al., 2019). Es wirkt bei systemischen und lokalen Entzündungsreaktionen auf Infektionen, Verletzungen und immunologische Stressoren, wodurch es einen wichtigen Faktor für chronische und akute Inflammation darstellt (Dinarello, 1998). IL-1 β induziert sowohl seine eigene Produktion als auch die Synthese und Expression mehrerer sekundärer Entzündungsmediatoren, einschließlich IL-6 (Ridker, 2016). Arterielle Gefäßwände mit atherosklerotischen Läsionen weisen im Vergleich zu gesunden Arterien eine erhöhte IL-1 β -Expression auf (Galea et al., 1996). Cholesterin und oxidiertes LDL wirken als endogene Signale, welche die IL-1 β -Aktivierung auslösen und über eine Entzündungsreaktion die Entstehung einer Plaque begünstigen können (Peter D'UeWell et al., 2010; Rajamäki et al., 2010). Passend dazu schwächt ein Mangel an IL-1 β bei ApoE-defizienten

Mäusen die Atherogenese ab und die Verabreichung eines monoklonalen Antikörpers gegen IL-1 β verringert die Entwicklung von diätetisch induzierten atherosklerotischen Läsionen in ApoE^{-/-}-Mäusen (Kirii et al., 2003; Bhaskar et al., 2011).

1.4.3.3 Interleukin-6

Die Synthese und Expression von Interleukin-6 (IL-6) als sekundärer Entzündungsmediator wird unter anderem von IL-1 β induziert (Ridker, 2016). Es sind sowohl entzündungsfördernde als auch entzündungshemmende Wirkungen von IL-6 dokumentiert (Reiss et al., 2017). IL-6 wird vor allem mit negativen gesundheitlichen Folgen, darunter Typ-II-Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und verschiedenen Lebererkrankungen verbunden (Pradhan et al., 2001; Lee et al., 2012). Hohe IL-6-Spiegel sind bei endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose zu beobachten und sind kongruent zum Ausmaß der subklinischen Atherosklerose (Mahmud and Feely, 2005; Esteve et al., 2007; Lee et al., 2007). Patienten mit koronarer Herzkrankheit haben hohe IL-6-Konzentrationen, weshalb es ein Entzündungsmarker im Kontext mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko sein kann (Reiss et al., 2017). Bei der Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion ist IL-6 maßgeblich für die Koordination der Migration von Entzündungszellen verantwortlich: Endothelzellen reagieren auf die Bindung eines Komplexes aus IL-6 und dem löslichen IL-6-Rezeptor, indem sie Chemokine freisetzen und die Expression von ICAM-1 erhöhen, wodurch die Rekrutierung und Migration von Leukozyten in die Intima ermöglicht wird (Romano et al., 1997; Hartman and Frishman, 2014; Ait-Oufella et al., 2019). Außerdem übt IL-6 verschiedene atherogene Einflüsse auf Monozyten und Makrophagen aus (Neumann et al., 1997; Tanaka et al., 2016).

1.4.3.4 TNF-alpha

TNF-alpha (TNF- α) ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, welches eine entscheidende Rolle im Immunsystem, in der Zellproliferation und in apoptotischen Prozessen spielt. Eine genetische Störung von TNF- α reduziert das Ausmaß einer Atherosklerose in experimentellen Mausmodellen (Oberoi et al., 2018). Es wird von verschiedenen Zellarten produziert, darunter auch Makrophagen, Monozyten und glatte Muskelzellen (Gray et al., 1984; Pennica et al., 1984; Popa et al., 2007). TNF- α trägt zusammen mit anderen

proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in verschiedenen Immunzellen entscheidend zur Entwicklung atherosklerotischer Läsionen bei, indem es die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, die Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen sowie die Initiierung der Entzündungskaskade innerhalb der Arterienwand fördert (Ross, 1999; Skoog et al., 2002). Des Weiteren beeinträchtigt TNF- α die Stoffwechselwege von Triglyceriden und Cholesterin auf direktem Weg und wirkt dadurch proatherogen (Grunfeld and Feingold, 1991; Memon, 1993; Feingold et al., 1998). Allerdings kann TNF- α wohl auch antiatherogene Wirkungen ausüben, da Mäuse mit TNF-Rezeptor-Mangel im Vergleich zur Normvariante schwerere atherosklerotische Läsionen entwickeln, wenn sie mit cholesterinreicher Nahrung gefüttert werden (Schreyer et al., 1996). Obwohl die pharmakologische Hemmung von TNF- α bei LDL-Rezeptor^{-/-}-Mäusen, welche mit mausspezifischen monoklonalen TNF- α behandelt wurden, die systemische Entzündungsreaktion verringerte, wurden vermehrte Läsionen mit einer erhöhten Expression von Entzündungsmediatoren und geringerer Plaquestabilität gefunden (Oberoi et al., 2018). Diese Beobachtungen sind auf eine Hochregulierung eines „Scavenger“-Rezeptors auf den Makrophagen zurückzuführen, der eine Erhöhung der Cholesterinaufnahme mit der Bildung von Schaumzellen folgt (Schreyer et al., 1996). Ähnlich wichtig wie Makrophagen sind die Endothelial colony-forming cells (ECFCs), welche in Neoangiogenese, vaskulärer Proliferation sowie für die Entwicklung einer Atherosklerose von zentraler Bedeutung sind. Es wurde berichtet, dass PACAP die ECFCs gegen TNF- α induzierte Apoptose über einen entzündungshemmenden Mechanismus schützt (Bian et al., 2017).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss einer PACAP- bzw. PAC1- Defizienz auf die Entstehung und Progression der Atherosklerose im ApoE^{-/-}-Mausmodell untersucht werden.

Dazu wurden nach Kreuzung von PACAP^{-/-} bzw. PAC1^{-/-} mit ApoE^{-/-}-Mäusen folgende Genotypen generiert und untersucht:

1. PACAP^{+/+} / PAC1^{+/+} / ApoE^{-/-} (kurz: „ApoE^{-/-}“) = Kontrolle
2. PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}
3. PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}

Alle Mäuse wurden für 10 Wochen mit Normalfutter und anschließend für 10 weitere Wochen mit cholesterinreichem Futter („Western Type Diet“) ernährt. Die TB wurden entnommen, kryokonserviert und anschließend immunohistomorphometrisch analysiert.

Des Weiteren wurden die Cholesterin- und Triglycerid-Spiegel im Blut gemessen. Körpergewicht und Tibialänge (Bezugsgröße) der Tiere waren ebenfalls Gegenstand der Untersuchungen.

Untersucht wurde die Auswirkung von PACAP- bzw. PAC1-Defizienz auf

- **Phänotypische Veränderungen** wie Körpergewicht, Tibialänge und Plasmalipidspiegel
- **Lumenstenose** des TB
- **Inflammationsmarker** wie die Cyclooxygenase und proinflammatorische Zytokine
- **Plaque Remodeling Marker** wie Apoptose, Autophagie, Nekroptose und Proliferation
- **Morphologische Marker** der atherosklerotischen Plaque, insbesondere Makrophagen Subtypen, glatte Muskelzellen und Zelldichte

2 Material und Methoden

2.1 Antikörper, Chemikalien, Geräte und Materialien

2.1.1 Antikörper

Primärantikörper

Tabelle 3: verwendete Primärantikörper. Jeweils mit Zielstruktur, Seriennummer und Hersteller

Antikörper	Nummer	Hersteller
Kaninchen anti-Maus APG5L/ATG5	ab 108327	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-Maus cleaved Caspase 3	9661	Cell Signaling/NEB, Frankfurt, Deutschland
Kaninchen anti-Maus COX-2	ab 15191	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-Maus IL-1β	ab 9722	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-Maus IL 6	ab 6672	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-Maus Ki 67	ab 15580	Abcam, Cambridge, UK
Ratte anti-Maus MoMa-2	MCA519GT	Bio-Rad AbD Serotec, Buchheim, Deutschland
Kaninchen anti-Maus RIP3	ab 56164	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-Maus sm-α-Actin	ab 5694	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-Maus TNF-α	ab 6671	Abcam, Cambridge, UK

Sekundärantikörper

Tabelle 4: verwendete Sekundärantikörper. Jeweils mit Zielstruktur, Seriennummer und Hersteller

Antikörper	Nummer	Hersteller
Ziege anti-Kaninchen IgG HRP	ZRH1158	Linaris, Dossenheim, Germany
Ziege anti-Ratte IgG HRP	STAR114	AbD Serotec, Düsseldorf, Germany

2.1.2 Chemikalien

1. 30% Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
2. Aceton	Acros organics, New Jersey, USA
3. Cholesterinreiches Futter (CRF) „Western Type Diet“ (21% fat, 0.15% cholesterol and 19.5% casein)	Altromin, Lage, Deutschland
4. Diaminobenzidin (DAB)	BIO-Rad, UK
5. DNA Extraktionslösung	PeqLab, VWR Company, Erlangen, Deutschland
6. Eosin gelblich Certistian (trocken)	Merck, Darmstadt, Deutschland
7. Ethanol, 96% und 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
8. Gelatine gepulvert	Merck, Darmstadt, Deutschland
9. Hämatoxylin -Lösung nach Mayer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
10. Heparin Liquemin® 25000UI/5ml	Roche, Grenzach, Deutschland
11. Isopropanolol	Merck, Darmstadt, Deutschland
12. Kaliumchrom-III-sulfat reinst.	Merck, Darmstadt, Deutschland
13. Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
14. Methylenblau	Riedel-de-Haen AG, Seelze, Deutschland
15. Normales Schweineserum (NSS)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
16. Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
17. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	
- Kaliumchlorid (KOH) Plätzchen	Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl) >99,8%	Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
- di-Natriumhydrogenphosphad-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
18. Standardfutter LASQC Diet Rod16 (SF) Deutschland	LASvendi, Soest,
19. Tissue-TEK™ O.C.T	Sakura Finetek, Stauffen, Deutschland
20. Triton X-100	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
21. Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Geräte und Material

1. Bildverarbeitungssoftware	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
2. Cholesterin-Cholesteryl Ester Quantification Assay Kit	Abcam plc, Cambridge, UK
3. Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
4. Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz, Deutschland
5. Ideapad U410	Lenovo, Hongkong
6. Kamera Axiocam Hrc	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
7. Kryostat Hyrax C60	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
8. Lichtmikroskop Orthoplan	Leitz, Wetzlar, Deutschland
9. Magnetrührer Ika Mag	Ika, Staufen, Deutschland
10. Messkolben	Schott, Mainz, Deutschland
11. Messzylinder	IDL, Nidderau, Deutschland
12. Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
13. Mikroskop Axio Imager.M2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
14. Mikroskop Olympus	Olympus, Hamburg, Deutschland
15. Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland
16. Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
17. Spritzenpumpe Secura	B. Braun, Melsungen, Deutschland
18. Triglyceride Quantification Assay Kit	Abcam plc, Cambridge, UK
19. Vortex-Rührer	Cenco, Breda, Niederlande
20. Waage K7	Mettler, Zürich, Schweiz
21. Wärmeschrank Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.4 Oligonukleotide

Es wurden Oligonukleotide von Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland verwendet.

ApoE-Knockout:

<i>oIMR180 forward</i>	5'-GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG-3' [245 bp]
<i>oIMR182 reverse</i>	5'-GCC GCC CCG ACT GCA TCT-3' [245 bp]

PACAP-Knockout:

<i>PACAP-neoORF</i>	5'-CACCGGCCTTTAGGGACCCTTGTA-3' [520bp (+/+)]
<i>PACAP-2R</i>	5'-GCTATTCGGCGTCCTTTGTTTTTAACCC-3' [520bp+320bp (+/-)]
<i>PACAP-PNT1R</i>	5'-TAGGGGAGGAGTAGAAGGTGGCGC-3' [310bp (-/-)]

PAC1-Knockout:

<i>PAC1-F</i>	5'-GGA CTA TGA GGA ATA ATA GGA TCC-3' [404bp (+/+)]
<i>PAC1-R</i>	5'-AAA TGT ACC CAT TCT CCT GCT GG-3' [404bp+265bp (+/-)]
<i>mPAC1_F514</i>	5'-CCT ATG GCT ATT GCT ATG CAC TC-3' [265bp (-/-)]

2.2 Mäuse

2.2.1 Generierung

Die PACAP- beziehungsweise PAC1-Defizienz der Mäuse wurde erwirkt, indem der ORF aus dem jeweiligen Genlokus ausgeschnitten wurde (s. Abb. 12) (Hamelink et al., 2002). Die entstandenen Mutanten wurden anschließend mit ApoE^{-/-} Mäusen gekreuzt (Charles River, Sulzfeld, Germany).

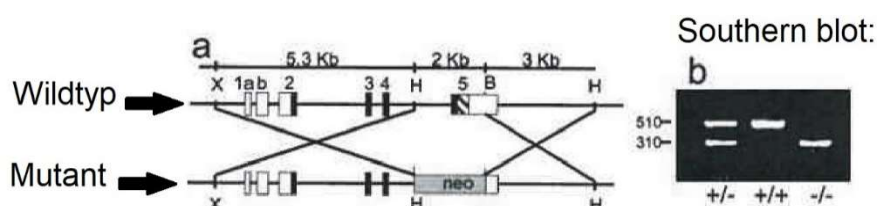


Abbildung 12: Herstellung von PACAP- bzw. PAC1-defizienter Mäuse durch Exzision des jeweiligen ORF aus dem Genlokus. Schwarze Flächen: Exons. Schraffierte Fläche unter Exon 5: PACAP- bzw. PAC1-ORF. (aus: Hamelink et al., 2002, modifiziert.)

Der Tierversuchsantrag wurde durch das Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen V54-19 c 2015 h 01 MR 20/26 Nr.21/2014 genehmigt.

Für die Untersuchungen wurden männliche Mäuse der „strain“ C57BL/6 verwendet. Den Mäusen der Kontrollgruppe wurden außer dem ApoE-Gen keine weiteren Gene deaktiviert (PACAP^{+/+} / PAC1^{+/+} / ApoE^{-/-}).

2.2.2. Genotypen

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde DNA mit einem kommerziellen Extraktions-Kit (DNA Extraktionslösung; PeqLab, VWR Company, Erlangen, Deutschland) aus dem Mäuseohr isoliert. Anschließend wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Intron-übergreifenden Oligonukleotiden durchgeführt. Die PCR-Analyse zeigte repräsentative Einzelbanden für PACAP^{-/-} (310 bp), PAC1^{-/-} (265 bp) und ApoE^{-/-} (245 bp). Folgende Genotypen standen für die Untersuchungen zur Verfügung:

1. PACAP^{+/+} / PAC1^{+/+} / ApoE^{-/-} (kurz „ApoE^{-/-}“)
2. PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}
3. PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}

2.2.3 Fütterung, Gewebe- und Blutentnahme

Alle Mäuse erhielten in den ersten zehn Wochen Standardfutter (LASQC Diet Rod16, Fa. LASvendi, Soest; SF). Daraufhin wurden sie für weitere zehn Wochen mit cholesterinreichem Futter („Western Type Diet“ mit 21% Fett, 0,15% Cholesterin und 19,5% Casein; Altromin GmbH, Lage, Deutschland; CRF) ernährt. Zur Präparation wurden die Mäuse gewichtsadaptiert mit einem Gemisch aus Ketamin (150mg/kg) und Xylazin (20mg/kg) betäubt und vor der Dissektion gewogen. Daraufhin erfolgte die Eröffnung der Thoraxhöhle. Es wurde ein Schnitt an der Spitze des linken Ventrikels gesetzt, in den eine Kanüle eingeführt wurde. Der rechte Vorhof wurde eröffnet. Über die Kanüle im linken Ventrikel wurde in das Gefäßsystem eine 38°-39°C warme Lösung aus PBS und 5UI/ml Heparin (Liquemin® 25000 UI / 5 ml, Roche, Grenzach, Deutschland) bis zur Blutleere gespült. Dies erfolgte mit einem Volumen von 30ml und einer Flussrate von 99,9 ml/h mithilfe einer automatischen Spritzenpumpe (Secura, B. Braun, Melsungen, Deutschland). Um den Truncus Brachiocephalicus während der Dissektion darzustellen, wurden 0,25-0,3 ml gefiltertes 0,25 %-iges Methylenblau

(Riedel-de-Haen AG, Seelze, Deutschland) gelöst in 0,9 % Natriumchlorid durch dieselbe Kanüle in den linken Ventrikel eingeleitet. Daraufhin konnten das Herz sowie die zu untersuchenden Gefäße präpariert, entnommen und in Tissue-TEK® (Sakura Finetek, Stauffen) asserviert werden. Zur Konservierung wurden die Gewebeproben in flüssigstickstoffgekühltem Isopentan schockgefroren und für spätere Analysen bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Tibialänge wurde je Maus die linke Tibia freipräpariert und entnommen. Anschließend wurden die Tibiae zusammen mit einer Skala fotografiert. Die Messung erfolgte digital durch die ImageJ software (Scion ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, USA), indem der Abstand vom Zentrum der Tibiakondylen bis zur Spitze des malleolus medialis gemessen wurde.

2.2.4 Bestimmung der Plasmalipid- und -cholesterolspiegel

Beim Öffnen des rechten Atriums wurden Blutproben entnommen und heparinisiert (0,25 IE / ml, Roche). Das durch Zentrifugation (10 min, 650 g), erhaltene Plasma wurde in einem Gefrierschrank bei -80 °C gelagert. Die Plasmacholesterin- und Triglyceridspiegel wurden spektrophotometrisch ($\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}$) unter Verwendung eines Mikroplattenlesegeräts (Sunrise, Tecan, Männedorf, Schweiz) und entsprechender Kits (Cholesterin / Cholesterylester-Quantifizierungskit ab65359 oder Triglyceridquantifizierungsassay-Kit ab65336, Abcam, Cambridge, UK) gemäß den Anweisungen des Herstellers quantifiziert.

2.3 Histologie

2.3.1 Chromalaunbeschichtung der Objektträger

Chromalaunbeschichtete Objektträger sorgen für eine bessere Anhaftung Schnitten der Gewebeproben, was vor allem bei empfindlichen Schnitten, wie sie hier angefertigt wurden, notwendig ist. Aufgrund der Bearbeitung mit teilweise aggressiven Chemikalien im Rahmen der immunhistomorphometrischen Analysen ist ein sicherer Halt der Schnitte am Objektträger essenziell.

Herstellung der Chromalaun-Gelatine und Durchführung der Beschichtung:

0,1g Kaliumchrom-III-sulfat reinst

Merck AG Darmstadt

1,0g Gelatine gepulvert

Merck AG Darmstadt

200ml Aqua dest. erhitzt auf 50°C

1. Lösen von 0,1g Kaliumchrom-III-sulfat in 100ml Aqua dest.	10 min bei 50°C
2. Lösen von 1,0g Gelatine gepulvert in 100ml Aqua dest.	10 min bei 50°C
3. Mischung der beiden Lösungen auf Magnetrührer	10 min bei 50°C
4. Auftragen der Chromalaun-Gelatine auf Objektträger	
5. Trocknen der beschichteten Objektträger	über Nacht bei 21°C

2.3.2 Herstellung der Histologieschnitte

Die in Tissue-Tek® gebetteten Trunci wurden mittels Kryostat (Zeiss Hyrax C60) bei ca. -20 °C in 5-7 µm dünne Gewebescheiben geschnitten. Diese wurden anschließend auf die mit chromalaunbeschichteten Objektträgern aufgezogen. Je Objektträger wurden 3-4 Gewebeschnitte aufgetragen. Während dieser Prozedur konnte die Beschaffenheit der angefertigten Schnitte bereits mikroskopisch beurteilt werden. Die Objektträger wurden wiederum anschließend bei -80 °C gelagert, um sie zu einem späteren Zeitpunkt für immunhistochemische und histomorphologische Analysen zu verwenden.

2.3.3 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Hämalaun ist ein saurer Farbstoff, weshalb sich dieser an basische Strukturen bindet. Zu diesen gehören beispielsweise Zellkerne und das rER. Zunächst färben sie sich rot-braun, woraufhin durch Alkalisierung unter fließendem Leitungswasser ein Farbumschlag ins bläuliche stattfindet. Danach werden die Objektträger in Eosin getaucht, wodurch sich die eosinophilen Zellbestandteile rot färben. Durch den Kontrast von Rot zu Blau erreicht man eine gute Darstellung und Abgrenzung einzelner Zellinhalte, vor allem der Kerne. Bestandteile der Farbstoffe:

Hämalaun	Eosin
1. 0,1g Hämatoxylin	1. 100ml Eosin Y (1%)
2. 5,0g Kalialaun	2. 10ml Phloxin B (1%)
3. 0,02g Natriumjodat	3. 4ml Eisessig
4. 100ml Aqua dest	4. 780ml Ethanol (96%)

2.3.4 Protokoll für Immunhistochemische Färbungen

Teil 1:

1. Fixierung der Kryoschnitte in 4% Paraformaldehyd-Lösung in PBS (PFA / PBS)	12 min.
2. Spülen in PBS	3 x 5 min.
3. Blockieren der endogenen Peroxidase in 3% H ₂ O ₂ -Lösung	20 min.
4. Spülen in PBS	3 x 5 min.
5. Blockieren unspezifischer Proteinbindungsstellen durch Überschichten mit 1% Schweineserum	30 min. bei 37°C
6. Spülen in PBS	3 x 5 min.
7. Inkubieren mit dem entsprechenden Primärantikörper (vgl. Primärantikörper)	Über Nacht bei 4°C oder 60 min. bei 37°

Teil 2:

1. Spülen in PBS	3 x 5 min.
2. Inkubieren mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (vgl. Sekundärantikörper)	60 min. bei 37°C
3. Spülen in PBS	3 x 5 min.
4. Visualisieren der Reaktion mit DAB	5 min. bzw. n. Sicht
5. Spülen in PBS	3 x 5 min.
6. Gegenfärbung (Kernfärbung) in Mayers Hämalaunlösung	30 sec.
7. Bläuen unter fließendem Leitungswasser	10 min.
8. Spülen in Aqua dest.	
9. Entwässern in einer Isopropanylalkoholreihe aufsteigender Konzentrationen	
10. Entalkoholisierung in einer Xylolreihe aufsteigender Konzentrationen	
11. Eindecken der Präparate mit Histokit	
12. Trocknen der Präparate über Nacht	

2.3.5 Verdünnungen der verwendeten Antikörper

Um die jeweiligen Immunhistochemischen Färbungen durchzuführen, wurden die folgend aufgelisteten Verdünnungen der jeweiligen Primär- und Sekundärantikörper verwendet (s. Tab. 5 & 6).

Tabelle 5: verwendete Primärantikörper mit der jeweiligen Verdünnung:

Primärantikörper	Verdünnung
Kaninchen anti-Maus APG5L/ATG5	1:100
Kaninchen anti-Maus cleaved Caspase 3	1:400
Kaninchen anti-Maus COX-2	1:200
Kaninchen anti-Maus IL-1β	1:100
Kaninchen anti-Maus IL 6	1:500
Kaninchen anti-Maus Ki 67	1:250
Ratte anti-Maus MoMa-2	1:50
Kaninchen anti-Maus RIP3	1:100
Kaninchen anti-Maus sm-α-Actin	1:150
Kaninchen anti-Maus TNF-α	1:50

Tabelle 6: verwendete Sekundärantikörper mit der jeweiligen Verdünnung:

Sekundärantikörper	Verdünnung
Ziege anti-Kaninchen IgG HRP	1:200
Ziege anti-Ratte IgG HRP	1:100

2.4 Auswertung

2.4.1 Immunhistochemie und Histomorphometrie

Die Querschnitte des TB wurden immunhistochemisch und histomorphometrisch analysiert (s.o.). Die atherosklerotischen Plaques wurden mithilfe der jeweiligen Antikörper auf Makrophagen und Monozyten (MoMa-2), Entzündungsprozesse (IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2), Proliferation (Ki-67), glatte Muskelzellen (sm- α -

Actin), Autophagie (ATG5), Apoptose (Aktive-Caspase-3) und Nekroptose (RIP3) untersucht. Mithilfe der HE-Färbung wurden Lumen- und Plaqueflächen analysiert. Die Lumenstenose wurde durch computerassistierte Markierung von Lumen- und Plaquebereichen entlang der Lamina Elastica interna und den intraluminalen Plaquegrenzen ermittelt. Hierbei nutzten wir die Software ImageJ (Scion ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Zur Berechnung der Lumenstenose wurde folgende Formel benutzt:

$$\text{(Plaquefläche } [\mu\text{m}^2]) / \text{(Lumenfläche } [\mu\text{m}^2]) \times 100\% = \text{Lumenstenose } (\%)$$

Zur Berechnung der Immunreaktiven Plaquefläche wurde folgende Formel benutzt:

$$\text{(immunreaktive Plaquefläche } [\mu\text{m}^2]) / \text{(gesamte Plaquefläche } [\mu\text{m}^2]) \times 100\% = \text{immunreaktive Plaquefläche } (\%)$$

Die Zelldichte (Zellkerne / mm²) einer atherosklerotischen Plaque wurde analysiert, indem alle Zellkerne pro Plaquefläche gezählt und ihre Anzahl ins Verhältnis mit der gesamten Plaquefläche gesetzt wurde.

Dokumentiert wurden die immunhistochemisch analysierten Präparate mit dem Mikroskop Axio Imager.M2 und dem Bildverarbeitungsprogramm Axiovision Rel.4.8.

2.4.2 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit SigmaPlot 12 (Systat Software Inc., San José, USA) durchgeführt. Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Normalitätstest und dem Brown-Forsythe-Gleichvarianztest analysiert. Die statistische Signifikanz wurde durch den ungepaarten „2-tailed Students t-Test“ bestimmt. Im Falle eines fehlgeschlagenen Normalitätstests und / oder eines Tests mit gleicher Varianz wurde der Mann-Whitney-U-Rang-Summen-Test angewendet. Gegebenenfalls wurde die statistische Signifikanz durch Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) mit entsprechenden Post-hoc-Tests bestimmt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert + Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ war. Die grafischen Abbildungen wurden mittels Microsoft Excel erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewicht und Tibiallänge

3.1.1 Körpergewicht

PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}

Das Körpergewicht war bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und bei ApoE^{-/-} Mäusen (Kontrolle) nahezu gleich (Abb. 13).

PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}

Das Körpergewicht war bei den PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} und bei ApoE^{-/-} Mäusen ähnlich (Abb. 13).

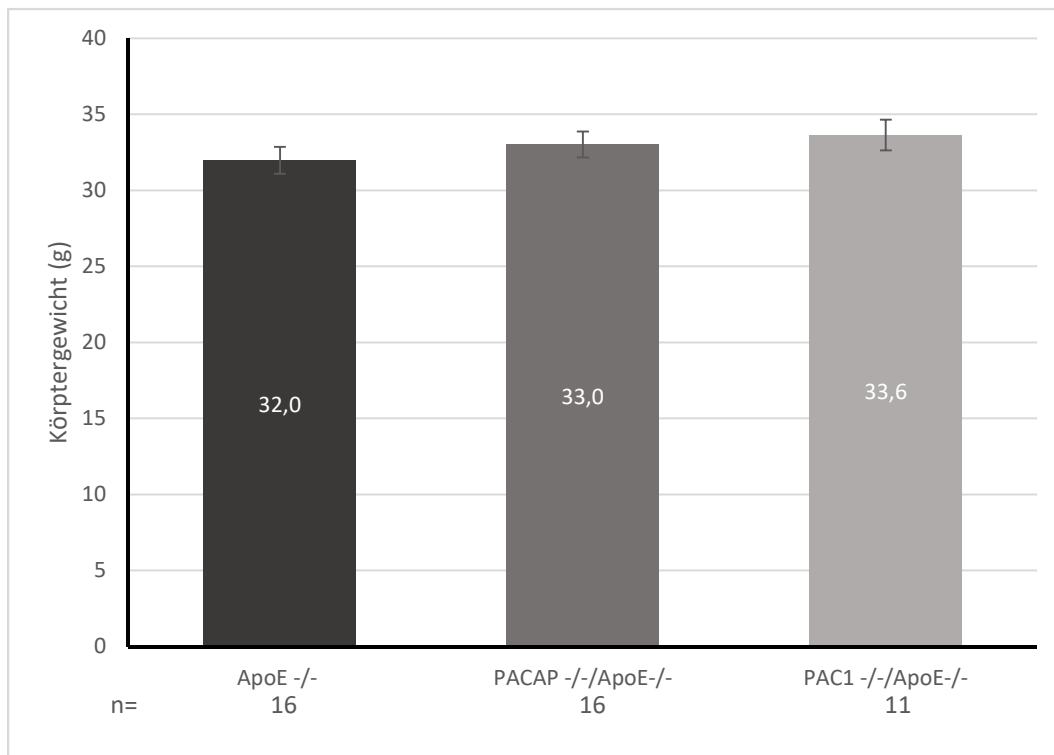


Abbildung 13: durchschnittliches Körpergewicht (g) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} -Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF; Mittelwerte + SEM.

3.1.2 Tibiallänge

PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}

Die Tibiae waren bei den PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen durchschnittlich **signifikant 1,1-fach (p=0,013) länger** als die der ApoE^{-/-}- Mäuse (Abb. 14).

PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}

Die durchschnittliche Tibiallänge war bei den PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen ähnlich wie die der ApoE^{-/-}- Mäuse (Abb. 14).

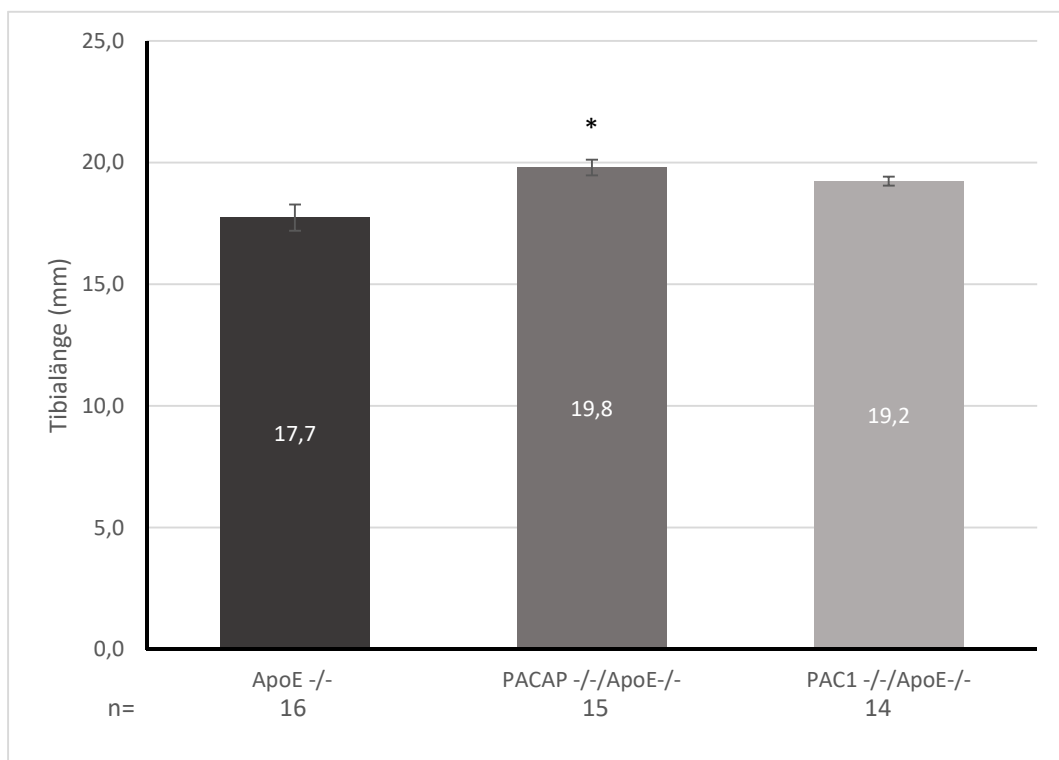


Abbildung 14: durchschnittliche Tibiallänge (mm) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} -Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF; Mittelwerte + SEM; ttest *p<0,05 vs. ApoE^{-/-}(Kontrolle).

3.2 Plasma-Analysen

3.2.1 Plasma-Cholesterinspiegel

PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}

Die Plasma-Cholesterinkonzentrationen waren nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF bei den PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} Mäusen ähnlich wie die der ApoE^{-/-} Mäuse (Abb. 15).

PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}

Die Plasma-Cholesterinkonzentrationen waren nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF bei den PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} Mäusen 1,4-fach höher (nicht signifikant) als die der ApoE^{-/-} Mäuse (Abb. 15).

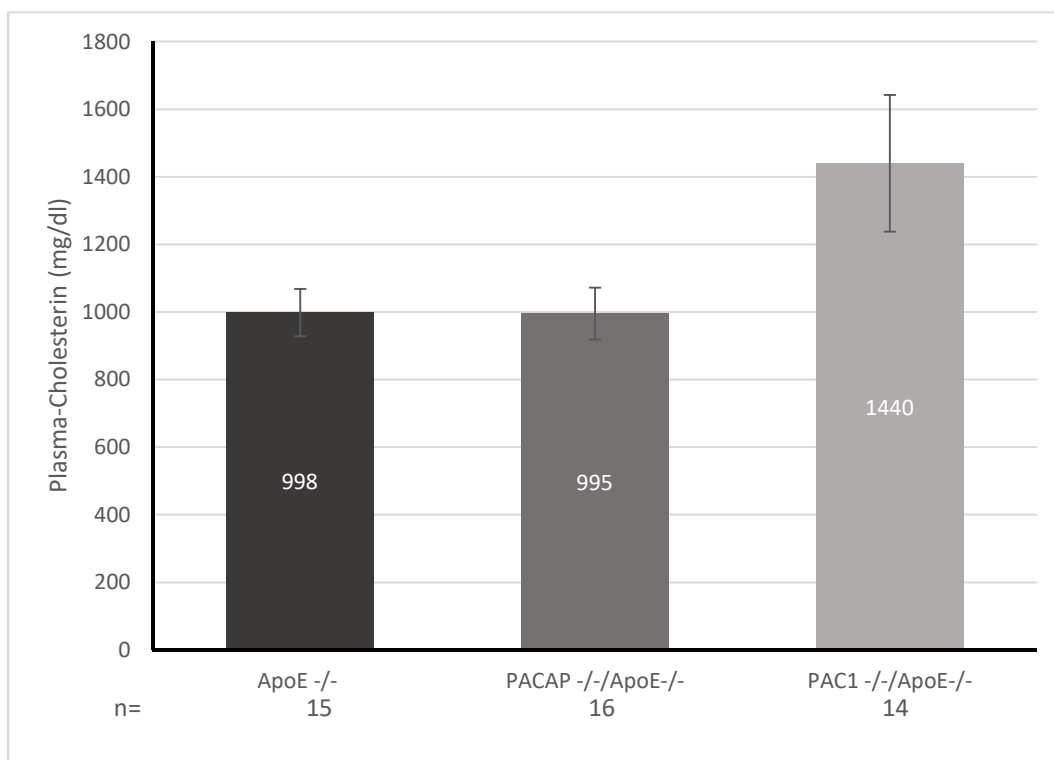


Abbildung 15: durchschnittlicher Plasma-Cholesterinspiegel (mg/dl) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} -Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF; Mittelwerte + SEM.

3.2.2 Plasma-Triglyceridspiegel

PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}

Die Plasma-Triglyceridkonzentrationen waren nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF bei den PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} Mäusen ähnlich wie die der ApoE^{-/-} Mäuse (Abb. 16).

PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}

Die Plasma-Triglyceridkonzentrationen waren nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} Mäusen 1,3-fach höher (nicht signifikant) als bei ApoE^{-/-} Mäusen (Abb. 16).

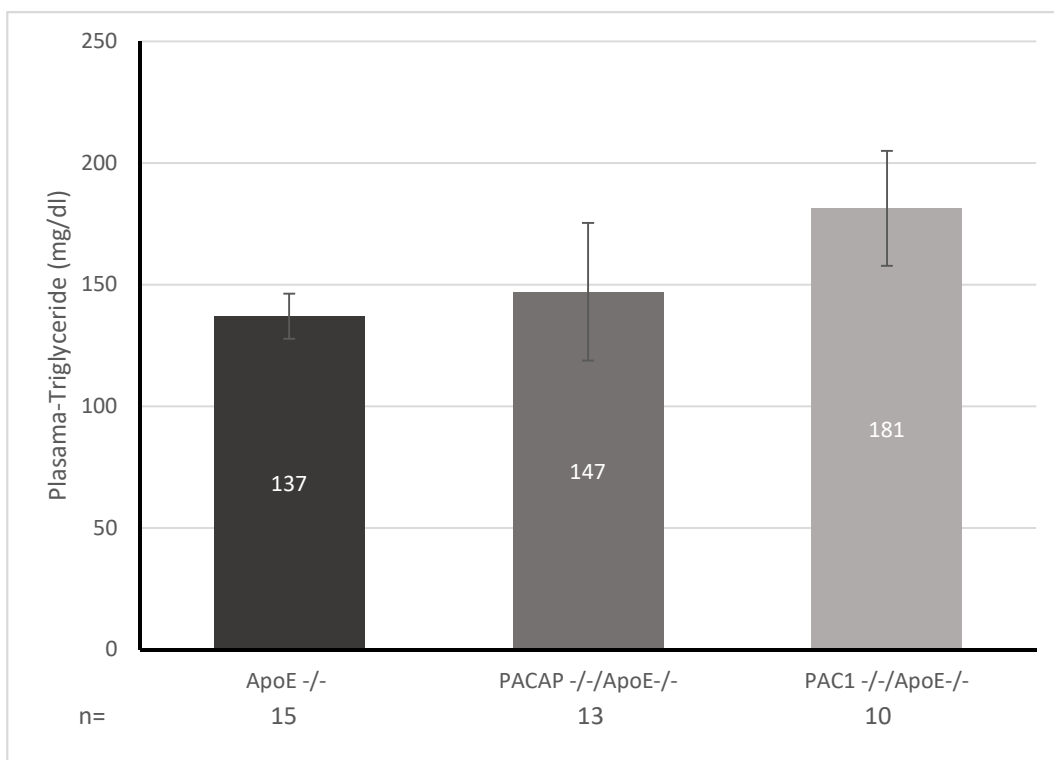


Abbildung 16: durchschnittlicher Plasma-Triglyceridspiegel (mg/dl) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} -Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF; Mittelwerte + SEM;

3.3 Lumenstenose

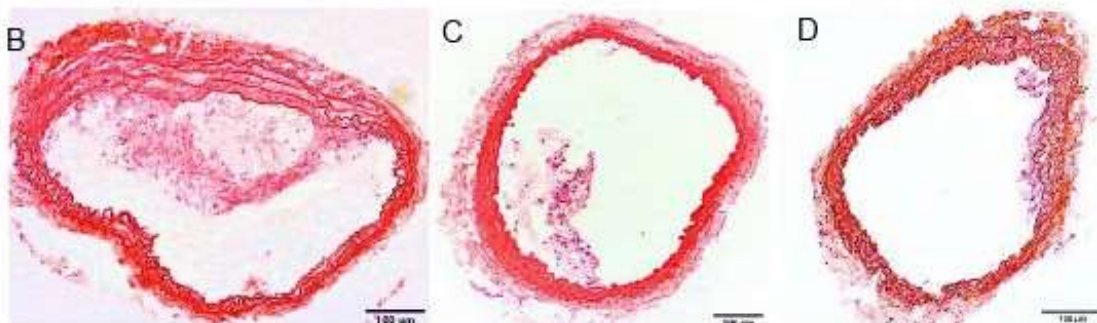
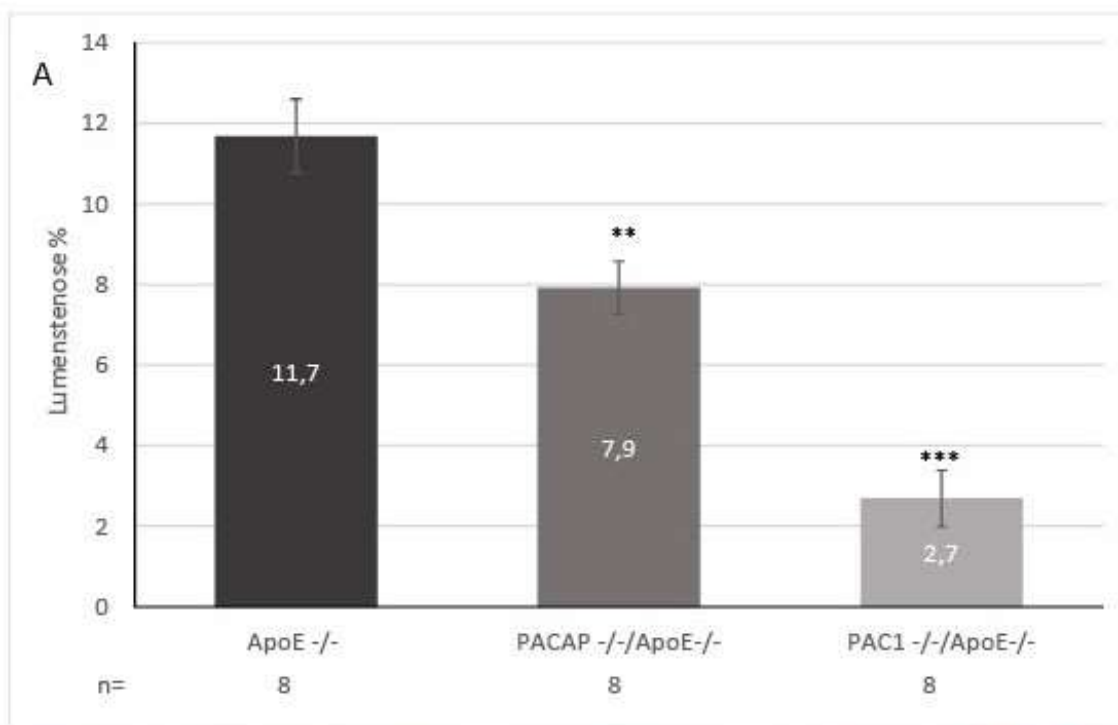
HE-gefärbte Gefäßquerschnitte wurden verwendet, um die plaquebedingte Lumenstenose zu quantifizieren (Abb. 17).

PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}

Die durchschnittliche Lumenstenose war bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} Mäusen **signifikant (p=0,004) 1,5-fach geringer** als bei ApoE^{-/-} Mäusen (Abb. 17).

PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}

Die durchschnittliche Lumenstenose war bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} Mäusen **signifikant (p<0,001) 4,3-fach geringer** als bei ApoE^{-/-} Mäusen (Abb. 17).



Mittelwerte + SEM; ttest **p<0,01, ***p<0,001 vs. ApoE^{-/-}(Kontrolle) (n = 8). Der Students t-Test wurde angewandt. Exemplarische HE gefärbte Gefäßquerschnitte von B: ApoE^{-/-} (Kontrolle), C: PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}, sowie D: PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} -Mäusen.

3.4 Morphologische Marker

Die morphologischen Marker MoMa-2 (Monozyten & Makrophagen) und sm- α -Actin (glatte Muskelzellen) wurden in den atherosklerotischen TB-Plaques von PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}, PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}-Mäusen (Kontrolle) immunhistomorphometrisch analysiert.

3.4.1 MoMa-2 (Monozyten & Makrophagen)

Der prozentuale Anteil der MoMa-2-positiven Plaquefläche war bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} Mäusen **signifikant (p=0,023) 5,8-fach geringer** als jener der ApoE^{-/-}-Mäuse (Abb. 18), während bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} Mäusen kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden konnte.

3.4.2 sm- α -Actin (glatte Muskelzellen)

Der prozentuale Anteil der sm- α -Actin-positiven Plaquefläche war bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} Mäusen **signifikant (p=0,009) 1,5-fach geringer** als jener der ApoE^{-/-} Mäuse (Abb. 27). Bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} Mäusen war der Anteil der sm- α -Actin-positiven Plaquefläche **signifikant (p<0,001) 2,2-fach geringer** als bei ApoE^{-/-} Mäusen (Abb. 19).

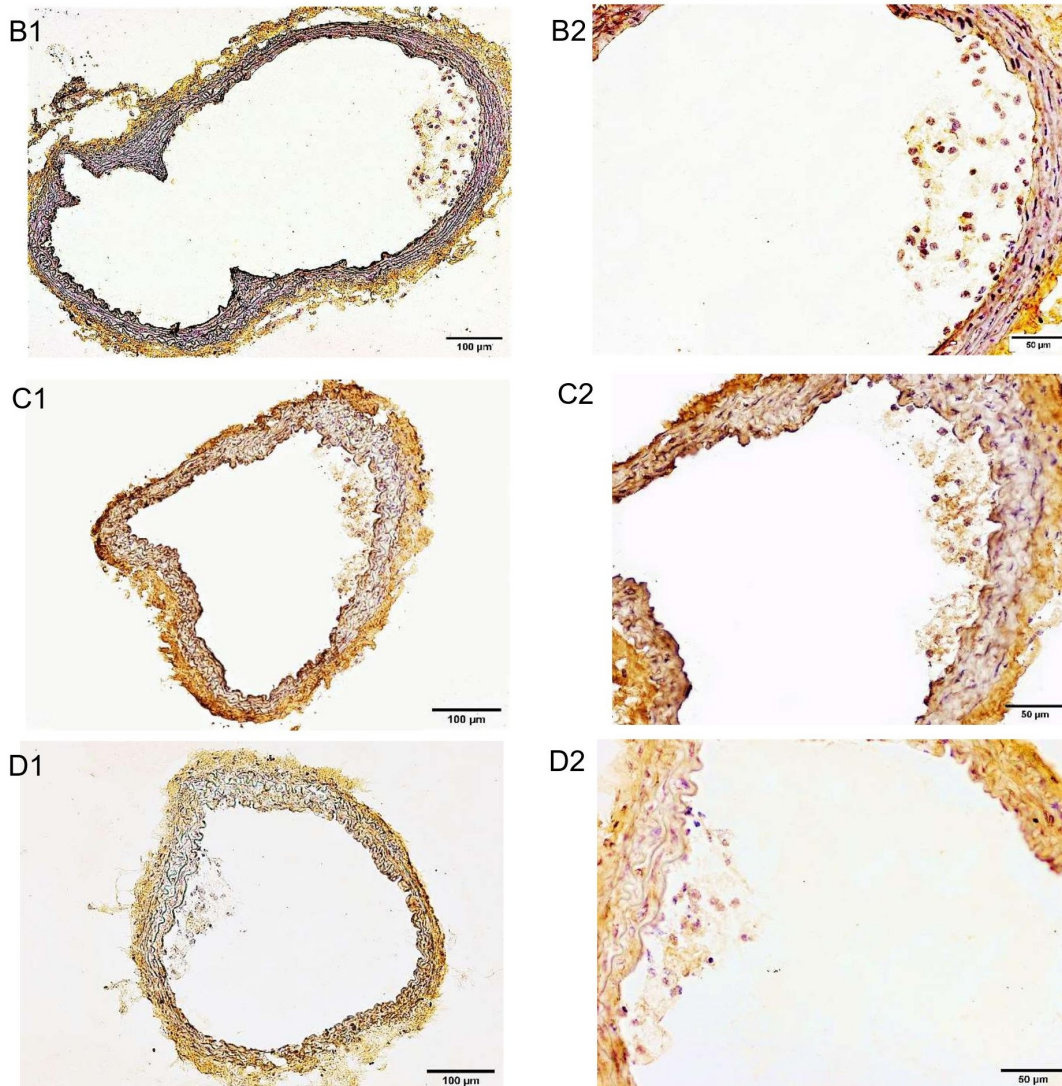
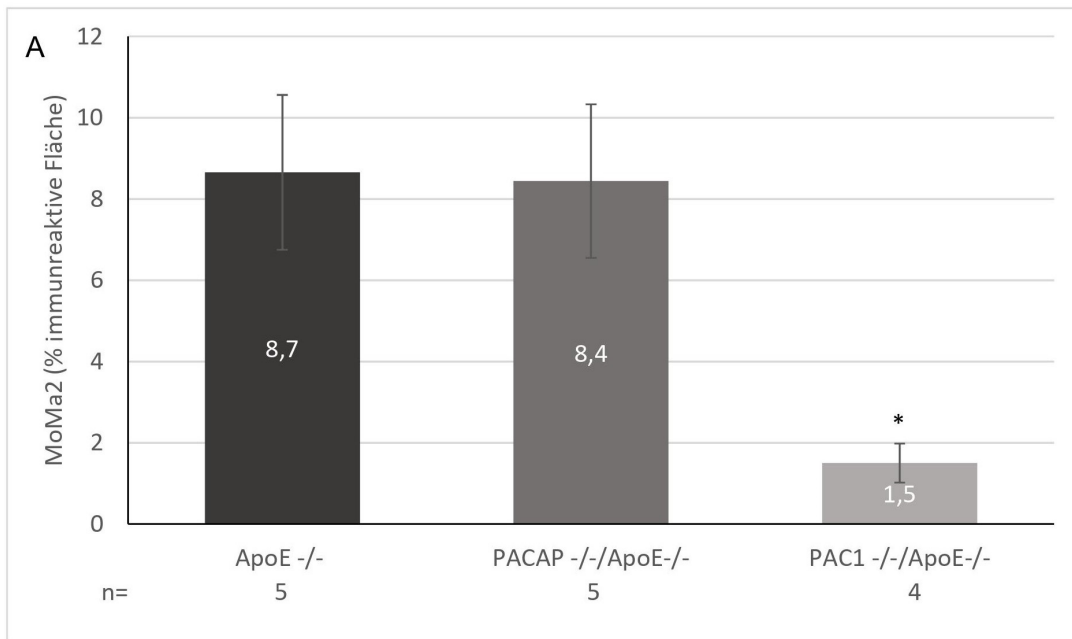


Abbildung 18: A: Anteil der MoMa-2-positiven Plauefläche (%) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} -Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF; Mittelwerte + SEM. ttest: *p<0,05 vs. ApoE^{-/-}(Kontrolle) (n = 4-5). Der Students t-Test wurde angewandt. Exemplarische Gefäßquerschnitte mit MoMa-2⁺ Arealen; Zellkerne (blau) mit Hämatoxylin gefärbt. B1: ApoE^{-/-} (Kontrolle); B2: Ausschnitt aus B1; C1: PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}; C2: Ausschnitt aus C1; D1: PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}; D2: Ausschnitt aus D1. Braun gefärbte Arealen kennzeichnen eine Immunreaktion.

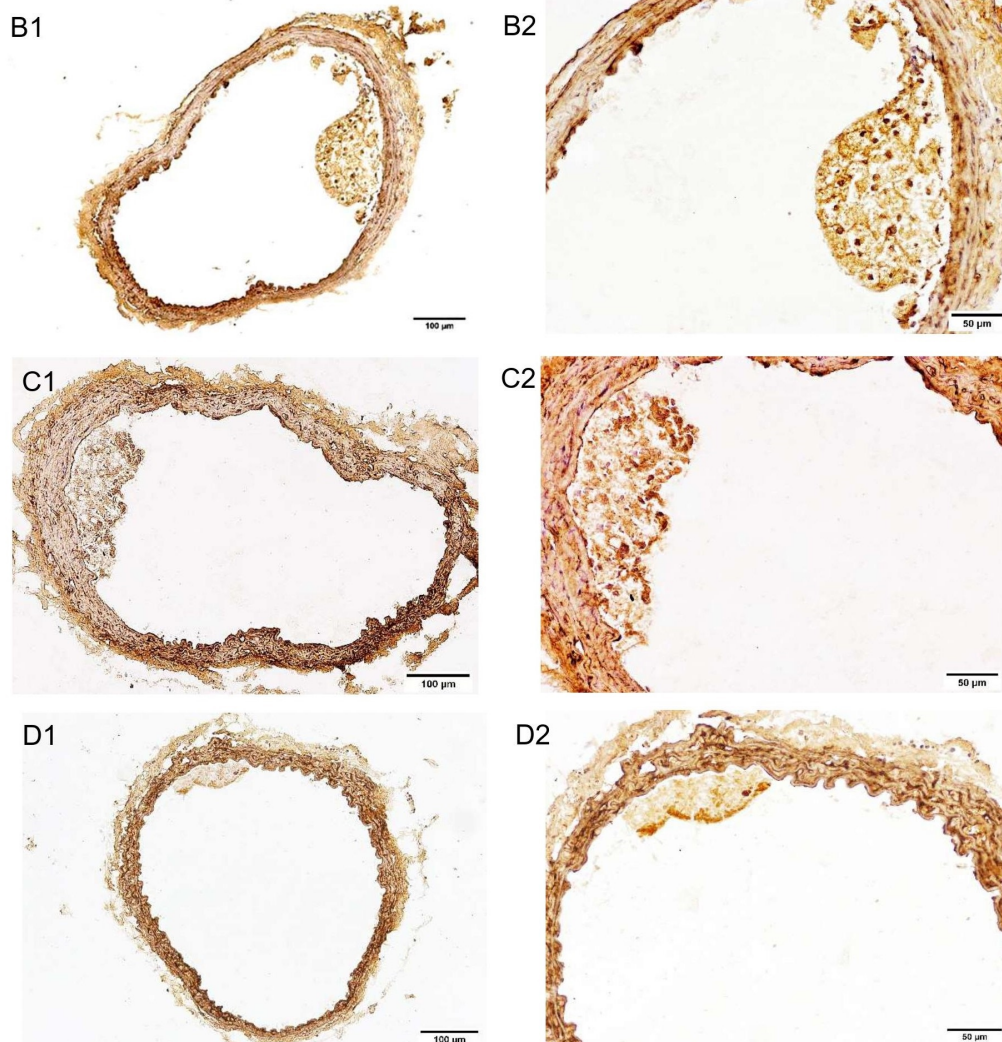
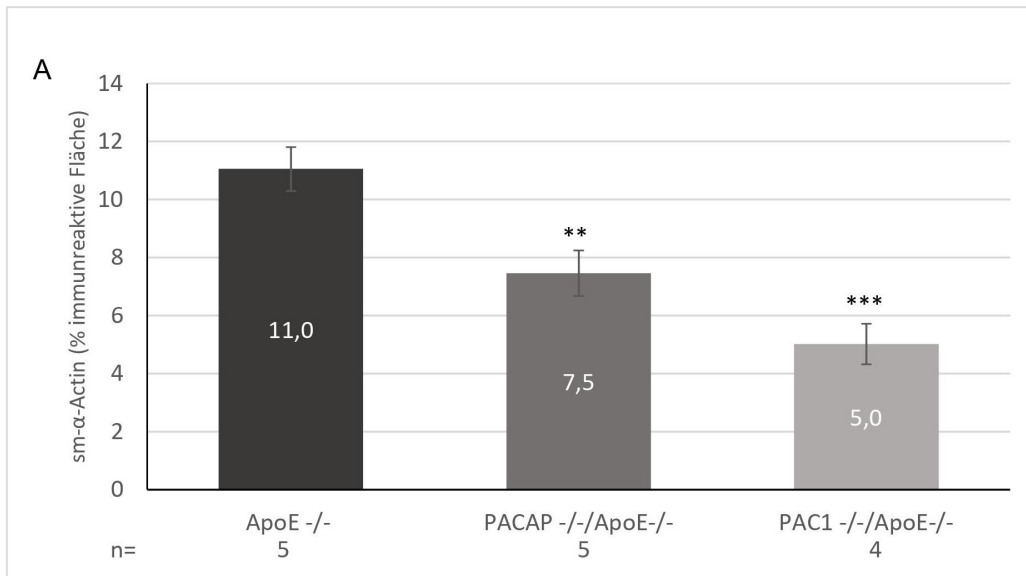


Abbildung 19: A: Anteil der sm- α -Actin-positiven Plauefläche (%) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} -Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF; Mittelwerte + SEM. ttest: **p<0,01, ***p<0,001 vs. ApoE^{-/-}(Kontrolle) (n = 4-5). Der Students t-Test wurde angewandt. Exemplarische Gefäßquerschnitte mit sm- α -Actin⁺ Arealen; Zellkerne (blau) mit Hämatoxylin gefärbt. B1: ApoE^{-/-} (Kontrolle); B2: Ausschnitt aus B1; C1: PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}; C2: Ausschnitt aus C1; D1: PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}; D2: Ausschnitt aus D1. Braun gefärbte Areale kennzeichnen eine Immunreaktion.

3.5 Remodeling Marker

Die Remodeling-Marker (Autophagie [ATG5], Nekroptose [RIP3], Apoptose [Caspase-3], Proliferation [Ki-67]) wurden in atherosklerotischen TB-Plaques von PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}, PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}-Mäusen (Kontrolle) immunhistomorphometrisch analysiert.

3.5.1 ATG5

Immunhistochemische Analysen mittels ATG5 Antikörper zeigten eine peri-/paranukleär lokalisierte Immunreaktivität (Abb. 20). Bei den PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen war der prozentuale Anteil der ATG5-positiven Plauefläche **signifikant (p=0,045) 2,2-fach geringer** als jener der ApoE^{-/-}- Mäuse. Der prozentuale Anteil der ATG5-positiven Plauefläche war bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}- Mäusen ähnlich (Abb. 20).

3.5.2 Ki-67 (Proliferation)

Die nukleäre Immunreaktivität von Ki-67 konnte durch entsprechende Antikörper sichtbar gemacht werden (Abb. 21). Der prozentuale Anteil der Ki-67-positiven Zellkerne war bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen **signifikant (p<0,001) 2,6-fach größer** als bei ApoE^{-/-}- Mäusen (Abb. 21). Bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen war er 1,3-fach geringer im Vergleich zu ApoE^{-/-}- Mäusen, allerdings war der Unterschied statistisch nicht signifikant (Abb. 21).

3.5.3 Caspase 3, RIP3

Immunhistochemische Untersuchungen mittels entsprechender Antikörper zeigten die peri- und paranukleäre Immunreaktivität von Caspase-3 und RIP3 in Gefäßquerschnitten (Abb. 22, 23). Die prozentualen Anteile der Caspase-3- bzw. RIP3-positiven Plaueflächen zeigten sowohl bei den PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- als auch bei den PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu ApoE^{-/-}- Mäusen.

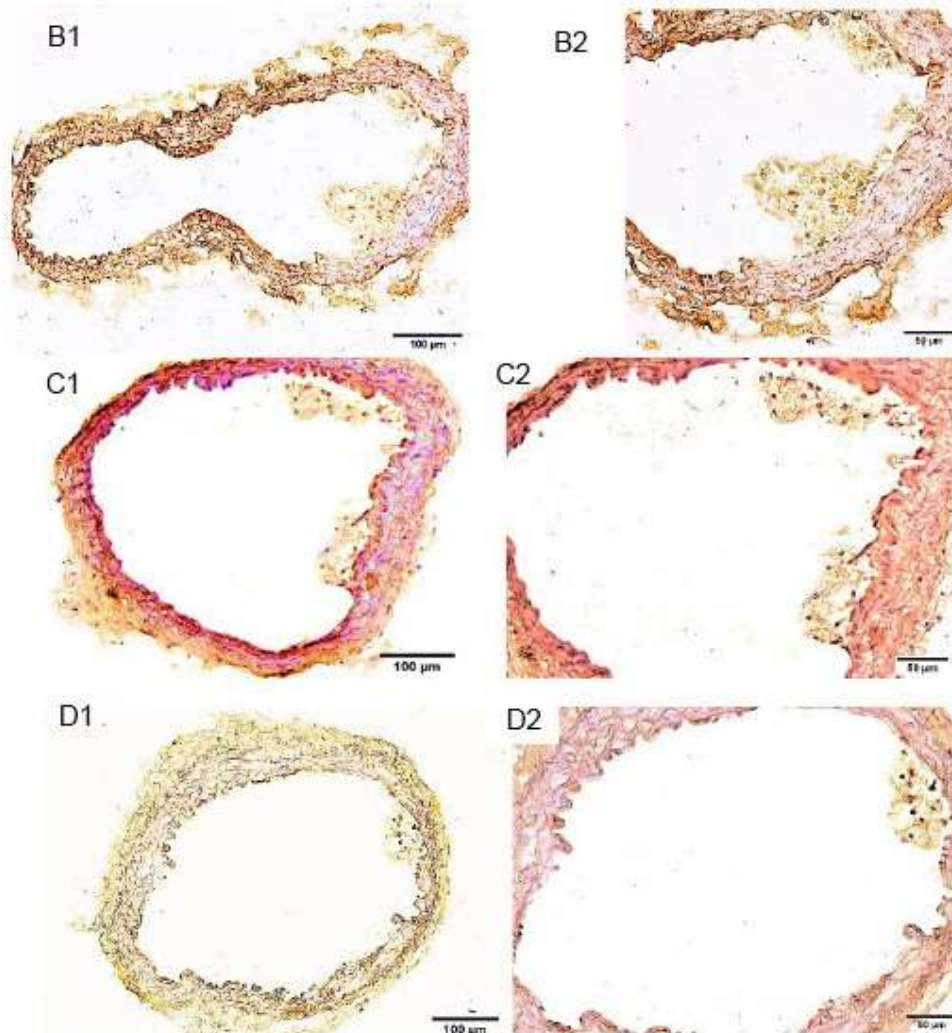
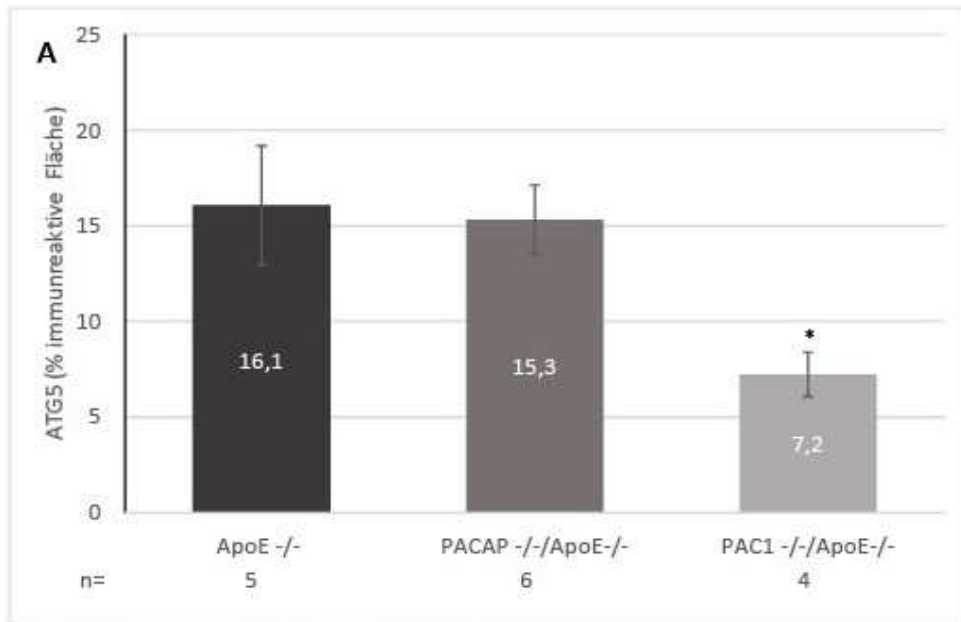


Abbildung 20: A: Anteil der ATG5-positiven Plauefläche (%) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-}/ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-}/ApoE^{-/-}-Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF; Mittelwerte + SEM; ttest: *p<0,05 vs. ApoE^{-/-}(Kontrolle) (n = 4-6). Der Students t-Test wurde angewandt. Exemplarische Gefäßquerschnitte mit ATG5⁺ Arealen; Zellkerne (blau) mit Hämatoxylin gefärbt. B1: ApoE^{-/-} (Kontrolle); B2: Ausschnitt aus B1; C1: PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}; C2: Ausschnitt aus C1; D1: PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}; D2: Ausschnitt aus D1 . Braun gefärbte Areale kennzeichnen eine Immunreaktion.

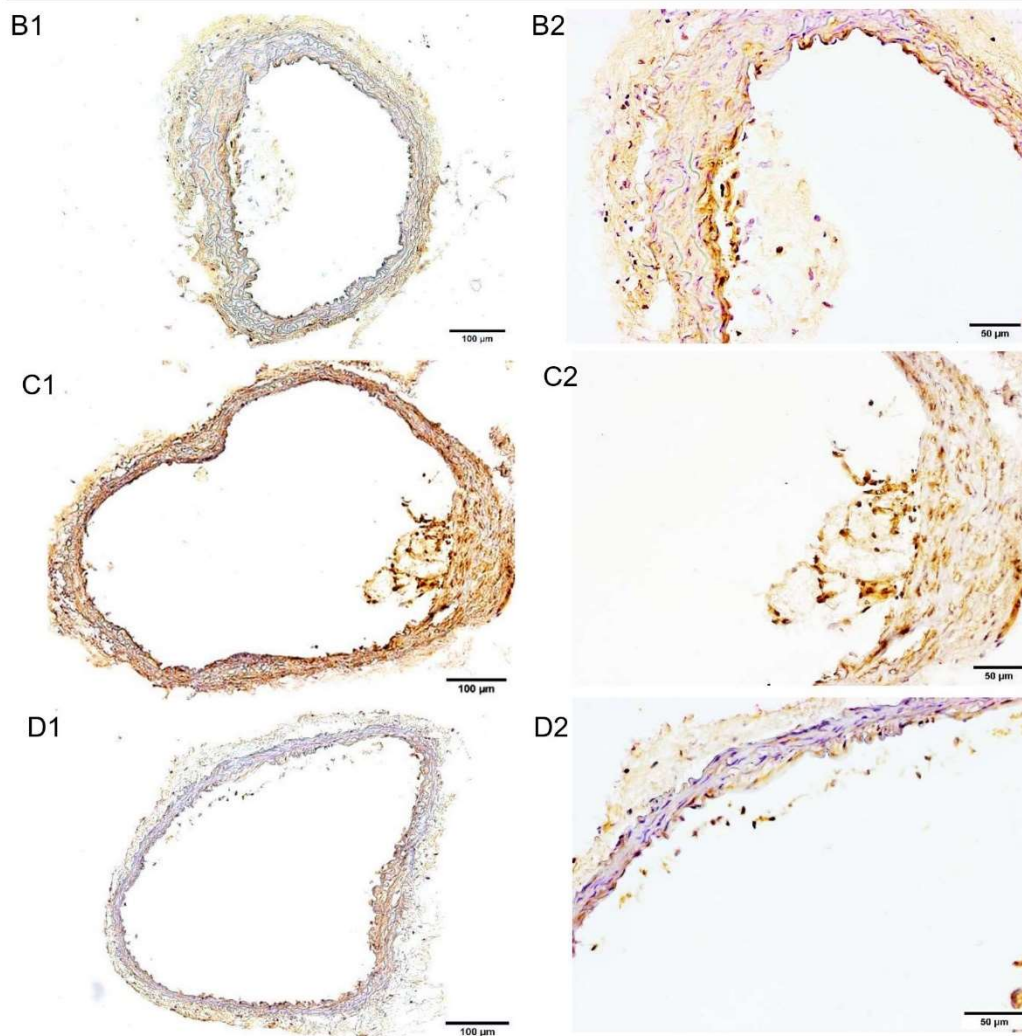
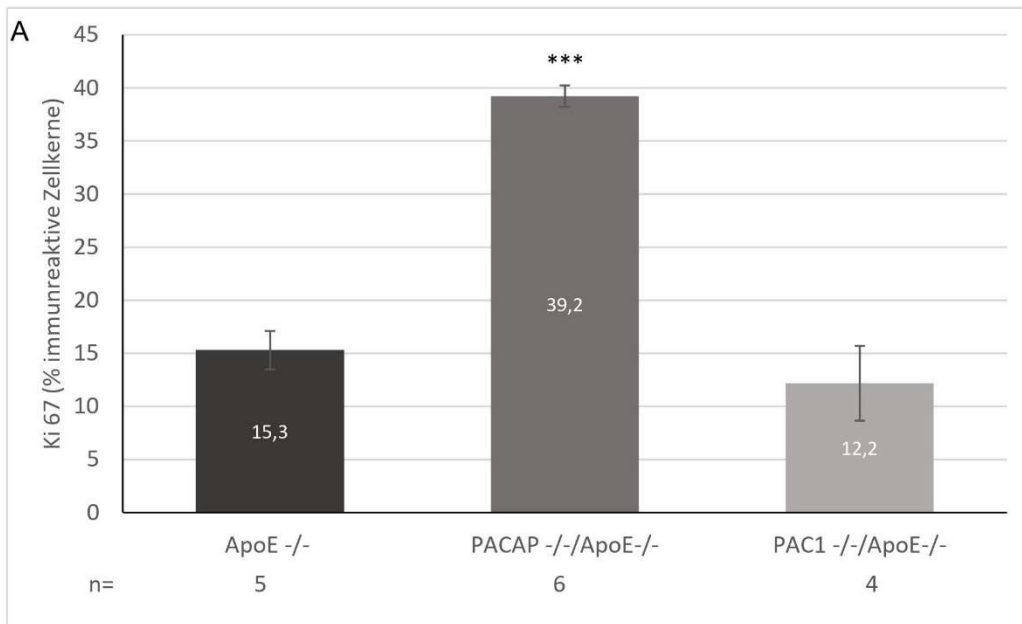


Abbildung 21: A: Anteil der Ki-67-positiven Zellkerne (%) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-}/ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-}/ApoE^{-/-}-Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF; Mittelwerte + SEM. ttest: ***p<0,001 vs. ApoE^{-/-}(Kontrolle) (n = 4-6). Der Students t-Test wurde angewandt. Exemplarische Gefäßquerschnitte mit Ki-67⁺ Zellkernen; Zellkerne (blau) mit Hämatoxylin gefärbt. B1: ApoE^{-/-} (Kontrolle); B2: Ausschnitt aus B1 C1: PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}; C2: Ausschnitt aus C1; D1: PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}; D2: Ausschnitt aus D1. Braun gefärbte Areale kennzeichnen eine Immunreaktion.

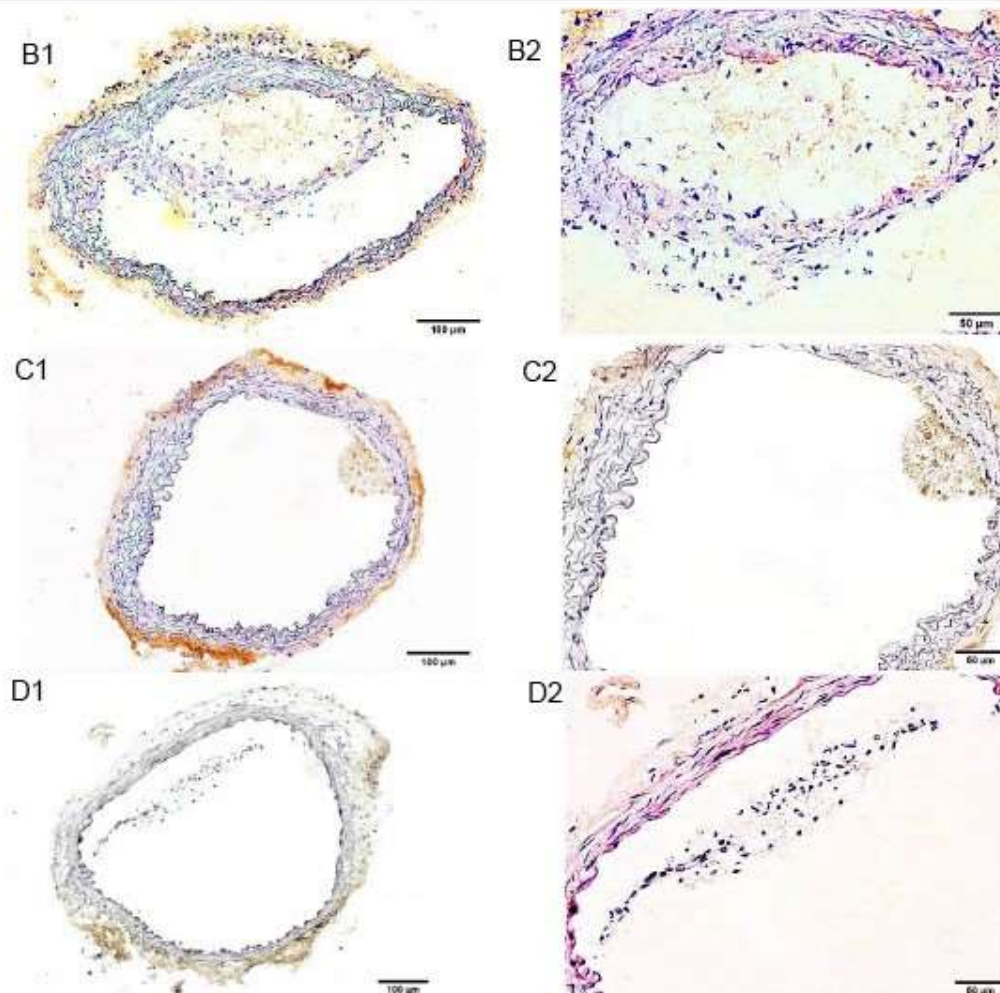
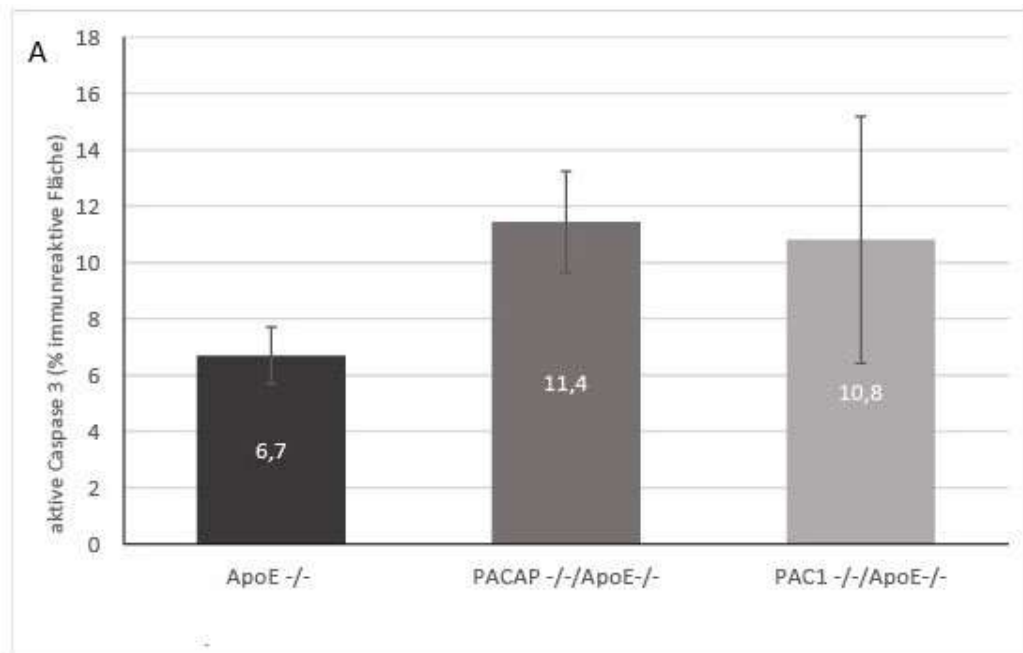


Abbildung 22: A: Anteil der aktive-Caspase-3-positiven Plauefläche (%) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} -Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF; Mittelwerte + SEM. Exemplarische Gefäßquerschnitte mit aktiver-Caspase-3⁺ Arealen; Zellkerne (blau) mit Hämatoxylin gefärbt. B1: ApoE^{-/-} (Kontrolle); B2: Ausschnitt aus B1; C1: PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}; C2: Ausschnitt aus C1; D1: PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}; D2: Ausschnitt aus D1. Braun gefärbte Areale kennzeichnen eine Immunreaktion.

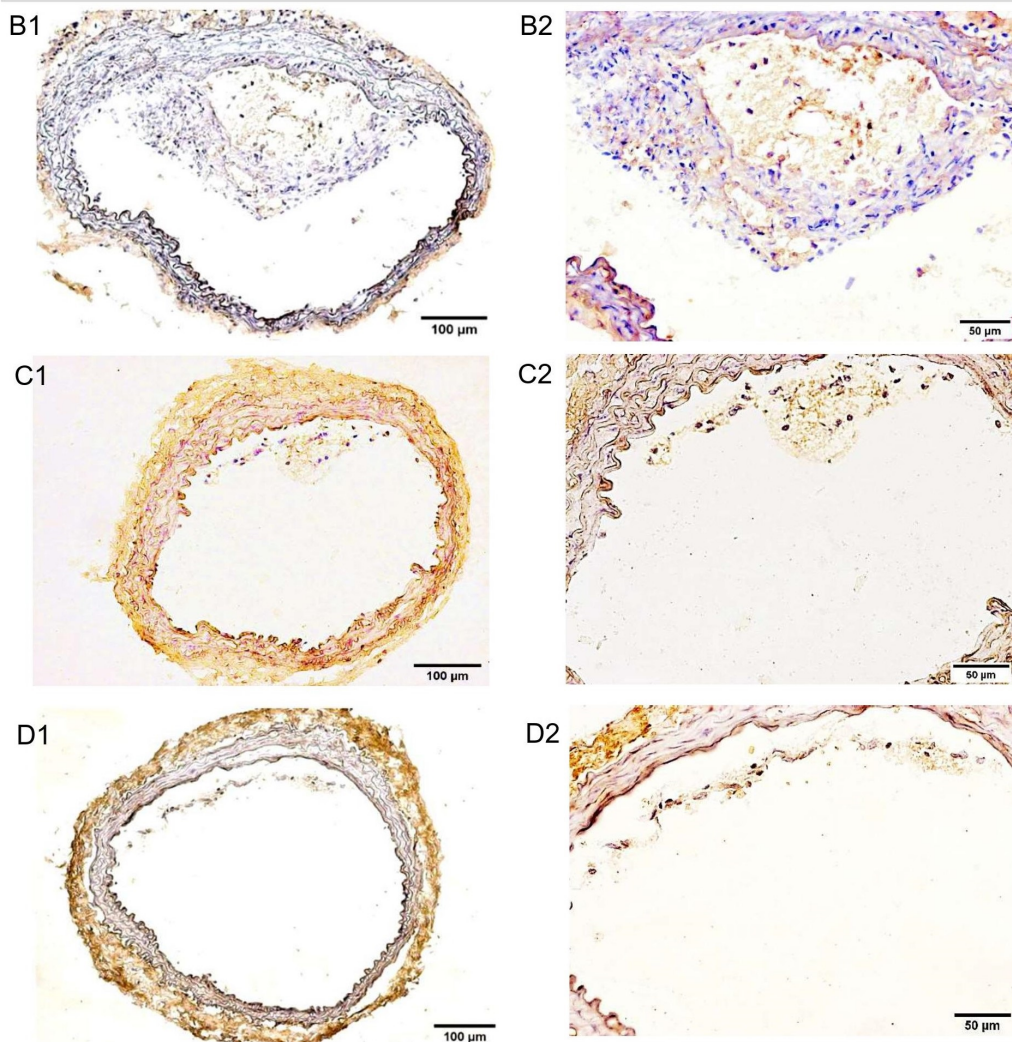
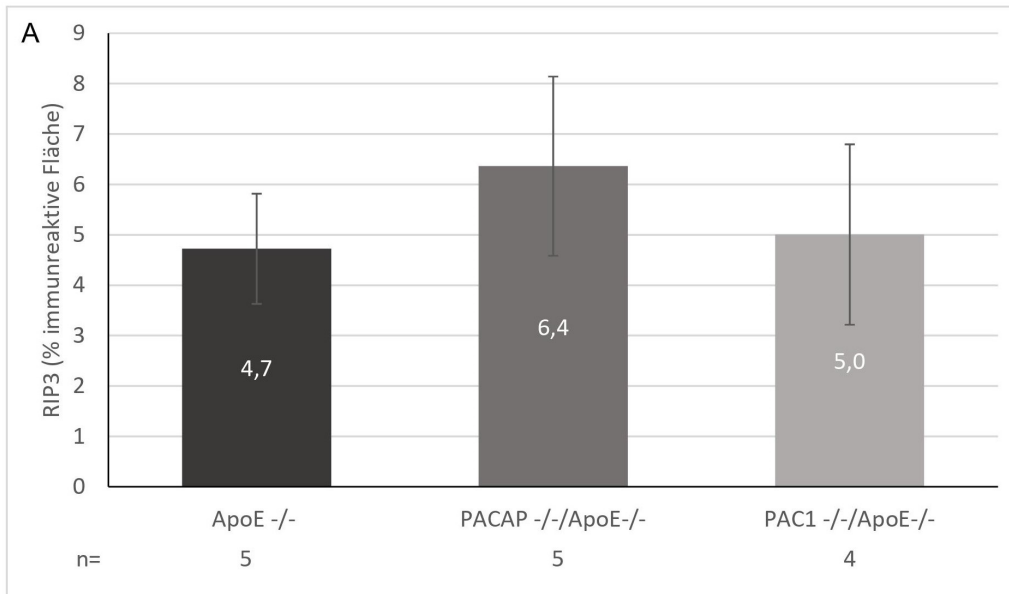


Abbildung 23: A: Anteil der RIP3-positiven Plauefläche (%) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} -Mäusen nach 10 Wochen Normalfutter und 10 Wochen cholesterinreichem Futter; Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) (n = 4-5); Exemplarische Gefäßquerschnitte mit RIP3⁺ Arealen; Zellkerne (blau) mit Hämatoxylin gefärbt. B1: ApoE^{-/-} (Kontrolle); B2: Abschnitt von B1; C1: PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}; C2: Abschnitt von C1; D1: PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}; D2: Abschnitt von D1. Braun gefärbte Areale kennzeichnen eine Immunreaktion.

3.6 Inflammationsmarker

Um den Effekt einer PACAP- bzw. PAC1-Defizienz auf die Entzündungsreaktion in atherosklerotischen Läsionen zu untersuchen, wurden die Gefäßquerschnitte des TB immunhistochemisch untersucht. Immunhistomorphometrische Analysen wurden dabei bzgl. Inflammationsmarkern wie Cyclooxygenase 2 (COX-2), Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) durchgeführt. Hierbei wurde eine peri- und paranukleär lokalisierte Immunreaktivität der jeweiligen Inflammationsmarker identifiziert.

3.6.1 Interleukin-6

Der prozentuale Anteil der Interleukin-6-positiven Plaquefläche war bei den PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} Mäusen **signifikant (p=0,041) 1,6-fach größer** als jener der ApoE^{-/-} Mäuse (Abb. 24). Währenddessen war der prozentuale Anteil der Interleukin-6-positiven Plaquefläche bei den PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} Mäusen ähnlich wie jener der ApoE^{-/-} Mäuse (Kontrolle) (Abb. 24).

3.6.2 Interleukin 1 β , COX-2, TNF- α

Die Untersuchungen zeigten keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil der COX-2-, IL-1 β - sowie TNF α –immunreaktiven Fläche in den Plaques von PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} bzw. PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäusen (Abb. 25, 26, 27).

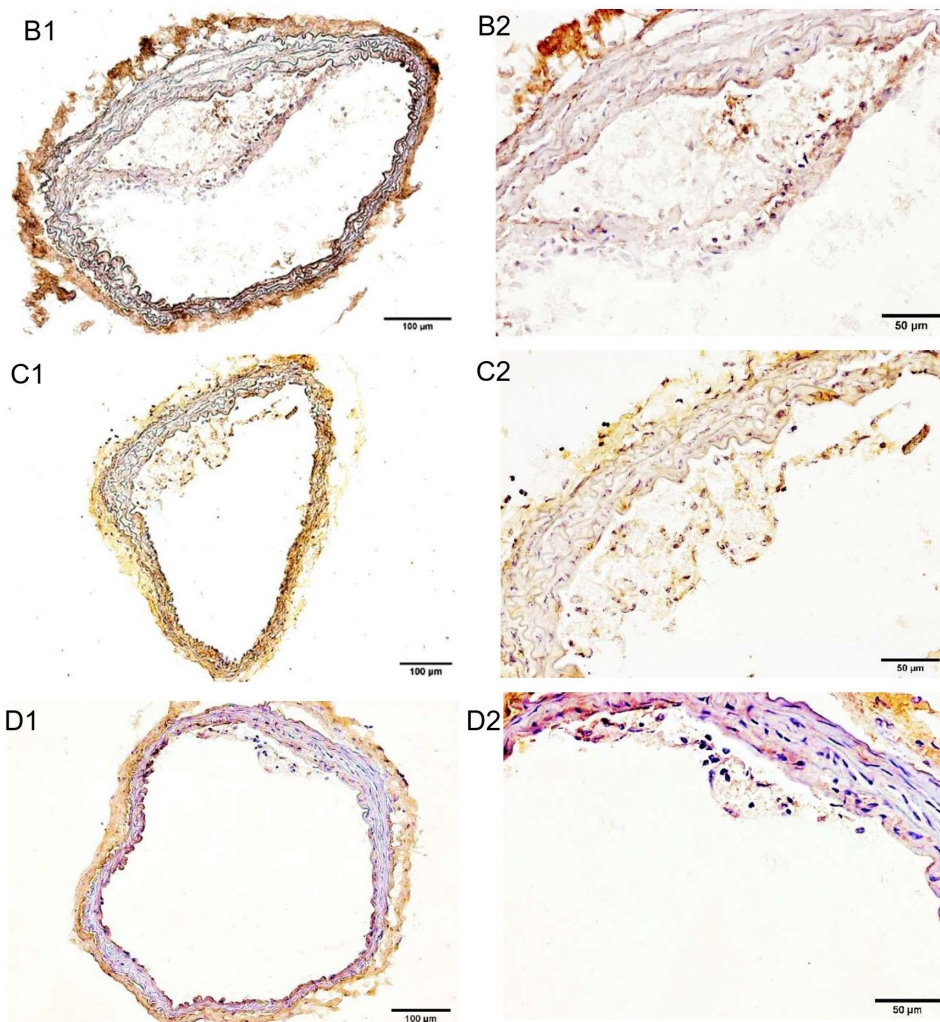
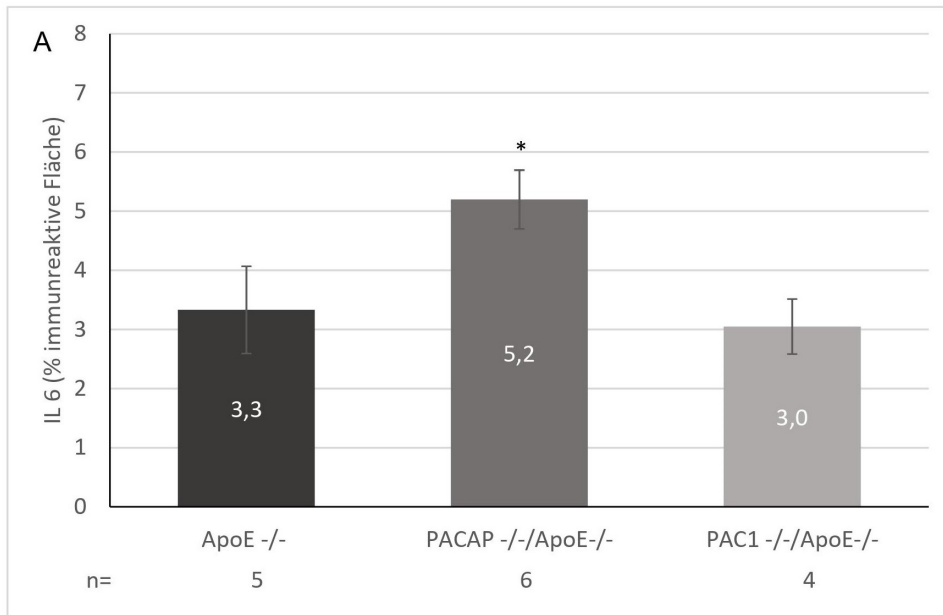


Abbildung 24: A: Anteil der Interleukin-6-positiven Plaqueläche (%) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} -Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF; Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM); ttest: *p<0,05 vs. ApoE^{-/-}(Kontrolle) (n = 4-6). Der Students t-Test wurde angewandt. Exemplarische Gefäßquerschnitte mit IL-6⁺ Arealen; Zellkerne (blau) mit Hämatoxylin gefärbt. B1: ApoE^{-/-} (Kontrolle); B2: Abschnitt von B1; C1: PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}; C2: Abschnitt von C1; D1: PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}; D2: Abschnitt von D1. Braun gefärbte Areale kennzeichnen eine Immunreaktion.

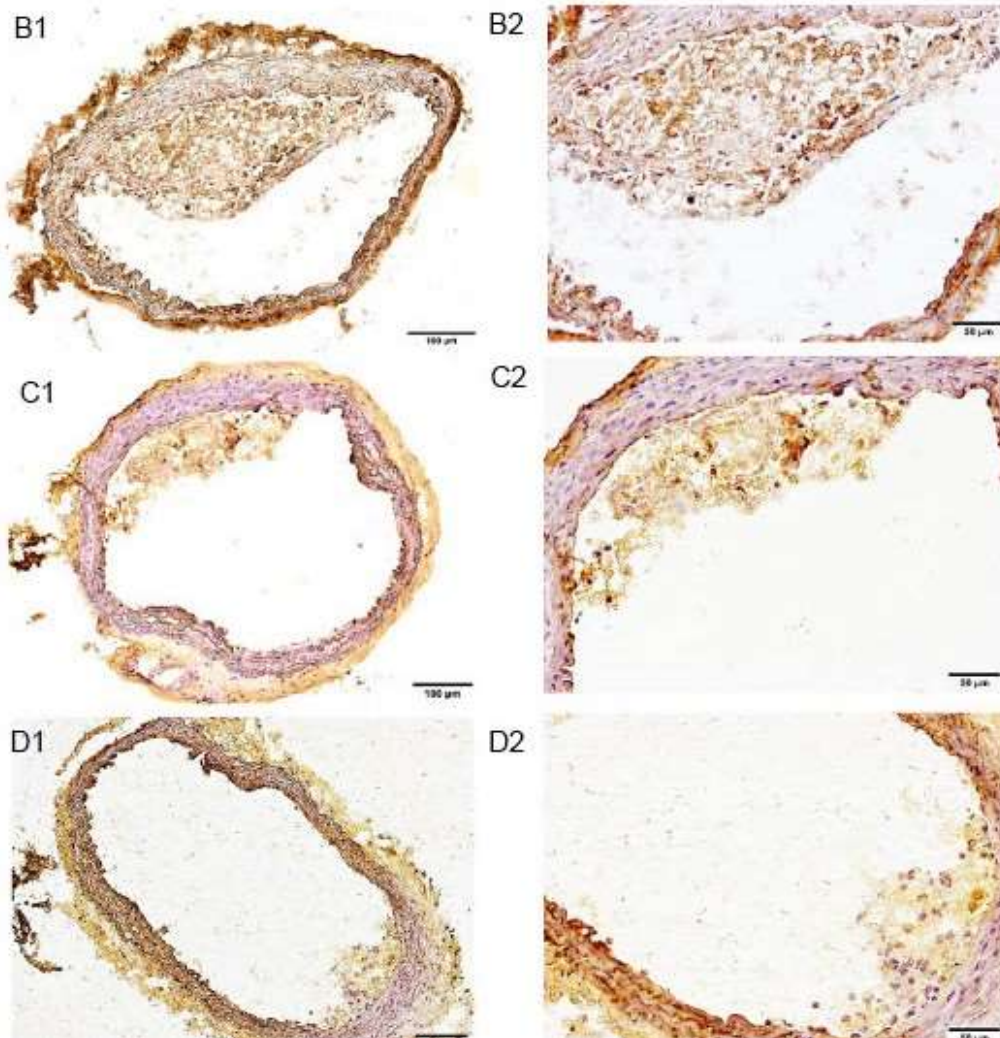
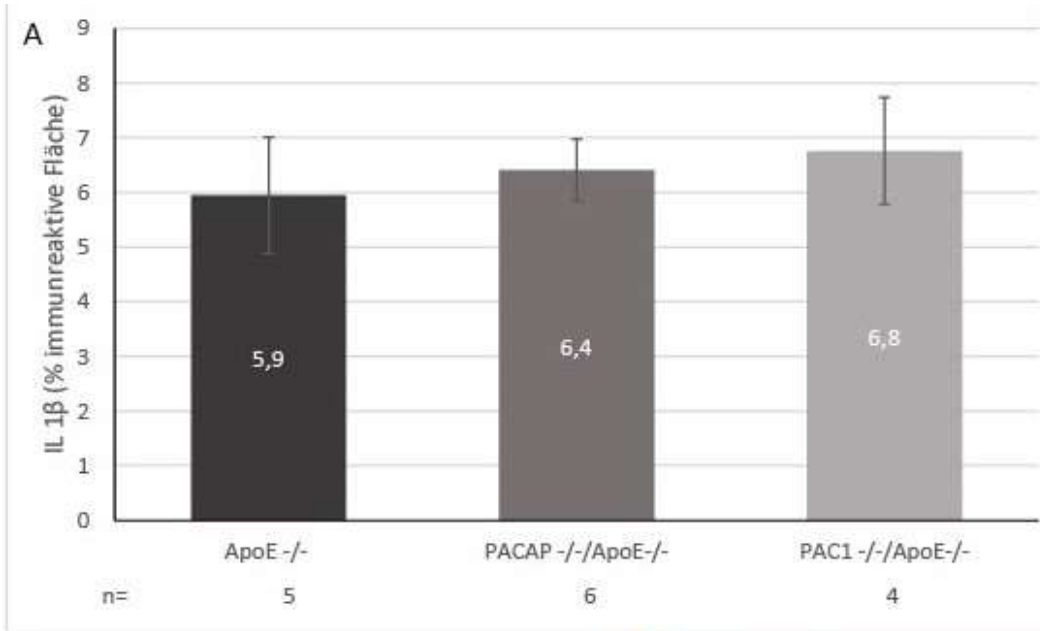


Abbildung 25: A: Anteil der Interleukin-1 β -positiven Plaqueläche (%) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} -Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF; Mittelwerte + SEM. Exemplarische Gefäßquerschnitte mit IL-1 β ⁺ Arealen; Zellkerne (blau) mit Hämatoxylin gefärbt. B1: ApoE^{-/-} (Kontrolle); B2: Abschnitt von B1; C1: PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}; C2: Abschnitt von C1; D1: PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}; D2: Abschnitt von D1. Braun gefärbte Areale kennzeichnen eine Immunreaktion.

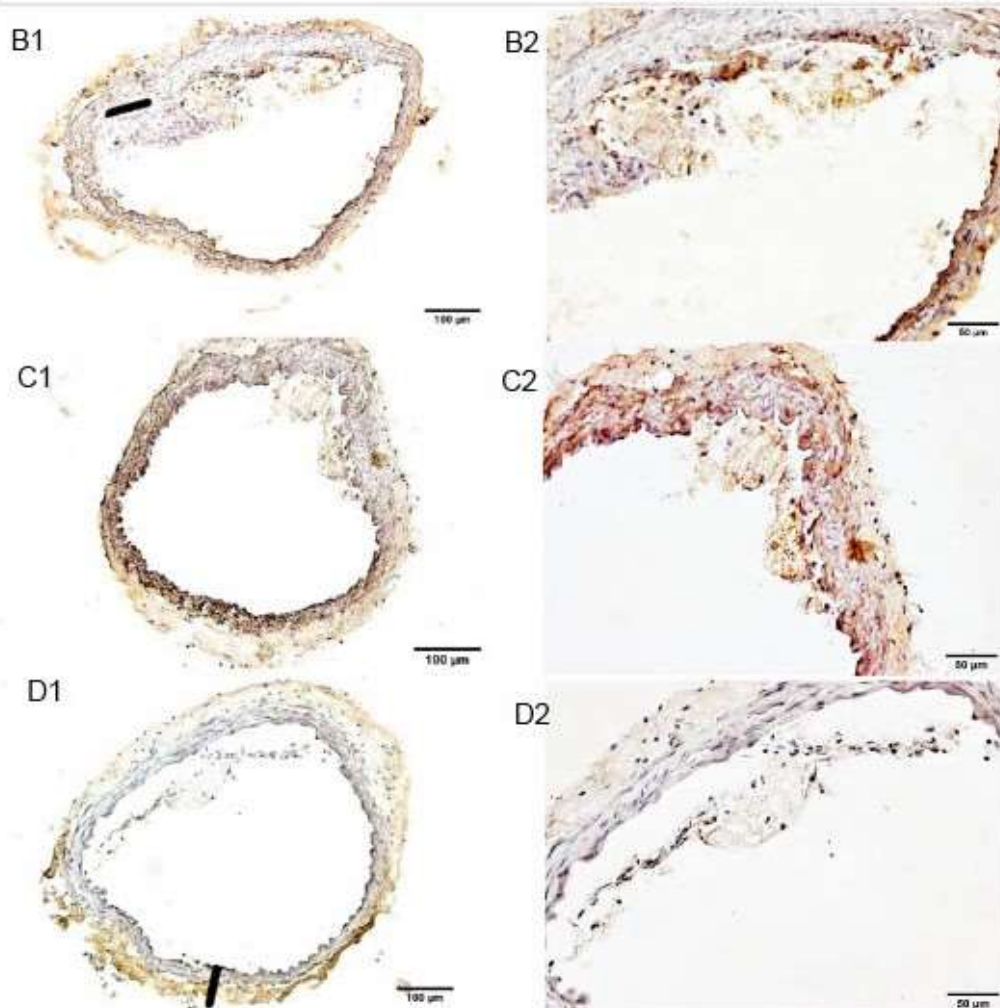
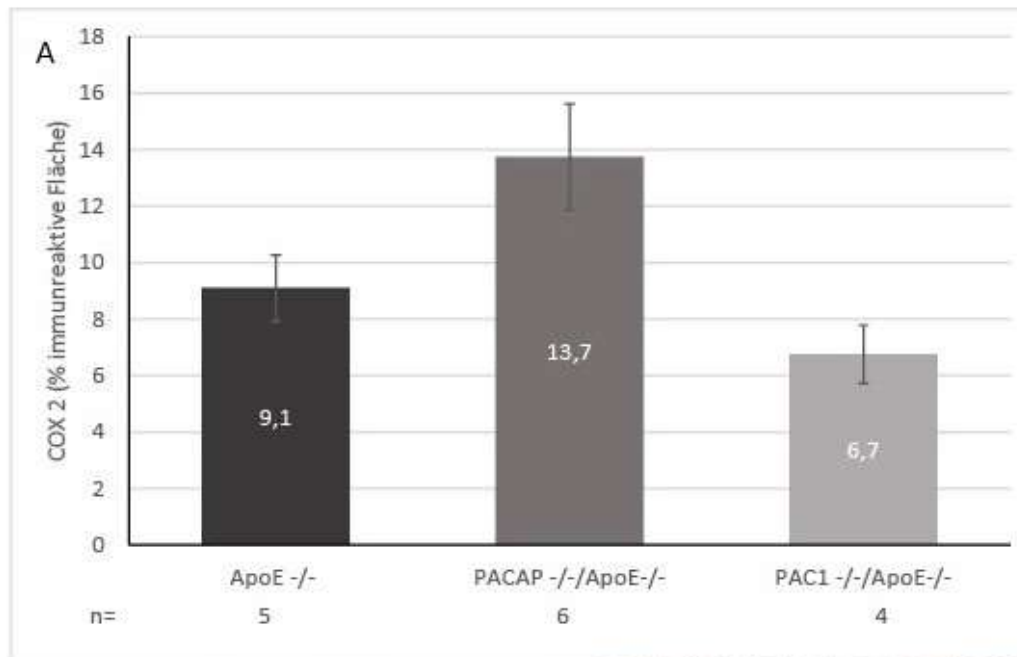


Abbildung 26: A: Anteil der COX-2-positiven Plauefläche (%) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} -Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF; Mittelwerte + SEM. Exemplarische Gefäßquerschnitte mit COX-2⁺ Arealen; Zellkerne (blau) mit Hämatoxylin gefärbt. B1: ApoE^{-/-} (Kontrolle); B2: Abschnitt von B1; C1: PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}; C2: Abschnitt von C1); D1: PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}; D2: Abschnitt von D1. Braun gefärbte Areale kennzeichnen eine Immunreaktion.

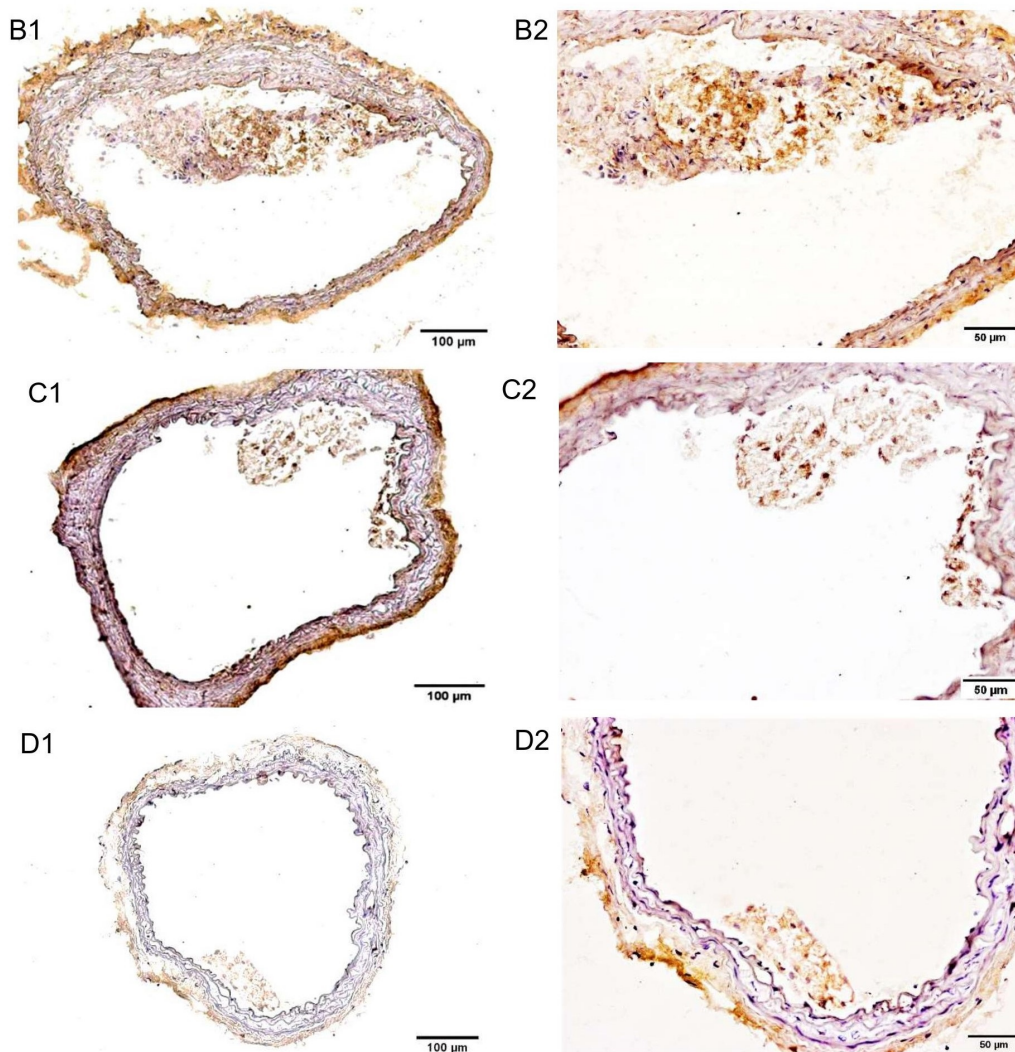
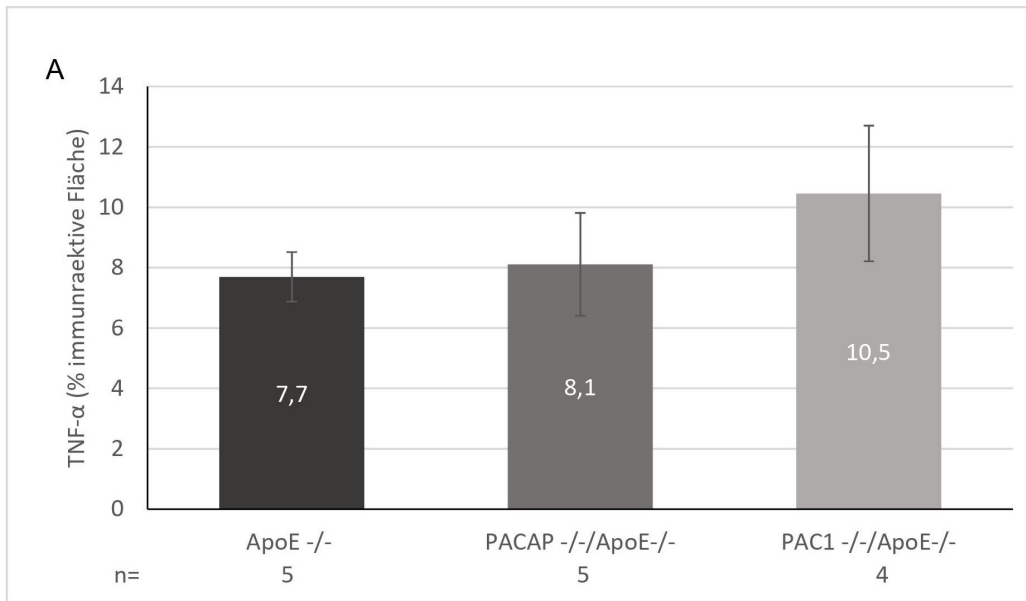


Abbildung 27: A: Anteil der TNF- α -positiven Plauefläche (%) bei ApoE^{-/-} (Kontrolle), PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} -Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF; Mittelwerte + SEM. Exemplarische Gefäßquerschnitte mit TNF- α ⁺ Arealen; Zellkerne (blau) mit Hämatoxylin gefärbt. B1: ApoE^{-/-} (Kontrolle) (n = 4-5); B2: Abschnitt von B1; C1: PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}; C2: Abschnitt von C1; D1: PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}; D2: Abschnitt von D1. Braun gefärbte Areale kennzeichnen eine Immunreaktion.

4 Diskussion

4.1 Körpergewicht und Tibialänge

Unsere Analysen ergaben keine signifikanten Unterschiede in den durchschnittlichen Körpergewichten zwischen den verschiedenen Genotypen, während die PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäuse etwas längere Tibiae und dadurch im Mittel eine größere Körperlänge aufwiesen. Das Verhältnis von Gewicht zur Körperlänge war bei diesem Genotyp also etwas niedriger als bei den ApoE^{-/-}-Mäusen (Kontrolle). Diese Ergebnisse bestätigen jene von Rasbach et al., bei denen PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäuse nach 30 Wochen SF ein niedrigeres Körpergewicht als ApoE^{-/-}-Mäuse aufwiesen. Andererseits hatten PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen mit 10 Wochen SF und anschließend 20 Wochen CRF ein höheres Gewicht als ApoE^{-/-}-Mäuse (Kontrolle). Außerdem waren die CRF- Mäuse deutlich schwerer als diejenigen mit SF (Rasbach et al., 2019), was die negativen Auswirkungen einer cholesterinreichen Ernährung auf das Körpergewicht aufzeigt. Bei Splitthoff et al. hatte eine PAC1-Defizienz dagegen keinen Einfluss auf die Körpergröße oder das Gewicht der untersuchten Mäuse (Splitthoff et al., 2020).

PACAP spielt bekanntermaßen eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Stoffwechsels; so konnte z.B. nachgewiesen werden, dass nach Injektion von PACAP in die Hirnventrikel von Wirbeltieren wie Mäusen oder Ratten der Appetit und die Nahrungsaufnahme unterdrückt wurde (Morley et al., 1992; Chance et al., 1995; Mizuno et al., 1998; Gargiulo et al., 2020). Nach Injektion in den ventromedialen Hypothalamus-Kern verringerte PACAP die Nahrungsaufnahme und erhöhte sowohl die Körpertemperatur als auch die Bewegungsaktivität (Resch et al., 2011). Auch eine intraperitoneale PACAP-Applikation verringerte bei Wildtyp-Mäusen den Appetit und die Nahrungsaufnahme über den PAC1-Rezeptor, indem es Ghrelin hemmt und die Konzentrationen sowohl von GLP-1 als auch von Leptin erhöht (Vu et al., 2015). Zusammengenommen weisen diese Daten auf eine wichtige Rolle von PACAP und PAC1 im ZNS als Vermittler der Energiehomöostase hin, wodurch ein Einfluss auf die Entwicklung von Körpergewicht und -größe plausibel wäre. Vor dem Hintergrund der aktuellen Datenlage gehen wir deshalb davon aus, dass sich die Effekte auf das Körpergewicht bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- bzw. PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen erst im

weiteren Lebenslauf der Tiere einstellen und sie bei unseren erst 20 Wochen alten Mäusen noch nicht zum Tragen kamen. Die von uns beobachteten Effekte eines PACAP- bzw. PAC1-Mangels auf Körpergewicht und Tibialänge waren außerdem relativ gering, sodass eine Maskierung der Ergebnisse durch die Hypercholesterinämie infolge des ApoE-Knockouts bei allen untersuchten Mäusen denkbar ist. Um einen langfristigen Effekt von PACAP oder seinem Rezeptor PAC1 (auch unabhängig von einem ApoE-Mangel) auf das Körpergewicht bzw. die Körpergröße bei Säugetieren nachzuweisen, sollten weiterführende Untersuchungen angestellt werden.

4.2 Plasma-Cholesterin- und –Triglyceridspiegel

Unsere Untersuchungen zeigten weder bei den Plasma-Triglycerid- noch bei den Plasma-Cholesterinkonzentrationen signifikante Unterschiede zwischen PACAP- bzw. PAC1-defizienten DKO und ApoE^{-/-} (~ Kontrolle) -Mäusen nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF. Tendenziell höhere Werte konnten bei den PAC1^{-/-}-Mäusen festgestellt werden.

Unsere Beobachtungen decken sich weitestgehend mit denen von Splitthoff et al. und Rasbach et al.: Sie konnten bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen, welche nach 10 Wochen SF und anschließend 20 Wochen CRF untersucht wurden, keine Unterschiede in der Plasma-Cholesterinkonzentration gegenüber ApoE^{-/-}-Mäusen feststellen (Rasbach et al., 2019; Splitthoff et al., 2020). Bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen war nach 10 Wochen SF und 20 Wochen CRF dagegen die Plasma-Triglyceridkonzentration im Vergleich zu ApoE^{-/-}- Mäusen signifikant erhöht (Rasbach et al., 2019). Obwohl wir keine signifikant veränderten Plasma-Triglyceridkonzentration bei PACAP-defizienten Mäusen beobachteten, können unsere Ergebnisse in Einklang mit denen von Rasbach et al. stehen: Die signifikant 1,5-fach größere durchschnittlichen Triglyceridkonzentrationen bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- im Vergleich zu ApoE^{-/-}- Mäusen könnten bei Rasbach et al. durch die 10 Wochen längere CRF-Phase im Vergleich zu unserer Studie begründet sein. Die Plasma-Triglyceridkonzentration zeigte bei PAC1-Defizienz im Vergleich zu ApoE^{-/-}- Mäusen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Splitthoff et al., 2020). Unsere Daten bestätigen demnach die bereits veröffentlichten Ergebnisse

und zeigen darüber hinaus, dass bereits nach 10 Wochen CRF eine höhere Triglycerid- und Cholesterin-Konzentration im Plasma durch entsprechende Signalkaskaden bei PAC1-Defizienz messbar war. Es ist davon auszugehen, dass der Effekt des PACAP- und ApoE-Knockouts mit längerer Lebensdauer der Mäuse noch deutlicher wird. Bisherige Forschungsergebnisse lassen ebenfalls vermuten, dass PACAP ein wichtiger Faktor in der Regulation des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels ist (Gray et al., 2001; Tabas et al., 2007; Bentzon et al., 2014). Weiterhin können VPAC1-Agonisten die Konzentrationen der Plasmaglukose, -Cholesterine, -Triglyceride und des Plasma-LDL bei Tieren verringern, welche mit hochkalorischem Futter ernährt wurden (Rong-Jie Yu et al., 2009). Ein Einfluss von PACAP auf die Triglycerid- und Cholesterinspiegel im Plasma ist also wahrscheinlich und sollte in weiteren Studien untersucht werden. Aufgrund der wesentlichen Bedeutung in der Therapie atherosklerotisch bedingter Erkrankungen könnte dadurch ein weiterer pharmakologischer Therapieansatz ermöglicht werden.

4.3 Lumenstenose

In unseren Analysen konnten wir sowohl bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}, als auch bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen eine geringere Lumenstenose im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen feststellen, wobei der Unterschied bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen noch deutlicher ausfiel als bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen.

Bei Rasbach et al. zeigte sich bei PACAP^{-/-} / Mäusen, welche über 30 Wochen SF erhielten, eine Zunahme der Lumenstenose im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen, wobei eine PACAP-Defizienz in der CRF Gruppe keinen signifikanten Effekt auf die Lumenstenose hatte (Rasbach et al., 2019). Dies ist ein Hinweis darauf, dass ab einem bestimmten Cholesterinspiegel die protektiven Effekte von PACAP überschattet werden könnten. Dagegen fanden sich in der Studie von Splitthoff et al. bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen eine verminderte durchschnittliche Lumenstenose im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen nach CRF, allerdings nicht nach SF (Splitthoff et al., 2020), was durch unsere Untersuchungen bestätigt wurde. Die für die Progression der Lumenstenose verantwortlichen Signalkaskaden scheinen also erstaunlicherweise bereits nach 10 Wochen SF + 10 Wochen CRF beeinflusst zu werden.

Der Einfluss von PACAP und PAC1 auf die Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen und damit einhergehender Lumenstenosen ist bisher nicht endgültig geklärt und weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Durch die Hemmung der Zellproliferation sowie der protektiven Wirkung auf Endothel- und glatte Muskelzellen besitzt PACAP Eigenschaften, welche die Entstehung einer atherosklerotischen Lumenstenose verlangsamen oder aufhalten können (Chang, 1997). Weiterhin werden PACAP-Rezeptoren auch von Makrophagen und anderen Immunzellen exprimiert, was auf eine immunmodulatorische Wirkung in der Entstehung und im Fortschreiten der Atherosklerose hinweist (Delgado et al., 1999e; Ganea and Delgado, 2001; Waschek, 2013). Unsere Ergebnisse deuten zusammen mit der aktuellen Studienlage darauf hin, dass PACAP und PAC1 einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen haben, wobei dieser Einfluss weiter untersucht werden muss. Bei uns zeigte sich entgegen den bisher postulierten positiven Effekten von PACAP eine verminderte Lumenstenose bei PACAP- und PAC1-Defizienz. Der vermeintlich protektive Effekt von PACAP könnte auch über die nicht selektiven Rezeptoren VPAC1 und VPAC2 vermittelt werden. Außerdem liegt der entscheidende Punkt offenbar in der jeweiligen Ernährung der Versuchstiere, da sich die protektiven Effekte vor allem bei SF zeigten (Rasbach et al., 2019). Die potenziell protektive Wirkung von PACAP könnte daher auch bei hohen Plasma-Cholesterinspiegeln überlagert werden. Langfristige Studien mit Tieren, die mittels SF ernährt werden, könnten weiteren Aufschluss über den Effekt einer PACAP- bzw. PAC1-Defizienz auf die Entwicklung der Lumenstenose geben.

4.4 Immunhistochemie

4.4.1 Morphologische Marker

4.4.1.1 MoMa-2 (Monozyten und Makrophagen)

Die MoMa-2-immunreaktive Plauefläche war in unseren Untersuchungen bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen 5,8-fach niedriger als die von ApoE^{-/-}- Mäusen. Allerdings fanden wir jedoch keine signifikanten Unterschiede in der MoMa-2-immunreaktiven Fläche zwischen den PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-} Mäusen, was bisher veröffentlichte Studienergebnisse bekräftigt: Rasbach et al. und

Splitthoff et al. untersuchten bereits Makrophagenpopulationen in atherosklerotischen Plaques, allerdings mit dem Marker CD68 (Rasbach et al., 2019; Splitthoff et al., 2020). Bei CRF konnte kein Unterschied der CD68-positiven Flächen von PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} bzw. PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum ApoE^{-/-}-Genotyp festgestellt werden (Rasbach et al., 2019; Splitthoff et al., 2020). Allerdings hatte ein PACAP-Mangel bei ausschließlich mit SF gefütterten Tieren einen verminderten prozentualen Anteil der CD68-positiven Plaqueflächen in den Läsionen zur Folge (Rasbach et al., 2019; Splitthoff et al., 2020). Bemerkenswert ist daher, dass bereits nach 10 Wochen CRF entsprechende Signalkaskaden zur Makrophagenrekrutierung infolge einer PAC1-Defizienz beeinträchtigt werden.

Makrophagen stehen im pathogenetischen Zentrum der Atherosklerose. Deren Exprimierung von PACAP-Rezeptoren in hohem Maße legt beachtlicherweise einen immunmodulatorischen Einfluss PACAPs bei der Entstehung und beim Fortschreiten der Atherosklerose nahe (Delgado et al., 1999e; Delgado et al., 1999c, 1999d; Ganea and Delgado, 2001; Waschek, 2013). In diesem Zusammenhang ist auffällig, dass ein PAC1-Mangel sowohl zu einer verminderten MoMa-2-immunreaktiven Fläche als auch zu einer deutlich verminderten Ausprägung der Lumenstenose führte (s.o.). Der Grund dafür könnte sein, dass Makrophagen und deren Immunmediatoren wichtige proatherogene Faktoren darstellen und sie eine hohe Anzahl an PACAP-Rezeptoren ausbilden (Ross, 1999; Yamada et al., 2018). Unsere Daten stützen daher die verbreitete Hypothese, dass der Schweregrad der Lumenstenose mit der Makrophagenrekrutierung korreliert und zeigen, dass diese bereits nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF durch einen PAC1-Mangel gehemmt werden kann.

4.4.1.2 sm- α -Actin (Glattmuskelzellen)

Unsere Untersuchungen ergaben einen signifikant verminderten Anteil der sm- α -Actin-positiven Fläche der atherosklerotischen Plaque, sowohl bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} (1,5-fach kleiner, p=0,009) als auch bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen (2,2-fach kleiner, p<0,001) im Vergleich zu ApoE^{-/-} Mäusen. Diese Daten stehen denen von Rasbach et al. und Splitthoff et al. gegenüber, bei denen unabhängig von der Fütterung weder eine PACAP- noch eine PAC1-Defizienz in atherosklerotischen Plaques einen Einfluss auf die sm- α -Actin-positive

Plaquefläche 30 Wochen alter ApoE^{-/-}-Mäuse hatte (Rasbach et al., 2019; Splitthoff et al., 2020). Unsere Ergebnisse könnten demnach darauf hindeuten, dass der Einfluss von PACAP bzw. PAC1 auf die glatten Muskelzellen vor allem in frühen Stadien der Atherosklerose relevant ist.

Die Wirkung von PACAP auf glatte Gefäßmuskulatur, speziell in atherosklerotischen Läsionen, ist bisher kaum erforscht. Jedoch wurde kürzlich beschrieben, dass VPAC1-Rezeptoren eine dominante Rolle bei der PACAP-induzierten Vasorelaxation sowohl in der Karotis als auch in den Oberschenkelarterien zu spielen scheinen (Ivic et al., 2019). *In-vitro*-Versuche konnten zeigen, dass sowohl PACAP als auch VIP die Proliferation gesunder aortaler Glattmuskelzellen inhibieren können (Oiso et al., 1993). Die bereits beschriebenen möglichen Modulationen glatter Gefäßmuskelzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Diskussion und Interpretation der Ergebnisse. Weiterhin offen ist die Frage, ob die Abnahme des prozentualen Anteils der sm- α -Actin-immunreaktiven Fläche in atherosklerotischen Plaques von PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- bzw. PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen auf die Umwandlung glatter Muskelzellen in einen anderen Zelltyp zurückzuführen sind, beispielsweise in Schaumzellen (Hong et al., 2017). Zusätzliche Studien wären für die Bestätigung dieser Hypothese notwendig.

4.4.2 Remodeling-Marker

4.4.2.1 ATG5 (Autophagie)

Der prozentuale Anteil der ATG5-positiven Plauefläche war bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- ähnlich wie bei ApoE^{-/-}- Mäusen, während er beim der PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Genotyp verglichen mit ApoE^{-/-}-Mäusen signifikant niedriger war. Unsere Ergebnisse passen nur teilweise zu den bisher veröffentlichten: Rasbach et al. zeigten, dass PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäuse nach 30 Wochen SF in den atherosklerotischen Plaques im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen erhöhte ATG5-Immunreaktivität aufwiesen, was auf eine gesteigerte Autophagie hindeuten könnte (Rasbach et al., 2019). Dieser Effekt war allerdings nicht bei Mäusen zu beobachten, welche 10 Wochen SF und 20 Wochen CRF erhielten (Rasbach et al., 2019). Bei Splitthoff et al. zeigte sich dagegen unabhängig von der Nahrungsform kein signifikanter Einfluss eines PAC1-Mangels auf die ATG5-immunreaktive Fläche im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen in atherosklerotischen

Läsionen (Splitthoff et al., 2020).

Bisher wird die Autophagie insofern als protektiver Faktor gegen Atherosklerose betrachtet, als dass die Autophagie der Makrophagen protektiv gegen oxidativen Stress sowie lokale Inflammation wirkt und zu einer Stabilisierung atherosklerotischer Plaques führt (Shao et al., 2016). In unserer Studie war bei PAC1-Defizienz sowohl eine geringere ATG-5-immunreaktive Plaquefläche als auch eine geringere Lumenstenose zu beobachten. Eine Erklärung dafür könnte eine Ablösung von Plaquefragmenten sein, die zu einer geringeren Lumenstenose führt.

Unsere Ergebnisse zeigen im Kontext der aktuellen Studienlage, dass ein PAC1-Mangel auf die Autophagie in atherosklerotischen Plaques einen Einfluss haben kann. Diesbezüglich sollte in weiteren Studien der Einfluss einer PACAP- bzw. PAC1-Defizienz auf die Autophagie und wiederum deren Effekt auf die Atherosklerose genauer untersucht werden.

4.4.2.2 Ki-67 (Proliferation)

Der prozentuale Anteil der Ki-67-positiven Zellkerne in atherosklerotischen Plaques war bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} signifikant größer als bei ApoE^{-/-}-Mäusen. Bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen ergab sich bezüglich des prozentualen Anteils Ki-67-positiver Zellkerne in atherosklerotischen Plaques jedoch kein Unterschied im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass proliferationshemmende Eigenschaften von PACAP wohl eher über die VPAC1 und VPAC2 Rezeptoren vermittelt werden könnten. Allerdings werden diese Rezeptoren auch von VIP stimuliert, sodass weitere Experimente durchgeführt werden sollten, um die Effekte von PACAP bzw. PAC1 auf eine mögliche Proliferationshemmung zu untersuchen. Möglich und sinnvoll wären hierbei Studien, in denen PACAP oder Maxadilan (als PACAP-Agonist) ApoE^{-/-}-Mäusen zugeführt werden. Unsere Daten zeigen sich nicht kongruent mit der bisherigen Literatur: Atherosklerotische Läsionen von PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen, die über 30 Wochen mit SF ernährt wurden, zeigten einen niedrigeren Anteil an Ki-67-positiven Zellkernen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen (Rasbach et al., 2019; Splitthoff et al., 2020). Außerdem fand sich nach 10 Wochen SF und 20 Wochen CRF der prozentuale Anteil Ki-67-positiver Zellkerne bei ApoE^{-/-}-Mäusen geringer als nach 30 Wochen mit ausschließlich SF. Dieser Unterschied könnte darauf hinweisen, dass eine cholesterinreiche

Ernährung bei ApoE^{-/-}-Mäusen eine antiproliferative Wirkung zu haben scheint (Rasbach et al., 2019; Splitthoff et al., 2020). In diesen Studien hatten PACAP- bzw. PAC1- defiziente Mäuse unter SF also eine verminderte Proliferation zufolge.

Durch pharmakologische Wirkstoffe konnte die Makrophagenproliferation in atherosklerotischen Plaques gehemmt werden, was ihre Bedeutung für die Plaquebildung und -progression verdeutlicht (Yamada et al., 2018). Differentialdiagnostische Untersuchungen zur Identifizierung der Zelltypen, welche in atherosklerotischen Läsionen von PACAP^{-/-}/ApoE^{-/-}-Mäusen proliferieren, wären in künftigen Studien sinnvoll, um den Einfluss von PACAP auf die an der Proliferation beteiligten Signalkaskaden besser zu verstehen.

4.4.2.3 Aktivierte Caspase 3 (Apoptose)

In unserer Studie wurde sowohl bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} als auch bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen eine tendenziell größere Caspase-3 immunreaktive Plaquefläche als bei ApoE^{-/-}-Mäusen festgestellt. Diese Daten könnten auf eine erhöhte Apoptoserate in atherosklerotischen Plaques hinweisen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Rasbach et al. überein, die bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäuse nach 30 Wochen SF im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen eine erhöhte Caspase-3-immunreaktive Plaquefläche nachweisen konnten (Rasbach et al., 2019). Dagegen konnten Splitthoff et al. keinen signifikanten Einfluss eines PAC1-Mangels auf die Caspase-3-immunreaktive Plaquefläche in atherosklerotischen Plaques feststellen (Splitthoff et al., 2020).

Ein Einfluss der Apoptose auf die Lumenstenose konnte bereits in früheren Studien nachgewiesen werden: Die Apoptose der Makrophagen konnte das Plaque-Wachstum bei frühen Läsionen durch Hemmung der Entzündungsreaktion begrenzen (Arai et al., 2005; Stoneman et al., 2007; Gautier et al., 2009). Bei fortgeschrittenen Läsionen förderte die Makrophagenapoptose jedoch die Plaque-Instabilität und die Bildung eines großen nekrotischen Kerns. Diese Folgen waren durch Inflammation, Plaque-Blutung und Mikroverkalkungen zu erklären (Stoneman et al., 2007; Gautier et al., 2009; Daghem et al., 2020). Die vermehrte Apoptose phagozytischer Zellen (u.a. Makrophagen) störte außerdem die Entfernung anderer apoptotischer und nekrotischer Zellen in der Läsion und förderte dadurch deren Wachstum (van Vré et al., 2012).

Die apoptotischen Zellen konnten in unseren Untersuchungen nicht in deren einzelne Zellarten differenziert werden, weshalb in weiteren Studien der Einfluss der Apoptose auf die Plaqueentwicklung abhängig vom apoptotischen Zelltyp untersucht werden sollte. Unsere Ergebnisse lassen jedoch nur auf eine eher untergeordnete Rolle apoptotischer Vorgänge in PACAP bzw. PAC1-defizienten Mäusen bei der Entwicklung und Progression atherosklerotischer Läsionen schließen, da wir letztendlich weder bei PACAP- noch bei PAC1-defizienten Mäusen signifikante Unterschiede im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen fanden.

4.4.2.4 RIP3 (Nekroptose)

RIP3 ist ein intrazellulärer Marker und Regulator der Nekroptose, der zum Beispiel in Makrophagen atherosklerotischer Plaques zu finden ist (Karunakaran et al., 2016). Unsere Untersuchungen zeigten bei PACAP- bzw. PAC1-defizienten ApoE^{-/-}-Mäusen keine signifikant veränderte prozentuale RIP3-immunreaktive Plaquefläche im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen. Diese Ergebnisse passen zu den Daten von Splitthoff et al. und Rasbach et al., die bei CRF-gefütterten PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- bzw. PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied der RIP3-positiven Plaquefläche im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen fanden: Atherosklerotische Läsionen des TB von PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen zeigten zwar nach 30 Wochen SF mehr RIP3-positive Flächen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen, allerdings war dieser Effekt bei CRF nicht zu beobachten (Splitthoff et al., 2020). Nach 30 Wochen SF zeigten atherosklerotischen Läsionen von PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen einen Anstieg der RIP3 immunreaktiven Plaquefläche im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen. Nach 10 Wochen SF und 20 Wochen CRF war die RIP3 immunreaktive Plaquefläche in atherosklerotischen Plaques jedoch niedriger als nach 30 Wochen SF (Rasbach et al., 2019). Aufgrund der Fütterungszeit mit 10 Wochen SF und weiteren 10 Wochen CRF konnten sich die atherosklerotischen Plaques unserer Mäuse noch in frühen Stadien befinden. Zu diesem Zeitpunkt hat womöglich noch keine relevante Nekroptose stattgefunden, da jene insbesondere in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose eine Rolle in deren Progression spielen kann (Lin et al., 2013).

Da die Lumenstenose sowohl bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- als auch bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen signifikant kleiner war und zwischen diesen Mäusen keine signifikant veränderte prozentuale RIP3-

immunreaktive Plauefläche im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden konnte, scheint nach 10 Wochen SF und 10 Wochen CRF die Nekroptose keinen wesentlichen Effekt auf die Lumenstenose zu haben. Andererseits bestehen bereits publizierte Daten, die auf einen relevanten Einfluss der Makrophagennekroptose auf die Entstehung und Progression der Atherosklerose hinweisen (Tabas, 2010). Darüber hinaus wurde bereits eine pharmakologische Inhibierung von RIP3 vorgeschlagen, um den Schweregrad der Atherosklerose pharmakologisch zu reduzieren (Zhe-Wei et al., 2018).

Die bisher publizierten Ergebnisse, nach denen die Nekroptose insbesondere in fortgeschrittenen Stadien einen Einfluss auf die Progression atherosklerotischer Läsionen hat, konnten wir mit unserem Mausmodell nicht bestätigen. Allerdings zeigen unsere Daten interessanterweise auch, dass eine Inhibierung der Lumenstenose bei PACAP^{-/-}/ApoE^{-/-} bzw. PAC1^{-/-}/ApoE^{-/-} unabhängig von RIP3 erreicht werden kann, ebenso wie z.B. bei PAC1^{-/-}/ApoE^{-/-} nach 10 Wochen SF + 20 Wochen CRF (Splitthoff et al., 2020). Daher sollten insbesondere im Hinblick auf den klinischen Nutzen einer RIP3-Inhibierung zur positiven Beeinflussung einer Atherosklerose weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

4.4.3 Inflammationsmarker

4.4.3.1 Interleukin-6

In unserer Studie war der prozentuale Anteil der Interleukin-6-positiven Plauefläche bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} signifikant größer als bei ApoE^{-/-}-Mäusen ($p=0,041$), während bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} Mäusen kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur ApoE^{-/-}-Mäusen festgestellt wurde. Dies könnte durch eine inhibitorische Wirkung von PACAP auf entzündliche Prozesse begründet sein, die bereits in der Literatur beschrieben ist: PACAP kann bei Makrophagen die IL-6-mRNA-Expression sowie die IL-6 Abgabe in deren Umgebung hemmen und dadurch in die Entzündungskaskade eingreifen (Delgado et al., 1999b; Gomariz et al., 2000), (Zhang et al., 2005). Weiterhin hemmt PACAP in atherosklerotischen Läsionen die IL-6-Freisetzung von Makrophagen, die durch Lipopolysaccharide stimuliert wurden (Martinez et al., 1998; Martínez et al., 1998). Jedoch hatte ein PACAP- bzw. PAC1-Mangel in neuesten Studien weder bei Rasbach et al. noch bei Splitthoff et al. einen signifikanten Einfluss auf die prozentuale IL-6-immunreaktive Fläche in atherosklerotischen Plaques CRF-

gefütterter ApoE^{-/-}-Mäuse (Rasbach et al., 2019; Splitthoff et al., 2020). Allerdings konnte nach 30 Wochen SF bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen eine 1,7-fach erhöhte prozentuale IL-6-immunreaktive Plaquefläche im Vergleich zu ApoE^{-/-}- Mäusen nachgewiesen werden, wenn auch der Unterschied nicht signifikant war (Splitthoff et al., 2020), was ebenfalls die Hypothese einer Inhibierung durch PACAP auf Inflammationsreaktionen bekräftigt.

Weiterhin beobachteten wir, dass sich die prozentualen immunreaktiven IL-6 - und RIP3 -Plaqueflächen innerhalb der jeweiligen Genotypen im Mittel ähnelten, ohne jedoch bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- bzw. PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen die Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen zu beeinflussen. Eine durch RIP3 verursachte Hochregulierung von IL-6 und anderer proinflammatorischer Cytokine infolge der Nekroptose wurde bereits beschrieben (Orozco et al., 2019). Unsere Befunde könnten zwar auf eine gemeinsame Regulation von IL-6 und RIP3 in Zellen atherosklerotischer Plaques hindeuten, zeigen aber interessanterweise, dass die Lumenstenose durch IL-6- und RIP3- unabhängige Prozesse reguliert werden könnte, da diese bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- bzw. PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}- dennoch geringer war als bei ApoE^{-/-}-Mäusen.

Unsere Daten könnten die entzündungshemmende Wirkung von PACAP bestätigen, bedürfen aber auch wegen des fehlenden Effekts bei PAC1-Defizienz weiterer Forschung zur Verifizierung. Die in unserer Studie gefundene Ausprägung der IL-6-immunreaktiven Fläche in atherosklerotischen Plaques scheint jedoch nicht direkt mit dem Grad der Lumenstenose des TB bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen zusammenzuhängen.

4.4.3.2 COX-2

Unsere Analysen zeigten keinen signifikanten Effekt einer PACAP- bzw. PAC1-Defizienz auf die prozentuale COX-2-immunreaktive Plaquefläche im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen. Allerdings gab es bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen eine tendenziell erhöhte COX-2-immunreaktive Plaquefläche. Eventuell war die durch den ApoE-Mangel bedingte Hypercholesterinämie und die dadurch verursachte Entzündungsreaktion zu ausgeprägt, weshalb ein möglicher Effekt von PACAP bzw. PAC1 maskiert worden sein könnte. Unsere Ergebnisse bestätigen damit neueste Daten, bei denen eine PACAP- bzw. PAC1-Defizienz unabhängig von der Ernährung keine signifikanten Auswirkungen auf die COX-2-immunreaktive

Plaquefläche hatte (Rasbach et al., 2019; Splitthoff et al., 2020).

Weiterhin könnte ein Zusammenhang zwischen den prozentualen immunreaktiven Plaueflächen von COX-2, IL-6 und RIP3 innerhalb der jeweiligen Genotypen bestehen, was auf eine gemeinsame Regulation dieser Biomarker hindeuten könnte. Ein Zusammenhang zwischen der Regulation des Nekroptosemediators RIP3 und verschiedenen Inflammationsparametern wie IL-6 und COX-2 ist bereits in der Literatur beschrieben (Orozco et al., 2019). Gemeinsame Regulationswege und die Interaktion zwischen den jeweiligen Cytokinen sollten weiterführend untersucht werden, um ein besseres Verständnis für deren Zusammenspiel zu gewinnen. Da die Lumenstenose sowohl bei PACAP- als auch PAC1-defizienten Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen verringert war, scheinen die Mechanismen, welche am Progress der Lumenstenose beteiligt sind, unabhängig von den von uns untersuchten Inflammationsmediatoren zu sein. Diese Mechanismen sollten zum besseren Verständnis der Atherogenese in weiterführenden Studien untersucht werden.

4.4.3.3 Interleukin-1 β

Unsere Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} im Vergleich zu ApoE^{-/-} Mäusen in Bezug auf die prozentuale IL-1 β -positive Plauefläche. Diese Befunde stimmen mit neuesten Daten von Rasbach et al. und Splitthoff et al. überein, bei denen nach 20 Wochen CRF ein PACAP- bzw. PAC1-Mangel keinen Effekt auf die prozentuale IL-1 β -immunreaktive Plauefläche hatte (Rasbach et al., 2019; Splitthoff et al., 2020). Allerdings konnten diese im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen bei PACAP- und PAC1-defizienten Mäusen nach einer Ernährung mit SF erhöhte prozentuale IL-1 β -immunreaktive Fläche in atherosklerotischen Läsionen nachweisen (Rasbach et al., 2019; Splitthoff et al., 2020). Deshalb kann angenommen werden, dass PACAP die lokale Entzündungsreaktion abmildern könnte. Da die Effekte einer PACAP- bzw. PAC1-Defizienz auf die prozentuale IL-1 β -immunreaktive Plauefläche bei Rasbach et al. und Splitthoff et al. hauptsächlich bei Mäusen mit SF zu sehen waren, scheint die Immunreaktivität von IL-1 β in atherosklerotischen Läsionen schon alleine durch die ApoE-Defizienz und der damit verbundenen Hyperlipidämie verstärkt zu sein.

Bei der Interpretation der Daten sollte darüber hinaus die Dauer der Fütterung berücksichtigt werden. Unsere Analysen wurden an Tieren durchgeführt, welche lediglich 10 Wochen SF und anschließend 10 Wochen CRF erhielten. Dagegen wurden die signifikanten Effekte auf die IL-1 β -positive Plauefläche bei Rasbach et al. und Splitthoff et al. nach 30 Wochen SF gemessen. Bei einer zusätzlichen verstärkten Hyperlipidämie durch CRF könnte die Entzündungsreaktion schon dermaßen ausgeprägt sein, dass PACAP bzw. PAC1 keinen protektiven Einfluss mehr auf die Inflammationsreaktion ausüben.

4.4.3.4 TNF-alpha

Unsere Untersuchungen zeigten weder bei PACAP- noch bei PAC1-defizienten Mäusen einen Unterschied der prozentualen TNF- α immunreaktiven Fläche in atherosklerotischen Plaques im Vergleich zu ApoE^{-/-}- Mäusen. Damit bestätigen wir die Ergebnisse von Splitthoff et al., bei deren Studie unabhängig von der Ernährung ebenfalls kein signifikanter Einfluss einer PAC1-Defizienz auf die prozentuale TNF- α -immunreaktive Plauefläche von ApoE^{-/-}-Mäusen nachgewiesen wurde (Splitthoff et al., 2020). Bei Rasbach et al. wurde dagegen bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}-Mäusen nach 30 Wochen SF eine vergrößerte prozentuale TNF- α -immunreaktive Plauefläche im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen gefunden, während dieser Effekt bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen nach 20 Wochen CRF nicht nachgewiesen wurde (Rasbach et al., 2019). Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Einfluss einer PACAP- bzw. PAC1-Defizienz auf die prozentuale TNF- α immunreaktive Plauefläche in unserer Studie könnte eine Maskierung durch eine ausgeprägte Hyperlipidämie und -cholesterinämie in allen Genotypen infolge der CRF und der ApoE-Defizienz sein. Weitere Untersuchungen mit entsprechendem Studiendesign könnten hierbei Aufschluss bringen. Prinzipiell ist die Wirkung von PACAP auf TNF- α bereits vielfach belegt: PACAP kann die Lipopolysaccharid-induzierte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und weiteren Chemokinen in Makrophagen-Kulturen hemmen (Delgado et al., 1999c; Delgado and Ganea, 2001). Weiterhin wurde berichtet, dass PACAP endotheliale koloniebildende Zellen („ECFCs“; involviert in die Neovaskularisation und Endothelreparatur [Naserian et al., 2020]) gegen eine TNF- α induzierte Apoptose über einen entzündungshemmenden Mechanismus schützt (Bian et al., 2017). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer

entzündungshemmenden Rolle PACAPs bei Kreislauferkrankungen wie der Atherosklerose.

4.5 Diskussion der Methoden und Ausblick

Das ApoE^{-/-}-Mausmodell ist wegen der resultierenden Hypercholesterinämie und der damit einhergehenden Neigung zur Entwicklung atherosklerotischer Plaques eines der am häufigsten verwendeten Mausmodelle in der Atheroskleroseforschung und weist eine gute Vergleichbarkeit mit dem humanen Organismus auf (Zhang et al., 1992; Jawien, 2012). Ergebnisse aus der Tierforschung können niemals uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden, da es Unterschiede in Stoffwechselfvorgängen, dem kardiovaskulären System und anderen Organsystemen gibt.

Tierversuche sollten prinzipiell immer unter strenger Kosten-Nutzen-Analyse durchgeführt werden. In der Forschung hat man sich hierbei auf die „3R“ „Reduction, Refinement, Replacement“ (= Reduzierung, Verfeinerung, Ersatz) geeinigt, um das Tierleid und die Anzahl der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten. Da für statistisch signifikante Unterschiede immer eine gewisse Anzahl an Versuchstieren notwendig ist, können deshalb allerdings Konflikte entstehen.

Da die Atherosklerose Grundlage für die häufigsten Erkrankungen unserer Gesellschaft ist, hat die Verhinderung ihrer Entwicklung und Progression einen hohen Stellenwert in der Forschung. Die signifikant verringerte Lumenstenose im TB der PACAP- und insbesondere PAC1-defizienten Mäuse kann für einen klinisch-pharmakologischen Einsatz relevant werden. Takasaki et al. haben mit PA-8 bereits einen PAC1 Antagonist entwickelt, nach dessen Gabe eine nachweisbar abgeschwächte Reaktion auf inflammationsbedingte Schmerzreize beobachtet wurde (Takasaki et al., 2019). Ein möglicher pharmakologischer Einfluss auf PACAP und dessen Rezeptoren, beispielsweise durch synthetisches PACAP-38 oder Maxadilan (M65), sollte ebenfalls in weiteren Studien untersucht werden.

Darüber hinaus empfehlen sich weitere Analysen der Entwicklung und Progression einer Atherosklerose in VPAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}- bzw. VPAC2^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen nach verschiedenen Fütterungen, insbesondere nach CRF.

5 Zusammenfassung

Das Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) wirkt über die pleiotrop verteilten G-Protein gekoppelten Rezeptoren PAC1, VPAC1 und VPAC2. PAC1 wird ausschließlich durch PACAP aktiviert. VPAC1 und VPAC2 können dagegen auch durch das verwandte vasoaktive intestinale Peptid (VIP) aktiviert werden. PACAP wirkt unter anderem an Blutgefäßen, Immunzellen und im neuroendokrinen System. Die vorliegende Studie untersuchte den *In-vivo*-Effekt einer PACAP- bzw. PAC1-Defizienz (PACPAP^{-/-} bzw. PAC1^{-/-}) auf die Entwicklung und den Verlauf einer Atherosklerose im Apolipoprotein E-knockout (ApoE^{-/-}) Mausmodell nach 10 Wochen Normalfutter (SF) und anschließend 10 Wochen cholesterinreicher Nahrung (CRF). Untersucht wurden die Genotypen ApoE^{-/-}, PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} sowie PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}. Bei den Mäusen wurde das Gewicht bestimmt und die Plasma-Cholesterin- und -Triglycerid-Konzentrationen gemessen. Danach erfolgte die Entnahme des Truncus brachiocephalicus (TB) und dessen unmittelbare Schockgefrierung in flüssigstickstoffgekühltem Isopentan. Aus dem TB wurden Gefrierschnitte angefertigt, die zur Quantifizierung der Lumenstenose, sowie von morphologischen, Remodeling- und Inflammationsparametern verwendet wurden. Das durchschnittliche Körpergewicht war bei allen Genotypen ähnlich, die Tibiae waren jedoch bei den PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen durchschnittlich signifikant 1,1-fach länger als die der ApoE^{-/-}- Mäuse. Die Plasma-Cholesterin- und -Triglycerid-Spiegel der drei untersuchten Genotypen ähnelten sich.

Bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen war die durchschnittliche Lumenstenose signifikant 1,5-fach geringer als bei ApoE^{-/-}- Mäusen. Außerdem fanden wir bei diesem Genotyp einen signifikant 1,5-fach kleineren prozentualen Anteil der sm- α -Actin-positiven Plaquefläche. Signifikant 2,6-fach größer dagegen war der prozentuale Anteil der Ki-67-positiven Zellkerne im Vergleich zur ApoE^{-/-}- Kontrolle. Darüber hinaus war der prozentuale Anteil der Interleukin-6-positiven Plaquefläche signifikant 1,6-fach höher als bei ApoE^{-/-}- Mäusen.

Die Lumenstenose war auch bei PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen signifikant 4,3-fach geringer als bei ApoE^{-/-}- Mäusen. Weiterhin war bei PAC1-defizienten Mäusen der prozentuale Anteil der MoMa-2-positiven Plaquefläche signifikant 5,8-fach kleiner als bei ApoE^{-/-}-Mäusen. Des Weiteren war der prozentuale Anteil der ATG5-positiven Plaquefläche signifikant 2,2-fach kleiner als bei ApoE^{-/-}- Mäusen.

Insgesamt zeigten sich sowohl bei PACAP^{-/-}- als auch bei PAC1^{-/-}-Mäusen anti-atherosklerotische Effekte im Vergleich zur Kontrolle (ApoE^{-/-}). Außerdem war ein geringerer Myozyten-Anteil zu beobachten, was eine verminderte Plaquestabilität zufolge haben könnte. Bei PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}- Mäusen fanden sich zudem Hinweise auf eine erhöhte Proliferationsaktivität in Form eines größeren prozentualen Anteils Ki-67-positiver Zellkerne und eine verstärkte Inflammation in den Plaueflächen. PAC1-Defizienz führte außerdem zu einer verminderten Monozyten- und Makrophagen-Dichte sowie einem geringeren Anteil ATG5-positiver Bereiche in der Plaque.

Unsere Ergebnisse bestätigen und erweitern Befunde anderer, wodurch die bestehende Vermutung eines Effekts von PACAP bzw. PAC1 auf die Entwicklung und Progression einer Atherosklerose durch unsere Studie zusätzlich bestärkt werden konnte. Interessanterweise zeigte sich ergänzend zu bisher veröffentlichten Daten eine reduzierte Lumenstenose durch PACAP- bzw. PAC1-Defizienz nach CRF. Der vermeintlich protektive Effekt von PACAP könnte also auch über die Rezeptoren VPAC1 und VPAC2 vermittelt werden. Die komplexen und vielfältigen Effekte von PACAP und dessen Rezeptoren sollten in weiterführenden Studien untersucht werden, um die jeweils zugrunde liegenden molekularen Mechanismen in den jeweiligen Organsystemen besser zu verstehen. Aufgrund unserer Ergebnisse und den bisher vorliegenden Daten sollten künftige Studien zeigen, ob durch den pharmakologischen Einsatz von PACAP-Rezeptor-Modulatoren, wie synthetisches PACAP38 oder Maxadilan, die Entwicklung und Progression einer Atherosklerose positiv beeinflusst werden kann.

5 Summary

The pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) acts via the pleiotropically distributed G-protein coupled receptors PAC1, VPAC1 and VPAC2. PAC1 is exclusively activated by PACAP. In contrast, VPAC1 and VPAC2 can also be activated by the related vasoactive intestinal peptide (VIP). PACAP acts, among other organ systems, on blood vessels, immune cells and the neuroendocrine system. The present study investigated the in vivo effect of a PACAP or PAC1 deficiency (PACAP^{-/-} or PAC1^{-/-}) on the development and course of atherosclerosis in the apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) mouse model after 10 weeks standard food (SF) and then 10 weeks on a cholesterol enriched diet (CRF). The genotypes ApoE^{-/-}, PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} and PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} were examined. Mice were weighed, their plasma cholesterol and triglyceride concentrations were measured. The truncus brachiocephalicus (TB) was then removed and immediately shock frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Frozen sections were prepared from the TB and used to quantify luminal stenosis, morphological, remodeling, and inflammatory parameters. Mean body weights were similar in all genotypes, however, the tibiae in PACAP^{-/-}/ApoE^{-/-} mice were, on average, significantly 1.1-fold longer than that of ApoE^{-/-} mice. The plasma cholesterol and triglyceride levels of the three genotypes examined were similar.

In PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-} mice, mean luminal stenosis was significantly 1.5-fold less than in ApoE^{-/-} mice. In addition, we found a significantly 1.5-fold smaller percentage of sm- α -actin-positive plaque area in this genotype. On the other hand, the percentage of Ki-67-positive cell nuclei was significantly 2.6 times greater than in the ApoE^{-/-} control. In addition, the percentage of interleukin-6 positive plaque area was significantly 1.6-fold higher than in ApoE^{-/-} mice.

Lumen stenosis was also significantly 4.3-fold lower in PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-} mice than in ApoE^{-/-} mice. Furthermore, in PAC1-deficient mice, the percentage of MoMa-2-positive plaque area was significantly 5.8-fold smaller than in ApoE^{-/-} mice. Additionally, the percentage of ATG5-positive plaque area was significantly 2.2-fold smaller than in ApoE^{-/-} mice.

Overall, both PACAP^{-/-} and PAC1^{-/-} mice showed anti-atherosclerotic effects compared to controls (ApoE^{-/-}). In addition, a lower proportion of myocytes was observed, which could result in reduced plaque stability. In PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}

mice there was also evidence of enlarged proliferation activity in the form of a larger percentage of Ki-67-positive cell nuclei and increased inflammation in the plaque areas. PAC1 deficiency also resulted in reduced monocyte and macrophage density and a lower proportion of ATG5-positive areas in the plaque.

Our results confirm and extend the findings of others, i.e. the existing assumption of an effect of PACAP or PAC1 on the development and progression of atherosclerosis could be additionally strengthened by our study. Interestingly, in addition to previously published data, a reduced lumen stenosis due to PACAP or PAC1 deficiency after CRF was shown. The supposedly protective effect of PACAP could therefore also be mediated via the VPAC1 and VPAC2 receptors. The complex and diverse effects of PACAP and its receptors should be investigated in further studies in order to better understand the underlying molecular mechanisms in the respective organ systems. Based on our results and the data available so far, future studies should show whether the development and progression of atherosclerosis can be positively influenced by the pharmacological use of PACAP receptor modulators, such as synthetic PACAP38 or Maxadilan.

6 Literatur

- A Lalazar, R W Mahley, 1989. Human apolipoprotein E. Receptor binding activity of truncated variants with carboxyl-terminal deletions. *J. Biol. Chem.* 264 (15), 8447–8450.
- Adamou, J.E., Aiyar, N., van Horn, S., Elshourbagy, N.A., 1995. Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 209 (2), 385–392. 10.1006/bbrc.1995.1515.
- Aino, H., Hashimoto, H., Ogawa, N., Nishino, A., Yamamoto, K., Nogi, H., Nagata, S., Baba, A., 1995. Structure of the gene encoding the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Gene* 164 (2), 301–304. 10.1016/0378-1119(95)00391-I.
- Ait-Oufella, H., Libby, P., Tedgui, A., 2019. Anticytokine Immune Therapy and Atherothrombotic Cardiovascular Risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 39 (8). 10.1161/ATVBAHA.119.311998.
- Albarrán-Juárez, J., Kaur, H., Grimm, M., Offermanns, S., Wettschureck, N., 2016. Lineage tracing of cells involved in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 251, 445–453. 10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.012.
- Allahverdian, S., Chehroudi, A.C., McManus, B.M., Abraham, T., Francis, G.A., 2014. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation* 129 (15), 1551–1559. 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005015.
- Andrés, V., Pello, O.M., Silvestre-Roig, C., 2012. Macrophage proliferation and apoptosis in atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* 23 (5). 10.1097/MOL.0b013e328357a379.
- Anzai, M., Suzuki, Y., Takayasu, M., Kajita, Y., Mori, Y., Seki, Y., Saito, K., Shibuya, M., 1995. Vasorelaxant effect of PACAP-27 on canine cerebral arteries and rat intracerebral arterioles. *European Journal of Pharmacology* 285 (2), 173–179. 10.1016/0014-2999(95)00404-9.
- Arai, S., Shelton, J.M., Chen, M., Bradley, M.N., Castrillo, A., Bookout, A.L., Mak, P.A., Edwards, P.A., Mangelsdorf, D.J., Tontonoz, P., Miyazaki, T., 2005. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Ap16 in atherosclerosis development. *Cell metabolism* 1 (3), 201–213. 10.1016/j.cmet.2005.02.002.
- Arastéh et al., 2018. *Innere Medizin*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Ascuitto, R.J., Ross-Ascuitto, N.T., Waddell, A.E., Kadowitz, P.J., 1996. Contractile and coronary vascular effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in neonatal pig hearts. *Cardiovascular Research* 31 Spec No, E153-9.
- Aumüller, G., Aust, G., Conrad, A., Engele, J., Kirsch, J., Maio, G., Mayerhofer, A., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E., Spanel-Borowski, K.,

- Wennemuth, G., Wolff, W., Wurzinger, L.J., Zilch, H.-G., 2020. *Duale Reihe Anatomie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Baeres, F.M.M., Møller, M., Martin, F., Baeres, M., 2004. Origin of PACAP-immunoreactive nerve fibers innervating the subarachnoidal blood vessels of the rat brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 24 (6), 628–635. 10.1097/01.WCB.0000121234.42748.F6.
- Baker, C.S., Hall, R.J., Evans, T.J., Pomerance, A., Maclouf, J., Creminon, C., Yacoub, M.H., Polak, J.M., 1999. Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19 (3), 646–655. 10.1161/01.atv.19.3.646.
- Basille, M., Gonzalez, B.J., Desrues, L., Demas, M., Fournier, A., Vaudry, H., 1995. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates adenylyl cyclase and phospholipase C activity in rat cerebellar neuroblasts. *Journal of neurochemistry* 65 (3), 1318–1324. 10.1046/j.1471-4159.1995.65031318.x.
- Basu, S.K., Brown, M.S., Ho, Y.K., Havel, R.J., Goldstein, J.L., 1981. Mouse macrophages synthesize and secrete a protein resembling apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (12), 7545–7549. 10.1073/pnas.78.12.7545.
- Benitez, R., Delgado-Maroto, V., Caro, M., Forte-Lago, I., Duran-Prado, M., O'Valle, F., Lichtman, A.H., Gonzalez-Rey, E., Delgado, M., 2018. Vasoactive Intestinal Peptide Ameliorates Acute Myocarditis and Atherosclerosis by Regulating Inflammatory and Autoimmune Responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 200 (11), 3697–3710. 10.4049/jimmunol.1800122.
- Bennett, M.R., Sinha, S., Owens, G.K., 2016. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation research* 118 (4), 692–702. 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361.
- Bentzon, J.F., Otsuka, F., Virmani, R., Falk, E., 2014. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation research* 114 (12), 1852–1866. 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.
- Bezold, V., Rosenstock, P., Scheffler, J., Geyer, H., Horstkorte, R., Bork, K., 2019. Glycation of macrophages induces expression of pro-inflammatory cytokines and reduces phagocytic efficiency. *Aging (Albany NY)* 11 (14), 5258–5275. 10.18632/aging.102123.
- Bhaskar, V., Yin, J., Mirza, A.M., Phan, D., Vanegas, S., Issafras, H., Michelson, K., Hunter, J.J., Kantak, S.S., 2011. Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis in vitro and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 216 (2), 313–320. 10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.026.

- Bitar, K.G., Coy, D.H., 1993. Interaction of ovine pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP-38) with rat lung membranes. *Peptides* 14 (3), 621–627. 10.1016/0196-9781(93)90154-9.
- Bodner, M., Castrillo, J.L., Theill, L.E., Deerinck, T., Ellisman, M., Karin, M., 1988. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55 (3), 505–518. 10.1016/0092-8674(88)90037-2.
- Bourgault, S., Vaudry, D., Dejda, A., Doan, N.D., Vaudry, H., Fournier, A., 2009. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: focus on structure-activity relationships of a neuroprotective Peptide. *Current medicinal chemistry* 16 (33), 4462–4480. 10.2174/092986709789712899.
- Brabet, P., Diriong, S., Journot, L., Bockaert, J., Taviaux, S., 1996. Localization of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor (PACAP1-R) gene to 7p15-p14 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 38 (1), 100–102. 10.1006/geno.1996.0600.
- Brown, M.S., Basu, S.K., Falck, J.R., Ho, Y.K., Goldstein, J.L., 1980. The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *Journal of supramolecular structure* 13 (1), 67–81. 10.1002/jss.400130107.
- Bruch, L., Bychkov, R., Kästner, A., Bülow, T., Ried, C., Gollasch, M., Baumann, G., Luft, F.C., Haller, H., 1997. Pituitary adenylate-cyclase-activating peptides relax human coronary arteries by activating K(ATP) and K(Ca) channels in smooth muscle cells. *Journal of vascular research* 34 (1), 11–18. 10.1159/000159197.
- Bu, G., 2009. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nature reviews. Neuroscience* 10 (5), 333–344. 10.1038/nrn2620.
- Buscail, L., Gourlet, P., Cauvin, A., Neef, P. de, Gossen, D., Arimura, A., Miyata, A., Coy, D.H., Robberecht, P., Christophe, J., 1990. Presence of highly selective receptors for PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide) in membranes from the rat pancreatic acinar cell line AR 4-2J. *FEBS Letters* 262 (1), 77–81. 10.1016/0014-5793(90)80158-F.
- Cai, Y., Xin, X., Yamada, T., Muramatsu, Y., Szpirer, C., Matsumoto, K., 1995. Assignments of the genes for rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (Adcyap1) and its receptor subtypes (Adcyap1r1, Adcyap1r2, and Adcyap1r3). *Cytogenetics and cell genetics* 71 (2), 193–196. 10.1159/000134105.
- Cardell, L.O., Uddman, R., Luts, A., Sundler, F., 1991. Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in guinea-pig lung: distribution and dilatory effects. *Regulatory peptides* 36 (3), 379–390. 10.1016/0167-0115(91)90071-N.

- Cauvin, A., Robberecht, P., Neef, P. de, Gourlet, P., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M.-C., Christophe, J., 1991. Properties and distribution of receptors for pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in rat brain and spinal cord. *Regulatory peptides* 35 (2), 161–173. 10.1016/0167-0115(91)90478-Y.
- Chan, D.C., Watts, G.F., 2006. Apolipoproteins as markers and managers of coronary risk. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 99 (5), 277–287. 10.1093/qjmed/hcl027.
- Chance, W.T., Thompson, H., Thomas, I., Fischer, J.E., 1995. Anorectic and neurochemical effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in rats. *Peptides* 16 (8), 1511–1516. 10.1016/0196-9781(95)02048-9.
- Chang, E., Welch, S., Luna, J., Giacalone, J., Francke, U., 1993. Generation of a Human Chromosome 18-Specific YAC Clone Collection and Mapping of 55 Unique YACs by FISH and Fingerprinting. *Genomics* 17 (2), 393–402. 10.1006/geno.1993.1338.
- Chang, Q., 1997. Experimental study of the effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its mechanism on the vascular cell components--the possible relationship between PACAP and atherosclerosis. *Sheng li ke xue jin zhan [Progress in physiology]* 28 (2), 132–135.
- Chapman, M.J., Le Goff, W., Guerin, M., Kontush, A., 2010. Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *European heart journal* 31 (2), 149–164. 10.1093/eurheartj/ehp399.
- Chappell, J., Harman, J.L., Narasimhan, V.M., Yu, H., Foote, K., Simons, B.D., Bennett, Jørgensen, H.F., Eriksson, P., Quertermous, T., Hamsten, A., Hedin, U., 2016. Extensive Proliferation of a Subset of Differentiated, yet Plastic, Medial Vascular Smooth Muscle Cells Contributes to Neointimal Formation in Mouse Injury and Atherosclerosis Models. *Circulation research* 36 (9). 10.1161/ATVBAHA.116.307893.
- Chedeville, A., Mirossay, L., Chastre, E., Hurbain-Kosmath, I., Lopez, M., Gespach, C., 1993. Interaction of VIP, PACAP and related peptides in normal and leukemic human monocytes and macrophages. *FEBS Letters* 319 (1-2), 171–176. 10.1016/0014-5793(93)80061-X.
- Cherng et al., 2008. Alpha-smooth muscle actin (α -SMA). *The Journal of American Science*, 4.
- Chik, C.L., Li, B., Ogiwara, T., Ho, A.K., Karpinski, E., 1996. PACAP modulates L-type Ca²⁺ channel currents in vascular smooth muscle cells: involvement of PKC and PKA. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10 (11), 1310–1317. 10.1096/fasebj.10.11.8836045.
- Cipollone, F., Fazia, M.L., 2006. COX-2 and atherosclerosis. *Journal of cardiovascular pharmacology* 47 Suppl 1, S26-36. 10.1097/00005344-200605001-00006.

- Cladaras, C., Hadzopoulou-Cladaras, M., Nolte, R.T., Atkinson, D., Zannis, V.I., 1986. The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. *The EMBO journal* 5 (13), 3495–3507.
- Clarke, M.C.H., Figg, N., Maguire, J.J., Davenport, A.P., Goddard, M., Littlewood, T.D., Bennett, M.R., 2006. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nature medicine* 12 (9), 1075–1080. 10.1038/nm1459.
- Colom, L.V., Diaz, M.E., Beers, D.R., Neely, A., Xie, W.J., Appel, S.H., 1998. Role of potassium channels in amyloid-induced cell death. *Journal of neurochemistry* 70 (5), 1925–1934. 10.1046/j.1471-4159.1998.70051925.x.
- Couvineau, A., Ceraudo, E., Tan, Y.-V., Nicole, P., Laburthe, M., 2012. The VPAC1 receptor: structure and function of a class B GPCR prototype. *Frontiers in endocrinology* 3, 139. 10.3389/fendo.2012.00139.
- Couvineau, A., Laburthe, M., 2012. VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *British journal of pharmacology* 166 (1), 42–50. 10.1111/j.1476-5381.2011.01676.x.
- Crofford, L.J., 1997. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *The Journal of rheumatology. Supplement* 49, 15–19.
- D Y Hui, J A Harmony, 1980. Inhibition of Ca²⁺ accumulation in mitogen-activated lymphocytes: role of membrane-bound plasma lipoproteins. *PNAS* 77 (8), 4764–4768. 10.1073/pnas.77.8.4764.
- Daghem, M., Bing, R., Fayad, Z.A., Dweck, M.R., 2020. Noninvasive Imaging to Assess Atherosclerotic Plaque Composition and Disease Activity: Coronary and Carotid Applications. *JACC. Cardiovascular imaging* 13 (4), 1055–1068. 10.1016/j.jcmg.2019.03.033.
- Dejda, A., Bourgault, S., Doan, N.D., Létourneau, M., Couvineau, A., Vaudry, H., Vaudry, D., Fournier, A., 2011. Identification by photoaffinity labeling of the extracellular N-terminal domain of PAC1 receptor as the major binding site for PACAP. *Biochimie* 93 (4), 669–677. 10.1016/j.biochi.2010.12.010.
- Delgado, M., Ganea, D., 2001. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (2), 966–975. 10.4049/jimmunol.167.2.966.
- Delgado, M., Leceta, J., Abad, C., Martinez, C., Ganea, D., Gomariz, R.P., 1999a. Shedding of membrane-bound CD14 from lipopolysaccharide-stimulated macrophages by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Journal of Neuroimmunology* 99 (1), 61–71. 10.1016/S0165-5728(99)00105-8.

- Delgado, M., Martinez, C., Pozo, D., Calvo, J.R., Leceta, J., Ganea, D., Gomariz, R.P., 1999b. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 162 (2), 1200–1205.
- Delgado, M., Munoz-Elias, E.J., Gomariz, R.P., Ganea, D., 1999c. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 162 (3), 1707–1716.
- Delgado, M., Munoz-Elias, E.J., Gomariz, R.P., Ganea, D., 1999d. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevent inducible nitric oxide synthase transcription in macrophages by inhibiting NF-kappa B and IFN regulatory factor 1 activation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 162 (8), 4685–4696.
- Delgado, M., Munoz-Elias, E.J., Kan, Y., Gozes, I., Fridkin, M., Brennehan, D.E., Gomariz, R.P., Ganea, D., 1998. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor alpha transcriptional activation by regulating nuclear factor-kB and cAMP response element-binding protein/c-Jun. *The Journal of biological chemistry* 273 (47), 31427–31436. 10.1074/jbc.273.47.31427.
- Delgado, M., Pozo, D., Ganea, D., 2004. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacological reviews* 56 (2), 249–290. 10.1124/pr.56.2.7.
- Delgado, M., Pozo, D., Martinez, C., Leceta, J., Calvo, J.R., Ganea, D., Gomariz, R.P., 1999e. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production by macrophages: in vitro and in vivo studies. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 162 (4), 2358–2367.
- Delporte, C., Poloczek, P., Neef, P. de, Vertongen, P., Ciccarelli, E., Svoboda, M., Herchuelz, A., Winand, J., Robberecht, P., 1995. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide stimulate two signaling pathways in CHO cells stably transfected with the selective type I PACAP receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 107 (1), 71–76. 10.1016/0303-7207(94)03424-R.
- Deter, R.L., Duve, C. de, 1967. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *The Journal of cell biology* 33 (2), 437–449. 10.1083/jcb.33.2.437.
- Dhuriya, Y.K., Sharma, D., 2018. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of neuroinflammation* 15 (1), 199. 10.1186/s12974-018-1235-0.
- Di Angelantonio, E., Sarwar, N., Perry, P., Kaptoge, S., Ray, K.K., Thompson, A., Wood, A.M., Lewington, S., Sattar, N., Packard, C.J., Collins, R., Thompson, S.G., Danesh, J., 2009. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 302 (18), 1993–2000. 10.1001/jama.2009.1619.

- Diané, 2014. Multifaces of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP): From Neuroprotection and Energy Homeostasis to Respiratory and Cardiovascular Systems. *J Metabolic Syndr* 03 (04). 10.4172/2167-0943.1000162.
- Dinareello, C.A., 1998. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Annals of the New York Academy of Sciences* 856, 1–11. 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08307.x.
- Dollé, P., Castrillo, J.L., Theill, L.E., Deerinck, T., Ellisman, M., Karin, M., 1990. Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of growth hormone gene activity. *Cell* 60 (5), 809–820. 10.1016/0092-8674(90)90095-v.
- Dong, Z.M., Chapman, S.M., Brown, A.A., Frenette, P.S., Hynes, R.O., Wagner, D.D., 1998. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 102 (1), 145–152. 10.1172/JCI3001.
- Dowsett, M., Nielsen, T.O., A'Hern, R., Bartlett, J., Coombes, R.C., Cuzick, J., Ellis, M., Henry, N.L., Hugh, J.C., Lively, T., McShane, L., Paik, S., Penault-Llorca, F., Prudkin, L., Regan, M., Salter, J., Sotiriou, C., Smith, I.E., Viale, G., Zujewski, J.A., Hayes, D.F., 2011. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *Journal of the National Cancer Institute* 103 (22). 10.1093/jnci/djr393.
- Dubland, J.A., Francis, G.A., 2016. So Much Cholesterol: the unrecognized importance of smooth muscle cells in atherosclerotic foam cell formation. *Current opinion in lipidology* 27 (2), 155–161. 10.1097/MOL.0000000000000279.
- Duewell, P., Hajime Kono, Katey J. Rayner, Cherilyn M. Sirois, Gregory Vladimer, Franz G. Bauernfeind, George S. Abela, Luigi Franchi, Gabriel Nuñez, Max Schnurr, Terje Espevik, Egil Lien, Katherine A. Fitzgerald, Kenneth L. Rock, Kathryn J. Moore, Samuel D. Wright, Veit Hornung, Eicke Latz, 2010. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464 (7293), 1357–1361. 10.1038/nature08938.
- Dynan, W.S., Tjian, R., 1983. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35 (1), 79–87. 10.1016/0092-8674(83)90210-6.
- E M Avila, G Holdsworth, N Sasaki, R L Jackson, J A Harmony, 1982. Apoprotein E suppresses phytohemagglutinin-activated phospholipid turnover in peripheral blood mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* 257 (10), 5900–5909.
- Eipper, B.A., Green, C.B., Campbell, T.A., Stoffers, D.A., Keutmann, H.T., Mains, R.E., Ouafik, L., 1992a. Alternative splicing and endoproteolytic processing generate tissue-specific forms of pituitary peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (PAM). *The Journal of biological chemistry* 267 (6), 4008–4015.

- Eipper, B.A., Stoffers, D.A., Mains, R.E., 1992b. The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Annual review of neuroscience* 15, 57–85. 10.1146/annurev.ne.15.030192.000421.
- Elshourbagy, N.A., Liao, W.S., Mahley, R.W., Taylor, J.M., 1985. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (1), 203–207. 10.1073/pnas.82.1.203.
- Engelking, L.R., 2015. *Textbook of veterinary physiological chemistry*. Academic Press/Elsevier, London, 773 pp.
- Esteve, E., Castro, A., López-Bermejo, A., Vendrell, J., Ricart, W., Fernández-Real, J.-M., 2007. Serum interleukin-6 correlates with endothelial dysfunction in healthy men independently of insulin sensitivity. *Diabetes care* 30 (4), 939–945. 10.2337/dc06-1793.
- Farah, A.E., 1983. Glucagon and the circulation. *Pharmacological reviews* 35 (3), 181–217.
- Favit, A., Sortino, M.A., Aleppo, G., Scapagnini, U., Canonico, P.L., 1995. The inhibition of peroxide formation as a possible substrate for the neuroprotective action of dihydroergocryptine. *Journal of neural transmission. Supplementum* 45, 297–305.
- Fazio, S., Babaev, V.R., Murray, A.B., Hasty, A.H., Carter, K.J., Gleaves, L.A., Atkinson, J.B., Linton, M.F., 1997. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (9), 4647–4652. 10.1073/pnas.94.9.4647.
- Feil, S., Fehrenbacher, B., Lukowski, R., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Schaller, M., Feil, R., 2014. Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circulation research* 115 (7), 662–667. 10.1161/CIRCRESAHA.115.304634.
- Feingold, K.R., Hardardóttir, I., Grunfeld, C., 1998. Beneficial effects of cytokine induced hyperlipidemia. *Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft* 37 Suppl 1, 66–74.
- Francone, O.L., Gurakar, A., Fielding, C., 1989. Distribution and functions of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. Evidence for a functional unit containing these activities together with apolipoproteins A-I and D that catalyzes the esterification and transfer of cell-derived cholesterol. *The Journal of biological chemistry* 264 (12), 7066–7072.
- Fuster, V., Topol, E.J., Nabel, E.G., 2015. *Atherothrombosis and Coronary Artery Disease*, 2nd ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, 1676 pp.
- Gabbiani, G., Kocher, O., Bloom, W.S., Vandekerckhove, J., Weber, K., 1984. Actin expression in smooth muscle cells of rat aortic intimal thickening, human atheromatous plaque, and cultured rat aortic media. *The Journal of clinical investigation* 73 (1). 10.1172/JCI111185.

- Galea, J., Armstrong, J., Gadsdon, P., Holden, H., Francis, S.E., Holt, C.M., 1996. Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 16 (8), 1000–1006. 10.1161/01.atv.16.8.1000.
- Ganea, D., Delgado, M., 2001. Neuropeptides as modulators of macrophage functions. Regulation of cytokine production and antigen presentation by VIP and PACAP. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* 49 (2), 101–110.
- Gargiulo, A.T., Curtis, G.R., Barson, J.R., 2020. Pleiotropic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): Novel insights into the role of PACAP in eating and drug intake. *Brain Research* 1729, 146626. 10.1016/j.brainres.2019.146626.
- Gasz, B., Rácz, B., Roth, E., Borsiczky, B., Ferencz, A., Tamás, A., Cserepes, B., Lubics, A., Gallyas, F., Tóth, G., Lengvári, I., Reglodi, D., 2006. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides* 27 (1), 87–94. 10.1016/j.peptides.2005.06.022.
- Gautier, E.L., Huby, T., Witztum, J.L., Ouzilleau, B., Miller, E.R., Saint-Charles, F., Aucouturier, P., Chapman, M.J., Lesnik, P., 2009. Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation* 119 (13). 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.806158.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., Stein, H., 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 133 (4), 1710–1715.
- Gerdes, J., Stein, H., Pileri, S., Rivano, M.T., Gobbi, M., Ralfkiaer, E., Nielsen, K.M., Pallesen, G., Bartels, H., Palestro, G., 1987. Prognostic relevance of tumour-cell growth fraction in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet (London, England)* 2 (8556), 448–449. 10.1016/s0140-6736(87)90977-9.
- Ghiselli, G., Schaefer, E.J., Gascon, P., Breser, H.B., 1981. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science (New York, N.Y.)* 214 (4526), 1239–1241. 10.1126/science.6795720.
- Giunta, S., Castorina, A., Marzagalli, R., Szychlinska, M.A., Pichler, K., Mobasheri, A., Musumeci, G., 2015. Ameliorative Effects of PACAP against Cartilage Degeneration. Morphological, Immunohistochemical and Biochemical Evidence from in Vivo and in Vitro Models of Rat Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (3), 5922–5944. 10.3390/ijms16035922.
- Gloddek, J., Pagotto, U., Paez Pereda, M., Arzt, E., Stalla, G.K., Renner, U., 1999. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids regulate the release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells. *The Journal of endocrinology* 160 (3), 483–490. 10.1677/joe.0.1600483.

- Glomset, J.A., 1968. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *Journal of lipid research* 9 (2), 155–167.
- Gomariz, R., Leceta, J., Martinez, C., Abad, C., Ganea, D., Delgado, M., 2000. Anti-inflammatory actions of VIP/PACAP. Role in endotoxemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 921, 284–288. 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06978.x.
- Gonzalez, B.J., Basille, M., Mei, Y.A., Vaudry, D., Fournier, A., Cazin, L., Vaudry, H., 1996. Ontogeny of PACAP and PACAP receptors in the rat brain: role of PACAP in the cerebellum during development. *Annals of the New York Academy of Sciences* 805, 302-13; discussion 313-4. 10.1111/j.1749-6632.1996.tb17492.x.
- Gonzalez, B.J., Basille, M., Vaudry, D., Fournier, A., Vaudry, H., 1998. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Annales d'endocrinologie* 59 (5), 364–405.
- Gonzalez, B.J., Leroux, P., Basille, M., Bodenat, C., Vaudry, H., 1994. Somatostatin and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): two neuropeptides potentially involved in the development of the rat cerebellum. *Annales d'endocrinologie* 55 (6), 243–247.
- Gottschall, P.E., Tatsuno, I., Miyata, A., Arimura, A., 1990. Characterization and distribution of binding sites for the hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology* 127 (1), 272–277. 10.1210/endo-127-1-272.
- Gourlet, P., Woussen-Colle, M.C., Robberecht, P., Neef, P. de, Cauvin, A., Vandermeers-Piret, M.C., Vandermeers, A., Christophe, J., 1991. Structural requirements for the binding of the pituitary adenylate-cyclase-activating peptide to receptors and adenylate-cyclase activation in pancreatic and neuronal membranes. *European journal of biochemistry* 195 (2), 535–541. 10.1111/j.1432-1033.1991.tb15734.x.
- Gray, P.W., Aggarwal, B.B., Benton, C.V., Bringman, T.S., Henzel, W.J., Jarrett, J.A., Leung, D.W., Moffat, B., Ng, P., Svedersky, L.P., 1984. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* 312 (5996), 721–724. 10.1038/312721a0.
- Gray, S.L., Cummings, K.J., Jirik, F.R., Sherwood, N.M., 2001. Targeted disruption of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene results in early postnatal death associated with dysfunction of lipid and carbohydrate metabolism. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 15 (10), 1739–1747. 10.1210/mend.15.10.0705.
- Griendling, K.K., Alexander, R.W., 1997. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 96 (10), 3264–3265.
- Grimaldi, M., Cavallaro, S., 1999. Functional and molecular diversity of PACAP/VIP receptors in cortical neurons and type I astrocytes. *The European journal of neuroscience* 11 (8), 2767–2772. 10.1046/j.1460-9568.1999.00693.x.

- Grundy et al., 1993. Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). *JAMA* 269 (23), 3015–3023.
- Grunfeld, C., Feingold, K.R., 1991. Tumor necrosis factor, cytokines, and the hyperlipidemia of infection. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2 (6), 213–219. 10.1016/1043-2760(91)90027-K.
- Ha, C.M., Kang, J.H., Choi, E.J., Kim, M.S., Park, J.W., Kim, Y., Choi, W.S., Chun, S.Y., Kwon, H.B., Lee, B.J., 2000. Progesterone increases mRNA levels of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and type I PACAP receptor (PAC(1)) in the rat hypothalamus. *Brain research. Molecular brain research* 78 (1-2), 59–68. 10.1016/S0169-328X(00)00070-x.
- Hamelink, C., Tjurmina, O., Damadzic, R., Young, W.S., Weihe, E., Lee, H.-W., Eiden, L.E., 2002. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (1), 461–466. 10.1073/pnas.012608999.
- Han, J., Hajjar, D.P., Febbraio, M., Nicholson, A.C., 1997. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *The Journal of biological chemistry* 272 (34), 21654–21659. 10.1074/jbc.272.34.21654.
- Hanson, J., Lowy, J., 1963. The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. *Journal of molecular biology* 6 (1), 46-IN5. 10.1016/S0022-2836(63)80081-9.
- Harmar, A.J., 2001. Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biology* 2 (12), reviews3013.1-reviews3013.10.
- Harmar, A.J., Arimura, A., Gozes, I., Journot, L., Laburthe, M., Pisegna, J.R., Rawlings, S.R., Robberecht, P., Said, S.I., Sreedharan, S.P., Wank, S.A., Waschek, J.A., 1998. International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of Receptors for Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide. *Pharmacol Rev* 50 (2), 265–270.
- Hartman, J., Frishman, W.H., 2014. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiology in review* 22 (3). 10.1097/CRD.0000000000000021.
- Hashimoto, H., Nogi, H., Mori, K., Ohishi, H., Shigemoto, R., Yamamoto, K., Matsuda, T., Mizuno, N., Nagata, S., Baba, A., 1996. Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: An in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 371 (4), 567–577. 10.1002/(SICI)1096-9861(19960805)371:4<567:AID-CNE6>3.0.CO;2-2.

- Hashimoto, H., Shintani, N., Nishino, A., Okabe, M., Ikawa, M., Matsuyama, S., Itoh, K., Yamamoto, K., Tomimoto, S., Fujita, T., Hagihara, N., Mori, W., Koyama, Y., Matsuda, T., Nagata, S., Baba, A., 2000. Mice with markedly reduced PACAP (PAC(1)) receptor expression by targeted deletion of the signal peptide. *Journal of neurochemistry* 75 (5), 1810–1817. 10.1046/j.1471-4159.2000.0751810.x.
- Hatters, D.M., Peters-Libeu, C.A., Weisgraber, K.H., 2006. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in biochemical sciences* 31 (8), 445–454. 10.1016/j.tibs.2006.06.008.
- Herz, J., Beffert, U., 2000. Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience* 1 (1), 51–58. 10.1038/35036221.
- Hirata, Y., Tomita, M., Takata, S., Fujita, T., 1985. Functional receptors for vasoactive intestinal peptide in cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Biochemical and biophysical research communications* 132 (3), 1079–1087. 10.1016/0006-291X(85)91917-5.
- Holighaus, Y., Mustafa, T., Eiden, L.E., 2011. PAC1hop, null and hip receptors mediate differential signaling through cyclic AMP and calcium leading to splice variant-specific gene induction in neural cells. *Peptides* 32 (8), 1647–1655. 10.1016/j.peptides.2011.06.004.
- Hong, X., Margariti, A., Le Bras, A., Jacquet, L., Kong, W., Hu, Y., Xu, Q., 2017. Transdifferentiated Human Vascular Smooth Muscle Cells are a New Potential Cell Source for Endothelial Regeneration. *Scientific reports* 7 (1), 5590. 10.1038/s41598-017-05665-7.
- Hosoya, M., Kimura, C., Ogi, K., Ohkubo, S., Miyamoto, Y., Kugoh, H., Shimizu, M., Onda, H., Oshimura, M., Arimura, A., Fujino, M., 1992. Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1129 (2), 199–206. 10.1016/0167-4781(92)90488-L.
- Huang, M., Shirahase, H., Rorstad, O.P., 1993. Comparative study of vascular relaxation and receptor binding by PACAP and VIP. *Peptides* 14 (4), 755–762. 10.1016/0196-9781(93)90109-t.
- Huang, Y., Liu, X.Q., Rall, S.C., Taylor, J.M., Eckardstein, A. von, Assmann, G., Mahley, R.W., 1998. Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia. *The Journal of biological chemistry* 273 (41), 26388–26393. 10.1074/jbc.273.41.26388.
- Inagaki, N., Yoshida, H., Mizuta, M., Mizuno, N., Fujii, Y., Gono, T., Miyazaki, J., Seino, S., 1994. Cloning and functional characterization of a third pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor subtype expressed in insulin-secreting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (7), 2679–2683. 10.1073/pnas.91.7.2679.

- Inooka, H., Endo, S., Kitada, C., MIZUTA, E., Fujino, M., 1992. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) with 27 residues. *International Journal of Peptide and Protein Research* 40 (5), 456–464. 10.1111/j.1399-3011.1992.tb00324.x.
- Ishigami, M., Swertfeger, D.K., Hui, M.S., Granholm, N.A., Hui, D.Y., 2000. Apolipoprotein E inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation but not the inhibition of migration is mediated through activation of inducible nitric oxide synthase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20 (4), 1020–1026. 10.1161/01.atv.20.4.1020.
- Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K., Nagata, S., 1992. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 8 (4), 811–819. 10.1016/0896-6273(92)90101-I.
- Ishizuka, Y., Kashimoto, K., Mochizuki, T., Sato, K., Ohshima, K., Yanaihara, N., 1992. Cardiovascular and respiratory actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *Regulatory peptides* 40 (1), 29–39. 10.1016/0167-0115(92)90081-5.
- Ivic, I., Balasko, M., Fulop, B.D., Hashimoto, H., Toth, G., Tamas, A., Juhasz, T., Koller, A., Reglodi, D., Solymár, M., 2019. VPAC1 receptors play a dominant role in PACAP-induced vasorelaxation in female mice. *PloS one* 14 (1), e0211433. 10.1371/journal.pone.0211433.
- Jakubke, H.-D., Jeschkeit, H., 1982. *Aminosäuren, Peptide, Proteine*. Verl. Chemie, Weinheim, 505 pp.
- Jankowski, J.M., Dixon, G.H., 1987. The GC box as a silencer. *Bioscience Reports* 7 (12), 955–963. 10.1007/BF01122129.
- Jawien, J., 2012. The role of an experimental model of atherosclerosis: apoE-knockout mice in developing new drugs against atherogenesis. *Current pharmaceutical biotechnology* 13 (13), 2435–2439.
- Jayaraman, S., Cavigliolo, G., Gursky, O., 2012. Folded functional lipid-poor apolipoprotein A-I obtained by heating of high-density lipoproteins: relevance to high-density lipoprotein biogenesis. *The Biochemical journal* 442 (3). 10.1042/BJ20111831.
- Ji, Z. S., W J Brecht, R D Miranda, M M Hussain, T L Innerarity, R W Mahley, 1993. Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J. Biol. Chem.* 268 (14), 10160–10167.
- Johnson, M.C., McCormack, R.J., Delgado, M., Martinez, C., Ganea, D., 1996. Murine T-lymphocytes express vasoactive intestinal peptide receptor 1 (VIP-R1) mRNA. *Journal of Neuroimmunology* 68 (1-2), 109–119. 10.1016/0165-5728(96)00085-9.
- Jonas, A., Phillips, M.C., 2008. Lipoprotein structure, in: Vance, D.E., Vance, J.E. (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Elsevier professional, s.l., pp. 485–506.

- Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G., Hansson, G.K., 1986. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 6 (2), 131–138. 10.1161/01.atv.6.2.131.
- Journot, L., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Seeburg, P.H., Bockaert, J., Spengler, D., 1995. Differential signal transduction by six splice variants of the pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) receptor. *Biochemical Society transactions* 23 (1), 133–137. 10.1042/bst0230133.
- Karunakaran, D., Geoffrion, M., Wei, L., Gan, W., Richards, L., Shangari, P., DeKemp, E.M., Beanlands, R.A., Perisic, L., Maegdefessel, L., Hedin, U., Sad, S., Guo, L., Kolodgie, F.D., Virmani, R., Ruddy, T., Rayner, K.J., 2016. Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis. *Science advances* 2 (7). 10.1126/sciadv.1600224.
- Kastelein, J.J.P., van der Steeg, W.A., Holme, I., Gaffney, M., Cater, N.B., Barter, P., Deedwania, P., Olsson, A.G., Boekholdt, S.M., Demicco, D.A., Szarek, M., LaRosa, J.C., Pedersen, T.R., Grundy, S.M., 2008. Lipids, apolipoproteins, and their ratios in relation to cardiovascular events with statin treatment. *Circulation* 117 (23), 3002–3009. 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.713438.
- Katsuda, S., Boyd, H.C., Fligner, C., Ross, R., Gown, A.M., 1992. Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. *The American Journal of Pathology* 140 (4), 907–914.
- Kawasaki, Y., Imaizumi, T., Matsuura, H., Ohara, S., Takano, K., Suyama, K., Hashimoto, K., Nozawa, R., Suzuki, H., Hosoya, M., 2008. Renal expression of alpha-smooth muscle actin and c-Met in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 23 (6), 913–919. 10.1007/s00467-008-0749-6.
- Kayden, H.J., Maschio, F., Traber, M.G., 1985. The secretion of apolipoprotein E by human monocytederived macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 239 (2), 388–395. 10.1016/0003-9861(85)90704-0.
- Kelly, M.E., Clay, M.A., Mistry, M.J., Hsieh-Li, H.M., Harmony, J.A., 1994. Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cellular immunology* 159 (2), 124–139. 10.1006/cimm.1994.1302.
- Khoo, J.C., Miller, E., Pio, F., Steinberg, D., Witztum, J.L., 1992. Monoclonal antibodies against LDL further enhance macrophage uptake of LDL aggregates. *Arterioscler Thromb* 12 (11), 1258–1266. 10.1161/01.atv.12.11.1258.
- Kim, M.S., Hur, M.K., Son, Y.J., Park, J.-I., Chun, S.Y., D'Elia, A.V., Damante, G., Cho, S., Kim, K., Lee, B.J., 2002. Regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene

- transcription by TTF-1, a homeodomain-containing transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 277 (39), 36863–36871. 10.1074/jbc.M206443200.
- Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y., Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki, H., Seishima, M., 2003. Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23 (4), 656–660. 10.1161/01.ATV.0000064374.15232.C3.
- Knott, T. J., R. J. Pease, L. M. Powell, S. C. Wallis, S. C. Rall, T. L. Innerarity, B. Blackhart, W. H. Taylor, Y. Marcel, R. Milne, D. Johnson, M. Fuller, A. J. Lusis, B. J. McCarthy, R. W. Mahley, B. Levy-Wilson, J. Scott, 1986. Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* 323 (6090), 734–738. 10.1038/323734a0.
- Kobayashi, T., Mori, Y., 1998. Ca²⁺ channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia. *European Journal of Pharmacology* 363 (1), 1–15. 10.1016/S0014-2999(98)00774-2.
- Kockx, M., 2000. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovascular Research* 45 (3), 736–746. 10.1016/S0008-6363(99)00235-7.
- Kockx, M.M., 1998. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18 (10), 1519–1522. 10.1161/01.atv.18.10.1519.
- Koo, C., Innerarity, T.L., Mahley, R.W., 1985. Obligatory role of cholesterol and apolipoprotein E in the formation of large cholesterol-enriched and receptor-active high density lipoproteins. *The Journal of biological chemistry* 260 (22), 11934–11943.
- Korenman, S.G., Krall, J.F., 1977. The role of cyclic AMP in the regulation of smooth muscle cell contraction in the uterus. *Biology of reproduction* 16 (1), 1–17. 10.1095/biolreprod16.1.1.
- Kothapalli, D., Fuki, I., Ali, K., Stewart, S.A., Zhao, L., Yahil, R., Kwiatkowski, D., Hawthorne, E.A., FitzGerald, G.A., Phillips, M.C., Lund-Katz, S., Puré, E., Rader, D.J., Assoian, R.K., 2004. Antimitogenic effects of HDL and APOE mediated by Cox-2-dependent IP activation. *J Clin Invest* 113 (4), 609–618. 10.1172/JCI19097.
- Köves, K., Arimura, A., Somogyvári-Vigh, A., Vigh, S., Miller, J., 1990. Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* 127 (1), 264–271. 10.1210/endo-127-1-264.
- Kraal, G., Rep, M., Janse, M., 1987. Macrophages in T and B cell compartments and other tissue macrophages recognized by monoclonal antibody MOMA-2. *An*

- immunohistochemical study. *Scandinavian journal of immunology* 26 (6), 653–661.
10.1111/j.1365-3083.1987.tb02301.x.
- Krebs, J., 1998. The role of calcium in apoptosis. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 11 (4), 375–382.
10.1023/a:1009226316146.
- Krieger, M., 1999. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annual review of biochemistry* 68, 523–558.
10.1146/annurev.biochem.68.1.523.
- Kuipers, F., Jong, M.C., Lin, Y., Eck, M., Havinga, R., Bloks, V., Verkade, H.J., Hofker, M.H., Moshage, H., Berkel, T.J., Vonk, R.J., Havekes, L.M., 1997. Impaired secretion of very low density lipoprotein-triglycerides by apolipoprotein E- deficient mouse hepatocytes. *J Clin Invest* 100 (11), 2915–2922. 10.1172/JCI119841.
- Laburthe, M., Couvineau, A., 2002. Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regulatory peptides* 108 (2-3), 165–173. 10.1016/S0167-0115(02)00099-X.
- Laburthe, M., Couvineau, A., Tan, V., 2007. Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: Structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 28 (9), 1631–1639.
10.1016/j.peptides.2007.04.026.
- Lahiri, D.K., Sambamurti, K., Bennett, D.A., 2004. Apolipoprotein gene and its interaction with the environmentally driven risk factors: molecular, genetic and epidemiological studies of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 25 (5), 651–660.
10.1016/j.neurobiolaging.2003.12.024.
- Lamperti, E.D., Rosen, K.M., Villa-Komaroff, L., 1991. Characterization of the gene and messages for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat and mouse. *Molecular Brain Research* 9 (3), 217–231. 10.1016/0169-328X(91)90005-I.
- Larsen, N.J., Womack, J.E., Kirkpatrick, B.W., 1996. Seven genes from human chromosome 18 map to chromosome 24 in the bovine. *Cytogenetics and cell genetics* 73 (3), 184–186.
10.1159/000134335.
- Laskin, D.L., Pendino, K.J., 1995. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annual review of pharmacology and toxicology* 35, 655–677.
10.1146/annurev.pa.35.040195.003255.
- Lee, J.K., Bettencourt, R., Brenner, D., Le, T.-A., Barrett-Connor, E., Loomba, R., 2012. Association between serum interleukin-6 concentrations and mortality in older adults: the Rancho Bernardo study. *PloS one* 7 (4), e34218. 10.1371/journal.pone.0034218.
- Lee, R.T., Libby, P., 1997. The unstable atheroma. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17 (10), 1859–1867. 10.1161/01.atv.17.10.1859.

- Lee, W.-Y., Allison, M.A., Kim, D.-J., Song, C.-H., Barrett-Connor, E., 2007. Association of interleukin-6 and C-reactive protein with subclinical carotid atherosclerosis (the Rancho Bernardo Study). *The American journal of cardiology* 99 (1), 99–102. 10.1016/j.amjcard.2006.07.070.
- Leenen, P.J.M., Bruijn, M.F.T.R. de, Voerman, J.S.A., Campbell, P.A., van Ewijk, W., 1994. Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods* 174 (1-2), 5–19. 10.1016/0022-1759(94)90005-1.
- Leeper, N.J., 2016. The Role of Necroptosis in Atherosclerotic Disease. *JACC: Basic to Translational Science* 1 (6), 548–550. 10.1016/j.jacbts.2016.08.002.
- Lhoták, Š., Gyulay, G., Cutz, J.-C., Al-Hashimi, A., Trigatti, B.L., Richards, C.D., Igdoura, S.A., Steinberg, G.R., Bramson, J., Ask, K., Austin, R.C., 2016. Characterization of Proliferating Lesion-Resident Cells During All Stages of Atherosclerotic Growth. *Journal of the American Heart Association* 5 (8). 10.1161/JAHA.116.003945.
- Libby, P., Ridker, P.M., Hansson, G.K., 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473 (7347), 317–325. 10.1038/nature10146.
- Libeu, C.P., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., Wehrl, S., Hernáiz, M.J., Capila, I., Linhardt, R.J., Raffai, R.L., Newhouse, Y.M., Zhou, F., Weisgraber, K.H., 2001. New insights into the heparan sulfate proteoglycan-binding activity of apolipoprotein E. *The Journal of biological chemistry* 276 (42), 39138–39144. 10.1074/jbc.M104746200.
- Lin, J., Li, H., Yang, M., Ren, J., Huang, Z., Han, F., Huang, J., Ma, J., Zhang, D., Zhang, Z., Wu, J., Huang, D., Qiao, M., Jin, G., Wu, Q., Huang, Y., Du, J., Han, J., 2013. A role of RIP3-mediated macrophage necrosis in atherosclerosis development. *Cell reports* 3 (1), 200–210. 10.1016/j.celrep.2012.12.012.
- Linton, M.F., Fazio, S., 2002. Cyclooxygenase-2 and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* 13 (5), 497–504. 10.1097/00041433-200210000-00005.
- Linton, M.F., Hasty, A.H., Babaev, V.R., Fazio, S., 1998. Hepatic apo E expression is required for remnant lipoprotein clearance in the absence of the low density lipoprotein receptor. *J Clin Invest* 101 (8), 1726–1736. 10.1172/JCI2181.
- Lo Chi-Wei, Chang, S.-L., Weng, C.-F., 2007. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) regulates the expression of PACAP in cultured tilapia astrocytes. *Experimental Biology and Medicine* 232 (2), 262–276.
- Lund-Katz, S., Phillips, M.C., 2010. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. *Sub-cellular biochemistry* 51, 183–227. 10.1007/978-90-481-8622-8_7.

- Lund-Katz, S., Zaiou, M., Wehrli, S., Dhanasekaran, P., Baldwin, F., Weisgraber, K.H., Phillips, M.C., 2000. Effects of lipid interaction on the lysine microenvironments in apolipoprotein E. *The Journal of biological chemistry* 275 (44), 34459–34464. 10.1074/jbc.M005265200.
- Lutz, E.M., Shen, S., Mackay, M., West, K., Harmar, A.J., 1999. Structure of the human VIPR2 gene for vasoactive intestinal peptide receptor type 2. *FEBS Letters* 458 (2), 197–203. 10.1016/s0014-5793(99)01135-7.
- Lutz, E.M., Sheward, W.J., West, K.M., Morrow, J.A., Fink, G., Harmar, A.J., 1993. The VIP 2 receptor: Molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Letters* 334 (1), 3–8. 10.1016/0014-5793(93)81668-P.
- M Kinoshita, H Arai, M Fukasawa, T Watanabe, K Tsukamoto, Y Hashimoto, K Inoue, K Kurokawa, T Teramoto, 1993. Apolipoprotein E enhances lipid exchange between lipoproteins mediated by cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid Res.* 34 (2), 261–268.
- Mackay, M., Fantès, J., Scherer, S., Boyle, S., West, K., Tsui, L.C., Belloni, E., Lutz, E., van Heyningen, V., Harmar, A.J., 1996. Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. *Genomics* 37 (3), 345–353. 10.1006/geno.1996.0569.
- Mahley, R.W., 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science (New York, N.Y.)* 240 (4852), 622–630. 10.1126/science.3283935.
- Mahley, R.W., Huang, Y., 1999. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Current opinion in lipidology* 10 (3), 207–217. 10.1097/00041433-199906000-00003.
- Mahley, R.W., Innerarity, T.L., 1983. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochimica et biophysica acta* 737 (2), 197–222. 10.1016/0304-4157(83)90001-1.
- Mahley, R.W., Rall, S.C., 2000. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annual review of genomics and human genetics* 1, 507–537. 10.1146/annurev.genom.1.1.507.
- Mahley, R.W., Zhong-Sheng Ji, 1999. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* 40 (1), 1–16.
- Mahmud, A., Feely, J., 2005. Arterial stiffness is related to systemic inflammation in essential hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 46 (5), 1118–1122. 10.1161/01.HYP.0000185463.27209.b0.
- Mallat, Z., Tedgui, A., 2000. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *British journal of pharmacology* 130 (5), 947–962. 10.1038/sj.bjp.0703407.
- Mallat, Z., Tedgui, A., 2001. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circulation research* 88 (10), 998–1003. 10.1161/hh1001.090571.

- Mansbach, C.M., Siddiqi, S.A., 2010. The Biogenesis of Chylomicrons. *Annual review of physiology* 72, 315–333. 10.1146/annurev-physiol-021909-135801.
- Marcil, V., Delvin, E., Seidman, E., Poitras, L., Zoltowska, M., Garofalo, C., Levy, E., 2002. Modulation of lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis, and lipoprotein assembly by butyrate. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 283 (2), G340-6. 10.1152/ajpgi.00440.2001.
- Martinez, C., Delgado, M., Gomariz, R.P., Ganea, D., 1996. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-38 inhibit IL-10 production in murine T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 156 (11), 4128–4136.
- Martinez, C., Delgado, M., Pozo, D., Leceta, J., Calvo, J.R., Ganea, D., Gomariz, R.P., 1998. VIP and PACAP enhance IL-6 release and mRNA levels in resting peritoneal macrophages: in vitro and in vivo studies¹The first two authors have contributed equally to the present work.¹ *Journal of Neuroimmunology* 85 (2), 155–167. 10.1016/S0165-5728(98)00018-6.
- Martínez, C., Delgado, M., Pozo, D., Leceta, J., Calvo, J.R., Ganea, D., Gomariz, R.P., 1998. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages. *Journal of leukocyte biology* 63 (5), 591–601. 10.1002/jlb.63.5.591.
- Martínez-Fuentes, A.J., Castaño, J.P., Gracia-Navarro, F., Malagón, M.M., 1998. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP27 activate common and distinct intracellular signaling pathways to stimulate growth hormone secretion from porcine somatotropes. *Endocrinology* 139 (12), 5116–5124. 10.1210/endo.139.12.6340.
- May, V., Parsons, R.L., 2017. G Protein-Coupled Receptor Endosomal Signaling and Regulation of Neuronal Excitability and Stress Responses: Signaling Options and Lessons From the PAC1 Receptor. *Journal of cellular physiology* 232 (4), 698–706. 10.1002/jcp.25615.
- Mei, Y.A., 1999. High-voltage-activated calcium current and its modulation by dopamine D4 and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptors in cerebellar granule cells. *Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica* 20 (1), 3–9.
- Memon, R.A., 1993. Tumor necrosis factor mediates the effects of endotoxin on cholesterol and triglyceride metabolism in mice. *Endocrinology* 132 (5), 2246–2253. 10.1210/en.132.5.2246.
- Merriam, L.A., Baran, C.N., Girard, B.M., Hardwick, J.C., May, V., Parsons, R.L., 2013. Pituitary adenylate cyclase 1 receptor internalization and endosomal signaling mediate the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-induced increase in guinea pig cardiac neuron excitability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (10), 4614–4622. 10.1523/JNEUROSCI.4999-12.2013.

- Miller, N.E., 1979. Plasma lipoproteins, lipid transport, and atherosclerosis: recent developments. *Journal of clinical pathology* 32 (7), 639–650. 10.1136/jcp.32.7.639.
- Mirfendereski, S., Tobin, G., Håkanson, R., Ekström, J., 1997. Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in salivary glands of the rat: origin, and secretory and vascular effects. *Acta physiologica Scandinavica* 160 (1), 15–22. 10.1046/j.1365-201X.1997.00010.x.
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R.R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M.D., Coy, D.H., 1989. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and biophysical research communications* 164 (1), 567–574. 10.1016/0006-291X(89)91757-9.
- Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R.D., Kitada, C., Kubo, K., Fujino, M., Minamino, N., Arimura, A., 1990. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochemical and biophysical research communications* 170 (2), 643–648. 10.1016/0006-291X(90)92140-U.
- Miyata, A., Sato, K., Hino, J., Tamakawa, H., Matsuo, H., Kangawa, K., 1998. Rat aortic smooth-muscle cell proliferation is bidirectionally regulated in a cell cycle-dependent manner via PACAP/VIP type 2 receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 865, 73–81. 10.1111/j.1749-6632.1998.tb11165.x.
- Miyata, M., Smith, J.D., 1996. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nature genetics* 14 (1), 55–61. 10.1038/ng0996-55.
- Mizuno, Y., Kondo, K., Terashima, Y., Arima, H., Murase, T., Oiso, Y., 1998. Anorectic effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rats: lack of evidence for involvement of hypothalamic neuropeptide gene expression. *Journal of neuroendocrinology* 10 (8), 611–616. 10.1046/j.1365-2826.1998.00244.x.
- Moore, K.J., Sheedy, F.J., Fisher, E.A., 2013. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature reviews. Immunology* 13 (10), 709–721. 10.1038/nri3520.
- Morel, D.W., Hessler, J.R., Chisolm, G.M., 1983. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *Journal of lipid research* 24 (8), 1070–1076.
- Morley, J.E., Horowitz, M., Morley, P.M.K., Flood, J.F., 1992. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) reduces food intake in mice. *Peptides* 13 (6), 1133–1135. 10.1016/0196-9781(92)90019-Y.
- Morrow, J.A., Arnold, K.S., Dong, J., Balestra, M.E., Innerarity, T.L., Weisgraber, K.H., 2000. Effect of arginine 172 on the binding of apolipoprotein E to the low density lipoprotein receptor. *The Journal of biological chemistry* 275 (4), 2576–2580. 10.1074/jbc.275.4.2576.

- Mulder, M., Lombardi, P., Jansen, H., van Berkel, T.J., Frants, R.R., Havekes, L.M., 1992. Heparan sulphate proteoglycans are involved in the lipoprotein lipase-mediated enhancement of the cellular binding of very low density and low density lipoproteins. *Biochemical and biophysical research communications* 185 (2), 582–587. 10.1016/0006-291x(92)91664-c.
- Mulvihill, E.R., Jaeger, J., Sengupta, R., Ruzzo, W.L., Reimer, C., Lukito, S., Schwartz, S.M., 2004. Atherosclerotic plaque smooth muscle cells have a distinct phenotype. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24 (7), 1283–1289. 10.1161/01.ATV.0000132401.12275.0c.
- Mulya, A., Lee, J.Y., Gebre, A.K., Boudyguina, E.Y., Chung, S.K., Smith, T.L., Colvin, P.L., Jiang, X.C., Parks, J.S., 2008. Initial interaction of apoA-I with ABCA1 impacts in vivo metabolic fate of nascent HDL. *Journal of lipid research* 49 (11). 10.1194/jlr.M800241-JLR200.
- Murao, K., Terpstra, V., Green, S.R., Kondratenko, N., Steinberg, D., Quehenberger, O., 1997. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *The Journal of biological chemistry* 272 (28), 17551–17557. 10.1074/jbc.272.28.17551.
- Murphy, A.J., Tall, A.R., 2014. Proliferating macrophages populate established atherosclerotic lesions. *Circulation research* 114 (2), 236–238. 10.1161/CIRCRESAHA.113.302813.
- Myant, N.B., 1982. Cholesterol transport through the plasma. *Clinical science (London, England : 1979)* 62 (3), 261–271. 10.1042/cs0620261.
- Nandha, K.A., Benito-Orfila, M.A., Smith, D.M., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 1991a. Action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on the rat vascular system: effects on blood pressure and receptor binding. *The Journal of endocrinology* 129 (1), 69–73. 10.1677/joe.0.1290069.
- Nandha, K.A., Benito-Orfila, M.A., Smith, D.M., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 1991b. Action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on the rat vascular system: effects on blood pressure and receptor binding. *The Journal of endocrinology* 129 (1), 69–73.
- Naruse, S., Suzuki, T., Ozaki, T., Nokihara, K., 1993. Vasodilator effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on femoral blood flow in dogs. *Peptides* 14 (3), 505–510. 10.1016/0196-9781(93)90139-8.
- Naserian, S., Abdelgawad, M.E., Afshar Bakshloo, M., Ha, G., Arouche, N., Cohen, J.L., Salomon, B.L., Uzan, G., 2020. The TNF/TNFR2 signaling pathway is a key regulatory factor in endothelial progenitor cell immunosuppressive effect. *Cell Commun Signal* 18 (1), 1–14. 10.1186/s12964-020-00564-3.

- Navab, M., Berliner, J.A., Watson, A.D., Hama, S.Y., Territo, M.C., Lusis, A.J., Shih, D.M., van Lenten, B.J., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Fogelman, A.M., 1996. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 16 (7), 831–842. 10.1161/01.atv.16.7.831.
- Neumann, F.J., Ott, I., Marx, N., Luther, T., Kenngott, S., Gawaz, M., Kotzsch, M., Schömig, A., 1997. Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17 (12), 3399–3405. 10.1161/01.atv.17.12.3399.
- Nguyen, T.D., Heintz, G.G., Wolfe, M.S., 1993. Structural characterization of PACAP receptors on rat liver plasma membranes. *The American journal of physiology* 265 (5 Pt 1), G811-8. 10.1152/ajpgi.1993.265.5.G811.
- Nicholson, D.W., Thornberry, N.A., 1997. Caspases: killer proteases. *Trends in biochemical sciences* 22 (8), 299–306. 10.1016/S0968-0004(97)01085-2.
- Oberoi, R., Vlacil, A.-K., Schuett, J., Schösser, F., Schuett, H., Tietge, U.J.F., Schieffer, B., Grote, K., 2018. Anti-tumor necrosis factor- α therapy increases plaque burden in a mouse model of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 277, 80–89. 10.1016/j.atherosclerosis.2018.08.030.
- Ohkubo, S., Kimura, C., Ogi, K., Okazaki, K., Hosoya, M., Onda, H., Miyata, A., Arimura, A., Fujino, M., 1992. Primary structure and characterization of the precursor to human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *DNA and cell biology* 11 (1), 21–30. 10.1089/dna.1992.11.21.
- Oiso, Y., Kotoyori, J., Murase, T., Ito, Y., Kozawa, O., 1993. Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on vasopressin-induced proliferation of aortic smooth muscle cells: comparison with vasoactive intestinal polypeptide. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 71 (3-4), 156–161. 10.1139/o93-025.
- Okazaki, K., Kimura, C., Kosaka, T., Watanabe, T., Ohkubo, S., Ogi, K., Kitada, C., Onda, H., Fujino, M., 1992. Expression of human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) cDNA in CHO cells and characterization of the products. *FEBS Letters* 298 (1), 49–56. 10.1016/0014-5793(92)80020-H.
- Oram, J.F., Vaughan, A.M., 2006. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circulation research* 99 (10), 1031–1043. 10.1161/01.RES.0000250171.54048.5c.
- Orehhov, A.N., R. Andreeva, E., Mikhailova, I.A., Gordon, D., 1998. Cell proliferation in normal and atherosclerotic human aorta: proliferative splash in lipid-rich lesions. *Atherosclerosis* 139 (1), 41–48. 10.1016/S0021-9150(98)00044-6.

- Orozco, S.L., Daniels, B.P., Yatim, N., Messmer, M.N., Quarato, G., Chen-Harris, H., Cullen, S.P., Snyder, A.G., Ralli-Jain, P., Frase, S., Tait, S.W.G., Green, D.R., Albert, M.L., Oberst, A., 2019. RIPK3 Activation Leads to Cytokine Synthesis that Continues after Loss of Cell Membrane Integrity. *Cell reports* 28 (9), 2275-2287.e5. 10.1016/j.celrep.2019.07.077.
- Otto, C., Hein, L., Brede, M., Jahns, R., Engelhardt, S., Gröne, H.-J., Schütz, G., 2004. Pulmonary hypertension and right heart failure in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *Circulation* 110 (20), 3245–3251. 10.1161/01.CIR.0000147235.53360.59.
- Owens, G.K., Kumar, M.S., Wamhoff, B.R., 2004. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews* 84 (3), 767–801. 10.1152/physrev.00041.2003.
- Palinski, W., Ord, V.A., Plump, A.S., Breslow, J.L., Steinberg, D., Witztum, J.L., 1994. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 14 (4), 605–616. 10.1161/01.atv.14.4.605.
- Pan, X., Hussain, M.M., 2012. Gut triglyceride production. *Biochimica et biophysica acta* 1821 (5), 727–735. 10.1016/j.bbailip.2011.09.013.
- Papageorgiou, N., Zacharia, E., Briasoulis, A., Charakida, M., Tousoulis, D., 2016. Celecoxib for the treatment of atherosclerosis. *Expert opinion on investigational drugs* 25 (5), 619–633. 10.1517/13543784.2016.1161756.
- Pauw, M. de, Vanloo, B., Weisgraber, K., Rosseneu, M., 1995. Comparison of lipid-binding and lecithin:cholesterol acyltransferase activation of the amino- and carboxyl-terminal domains of human apolipoprotein E3. *Biochemistry* 34 (34), 10953–10966. 10.1021/bi00034a030.
- Pei, L., 1997. Genomic structure and embryonic expression of the rat type 1 vasoactive intestinal polypeptide receptor gene. *Regulatory peptides* 71 (3), 153–161. 10.1016/S0167-0115(97)01012-4.
- Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B., Goeddel, D.V., 1984. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312 (5996), 724–729. 10.1038/312724a0.
- Perisic, M.L., Rykaczewska, U., Razuvaev, A., Sabater-Lleal, M., Lengquist, M., Miller, C.L., Ericsson, I., Röhl, S., Kronqvist, M., Aldi, S., Magné, J., Paloschi, V., Vesterlund, M., Li, Y., Jin, H., Diez, M.G., Roy, J., Baldassarre, D., Veglia, F., Humphries, S.E., de, F.U., Tremoli, E., Odeberg, J., Vukojević, V., Lehtiö, J., Maegdefessel, L., Ehrenborg, E., Paulsson-Berne, G., Hansson, G.K., Lindeman, J.H., Eriksson, P., Quertermous, T., Hamsten, A., Hedin, U., 2016. Phenotypic Modulation of Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis Is Associated With

- Downregulation of LMOD1, SYNPO2, PDLIM7, PLN, and SYNM. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 36 (9). 10.1161/ATVBAHA.116.307893.
- Pierdominici, M., Vomero, M., Barbati, C., Colasanti, T., Maselli, A., Vacirca, D., Giovannetti, A., Malorni, W., Ortona, E., 2012. Role of autophagy in immunity and autoimmunity, with a special focus on systemic lupus erythematosus. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (4), 1400–1412. 10.1096/fj.11-194175.
- Pisegna, J.R., Wank, S.A., 1993. Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (13), 6345–6349. 10.1073/pnas.90.13.6345.
- Pisegna, J.R., Wank, S.A., 1996. Cloning and characterization of the signal transduction of four splice variants of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor. Evidence for dual coupling to adenylate cyclase and phospholipase C. *The Journal of biological chemistry* 271 (29), 17267–17274. 10.1074/jbc.271.29.17267.
- Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M., Breslow, J.L., 1992. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71 (2), 343–353. 10.1016/0092-8674(92)90362-G.
- Popa, C., Netea, M.G., van Riel, P.L.C.M., van der Meer, J.W.M., Stalenhoef, A.F.H., 2007. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of lipid research* 48 (4), 751–762. 10.1194/jlr.R600021-JLR200.
- Pradhan, A.D., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E., Ridker, P.M., 2001. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286 (3), 327–334. 10.1001/jama.286.3.327.
- Rácz, B., Gasz, B., Borsiczky, B., Gallyas, F., Tamás, A., Józsa, R., Lubics, A., Kiss, P., Roth, E., Ferencz, A., Tóth, G., Hegyi, O., Wittmann, I., Lengvári, I., Somogyvári-Vigh, A., Reglodi, D., 2007. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *General and comparative endocrinology* 153 (1-3), 115–123. 10.1016/j.ygcen.2006.12.006.
- Rajamäki, K., Lappalainen, J., Öörni, K., Välimäki, E., Matikainen, S., Kovanen, P.T., Eklund, K.K., 2010. Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation. *PloS one* 5 (7). 10.1371/journal.pone.0011765.
- Rall, S.C., Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., Mahley, R.W., 1982a. Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 79 (15), 4696–4700.
- Rall, S.C., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., 1982b. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *The Journal of biological chemistry* 257 (8), 4171–4178.
- Ramasamy, I., 2014. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 52 (12), 1695–1727. 10.1515/cclm-2013-0358.
- Rasbach, E., Splittthoff, P., Bonaterra, G.A., Schwarz, A., Mey, L., Schwarzbach, H., Eiden, L.E., Weihe, E., Kinscherf, R., 2019. PACAP deficiency aggravates atherosclerosis in ApoE deficient mice. *Immunobiology* 224 (1), 124–132. 10.1016/j.imbio.2018.09.008.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R., 2016. *Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Raussens, V., Slupsky, C.M., Sykes, B.D., Ryan, R.O., 2003. Lipid-bound structure of an apolipoprotein E-derived peptide. *The Journal of biological chemistry* 278 (28), 25998–26006. 10.1074/jbc.M301753200.
- Razani, B., Feng, C., Coleman, T., Emanuel, R., Wen, H., Hwang, S., Ting, J.P., Virgin, H.W., Kastan, M.B., Semenkovich, C.F., 2012. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. *Cell metabolism* 15 (4), 534–544. 10.1016/j.cmet.2012.02.011.
- Reiss, A.B., Siegart, N.M., Leon, J. de, 2017. Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective? *Clinical Lipidology* 12 (1), 14–23. 10.1080/17584299.2017.1319787.
- Resch, J.M., Boisvert, J.P., Hourigan, A.E., Mueller, C.R., Yi, S.S., Choi, S., 2011. Stimulation of the hypothalamic ventromedial nuclei by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces hypophagia and thermogenesis. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 301 (6), R1625-34. 10.1152/ajpregu.00334.2011.
- Reubi, J.C., 2000. In vitro evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues. Clinical implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 921, 1–25. 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06946.x.
- Ridker, P.M., 2016. From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream To Identify Novel Targets for Atheroprotection. *Circulation research* 118 (1), 145–156. 10.1161/CIRCRESAHA.115.306656.
- Robberecht, P., Woussen-Colle, M.-C., Neef, P. de, Gourlet, P., Buscail, L., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M.-C., Christophe, J., 1991. The two forms of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP (1–27) and PACAP (1–38)) interact with distinct receptors on rat pancreatic AR 4-2J cell membranes. *FEBS Letters* 286 (1), 133–136. 10.1016/0014-5793(91)80958-6.

- Robbins, C.S., Hilgendorf, I., Weber, G.F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J.-L., Gorbatov, R., Sukhova, G.K., Gerhardt, L.M.S., Smyth, D., Zavitz, C.C.J., Shikatani, E.A., Parsons, M., van Rooijen, N., Lin, H.Y., Husain, M., Libby, P., Nahrendorf, M., Weissleder, R., Swirski, F.K., 2013. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nature medicine* 19 (9), 1166–1172. 10.1038/nm.3258.
- Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G., Mantovani, A., 1997. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6 (3), 315–325. 10.1016/s1074-7613(00)80334-9.
- Rong-Jie Yu, Ling Zhang, Tian-Hong Yi, Shan-Shan Xie, Yun Dai, 2009. In vivo anti-obesity effect of the agonist for receptor VPAC1. *Sheng li xue bao: [Acta physiologica Sinica]* 60 (6), 751–758.
- Rosenfeld, M.E., Butler, S., Ord, V.A., Lipton, B.A., Dyer, C.A., Curtiss, L.K., Palinski, W., Witztum, J.L., 1993. Abundant expression of apoprotein E by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb* 13 (9), 1382–1389. 10.1161/01.ATV.13.9.1382.
- Ross, R., 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362 (6423), 801–809. 10.1038/362801a0.
- Ross, R., 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* 340 (2), 115–126. 10.1056/NEJM199901143400207.
- Ross-Ascuitto, N.T., Ascuitto, R.J., Ramage, D., Kydon, D.W., Coy, D.H., Kadowitz, P.J., 1993. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a neuropeptide with potent inotropic and coronary vasodilatory effects in neonatal pig hearts. *Pediatric research* 34 (3), 323–328. 10.1203/00006450-199309000-00017.
- Roth, E., Wéber, G., Kiss, P., Horváth, G., Tóth, G., Gasz, B., Ferencz, A., Gallyas, F., Reglodi, D., Rácz, B., 2009. Effects of PACAP and preconditioning against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1163, 512–516. 10.1111/j.1749-6632.2008.03635.x.
- Rye, K.-A., Barter, P.J., 2004. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24 (3), 421–428. 10.1161/01.ATV.0000104029.74961.f5.
- Saito, H., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., 2004. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Progress in lipid research* 43 (4), 350–380. 10.1016/j.plipres.2004.05.002.

- Santiago, J., Kadowitz, P.J., 1993. Analysis of responses to pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in the feline hindquarters vascular bed. *European Journal of Pharmacology* 243 (3), 291–294. 10.1016/0014-2999(93)90188-N.
- Schaefer, E.J., Gregg, R.E., Ghiselli, G., Forte, T.M., Ordovas, J.M., Zech, L.A., Brewer, H.B., 1986. Familial apolipoprotein E deficiency. *The Journal of clinical investigation* 78 (5), 1206–1219. 10.1172/JCI112704.
- Schildmeyer, L.A., Braun, R., Taffet, G., Debiassi, M., Burns, A.E., Bradley, A., Schwartz, R.J., 2000. Impaired vascular contractility and blood pressure homeostasis in the smooth muscle alpha-actin null mouse. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (14), 2213–2220. 10.1096/fj.99-0927com.
- Schmidt-Choudhury, A., Furuta, G.T., Galli, S.J., Schmidt, W.E., Wershil, B.K., 1999a. Mast cells contribute to PACAP-induced dermal oedema in mice. *Regulatory peptides* 82 (1-3), 65–69. 10.1016/S0167-0115(99)00041-5.
- Schmidt-Choudhury, A., Meißner, J., Seebeck, J., Goetzl, E.J., Xia, M., Galli, S.J., Schmidt, W.E., Schaub, J., Wershil, B.K., 1999b. Stem cell factor influences neuro-immune interactions: The response of mast cells to pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is altered by stem cell factor. *Regulatory peptides* 83 (2-3), 73–80. 10.1016/S0167-0115(99)00054-3.
- Schönbeck, U., Sukhova, G.K., Graber, P., Coulter, S., Libby, P., 1999. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *The American Journal of Pathology* 155 (4). 10.1016/S0002-9440(10)65230-3.
- Schreyer, S.A., Peschon, J.J., LeBoeuf, R.C., 1996. Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumor necrosis factor receptor p55. *The Journal of biological chemistry* 271 (42), 26174–26178. 10.1074/jbc.271.42.26174.
- Schwartz, S.M., deBlois, D., O'Brien, E.R., 1995. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circulation research* 77 (3), 445–465. 10.1161/01.res.77.3.445.
- Segrest, J.P., Jones, M.K., Loof, H. de, Brouillette, C.G., Venkatachalapathi, Y.V., Anantharamaiah, G.M., 1992. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *Journal of lipid research* 33 (2), 141–166.
- Seidah, N.G., Chrétien, M., Day, R., 1994. The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: Divergent or shared functions. *Biochimie* 76 (3-4), 197–209. 10.1016/0300-9084(94)90147-3.
- Seidah, N.G., Day, R., Marcinkiewicz, M., Chrétien, M., 1998. Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 839, 9–24. 10.1111/j.1749-6632.1998.tb10727.x.

- Shachter, N.S., 2001. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Current opinion in lipidology* 12 (3), 297–304. 10.1097/00041433-200106000-00009.
- Shankman, L.S., Gomez, D., Cherepanova, O.A., Salmon, M., Alencar, G.F., Haskins, R.M., Swiatlowska, P., Newman, A.A.C., Greene, E.S., Straub, A.C., Isakson, B., Randolph, G.J., Owens, G.K., 2015. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nature medicine* 21 (6), 628–637. 10.1038/nm.3866.
- Shao, B.-z., Han, B.-z., Zeng, Y.-x., Su, D.-f., Liu, C., 2016. The roles of macrophage autophagy in atherosclerosis. *Acta pharmacologica Sinica* 37 (2), 150–156. 10.1038/aps.2015.87.
- Shioda, S., Shuto, Y., Somogyvári-Vigh, A., Legradi, G., Onda, H., Coy, D.H., Nakajo, S., Arimura, A., 1997. Localization and gene expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat brain. *Neuroscience Research* 28 (4), 345–354. 10.1016/S0168-0102(97)00065-5.
- Shivers, B.D., Göröcs, T.J., Gottschall, P.E., Arimura, A., 1991. Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distributions. *Endocrinology* 128 (6), 3055–3065. 10.1210/endo-128-6-3055.
- Shore, V.G., Shore, B., 1973. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 12 (3), 502–507. 10.1021/bi00727a022.
- Siddiqi, S., Saleem, U., Abumrad, N.A., Davidson, N.O., Storch, J., Siddiqi, S.A., Mansbach, C.M., 2010. A novel multiprotein complex is required to generate the prechylomicron transport vesicle from intestinal ERS. *Journal of lipid research* 51 (7), 1918–1928. 10.1194/jlr.M005611.
- Skak, K., Michelsen, B.K., 1999. The TATA-less rat GAD65 promoter can be activated by Sp1 through non-consensus elements. *Gene* 236 (2), 231–241. 10.1016/S0378-1119(99)00286-3.
- Skoog, T., Dichtl, W., Boquist, S., Skoglund-Andersson, C., Karpe, F., Tang, R., Bond, M.G., Faire, U. de, Nilsson, J., Eriksson, P., Hamsten, A., 2002. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *European heart journal* 23 (5), 376–383. 10.1053/euhj.2001.2805.
- Soares, M.B., Titus, R.G., Shoemaker, C.B., David, J.R., Bozza, M., 1998. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160 (4), 1811–1816.

- Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P.H., Journot, L., 1993. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365 (6442), 170–175. 10.1038/365170a0.
- Splitthoff, P., Rasbach, E., Neudert, P., Bonaterra, G.A., Schwarz, A., Mey, L., Schwarzbach, H., Eiden, L.E., Weihe, E., Kinscherf, R., 2020. PAC1 deficiency attenuates progression of atherosclerosis in ApoE deficient mice under cholesterol-enriched diet. *Immunobiology*, 151930. 10.1016/j.imbio.2020.151930.
- Sreedharan, S.P., Huang, J.X., Cheung, M.C., Goetzi, E.J., 1995. Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (7), 2939–2943. 10.1073/pnas.92.7.2939.
- Sreedharan, S.P., Patel, D.R., Huang, J.X., Goetzi, E.J., 1993. Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 193 (2), 546–553. 10.1006/bbrc.1993.1658.
- Steenstrup, B.R., Jørgensen, J.C., Alm, P., Hannibal, J., Junge, J., Fahrenkrug, J., Ottesen, B., 1996. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): occurrence and vasodilatory effect in the human uteroplacental unit. *Regulatory peptides* 61 (3), 197–204. 10.1016/0167-0115(95)00156-5.
- Steer, M.L., 1976. Cyclic AMP. *Annals of surgery* 184 (1), 107–115. 10.1097/00000658-197607000-00018.
- Steinberg, D., 1997. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *The Journal of biological chemistry* 272 (34), 20963–20966. 10.1074/jbc.272.34.20963.
- Stoffel, M., Espinosa, R., Trabb, J.B., Le Beau, M.M., Bell, G.I., 1994. Human type I pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor (ADCYAP1R): localization to chromosome band 7p14 and integration into the cytogenetic, physical, and genetic map of chromosome 7. *Genomics* 23 (3), 697–699. 10.1006/geno.1994.1560.
- Stoneman, V., Braganza, D., Figg, N., Mercer, J., Lang, R., Goddard, M., Bennett, M., 2007. Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques. *Circulation research* 100 (6), 884–893. 10.1161/01.RES.0000260802.75766.00.
- Stoneman, V.E.A., Bennett, M.R., 2004. Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications. *Clinical science (London, England : 1979)* 107 (4), 343–354. 10.1042/CS20040086.
- Suzuki, N., Harada, M., Hosoya, M., Fujino, M., 1994. Enhanced production of pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide by 1, N6-dibutyryl-adenosine 3',5'-monophosphate, phorbol 12-myristate 13-acetate and by the polypeptide itself in human neuroblastoma cells,

- IMR-32. *European journal of biochemistry* 223 (1), 147–153. 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18976.x.
- Svoboda, M., Tastenoy, M., van Rampelbergh, J., Goossens, J.F., Neef, P. de, Waelbroeck, M., Robberecht, P., 1994. Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 205 (3), 1617–1624. 10.1006/bbrc.1994.2852.
- Swertfeger, D.K., Hui, D.Y., 2001. Apolipoprotein E receptor binding versus heparan sulfate proteoglycan binding in its regulation of smooth muscle cell migration and proliferation. *The Journal of biological chemistry* 276 (27), 25043–25048. 10.1074/jbc.M102357200.
- Tabas, I., 2010. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature reviews. Immunology* 10 (1). 10.1038/nri2675.
- Tabas, I., Williams, K.J., Borén, J., 2007. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* 116 (16), 1832–1844. 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890.
- Takasaki, I., Nakamura, K., Shimodaira, A., Watanabe, A., Du Nguyen, H., Okada, T., Toyooka, N., Miyata, A., Kurihara, T., 2019. The novel small-molecule antagonist of PAC1 receptor attenuates formalin-induced inflammatory pain behaviors in mice. *Journal of Pharmacological Sciences* 139 (2), 129–132. 10.1016/j.jphs.2018.11.011.
- Tanaka, T., Narazaki, M., Masuda, K., Kishimoto, T., 2016. Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Advances in experimental medicine and biology* 941. 10.1007/978-94-024-0921-5_4.
- Tanida, I., 2011. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxidants & redox signaling* 14 (11), 2201–2214. 10.1089/ars.2010.3482.
- Tatsuno, I., Gottschall, P.E., Köves, K., Arimura, A., 1990. Demonstration of specific binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rat astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 168 (3), 1027–1033. 10.1016/0006-291X(90)91132-C.
- Thuren, T., Weisgraber, K.H., Sisson, P., Waite, M., 1992. Role of apolipoprotein E in hepatic lipase catalyzed hydrolysis of phospholipid in high-density lipoproteins. *Biochemistry* 31 (8), 2332–2338. 10.1021/bi00123a018.
- Timmins, J.M., Lee, J.-Y., Boudyguina, E., Kluckman, K.D., Brunham, L.R., Mulya, A., Gebre, A.K., Coutinho, J.M., Colvin, P.L., Smith, T.L., Hayden, M.R., Maeda, N., Parks, J.S., 2005. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *The Journal of clinical investigation* 115 (5), 1333–1342. 10.1172/JCI23915.

- Tong, S., Parfenova, H., Shibata, M., Zuckerman, S., Armstead, W.M., Leffler, C.W., 1993. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide dilates cerebral arterioles of newborn pigs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 203 (3), 343–347. 10.3181/00379727-203-43609.
- Toth, P. P., 2003. Reverse cholesterol transport: High-density lipoprotein's magnificent mile. *Curr Atheroscler Rep* 5 (5), 386–393. 10.1007/s11883-003-0010-5.
- van der Wal, A.C., Das, P.K., van de Bentz Berg, D., van der Loos, C.M., Becker, A.E., 1989. Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 61 (2), 166–170.
- van Eck, M., Herijgers, N., Vidgeon-Hart, M., Pearce, N.J., Hoogerbrugge, P.M., Groot, P.H.E., van Berkel, T.J.C., 2000. Accelerated atherosclerosis in C57Bl/6 mice transplanted with ApoE-deficient bone marrow. *Atherosclerosis* 150 (1), 71–80. 10.1016/S0021-9150(99)00372-X.
- van Vré, E.A., Ait-Oufella, H., Tedgui, A., Mallat, Z., 2012. Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32 (4), 887–893. 10.1161/ATVBAHA.111.224873.
- Vandekerckhove, J., Weber, K., 1979. The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle. A protein-chemical analysis of muscle actin differentiation. *Differentiation; research in biological diversity* 14 (3), 123–133. 10.1111/j.1432-0436.1979.tb01021.x.
- Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., 2012. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell death and differentiation* 19 (1), 75–86. 10.1038/cdd.2011.164.
- Vaudry, D., Basille, M., Anouar, Y., Fournier, A., Vaudry, H., Gonzalez, B.J., 1998a. The neurotrophic activity of PACAP on rat cerebellar granule cells is associated with activation of the protein kinase A pathway and c-fos gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 865, 92–99. 10.1111/j.1749-6632.1998.tb11167.x.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B.K.C., Hashimoto, H., Galas, L., Vaudry, H., 2009. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological reviews* 61 (3), 283–357. 10.1124/pr.109.001370.
- Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Anouar, Y., Fournier, A., Vaudry, H., 1998b. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates both c-fos gene expression and cell survival in rat cerebellar granule neurons through activation of the protein kinase A pathway. *Neuroscience* 84 (3), 801–812. 10.1016/S0306-4522(97)00545-9.

- Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A., Vaudry, H., 2000. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: From Structure to Functions. *Pharmacological reviews* 52 (2), 269.
- Villalba, M., Bockaert, J., Journot, L., 1997. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (1), 83–90.
- Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Farb, A., Schwartz, S.M., 2000. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20 (5), 1262–1275. 10.1161/01.atv.20.5.1262.
- Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Finn, A.V., Gold, H.K., Tulenko, T.N., Wrenn, S.P., Narula, J., 2005. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25 (10), 2054–2061. 10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18.
- Vu, J.P., Goyal, D., Luong, L., Oh, S., Sandhu, R., Norris, J., Parsons, W., Pisegna, J.R., Germano, P.M., 2015. PACAP intraperitoneal treatment suppresses appetite and food intake via PAC1 receptor in mice by inhibiting ghrelin and increasing GLP-1 and leptin. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 309 (10), G816-25. 10.1152/ajpgi.00190.2015.
- Wang, H.-Y., Jiang, X., Gozes, I., Fridkin, M., Brenneman, D.E., Ganea, D., 1999. Vasoactive intestinal peptide inhibits cytokine production in T lymphocytes through cAMP-dependent and cAMP-independent mechanisms. *Regulatory peptides* 84 (1-3), 55–67. 10.1016/S0167-0115(99)00068-3.
- Warren, J.B., Cockcroft, J.R., Larkin, S.W., Kajekar, R., Macrae, A., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 1992a. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is a potent vasodilator in humans. *Journal of cardiovascular pharmacology* 20 (1), 83–87.
- Warren, J.B., Larkin, S.W., Coughlan, M., Kajekar, R., Williams, T.J., 1992b. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is a potent vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin in vivo. *British journal of pharmacology* 106 (2), 331–334. 10.1111/j.1476-5381.1992.tb14336.x.
- Wasan, K.M., Brocks, D.R., Lee, S.D., Sachs-Barrable, K., Thornton, S.J., 2008. Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* 7 (1), 84–99. 10.1038/nrd2353.
- Waschek, J.A., 2013. VIP and PACAP: neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair. *British journal of pharmacology* 169 (3), 512–523. 10.1111/bph.12181.

- Watanabe, M., Sangawa, A., Sasaki, Y., Yamashita, M., Tanaka-Shintani, M., Shintaku, M., Ishikawa, Y., 2007. Distribution of inflammatory cells in adventitia changed with advancing atherosclerosis of human coronary artery. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 14 (6), 325–331. 10.5551/jat.e489.
- Wei, Y., Mojsov, S., 1996a. Distribution of GLP-1 and PACAP receptors in human tissues. *Acta physiologica Scandinavica* 157 (3), 355–357. 10.1046/j.1365-201X.1996.42256000.x.
- Wei, Y., Mojsov, S., 1996b. Tissue specific expression of different human receptor types for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide: implications for their role in human physiology. *Journal of neuroendocrinology* 8 (11), 811–817. 10.1046/j.1365-2826.1996.05191.x.
- Weisgraber, K.H., 1994. Apolipoprotein E: Structure-Function Relationships, in: Schumaker, V.N. (Ed.), *Lipoproteins, apolipoproteins, and lipases*, vol. 45. Academic Press, San Diego, pp. 249–302.
- Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., 1980. Subfractionation of human high density lipoproteins by heparin-Sepharose affinity chromatography. *Journal of lipid research* 21 (3), 316–325.
- Werb, Z., Chin, J.R., 1983a. Apoprotein E is synthesized and secreted by resident and thioglycollate-elicited macrophages but not by pyran copolymer- or bacillus Calmette-Guerin-activated macrophages. *The Journal of experimental medicine* 158 (4), 1272–1293. 10.1084/jem.158.4.1272.
- Werb, Z., Chin, J.R., 1983b. Endotoxin suppresses expression of apoprotein E by mouse macrophages in vivo and in culture. A biochemical and genetic study. *The Journal of biological chemistry* 258 (17), 10642–10648.
- Westerlund, J.A., Weisgraber, K.H., 1993. Discrete carboxyl-terminal segments of apolipoprotein E mediate lipoprotein association and protein oligomerization. *The Journal of biological chemistry* 268 (21), 15745–15750.
- Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Rall, S.C., Weisgraber, K.H., 1988. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains. *The Journal of biological chemistry* 263 (13), 6240–6248.
- Whalen, E.J., Johnson, A.K., Lewis, S.J., 1999a. Hemodynamic actions of systemically injected pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-27 in the rat. *European Journal of Pharmacology* 365 (2-3), 205–215. 10.1016/S0014-2999(98)00852-8.
- Whalen, E.J., Johnson, A.K., Lewis, S.J., 1999b. Tachyphylaxis to PACAP-27 after inhibition of NO synthesis: a loss of adenylate cyclase activation. *The American journal of physiology* 277 (5 Pt 2), R1453-61. 10.1152/ajpregu.1999.277.5.r1453.

- Whalen, E.J., Travis, M.D., Johnson, A.K., Lewis, S.J., 1999c. Rapid tachyphylaxis to hemodynamic effects of PACAP-27 after inhibition of nitric oxide synthesis. *The American journal of physiology* 276 (6 Pt 2), H2117-26. 10.1152/ajpheart.1999.276.6.h2117.
- William A. Boisvert, Linda K. Curtiss, 1999. Elimination of macrophage-specific apolipoprotein E reduces diet-induced atherosclerosis in C57BL/6J male mice. *J. Lipid Res.* 40 (5), 806–813.
- Wilson, C., Wardell, M.R., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., Agard, D.A., 1991. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science (New York, N.Y.)* 252 (5014), 1817–1822. 10.1126/science.2063194.
- Wong, A.O., Leung, M.Y., Shea, W.L., Tse, L.Y., Chang, J.P., Chow, B.K., 1998. Hypophysiotropic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the goldfish: immunohistochemical demonstration of PACAP in the pituitary, PACAP stimulation of growth hormone release from pituitary cells, and molecular cloning of pituitary type I PACAP receptor. *Endocrinology* 139 (8), 3465–3479. 10.1210/endo.139.8.6145.
- Wray, V., Kakoschke, C., Nokihara, K., Naruse, S., 1993. Solution structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 32 (22), 5832–5841. 10.1021/bi00073a016.
- Wu, K.K., 1998. Cyclooxygenase-2 induction in congestive heart failure: friend or foe? *Circulation* 98 (2), 95–96. 10.1161/01.cir.98.2.95.
- Xu, Q., Bernardo, A., Walker, D., Kanegawa, T., Mahley, R.W., Huang, Y., 2006. Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (19), 4985–4994. 10.1523/JNEUROSCI.5476-05.2006.
- Xu, Q., Walker, D., Bernardo, A., Brodbeck, J., Balestra, M.E., Huang, Y., 2008. Intron-3 retention/splicing controls neuronal expression of apolipoprotein E in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (6), 1452–1459. 10.1523/JNEUROSCI.3253-07.2008.
- Yamada, S., Senokuchi, T., Matsumura, T., Morita, Y., Ishii, N., Fukuda, K., Murakami-Nishida, S., Nishida, S., Kawasaki, S., Motoshima, H., Furukawa, N., Komohara, Y., Fujiwara, Y., Koga, T., Yamagata, K., Takeya, M., Araki, E., 2018. Inhibition of Local Macrophage Growth Ameliorates Focal Inflammation and Suppresses Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38 (5), 994–1006. 10.1161/ATVBAHA.117.310320.
- Yáñez, J.A., Wang, S.W.J., Knemeyer, I.W., Wirth, M.A., Alton, K.B., 2011. Intestinal lymphatic transport for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 63 (10-11), 923–942. 10.1016/j.addr.2011.05.019.
- Yang, T.-T., Tsao, C.-W., Li, J.-S., Wu, H.-T., Hsu, C.-T., Cheng, J.-T., 2007. Changes of dopamine content and cell proliferation by dexamethsone via pituitary adenylate cyclase-

- activating polypeptide in PC12 cell. *Neuroscience letters* 426 (1), 45–48.
10.1016/j.neulet.2007.08.037.
- Zerr, P., Feltz, A., 1994. Forskolin blocks the transient K current of rat cerebellar granule neurons. *Neuroscience letters* 181 (1-2), 153–157. 10.1016/0304-3940(94)90582-7.
- Zhang, RL Reddick, JA Piedrahita, N Maeda, 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258 (5081), 468–471.
10.1126/science.1411543.
- Zhang, J., Schmidt, J., Ryschich, E., Schumacher, H., Allenberg, J.R., 2003. Increased apoptosis and decreased density of medial smooth muscle cells in human abdominal aortic aneurysms. *Chinese medical journal* 116 (10), 1549–1552.
- Zhang, S.H., Reddick, R.L., Burkey, B., Maeda, N., 1994. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *J Clin Invest* 94 (3), 937–945. 10.1172/JCI117460.
- Zhang, X.-Y., Hayasaka, S., Chi, Z.-L., Cui, H.-S., Hayasaka, Y., 2005. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on IL-6, IL-8, and MCP-1 expression in human retinal pigment epithelial cell line. *Current eye research* 30 (12), 1105–1111.
10.1080/02713680500421444.
- Zhe-Wei, S., Li-Sha, G., Yue-Chun, L., 2018. The Role of Necroptosis in Cardiovascular Disease. *Frontiers in pharmacology* 9. 10.3389/fphar.2018.00721.
- Zhou, J., Lhoták, S., Hilditch, B.A., Austin, R.C., 2005. Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 111 (14), 1814–1821. 10.1161/01.CIR.0000160864.31351.C1.

7 Anhang

Gruppen

ApoE^{-/-}	PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}	PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}
FzH706	FzH697	T629
FzH707	FzH699	T631
FzH721	FzH701	T632
FzH722	FzH737	T633
FzH723	FzH735	T636
FzH724	FzH736	T637
FzH725	FzH796	T638
FzH726	FzH797	T752
FzH759	FzH798	T753
FzH760	FzH799	T772
FzH738	FzH800	T773
FzH739	FzH801	T872
FzH982	FzH836	T873
FzH983	FzH837	T874
FzH984	FzH838	
FzH985	FzH839	

Körpergewicht

	ApoE^{-/-}	PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}	PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}
Mean	17,74	19,80	19,24
SE	2,1686	1,2382	0,6986
N	16	15	14
SEM	0,5422	0,3197	0,1867
TTEST vs. ApoE^{-/-}		P = 0,008	P = 0,044

Tibiallänge

	ApoE^{-/-}	PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}	PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}
Mean	31,97	33,02	33,64
SE	3,5353	3,4081	3,3394
N	16	16	11
SEM	0,8838	0,8520	1,0069
TTEST vs. ApoE^{-/-}		P = 0,207	P = 0,124

Plasmacholesterin

	ApoE ^{-/-}	PACAP ^{-/-} / ApoE ^{-/-}	PAC1 ^{-/-} / ApoE ^{-/-}
Mean	998,06	995,31	1440,09
SE	269,9517	307,1139	755,2903
N	15	16	14
SEM	69,7012	76,7785	201,8598
TTEST vs. ApoE^{-/-}		P = 0,490	P = 0,230

Plasmatriglyceride

	ApoE ^{-/-}	PACAP ^{-/-} / ApoE ^{-/-}	PAC1 ^{-/-} / ApoE ^{-/-}
Mean	137,04	147,13	245,25
SE	35,9180	101,9814	124,8687
N	15	13	14
SEM	9,2740	28,2846	33,3726
TTEST vs. ApoE^{-/-}		P = 0,782	P = 0,022

Lumenstenose

	ApoE ^{-/-}	PACAP ^{-/-} / ApoE ^{-/-}	PAC1 ^{-/-} / ApoE ^{-/-}
Mean	11,68	7,92	2,69
SE	2,59	1,85	1,98
N	8,00	8,00	8,00
SEM	0,9159	0,6534	0,6990
TTEST vs. ApoE^{-/-}		P = 0,004	P < 0,001

MoMa-2

	ApoE ^{-/-}	PACAP ^{-/-} / ApoE ^{-/-}	PAC1 ^{-/-} / ApoE ^{-/-}
Mean	8,65	8,44	1,50
SE	4,2621	4,2252	0,9606
N	5	5	4
SEM	1,9061	1,8896	0,4803
TTEST vs. ApoE^{-/-}		P = 0,473	P = 0,023

sm-α-Actin

	ApoE ^{-/-}	PACAP ^{-/-} / ApoE ^{-/-}	PAC1 ^{-/-} / ApoE ^{-/-}
Mean	8,65	8,44	1,50
SE	11,05	7,46	5,02
N	1,6921	1,9163	1,3960
SEM	5	6	4
TTEST vs. ApoE^{-/-}		P = 0,009	P < 0,001

ATG5

	ApoE ^{-/-}	PACAP ^{-/-} / ApoE ^{-/-}	PAC1 ^{-/-} / ApoE ^{-/-}
Mean	16,07	15,32	7,24
SE	6,9641	4,4248	2,3218
N	5	6	4
SEM	3,1144	1,8064	1,1609
TTEST vs. ApoE ^{-/-}		P = 0,063	P = 0,045

Ki-67

	ApoE ^{-/-}	PACAP ^{-/-} / ApoE ^{-/-}	PAC1 ^{-/-} / ApoE ^{-/-}
Mean	15,30	39,22	12,18
SE	4,0392	2,4630	7,0513
N	5	6	4
SEM	1,8064	1,0055	3,5256
TTEST vs. ApoE ^{-/-}		P < 0,001	P = 0,556

Caspase-3

	ApoE ^{-/-}	PACAP ^{-/-} / ApoE ^{-/-}	PAC1 ^{-/-} / ApoE ^{-/-}
Mean	6,69	11,44	10,80
SE	2,2556	4,4075	8,7737
N	5	6	4
SEM	1,0087	1,7994	4,3868
TTEST vs. ApoE ^{-/-}		P = 0,080	P = 0,905

RIP3

	ApoE ^{-/-}	PACAP ^{-/-} / ApoE ^{-/-}	PAC1 ^{-/-} / ApoE ^{-/-}
Mean	4,72	6,36	5,00
SE	2,4439	3,9759	3,5809
N	5	5	4
SEM	1,0929	1,7781	1,7904
TTEST vs. ApoE ^{-/-}		P = 0,251	P = 0,453

Interleukin-6

	ApoE ^{-/-}	PACAP ^{-/-} / ApoE ^{-/-}	PAC1 ^{-/-} / ApoE ^{-/-}
Mean	3,33	5,20	3,05
SE	1,6481	1,2161	0,9290
N	5	6	4
SEM	0,7370	0,4965	0,4645
TTEST vs. ApoE ^{-/-}		P = 0,041	P = 0,398

Interleukin-1 β

	ApoE^{-/-}	PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}	PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}
Mean	5,95	6,40	6,76
SE	2,3776	1,3944	1,9504
N	5	6	4
SEM	1,0633	0,5692	0,9752
TTEST vs. ApoE^{-/-}		P = 0,365	P = 0,321

COX-2

	ApoE^{-/-}	PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}	PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}
Mean	9,09	13,74	6,74
SE	2,6199	4,5856	2,0716
N	5	6	4
SEM	1,1717	1,8721	1,0358
TTEST vs. ApoE^{-/-}		P = 0,103	P = 0,119

TNF- α

	ApoE^{-/-}	PACAP^{-/-} / ApoE^{-/-}	PAC1^{-/-} / ApoE^{-/-}
Mean	7,70	8,11	10,45
SE	1,8342	4,1740	4,4974
N	5	6	4
SEM	0,8203	1,7040	2,2487
TTEST vs. ApoE^{-/-}		P = 0,365	P = 0,321

8 Liste der akademischen Lehrer

An der Philipps-Universität Marburg waren meine akademischen Lehrer die folgenden Damen und Herren (alphabetische Reihenfolge):

Adamkiewicz	Nimsky
Bartsch	Oberwinkler
Becker	Oliver
Bösner	Opitz
Czubayko	Pagenstecher
Daut	Plant
Decher	Preisig-Müller
Fendrich	Rastan
Feuser	Reese
Fuchs- Winkelmann	Renz
Gress	Resse
Grgic	Richter
Haas	Ruchholtz
Hertl	Schäfer
Hofmann	Schieffer
Hoyer	Seitz
Kinscherf	Sekundo
Kircher	Stuck
Kühnert	Thieme
Lill	Vogelmeier
Lohoff	Wagner
Mahnken	Weber
Maier	Weihe
Mirow	Werner
Moll	Westermann
Neff	Wilhelm
Neubauer	Wrocklage
Neumüller	Wulf

9 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Bedeutung von PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) bzw. seines Rezeptors PAC1 für die Entwicklung und Progression der Atherosklerose in 10 Wochen mit Cholesterin-gefütterten ApoE-defizienten Mäusen“ im Institut für Anatomie und Zellbiologie unter Leitung von Prof. Dr. Kinscherf mit Unterstützung durch Herrn Dr. Gabriel Bonaterra ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe. Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Ort, Datum, Unterschrift Doktorand

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

Ort, Datum, Unterschrift Referentin/Referent

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Kinscherf für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung der Institutsräumlichkeiten und insbesondere für die hervorragende Betreuung während der Arbeit an meiner Dissertation bedanken.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Gabriel Bonaterra für seine Unterstützung zu jeder Zeit und für seine Lösungsvorschläge zu jeglichen aufgetretenen Schwierigkeiten.

Weiterhin danke ich Michael Dreher und den weiteren Mitarbeiter:innen im Labor für die Einarbeitung und Unterstützung bei den Laborexperimenten.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich auch in schwierigen Zeiten immer unterstützt hat, mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mir das Medizinstudium sowie diese Dissertation ermöglicht hat.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Freundin Thea, die mich immer wieder ermutigt, aufgebaut, motiviert und, wenn notwendig, auch abgelenkt hat und mir mit ihrer Zielstrebigkeit und Disziplin im Rahmen ihrer eigenen Promotion ein großes Vorbild war.

11 Lebenslauf

Name: Philip Neudert
Geburtsdatum: 22.11.1993 **Staatsangehörigkeit:** Deutsch
Geburtsort: Alsfeld **Email:** philip_neudert@web.de

Schulbildung

2000-2004 Grundschule Katzenberg, Ruhlkirchen, Antrifttal
2004-2013 Albert-Schweitzer-Schule Alsfeld
06/2013 Allgemeine Hochschulreife, Notendurchschnitt: 1,1
Karl-von-Frisch Abiturientenpreis für besondere
Leistungen im Fach Biologie

Studium und Beruf

2013-2020 Studium der Humanmedizin an der Philipps-
Universität Marburg
09/2015 erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: -2-
Wahlfach „Medizinrecht für Mediziner“, Note: -1-
Seit 06/2016 Promotion am Institut für Anatomie & Zellbiologie
Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Ralf
Kinscherf
Thema: Die Bedeutung von PACAP (Pituitary
Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) bzw.
seines Rezeptors PAC1 für die Entwicklung und
Progression der Atherosklerose in 10 Wochen mit
Cholesterin-gefütterten ApoE-defizienten Mäusen
04/2019 zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: -2-
05/2020 dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: -2-
Seit 10/2020 Arzt in Weiterbildung für Gynäkologie und
Geburtshilfe, Klinikum Leverkusen