

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Direktor: Prof. Dr. Ralf Kinscherf
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Der Einfluss von PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide)-
und PAC1-Defizienz bei ApoE-defizienten Mäusen auf das cholinerge
Neurotransmittersystem des Gehirns unter Standard und unter hoher
Cholesterol-/ Fett-Diät**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Philipp Simon Fritz Berlet
aus Heidelberg
Marburg, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 26.09.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. E. Weihe

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. J. Schäfer

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Einführung und Zielsetzung.....	1
1.2 PACAP Überblick.....	2
1.3 Funktionen von PACAP.....	3
1.4 Atherosklerose und PACAP.....	5
1.5 Schlaganfall und PACAP.....	7
1.6 Demenz und PACAP.....	9
1.7 Cholinerge Aktivität und PACAP.....	12
1.8 Neuroregeneration und PACAP.....	13
1.9 Fragestellungen und Hypothesen.....	15
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Versuchstiere und Fütterung.....	17
2.2 Antikörper.....	18
2.3 Chemikalien.....	19
2.4 Gerätschaften.....	20
2.5 Programme.....	21
2.6 Versuchsablauf.....	21
2.6.1 Immunhistochemie.....	21
2.6.2 Mikroskopie.....	25
2.7 Untersuchungsgebiet.....	26
2.7.1 Histologie des Hippocampus.....	26
2.7.2 Hippocampus und PACAP.....	27
2.8 Statistische Analyse.....	30
3 Ergebnisse.....	31
3.1 ChAT, Fütterung 10+20: Vergleich hippocampaler Regionen innerhalb einer Knockout-Gruppe.....	32
3.2 ChAT, Fütterung 10+20: Unterschiedliche Knockout-Gruppen im Vergleich.....	34
3.3 ChAT, Fütterung Standard 30: Vergleich hippocampaler Regionen innerhalb einer Knockout-Gruppe.....	35

3.4 ChAT, Fütterung Standard 30: Unterschiedliche Knockout-Gruppen im Vergleich.....	37
3.5 ChAT: Vergleich zwischen Knockout-Gruppe und Wildtyp.....	38
3.6 ChAT: Vergleich aller Gruppen.....	41
3.7 VACHT, Fütterung 10+20: Vergleich hippocampaler Regionen innerhalb einer Knockout-Gruppe.....	43
3.8 VACHT, Fütterung 10+20: Unterschiedliche Knockout-Gruppen im Vergleich.....	45
3.9 VACHT, Fütterung Standard 30: Vergleich hippocampaler Regionen innerhalb einer Knockout-Gruppe.....	46
3.10 VACHT, Fütterung Standard 30: Unterschiedliche Knockout-Gruppen im Vergleich.....	48
3.11 VACHT: Vergleich zwischen Knockout-Gruppe und Wildtyp.....	49
3.12 VACHT: Vergleich aller Gruppen.....	52
4 Diskussion.....	54
4.1 Welche cholinerge Innervation (ChAT, VACHT) zeigt sich im Hippocampus der Mäuse?.....	55
4.2 Gibt es Unterschiede zwischen den Gruppen an Mäusen (ApoE-/-, PACAP-/-ApoE-/-, PAC1-/-ApoE-/-, WT) bezüglich der hippocampalen cholinergen Innervation?.....	55
4.3 Wie unterscheidet sich die cholinerge Innervation innerhalb verschiedener Regionen des Hippocampus (CA1, CA3, DG)?.....	57
4.4 Was ergibt ein Vergleich zwischen Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Fütterung?.....	59
4.5 Auf welche Weise beeinflusst die unterschiedliche Fütterung (Diät 10+20, Standard 30) die cholinerge Innervation im Hippocampus?.....	60
4.6 Gegenüberstellung eigener Forschungsergebnisse mit Fachliteratur.....	61
4.7 Kritik und Ausblick.....	63
5 Zusammenfassung.....	64

6 Summary.....	66
7 Literaturverzeichnis.....	68
8 Anhang.....	78
8.1 Ergebnistabellen.....	78
8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	104
8.3 Danksagung.....	105

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
AC	Adenylatcyclase
ACh	Acetylcholin
AD	Alzheimer Demenz
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
AP	Aktionspotential
Apo	Apolipoprotein
ApoE	Apolipoprotein E
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin (vom Rind)
BrdU	Bromodeoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA1	Cornu ammonis Region 1
CA3	Cornu ammonis Region 3
Ca	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CED	Cholesterol Enriched Diet (Cholesterinreiche Diät)
ChAT	Cholinacetyltransferase
CRP	C-reaktives Protein
DAB	Diaminobenzidin
DG	Gyrus dentatus
Diät10+20	10 Wochen Standardfutter, dann 20 Wochen cholesterinreiche Diät
DKO	Doppel-Knockout (Deletion eines Gens)
dl	Deziliter
do	donkey (Esel)
et al.	et altera (und andere)
g	Gramm
GCS	Glasgow Coma Scale

G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
gt	goat (Ziege)
h	Stunde
HC	Hippocampus
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme)
i.v.	intravenös
l	Liter
Lys	Lysin
µl	Mikroliter
M	molar
MCAO	Okklusion der Arteria cerebri media
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Mililiter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
nAChR	nikotinerge Acetylcholin Rezeptoren
Ncl.	nucleus (Kern)
n	Größe der Stichprobe
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
NOS1	Stickstoffmonoxid Synthase 1
NF	Normalfutter
Nr.	Nummer
MRT	Magnetresonanztomografie
OT	Objektträger

PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide
PAC1	PACAP Rezeptor 1
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PET	Positronenemissionstomografie
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pmol	Pikomol
PNS	Peripheres Nervensystem
Pro	Prolin
rb	rabbit (Kaninchen)
RT	Raumtemperatur
Rez	Rezeptor
SAB	Subarachnoidalblutung
SD	Standard Diet (Standardfutter)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SGZ	subgranuläre Zone
St30	30 Wochen Standardfutter
Tyr	Tyrosin
VACHT	vesikulärer Acetylcholin-Transporter
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
VLDL	very low density lipoprotein
VPAC1	Vasoactive Intestinal Peptide Receptor 1
VPAC2	Vasoactive Intestinal Peptide Receptor 2
vs.	versus
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
1,25x	1,25-fache Vergrößerung
4x	4-fache Vergrößerung
10x	10-fache Vergrößerung
20x	20-fache Vergrößerung

40x	40-fache Vergrößerung
+/+	intaktes Gen, kein Doppel Knockout
-/-	Doppel Knockout
%	Prozent
>	größer als
<	kleiner als

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gehirn einer Maus im Sagittalschnitt (Giemsa-Färbung).....	22
Abbildung 2: Hippocampus einer Maus im Sagittalschnitt (Giemsa-Färbung)...	22
Abbildung 3: Hippocampus-Regionen.....	26
Abbildung 4: Untersuchte Hippocampus-Regionen (Giemsa-Färbung).....	28
Abbildung 5: Auswertung CA3 Graustufen.....	29
Abbildung 6: Auswertung CA3 schwarz-weiß.....	29
Abbildung 7: Statistische Auswertung I.....	32
Abbildung 8: Statistische Auswertung II.....	32
Abbildung 9: Statistische Auswertung III.....	33
Abbildung 10: Statistische Auswertung IV.....	33
Abbildung 11: Statistische Auswertung V.....	34
Abbildung 12: Statistische Auswertung VI.....	35
Abbildung 13: Statistische Auswertung VII.....	35
Abbildung 14: Statistische Auswertung VIII.....	36
Abbildung 15: Statistische Auswertung IX.....	36
Abbildung 16: Statistische Auswertung X.....	37
Abbildung 17: Statistische Auswertung XI.....	38
Abbildung 18: Statistische Auswertung XII.....	39
Abbildung 19: Statistische Auswertung XIII.....	40
Abbildung 20: Statistische Auswertung XIV.....	41
Abbildung 21: Statistische Auswertung XV.....	43
Abbildung 22: Statistische Auswertung XVI.....	43
Abbildung 23: Statistische Auswertung XVII.....	44

Abbildung 24: Statistische Auswertung XVIII.....	44
Abbildung 25: Statistische Auswertung XIX.....	45
Abbildung 26: Statistische Auswertung XX.....	46
Abbildung 27: Statistische Auswertung XXI.....	46
Abbildung 28: Statistische Auswertung XXII.....	47
Abbildung 29: Statistische Auswertung XXIII.....	47
Abbildung 30: Statistische Auswertung XXIV.....	48
Abbildung 31: Statistische Auswertung XXV.....	49
Abbildung 32: Statistische Auswertung XXVI.....	50
Abbildung 33: Statistische Auswertung XXVII.....	51
Abbildung 34: Statistische Auswertung XXVIII.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Statistische Auswertung XIV.....	42
Tabelle 2: Statistische Auswertung XXVIII.....	53

Anhang

Tabelle 3: Statistische Auswertung I.....	78
Tabelle 4: Statistische Auswertung II.....	79
Tabelle 5: Statistische Auswertung III.....	80
Tabelle 6: Statistische Auswertung IV.....	81
Tabelle 7: Statistische Auswertung V.....	82
Tabelle 8: Statistische Auswertung VI.....	83
Tabelle 9: Statistische Auswertung VII.....	84
Tabelle 10: Statistische Auswertung VIII.....	85
Tabelle 11: Statistische Auswertung IX.....	86
Tabelle 12: Statistische Auswertung X.....	87
Tabelle 13: Statistische Auswertung XI.....	88

Tabelle 14: Statistische Auswertung XII.....	89
Tabelle 15: Statistische Auswertung XIII.....	90
Tabelle 16: Statistische Auswertung XV.....	91
Tabelle 17: Statistische Auswertung XVI.....	92
Tabelle 18: Statistische Auswertung XVII.....	93
Tabelle 19: Statistische Auswertung XVIII.....	94
Tabelle 20: Statistische Auswertung XIX.....	95
Tabelle 21: Statistische Auswertung XX.....	96
Tabelle 22: Statistische Auswertung XXI.....	97
Tabelle 23: Statistische Auswertung XXII.....	98
Tabelle 24: Statistische Auswertung XXIII.....	99
Tabelle 25: Statistische Auswertung XXIV.....	100
Tabelle 26: Statistische Auswertung XXV.....	101
Tabelle 27: Statistische Auswertung XXVI.....	102
Tabelle 28: Statistische Auswertung XXVII.....	103

1 Einleitung

1.1 Einführung und Zielsetzung

Atherosklerose, Schlaganfall und Morbus Alzheimer sind häufige altersabhängige Krankheiten, bei denen systemische Inflammation oder Neuroinflammation eine wesentliche Rolle spielen (Cunningham et al., 2015).

Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) ist ein vasoregulatorisches, immunmodulatorisches und neuroprotektives Peptid, welches mit den Rezeptoren PAC1, VPAC1 und VPAC2 interagiert (Ringer et al., 2013). Die zahlreichen Funktionen von PACAP werden deutlich durch seine Rolle im Zusammenspiel von Sympathikus und Nebenniere bei Stress (Eiden et al., 2018) und der Wirkung von PACAP auf Bluthochdruck (Fukushima et al., 2001) sowie der Interaktion von PACAP mit Neurotransmittern (Arimura, 1998). PACAP nimmt auf vielfältige Art Einfluss auf zerebrale Ischämie und neurodegenerative Erkrankungen (Arimura, 1998). Bei Hirnschädigung kann PACAP zur Erholung beitragen (Cherait et al., 2020).

Es gibt aktuelle Evidenz dafür, dass PACAP eine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit Atherosklerose spielt (Splitthoff et al., 2020).

Apolipoprotein E (ApoE) wirkt sich auf das cholinerge Transmittersystem aus (Dolejsi et al., 2016). Die ApoE-Defizienz ist charakterisiert durch erhöhte Plasma-Lipid-Spiegel (Mato et al., 1999) und stellt ein gut etabliertes Maus-Modell zur Untersuchung von Altersprozessen und Forschung zu den Krankheitsbildern Atherosklerose, Schlaganfall und Morbus Alzheimer dar (Reglodi et al., 2018).

PACAP Signalwege sind in der Lage, Neurotransmittersysteme wie das cholinerge System regulieren zu können (Liu et al., 2000).

Gegenwärtig ist nicht bekannt, wie sich der Knockout von PACAP, PAC1 und ApoE zusammen mit cholesterinreicher Ernährung auf das hippocampale cholinerge Neurotransmittersystem auswirkt. Dies gilt es in dieser Forschungsarbeit erstmalig zu untersuchen.

Die Ausgangshypothesen sind, dass die fehlende protektive Wirkung von PACAP sowie der PAC1- und ApoE-Knockout einen Effekt auf die cholinerge

Innervation im Hippocampus haben werden. Zusätzlich könnte die fettreiche Ernährung zu einer Änderung der cholinergen Synapsendichte führen.

Es wird erwartet, dass die gewonnenen Ergebnisse neue Einblicke liefern, wie sich PACAP auf die Neurotransmission auswirkt.

1.2 PACAP Überblick

Das Peptid Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) wurde im Jahr 1989 von Miyata et al. entdeckt. Es wurde aus dem Hypothalamus von Schafen isoliert und ist charakterisiert durch seine Fähigkeit, cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) in anterioren Hypophysen-Zellen zu stimulieren (Miyata et al., 1990). PACAP gehört zu der Sekretin-Glukagon-VIP (Vasoaktives Intestinales Peptid) Familie (Arimura, 1998). Die Struktur von PACAP blieb während der Evolution weitestgehend unverändert (Arimura, 1998). PACAP ist sowohl im Gehirn als auch in peripheren Organen weit verbreitet (Vaudry et al., 2009). Es gibt zwei biologisch aktive Formen: PACAP38 und PACAP27 (Miyata et al., 1990). PACAP38 besteht aus 38 Aminosäuren und ist am C-Terminus alpha amidiert (Vaudry et al., 2009). Bei PACAP27 handelt es sich um eine kürzere Form des Peptides mit 27 N-terminalen Aminosäuren und amidiertem C-Terminus (Miyata et al., 1990). Die biologische Aktivität des synthetischen PACAP27 ist im Bezug auf die Stimulation der Adenylatcyclase (AC) mit PACAP38 vergleichbar (Miyata et al., 1990).

Die PACAP-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt und bestehen aus sieben transmembranären Domänen (Arimura, 1998). Es werden drei verschiedene PACAP-Rezeptoren unterschieden: der PACAP-spezifische PAC1-Rezeptor (PACAP Rezeptor Typ I) und die Rezeptoren VPAC1 und VPAC2 (PACAP Rezeptor Typ II) (Vaudry et al., 2009). Die Rezeptoren VPAC1 und VPAC2 zeigen im Gegensatz zum PACAP-spezifischen PAC1-Rezeptor eine ähnliche Bindungsaffinität zu PACAP und zu VIP (Arimura, 1998). An den PAC1-Rezeptor bindet selektiv und hochaffin PACAP (Arimura, 1998). Die PACAP Rezeptoren kommen mit unterschiedlicher Häufigkeit im zentralen

Nervensystem (ZNS), im peripheren Nervensystem (PNS) und verschiedenen Organen vor (Vaudry et al., 2009).

Es wurde nachgewiesen, dass PACAP im zentralen Nervensystem (ZNS) als Neurotransmitter und Neuromodulator wirkt (Arimura, 1998). Im adulten Gehirn wird die neuroprotektive Eigenschaft von PACAP deutlich, da der durch Trauma, Ischämie oder Degeneration entstandene neuronale Schaden durch PACAP abgemildert werden kann (Arimura, 1998).

Synaptische Plastizität und neuronaler Zelltod sind in besonders wichtigen Hirnregionen wie dem zerebralen Kortex, der Substantia nigra, dem Striatum und dem Hippocampus von entscheidender Rolle im Hinblick auf kognitive Einschränkungen, die bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Demenz (AD) ein Hauptsymptom darstellen (Soles-Tarres et al., 2020).

1.3 Funktionen von PACAP

Die Infusion von PACAP (100 nmol) steigerte die Ausschüttung von Epinephrin und Norepinephrin bei Ratten (Fukushima et al., 2001). Ebenso wurde nachgewiesen, dass PACAP aus den Nervenendigungen freigegeben wird, um die neural hervorgerufene Katecholaminausschüttung durch PAC1-Rezeptoren in der Nebenniere bei Ratten zu fördern (Fukushima et al., 2001).

Die unterstützende Wirkung von PACAP im Rahmen der sympathoadrenomedullären Achse bei Stress wurde auch in den Forschungsarbeiten von Hamelink et al. (2002) nachgewiesen. Hierbei wurde mithilfe von hochspezifischen Antikörpern gegen PACAP und gegen den vesikulären Acetylcholin-Transporter (VACHT) herausgefunden, dass PACAP bei Ratten in allen untersuchten Nervenendigungen von cholinergen Synapsen der Nebenniere zu finden war (Hamelink et al., 2002). PACAP-Knockout-Mäuse hatten eine normwertige cholinerge Innervation und eine regelrechte Morphologie des Nebennierenmarkes sowie Spiegel von Katecholaminen und Glukose im Normbereich (Hamelink et al., 2002). Auch auf Insulin-induzierte Hypoglykämie zeigte sich initial eine regelhafte Katecholaminantwort (Hamelink et al., 2002). Allerdings fiel bei PACAP-Knockout-Mäusen auf, dass die Insulin-

induzierte Hypoglykämie stärker ausgeprägt und länger andauernd war als in der Kontrollgruppe (Hamelink et al., 2002). Folglich wurde beschrieben, dass PACAP als ein Cotransmitter in peptidergen cholinergen präganglionären Nervenendigungen während metabolischem Stress fungiert (Hamelink et al., 2002).

Des Weiteren fanden Eiden et al. (2018) heraus, dass PACAP durch Calcium-Einstrom unabhängig von der Erzeugung eines Aktionspotentials (AP) zur Katecholaminsekretion führt und Enzyme der Katecholaminbiosynthese während Stressepisoden bei Säugetieren aktiviert.

Die Experimente von Niewiadomski et al. (2000) stellten dar, dass Mäuse mit einem Doppelknockout für VIP/ PACAP zwar ein normwertiges Geburtsgewicht hatten, aber postnatal ein deutlich vermindertes Wachstum zeigten. Analysen am 16. postnatalen Tag zeigten, dass alle untersuchten Organe außer dem Gehirn eine Gewichtsreduktion von 40-70% aufwiesen (Niewiadomski et al., 2000). Die Masse des Gehirns war signifikant um 10% verringert (Niewiadomski et al., 2000). Trotz der regelrechten Überlebensraten der Mäuse bis zum Zeitpunkt des Abstillens führten nachfolgend viele plötzliche Todesereignisse dazu, dass nur 48% der weiblichen und 82% der männlichen Mäuse das Lebensalter von sechs Monaten erreichten (Niewiadomski et al., 2000).

Versuche von Nguyen et al. (2020) zeigten, dass die Nahrungsaufnahme bei PACAP-defizienten Mäusen verringert ist. Die Versuchstiere mussten zwei Tage lang fasten (Nguyen et al., 2020). Daraufhin bekamen sie Nahrung und wurden acht Stunden nach der ersten Nahrungsaufnahme erneut gefüttert (Nguyen et al., 2020). Dabei wurde deutlich, dass der Nahrungskonsum sowohl tagsüber als auch nachts bei PACAP(-/-) Mäusen signifikant niedriger war als bei PACAP(+/+) Mäusen (Nguyen et al., 2020). Außerdem wurde festgestellt, dass intracerebroventrikuläre Gabe eines PACAP-Antagonisten (1 nmol/ 4µl/ Maus) sowohl die Nahrungsaufnahme als auch das Körpergewicht senkten (Nguyen et al., 2020).

1.4 Atherosklerose und PACAP

Definitionsgemäß handelt es sich bei dem Krankheitsbild der Atherosklerose um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung der Intima-Schicht der Gefäßwand mit Bildung lipidhaltiger Plaques (Bir et al., 2022). Hauptrisikofaktoren für Atherosklerose sind Bestandteile des metabolischen Syndroms: Adipositas, Diabetes mellitus, Dyslipidämie und arterielle Hypertonie (Böcker et al., 2008). Bedeutende atherosklerotisch bedingte Folgeerkrankungen sind: Periphere arterielle Verschlusskrankheit, koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall und vaskuläre Demenz (Böcker et al., 2008).

Zhang et al. (1992) beschäftigten sich mit der Frage, inwieweit sich die Defizienz von ApoE als atherogen erweist. ApoE ist ein Ligand für Rezeptoren, welche die Überreste von Chylomikronen und very low density lipoproteins (VLDL), sogenannte Remnants, abbauen (Zhang et al., 1992). Folglich ist ein Mangel an ApoE mit einer Akkumulation von Remnants im Plasma und somit im Verlauf mit Atherosklerose assoziiert (Zhang et al., 1992). Die Experimente von Zhang et al. (1992) zeigten, dass ApoE^{-/-} Mäuse fünffach erhöhte Cholesterolverte aufwiesen und bereits im Alter von drei Monaten schaumzellreiche Ablagerungen im Bereich der proximalen Aorta entwickelten. Die Läsionen verursachten fünf Monate später schwerwiegende Okklusionen der Koronararterien (Zhang et al., 1992).

Ähnliche Ergebnisse ergaben die Studien von Plump et al. (1992). Hierbei wurde eine Gruppe von ApoE-defizienten Mäusen mit einer fett- und cholesterolarmen Nahrung gefüttert (Plump et al., 1992). Die Messwerte der Cholesterolspiegel im Plasma dieser Knockout-Mäuse betragen 494 mg/dl im Vergleich zu 60 mg/dl in der Kontrollgruppe (Plump et al., 1992). Bei den ApoE-defizienten Mäusen unter fettreicher Ernährung, sogenannter „Western Diet“, wurden Cholesterolspiegel im Plasma von 1821 mg/dl im Vergleich zu 132 mg/dl in der Kontrollgruppe gemessen (Plump et al., 1992). Im Alter von zehn Wochen hatten die ApoE-defizienten Mäuse bereits atherosklerotische Läsionen in der Aorta sowie in den Koronararterien und in der Pulmonalarterie entwickelt (Plump et al., 1992).

Mato et al. (1999) beschrieben, dass ApoE eine wichtige Rolle für die Homöostase des intrazellulären Cholesterolspiegels spielt. ApoE-defiziente

Mäuse entwickeln Hyperlipidämie, leiden unter Atherosklerose in extrazerebralen Blutgefäßen und unter Neurodegeneration im ZNS (Mato et al., 1999).

Cunningham et al. (2015) bestätigten, dass Komorbiditäten wie Atherosklerose und systemische Inflammation den kognitiven Niedergang vorantreiben und Risikofaktoren für Demenz bedeuten.

Splitthoff et al. (2020) untersuchten PAC1^{-/-}/ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäuse mit der Fragestellung, wie sich der PAC1-Knockout auf plasmatische Cholesterol-/Triglyzerid-Spiegel und atherosklerotische Veränderungen, welche bei ApoE^{-/-} beobachtet wurden, auswirkt. Die untersuchten Tiere wurden entweder mit Standardfutter oder mit cholesterinreicher Nahrung gefüttert (Splitthoff et al., 2020). Obwohl der Doppelknockout von PAC1 und ApoE keinen Einfluss auf die Hyperlipidämie hatte, fiel auf, dass sich in der Gruppe der cholesterinreich ernährten Tiere bei PAC1^{-/-}/ApoE^{-/-} Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-} Mäusen deutlich weniger Gefäßstenosen zeigten (Splitthoff et al., 2020). Eine Therapieoption durch selektive PAC1-Antagonisten bei Hyperlipidämie und Atherosklerose wurde diskutiert (Splitthoff et al., 2020).

1.5 Schlaganfall und PACAP

Bei einem Schlaganfall handelt es sich um eine neurologische Dysfunktion infolge einer akuten zerebralen Durchblutungsstörung (ischämischer Schlaganfall) oder seltener infolge einer Blutung (hämorrhagischer Schlaganfall) (Sacco et al., 2013).

Die Anzahl der Schlaganfälle in Deutschland beträgt laut der Deutschen Schlaganfall Gesellschaft ca. 260.000 pro Jahr (Stand: 2021).

Moller et al. (1997) untersuchten, welche Auswirkungen Hirnschädigung in Form von Axotomie, chemischer Sympathektomie und präganglionärer Denervierung auf die Expression von PACAP und PAC1 bei Ratten hat. Für das Aufspüren von präganglionären cholinergen Fasern wurden Antikörper gegen VAcHT benutzt (Moller et al., 1997). Im gesunden Ganglion cervicale superius wurde PACAP mittels Immunhistochemie in zahlreichen präganglionären Nervenfasern nachgewiesen, wohingegen nur sehr wenige Neurone PACAP exprimierten (Moller et al., 1997). PAC1 wurden in allen untersuchten neuronalen Zellkörpern gefunden (Moller et al., 1997). Axotomie und chemische Sympathektomie führten zu einer schnellen und starken Hochregulation von PACAP und zu einer Abnahme der PAC1-Expression (Moller et al., 1997). Präganglionäre Denervierung führte ebenfalls zu einer Hochregulation von PACAP, hatte jedoch keinen Einfluss auf die PAC1-Expression (Moller et al., 1997).

Chronische systemische Inflammation wie bei Atherosklerose, Diabetes mellitus und Adipositas sind mit einem erhöhten Schlaganfall-Risiko assoziiert (Drake et al., 2011). Unter atherogener Diät zeigten ApoE^{-/-} Mäuse bereits innerhalb von acht Wochen eine Aktivierung von Mikroglia-Zellen im Gehirn und eine erhöhte Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen (Drake et al., 2011). Außerdem wurden in periventrikulären und kortikalen Bereichen fokale Lipidablagerungen, Neuroinflammation sowie eine umfassende Rekrutierung von aktivierten myeloischen Phagozyten, T-Zellen und Granulozyten beobachtet (Drake et al., 2011). Sie konnten auch feststellen, dass bei Patienten mit erhöhtem Risiko für Schlaganfall (chronisch erhöhtes CRP, aber ohne Pathologie im MRT) in der PET-Bildgebung eine erhöhte Neuroinflammation vorhanden war (Drake et al., 2011). Dies bewegte Drake et

al. (2011) zu der Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen Schlaganfall Risikofaktoren und einer erhöhten systemischen Inflammation besteht.

Mit der Rolle von PACAP bei Subarachnoidalblutung (SAB) haben sich Jiang et al. (2016) auseinandergesetzt. Die Fragestellung der Studie lautete, ob sich erhöhte Plasma-Spiegel von PACAP als ein Prädiktor für das klinische Ergebnis von SAB-Patienten erweisen. Hierzu wurden 118 SAB-Patienten und 118 Patienten für die Kontrollgruppe rekrutiert (Jiang et al., 2016). Die PACAP-Plasmaspiegel waren bei allen 118 SAB-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Jiang et al., 2016). Es zeigte sich, dass PACAP als ein unabhängiger Prädiktor für die 6-Monatsmortalität und das Auftreten von unerwünschten Ereignissen (definiert als Glasgow Coma Scale (GCS) = 3, dies entspricht einer schweren Bewusstseinsstörung) fungiert und somit einen geeigneten Biomarker hinsichtlich klinischem Schweregrad und Langzeitprognose bei SAB-Patienten darstellt (Jiang et al., 2016).

Während der Experimente von Kaneko et al. (2018) wurden Neuronen von Ratten mit PACAP27 oder PACAP38 in Kontakt gebracht und anschließend experimentell ein akuter ischämischer Schlaganfall induziert (Kaneko et al., 2018). Sowohl PACAP27 und PACAP38 erhöhten das Zellüberleben und reduzierten den durch oxidativen Stress verursachten Zellschaden und die Apoptoserate (Kaneko et al., 2018).

Auch Fang et al. (2020) beschäftigten sich mit den neuroprotektiven Eigenschaften von PACAP bei Schlaganfall. Basierend auf den Erkenntnissen hat PACAP Einfluss auf die neuronale Proliferation, Differenzierung und Migration sowie die ionische Homöostase und Exzitotoxizität (Fang et al., 2020). Zusätzlich beeinflusst PACAP die Ausprägung von Zellödem, oxidativem Stress, Inflammation und Zelltod (Fang et al., 2020). Um zu demonstrieren, dass PACAP eine abschwächende Wirkung auf das durch eine Subarachnoidalblutung (SAB) verursachte Hirnödem hat, wurden PACAP-Knockout-Ratten untersucht (Fang et al., 2020). Exogene PACAP-Gabe hatte hierbei sowohl kurz- als auch langfristig vorteilhafte Effekte durch Schützen der Blut-Hirn-Schranke und des glymphatischen Systems (Fang et al., 2020). Eine vorausgehende Gabe von PACAP-Inhibitoren zeigte die PACAP-assoziierte anti-ödematöse Wirkung (Fang et al., 2020). Diese wurde über den selektiven PAC1-Rezeptor und den AC-cAMP-PKA Signalweg übermittelt (Fang et al.,

2020). Schlussfolgernd wurde das therapeutische Potential von PACAP im Hinblick auf Hirnödemen bei Patienten mit SAB zur Diskussion gestellt (Fang et al., 2020).

Cherait et al. (2020) zeigten, dass die nasale Gabe von PACAP ein effektiver Applikationsweg ist, um das Infarktvolumen zu reduzieren und die funktionelle Erholung zu fördern. Nachdem bei Mäusen eine transiente oder permanente Okklusion der Arteria cerebri media verursacht wurde, resultierte die innerhalb von sechs Stunden nach Reperfusion durchgeführte Applikation von PACAP in einer Verringerung des Infarktvolumens und einer Verbesserung der Funktionalität (Cherait et al., 2020).

1.6 Demenz und PACAP

Laut Definition nach ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) ist Demenz ein Syndrom als Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns mit Störung vieler höherer kortikaler Funktionen, einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Rechnen, Lernfähigkeit, Sprache und Urteilsvermögen.

Die Forschungen von Krzywkowski et al. (1999) zeigten, dass ApoE eine wichtige Rolle für die neuronale Plastizität bedeutet. Die ChAT-Aktivität, die hippocampale Acetylcholin-Ausschüttung und die cholinerge Nervenendigungsdichte zeigten keine Veränderungen bei 3 und 9,5 Monate alten ApoE-defizienten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Krzywkowski et al., 1999). Im Gegensatz dazu war die Langzeitpotenzierung bei den ApoE-defizienten Mäusen deutlich reduziert, stieg aber bei Stimulation in gleichem Maß an wie bei Mäusen der Kontrollgruppe (Krzywkowski et al., 1999).

Blusztajn et al. (2000) haben sich mit dem Zusammenhang zwischen Acetylcholin (ACh), ApoE und Alzheimer Demenz (AD) beschäftigt. Die Synthese, Speicherung und Ausschüttung von ACh erfordert die Expression verschiedener Proteine wie der Cholinacetyltransferase (ChAT) und dem vesikulären Acetylcholin Transporter (VACHT) (Blusztajn et al., 2000). Ein cholinerges Defizit ist ein Hauptmerkmal der Alzheimer Demenz (Blusztajn et

al., 2000). Eine weitere Besonderheit bei AD ist der gestörte Phospholipid Umsatz (Blusztajn et al., 2000). Hierbei könnte die fortschreitende Ansammlung von ApoE innerhalb der Amyloid-Plaques eine Rolle spielen (Blusztajn et al., 2000). ApoE ist mit VLDL (very low density lipoprotein) assoziiert (Blusztajn et al., 2000). Um eine mögliche neuroprotektive Wirkung von ApoE festzustellen, wurde die Auswirkung von VLDL auf den ACh-Gehalt in Neuronen untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass VLDL den ACh-Gehalt erhöht und dass VLDL die anticholinerge Wirkung von Amyloid beta Peptiden teilweise ausgleichen kann (Blusztajn et al., 2000).

Wie sich PACAP- und PAC1-Defizienz auf höhere Hirnfunktionen auswirken, wurde von Hashimoto et al. (2002) untersucht. Bei PAC1-defizienten Mäusen fiel ein Defizit bei Hippocampus-abhängigen assoziativem Lernen auf (Hashimoto et al., 2002). Bei PACAP-defizienten Mäusen wurden eine hohe Frühsterblichkeitsrate und Verhaltensauffälligkeiten beobachtet (Hashimoto et al., 2002).

Laut Harmer et al. (2012) spielt PACAP im ZNS eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des zirkadianen Rhythmus, dem Lernen und der Gedächtnisfunktion. Darüber hinaus hat PACAP einen Einfluss auf Angstepfinden, Stressantwort und Erholung bei Hirnschädigung (Harmer et al., 2012).

Han et al. (2015) beschäftigten sich mit der Assoziation zwischen Mangel an PACAP und Schweregrad der Demenz. Für diese Forschungen wurden die PACAP- und PAC1-Spiegel post mortem in Hirngewebe und Liquor cerebrospinalis bei Patienten ohne kognitive Einschränkungen sowie bei Patienten mit leichten kognitiven Einschränkungen und Patienten mit Alzheimer Demenz mittels enzymgekoppeltem Immuntests gemessen (Han et al., 2015). Insgesamt wurden 35 Proben untersucht (Han et al., 2015). Es wurde eine inverse Relation zwischen PACAP-Spiegel im Gyrus frontalis superior, Gyrus temporalis medius und Liquor cerebrospinalis und dem Schweregrad der Demenz festgestellt (Han et al., 2015).

Der Zusammenhang von PACAP und der Alzheimer Demenz (AD) wurde auch von Han et al. (2017) untersucht. Durchgeführt wurden die Untersuchungen bei Rhesusaffen und Mäusen hinsichtlich der folgenden Variablen: Altern, kognitive Leistung, Vorkommen von Amyloid-Plaques und PACAP-Spiegel (Han et al., 2017). Mit fortschreitendem Alter verringerten sich bei Rhesusaffen die PACAP-

Spiegel und die Leistung bei Gedächtnistests (Han et al., 2017). Genetisch veränderte Mäuse (human amyloid precursor protein transgenic mice) zeigten ein gehäuftes Vorkommen von Plaques im Hippocampus und angrenzenden kortikalen Regionen (Han et al., 2017). Die zerebralen PACAP-Spiegel waren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen geringer (Han et al., 2017).

Chen et al. (2018) betonten ebenfalls den neuroprotektiven Effekt von Neuropeptiden wie PACAP auf die Pathophysiologie der altersabhängigen Alzheimer Demenz (AD). Durch Verhinderung von A-beta-Akkumulation, Erhöhung des neuronalen Glucose-Transports und der Produktion von Neurotrophinen hat PACAP einen positiven Effekt auf AD (Chen et al., 2018). Durch Hemmung des endoplasmatischen Stress und der Autophagie sowie Modulation der Kaliumkanalaktivität und der hippocampalen Langzeitpotenzierung wirkt sich PACAP zusätzlich vorteilhaft auf das Krankheitsbild der Alzheimer Demenz aus (Chen et al., 2018).

Reglodi et al. (12/2018) beschrieben, dass PACAP-Defizienz ein gutes Modell für vorzeitiges Altern darstellt. PACAP wirkt generell zytoprotektiv durch seine anti-apoptischen, anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Eigenschaften (Reglodi et al., 12/2018). Es wurde nachgewiesen, dass PACAP-defiziente Mäuse zahlreiche, altersabhängige, pathologische Veränderungen zeigen (Reglodi et al., 12/2018). Sie eignen sich wegen der erhöhten neuronalen Vulnerabilität und der systemischen Degeneration gepaart mit einer Steigerung der Apoptose, des oxidativen Stress und der Inflammation gut dafür, verfrühtes Altern zu simulieren (Reglodi et al., 12/2018). Die Versuche wurden an jungen und alternden PACAP-Knockout-Mäusen sowie Wildtyp-Mäusen durchgeführt (Reglodi et al., 12/2018). Die Ergebnisse bestärkten die Hypothese, dass PACAP eine schützende Rolle bei altersabhängigen degenerativen Prozessen spielt (Reglodi et al., 08/2018). Es wurde präsenile Amyloidose bei den jungen PACAP-Knockout-Mäusen festgestellt (Reglodi et al., 08/2018). Außerdem entwickelte sich senile Amyloidose früher und häufiger (Reglodi et al., 08/2018). Sie war stärker ausgeprägt und weiter verbreitet in der alternden PACAP-Knockout-Gruppe im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Reglodi et al., 08/2018).

Nonaka et al. (2020) betonten den protektiven Effekt von PACAP bei Schlaganfall und Demenz. Ein entscheidender Aspekt für Therapeutika bei

Schlaganfall ist die Blut-Hirn-Schranke, welche den Austausch von Peptiden und regulatorischen Proteinen zwischen Blut und ZNS kontrolliert (Nonaka et al., 2020). Im Mausmodell wurde beobachtet, dass dieser Transport bei Schlaganfall und Alzheimer Demenz gestört war (Nonaka et al., 2020). Das neuroprotektive PACAP ist in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu durchqueren und somit interessant für die Suche nach geeigneten Therapeutika für Erkrankungen wie Schlaganfall und Alzheimer Demenz (Nonaka et al., 2020).

1.7 Cholinerge Aktivität und PACAP

Der Effekt von PACAP auf die cholinerge Aktivität wurde von Masuo et al. (1993) untersucht. Bereits bekannt war, dass VIP die ACh-Synthese an cholinergen Nervenendigungen im Hippocampus bei Ratten aktiviert (Masuo et al., 1993). Im Hippocampus wurden auch für das mit VIP verwandte PACAP eine hohe Dichte von Bindungsstellen nachgewiesen (Masuo et al., 1993). Bei den Experimenten von Masuo et al. (1993) wurden VIP, PACAP38 und PACAP27 durch eine Mikroinjektionskanüle in den Bereich des dorsalen Hippocampus appliziert. Mithilfe von Mikrodialyse wurde herausgefunden, dass die Gabe von VIP, PACAP38 und PACAP27 (12 und 120 pmol) zu einer calcium- und dosisabhängigen Erhöhung der ACh-Ausschüttung führte (VIP > PACAP38 > PACAP27) (Masuo et al., 1993).

Während der Forschungen von Roberto et al. (2000) wurde der Einfluss von PACAP38 auf exzitatorische cholinerge Synapsen der hippocampalen CA1-Region bei Ratten untersucht. Eine kurzzeitige Applikation von PACAP38 (0,05 nmol) induzierte eine lang anhaltende Förderung der basalen Transmission (Roberto et al., 2000). PACAP38 bewirkt präsynaptisch eine gesteigerte ACh-Freisetzung (Roberto et al., 2000). Dies steht im Einklang mit den Forschungsergebnissen von Masuo et al. (1993).

Takei et al. (2000) beschrieben den schützenden Einfluss von PACAP auf das Überleben septaler cholinergischer Neurone in vitro und in vivo. PACAP-mRNA wird im sich entwickelnden und im adulten Hippocampus exprimiert (Takei et al., 2000). Dies ist die Hauptzielregion von septalen cholinergen Neuronen (Takei

et al., 2000). Es stellte sich heraus, dass PACAP in Gewebeproben des Septums von embryonalen und postnatalen Ratten die Anzahl der Neuronen, die immunhistochemisch für ChAT gefärbt wurden, erhöht (Takei et al., 2000). Zusätzlich fördert PACAP die ChAT-Aktivität (Takei et al., 2000).

Dass PACAP nicht nur embryonale und postnatale cholinerge Neurone, sondern auch adulte Neurone in vitro als neurotropher Faktor beeinflussen kann, berichteten Yuhara et al. (2001). PACAP verdoppelte die Anzahl an ChAT-immunreaktiven adulten Neuronen, die aus dem basalen Vorderhirn von Ratten kultiviert wurden (Yuhara et al., 2001). Darüber hinaus verbesserte PACAP das Überleben und das Axonwachstum (Yuhara et al., 2001).

Auf die therapeutischen Möglichkeiten von PACAP in Bezug auf kognitive Erkrankungen mit reduzierter cholinergischer Transmission wurde von Pecoraro et al. (2017) aufmerksam gemacht. Es wurde festgestellt, dass eine subnanomolare Konzentration von PACAP präsynaptisch ausreicht, um die glutaminerge Transmission durch ACh im Hippocampus bei Ratten zu regulieren (Pecoraro et al., 2017).

1.8 Neuroregeneration und PACAP

Chen et al. (2006) untersuchten den Effekt von PACAP-Gabe und endogener PACAP-Defizienz auf Infarktvolumen und neurologische Funktionen in einem Mausmodell mit Schlaganfall nach Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO). Die Gabe von PACAP38 intravenös oder intracerebroventrikulär eine Stunde nach MCAO führte bei einer Messung, die 24 Stunden später durchgeführt wurde, zu einer signifikanten Reduzierung des Infarktvolumens und zu einer Verbesserung der motorischen Defizite bei Wildtyp-Mäusen (Chen et al., 2006). Sowohl Infarktvolumen als auch motorische Einschränkungen waren bei PACAP-defizienten Mäusen stärker ausgeprägt als bei Wildtyp-Mäusen (Chen et al., 2006). Die Behandlung mit PACAP führte bei PACAP-defizienten Mäusen jedoch in gleichem Maß wie bei Wildtyp-Mäusen zu einer Besserung (Chen et al., 2006).

Dass sich PACAP-Defizienz in gestörter Nervenregeneration und verstärkter Neuroinflammation äußert, wurde von Armstrong et al. (2008) beschrieben. Die Forschung wurde an PACAP-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen durchgeführt, um die Auswirkungen von endogenem PACAP nach Verletzung des Nervus facialis zu untersuchen (Armstrong et al., 2008). Die Ergebnisse zeigten, dass die Axonregeneration bei PACAP-defizienten Mäusen signifikant verlangsamt war (Armstrong et al., 2008). Diese gestörte Regeneration war mit einem 8- bis 12-fachen Anstieg der Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen (Tumornekrosefaktor alpha, Interferon gamma und Interleukin 6) und einem 90% Rückgang der anti-inflammatorischen Zytokine (Interleukin 4) assoziiert (Armstrong et al., 2008).

Laut Reglodi et al. (2011) gilt PACAP als ein potentes neurotrophes und neuroprotektives Peptid. Es hat sowohl in vitro als auch in vivo eine schützende Wirkung auf Neuronen (Reglodi et al., 2011). In neuronalen Zellkulturen wurde nachgewiesen, dass PACAP bei verschiedenen toxischen Einflüssen neuroprotektiv ist (Reglodi et al., 2011). Auch bei Experimenten mit ischämischer und traumatischer Hirnschädigung sowie bei Neurodegeneration zeigte PACAP seine neuroprotektiven Eigenschaften (Reglodi et al., 2011). Basierend auf diesen Beobachtungen könnte endogen entstandenes und exogen appliziertes PACAP bei der Behandlung neurodegenerativer Krankheiten eine Rolle spielen (Reglodi et al., 2011).

Brifault et al. (2015) thematisierten ebenfalls die Therapieoptionen von PACAP. Drei Tage nach permanenter fokaler Ischämie wurden PACAP produzierende Stammzellen nicht immunsupprimierten Mäusen intracerebroventrikulär transplantiert (Brifault et al., 2015). Die Zufuhr von PACAP in die Nähe der Infarktzone führte zu einer schnellen, dauerhaften, effizienten und funktionellen Erholung (Brifault et al., 2015). Hierzu entsprechend kam es zu einer Regulierung der postischämischen, inflammatorischen Mikroglia-Antwort (Brifault et al., 2015). Besonders im Hinblick auf dieses verspätete und somit neue Therapiefenster betonten Brifault et al. (2015) die therapeutischen Möglichkeiten von PACAP bei der Behandlung von Schlaganfall.

Matsumoto et al. (2016) beschrieben, dass PACAP bei adulten Mäusen in die hippocampale Neurogenese nach einem Schlaganfall involviert ist. In der subgranularen Zone (SGZ) des Hippocampus besteht Neurogenese ein Leben

lang und wird in Folge von Ischämie hochreguliert (Matsumoto et al., 2016). Diese hochregulierte Neurogenese kann nach Schlaganfall zur Erholung beitragen (Matsumoto et al., 2016). PACAP hat einen weitreichenden Effekt auf neuronale Stammzellen während der neuronalen Entwicklung, aber auch auf adulte neuronale Stammzellen der Subgranularzone (Matsumoto et al., 2016). Ciranna et al. (2019) beschäftigten sich mit der Thematik, inwiefern PACAP die hippocampale synaptische Transmission und Plastizität moduliert. Der Hippocampus ist eine Hirnregion, die eine Kernrolle für Lernen und Gedächtnisfunktion darstellt (Ciranna et al., 2019). Studien zeigten, dass reduzierte Level an PACAP und Veränderungen der PACAP-Rezeptor-Expression zu kognitiver Einschränkung führen (Ciranna et al., 2019). Bemerkenswert ist, dass sich die Gabe von PACAP im Mausmodell des Alterns und bei Alzheimer Demenz positiv auf synaptische Plastizität und Lernen auswirkt (Ciranna et al., 2019).

1.9 Fragestellungen und Hypothesen

Gegenwärtig ist nicht bekannt, wie sich der Knockout von PACAP, PAC1 und ApoE zusammen mit cholesterinreicher Ernährung auf das hippocampale cholinerge Neurotransmittersystem auswirkt. Dies gilt es in dieser Forschungsarbeit erstmalig zu untersuchen.

Angesichts der oben geschilderten Rolle von PACAP (siehe 1.1 bis 1.8) fokussiert die vorliegende Arbeit folgende Forschungsfragen:

- Welche cholinerge Innervation (ChAT, VACHT) zeigt sich im Hippocampus der Mäuse?
- Gibt es Unterschiede zwischen den Gruppen an Mäusen (ApoE^{-/-}, PACAP^{-/-} ApoE^{-/-}, PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}, WT) bezüglich der hippocampalen cholinergen Innervation?

- Wie unterscheidet sich die cholinerge Innervation innerhalb verschiedener Regionen des Hippocampus (CA1, CA3, DG)?
- Welche Unterschiede ergibt ein Vergleich zwischen Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Fütterung?
- Auf welche Weise beeinflusst die unterschiedliche Fütterung (Diät 10+20, Standard 30) die cholinerge Innervation im Hippocampus?

Folgende Hypothesen werden geprüft:

- Genetischer Knockout (ApoE^{-/-}, PACAP^{-/-} ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}) führt zu veränderter cholinergischer Innervation (ChAT und VAcHT) im Vergleich zum Wildtyp.
- Fettreiche Ernährung (Diät 10 + 20) führt im Vergleich zu Standard 30 Diät zu einer Änderung der cholinergen Innervation.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Fütterung

Um den Einfluss von PACAP auf das cholinerge Neurotransmittersystem zu ermitteln, wurden die Gehirne von Einzel- oder Doppel-Gen-defizienten Mäusen untersucht. Folgende Gruppen an Mäusen lagen vor:

- ApoE -/-
- PACAP-/- ApoE-/-
- PAC1-/- ApoE-/-
- Wildtyp (WT)

Die eine Gruppe an Mäusen wurde 30 Wochen mit Standardfutter (Standard 30) ernährt. Die andere Gruppe an Mäusen bekam für 10 Wochen Standardfutter und danach 20 Wochen lang fett-/ cholesterinreiche Nahrung, sogenannte „Western Diet“ (Diät 10 + 20).

Die Analyse erfolgte mithilfe von Paraffinschnitten der Gehirne und immunhistochemischen Versuchen mit Nickel-verstärkter Streptavidin-Biotin-Peroxidase sowie anschließender Mikroskopie. Da der Hippocampus als Zentrum des Lernens und des Gedächtnisses gilt (Ciranna et al., 2019) und dort eine hohe cholinerge Aktivität sowie ein hohes Vorkommen von PACAP und PAC1 besteht (Takei et al., 2000), wurden verschiedene hippocampale Regionen (CA1, CA3 und Gyrus dentatus) untersucht. Als Marker für das cholinerge Neurotransmittersystem wurden die Acetylcholin-synthesierende Cholinacetyltransferase (ChAT) und der vesikuläre Acetylcholin-Transporter (VACHT) verwendet.

2.2 Antikörper

Primär-Antikörper

- ChAT (Cholinacetyltransferase) (Verdünnung 1:100)
- VACHT (Vesikulärer Acetylcholin-Transporter) (Verdünnung 1:2000)

Sekundär-Antikörper

- do-a-gt (donkey anti-goat) (Verdünnung 1:200, bei ChAT)
- do-a-rb (donkey anti-rabbit) (Verdünnung 1:200, bei VACHT)

ChAT und VACHT sind Proteine, die für die cholinerge Neurotransmission notwendig sind (Ichikawa et al., 1997). Die Verteilungsmuster im ZNS für mRNA, Proteine und Zellkörper von ChAT und VACHT sind unterschiedlich (Ichikawa et al., 1997). Demzufolge wurden in dieser Forschungsarbeit Antikörper sowohl gegen ChAT als auch gegen VACHT verwendet, um die cholinerge Aktivität mittels Immunhistochemie bestmöglich analysieren zu können.

Es wurden auch immunhistochemische Experimente mit Antikörpern gegen VIP (Vasoaktives intestinales Peptid) durchgeführt. Hierbei konnten bei den ersten Messungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Im weiteren Verlauf wurde sich auf Antikörper gegen ChAT und VACHT konzentriert. Daten zu VIP sind im Folgenden nicht aufgeführt.

2.3 Chemikalien

- Xylol
- Isopropanol: 100 %, 96 %, 80 %, 70 %
- Peroxidase-Block (3 ml H₂O₂ in 600 ml Methanol)
- H₂O Analyse (Aqua dest.)
- Zitratpuffer (54 ml 0,1 M Zitronensäure + 246 ml 0,1 M Natriumcitrat + 2700 ml Aqua bidest)
- BSA (Bovines Serumalbumin)
- PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) (6,55 g 9,5 mM NaH₂PO₄xH₂O + 36,05 g 40,5 mM Na₂HPO₄x2H₂O + 45,00 g 153 mM NaCl)
- Avidin
- Biotin
- AB-Komplex (Avidin-Biotin-Komplex, 20 µl Lösung Avidin + 20 µl Lösung Biotin in 1 ml 1 % BSA-PBS)
- DAB (Diaminobenzidin) (16 ml)
- Nickel (8 ml)
- Lösung von 100 mg DAB-Aliquot und 600 mg Nickel-Aliquot in 800 ml PBS
- H₂O₂ (112 µl)
- DePeX, Eukitt (Einschlussharz)

2.4 Gerätschaften

- Mikrotom
- Wasserbad
- Wärmeplatte
- Trockenschrank
- Feinwaage
- Magnetrührer
- pH-Meter
- Thermometer
- Vortexer (Reagenzglas-Schüttler)
- Absauger
- PAP-Pen
- Pipetten
- Inkubator
- Spritzflasche
- Mikroskop

2.5 Programme

- Microsoft Word
- Microsoft Excel
- Clarivate Analytics Endnote
- ImageJ Fiji
- Olympus cellSens
- GraphPad Prism
- Google Übersetzer

2.6 Versuchsablauf

2.6.1 Immunhistochemie

Mithilfe eines Mikrotoms wurden die Gewebeschnitte der sagittalisierten Mäusegehirne im Paraffinblock angefertigt. Die Schnittdicke wurde auf 7 μm eingestellt. Es wurden vier zusammenhängenden Gewebeschnitte auf einen Objektträger positioniert.

Zur Übersicht wurden Giemsa-Färbungen (Azur-Eosin-Methylenblau) angefertigt (siehe Abbildungen 1 und 2).

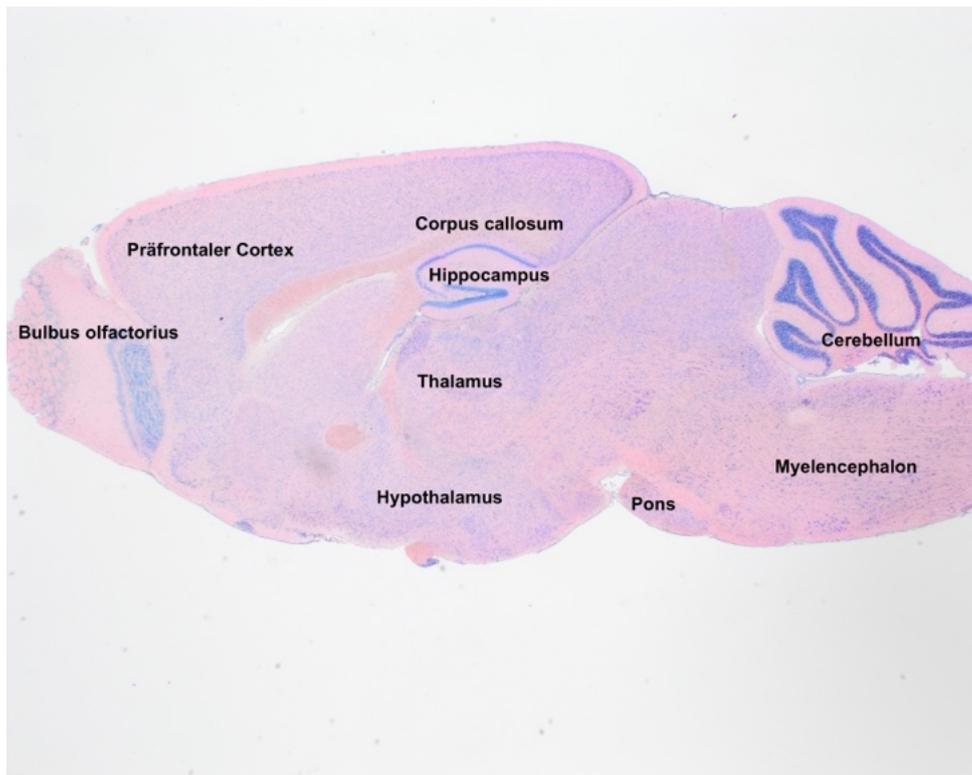


Abbildung 1: Gehirn einer Maus im Sagittalschnitt (Giemsa-Färbung), Gruppe: Wildtyp, Fütterung: 10+20, wichtige Regionen des Gehirns wurden beschriftet.

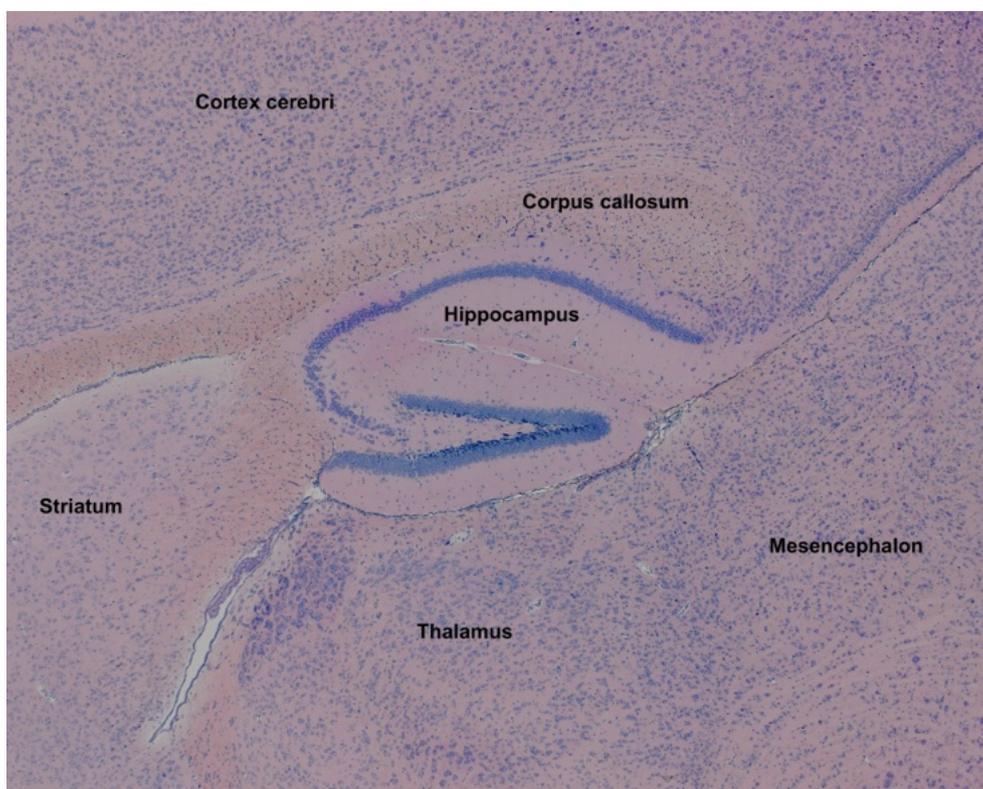


Abbildung 2: Hippocampus einer Maus im Sagittalschnitt (Giemsa-Färbung), Gruppe: Wildtyp, Fütterung: 10+20, zur besseren Orientierung wurden umliegende Hirnregionen beschriftet.

Versuchsablauf DAB/ Nickel

1. Tag

Für Paraffinschnitte:

- Xylol 1 10 min, Lösen des Paraffins aus dem Gewebe durch Xylol und Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe
- Xylol 2 10 min
- Xylol 3 10 min
- Abs. Isopropanol 10 min
- Peroxidase-Block 30 min, Verhinderung einer zu starken Hintergrundreaktion durch die endogene Peroxidase des Gewebes (Noll et al., 2000)
- Abs. Isopropanol 10 min
- 96 % Isopropanol 5 min
- 80 % Isopropanol 5 min
- 70 % Isopropanol 5 min
- H₂O Analyse 2 x 5 min
- Kochen in Zitratpuffer 10 min (92 – 95 Grad Celsius), Aufhebung der durch Formalinfixierung verursachten Proteinvernetzung (Noll et al., 2000)
- H₂O Analyse 5 min
- PAP-Pen Objektträger trocken saugen, Schnitte einzeln umfahren
- 5 % BSA-PBS 30 min
- 1 % BSA-PBS 5 min
- 30 % Avidin 20 min
- 1 % BSA-PBS 5 sek
- 30 % Biotin 20 min
- 1% BSA-PBS 5 min
- Primär-Ak in Arbeitsverdünnung (ChAT 1:100,

- feuchte Kammer VACHT 1:2000) auftropfen
Inkubation über Nacht (16 Grad Celsius)

2. Tag

- Brutschrank Inkubation für 2 h bei 37 Grad Celsius
- Spritzflasche Ak mit H₂O abspülen, Waschschritte, um eine nachfolgende spezifische Antikörperbindung zu gewährleisten (Noll et al., 2000)
- Waschen in Aqua bidest 3 x 5 min
- Waschen in PBS 10 min
- 0,5 % BSA-PBS 1 min
- biotinylierten Sekundär-Ak (do-a-gt bei ChAT bzw. do-a-rb bei VACHT in Arbeitsverdünnung 1:200 auftropfen, dann Inkubation für 45 min bei 37 Grad Celsius
- Spritzflasche Ak mit H₂O abspülen
- Waschen in Aqua bidest 3 x 5 min
- Waschen in PBS 10 min
- 0,5 % BSA-PBS 1 min
- AB-Komplex Inkubation für 30 min bei 37 Grad Celsius
- Spritzflasche mit H₂O spülen
- Waschen in Aqua bidest 3 x 5 min
- Waschen in PBS 10 min
- DAB-Nickel vorinkubieren für 5 min
- H₂O₂ hinzugeben und 8 min weiter inkubieren
- Aqua bidest 3 x 5 min
- Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe dehydrieren:
- 70 % Isopropanol 5 min
- 80 % Isopropanol 5 min
- 96 % Isopropanol 5 min
- Abs. Isopropanol 10 min
- Xylol 3 10 min
- Xylol 2 10 min

- Xylol 1 10 min
- Eindeckeln mit Depex

Ergänzung zu 2. Tag:

An den Biotin-markierten Sekundär-Ak bindet der bereits vorher hergestellte Enzymkomplex. Bei diesem Enzymkomplex wird das Enzym über Biotin an das Avidin gebunden, wobei eine Bindungsstelle zur Kopplung des biotinmarkierten Sekundär-Ak frei bleibt (Noll et al., 2000). Bei dieser Methode wird die starke Affinität von Avidin zu Biotin genutzt (Noll et al., 2000).

2.6.2 Mikroskopie

Die Aufnahmen der Gewebeschnitte wurden mithilfe eines Lichtmikroskops (Olympus) und des Computerprogramms Olympus cellSens in den Vergrößerungen 1.25x, 4x, 10x, 20x und 40x angefertigt. Die 1.25x, 4x und 10x Vergrößerungen dienen zur Übersicht, wohingegen die 40x Vergrößerung zur Auswertung der hippocampalen Regionen CA1, CA3 und Gyrus dentatus (DG) benutzt wurde (siehe Abbildung 3).

Initial wurde der Cortex auch mikroskopisch untersucht. Eine objektive Zählung der immunhistochemisch markierten Zellkörper mithilfe des Programms imageJ war nicht fehlerfrei möglich, da Artefakte nicht ausgeschlossen werden konnten. Erste manuelle Zählungen der cholinergen Zellkörper im Cortex zeigten keine signifikanten Unterschiede. Diese Daten sind hier nicht aufgeführt. Während der weiteren Auswertung wurde sich auf die Region des Hippocampus konzentriert.

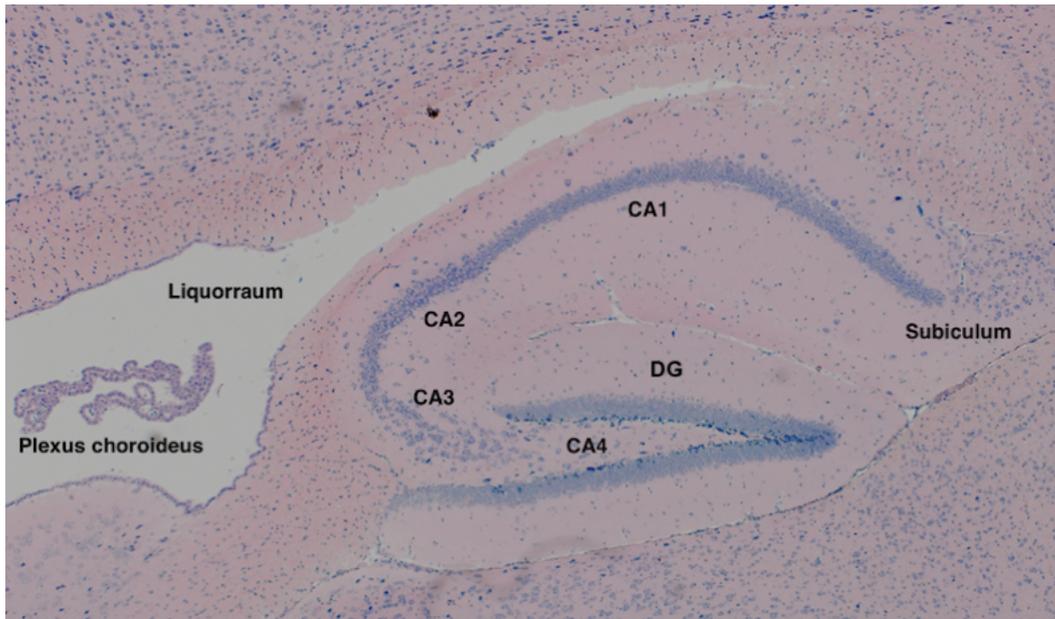


Abbildung 3: Hippocampus-Regionen, Gruppe: PACAP^{-/-} ApoE^{-/-}, Fütterung: 10+20

2.7 Untersuchungsgebiet

2.7.1 Histologie des Hippocampus

Der Hippocampus ist entscheidend für die Gedächtnisfunktion und besteht aus den Subregionen Gyrus dentatus (DG), Cornu ammonis (CA) und Subiculum (siehe Abbildung 3 und 4) (Welsch et al., 2010). Die Subregionen sind dreischichtig aufgebaut (Welsch et al., 2010). Sie bestehen aus einer mittleren zellreichen Schicht, die jeweils von einer zellarmen Schicht umgeben ist (Welsch et al., 2010). Die Zellkörper des Hippocampus sind S-förmig angeordnet (Welsch et al., 2010). Im Gyrus dentatus befinden sich Körnerzellen und im Cornu ammonis Pyramidenzellen (Welsch et al., 2010). Bezüglich der Anordnung, Morphologie und Verschaltung der Pyramidenzellen wird das Cornu ammonis in 4 Subsektoren (CA1 – CA4) unterteilt (Welsch et al., 2010). Die CA4-Region liegt neben dem Gyrus dentatus und wird von Körnerzellen des Gyrus dentatus umschlossen (Welsch et al., 2010). Die CA3-Region ist durch eine dichte Pyramidenzellschicht charakterisiert und geht in die CA2-Region über (Welsch et al., 2010). Die CA1-Region besteht aus einer weniger kompakten Pyramidenzellschicht und macht den größten Teil des Hippocampus

aus (Welsch et al., 2010). Das Subiculum schließt sich der CA1-Region an (Welsch et al., 2010). Die Zellen des Hippocampus bilden eine neuronale Verschaltungskette (Welsch et al., 2010).

2.7.2 Hippocampus und PACAP

Da der Hippocampus sowohl im Zusammenhang mit PACAP und PAC1 als auch mit dem cholinergen System (ChAT, VAChT) eine wesentliche Rolle spielt (Ciranna et al., 2019), wurde sich bei der Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitte auf diese Region konzentriert.

Der Hippocampus ist eine Hirnregion, die eine Kernrolle für Lernen und Gedächtnisfunktion darstellt (Ciranna et al., 2019). Studien zeigten, dass reduzierte Spiegel an PACAP und Veränderungen der PACAP-Rezeptor-Expression zu kognitiver Einschränkung führen (Ciranna et al., 2019).

Matsumoto et al. (2016) beschrieben, dass PACAP bei adulten Mäusen in die hippocampale Neurogenese nach Schlaganfall involviert ist. In der subgranularen Zone des Hippocampus besteht Neurogenese ein Leben lang und wird in Folge von Ischämie hochreguliert (Matsumoto et al., 2016). Diese hochregulierte Neurogenese kann nach Schlaganfall zur Erholung beitragen (Matsumoto et al., 2016). PACAP hat einen weitreichenden Effekt auf neuronale Stammzellen während der Entwicklung, aber auch auf adulte neuronale Stammzellen der Subgranularzone (Matsumoto et al., 2016).

Bei PAC1-defizienten Mäusen fiel ein Defizit bei Hippocampus-abhängigem assoziativen Lernen auf (Hashimoto et al., 2002).

Roberto et al. (2000) untersuchten den Einfluss von PACAP38 auf exzitatorische cholinerge Synapsen der hippocampalen CA1-Region bei Ratten. Die Applikation von PACAP38 (0,05 nmol) induzierte eine lang anhaltende Förderung der basalen Transmission (Roberto et al., 2000). PACAP38 bewirkte präsynaptisch eine gesteigerte Acetylcholin-Freisetzung (Roberto et al., 2000).

Mit Hilfe des Olympus cellSens Mikroskops wurden, wie in der Abbildung 4 gezeigt, vier Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung erstellt.

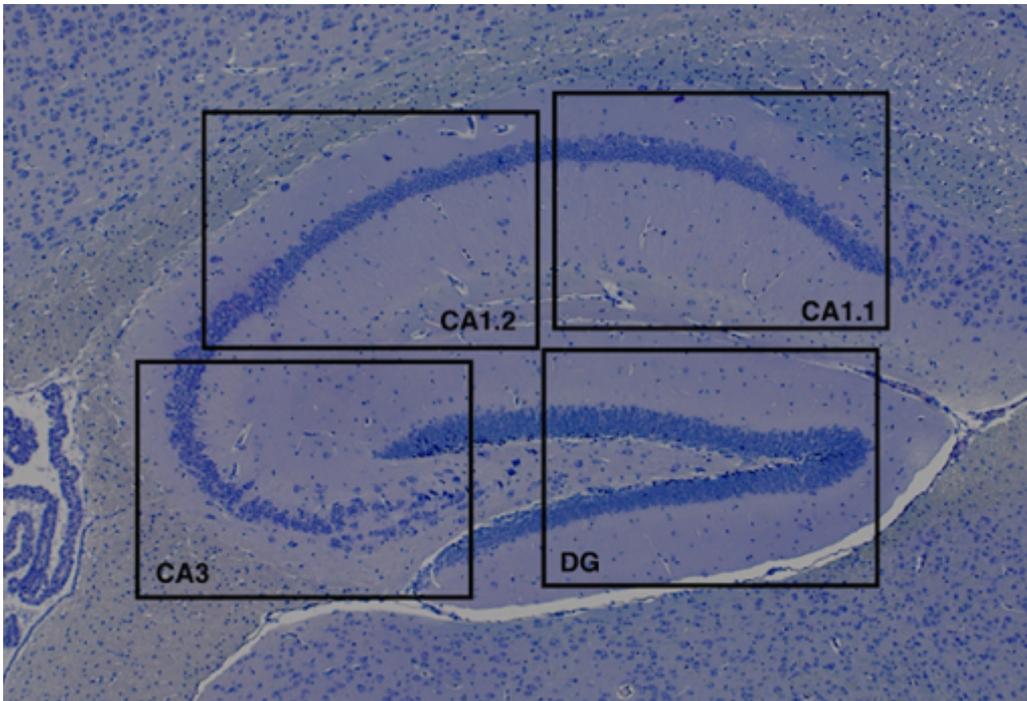


Abbildung 4: Untersuchte Hippocampus-Regionen (Giemsa-Färbung), Gruppe: PACAP-/- ApoE-/-, Fütterung: 10+20,

Die Auswertung der Aufnahmen wurde randomisiert durchgeführt. Zunächst wurden die Bilder im TIFF-Format gespeichert und mit dem Computerprogramm Fiji-Imagej geöffnet. Anschließend wurden die Bilder von dem farbigen RGB-Color-Modus (siehe Abbildung 5) in den 8-bit-Modus, in dem nur Graustufen angezeigt werden (siehe Abbildung 6), konvertiert. Danach wurden die Bilder in binär (schwarz – weiß) umgewandelt und der Flächenanteil (Area fraction) der gefärbten Fasern im Verhältnis zum gesamten Bild ermittelt.

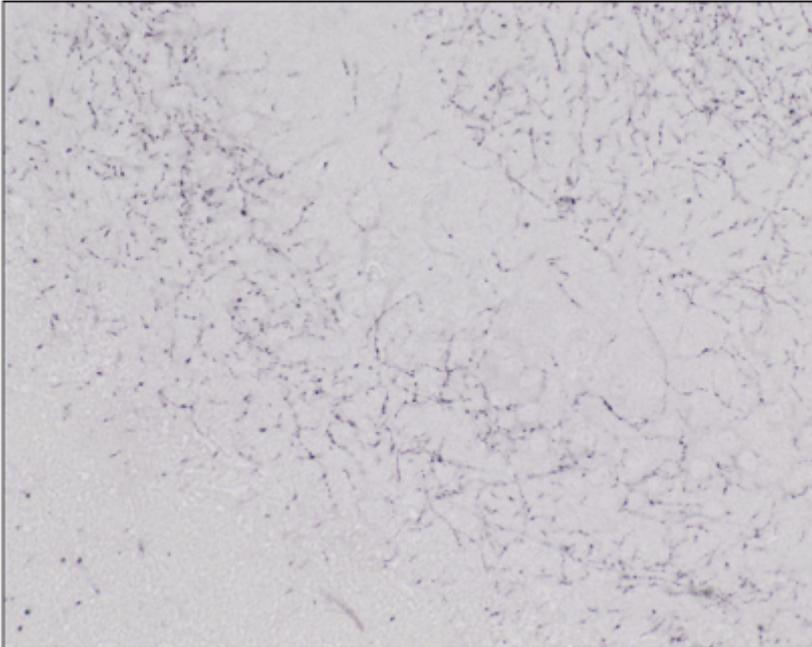


Abbildung 5: Auswertung CA3-Region, Graustufen, ChAT, Gruppe: ApoE^{-/-}, Fütterung: 10+20

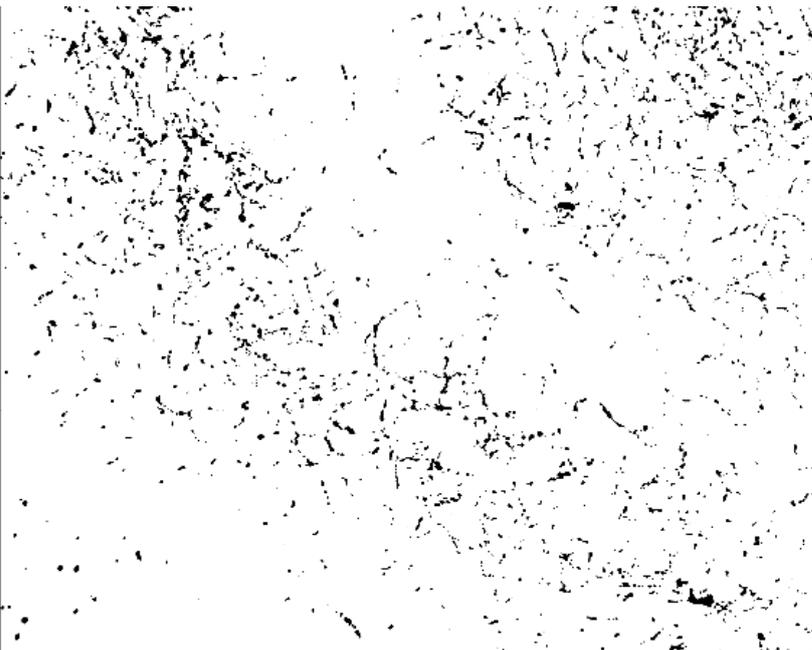


Abbildung 6: Auswertung CA3-Region, schwarz-weiß, ChAT, Gruppe: ApoE^{-/-}, Fütterung: 10+20

2.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der Software ImageJ Fiji, Microsoft Excel und GraphPad Prism durchgeführt. Durch das Programm ImageJ Fiji konnte der Anteil der immunhistochemisch gefärbten Flächen in das Verhältnis zur gesamten Fläche der Aufnahme einer bestimmten Region des Hippocampus gesetzt werden. Dieser prozentuelle Flächenanteil wurde anschließend in eine Tabelle der Software Microsoft Excel eingefügt, beschriftet und geordnet. Es wurden Mittelwerte berechnet, um die Daten in einer Ergebnistabelle anschaulicher darstellen zu können. Um den Wert für die CA1-Region zu berechnen, wurden der Mittelwert aus CA1.1 und CA1.2 erstellt. Für den Wert des gesamten Hippocampus (HC) wurde der Mittelwert aus CA1.1, CA1.2, CA3 und DG berechnet. Des Weiteren wurde die Daten in das Programm GraphPad Prism importiert. Hier konnten Grafiken erstellt und statistische Tests durchgeführt werden, die für eine statistische Analyse genutzt wurden.

Die Stichprobengröße war bei den immunhistochemischen Färbungen für ChAT und VACHT:

- ChAT: 40 Tiere, 115 Schnitte, 458 Aufnahmen
- VACHT: 40 Tiere, 135 Schnitte, 535 Aufnahmen

Es wurden bei ChAT für jede Mäusegruppe 3 bis 6 Tiere (durchschnittlich 5 Tiere) untersucht, 6 bis 19 Schnitte (durchschnittlich 14 Schnitte) erstellt und 24 bis 64 Aufnahmen (durchschnittlich 57,25 Aufnahmen) angefertigt.

Bei VACHT wurden für jede Mäusegruppe 4 bis 6 Tiere (durchschnittlich 5 Tiere) analysiert, 12 bis 21 Schnitte (durchschnittlich 16,88 Schnitte) erzeugt und 48 bis 84 Aufnahmen (durchschnittlich 66,88 Aufnahmen) gemacht.

3 Ergebnisse

Statistische Tests

Mithilfe des Pearson-D`Agostino-Tests und des Shapiro-Wilk-Tests ist es möglich Daten auf eine Abweichung von der Gausschen Normalverteilung zu prüfen (Graphpad Prism, 2021).

Die ANOVA (englisch: Analysis of variance, deutsch: Varianzanalyse) ist ein statistischer Test, der es ermöglicht, die Mittelwerte von mehr als zwei Gruppen miteinander zu vergleichen (Graphpad Prism, 2021).

Mittels Two-Way-ANOVA kann man eine statistische Analyse durchführen, wenn die Fragestellung von zwei Faktoren abhängig ist (Graphpad Prism, 2021).

Der Tukey`s-multiple-comparison-Test ist ein Folgetest der Two-Way-ANOVA. Hierbei ist es möglich jeden Mittelwert mit jedem anderen Mittelwert zu vergleichen (Graphpad Prism, 2021).

Die Abbildungen zur Darstellung der Ergebnisse und Ergebnistabellen der abschließenden Untersuchung sind im Folgenden aufgeführt. Die weiteren Ergebnistabellen befinden sich im Anhang.

Um die Zahlenwerte besser optisch darstellen und statistisch analysieren zu können, wurden alle Einzelwerte der Messungen (für ChAT 458 Werte, für VACHT 535 Werte) in das Programm GraphPad Prism eingefügt.

Zur Beantwortung der initial gestellten Fragen dieser Forschungsarbeit (siehe 1.9) wurden verschiedene Regionen des Hippocampus, Knockout-Gruppen und Fütterungen miteinander verglichen. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant eingestuft.

3.1 ChAT, Fütterung 10+20: Vergleich hippocampaler Regionen innerhalb einer Knockout-Gruppe

Zunächst wurden bei ChAT folgende Grafiken erstellt. Hierbei wurden die verschiedenen Regionen des Hippocampus innerhalb der gleichen Fütterung (Diät 10+20) und innerhalb der gleichen Knockout-Mäusegruppe verglichen.

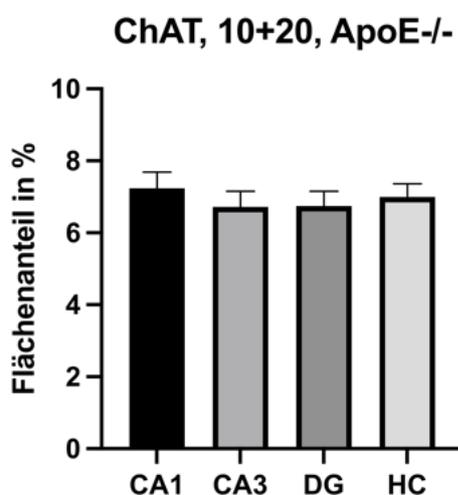


Abbildung 7: Statistische Auswertung I

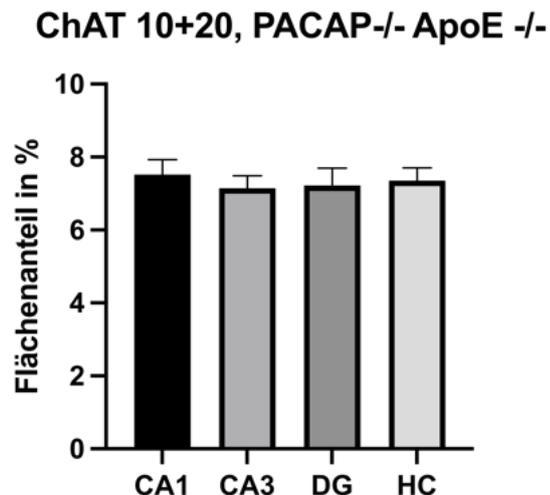


Abbildung 8: Statistische Auswertung II

Zu Abbildung 7: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG

und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: ChAT, Fütterung: 10+20, Knockout: ApoE^{-/-}, n-Werte: 19 (CA1), 19 (CA3), 19 (DG), 19 (HC).

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary One Way ANOVA ergab einen p-Wert von 0,7964 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 8: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: ChAT, Fütterung: 10+20, Knockout: PACAP^{-/-} ApoE^{-/-}, n-Werte: 18 (CA1), 18 (CA3), 18 (DG), 18 (HC).

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,9168 und somit keinen signifikanten Unterschied.

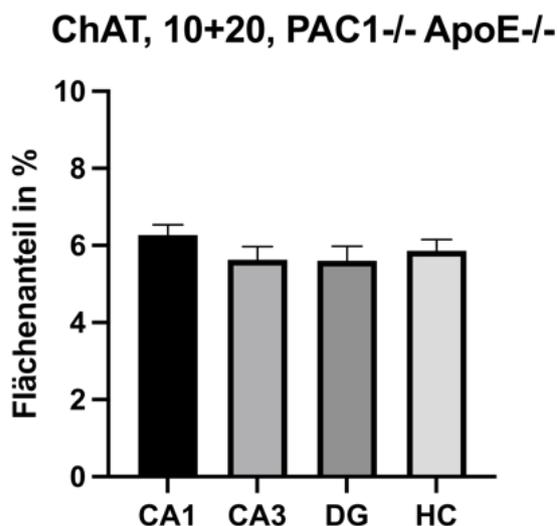


Abbildung 9: Statistische Auswertung III

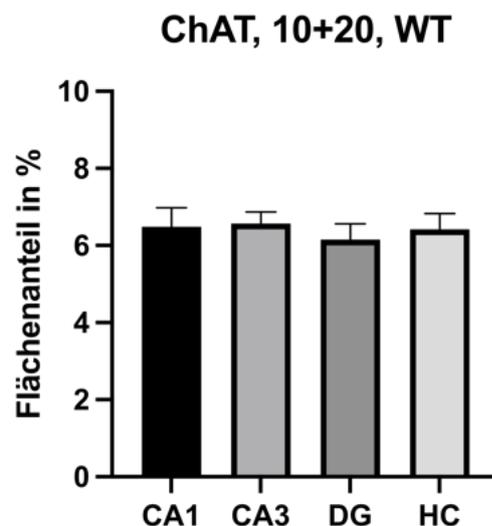


Abbildung 10: Statistische Auswertung IV

Zu Abbildung 9: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: ChAT, Fütterung: 10+20, Knockout: PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}, n-Werte: 19 (CA1), 19 (CA3), 19 (DG), 19 (HC).

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,4275 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 10: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: ChAT, Fütterung: 10+20, Wildtyp, n-Werte: 16 (CA1), 16 (CA3), 16 (DG), 16 (HC).

Im D'Agostino-Pearson Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,8980 und somit keinen signifikanten Unterschied.

3.2 ChAT, Fütterung 10+20: Unterschiedliche Knockout-Gruppen im Vergleich

Im Folgenden wurde bei ChAT mit der Fütterung Diät 10+20 die immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil-Werte der verschiedenen Mäusegruppen (Knockout und Wildtyp) miteinander verglichen und eine statistische Analyse durchgeführt.

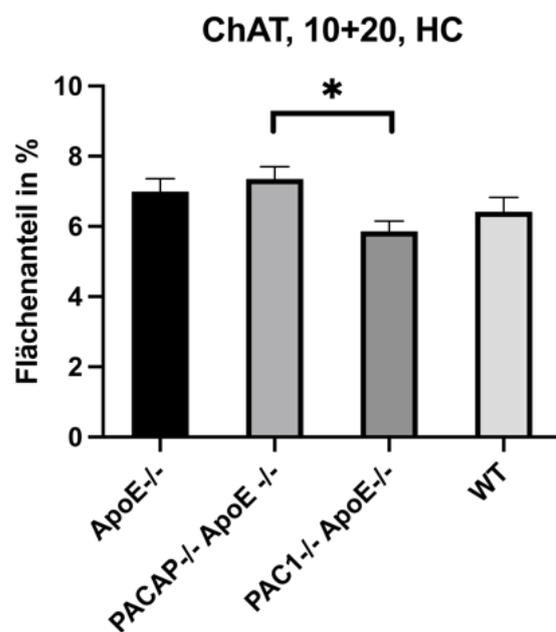


Abbildung 11: Statistische Auswertung V

Zu Abbildung 11: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der Knockout Gruppen ApoE-/-, PACAP-/- ApoE-/-, PAC1-/- ApoE-/- und WT, Gruppe: ChAT, Fütterung: 10+20, Region:

gesamter Hippocampus (HC), Signifikanz: * $p < 0,05$, n-Werte: 19 (ApoE^{-/-}), 19 (PACAP^{-/-} ApoE^{-/-}), 19 (PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}), 19 (WT).

* Dieser signifikante Unterschied ist in der Region des Gyrus dentatus am stärksten ausgeprägt.

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,0196 und somit einen signifikanten Unterschied. Nun wurde der Tukey's-multiple-comparison-Test durchgeführt. Dieser kam zu dem Schluss, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen dem HC-Flächenanteilswert der Gruppe PACAP^{-/-}ApoE^{-/-} und der Gruppe PAC1^{-/-}ApoE^{-/-} gab. Der adjustierte p-Wert lag hierbei bei 0,0179. Der signifikante Unterschied wurde in der Grafik mit einem * markiert.

3.3 ChAT, Fütterung Standard 30: Vergleich hippocampaler Regionen innerhalb einer Knockout-Gruppe

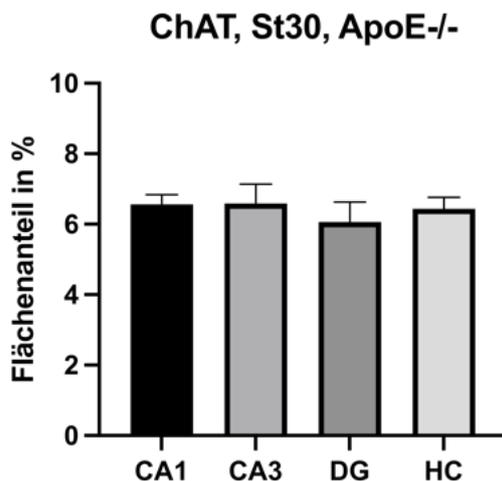


Abbildung 12: Statistische Auswertung VI

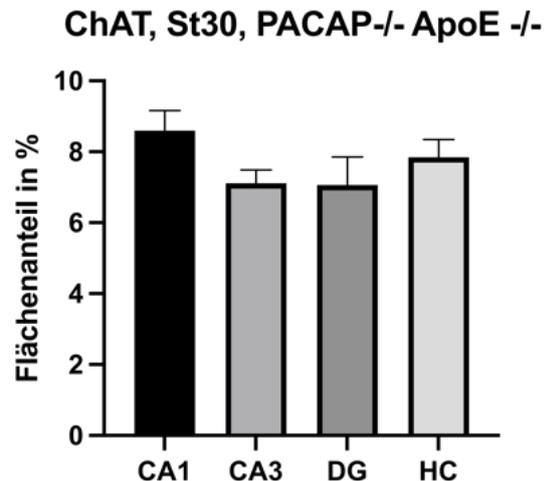


Abbildung 13: Statistische Auswertung VII

Zu Abbildung 12: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: ChAT, Fütterung: Standard 30, Knockout: ApoE^{-/-}, n-Werte: 11 (CA1), 11 (CA3), 11 (DG), 11 (HC).

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,8330 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 13: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: ChAT, Fütterung: Standard 30, Knockout: PACAP-/- ApoE-/-, n-Werte: 13 (CA1), 13 (CA3), 13 (DG), 13 (HC).

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,2092 und somit keinen signifikanten Unterschied.

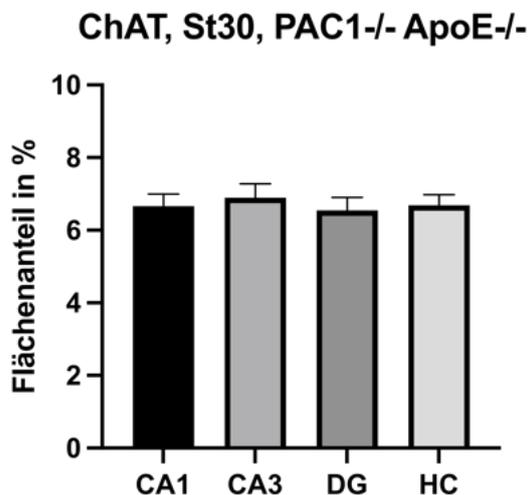


Abbildung 14: Statistische Auswertung VIII

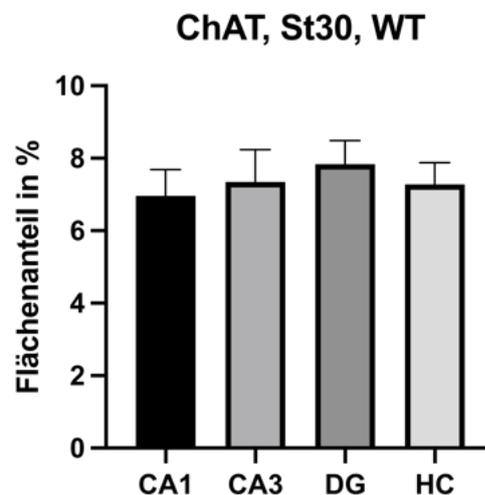


Abbildung 15: Statistische Auswertung IX

Zu Abbildung 14: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: ChAT, Fütterung: Standard 30, Knockout: PAC1-/- ApoE-/-, n-Werte: 13 (CA1), 13 (CA3), 13 (DG), 13 (HC).

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,9099 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 15: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG

und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: ChAT, Fütterung: Standard 30, Wildtyp, n-Werte: 6 (CA1), 6 (CA3), 6 (DG), 6 (HC).

Im Shapiro-Wilk-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,9099 und somit keinen signifikanten Unterschied.

3.4 ChAT, Fütterung Standard 30: Unterschiedliche Knockout-Gruppen im Vergleich

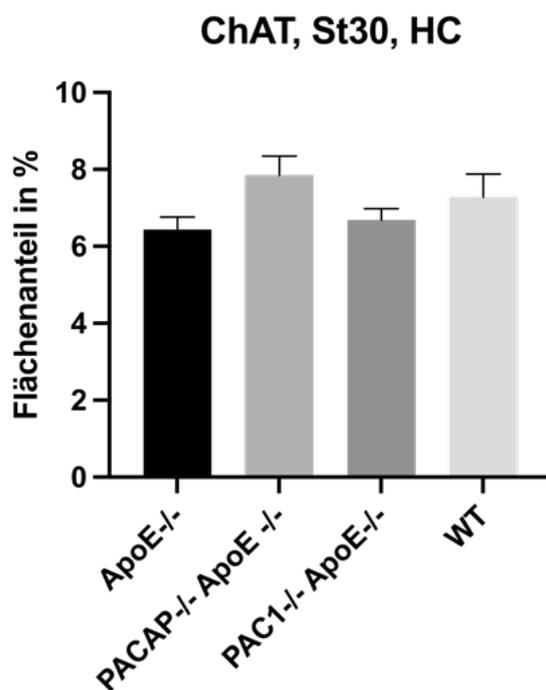


Abbildung 16: Statistische Auswertung X

Zu Abbildung 16: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der Knockout Gruppen ApoE-/-, PACAP-/- ApoE-/-, PAC1-/- ApoE-/- und WT, Gruppe: ChAT, Fütterung: Standard 30, Region: gesamter Hippocampus (HC), n-Werte: 11 (ApoE-/-), 13 (PACAP-/- ApoE-/-), 13 (PAC1-/- ApoE-/-), 6 (WT).

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,0731 und somit keinen signifikanten Unterschied.

3.5 ChAT: Vergleich zwischen Knockout-Gruppe und Wildtyp

Anschließend wurden bei ChAT zum einen die verschiedenen Knockouts gegenüber dem Wildtyp (WT) verglichen und zum anderen die verschiedenen Arten der Fütterung. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt:

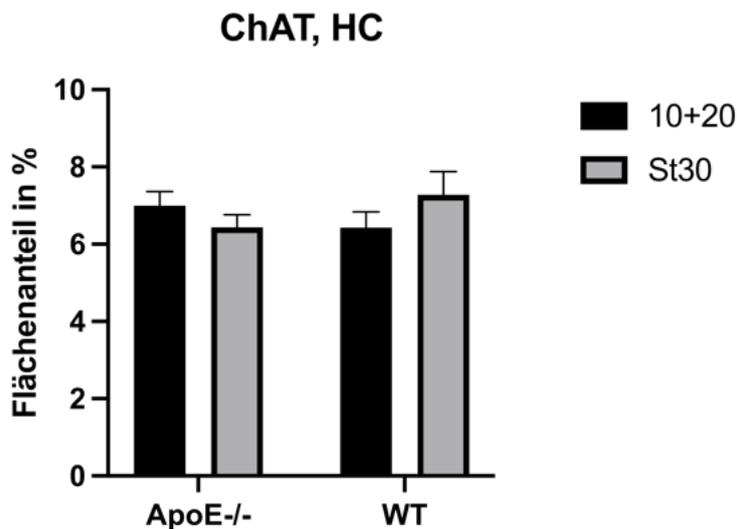


Abbildung 17: Statistische Auswertung XI

Zu Abbildung 17: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der Knockout Gruppe ApoE-/- und WT, Gruppe: ChAT, Fütterung: 10+20 und Standard 30, Region: gesamter Hippocampus (HC), n-Werte: 19 (ApoE-/-, 10+20), 11 (ApoE-/-, St30), 16 (WT, 10+20), 6 (WT, St30).

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde keine signifikante Interaktion (p-Wert 0,1342) gefunden.

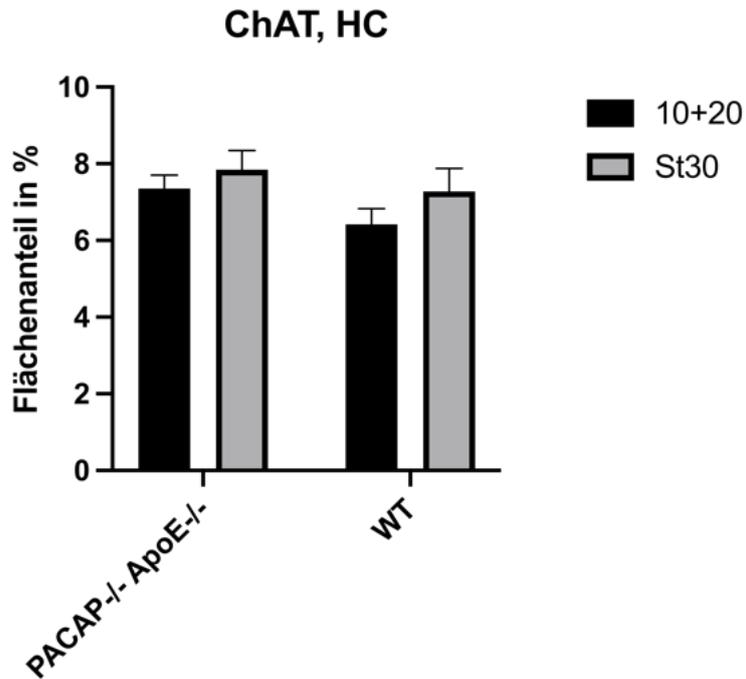


Abbildung 18: Statistische Auswertung XII

Zu Abbildung 18: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der Knockout Gruppe PACAP-/- ApoE-/- und WT, Gruppe: ChAT, Fütterung: 10+20 und Standard 30, Region: gesamter Hippocampus (HC), n-Werte: 18 (PACAP-/- ApoE-/-, 10+20), 13 (PACAP-/- ApoE-/-, St30), 16 (WT, 10+20), 6 (WT, St30).

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde keine signifikante Interaktion (p-Wert 0,7127) gefunden.

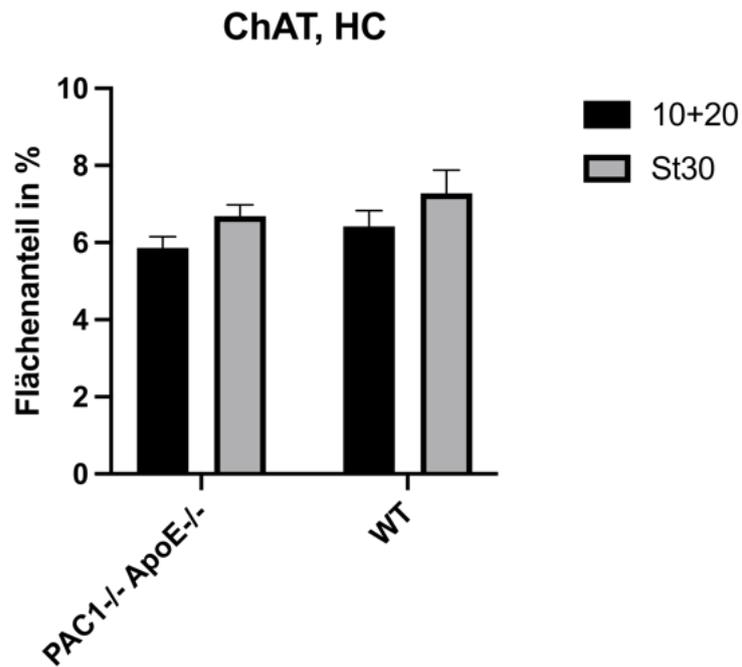


Abbildung 19: Statistische Auswertung XIII

Zu Abbildung 19: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der Knockout Gruppe PAC1^{-/-} ApoE^{-/-} und WT, Gruppe: ChAT, Fütterung: 10+20 und Standard 30, Region: gesamter Hippocampus (HC), n-Werte: 19 (PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}, 10+20), 13 (PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}, St30), 16 (WT, 10+20), 6 (WT, St30).

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde keine signifikante Interaktion (p-Wert 0,9759) gefunden.

3.6 ChAT: Vergleich aller Gruppen

Schließlich wurden bei ChAT alle Mäusegruppen und Fütterungen miteinander verglichen:

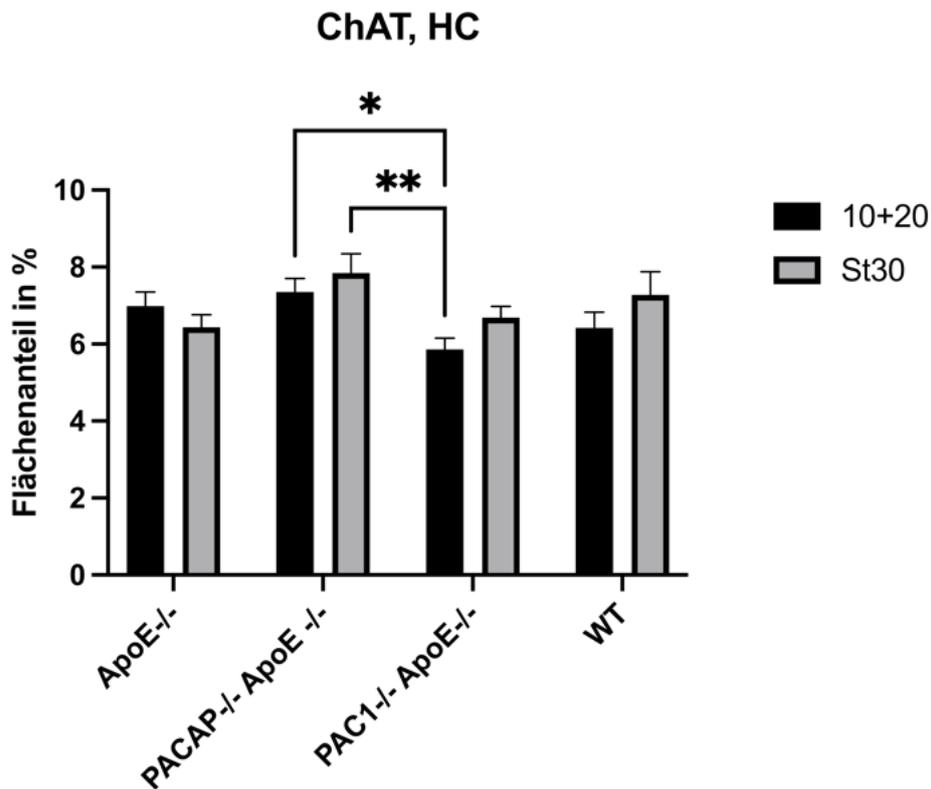


Abbildung 20: Statistische Auswertung XIV

Zu Abbildung 20: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der Knockout Gruppe ApoE-/-, PACAP-/- ApoE-/-, PAC1-/- ApoE-/- und WT, Gruppe: ChAT, Fütterung: 10+20 und Standard 30, Region: gesamter Hippocampus (HC), Signifikanz: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$, n-Werte: 19 (ApoE-/-, 10+20), 11 (ApoE-/-, St30), 18 (PACAP-/- ApoE-/-, 10+20), 13 (PACAP-/- ApoE-/-, St30), 19 (PAC1-/- ApoE-/-, 10+20), 13 (PAC1-/- ApoE-/-, St30), 16 (WT, 10+20), 6 (WT, St30).

*Dieser signifikante Unterschied ist in der Region des Gyrus dentatus am stärksten ausgeprägt.

**Dieser signifikante Unterschied ist in der Region CA1 am stärksten ausgeprägt.

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde eine Signifikanz (p-Wert 0,0062) festgestellt. Der anschließend durchgeführte Tukey's-multiple

comparison-Test zeigte zwischen PACAP-/- ApoE -/- der Fütterung 10+20 und PAC1-/- ApoE-/- der Fütterung 10+20 einen signifikanten Unterschied (p-Wert 0,0471). Darüber hinaus ergab dieser Test einen signifikanten Unterschied (p-Wert 0,0059) zwischen PACAP-/- ApoE -/- der Fütterung St30 und PAC1-/- ApoE-/- der Fütterung 10+20. Die Signifikanz $p < 0,05$ wurde mit * und $p < 0,01$ mit ** verdeutlicht.

Hier wurden die Werte, die Abbildung 20 zu Grunde liegen, tabellarisch dargestellt.

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	10+20	St30	10+20	St30	10+20	St30	10+20	St30
Knockout	ApoE	ApoE	PACAP/ ApoE	PACAP/ ApoE	PAC1/ ApoE	PAC1/ ApoE	WT	WT
Region	HC	HC	HC	HC	HC	HC	HC	HC
Anzahl der Werte	19	11	18	13	19	13	16	6
Minimum	3,769	4,641	3,964	4,217	3,678	4,986	3,904	5,746
Maximum	9,910	7,912	9,417	10,11	8,034	8,489	9,348	9,417
Mittelwert	6,987	6,441	7,353	7,847	5,862	6,691	6,423	7,276
Standard- abweichung	1,617	1,056	1,481	1,812	1,255	1,039	1,625	1,470
Standardfehler des Mittelwertes	0,3711	0,3183	0,3491	0,5025	0,2880	0,2881	0,4062	0,6000

Tabelle 1: Statistische Auswertung XIV

3.7 VACHT, Fütterung 10+20: Vergleich hippocampaler Regionen innerhalb einer Knockout-Gruppe

Im Anschluss daran wurden bei VACHT die verschiedenen Regionen des Hippocampus innerhalb der gleichen Fütterung (Diät 10+20) und innerhalb der gleichen Knockout-Mäusegruppe verglichen und resultierend folgende Grafiken erstellt.

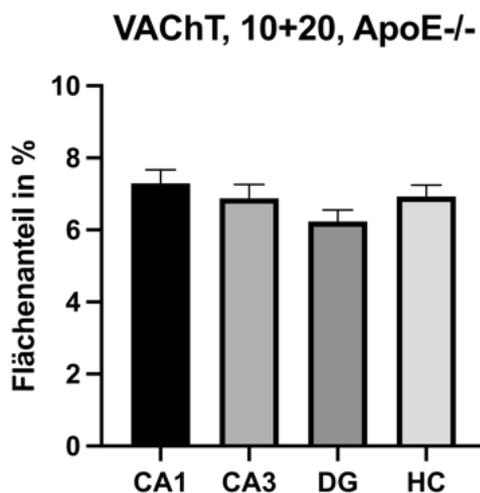


Abbildung 21: Statistische Auswertung XV

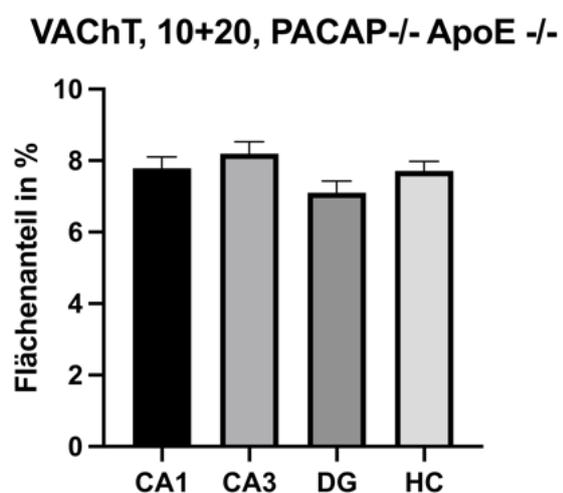


Abbildung 22: Statistische Auswertung XVI

Zu Abbildung 21: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: VACHT, Fütterung: 10+20, Knockout: ApoE-/-

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,1981 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 22: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: VACHT, Fütterung: 10+20, Knockout: PACAP-/- ApoE-/-

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,1100 und somit keinen signifikanten Unterschied.

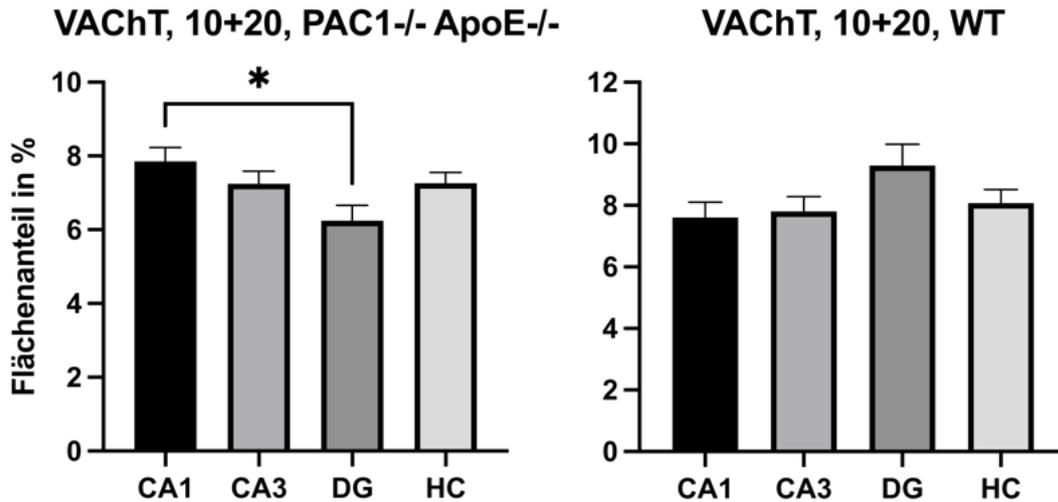


Abbildung 23: Statistische Auswertung XVII

Abbildung 24: Statistische Auswertung XVIII

Zu Abbildung 23: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: VACHT, Fütterung: 10+20, Knockout: PAC1-/- ApoE-/-, $p^* < 0,05$

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,0208 und somit einen signifikanten Unterschied. Nun wurde der Tukey's-multiple-comparison-Test durchgeführt. Dieser kam ebenfalls zu dem Schluss, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen der CA1- und der DG-Region innerhalb der PAC1-/- ApoE-/- Knockout Gruppe gab. Der adjustierte p-Wert lag hierbei bei 0,0127. Der signifikante Unterschied wurde in der Grafik mit einem * markiert.

Zu Abbildung 24: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: VACHT, Fütterung: 10+20, Wildtyp

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,1261 und somit keinen signifikanten Unterschied.

3.8 VACHT, Fütterung 10+20: Unterschiedliche Knockout-Gruppen im Vergleich

Im Folgenden wurde bei VACHT mit der Fütterung Diät 10+20 die immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil-Werte der verschiedenen Mäusegruppen (Knockout und Wildtyp) miteinander verglichen und eine statistische Analyse durchgeführt.

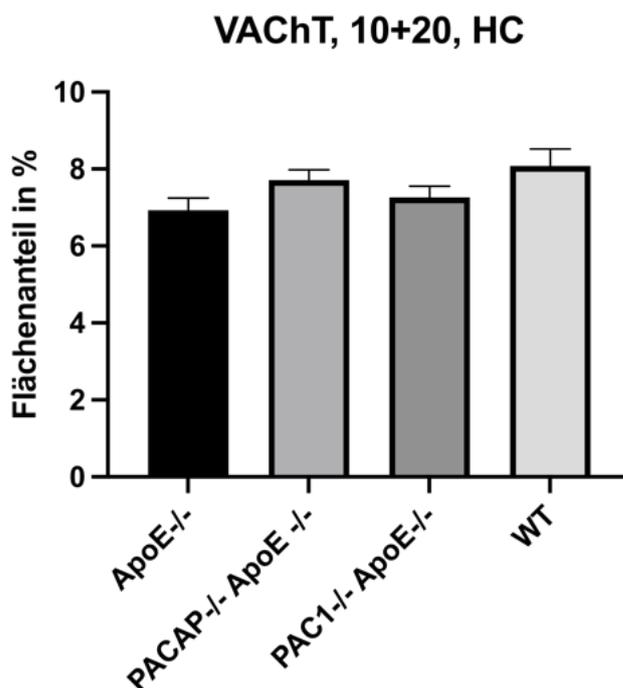


Abbildung 25: Statistische Auswertung XIX

Zu Abbildung 25: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der Knockout Gruppen ApoE-/-, PACAP-/- ApoE-/-, PAC1-/- ApoE-/- und WT, Gruppe: VACHT, Fütterung: 10+20, Region: gesamter Hippocampus (HC)

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,0773 und somit keinen signifikanten Unterschied.

3.9 VACHT, Fütterung Standard 30: Vergleich hippocampaler Regionen innerhalb einer Knockout-Gruppe

Anschließend wurden bei VACHT die verschiedenen Regionen des Hippocampus innerhalb der gleichen Fütterung (Standard 30) und innerhalb der gleichen Knockout-Mäusegruppe verglichen und folgende Grafiken erstellt.

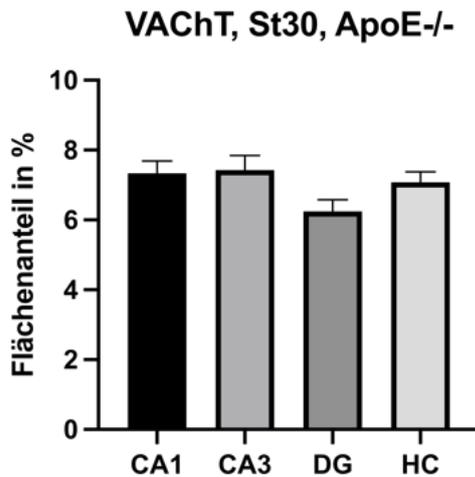


Abbildung 26: Statistische Auswertung XX

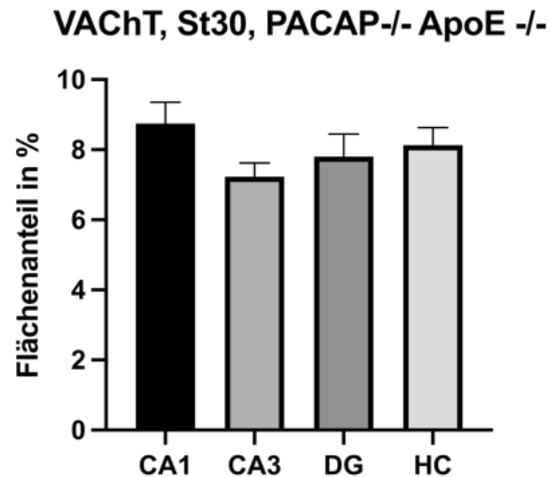


Abbildung 27: Statistische Auswertung XXI

Zu Abbildung 26: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: VACHT, Fütterung: Standard 30, Knockout: ApoE^{-/-}

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,0795 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 27: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: VACHT, Fütterung: Standard 30, Knockout: PACAP^{-/-} ApoE^{-/-}

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,2669 und somit keinen signifikanten Unterschied.

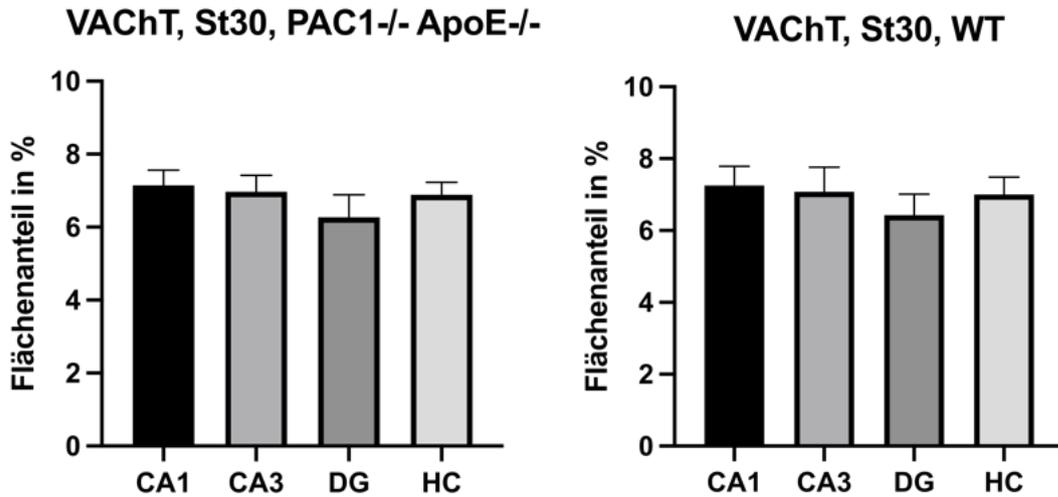


Abbildung 28: Statistische Auswertung XXII

Abbildung 29: Statistische Auswertung XXIII

Zu Abbildung 28: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: VACHT, Fütterung: Standard 30, Knockout: PAC1-/- ApoE-/-

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,5788 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 29: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der hippocampalen Regionen CA1, CA3, DG und des gesamten Hippocampus (HC), Gruppe: VACHT, Fütterung: Standard 30, Wildtyp

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,7599 und somit keinen signifikanten Unterschied.

3.10 VACHT, Fütterung Standard 30: Unterschiedliche Knockout-Gruppen im Vergleich

Im Folgenden wurde bei VACHT mit der Fütterung Standard 30 die immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil-Werte der verschiedenen Mäusegruppen (Knockout und Wildtyp) miteinander verglichen und eine statistische Analyse durchgeführt.

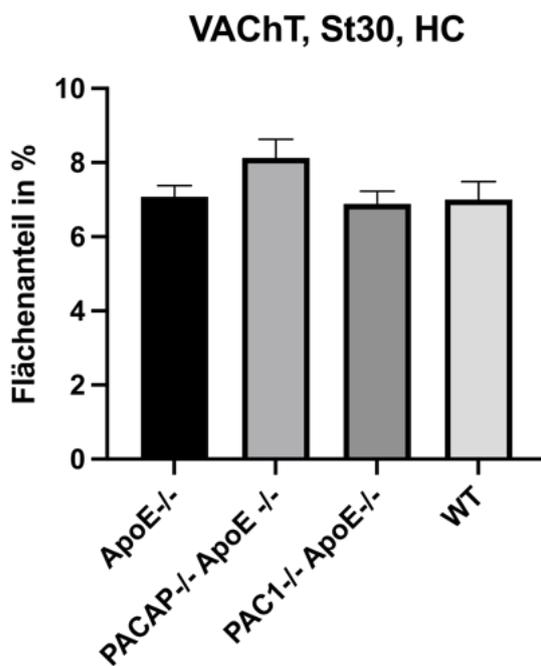


Abbildung 30: Statistische Auswertung XXIV

Zu Abbildung 30: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der Knockout Gruppen ApoE-/-, PACAP-/- ApoE-/-, PAC1-/- ApoE-/- und WT, Gruppe: VACHT, Fütterung: Standard 30, Region: gesamter Hippocampus (HC)

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,2002 und somit keinen signifikanten Unterschied.

3.11 VACHT: Vergleich zwischen Knockout-Gruppe und Wildtyp

Anschließend wurden bei VACHT zum einen die verschiedenen Knockouts gegenüber dem Wildtyp verglichen und zum anderen die verschiedenen Arten der Fütterung. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

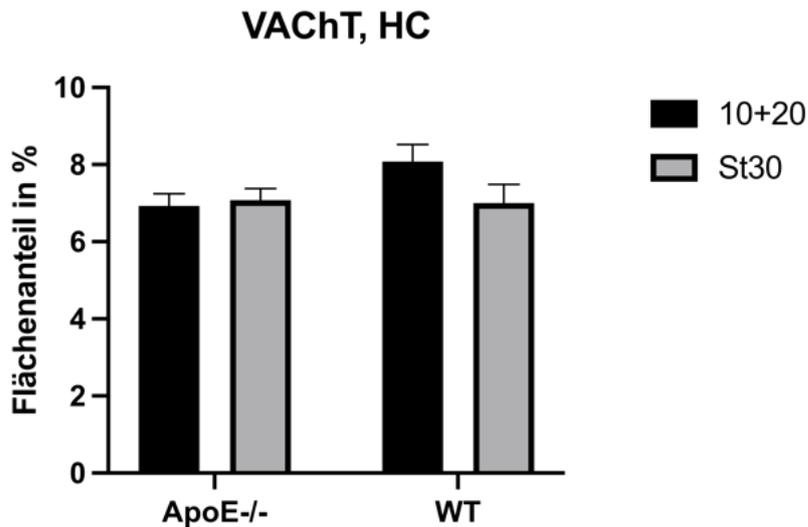


Abbildung 31: Statistische Auswertung XXV

Zu Abbildung 31: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der Knockout Gruppe ApoE-/- und WT, Gruppe: VACHT, Fütterung: 10+20 und Standard 30, Region: gesamter Hippocampus (HC)

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde keine signifikante Interaktion (p-Wert 0,1196) gefunden.

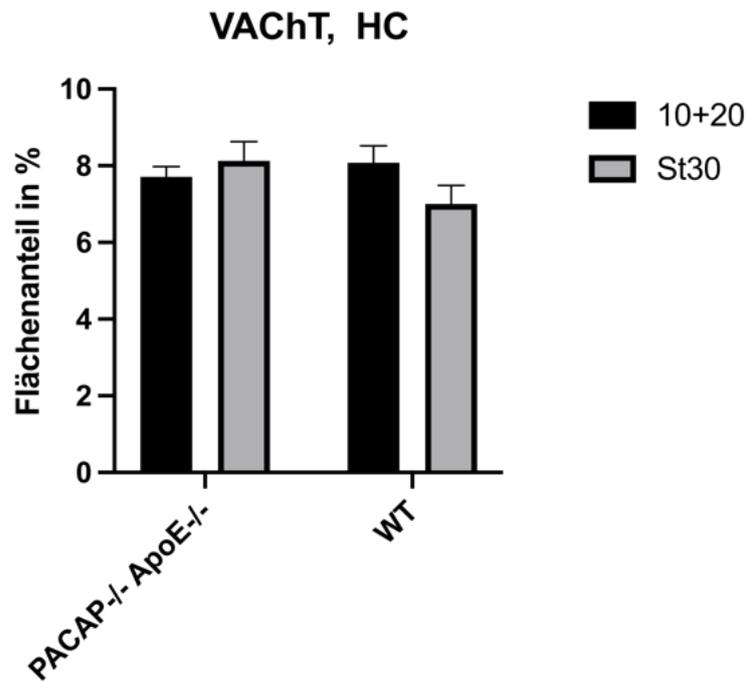


Abbildung 32: Statistische Auswertung XXVI

Zu Abbildung 32: immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der Knockout Gruppe PACAP-/- ApoE-/- und WT, Gruppe: VACHT, Fütterung: 10+20 und Standard 30, Region: gesamter Hippocampus (HC)

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde keine signifikante Interaktion (p-Wert 0,0812) gefunden.

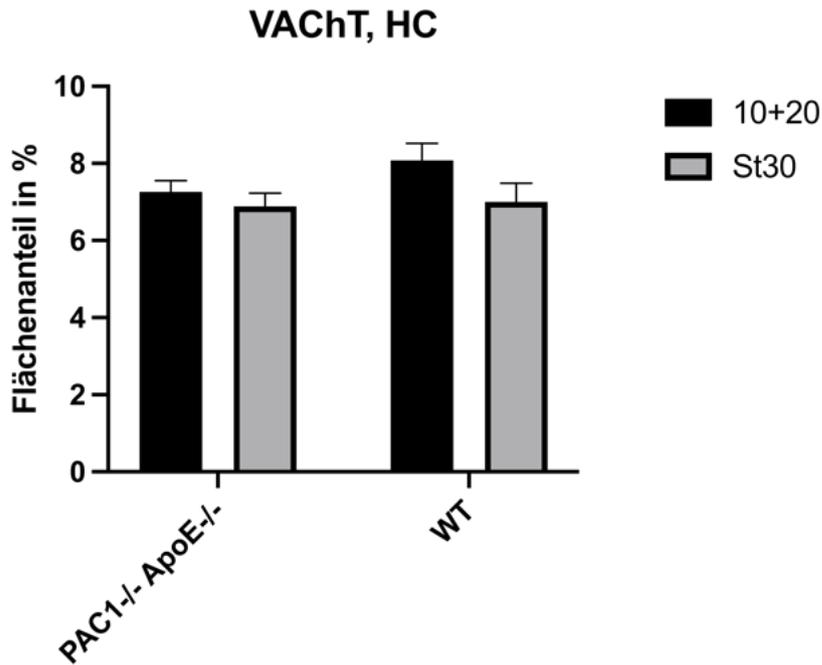


Abbildung 33: Statistische Auswertung XXVII

Zu Abbildung 33: Immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der Knockout Gruppe PAC1-/- ApoE-/- und WT, Gruppe: VACHT, Fütterung: 10+20 und Standard 30, Region: gesamter Hippocampus (HC)

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde keine signifikante Interaktion (p-Wert 0,4001) gefunden.

3.12 VACHT: Vergleich aller Gruppen

Zuletzt wurden bei VACHT alle Mäusegruppen und Fütterungen miteinander verglichen:

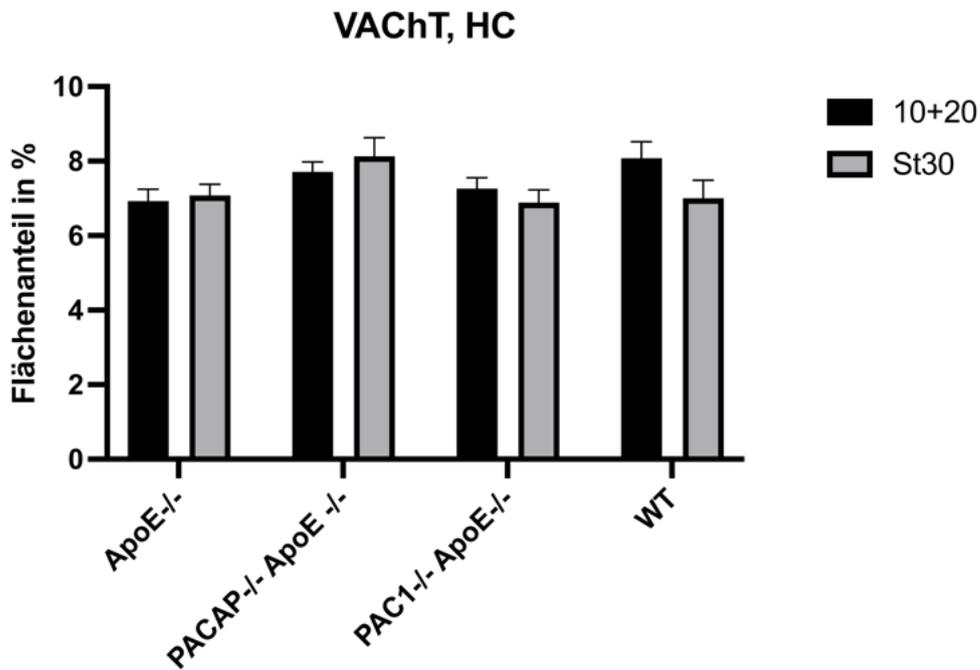


Abbildung 34: Statistische Auswertung XXVIII

Zu Abbildung 34: immunhistochemisch gefärbter Flächenanteil in Prozent, Mittelwerte und Standardfehler der Knockout Gruppe ApoE^{-/-}, PACAP^{-/-} ApoE^{-/-}, PAC1^{-/-} ApoE^{-/-} und WT, Gruppe: VACHT, Fütterung: 10+20 und Standard 30, Region: gesamter Hippocampus (HC)

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde keine signifikante Interaktion (p-Wert 0,1993) gefunden.

Hier wurden die Werte, welche die Grundlage für Abbildung 34 bilden, tabellarisch dargestellt.

Ak	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	10+20	St30	10+20	St30	10+20	St30	10+20	St30
Knockout	ApoE	ApoE	PACAP/ ApoE	PACAP/ ApoE	PAC1/ ApoE	PAC1/ ApoE	WT	WT
Region	HC	HC	HC	HC	HC	HC	HC	HC
Anzahl der Werte	21	17	21	12	19	12	15	18
Minimum	3,742	4,279	5,079	4,567	4,205	5,622	4,454	3,467
Maximum	10,23	9,712	9,309	10,21	9,955	9,219	11,46	9,811
Mittelwert	6,928	7,080	7,717	8,132	7,262	6,884	8,078	7,007
Standard- abweichung	1,443	1,228	1,199	1,723	1,265	1,203	1,700	2,035
Standardfehler des Mittelwertes	0,3149	0,2978	0,2617	0,4973	0,2902	0,3473	0,4389	0,4797

Tabelle 2: Statistische Auswertung XXVIII

4 Diskussion

Krankheitsbilder wie Atherosklerose, Schlaganfall und Morbus Alzheimer stellen in unserer heutigen Gesellschaft ein großes Problem dar (Hacke, 2016) (Deutsche Alzheimer Gesellschaft, 2021). Diese Krankheiten und ihre Folgen bedeuten für die Betroffenen oftmals einen hohen Leidensdruck. Gemäß der gesellschaftlichen Erwartung liegt es im Verantwortungsbereich des Gesundheitswesens und der Forschung der großen Herausforderung gerecht zu werden, eine adäquate Patientenversorgung sicherzustellen und neue Behandlungsmöglichkeiten zu entdecken.

PACAP hat neuroprotektive, immunmodulatorische und vasoregulatorische Eigenschaften (Holighaus et al., 2012) und in zahlreichen Studien wird das therapeutische Potential von PACAP betont (Brifault et al., 2015).

In der Literatur gibt es aktuelle Evidenz dafür, dass sowohl ApoE (Dolejsi et al., 2016) als auch PACAP (Liu et al., 2000) einen bedeutenden Einfluss auf das cholinerge Transmittersystem haben.

Ziel der Forschungsarbeit war es zu untersuchen, inwieweit sich PACAP- und PAC1-Defizienz bei ApoE-defizienten Mäusen unter Standard und unter cholesterinreicher Ernährung auf das cholinerge Neurotransmittersystem auswirken.

Es wurde angenommen, dass die fehlende protektive Wirkung von PACAP sowie der PAC1- und ApoE-Knockout einen Effekt auf die cholinerge Innervation haben werden. Zusätzlich wurde vermutet, dass die fettreiche Ernährung zu einer Veränderung der cholinergen Aktivität führen würde.

Im Rahmen der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit wurden folgende Forschungsfragen untersucht und nachfolgend in zusammengefasster Form beantwortet:

4.1 Welche cholinerge Innervation (ChAT, VAcHT) zeigt sich im Hippocampus der Mäuse?

4.2 Gibt es Unterschiede zwischen den Gruppen an Mäusen (ApoE^{-/-}, PACAP^{-/-} ApoE^{-/-}, PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}, WT) bezüglich der hippocampalen cholinergen Innervation?

Zu den Fragen 4.1 und 4.2:

Um zu eruieren, ob und inwieweit sich Unterschiede im Hinblick auf die cholinerge Innervation des Hippocampus zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen zeigen, wurden die erhobenen Daten statistisch analysiert.

ChAT, Diät 10+20

Zunächst wurden bei ChAT die Mäusegruppen (Knockout und Wildtyp) der Fütterung Diät 10+20 miteinander verglichen. Die statistische Analyse zeigte einen signifikanten Unterschied im Hinblick auf die hippocampale cholinerge Innervation zwischen der Gruppe PACAP^{-/-} ApoE^{-/-} und der Gruppe PAC1^{-/-} ApoE^{-/-} (PACAP^{-/-} ApoE^{-/-} > PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}).

Demzufolge ist anzunehmen, dass der Doppelknockout von PAC1^{-/-} und ApoE^{-/-} maßgeblich ist und im Vergleich zum Doppelknockout von PACAP^{-/-} und ApoE^{-/-} zu einer geringeren cholinergen Aktivität führt. Dieser signifikante Unterschied ist in der Gyrus-dentatus-Region des Hippocampus am stärksten ausgeprägt.

Somit ist die Frage naheliegend, warum der fehlende PACAP-spezifische PAC1-Rezeptor zu einer geringeren cholinergen Innervation im Hippocampus führt. Es liegt die Vermutung nahe, dass ein Fehlen von PAC1, als einer von drei PACAP-Rezeptoren, durch die anderen beiden intakten Rezeptoren

VPAC1 und VPAC2 besser kompensiert werden kann als ein Fehlen des Liganden PACAP. Die erhobenen Daten zeigen jedoch das Gegenteil. Die Gründe hierfür sind unklar.

ChAT, Diät Standard 30

Bei ChAT und der Fütterung Standard 30 wurde ebenfalls eine statistische Auswertung der hippocampalen, immunhistochemisch markierten Flächenanteil-Werte erhoben. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Mäusegruppen (Knockout und Wildtyp). Die signifikant erhöhte cholinerge Innervation von PACAP^{-/-} ApoE^{-/-} gegenüber PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}, die zuvor bei ChAT und der Diät 10+20 beobachtet wurde, konnte somit in der Diät-Standard-30-Gruppe nicht bestätigt werden.

Es besteht die Annahme, dass die unterschiedliche Ernährung der Mäuse die Ergebnisse beeinflusst hat, da sich der oben beschriebene signifikante Unterschied (PACAP^{-/-} ApoE^{-/-} > PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}) nur in der Gruppe der fettreich gefütterten Tiere zeigt. Welche weitere Auswirkung die Fütterung auf die cholinerge Innervation des Hippocampus hat, wurde im Verlauf untersucht. Die Resultate werden nachfolgend erläutert.

VACHT, Diät 10+20

Bei VACHT wurden wie bei ChAT die hippocampalen Flächenanteil-Werte der mit Diät 10+20 gefütterten Mäuse (Knockout und Wildtyp) miteinander verglichen und statistisch analysiert. Beim Testergebnis konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Folglich konnte bei VACHT nicht die gleiche Signifikanz wie in der entsprechenden Fütterung bei ChAT beobachtet werden.

VACHT, Diät Standard 30

Auch die Auswertung der Fütterung Standard 30 bezüglich der immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil-Werte der verschiedenen Mäusegruppen (Knockout und Wildtyp) ergab keinen signifikanten Unterschied.

Bei VACHT lässt sich nach den ersten Untersuchungen schlussfolgern, dass die Variable, ob die Mäuse mit Standardfutter oder mit „Western Diet“ ernährt

wurden, nicht in signifikantem Maße Einfluss auf die cholinerge Aktivität des Hippocampus hat. Ebenso scheint der unterschiedliche genetische Knockout der Mäuse keine entscheidende Rolle zu spielen. Dies widerspricht den initial erhobenen Hypothesen. Vor Beginn der Experimente wurde mit Kenntnis der aktuellen Literatur erwartet, dass sich durch genetischen Knockout und fettreiche Ernährung ein Unterschied im cholinergen Neurotransmittersystem zeigen würde.

4.3 Wie unterscheidet sich die cholinerge Innervation innerhalb verschiedener Regionen des Hippocampus (CA1, CA3, DG)?

ChAT, Diät 10+20

Es wurde sich mit der Frage beschäftigt, wie sich der immunhistochemisch gefärbte Anteil im Verhältnis zur Gesamtfläche zwischen den verschiedenen Regionen des Hippocampus unterscheidet. Hierbei wurden die verschiedenen Regionen des Hippocampus innerhalb der gleichen Fütterung (Diät 10+20) und innerhalb der gleichen Knockout-Mäusegruppe verglichen. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

ChAT, Diät Standard 30

Die Untersuchung der Hippocampus-Regionen CA1, CA3, DG der Standard 30 Fütterung ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

Folglich führte die unterschiedliche Fütterung bei ChAT nicht zu interregionalen Unterschieden.

VACHT, Diät 10+20

Bei VACHT wurden ebenfalls die verschiedenen Regionen des Hippocampus innerhalb der gleichen Fütterung (Diät 10+20) und innerhalb der gleichen Knockout-Mäusegruppe statistisch gegenübergestellt.

In der PAC1-/- ApoE-/- Knockout-Gruppe ergab die Ordinary-One-Way-ANOVA einen p-Wert von 0,0208 und somit einen signifikanten Unterschied. Nachfolgend wurde der Tukey's-multiple-comparison-Test durchgeführt. Die

Auswertung zeigte, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen der CA1- und der DG-Region innerhalb der PAC1^{-/-} ApoE^{-/-} Knockout-Gruppe gab (CA1 > DG). In den anderen Knockout-Gruppen und in der Wildtyp-Gruppe konnte dagegen keine Signifikanz nachgewiesen werden.

Dies stellt ein selektives und regionales Ergebnis dar. Es ist fraglich, wie groß der Stellenwert ist, da es sich hierbei um den einzigen interregionalen signifikanten Unterschied handelt. Im Hinblick auf die Literatur ist zu erwarten, dass in der weniger kompakten CA1-Region des Hippocampus weniger cholinerge Fasern vorkommen als im Gyrus dentatus. In den vorliegenden Forschungsergebnissen ist jedoch die Dichte der immunhistochemisch gefärbten cholinergen Fasern in der Gruppe der cholesterinreich gefütterten Mäuse in der CA1-Region höher als im Gyrus dentatus. Die Gründe dafür sind unbekannt.

VACHT, Diät Standard 30

Die statistische Auswertung der verschiedenen Hippocampus-Regionen kam bei VACHT und der Diät Standard 30 zu dem Ergebnis, dass kein signifikanter Unterschied besteht. Die in der Standard-30-Diät-Gruppe beobachteten interregionalen Unterschiede konnten nicht wiederholt festgestellt werden.

4.4 Was ergibt ein Vergleich zwischen Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Fütterung?

ChAT

Bei ChAT wurden zum einen die verschiedenen Knockouts gegenüber dem Wildtyp verglichen und zum anderen die verschiedenen Arten der Fütterung. Dies ergab keinen signifikanten Unterschied.

VACht

Die Berücksichtigung der unterschiedlichen Fütterung und der Vergleich der Knockout- und der Wildtyp-Mäuse ergab bei VACht ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

Dies steht im Widerspruch zu den eingangs genannten Hypothesen. Es wurden die Erwartungen geäußert, dass ein Fehlen des protektiven PACAP- oder PAC1-Gens zu einer Veränderung der hippocampalen cholinergen Aktivität führen würde. Die Wildtyp-Mäuse mit intakten Genen für ApoE, PACAP und PAC1 zeigten im Umkehrschluss keine höhere Aktivität der cholinergen Neurotransmitter.

4.5 Auf welche Weise beeinflusst die unterschiedliche Fütterung (Diät 10+20, Standard 30) die cholinerge Innervation im Hippocampus?

ChAT

In der abschließenden Analyse wurden bei ChAT alle Mäusegruppen und Fütterungen miteinander verglichen. Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde eine Signifikanz (p-Wert 0,0062) festgestellt.

Der anschließend durchgeführte Tukey`s-multiple-comparison-Test zeigte zwischen PACAP-/- ApoE-/- der Fütterung 10+20 und PAC1-/- ApoE-/- der Fütterung 10+20 einen signifikanten Unterschied (p-Wert 0,0471) (PACAP-/- ApoE-/- > PAC1-/- ApoE-/-). Dieser Unterschied ist in der Region des Gyrus dentatus am stärksten ausgeprägt.

Außerdem ergab dieser Test einen signifikanten Unterschied (p-Wert 0,0059) zwischen PACAP-/- ApoE-/- der Fütterung Standard 30 und PAC1-/- ApoE-/- der Fütterung 10+20 (PACAP-/- ApoE-/- > PAC1-/- ApoE-/-). Dieser Unterschied ist in der Region CA1 am stärksten ausgeprägt.

Schlussfolgernd ist festzustellen, dass der Knockout von PAC1 in beiden Fütterungen im Vergleich zum PACAP-Knockout zu einer stärkeren Reduzierung der cholinergen Innervation des Hippocampus führt.

Wenn PAC1 fehlt, hat PACAP keinen spezifischen Rezeptor an den es binden kann. Folglich ist die Aktivierung des cholinergen Neurotransmittersystems deutlich geringer. Dadurch kann das endogene PACAP seine Wirkung schlechter entfalten. Bei cholesterinreicher Nahrung scheint der Verlust von PAC1 besonders ins Gewicht zu fallen.

Wenn PACAP als Ligand aufgrund des genetischen Knockouts nicht vorhanden ist, resultiert dies in einer höheren cholinergen Innervation im Vergleich zum Verlust eines Rezeptors. Dies ist ein gegenteiliger Effekt. Eine ausführliche Literaturrecherche konnte keine Erklärung hierfür liefern.

VACht

Die Abschlussuntersuchung bei VACht, bei der alle Mäusegruppen und Fütterungen miteinander verglichen wurden, konnte keine Signifikanz nachweisen.

Bei VAcHT konnten nicht die gleichen signifikanten Unterschiede wie bei ChAT beobachtet werden. Eine potentielle Begründung hierfür könnte sein, dass es sich bei VAcHT im Gegensatz zu ChAT um ein strukturelles Protein handelt. Mittels ChAT ist es präziser möglich die enzymatische cholinerge Aktivität zu messen. Eine große Menge an ChAT bedeutet, dass viel Acetylcholin gebildet werden kann. Dies kann zu Neuroprotektion führen. Die Art der Fütterung hat bei VAcHT wenig Einfluss auf die cholinerge Aktivität im Hippocampus.

4.6 Gegenüberstellung eigener Forschungsergebnisse mit Fachliteratur

Unter Berücksichtigung der Forschungsergebnisse dieser wissenschaftlichen Arbeit wird darauf hingewiesen, dass durch den oftmals fehlenden signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Mäusegruppen nur eingeschränkte Schlussfolgerungen gezogen werden können. Im Folgenden werden die Forschungsergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen verwandter Literatur verglichen.

Hashimoto et al. (2002) konnten zeigen, dass PACAP^{-/-} Mäuse eine hohe Frühmortalität und PAC1^{-/-} Mäuse Defizite im hippocampalen assoziativen Lernen aufweisen. Während der vorliegenden experimentellen Forschung konnte kein signifikanter Unterschied der cholinergen Innervation des Hippocampus zwischen Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Aufgrund dieser immunhistochemisch erworbenen Daten kann angenommen werden, dass die Versuchstiere dieser Forschungsarbeit ebenfalls in Bezug auf hippocampales assoziatives Lernen keine signifikanten Unterschiede gezeigt hätten. Da die Versuchsmäuse zu Beginn dieser wissenschaftlichen Arbeit bereits getötet waren und die Gehirnhälften in Paraffin konserviert waren, ist es nicht möglich eine fundierte Aussage zum Lernverhalten dieser Tiere zu treffen.

Folglich kann die Schlussfolgerung der Forschungsarbeit von Ciranna et al. (2019), dass reduzierte Spiegel an PACAP oder PACAP-Rezeptoren mit kognitiver Einschränkung verbunden sind, weder bekräftigt noch widerlegt werden.

Roberto et al. (2000) konnten durch ihre Forschungen zeigen, dass PACAP die exzitatorische synaptische Transmission im Hippocampus (CA1-Region) durch Aktivierung des cholinergen Systems verbessert. Bei den vorliegenden Forschungsergebnissen zeigten die Wildtyp-Mäuse mit vorhandenem PACAP-Gen keine erhöhte cholinerge Innervation in der CA1-Region des Hippocampus. Takei et al. (2000) beschrieben, dass PACAP das Überleben von cholinergen Neuronen fördert und die ChAT-Aktivität im Hippocampus steigert. Diese Aussagen unterstützen die Entscheidung des Autors der vorliegenden Arbeit den Hippocampus als Untersuchungsgebiet zu wählen. In der vorliegenden experimentellen Forschungsarbeit konnte keine erhöhte hippocampale ChAT-Aktivität bei Wildtyp und ApoE ^{-/-} Mäuse mit intaktem PACAP-Gen festgestellt werden.

Yuhara et al. (2001) thematisierten eine Besonderheit des Hippocampus. Im Gyrus dentatus findet auch im adulten Gehirn Neurogenese statt (Welsch et al., 2010). Yuhara et al. (2001) kamen zu dem Ergebnis, dass PACAP auch bei adulten cholinergen Neuronen in vitro einen neurotrophen Fraktor darstellt und in der Lage ist, die Anzahl der ChAT immunreaktiven Neuronen zu verdoppeln. Diese Eigenschaft von PACAP konnte in der vorliegenden Arbeit nicht in signifikantem Maß beobachtet werden.

Abschließend lässt sich zu den vorliegenden Forschungsergebnissen Folgendes feststellen:

Der Verlust des PACAP-spezifischen Rezeptors PAC1 bei Fettbelastung bedeutet eine Reduzierung der cholinergen Innervation des Hippocampus. Bei einem PAC1-Knockout findet kein Signaling an PAC1 statt. Die reduzierte cholinerge Aktivität kann zu einem Verlust der anti-inflammatorischen zerebralen Funktion führen. Im Umkehrschluss kann angenommen werden, dass PAC1 protektiv ist. Der Schutz des PAC1-Gens könnte zu weniger Neuroinflammation und Neurodegeneration führen.

Endogenes PAC1-Signaling schützt vor metabolischen Stress. Bei PAC1-Knockout ist der durch cholesterinreiche Ernährung („Western Diet“) induzierte Verlust cholinergischer Innervation im Hippocampus höher als bei PACAP-Knockout. Es handelt sich um ein selektives Ergebnis und die Ursache hierfür ist unklar.

4.8 Kritik und Ausblick

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, mehr signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Mäusegruppen und Fütterungen finden zu können, wäre die Untersuchung einer größeren Anzahl an Versuchstieren notwendig. Die Anzahl der vorhandenen Hirnschnitte mit dem entsprechenden genetischen Knockout war begrenzt.

Des Weiteren könnte es hilfreich sein, wenn genetisch veränderte Versuchstiere über einen längeren Zeitraum als 30 Wochen lang beobachtet werden, damit altersabhängige Veränderungen des Gehirns besser festgestellt werden können.

Da PACAP durch seine vielfältigen Eigenschaften und Funktionen ein großes Potenzial für Forschung bietet, werden sich sehr wahrscheinlich auch zukünftige Forschungsarbeiten mit diesem Thema beschäftigen. Es ist wünschenswert, dass es in Zukunft wirksamere Therapeutika für durch Ischämie, Blutung oder Degeneration entstandene Krankheiten des Gehirns gibt. Durch die steigende Lebenserwartung in vielen westlichen Industrienationen werden auch zukünftig Krankheitsbilder wie Atherosklerose, Schlaganfall und Demenz eine große Herausforderung sowohl für die Patientenversorgung als auch für die Forschung darstellen. Diese Herausforderung bezüglich Optimierung der Prophylaxe und Therapie altersabhängiger Erkrankungen gilt es zu bewältigen. Den Leidensdruck der betroffenen Menschen zu lindern und die Lebensqualität für Patienten und Angehörige zu verbessern, stellt eine große Motivation für zukünftige Forschungsarbeiten dar.

Mit besonderer Spannung können die therapeutischen Möglichkeiten von PACAP erwartet werden.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Atherosklerose, Schlaganfall und Morbus Alzheimer sind häufige, altersabhängige Krankheiten, bei denen systemische Inflammation oder Neuroinflammation eine wesentliche Rolle spielen. Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) ist ein neuroprotektives, immunmodulatorisches und vasoregulatorisches Peptid, welches mit den Rezeptoren PAC1, VPAC1 und VPAC2 interagiert. Die zahlreichen Funktionen von PACAP werden deutlich durch den Einfluss auf Bluthochdruck und die Interaktion mit Neurotransmittern. Außerdem zeigt PACAP schützende Effekte bei Neurodegeneration und führt zur Erholung nach Hirnschädigung. In der Literatur gibt es aktuelle Evidenz dafür, dass das Apolipoprotein E (ApoE) einen Einfluss auf das cholinerge Transmittersystem hat. Die ApoE-Defizienz ist charakterisiert durch erhöhte Plasma-Lipid-Spiegel und stellt ein gut etabliertes Maus-Modell zur Untersuchung von Altersprozessen dar. Gegenwärtig ist nicht bekannt, wie sich der Knockout von PACAP, PAC1 und ApoE zusammen mit cholesterinreicher Ernährung auf das hippocampale cholinerge Neurotransmittersystem auswirkt. Dies gilt es in dieser Forschungsarbeit erstmalig zu untersuchen. Ob sich die Hypothesen bewahrheiten, dass fettreiche Ernährung und genetischer Knockout zu einer veränderten cholinergen Innervation im Hippocampus führen, werden folgende Forschungsergebnisse zeigen.

Material und Methoden: Um den Einfluss von PACAP auf das cholinerge Neurotransmittersystem zu untersuchen, wurden die Gehirne von Einzel- oder Doppel-Gen-defizienten Mäusen (ApoE^{-/-}, PACAP^{-/-} ApoE^{-/-} und PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}) betrachtet und mit Wildtyp-Mäusen verglichen. Die Mäuse wurden entweder für 30 Wochen mit Standardfutter oder für 10 Wochen mit Standardfutter und anschließend für 20 Wochen mit cholesterinreicher Nahrung („Western Diet“) ernährt. Die Analyse erfolgte mithilfe von sagittalen Paraffinschnitten der Gehirne und immunhistochemischen Versuchen mit Nickel-verstärkter Streptavidin-Biotin-Peroxidase sowie anschließender Mikroskopie. Da der Hippocampus als Zentrum des Lernens und des Gedächtnisses gilt und dort eine hohe cholinerge Aktivität sowie ein hohes Vorkommen von PACAP und PAC1 besteht, wurden verschiedene

hippocampale Regionen (CA1, CA3 und Gyrus dentatus) untersucht. Als Marker für das cholinerge Neurotransmittersystem wurden die Acetylcholin-synthesierende Cholinacetyltransferase (ChAT) und der vesikuläre Acetylcholin-Transporter (VACHT) verwendet.

Ergebnisse: In der abschließenden Analyse wurden bei ChAT alle Mäusegruppen und Fütterungen miteinander verglichen. Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA (Varianzanalyse) wurde eine Signifikanz (p-Wert 0,0062) festgestellt. Der anschließend durchgeführte Tukey`s-multiple-comparison-Test zeigte zwischen PACAP-/- ApoE -/- der Fütterung 10+20 und PAC1-/- ApoE-/- der Fütterung 10+20 einen signifikanten Unterschied (PACAP-/- ApoE -/- > PAC1-/- ApoE-/-). Außerdem ergab dieser Test einen signifikanten Unterschied (p-Wert 0,0059) zwischen PACAP-/- ApoE -/- der Fütterung Standard 30 und PAC1-/- ApoE-/- der Fütterung 10+20 (PACAP-/- ApoE -/- > PAC1-/- ApoE-/-). Die Abschlussuntersuchung bei VACHT, bei der alle Mäusegruppen und Fütterungen miteinander verglichen wurden, konnte keine Signifikanz nachweisen.

Schlussfolgerung: Die Hypothesen, dass fettreiche Ernährung und genetischer Knockout zu einer veränderten cholinergen Innervation im Hippocampus führen, konnten nicht in signifikantem Maß bestätigt werden. Es ist festzustellen, dass bei ChAT der Knockout von PAC1 in beiden Fütterungen im Vergleich zum PACAP-Knockout einen signifikant größeren Effekt hat. Der Verlust des PACAP-spezifischen Rezeptors PAC1 bei Fettbelastung bedeutet eine Reduzierung der cholinergen Innervation des Hippocampus. Bei einem PAC1-Knockout findet kein Signaling an PAC1 statt. Die reduzierte cholinerge Aktivität kann zu einem Verlust der anti-inflammatorischen zerebralen Funktion führen. Im Umkehrschluss kann angenommen werden, dass PAC1 protektiv ist. Der Schutz des PAC1-Gens könnte zu weniger Neuroinflammation und Neurodegeneration führen. Da PACAP durch seine vielfältigen Eigenschaften und Funktionen ein großes Potenzial für Forschung bietet, werden sich auch zukünftige Forschungsarbeiten mit dieser Thematik beschäftigen. Mit besonderer Spannung können die therapeutischen Möglichkeiten von PACAP erwartet werden.

6 Summary

Background: Atherosclerosis, stroke and Alzheimer's disease are common age-related diseases in which systemic inflammation or neuroinflammation play an important role. Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) is a neuroprotective, immunomodulatory and vasoregulatory peptide that interacts with the PAC1, VPAC1, and VPAC2 receptors. PACAP's many functions are displayed by its influence on hypertension and its interaction with neurotransmitters. Moreover, PACAP shows protective effects in neurodegeneration and leads to recovery after brain damage. There is current evidence in the literature that apolipoprotein E (ApoE) affects the cholinergic transmitter system. ApoE deficiency is characterized by elevated plasma lipid levels and represents a well-established mouse model for studying aging processes. Currently, it is unknown how the knockout of PACAP, PAC1 and ApoE together with a high-cholesterol diet affects the hippocampal cholinergic neurotransmitter system. This is the first time to be investigated in a research work. It remains to be seen if the hypotheses, that a high-fat diet and genetic knockout lead to changed cholinergic innervation in the hippocampus, will prove true.

Methods and Materials: In order to investigate the influence of PACAP on the cholinergic neurotransmitter system, the brains of single or double gene deficient mice (ApoE^{-/-}, PACAP^{-/-} ApoE^{-/-} and PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}) were examined and compared to wild-type mice. These mice were fed either standard chow for 30 weeks or standard chow for 10 weeks followed by high cholesterol chow ('Western Diet') for 20 weeks. The analysis was realised with the help of sagittal paraffin sections of the brains and immunohistochemical experiments with nickel-enhanced streptavidin-biotin-peroxidase as well as following microscopy. Since the hippocampus is considered the center of learning and memory and there is high cholinergic activity and a high occurrence of PACAP and PAC1, different hippocampal regions (CA1, CA3 and dentate gyrus) were examined. The acetylcholine-synthesizing cholineacetyltransferase (ChAT) and the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) were used as markers for the cholinergic neurotransmitter system.

Results: In the final ChAT analysis, all groups and feedings were compared. Significance (p value 0.0062) was determined when performing the Two Way ANOVA (analysis of variance). The subsequently performed Tukey's multiple comparison test showed a significant difference (p value 0.0471) (PACAP^{-/-} ApoE^{-/-} > PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}). Moreover, this test revealed a significant difference (p value 0.0059) between PACAP^{-/-} ApoE^{-/-} feeding Standard 30 and PAC1^{-/-} ApoE^{-/-} feeding 10+20 (PACAP^{-/-} ApoE^{-/-} > PAC1^{-/-} ApoE^{-/-}). The final VChT examination, in which all groups and feedings were compared, could not prove any significance.

Conclusion: The hypotheses that high-fat diet and genetic knockout lead to changed cholinergic innervation in the hippocampus could not be confirmed to a significant extent. It is noted that in the ChAT group, knockout of PAC1 in both feedings resulted in a significantly bigger impact compared to PACAP knockout. The loss of PACAP specific PAC1 receptor under high-fat diet leads to a reduction of cholinergic hippocampal innervation. There is no signaling on PAC1 because of the PAC1 knockout. The decreased cholinergic activity can cause a loss of anti-inflammatory cerebral functions. In reverse conclusion this means that PAC1 could be protective. The protection of the PAC1-gene could result in less neuroinflammation and neurodegeneration.

As PACAP offers great potential for research due to its diverse properties and functions, future research will also deal with this topic. The therapeutic possibilities of PACAP can be expected with special excitement.

7 Literaturverzeichnis

Arimura, A. (1998) 'Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems', *Jpn J Physiol*, 48(5), pp. 301-31.

Armstrong, B. D., Abad, C., Chhith, S., Cheung-Lau, G., Hajji, O. E., Nobuta, H. and Waschek, J. A. (2008) 'Impaired nerve regeneration and enhanced neuroinflammatory response in mice lacking pituitary adenylyl cyclase activating peptide', *Neuroscience*, 151(1), pp. 63-73.

Blusztajn, J. K. and Berse, B. (2000) 'The cholinergic neuronal phenotype in Alzheimer's disease', *Metab Brain Dis*, 15(1), pp. 45-64.

Bir, S. C. and Kelley, R. E. (2022) 'Carotid atherosclerotic disease: A systematic review of pathogenesis and management', *Brain Circ*, 8(3), pp. 127-136.

Brifault, C., Gras, M., Liot, D., May, V., Vaudry, D. and Wurtz, O. (2015) 'Delayed pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide delivery after brain stroke improves functional recovery by inducing m2 microglia/macrophage polarization', *Stroke*, 46(2), pp. 520-8.

Chen, X. Y., Du, Y. F. and Chen, L. (2018) 'Neuropeptides Exert Neuroprotective Effects in Alzheimer's Disease', *Front Mol Neurosci*, 11, pp. 493.

Chen, Y., Samal, B., Hamelink, C. R., Xiang, C. C., Chen, M., Vaudry, D., Brownstein, M. J., Hallenbeck, J. M. and Eiden, L. E. (2006) 'Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke', *Regul Pept*, 137(1-2), pp. 4-19.

Cherait, A., Maucotel, J., Lefranc, B., Leprince, J. and Vaudry, D. (2020) 'Intranasal Administration of PACAP Is an Efficient Delivery Route to Reduce Infarct Volume and Promote Functional Recovery After Transient and

Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, pp. 585082.

Ciranna, L. and Costa, L. (2019) 'Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Modulates Hippocampal Synaptic Transmission and Plasticity: New Therapeutic Suggestions for Fragile X Syndrome', *Front Cell Neurosci*, 13, pp. 524.

Cunningham, C. and Hennessy, E. (2015) 'Co-morbidity and systemic inflammation as drivers of cognitive decline: new experimental models adopting a broader paradigm in dementia research', *Alzheimers Res Ther*, 7(1), pp. 33.

Dolejší, E., Liraz, O., Rudajev, V., Zimčík, P., Doležal, V. and Michaelson, D. M. (2016) 'Apolipoprotein E4 reduces evoked hippocampal acetylcholine release in adult mice', *J Neurochem*, 136(3), pp. 503-9.

Drake, C., Boutin, H., Jones, M. S., Denes, A., McColl, B. W., Selvarajah, J. R., Hulme, S., Georgiou, R. F., Hinz, R., Gerhard, A., Vail, A., Prenant, C., Julyan, P., Maroy, R., Brown, G., Smigova, A., Herholz, K., Kassiou, M., Crossman, D., Francis, S., Proctor, S. D., Russell, J. C., Hopkins, S. J., Tyrrell, P. J., Rothwell, N. J. and Allan, S. M. (2011) 'Brain inflammation is induced by co-morbidities and risk factors for stroke', *Brain Behav Immun*, 25(6), pp. 1113-22.

Eiden, L. E., Emery, A. C., Zhang, L. and Smith, C. B. (2018) 'PACAP signaling in stress: insights from the chromaffin cell', *Pflugers Arch*, 470(1), pp. 79-88.

Fang, Y., Ren, R., Shi, H., Huang, L., Lenahan, C., Lu, Q., Tang, L., Huang, Y., Tang, J., Zhang, J. and Zhang, J. H. (2020a) 'Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide: A Promising Neuroprotective Peptide in Stroke', *Aging Dis*, 11(6), pp. 1496-1512.

Fang, Y., Shi, H., Ren, R., Huang, L., Okada, T., Lenahan, C., Gamdzyk, M., Travis, Z. D., Lu, Q., Tang, L., Huang, Y., Zhou, K., Tang, J., Zhang, J. and Zhang, J. H. (2020b) 'Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide

Attenuates Brain Edema by Protecting Blood-Brain Barrier and Glymphatic System After Subarachnoid Hemorrhage in Rats', *Neurotherapeutics*, 17(4), pp. 1954-1972.

Fukushima, Y., Hikichi, H., Mizukami, K., Nagayama, T., Yoshida, M., Suzuki-Kusaba, M., Hisa, H., Kimura, T. and Satoh, S. (2001) 'Role of endogenous PACAP in catecholamine secretion from the rat adrenal gland', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281(5), pp. R1562-7.

Hamelink, C., Tjurmina, O., Damadzic, R., Young, W. S., Weihe, E., Lee, H. W. and Eiden, L. E. (2002) 'Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), pp. 461-6.

Han, P., Caselli, R. J., Baxter, L., Serrano, G., Yin, J., Beach, T. G., Reiman, E. M. and Shi, J. (2015) 'Association of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide with cognitive decline in mild cognitive impairment due to Alzheimer disease', *JAMA Neurol*, 72(3), pp. 333-9.

Han, P., Liang, W., Baxter, L. C., Yin, J., Tang, Z., Beach, T. G., Caselli, R. J., Reiman, E. M. and Shi, J. (2014) 'Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is reduced in Alzheimer disease', *Neurology*, 82(19), pp. 1724-8.

Han, P., Nielsen, M., Song, M., Yin, J., Permenter, M. R., Vogt, J. A., Engle, J. R., Dugger, B. N., Beach, T. G., Barnes, C. A. and Shi, J. (2017) 'The Impact of Aging on Brain Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide, Pathology and Cognition in Mice and Rhesus Macaques', *Front Aging Neurosci*, 9, pp. 180.

Harmar, A. J., Fahrenkrug, J., Gozes, I., Laburthe, M., May, V., Pisegna, J. R., Vaudry, D., Vaudry, H., Waschek, J. A. and Said, S. I. (2012) 'Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1', *Br J Pharmacol*, 166(1), pp. 4-17.

Hashimoto, H., Shintani, N. and Baba, A. (2002) 'Higher brain functions of PACAP and a homologous *Drosophila* memory gene *amnesiac*: insights from knockouts and mutants', *Biochem Biophys Res Commun*, 297(3), pp. 427-31.

Holighaus, Y., Weihe, E. and Eiden, L. E. (2012) 'STC1 induction by PACAP is mediated through cAMP and ERK1/2 but not PKA in cultured cortical neurons', *J Mol Neurosci*, 46(1), pp. 75-87.

Ichikawa, T., Ajiki, K., Matsuura, J. and Misawa, H. (1997) 'Localization of two cholinergic markers, choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in the central nervous system of the rat: in situ hybridization histochemistry and immunohistochemistry', *J Chem Neuroanat*, 13(1), pp. 23-39.

Isaac, E. R. and Sherwood, N. M. (2008) 'Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is important for embryo implantation in mice', *Mol Cell Endocrinol*, 280(1-2), pp. 13-9.

Jiang, L., Wang, W. H., Dong, X. Q., Yu, W. H., Du, Q., Yang, D. B., Wang, H. and Shen, Y. F. (2016) 'The change of plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide levels after aneurysmal subarachnoid hemorrhage', *Acta Neurol Scand*, 134(2), pp. 131-9.

Kaneko, Y., Tuazon, J. P., Ji, X. and Borlongan, C. V. (2018) 'Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Elicits Neuroprotection Against Acute Ischemic Neuronal Cell Death Associated with NMDA Receptors', *Cell Physiol Biochem*, 51(4), pp. 1982-1995.

Krzywkowski, P., Ghribi, O., Gagné, J., Chabot, C., Kar, S., Rochford, J., Massicotte, G. and Poirier, J. (1999) 'Cholinergic systems and long-term potentiation in memory-impaired apolipoprotein E-deficient mice', *Neuroscience*, 92(4), pp. 1273-86.

Lai, M. K., Tsang, S. W., Garcia-Alloza, M., Minger, S. L., Nicoll, J. A., Esiri, M. M., Wong, P. T., Chen, C. P., Ramírez, M. J. and Francis, P. T. (2006) 'Selective effects of the APOE epsilon4 allele on presynaptic cholinergic markers in the neocortex of Alzheimer's disease', *Neurobiol Dis*, 22(3), pp. 555-61.

Liu, D. M., Cuevas, J. and Adams, D. J. (2000) 'VIP and PACAP potentiation of nicotinic ACh-evoked currents in rat parasympathetic neurons is mediated by G-protein activation', *Eur J Neurosci*, 12(7), pp. 2243-51.

Masuo, Y., Matsumoto, Y., Tokito, F., Tsuda, M. and Fujino, M. (1993) 'Effects of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the spontaneous release of acetylcholine from the rat hippocampus by brain microdialysis', *Brain Res*, 611(2), pp. 207-15.

Mato, M., Ookawara, S., Mashiko, T., Sakamoto, A., Mato, T. K., Maeda, N. and Kodama, T. (1999) 'Regional difference of lipid distribution in brain of apolipoprotein E deficient mice', *Anat Rec*, 256(2), pp. 165-76.

Matsumoto, M., Nakamachi, T., Watanabe, J., Sugiyama, K., Ohtaki, H., Murai, N., Sasaki, S., Xu, Z., Hashimoto, H., Seki, T., Miyazaki, A. and Shioda, S. (2016) 'Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Is Involved in Adult Mouse Hippocampal Neurogenesis After Stroke', *J Mol Neurosci*, 59(2), pp. 270-9.

Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R. D., Kitada, C., Kubo, K., Fujino, M., Minamino, N. and 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)', *Biochem Biophys Res Commun*, 170(2), pp. 643-8.

Moller, K., Reimer, M., Ekblad, E., Hannibal, J., Fahrenkrug, J., Kanje, M. and Sundler, F. (1997) 'The effects of axotomy and preganglionic denervation on the expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP), galanin

and PACAP type 1 receptors in the rat superior cervical ganglion', *Brain Res*, 775(1-2), pp. 166-82.

Mustafa, T., Jiang, S. Z., Eiden, A. M., Weihe, E., Thistlethwaite, I. and Eiden, L. E. (2015) 'Impact of PACAP and PAC1 receptor deficiency on the neurochemical and behavioral effects of acute and chronic restraint stress in male C57BL/6 mice', *Stress*, 18(4), pp. 408-18.

Nguyen, T. T., Kambe, Y., Kurihara, T., Nakamachi, T., Shintani, N., Hashimoto, H. and Miyata, A. (2020) 'Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in the Ventromedial Hypothalamus Is Responsible for Food Intake Behavior by Modulating the Expression of Agouti-Related Peptide in Mice', *Mol Neurobiol*, 57(4), pp. 2101-2114.

Niewiadomski, P., Coûté-Monvoisin, A. C., Abad, C., Ngo, D., Menezes, A. and Waschek, J. A. (2008) 'Mice deficient in both pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide survive, but display growth retardation and sex-dependent early death', *J Mol Neurosci*, 36(1-3), pp. 200-7.

Nonaka, N., Banks, W. A. and Shioda, S. (2020) 'Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: Protective effects in stroke and dementia', *Peptides*, 130, pp. 170332.

Pecoraro, V., Sardone, L. M., Chisari, M., Licata, F., Li Volsi, G., Perciavalle, V., Ciranna, L. and Costa, L. (2017) 'A subnanomolar concentration of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) pre-synaptically modulates glutamatergic transmission in the rat hippocampus acting through acetylcholine', *Neuroscience*, 340, pp. 551-562.

Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M. and Breslow, J. L. (1992) 'Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells', *Cell*, 71(2), pp. 343-53.

Poirier, J., Delisle, M. C., Quirion, R., Aubert, I., Farlow, M., Lahiri, D., Hui, S., Bertrand, P., Nalbantoglu, J., Gilfix, B. M. and Gauthier, S. (1995) 'Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(26), pp. 12260-4.

Pugh, P. C., Jayakar, S. S. and Margiotta, J. F. (2010) 'PACAP/PAC1R signaling modulates acetylcholine release at neuronal nicotinic synapses', *Mol Cell Neurosci*, 43(2), pp. 244-57.

Rasbach, E., Splitthoff, P., Bonaterra, G. A., Schwarz, A., Mey, L., Schwarzbach, H., Eiden, L. E., Weihe, E. and Kinscherf, R. (2019) 'PACAP deficiency aggravates atherosclerosis in ApoE deficient mice', *Immunobiology*, 224(1), pp. 124-132.

Reglodi, D., Atlasz, T., Szabo, E., Jungling, A., Tamas, A., Juhasz, T., Fulop, B. D. and Bardosi, A. (2018a) 'PACAP deficiency as a model of aging', *Geroscience*, 40(5-6), pp. 437-452.

Reglodi, D., Jungling, A., Longuespée, R., Kriegsmann, J., Casadonte, R., Kriegsmann, M., Juhasz, T., Bardosi, S., Tamas, A., Fulop, B. D., Kovacs, K., Nagy, Z., Sparks, J., Miseta, A., Mazzucchelli, G., Hashimoto, H. and Bardosi, A. (2018b) 'Accelerated pre-senile systemic amyloidosis in PACAP knockout mice - a protective role of PACAP in age-related degenerative processes', *J Pathol*, 245(4), pp. 478-490.

Reglodi, D., Kiss, P., Lubics, A. and Tamas, A. (2011) 'Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo', *Curr Pharm Des*, 17(10), pp. 962-72.

Ringer, C., Büning, L. S., Schäfer, M. K., Eiden, L. E., Weihe, E. and Schütz, B. (2013) 'PACAP signaling exerts opposing effects on neuroprotection and neuroinflammation during disease progression in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis', *Neurobiol Dis*, 54, pp. 32-42.

Roberto, M. and Brunelli, M. (2000) 'PACAP-38 enhances excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal CA1 region', *Learn Mem*, 7(5), pp. 303-11.

Sacco, R. L., Kasner, S. E., Broderick, J. P., Caplan, L. R., Connors, J. J., Culebras, A., Elkind, M. S., George, M. G., Hamdan, A. D., Higashida, R. T., Hoh, B. L., Janis, L. S., Kase, C. S., Kleindorfer, D. O., Lee, J. M., Moseley, M. E., Peterson, E. D., Turan, T. N., Valderrama, A. L., Vinters, H. V., American Heart Association Stroke Council, C. o. C. S. a. A., Intervention, C. o. C. R. a., Nursing, C. o. C. a. S., Prevention, C. o. E. a., Disease, C. o. P. V. and Council on Nutrition, P. y. A. a. M. (2013) 'An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association', *Stroke*, 44(7), pp. 2064-89.

Soininen, H., Kosunen, O., Helisalmi, S., Mannermaa, A., Paljärvi, L., Talasniemi, S., Ryyänen, M. and Riekkinen, P. (1995) 'A severe loss of choline acetyltransferase in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein epsilon 4 allele', *Neurosci Lett*, 187(2), pp. 79-82.

Solés-Tarrés, I., Cabezas-Llobet, N., Vaudry, D. and Xifró, X. (2020) 'Protective Effects of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Peptide Against Cognitive Decline in Neurodegenerative Diseases', *Front Cell Neurosci*, 14, pp. 221.

Splitthoff, P., Rasbach, E., Neudert, P., Bonaterra, G. A., Schwarz, A., Mey, L., Schwarzbach, H., Eiden, L. E., Weihe, E. and Kinscherf, R. (2020) 'PAC1 deficiency attenuates progression of atherosclerosis in ApoE deficient mice under cholesterol-enriched diet', *Immunobiology*, 225(3), pp. 151930.

Starr, E. R. and Margiotta, J. F. (2017) 'Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide induces long-term, transcription-dependent plasticity and remodeling at autonomic synapses', *Mol Cell Neurosci*, 85, pp. 170-182.

Takei, N., Torres, E., Yuhara, A., Jongasma, H., Otto, C., Korhonen, L., Abiru, Y., Skoglösa, Y., Schütz, G., Hatanaka, H., Sofroniew, M. V. and Lindholm, D.

(2000) 'Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes the survival of basal forebrain cholinergic neurons in vitro and in vivo: comparison with effects of nerve growth factor', *Eur J Neurosci*, 12(7), pp. 2273-80.

Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B. K., Hashimoto, H., Galas, L. and Vaudry, H. (2009) 'Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery', *Pharmacol Rev*, 61(3), pp. 283-357.

Yuhara, A., Nishio, C., Abiru, Y., Hatanaka, H. and Takei, N. (2001) 'PACAP has a neurotrophic effect on cultured basal forebrain cholinergic neurons from adult rats', *Brain Res Dev Brain Res*, 131(1-2), pp. 41-5.

Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A. and Maeda, N. (1992) 'Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E', *Science*, 258(5081), pp. 468-71.

Bücher:

Hacke, W. (2016) : `*Neurologie*`, 14. Auflage, Springer

Noll, S., Schaub-Kuhnen, S., Höfler, H., Müller K. M., (2000) `*Praxis der Immunhistochemie*`, Urban & Fischer, pp. 38-105.

Welsch, U., Deller, T., (2010) `*Lehrbuch Histologie*`, Urban & Fischer, pp. 551 - 554.

Böcker et al. (2008): `*Pathologie*`, 4. Auflage Urban & Fischer.

Internet:

AMBOSS, Lernkarte: Atherosklerose und kardiovaskuläre Prävention

<https://next.amboss.com/de/article/s70tMh?>

q=arteriosklerose#Z4d61abc7c30153016762671ca0a5af08, 25.04.2021

AMBOSS, Lernkarte: Ischämischer Schlaganfall

<https://next.amboss.com/de/article/UR0bmf?>

q=schlaganfall#Z26d79c8b2401bd949ec51d7c96878352, 14.05.2021

<https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/Alz/pdf/factsheets/>

infoblatt1_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalzg.pdf, 20.11.2022

Graphpad Prism, Tests für Normalverteilung:

<https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/>

stat_choosing_a_normality_test.htm, 19.11.2022

<https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/>

stat_the_methods_of_tukey_and_dunne.htm?q=tukey, 19.11.2022

Graphpad Prism, ANOVA und two-way ANOVA:

<https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/>

f_ratio_and_anova_table_(one-way_anova).htm?q=anova, 19.11.2022

<https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/>

stat_checklist_2wayanova.htm?q=anova, 19.11.2022

8 Anhang

8.1 Ergebnistabellen

Zu Abbildung 7: Statistische Auswertung I

Hier wurde bei ChAT und der Diät 10+20 innerhalb der ApoE^{-/-} Knockout-Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	10+20	10+20	10+20	10+20
Knockout	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	19	19	19	19
Minimum	4,344	3,103	3,286	3,769
Maximum	12,05	9,849	9,615	9,910
Mittelwert	7,241	6,719	6,745	6,987
Standardabweichung	1,961	1,912	1,773	1,617
Standardfehler des Mittelwertes	0,4499	0,4385	0,4068	0,3711

Tabelle 3: Statistische Auswertung I

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,7964 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 8: Statistische Auswertung II

Hier wurde bei ChAT und der Diät 10+20 innerhalb der PACAP-/- ApoE-/- Knockout-Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	10+20	10+20	10+20	10+20
Knockout	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	18	18	18	18
Minimum	4,036	4,287	3,175	3,964
Maximum	9,815	9,669	10,28	9,417
Mittelwert	7,520	7,148	7,222	7,353
Standardabweichung	1,722	1,447	2,026	1,481
Standardfehler des Mittelwertes	0,4059	0,3411	0,4775	0,3491

Tabelle 4: Statistische Auswertung II

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,9168 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 9: Statistische Auswertung III

Hier wurde bei ChAT und der Diät 10+20 innerhalb der PAC1-/- ApoE-/- Knockout-Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	10+20	10+20	10+20	10+20
Knockout	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	19	19	19	19
Minimum	3,707	2,654	3,155	3,678
Maximum	8,394	9,524	9,230	8,034
Mittelwert	6,274	5,630	5,604	5,862
Standardabweichung	1,165	1,469	1,645	1,255
Standardfehler des Mittelwertes	0,2672	0,3369	0,3775	0,2880

Tabelle 5: Statistische Auswertung III

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,4275 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 10: Statistische Auswertung IV

Hier wurde bei ChAT und der Diät 10+20 innerhalb der Wildtyp-Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	10+20	10+20	10+20	10+20
Knockout	WT	WT	WT	WT
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	16	16	16	16
Minimum	3,824	4,536	3,168	3,904
Maximum	10,04	8,533	8,829	9,348
Mittelwert	6,487	6,568	6,150	6,423
Standardabweichung	1,975	1,200	1,635	1,625
Standardfehler des Mittelwertes	0,4939	0,2999	0,4086	0,4062

Tabelle 6: Statistische Auswertung IV

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,8980 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 11: Statistische Auswertung V

Hier wurden bei ChAT und der Diät 10+20 die immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil-Werte aller Mäusegruppen miteinander verglichen und eine statistische Analyse durchgeführt.

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	10+20	10+20	10+20	10+20
Knockout	ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	WT
Region	HC	HC	HC	HC
Anzahl der Werte	19	18	19	16
Minimum	3,769	3,964	3,678	3,904
Maximum	9,910	9,417	8,034	9,348
Mittelwert	6,987	7,353	5,862	6,423
Standardabweichung	1,617	1,481	1,255	1,625
Standardfehler des Mittelwertes	0,3711	0,3491	0,2880	0,4062

Tabelle 7: Statistische Auswertung V

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,0196 und somit einen signifikanten Unterschied. Nun wurde der Tukey`s-multiple-comparison-Test durchgeführt. Dieser kam zu dem Schluss, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen dem Hippocampus-Flächenanteilswert der Gruppe PACAP-/- ApoE-/- und der Gruppe PAC1-/- ApoE-/- gab. Der adjustierte p-Wert lag hierbei bei 0,0179. Der signifikante Unterschied wurde in der Abbildung 11 mit einem * markiert.

Zu Abbildung 12: Statistische Auswertung VI

Hier wurde bei ChAT Gruppe und der Fütterung Standard 30 innerhalb der ApoE-/- Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	St30	St30	St30	St30
Knockout	ApoE-/-	ApoE-/-	ApoE-/-	ApoE-/-
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	11	11	11	11
Minimum	5,001	3,768	3,421	4,641
Maximum	7,828	10,38	9,290	7,912
Mittelwert	6,558	6,586	6,061	6,441
Standardabweichung	0,9283	1,840	1,888	1,056
Standardfehler des Mittelwertes	0,2799	0,5547	0,5692	0,3183

Tabelle 8: Statistische Auswertung VI

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,8330 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 13: Statistische Auswertung VII

Hier wurde bei ChAT Gruppe und der Fütterung Standard 30 innerhalb der PACAP-/-ApoE-/- Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	St30	St30	St30	St30
Knockout	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	13	13	13	13
Minimum	4,956	4,667	2,287	4,217
Maximum	11,22	9,055	12,96	10,11
Mittelwert	8,599	7,114	7,061	7,847
Standardabweichung	2,025	1,352	2,858	1,812
Standardfehler des Mittelwertes	0,5618	0,3750	0,7927	0,5025

Tabelle 9: Statistische Auswertung VII

Die Ordinary One Way ANOVA ergab einen p-Wert von 0,2092 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 14: Statistische Auswertung VIII

Hier wurde bei ChAT und der Fütterung Standard 30 innerhalb der PAC1-/- ApoE-/- Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	St30	St30	St30	St30
Knockout	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	13	13	13	13
Minimum	4,603	4,405	4,762	4,986
Maximum	9,188	9,315	8,916	8,489
Mittelwert	6,662	6,894	6,546	6,691
Standardabweichung	1,206	1,375	1,295	1,039
Standardfehler des Mittelwertes	0,3345	0,3813	0,3592	0,2881

Tabelle 10: Statistische Auswertung VIII

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,9099 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 15: Statistische Auswertung IX

Hier wurde bei ChAT und der Fütterung Standard 30 innerhalb der Wildtyp-Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im Shapiro-Wilk Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	St30	St30	St30	St30
Knockout	WT	WT	WT	WT
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	6	6	6	6
Minimum	4,430	3,728	6,058	5,746
Maximum	9,705	9,557	10,30	9,417
Mittelwert	6,963	7,342	7,835	7,276
Standardabweichung	1,765	2,187	1,590	1,470
Standardfehler des Mittelwertes	0,7204	0,8929	0,6490	0,6000

Tabelle 11: Statistische Auswertung IX

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,8619 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 16: Statistische Auswertung X

Es wurde bei ChAT und der Fütterung Diät Standard 30 die immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil Werte der verschiedenen Mäusegruppen (Knockout und Wildtyp) miteinander verglichen und eine statistische Analyse durchgeführt. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	St30	St30	St30	St30
Knockout	ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	WT
Region	HC	HC	HC	HC
Anzahl der Werte	11	13	13	6
Minimum	4,641	4,217	4,986	5,746
Maximum	7,912	10,11	8,489	9,417
Mittelwert	6,441	7,847	6,691	7,276
Standardabweichung	1,056	1,812	1,039	1,470
Standardfehler des Mittelwertes	0,3183	0,5025	0,2881	0,6000

Tabelle 12: Statistische Auswertung X

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,0731 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 17: Statistische Auswertung XI

Hier wurden bei ChAT und beiden Fütterungen (Diät Standard 30 und Diät 10+20) die immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil Werte der verschiedenen Mäusegruppen (Knockout und Wildtyp) miteinander verglichen und eine statistische Analyse durchgeführt. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	10+20	St30	10+20	St30
Knockout	ApoE-/-	ApoE-/-	WT	WT
Region	HC	HC	HC	HC
Anzahl der Werte	19	11	16	6
Minimum	3,769	4,641	3,904	5,746
Maximum	9,910	7,912	9,348	9,417
Mittelwert	6,987	6,441	6,423	7,276
Standardabweichung	1,617	1,056	1,625	1,470
Standardfehler des Mittelwertes	0,3711	0,3183	0,4062	0,6000

Tabelle 13: Statistische Auswertung XI

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde keine signifikante Interaktion (p-Wert 0,1342) gefunden.

Zu Abbildung 18: Statistische Auswertung XII

Hier wurden bei ChAT und beiden Fütterungen (Diät Standard 30 und Diät 10+20) die immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil Werte der verschiedenen Mäusegruppen (Knockout und Wildtyp) miteinander verglichen und eine statistische Analyse durchgeführt. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	10+20	St30	10+20	St30
Knockout	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	WT	WT
Region	HC	HC	HC	HC
Anzahl der Werte	18	13	16	6
Minimum	3,964	4,217	3,904	5,746
Maximum	9,417	10,11	9,348	9,417
Mittelwert	7,353	7,847	6,423	7,276
Standardabweichung	1,481	1,812	1,625	1,470
Standardfehler des Mittelwertes	0,3491	0,5025	0,4062	0,6000

Tabelle 14: Statistische Auswertung XII

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde keine signifikante Interaktion (p-Wert 0,7127) gefunden.

Zu Abbildung 19: Statistische Auswertung XIII

Hier wurden bei ChAT und beiden Fütterungen (Diät Standard 30 und Diät 10+20) die immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil Werte der verschiedenen Mäusegruppen (Knockout und Wildtyp) miteinander verglichen und eine statistische Analyse durchgeführt. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	ChAT	ChAT	ChAT	ChAT
Fütterung	10+20	St30	10+20	St30
Knockout	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	WT	WT
Region	HC	HC	HC	HC
Anzahl der Werte	19	13	16	6
Minimum	3,678	4,986	3,904	5,746
Maximum	8,034	8,489	9,348	9,417
Mittelwert	5,862	6,691	6,423	7,276
Standardabweichung	1,255	1,039	1,625	1,470
Standardfehler des Mittelwertes	0,2880	0,2881	0,4062	0,6000

Tabelle 15: Statistische Auswertung XIII

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde keine signifikante Interaktion (p-Wert 0,9759) gefunden.

Zu Abbildung 21: Statistische Auswertung XV

Hier wurde bei VACHT und der Diät 10+20 innerhalb der ApoE^{-/-} Knockout-Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	10+20	10+20	10+20	10+20
Knockout	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	21	21	21	21
Minimum	4,024	3,575	3,343	3,742
Maximum	11,34	11,59	9,192	10,23
Mittelwert	7,298	6,878	6,237	6,928
Standardabweichung	1,691	1,775	1,465	1,443
Standardfehler des Mittelwertes	0,3690	0,3873	0,3198	0,3149

Tabelle 16: Statistische Auswertung XV

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,1981 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 22: Statistische Auswertung XVI

Hier wurde bei VACHT und der Diät 10+20 innerhalb der PACAP-/-ApoE-/- Knockout-Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	10+20	10+20	10+20	10+20
Knockout	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	21	21	21	21
Minimum	4,881	4,875	5,151	5,079
Maximum	10,18	10,92	10,66	9,309
Mittelwert	7,784	8,193	7,105	7,717
Standardabweichung	1,455	1,554	1,479	1,199
Standardfehler des Mittelwertes	0,3174	0,3392	0,3227	0,2617

Tabelle 17: Statistische Auswertung XVI

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,1100 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 23: Statistische Auswertung XVII

Hier wurde bei VACHT und der Diät 10+20 innerhalb der PAC1-/-ApoE-/- Knockout-Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	10+20	10+20	10+20	10+20
Knockout	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	17	19	19	19
Minimum	5,431	3,261	2,699	4,205
Maximum	11,66	8,959	9,775	9,955
Mittelwert	7,858	7,249	6,247	7,262
Standardabweichung	1,523	1,489	1,808	1,265
Standardfehler des Mittelwertes	0,3693	0,3416	0,4148	0,2902

Tabelle 18: Statistische Auswertung XVII

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,0208 und somit einen signifikanten Unterschied. Nun wurde der Tukey`s-multiple-comparison-Test durchgeführt. Dieser kam zu dem Schluss, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen der CA1- und der DG-Region innerhalb der PAC1-/-ApoE-/- Knockout-Gruppe gab. Der adjustierte p-Wert lag hierbei bei 0,0127. Der signifikante Unterschied wurde in der Abbildung 23 mit einem * markiert.

Zu Abbildung 24: Statistische Auswertung XVIII

Hier wurde bei VACHT und der Diät 10+20 innerhalb der Wildtyp-Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	10+20	10+20	10+20	10+20
Knockout	WT	WT	WT	WT
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	15	15	15	15
Minimum	4,813	3,726	4,463	4,454
Maximum	11,13	12,18	13,25	11,46
Mittelwert	7,607	7,806	9,293	8,078
Standardabweichung	1,912	1,848	2,700	1,700
Standardfehler des Mittelwertes	0,4936	0,4771	0,6971	0,4389

Tabelle 19: Statistische Auswertung XVIII

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,1261 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 25: Statistische Auswertung XIX

Hier wurden bei VACHT und der Fütterung Diät 10+20 die immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil-Werte aller Mäusegruppen miteinander verglichen und eine statistische Analyse durchgeführt.

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	10+20	10+20	10+20	10+20
Knockout	ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	WT
Region	HC	HC	HC	HC
Anzahl der Werte	21	21	19	15
Minimum	3,742	5,079	4,205	4,454
Maximum	10,23	9,309	9,955	11,46
Mittelwert	6,928	7,717	7,262	8,078
Standardabweichung	1,443	1,199	1,265	1,700
Standardfehler des Mittelwertes	0,3149	0,2617	0,2902	0,4389

Tabelle 20: Statistische Auswertung XIX

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,0773 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 26: Statistische Auswertung XX

Hier wurde bei VACHT und der Fütterung St30 innerhalb der ApoE-/- Knockout-Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	St30	St30	St30	St30
Knockout	ApoE-/-	ApoE-/-	ApoE-/-	ApoE-/-
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	17	17	17	17
Minimum	4,728	3,841	3,651	4,279
Maximum	10,53	9,497	9,626	9,712
Mittelwert	7,341	7,427	6,244	7,080
Standardabweichung	1,411	1,739	1,368	1,228
Standardfehler des Mittelwertes	0,3422	0,4218	0,3317	0,2978

Tabelle 21: Statistische Auswertung XX

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,0795 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 27: Statistische Auswertung XXI

Hier wurde bei VACHT und der Fütterung St30 innerhalb der PACAP-/-ApoE-/- Knockout-Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	St30	St30	St30	St30
Knockout	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	12	12	12	12
Minimum	4,684	4,844	3,454	4,567
Maximum	12,16	9,481	11,62	10,21
Mittelwert	8,747	7,229	7,806	8,132
Standardabweichung	2,109	1,348	2,222	1,723
Standardfehler des Mittelwertes	0,6087	0,3890	0,6414	0,4973

Tabelle 22: Statistische Auswertung XXI

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,2669 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 28: Statistische Auswertung XXII

Hier wurde bei VACHT und der Fütterung St30 innerhalb der PAC1-/-ApoE-/- Knockout-Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	St30	St30	St30	St30
Knockout	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	12	12	12	12
Minimum	5,256	3,818	3,654	5,622
Maximum	10,21	9,217	10,57	9,219
Mittelwert	7,148	6,970	6,270	6,884
Standardabweichung	1,436	1,561	2,141	1,203
Standardfehler des Mittelwertes	0,4144	0,4505	0,6182	0,3473

Tabelle 23: Statistische Auswertung XXII

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,5788 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 29: Statistische Auswertung XXIII

Hier wurde bei VACHT und der Fütterung St30 innerhalb der Wildtyp-Gruppe die Regionen CA1, CA3, DG und der Gesamtwert für den Hippocampus (HC) statistisch ausgewertet. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	St30	St30	St30	St30
Knockout	WT	WT	WT	WT
Region	CA1	CA3	DG	HC
Anzahl der Werte	18	18	18	18
Minimum	3,095	2,266	3,463	3,467
Maximum	11,03	11,42	10,28	9,811
Mittelwert	7,258	7,079	6,431	7,007
Standardabweichung	2,245	2,884	2,459	2,035
Standardfehler des Mittelwertes	0,5291	0,6798	0,5797	0,4797

Tabelle 24: Statistische Auswertung XXIII

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,7599 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 30: Statistische Auswertung XXIV

Hier wurden bei VACHT und der Fütterung Standard 30 die immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil-Werte aller Mäusegruppen miteinander verglichen und eine statistische Analyse durchgeführt.

Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	St30	St30	St30	St30
Knockout	ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	WT
Region	HC	HC	HC	HC
Anzahl der Werte	17	12	12	18
Minimum	4,279	4,567	5,622	3,467
Maximum	9,712	10,21	9,219	9,811
Mittelwert	7,080	8,132	6,884	7,007
Standardabweichung	1,228	1,723	1,203	2,035
Standardfehler des Mittelwertes	0,2978	0,4973	0,3473	0,4797

Tabelle 25: Statistische Auswertung XXIV

Die Ordinary-One-Way-ANOVA ergab einen p-Wert von 0,2002 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Zu Abbildung 31: Statistische Auswertung XXV

Hier wurden bei VACHT und beiden Fütterungen (Diät Standard 30 und Diät 10+20) die immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil-Werte der verschiedenen Mäusegruppen (Knockout und Wildtyp) miteinander verglichen und eine statistische Analyse durchgeführt. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	10+20	St30	10+20	St30
Knockout	ApoE-/-	ApoE-/-	WT	WT
Region	HC	HC	HC	HC
Anzahl der Werte	21	17	15	18
Minimum	3,742	4,279	4,454	3,467
Maximum	10,23	9,712	11,46	9,811
Mittelwert	6,928	7,080	8,078	7,007
Standardabweichung	1,443	1,228	1,700	2,035
Standardfehler des Mittelwertes	0,3149	0,2978	0,4389	0,4797

Tabelle 26: Statistische Auswertung XXV

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde keine signifikante Interaktion (p-Wert 0,1196) gefunden.

Zu Abbildung 32: Statistische Auswertung XXVI

Hier wurden bei VACHT und beiden Fütterungen (Diät Standard 30 und Diät 10+20) die immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil-Werte der verschiedenen Mäusegruppen (Knockout und Wildtyp) miteinander verglichen und eine statistische Analyse durchgeführt. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	10+20	St30	10+20	St30
Knockout	PACAP-/- ApoE-/-	PACAP-/- ApoE-/-	WT	WT
Region	HC	HC	HC	HC
Anzahl der Werte	21	12	15	18
Minimum	5,079	4,567	4,454	3,467
Maximum	9,309	10,21	11,46	9,811
Mittelwert	7,717	8,132	8,078	7,007
Standardabweichung	1,199	1,723	1,700	2,035
Standardfehler des Mittelwertes	0,2617	0,4973	0,4389	0,4797

Tabelle 27: Statistische Auswertung XXVI

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde keine signifikante Interaktion (p-Wert 0,0812) gefunden.

Zu Abbildung 33: Statistische Auswertung XXVII

Hier wurden bei VACHT und beiden Fütterungen (Diät Standard 30 und Diät 10+20) die immunhistochemisch gefärbten Hippocampus-Flächenanteil-Werte der verschiedenen Mäusegruppen (Knockout und Wildtyp) miteinander verglichen und eine statistische Analyse durchgeführt. Im D'Agostino-Pearson-Test wurde gezeigt, dass es sich um eine Normalverteilung handelt. Die deskriptive Statistik kam zu folgendem Ergebnis:

	VACHT	VACHT	VACHT	VACHT
Fütterung	10+20	St30	10+20	St30
Knockout	PAC1-/- ApoE-/-	PAC1-/- ApoE-/-	WT	WT
Region	HC	HC	HC	HC
Anzahl der Werte	19	12	15	18
Minimum	4,205	5,622	4,454	3,467
Maximum	9,955	9,219	11,46	9,811
Mittelwert	7,262	6,884	8,078	7,007
Standardabweichung	1,265	1,203	1,700	2,035
Standardfehler des Mittelwertes	0,2902	0,3473	0,4389	0,4797

Tabelle 28: Statistische Auswertung XXVII

Bei der Durchführung der Two-Way-ANOVA wurde keine signifikante Interaktion (p-Wert 0,4001) gefunden.

8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrer/-innen an der Philipps-Universität Marburg waren:

Adamkiewicz, Arndt, Baranowski, Bartsch, Bauer, Baumann, Becker A., Becker S., Bertoune, Best, Bette, Bien, Bösner, Bonaterra, Brehm, Bücking, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Del Rey, Dettmeyer, Dietz, Dodel, Donner-Banzhoff, Eberhart, Feuser, Frink, Geks, Görg, Gress, Grgic, Haas, Halaszovich, Hegele, Hertl, Hildebrandt, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Kann, Kanngießler, Kinscherf, Kircher, Kirschbaum, Köhler, König, Koczulla, Kühnert, Lill, Lohoff, Lüsebrink, Mahnken, Maier, Maisner, Meißner, Milani, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nikolaizik, Oberkircher, Oberwinkler, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pankuweit, Patrascan, Peterlein, Pfützner, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Riera-Knorrenschild, Ruchholtz, Rüscher, Sahmland, Sattler, Schäfer J., Schäfer M., Schieffer, Schu, Schütz B., Schütz H., Schüttler, Schulze, Schwarz, Seifart, Seipelt, Seitz, Sekundo, Sevinc, Steiniger, Strik, Stuck, Swaid, Tackenberg, Teymoortash, Thieme, Timmesfeld, Torossian, Vojnar, Wagner, Wallot, Wege-Rost, Weihe, Westermann, Wiesmann, Wilhelm, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zemlin, Zentgraf

8.3 Danksagung

Während der Verfassung meiner Doktorarbeit wurde ich von vielen Menschen unterstützt und dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Zuerst möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg bedanken, die mir bei meinen Forschungen geholfen haben. Namentlich erwähnen möchte ich Petra Unverzagt, Michael Schneider und Marion Zibuschka.

Des Weiteren gilt ein großer Dank Prof. Dr. Ralf Kinscherf und Dr. Gabriel Bonaterra, die mich während der ersten Schritte meiner Forschungsarbeit mit Rat und Tat unterstützt haben.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Eberhard Weihe und Dr. Martin Schäfer für die gute Betreuung meiner Dissertation, Ihre Geduld und hilfreichen Ratschläge bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Andreas Berlet, Eva Berlet und Kathleen Bardua für das aufmerksame Korrekturlesen bedanken.

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern Christine und Dr. Steffen Berlet, die mir eine sorglose Kindheit und Ausbildung ermöglicht haben.

Von Herzen möchte ich meiner Verlobten Inga Bardua danken, die immer für mich da ist.