

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Einfluss von c-Jun und den c-Jun N-terminalen Kinasen,
1, 2 und 3, auf die Regeneration des Nervus facialis

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Nils Holger Staak
aus Reinbek

Kiel 2009

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Herdegen_____
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ralph Lucius_____
Tag der mündlichen Prüfung	Donnerstag, den 19.08.2010_____
Zum Druck genehmigt, Kiel,	
den	19.08.2010_____

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Therapie von peripheren Nervenverletzungen	1
1.2 Der periphere Nerv	2
1.3 Die Schnauzbäckchenregion der Maus	3
1.4 Die Regeneration von Nerven	4
1.4.1 Molekulare Veränderungen an der Durchtrennungsstelle	5
1.4.2 Die axonale Aussprossung	7
1.5 Der Transkriptionsfaktor c-Jun	8
1.5.1 Die Aktivierung von c-Jun	8
1.5.2 Funktionen von c-Jun	8
1.6 Die c-Jun N-terminale Kinasen	9
1.6.1 Das MAP-Kinase-Signaltransduktionssystem	10
1.6.2 Funktionen von JNK	10
1.7 Die genetische Deletion bzw. genetische Inaktivierung von JNK und c-Jun	11
1.8 Die Fragestellung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Versuchstiere	13
2.2 Tierhaltung	13
2.3 Das Experimentelle Protokoll	14
2.4 Methoden	14
2.4.1 Die Durchtrennung des Nervus facialis	14
2.4.2 Die Bewertung der Regeneration	15
2.4.3 Die FluoroGold Applikation	16
2.4.4 Die Gewebeentnahme und Gewebefixierung	17
2.4.5 Die Anfertigung der Hirnschnitte	17
2.5 Die Auswertung der Hirnschnitte	18
2.6 Genotypisierung	18
2.7 Statistik	18
2.8 Instrumente	19
2.9 Materialien	20

3. Ergebnisse	21
3.1 Darstellung der Ergebnisse	21
3.2 c-Jun	22
3.2.1 Funktionsgewinn der Vibrissenbewegung	22
3.2.2 Retrograd markierte Kerne	24
3.2.3 Korrelation zwischen später Reflexantwort und den markierten Kernen	25
3.3 JNK	26
3.3.1 JNK1	26
3.3.1.1 Funktionsgewinn der Vibrissenbewegung	26
3.3.1.2 Retrograd markierte Kerne	28
3.3.1.3 Korrelation zwischen später Reflexantwort und markierten Kernen	29
3.3.2 JNK3	30
3.3.2.1 Funktionsgewinn der Vibrissenbewegung	30
3.3.2.2 Retrograd markierte Kerne	32
3.3.2.3 Korrelation zwischen später Reflexantwort und markierten Kernen	34
3.3.3 JNK2/3 Doppel-KO	35
3.3.3.1 Funktionsgewinn der Vibrissenbewegung	35
3.3.3.2 Retrograd markierte Kerne	37
3.3.3.3 Korrelation zwischen später Reflexantwort und markierten Kernen	38
3.3.4 JNK2-KO	39
3.3.4.1 Funktionsgewinn der Vibrissenbewegung	39
3.3.4.2 Retrograd markierte Kerne	40
3.3.4.3 Korrelation zwischen später Reflexantwort und markierten Kernen	41
3.3.4.4 JNK2 <i>Knock-out</i> in Beziehung gesetzt mit den Kontrollgruppen	43
3.8 Zusammenstellung der Ergebnisse	44
4. Diskussion	45
4.1 Das Experimentelle Modell	45
4.1.1 JNK Knockout und c-JunAA	45

Inhaltsverzeichnis	III
4.1.2 Die Nervendurchtrennung	46
4.1.2 Die Retrograde Markierung	46
4.2 Axonale Reinnervation	47
4.3 Die Rolle von JNK in der neuronalen Regeneration	48
4.3.1 Beteiligung von JNK an der Nervenregeneration	48
4.3.2 Beteiligung von JNK am Aufbau des Axons	48
4.3.3 Einfluss der JNK-Isoformen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Regeneration	50
4.4 Die Rolle von c-Jun in der neuronalen Regeneration	50
4.5 Substrate von c-Jun und die axonale Verlängerung	51
4.6 Nervendurchtrennung und die c-Jun/JNK-Achse	52
4.7 Offene Fragen	52
5. Zusammenfassung	54
6. Literaturverzeichnis	55
7. Danksagungen	66
8. Lebenslauf	67

1. Einleitung

Diese Dissertationsarbeit untersucht den Einfluss des Transkriptionsfaktors c-Jun und der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) auf die Regeneration des Nervus facialis in einem *in vivo* Experiment. Hierzu wurden Mäuse, in denen die Gene für die c-Jun mutiert und JNK deletiert wurden, mit Kontrolltieren verglichen. Der Nervus facialis wurde durchtrennt, dessen Funktionsgewinn über 50 Tage dokumentiert und zum Ende des Versuchs die regenerierte Nervenverbindung untersucht.

Der Transkriptionsfaktor c-Jun und die Kinasen JNK sind in Modellen zur Neurodegeneration als Schlüsselmoleküle für den neuronalen Zelltod nachgewiesen worden. Jedoch gibt es Erkenntnisse, dass diese Moleküle auch wichtige Bestandteile neurophysiologischer Prozesse sind. In diesem *in vivo* Experiment werden bis auf die genetische Veränderungen im Genom der Maus alle Prozesse der Neuroregeneration nicht vom Untersucher beeinflusst. Vielmehr ist dies ein offenes Modell, in dem alle zellulären und molekularen Antworten auf die Nervendurchtrennung frei ablaufen können. Kann dieses Modell nachweisen, dass c-Jun und JNK an der Regeneration beteiligt sind? Oder wird diese Hypothese widerlegt?

Zu Beginn möchte ich auf die klinische Relevanz peripherer Nervenverletzungen, den aktuellen Forschungsstand der Nervenregeneration, die anatomischen Grundlagen der Nervenbahnen sowie der Schnauzbäckchenregion der Maus eingehen, bevor ich c-Jun und JNK in der gegenwärtigen wissenschaftlichen Diskussion näher erläutern werde.

1.1 Epidemiologie und Therapie von peripheren Nervenverletzungen

Entgegen des zentralen Nervensystems können Nervenfasern des peripheren Nervensystems wiederhergestellt werden, solange das Perikaryon nicht zerstört wurde (Schiebler und Schmidt 2003). Die Inzidenz peripherer Nervenverletzungen beträgt 15/100.000. Zu den häufigsten betroffenen Nerven gehören der Ulnaris- und der Peronäusnerv (Masuhr und Neumann 2005). Abhängig von der Schwere der Verletzung ist ein Wiedergewinn der Funktion möglich, jedoch eine *restitutio ad integrum* ist nicht zu erwarten (Evans 2001, Masuhr und Neumann 2005).

Die Therapiestrategien zur Behandlung von Nervenverletzungen sind von der klinischen Einordnung und von der Entfernung der getrennten Nervenenden abhängig (Tab. 1). Sind die

Nervenenden adaptierbar, so werden sie primär genäht. Der aussprossende Nerv hat hier noch eine Leitschiene zur Regeneration. Ist jedoch die Distanz für eine primäre Naht zu groß, muss für eine effektive Regeneration diese überbrückt werden. Hierfür gilt das Einfügen von Nerventransplantaten noch als Goldstandard (Lohmeyer 2006). Dennoch werden in wissenschaftlichen Veröffentlichungen das Einfügen von Muskelfasern oder synthetischen Materialien als weitere Therapiestrategien diskutiert (Evans 2001, Lohmeyer 2006, Trumble et al. 2004). Eine zusätzliche Säule in der Behandlung von Nervenverletzungen könnte die gezielte Applikation von Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise *nerve growth factor* (NGF), *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) oder *fibroblastic growth factor* (FGF) sein (Evans 2001, Masuhr und Neumann 2005, Tonge und Golding 1993, Trumble et al. 2004). Hier zeigten sich große Unterschiede zwischen den Wachstumsfaktoren. Einige beeinflussten nur bestimmte Faserqualitäten (Trumble et al. 2004). Dies birgt die Gefahr, dass die ungleiche Regeneration einzelner Fasern zu Fehlfunktionen mit deutlichen Missempfindungen im Innervationsgebiet führen könnte. Zusätzlich sind Wachstumsfaktoren nur zu bestimmten Zeitpunkten in der Nervenregeneration aktiv, so dass eine ungezielte Applikation gar nicht den Regenerationsprozess beeinflussen würde (Trumble et al. 2004).

1.2 Der periphere Nerv

Die kleinste Einheit des Nervensystems ist das Neuron, bestehend aus dem Zellkörper, den Dendriten und dem Axon. Die Dendriten leiten elektrische Impulse zum Zellkörper hin und das Axon leitet elektrische Impulse vom Zellkörper weg. Funktionell unterteilt man die Nervenzellen in afferente Neurone, die Impulse aus der Peripherie zum Zentralnervensystem leiten, efferente Neurone, die Impulse vom Zentralnervensystem zur Peripherie leiten und Interneurone, die als Zwischenglieder bezeichnet werden (Gertz 2001, Schiebler und Schmidt 2003).

Die Axone des peripheren Nervensystems sind in Nervenbahnen organisiert. Eine Nervenfasern ist die Einheit aus Axon und der dazugehörigen Axonscheide. Jede Nervenfasern ist in drei Schichten organisiert. Das Endoneurium umgibt die Nervenfasern, das Perineurium fasst bis zu 100 Nervenfasern zu einem Faszikel zusammen, und das Epineurium bildet aus den Faszikeln den Nerv (Schiebler und Schmidt 2003). Die peripheren Nervenbahnen sind meist gemischte Nerven bestehend aus afferenten und efferenten Neuronen, so dass bei einer Nervenläsion

Paresen, Sensibilitätsstörungen, trophische Störungen zusammen mit vegetativen Symptomen auftreten können (Masuhr und Neumann 2005).

Diesem Aufbau eines Nervens entsprechend teilt man die Nervenverletzung nach Dillon in sechs Schweregrade ein (Tab.1). Diese Einteilung der Verletzung kann den Verlauf der Regeneration prognostizieren und die Therapieform bestimmen. Je schwerwiegender und umfangreicher die Strukturen des Nervens verletzt sind, desto schlechter ist die Prognose für einen vollständigen Funktionsgewinn (Evans 2001). Bei einer Quetschung ohne Verletzung der Nervenstrukturen wird mit einem vollständigen Funktionsgewinn gerechnet. Die °V Verletzung entspricht einer kompletten Nervendurchtrennung, bei der trotz adäquater Therapiestrategien ein vollständiger Funktionsgewinn nicht erwartet wird (Evans 2001).

Tab. 1: Klassifikation von Nervenverletzungen nach Dillon

Verletzungsgrad nach Dillon	Beteiligte Strukturen:			
	Endoneurium	Perineurium	Epineurium	Tinel Zeichen
I				-
II				+
III	+			+
IV	+	+		+
V	+	+	+	+
VI				

(+) = beteiligte Struktur und positives Tinel Zeichen; (-) = kein Tinel Zeichen. °VI beschreibt einen Zustand, bei dem die Verletzung des Nervens keinem der 5 genannten Zustände zuzuordnen ist, sondern eine Mischung aus den genannten Verletzungen ist (aus Evans 2001).

1.3 Die Schnauzbäckchenregion der Maus

In der Schnauzbäckchenregion der Maus sind die Haarfollikel in vier vertikalen Reihen und fünf horizontalen Reihen gegliedert (Dörfl 1985) (Abb. 1). Die Vibrissen (Tasthaare) werden motorisch vom Ramus buccalis des N. facialis innerviert (Dörfl 1985, Moran und Graeber 2004). Die motorische Einheit gehört zum emotional-motorischen System, welches mit dem limbischen System verbunden ist. So sind die Vibrissenbewegungen als willkürliche Bewegung von andererseits unwillkürlichen Bewegungen abzugrenzen (Holstege 1995). Die Motoneurone des N. facialis liegen im ventrolateralen pontinen Tegmentum des Hirnstammes. Aus dem Foramen stylomastoideum läuft der N. facialis unterhalb des Ohrknorpels und der Glandula parotis zum Innervationsgebiet (Abb. 1) (Dörfl 1985). Sensorische Informationen

werden vom Haarfollikel durch den N. infraorbitalis, Ast des N. maxillaris, aufgenommen. Der N. infraorbitalis projiziert die Wahrnehmungen über das Ganglion Gasseri, zum Traktus trigeminus und zum sensorischen parietalen Kortex (Dörfl 1985, Zucker und Welker 1969).

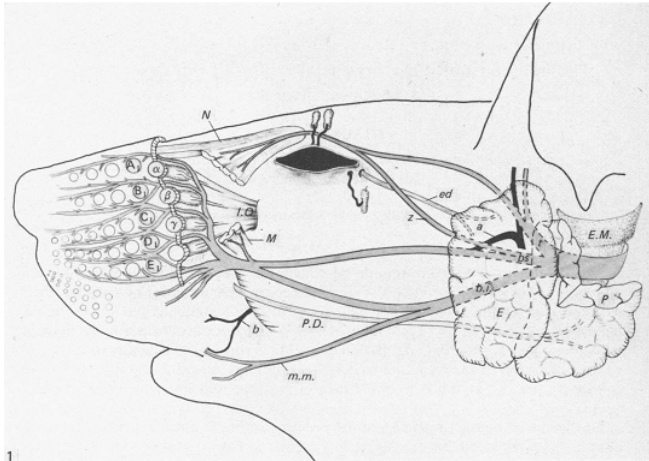


Abb.1: Anatomische Darstellung der Schnauzbäckchenregion. Aufzweigungen vom N. facialis: t: ramus temporalis; z: ramus zygomatico-orbitalis; bi und bs: Äste vom N. buccolabialis; m.m.: ramus marginalis mandibulae. I.O.: Austritt vom N. infraorbitalis; $\alpha - \delta$: vertikale Reihe der vier Follikel; A1 - E1: horizontale Reihe der 5 Follikel. E.M.: Knorpel des Meatus acusticus externus; P: Gld. parotis; P.D.: Ductus parotideus; E: Gld. extraorbitalis; a: N. auriculotemporalis; b: N. buccalis; M: M. maxillolabialis; N: M. nasolabialis; ed: Ductus extraorbitalis (aus Dörfl 1985).

1.4 Die Regeneration von Nerven

Periphere Nerven können im Gegensatz zu zentralen Nerven nach einer Durchtrennung regenerieren (Fournier und Strittmacher 2001, Schiebler und Schmidt 2003). Die Reaktion vom Organismus auf die Durchtrennung beschränkt sich nicht nur auf die Nervenzellen und den Schwanzzellen, sondern sie stellt eine komplexe Entzündungsreaktion unter Beteiligung von Makrophagen und T-Lymphozyten dar. Diese infiltrieren das Gewebe lokal an der Durchtrennungsstelle, an der motorischen Endplatte und zentral an den Motoneuronen (Moran und Graeber 2004). Die Durchtrennung zerstört die Verbindung zwischen dem Zellkörper und dem Erfolgsorgan (Abb. 2). Grob werden dabei drei Mechanismen vom Organismus unterschieden, die die funktionellen Ausfälle kompensieren sollen (Navarro et al. 2007):

- a. Reinnervation durch regenerierende Axone.
- b. Bildung von Kollateralen von unbeschädigten Axonen.
- c. Neuorganisation der neuronalen Plastizität.

Der Nerv wird nach der Durchtrennung in ein distales und ein proximales Segment unterteilt (Gillingwater und Ribchester 2001). Das distale Segment unterliegt der Waller'schen Degeneration (Abb.2). Hierbei wird das Axon fragmentiert und die Bestandteile des Axons

werden von eingewanderten Makrophagen phagozytiert (Gillingwater und Ribchester 2001). Parallel hierzu proliferieren die einzelnen Schwannzellen zu einem Verbund, die Büngner-Bänder. Der Verbund ist an der Schienung des aussprossenden Axons beteiligt (Gillingwater und Ribchester 2001). Im proximalen Segment vergrößert sich der Nukleus, er verliert seine zentrale Lage, der Zellkörper nimmt an Volumen zu und die Nissl-Substanz löst sich auf (Chromatolyse). Dies verkörpert die Neuorganisation des Neurons von einer Umschaltstelle für Erregungen in eine auf die Durchtrennung reagierende Zelle (Navarro et al. 2007).

In dem Neuron werden induzierbare Transkriptionsfaktoren, die zu einer vermehrten Proteinbiosynthese u.a. von Neurotrophen und Adhäsions-Molekülen führen, vermehrt nachgewiesen (Herdegen und Leah 1998, Makwana und Raivich 2005). An dem proximalen Ende werden Wachstumskolben gebildet. Durch die axonale Verlängerung soll eine neue Verbindung zwischen Neuron und Erfolgsorgan entstehen (Schiebler und Schmidt 2003).

Trotz der Kompensationsmechanismen wird ein vollständiger Funktionsgewinn nicht erreicht. Durch die meist schlechte Schienung des aussprossenden Axons erreichen weniger als 50% der regenerierenden Nerven das Innervationsgebiet und die Somatotopie im Kerngebiet geht dem entsprechend verloren (Aldskogius und Thomander 1986, Esslen 1960, Trumble et al. 2004). Die massive unkontrollierte axonale Aussprossung führt zu einer Fehlinnervation, bei der Axone von verschiedenen Motoneuronen dieselben motorischen Endplatten innervieren (Guntinas-Lichius et al. 2002, Morris et al. 1972). Dies äußert sich klinisch am Patienten durch ein Funktionsdefizit des betroffenen Organs, das sowohl motorische als auch sensorische Komponenten umfassen kann.

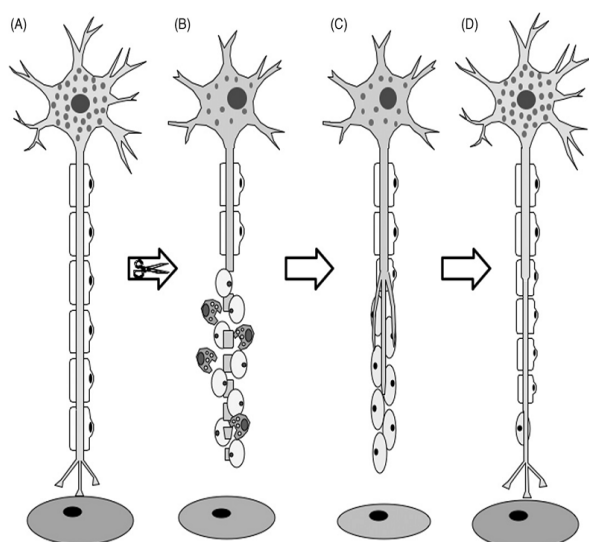


Abb. 2: Schematische Darstellung der Nervenregeneration. Diese Zeichnung stellt schematisch die Prozesse dar, die am Ende zu einer Reinnervation führen. **A:** Intaktes Neuron mit zentralem Zellkern, die Nissl-Substanz, das Axon, das Zielorgan und die Myelinscheiden. **B:** Zustand nach Axondurchtrennung. Einteilung in distales und proximales Segment. Dezentralisation des Kerns, Chromatolyse und Fragmentation des distalen Segments. **C:** Organisation der Schwannzellen im distalen Segment zu Büngner-Bänder, proximale Aussprossung des Axons. **D:** Reinnervation des Zielorgans, geringeres Kaliber des Nerven (aus Navarro et al. 2007).

1.4.1 Molekulare Veränderungen an der Durchtrennungsstelle

Bei der Nervenverletzung liegen im Wesentlichen drei Veränderungen vor, durch die das Neuron über den lokalen Stress informiert wird und dadurch Programme für die Regeneration oder den Zelltod starten kann (Makwana und Raivich 2005):

- a. Die Integrität des Axons ist zerstört. Die intrazellulären Strukturen sind gegenüber nichtneuronalen Zellen exponiert (Kirsch et al. 2003, Sendter et al. 1997).
- b. Der retrograde Transport von Molekülen ist unterbrochen (Raivich et al. 1991, Shadiack et al. 2001).
- c. Die Zerstörung der axonalen Membran führt zu einem unkontrollierten Einstrom von Ca^{2+} - und Na^{+} -Ionen (Yoo et al. 2003).

Der Beginn der Regeneration wird in zwei Phasen unterteilt.

Die erste Phase, die Sekunden nach der Zerstörung der Zellintegrität stattfindet, besteht in dem plötzlichen Ausbruch von Aktionspotenzialen aufgrund des massiven Einstroms von Ca^{2+} - und Na^{+} -Ionen. Durch diesen massiven Einstrom werden mehrstufige Protein-Signaltransduktionssysteme u.a. das MAP-Kinase System aktiviert (Ghosh und Greenberg 1995, Navarro et al. 2007, Yoo et al. 2003). Zusätzlich werden durch diese starke Depolarisation Transmitter, Neuropeptide und neurotrophische Faktoren freigesetzt, die die Aktivierung der Signalkaskaden weiter unterhalten (Navarro et al. 2007).

In der zweiten Phase werden Signalmoleküle, wie ERK und JNK, die zum MAP-Kinase Signaltransduktionssystem gehören, von der Durchtrennungsstelle retrograd über Bindungen an Transporterproteinen wie Vimentin oder Kinesin zum Nukleus transportiert (Abe und Cavalli 2008, Navarro et al. 2007). Diese werden als positive Signalmoleküle bezeichnet, die dem Neuron die Verletzung der Leitungsbahn signalisieren (Abe und Cavalli 2008). Am Ende werden induzierbare Transkriptionsfaktoren, zu denen c-Jun gehört, aktiviert, und es werden u.a. Adhäsionsmoleküle und neurotrophische Faktoren gebildet (Hanz und Fainzilber 2006, Herdegen und Leah 1998, Lee et al. 2004, Lindwall und Kanje 2005). Das Neuron ist jetzt keine Umschaltstelle von Erregungen, sondern eine aktivierte Zelle, die auf die Durchtrennung mit der Neusynthese von Proteinen reagiert (Navarro et al. 2007).

Schwanzzellen, benachbarte Axone und infiltrierende Entzündungszellen setzen früh Signalmoleküle, wie die Wachstumsfaktoren NGF und CNTF, frei. Es wurde beschrieben, dass diese Moleküle die c-Jun/JNK Achse als Teil des MAP-Kinase Systems aktivieren

(Makwana und Raivich 2005). CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), der in den Schwanzzellen gebildet wird, aktiviert über die Bindung an dem CNTF-Rezeptor des Axons die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) (Makwana und Raivich 2005). Daraufhin wird STAT3 zum Zellkörper des Neurons transportiert und signalisiert die Nervendurchtrennung (Schweizer et al. 2002, Sendter et al. 1994). JNK phosphoryliert STAT3 (Levy und Lee 2002).

Neben dem positiven Signalweg, der aufgrund der peripheren Verletzung erst aktiviert wird, gibt es noch den negativen Signalfluss, der den Zellkern ebenfalls über die Verletzung in der Peripherie informiert (Abe und Cavalli 2008). Beobachtungen legen den Rückschluss nahe, dass durch den plötzlichen Abfall kontinuierlich retrograd transportierter Moleküle, das Neuron ebenfalls über die Verletzung informiert wird (Abe und Cavalli 2008). Der neurotrophische Faktor NGF wird kontinuierlich retrograd transportiert. Die plötzliche Unterbrechung des Transports zeigt im Neuron einen entsprechend starken Abfall im Perikaryon vom NGF und parallel hierzu werden vermehrt der Transkriptionsfaktor c-Jun und die Neuropeptide Galanin und Substanz P gebildet (Makwana und Raivich 2005, Raivich et al. 1991).

1.4.2 Die axonale Aussprossung

Mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun werden Zellprogramme eingeleitet, die zu einer vermehrten Bildung von Adhäsions-Molekülen und neurotrophischen Faktoren führen. Damit wird die Reinnervation des Axons zum Zielorgan gesteuert (Navarro et al. 2007, Raivich et al. 2004). Die Zellkörper-Reaktion, d.h. die Aktivierung von spezifischen Programmen als Antwort auf Stress, hat zum Ziel, den Funktionsverlust durch axonale Elongation und Rekonstruktion neuer Synapsen auszugleichen (Herdegen und Waetzig 2001).

Die am distalen Ende des Axons entstehenden Wachstumskegel werden durch Adhäsions-Moleküle organisiert. Zu diesen gehören Galecitin und Laminin. Ihr Rezeptor $\alpha 7\beta 1$ -Integrin ist in der Membran vom Wachstumskegel integriert (Makwana und Raivich 2005). Verlust bzw. Mangel von Laminin und $\alpha 7\beta 1$ -Integrin führen zu einer eingeschränkten bzw. abgeschwächten Reinnervation des Zielgebietes (Werner et al. 2000). Die Bildung des Rezeptors ist von c-Jun abhängig (Raivich et al. 2004). Galecitin ist verantwortlich für die

Migration und die Neuorganisation von Schwannzellen, die sich um das auswachsende Axon als Leitschiene formieren (Horie et al. 2000, Fukaya et al. 2003).

Für die kontinuierliche Neubildung des Zytoskeletts vom auswachsenden Axon sind *growth-cone-proteins* wichtig. Zu diesen gehören GAP43 und CAP23 (Bomze et al. 2001, Frey et al. 2000). Diese Proteine stehen wiederum unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors c-Jun (Raivich et al. 2004).

1.5 Der Transkriptionsfaktor c-Jun

Es werden zwei Formen von Transkriptionsfaktoren unterschieden. Die konstitutiven Transkriptionsfaktoren aktivieren die Gene, die für die Aufrechterhaltung der basalen Grundfunktion der Zelle wichtig sind (Löffler und Petrides 2003). Damit die Zelle sowohl auf neue physiologische als auch pathophysiologische Reize reagieren kann, existieren die induzierbaren Transkriptionsfaktoren (Löffler und Petrides 2003). Zu diesen gehört der Transkriptionsfaktor c-Jun (Herdegen und Leah 1998). Dieser Transkriptionsfaktor wird zu der Familie der AP-1 Proteine (*activator proteine*) gezählt (Herdegen und Waetzig 2001). Die AP-1 Proteine zeigen prinzipiell entgegen gesetzte Funktionen. Auf der einen Seite sind AP-1 Proteine essentiell für den Zellzyklus (Hilberg et al. 1993, Leppa und Bohmann 1999). Auf der anderen Seite zeigt eine hohe AP-1 Aktivität in Neuronen einen vermehrten Zelluntergang (Behrens et al. 1999). AP-1 Proteine können Matrix-Metalloproteinasen aktivieren, die sowohl an Entzündungsreaktionen als auch an strukturellen Umbauprozessen beteiligt sind (Xu et al. 2001). So werden die AP-1 Proteine mit neurophysiologischen, neurodegenerativen und neuroregenerativen Prozessen in Verbindung gebracht (Herdegen und Waetzig 2001).

1.5.1 Die Aktivierung von c-Jun

Die Aktivierung von c-Jun ist zu einem Großteil abhängig von Molekülen des MAP-Kinase Systems (Raivich 2008). Zu diesen gehören die JNK, p-38 und ERK (Whitmarsch und Davis 2000). Der Transkriptionsfaktor c-Jun wird über chemische Modifikationen an mehreren Stellen des Moleküls aktiviert. An Serin 63 und 73 und an Threonin 91 und 93 wird der Transkriptionsfaktor phosphoryliert, an Threonin 239 dephosphoryliert und an Lysin in der Basis Struktur acetyliert (Morton 2003, Raivich 2008). Die Untersuchung der Funktion von c-Jun in dieser Arbeit wurde an Mäusen unternommen, deren c-Jun Funktion nur durch die

Blockade der JNK-Bindungsstelle an Serin 63 und 73 gehemmt wurde (Behrens 2000). Alle anderen Bindungsstellen von c-Jun sind somit noch frei.

1.5.2 Funktionen von c-Jun

Der Transkriptionsfaktor c-Jun ist nur im Perikaryon der Nervenzelle nicht in den Axonen und Dendriten vorhanden, und dieser wird nicht wie die JNK-Isoformen retrograd zum Perikaryon transportiert (Herdegen et al. 1997, Lindwall et al. 2005). Eine erhöhte Expression von c-Jun im Zellkern zeigen Experimente sowohl zur Neurodegeneration als auch zur Neuroprotektion. Zerebrale Ischämien führen in der Penumbra, dem Randgebiet des nekrotischen Kerns, zu einem Expressionsanstieg von c-Jun (Herdegen et al. 1998). Die Neurone aus der Penumbra zeigen noch 12 Stunden nach der Ischämie eine erhöhte TUNEL-Aktivität, die als Zeichen für die Neurodegeneration dient (Herdegen et al. 1998). Die Glutamat vermittelte Zerstörung von Nervenzellen oder der Entzug von neurotrophen Molekülen äußert sich in einem vermehrten Untergang von Neuronen, in denen ebenfalls eine gesteigerte Expression von c-Jun nachzuweisen war (Behrens et al. 1999). In der Wissenschaft wird die gezielte Inaktivierung von c-Jun bei einem ischämischen Insult als eine therapeutische Option diskutiert, um die Größe des nekrotischen Kerns zu reduzieren und um so das neurologische Outcome des Patienten zu verbessern (Vosler et al. 2009).

Dem gegenüber wird c-Jun auch mit physiologischen und neuroprotektiven Prozessen in Verbindung gebracht. Für die embryonale Entwicklung ist c-Jun essentiell, denn Tiere, in denen das c-Jun Gen komplett fehlt, sterben als Feten mit einer unvollständigen Hepatogenese (Behrens et al. 1999). In den CA1-Regionen des Gehirns, die gegenüber Ischämien eine erhöhte Toleranz zeigen, kann vermehrt c-Jun nachgewiesen werden (Sommer et al. 1995). Experimente mit einer hochfrequenten visuellen Reizgebung, die zu einer Ausbildung von neuronaler Plastizität führt, haben ebenfalls eine erhöhte Expression von c-Jun und JNK gezeigt (Brecht et al. 1999). Raivich et al. wiesen eine Beteiligung von c-Jun an der Regeneration von Nerven nach (Raivich et al. 2004).

1.6 Die c-Jun N-terminale Kinasen

Die Abkürzung JNK steht für c-Jun N-terminale Kinasen, die c-Jun an den Serin-Resten 63 und 73 und an den Threonin-Resten 91 und 93 phosphorylieren (Morton et al. 2003). Die JNK-Isoformen 1 und 2 kommen ubiquitär in den Zellen der Säugetiere vor. Demgegenüber wird

JNK3 nur im ZNS, im Herzen, im Hoden und im endokrinen Pankreas nachgewiesen (Ip und Davis 1998, Widmann et al. 1999). Im Neuron befinden sich die JNK-Isoformen in den Axonen, den Dendriten, dem Perikaryon und den präsynaptischen Nervenendigungen (Bjorkblom et al. 2005, Chang et al. 2003, Coffey et al. 2000, Tararuk et al. 2006). Moleküle, die mit JNK in einem unmittelbaren Zusammenhang stehen, sind neben c-Jun die Transkriptionsfaktoren Elk-1 und ATF2 und die zytoskelettalen Moleküle MAP2, MAP1B und SCG10 (Neidhart et al. 2001, Newbern et al. 2007, Widmann et al. 1999).

1.6.1 Das MAP-Kinase-Signaltransduktionssystem

Neben JNK gehören ERK und p-38 zum MAP-Kinase-Signaltransduktionssystem, das extrazelluläre Signale in die Zelle transformieren und dadurch die Zelle in den Organismus integrieren kann (Waetzig et al. 2006). Das MAP-Kinase-System besteht aus 3 Ebenen MAPKKK, MAPKK, MAPK. Die Kinasen aus der zweiten Aktivierungsstufe MKK7 und MKK4 phosphorylieren JNK an dessen Thyronin und Threonin Resten, wodurch JNK aktiviert wird (Waetzig et al. 2006). Dieses Signaltransduktionssystem ist mit weiteren Signalkaskaden verbunden, wie dem NFκB-Weg, der für die Immunmodulation verantwortlich ist, oder wie der JAK/STAT Signalweg, der mit der Zellentwicklung, der Wachstumskontrolle und der Zellhomöostase in Verbindung gebracht wird (Morrison und Davis 2003).

Neben der Verflechtung des MAP-Kinase-Signaltransduktionssystem zu anderen Systemen, können die einzelnen Stufen des Systems durch Hinzufügen weiterer Moleküle zusätzlich verändert werden (Waetzig et al. 2006). Die JIPs, *JNK interacting proteins*, können mit JNK zu einem Multiprotein-Komplex aggregieren, wodurch die Funktionen von JNK weiter moduliert werden (Herdegen and Waetzig 2001, Waetzig et al. 2006). Die Zelle hat so die Möglichkeit mit dem JNK-System, den verschiedenen Isoformen und den Verflechtungen zu anderen Signalwegen eine balancierte Antwort auf verschiedene Signale und Stressoren zu finden (Morrison und Davis 2003).

1.6.2 Funktionen von JNK

Die JNK-Isoformen sind sowohl am neuronalen Zelltod als auch an deren Überleben beteiligt (Herdegen et al. 1998, Kenney und Kocsis 1998, Kuan et al. 1999, Yang et al. 1997).

In Experimenten über neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson oder in Experimenten zu Hirnischämien oder zur Exzitotoxizität wird JNK in den beteiligten Zellen vermehrt exprimiert (Brecht et al. 2005, Eilers et al. 1998, Harrington et al. 2002, Hunot et al. 2004, Kasibhatla et al. 1998). Deswegen ist die spezifische Inhibition von JNK in der Medizin ein reizvoller Behandlungsansatz von neurodegenerativen Erkrankungen.

Diesem stehen jedoch physiologische Funktionen gegenüber. JNK beteiligt sich an der Zellteilung, dem Zellzyklus und der Wahrung der zellulären Stabilität (Herdegen and Waetzig 2005). In der neuronalen Entwicklung ist JNK an der Neuritogenese, der Ausbildung neuronaler Plastizität und der Ausführung von neuronalen Verbindungen von Bedeutung (Waetzig et al. 2006). Hier stehen vor allen Dingen JNK1 und JNK2 im Vordergrund, die essentiell für die Hirnentwicklung sind. Tiere, bei denen JNK1 und JNK2 genetisch ausgeschaltet wurden, zeigen schwerwiegende neurologische Beeinträchtigungen (Kuan et al. 1999). In PC12-Zellen, die einer neuronalen Zelllinie entstammen, wird unter Stimulation mit NGF vermehrt JNK induziert. Das führt zu einem vermehrten Neuritenwachstum (Waetzig et al. 2006). Eine unspezifische Hemmung von JNK mit dem JNK Inhibitor (SP600125) führt die PC12-Zelle unter sonst gleichen Bedingungen zu einer reduzierten Aussprossung der Neuriten (Giasson et al. 1999, Kita et al. 1998, Waetzig und Herdegen 2003). Die Rho-GTPasen und dessen vorgeschalteter Wachstumsfaktor PAK1 sind durch die Reorganisation des Zytoskeletts am Neuritenwachstum beteiligt (Daniels et al. 1998, Aoki et al. 2004). Diese beiden Moleküle wiederum aktivieren JNK. Die JNK Substrate DCX (*double cortin*) und MAP2 sind für das Wachstum und für die Stabilität von Neuriten wichtig (Björkblom et al. 2005, Gdalyahu et al. 2004, Shmueli et al. 2001).

1.7 Die genetische Deletion bzw. genetische Inaktivierung von JNK und c-Jun

Durch die Entwicklung von Tieren, denen ein bestimmter Erbgutabschnitt entfernt wurde, können Funktionen von spezifischen Genen untersucht werden und die Bedeutung eines Funktionsausfalls von bestimmten Genen besser verstanden werden. Für ihre Entdeckung des „Gene targeting-Verfahrens“ und dessen Bedeutung in der Forschung erhielten die drei Forscher Mario Capecchi, Oliver Smithies und Sir Martin Evans 2007 den Nobelpreis in Medizin.

Durch homologe Rekombination kann mittels spezifischer Targeting-Vektoren das JNK Gen einer JNK-Isoform spezifisch ausgeschaltet werden. Dabei wird das Phosphorylierungsmotiv

Thr-Pro-Tyr, das erforderlich für die JNK Protein-Kinase ist, durch eine Neomycin Kasette ersetzt (Yang et al. 1997). Um eine Spezifität der Inaktivierung einer JNK Isoform erlangen zu können, werden zusätzlich die Exone der α - und β -Isoformen vom entsprechenden JNK Gen entfernt (Dong et al. 1998, Yang et al. 1997, Yang et al. 1998). Aus diesem veränderten Genom werden JNK-Knockout Mäuse gezüchtet.

Der JNK2+3 Doppelknockout wurde durch die Kreuzung von jeweils einem homologen JNK2-Knockout Tier mit einem homologen JNK3-Knockout Tier gezüchtet.

Auch c-JunAA wird über das „Gene targeting-Verfahren“ generiert. Jedoch dürfen hier die Funktionen von c-Jun nicht vollständig ausgeschaltet werden, weil Tiere mit einem c-Jun-Knockout bereits in der embryonalen Entwicklung versterben (Behrens et al. 1999). Im c-Jun Gen werden Serin 73 und 63 durch Alanin ersetzt und zusätzlich im Gen eine Selektionskasette eingesetzt (Behrens et al. 1999). Dies wird anschließend in das Genom der Maus integriert. Durch dieses Verfahren werden die Bindungsstellen Serin 73 und 63 für die JNK Isoformen spezifisch ausgeschaltet (Behrens et al. 1999).

1.8 Die Fragestellung

JNK werden in aktivierter Form in den Nerven retrograd transportiert und aktivieren den Transkriptionsfaktor c-Jun (Lindwall und Kanje 2005, Fernyhough et al. 1999). Die c-Jun/JNK-Achse ist ein Bestandteil der Zellkörper-Reaktion, die das Neuron entweder in die Apoptose oder in die Regeneration führt (Herdegen und Waetzig 2001, Kenney und Kocsis 1998, Leah et al. 1991).

Diese Arbeit untersucht den Einfluss von c-Jun und JNK auf die Regeneration des Nervus facialis in einem *in vivo* Modell. Hierzu wurde der Nerv zunächst durchtrennt und der Funktionsgewinn dokumentiert. Anschließend wurde die neue Verbindung zwischen Kerngebiet des Nervens und dem Innervationsgebiet untersucht.

Verändert die genetische Inaktivierung bzw. die Ausschaltung von c-Jun und JNK das Regenerationsverhalten des N. facialis? Beeinflussen c-Jun und die JNK Isoformen die Regeneration unterschiedlich stark und zu unterschiedlichen Zeitpunkten? Besteht zwischen dem Funktionsgewinn und der *motoneuron-target* Achse ein funktioneller Zusammenhang?

3. Ergebnisse

3.1 Darstellung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht, inwieweit die genetische Deletion einzelner JNK Isoformen und der Austausch des N-terminalen Phosphorylierungsmotivs (Ser63 und Ser73) von c-Jun im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen die Regenerationsfähigkeit verändert. Dabei wurden drei Ansätze ausgewählt, die den Regenerationsfortschritt des N. facialis quantifizierten.

- a. in vivo Betrachtung des Regenerationsverlaufs
- b. Quantifizierung der retrograd markierten Kerne
- c. Vergleich des Funktionsgewinns mit dem Zustand im Kerngebiet

a. in vivo Betrachtung des Regenerationsverlaufs: Zur Beschreibung des Regenerationsverlaufs über einen Zeitraum von 50 Tagen wurde an 22 Zeitpunkten die Vibrissen-Funktion jeder Maus nach festgelegten Kriterien protokolliert (2.3.2). Die Ergebnisse wurden auf zwei Weisen untersucht. Zunächst wurden aus den Reflexwerten Mittelwerte gebildet, in einem Balkendiagramm eingetragen, und so der Verlauf der Regeneration beurteilt. Anschließend wurde die Regenerationseffizienz mittels Boxplot und der statistischen Testung nach Wilcoxon dargestellt (2.8). Hierfür wurden Rangsummen aus den Reflexwerten des gesamten Beobachtungszeitraums gebildet. Mit den Rangsummen aus den Reflexwerten der letzten 10 Tage wurde der Zustand des N. facialis am Ende des Versuchs beurteilt.

b. Quantifizierung der retrograd markierten Kerne: Die Reinnervation der Vibrissenmuskulatur wurde durch die Applikation von FluoroGold in den Vibrissenmuskel dargestellt. Das Kerngebiet zeigte insgesamt eine sehr heterogene Fluoreszenz, so dass das Schnittbild manuell ausgezählt und auf eine automatisierte Auszählung verzichtet wurde. Bereits bei der morphologischen Betrachtung fiel der Verlust der Somatotopie auf der durchtrennten Seite auf (Abb. 7). Von jedem ausgezählten Kerngebiet wurden Quotienten gebildet und aus denen der geometrische Mittelwert errechnet. In einem Boxplot wurden die Quotienten aufgetragen und mit dem Wilcoxon-Rangsummentest auf Signifikanz geprüft. Die Leuchtkraft der Kerne unterschied sich nicht nur zwischen den einzelnen Hirnen, sondern auch innerhalb des Kerngebietes.

c. Vergleich des Funktionsgewinns mit dem Zustand im Kerngebiet: Abschließend prüfte ich, ob ein guter Funktionsgewinn der Vibrissenbewegung ein entsprechendes morphologisches Korrelat zu den retrograd markierten Kernen besaß. Hierfür wurden die

Quotienten mit den Rangsummen der letzten 10 Tage verglichen und mit Hilfe des Spearman-Rangkorrelationstest auf Korrelation geprüft. Zur Veranschaulichung wurde das Ergebnis in einem Scatterplot eingetragen.

3.2 c-Jun

Für diese Versuchsreihe wurden 15 Tiere operiert. Bei den c-JunAA Mutanten wurden Serin 73 und 63 durch Alanin ersetzt. Somit kann c-Jun nicht durch die JNK Isoformen phosphoryliert bzw. aktiviert werden.

3.2.1 Funktionsgewinn der Vibrissenbewegung

Die c-JunAA Gruppe zeigt über den gesamten Bewertungszeitraum einen schwächeren Funktionsgewinn als die WT-Kontrolle. Betrachtet man die einzelnen Reflexwerte von 0,5 bis 3 als Meilensteine der Regeneration (Tab. 4), so erkennt man in der graphischen Darstellung, dass die c-JunAA Gruppe später die Reflexwerte als die WT-Kontrolle überschreitet und einen maximalen Wert von $1,68 \pm 0,4$ erreicht (Abb. 8). Dem gegenüber hat die WT-Kontrolle am Tag 40 den Reflexwert 2 und erreicht einen maximalen Wert von $2,08 \pm 0,2$. Die Regeneration beider Gruppen zeigt ab Tag 40 ein Plateau, bei dem der Funktionsgewinn im Vergleich zu den davor liegenden Tagen sistiert.

Tab. 4: Meilensteine der Regeneration von WTc-Jun und c-JunAA

Reflexwerte	0,5	1	1,5	2	2,5
WTc-Jun (d)	14	21	28	37	-
c-JunAA (d)	16	28	40	-	-

Dargestellt sind die Tage nach Nervendurchtrennung, an denen die Mittelwerte der Gruppen die entsprechenden Reflexwerte erstmalig erreicht haben. d = Tage nach Durchtrennung; - = Reflexwert nicht erreicht.

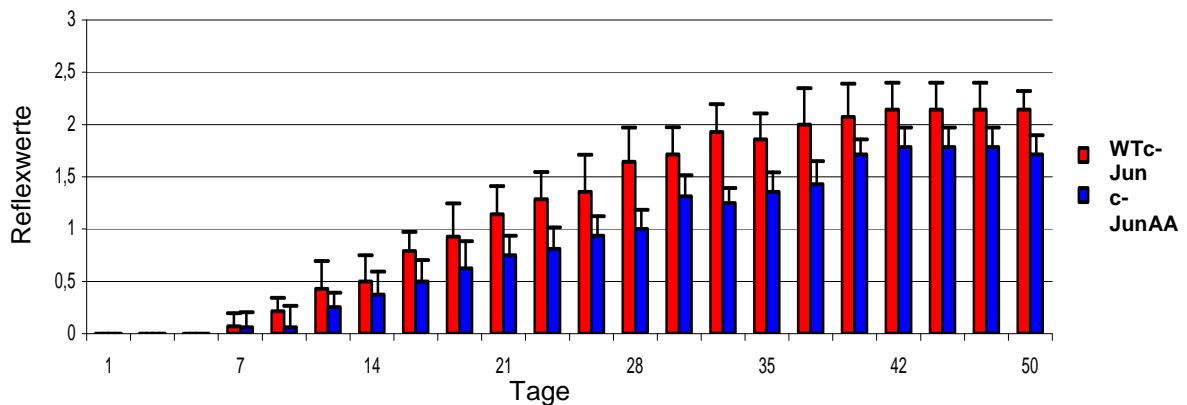


Abb. 7: Regenerationsverlauf von WTc-Jun und c-JunAA. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD) der Gruppe WTc-Jun ($n = 7$) und c-JunAA ($n = 8$) an 22 Messzeitpunkten. Maximalwert WTc-Jun: 2,08 (\pm 0,4) am Tag 40; c-JunAA: 1,68 (\pm 0,4) am Tag 50. $n =$ Anzahl der untersuchten Tiere.

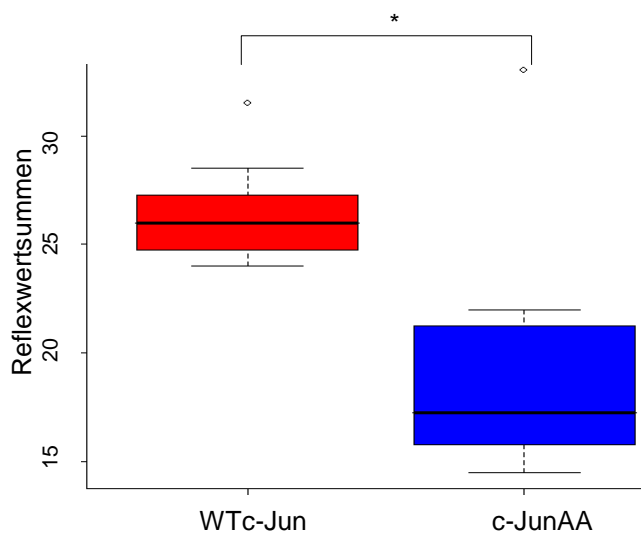


Abb. 8: Regenerationseffizienz von WTc-Jun und c-JunAA. Darstellung der Reflexwertsummen einzelner Tiere im Boxplot. **WTc-Jun:** Median: 25,5; IQR: 24,5 – 26,75; Minimum: 23, Maximum: 28; Ausreißer: 31. **c-JunAA:** Median: 17,5; IQR: 15,5 – 22,38; Minimum: 15,09; Maximum: 23,5; Ausreißer: 32,5. **IQR (interquartile range):** Alle Werte zwischen der 1. Quartile und 3. Quartile ergeben den Interquartil Abstand, der 50% aller Werte repräsentiert. **Ausreißer** = 1,5 des bis 3-fache IQR. * = $p \leq 0,05$

Aus dem gesamten Beobachtungszeitraum wurden die Reflexwerte addiert und in dem aufgeführten Boxplot eingetragen (Abb. 8). Der Median der c-JunAA Gruppe liegt um 8 Punktwerte niedriger als bei der WT-Kontrolle. Nach der statistischen Überprüfung ist die c-JunAA sowohl über den gesamten Zeitraum ($p = 0,02$), als auch am Ende des Versuches ($p = 0,03$) signifikant schlechter als die WT-Kontrolle.

3.2.2 Retrograd markierte Kerne

Von c-JunAA und der Kontrollgruppe wurden jeweils 7 Gehirne untersucht. Insgesamt wurden pro Tier 9-10 Schnitte ausgezählt.

Die Ergebnisse beider Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant. Der geometrische Mittelwert von c-JunAA ist um 1 Prozentpunkt schwächer (Tab. 5). Innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich die Quotienten der Tiere sehr. Dies wird durch die Darstellung im Boxplot verdeutlicht. Die Mediane der beiden Gruppen liegen um 6 Punktwerte auseinander (Abb. 9).

Tab. 5: Markierte Kerne von WTc-Jun und c-JunAA

WTc-Jun				c-JunAA			
Kennung	ipsi	contra	i/c (%)	Kennung	ipsi	contra	i/c (%)
m-5-III	4,00	8,60	47	m-1-III	1,50	3,25	46
m-13-III	4,30	6,20	69	m-3-III	4,00	4,56	88
m-20-III	2,50	6,80	37	m-4-III	4,30	7,64	56
m-22-III	5,91	8,00	74	m-7-III	1,20	4,20	29
m-23-III	6,10	6,90	88	m-12-III	2,63	5,00	53
m-24-III	2,44	5,44	45	m-15-III	4,09	9,82	42
m-26-III	1,73	4,45	39	m-18-III	4,55	5,73	79
gMW			54	gMW			53

Dargestellt sind im Seitenvergleich die MW der markierten Kerne pro Tier. Aus den MW wurde der Quotient gebildet. Die Quotienten wurden durch den gMW zusammengefasst. Ausgewertete Schnitte pro Tier: WTc-Jun: 10,4; c-JunAA: 9,7. Kennung = individuell protokollierte Tiere; ipsi = Nervendurchtrennung; contra = unbehandelte Seite; i/c (%) = Verhältnis von contra zu ipsi in %; gMW = geometrischer Mittelwert

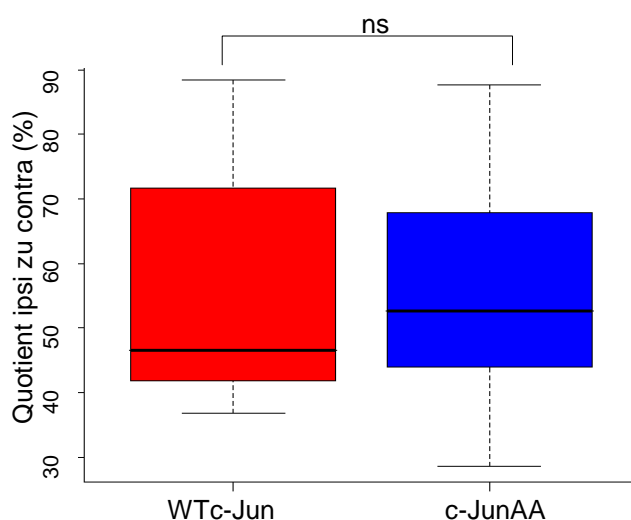


Abb. 9: Boxplot der markierten Kerne von WTc-Jun und c-JunAA. Dargestellt wird das Verhältnis der markierten Kerne auf der contralateralen zur ipsilateralen Seite. **WTc-Jun Gruppe:** Median: 47; IQR: 42 - 72. Minimum: 37; Maximum: 88; **c-JunAA:** Median: 53; Minimum: 29; Maximum: 88; IQR: 44 - 68. IQR (*interquartile range*) = Alle Werte zwischen der 1. Quartile und 3. Quartile ergeben den Interquartil Abstand, der 50% aller Werte repräsentiert. **ns = nicht signifikant**

3.2.3 Korrelation zwischen später Reflexantwort und den markierten Kernen

Schließlich wurde eine mögliche Korrelation zwischen den Reflexwertsummen zum Ende des Versuches und den markierten Kernen innerhalb eines Genotyps überprüft.

Die Ergebnisse von der WTc-Jun Gruppe und der c-JunAA Gruppe zeigen, dass kein bzw. nur ein geringer Zusammenhang zwischen den Reflexwerten und den markierten Kernen besteht. Vergibt man für die Reflexwerte und für die Kerne von jedem Tier aus einer Gruppe Ränge, zeigt sich besonders in der Kontrolle, dass die erreichten Ränge sich z.T. stark unterscheiden (Tab. 6). Die Korrelationsprüfung ergibt für WTc-Jun einen Index von 0. Nur die c-JunAA Gruppe besitzt eine schwach positive Korrelation (Abb. 10).

Tab. 6: Reflexwertsummen und markierte Kerne von c-Jun und c-JunAA

WTc-Jun		Reflex		Kerne	
Kennung	Rang	Summe	Rang	i/c (%)	
m-13-III	1	9,5	5	69	
m-24-III	2	10	3	45	
m-5-III	4	10,5	4	47	
m-26-III	4	10,5	2	39	
m-23-III	4	10,5	7	88	
m-20-III	6	11	1	37	
m-22-III	7	12,5	6	74	

Korrelationsindex: 0

c-JunAA		Reflex		Kerne	
Kennung	Rang	Summe	Rang	i/c (%)	
m-4-III	1	6,5	5	56	
m-7-III	2,5	7,5	1	29	
m-12-III	2,5	7,5	4	53	
m-1-III	4	8,5	3	46	
m-15-III	5,5	10	2	42	
m-18-III	5,5	10	6	79	
m-3-III	7	12	7	88	

Korrelationsindex: +0,34

In der Tabelle aufgelistet sind die Ränge von jedem Tier, erhalten aus den Reflexwertsummen zum Ende des Versuches und den markierten Kernen. Summe = Summe der Reflexwerte der letzten 10 Tage. i/c (%) = Quotient der ipsilateralen zur contralateralen Seite; Rang = Rang Zuordnung innerhalb des Betrachtungsschwerpunktes, dabei erhält der niedrigste Wert den niedrigsten Rang; Kennung = individuell protokollierte Tiere. Zusätzlich wurde der Korrelationsindex eingetragen.

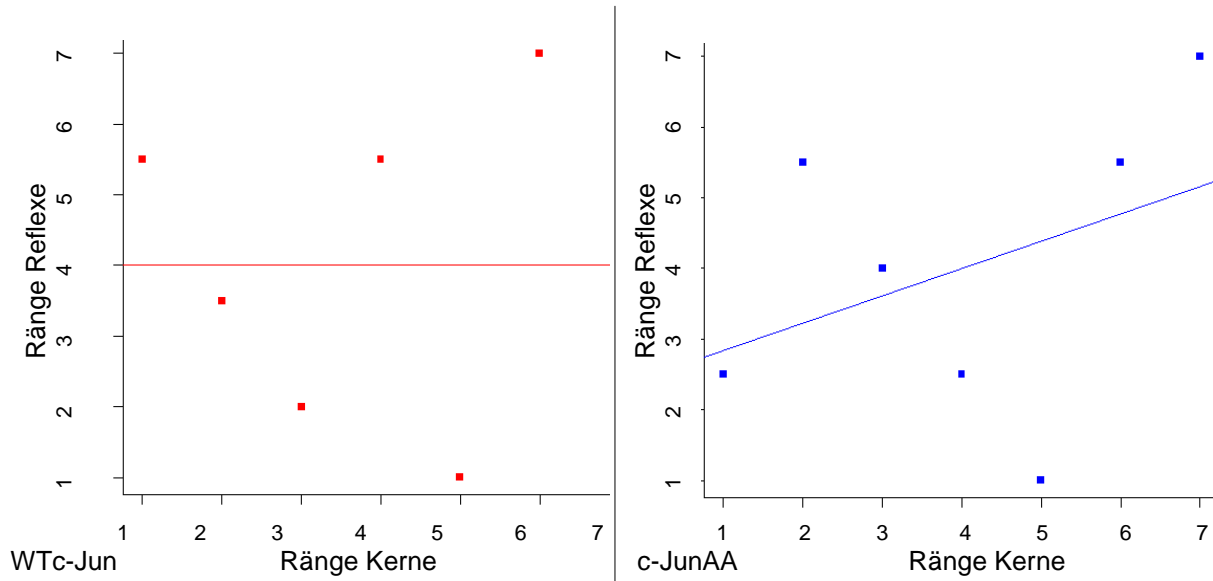


Abb. 10: Scatterplot von der Reflexantwort und den markierten Kerne von WTc-Jun und c-JunAA. Für die jeweilige Gruppe ist die Beziehung zwischen den Reflexwerten zu den markierten Kernen in einem Scatterplot dargestellt. Der Korrelationsindex von WTc-Jun beträgt 0, c-JunAA +0,34. Ränge = Rang Zuordnung innerhalb des Betrachtungsschwerpunktes, dabei erhält der niedrigste Wert den niedrigsten Rang. Reflexe: Reflexwertsummen der letzten 10 Tage; Kerne: Quotienten der markierten Kerne.

3.3 JNK

Anders als bei c-JunAA ist bei den folgenden JNK-Knockouts (JNK-KO) das Gen der entsprechenden Isoformen vollständig inaktiv. Im Folgenden werden die Ergebnisse von jedem Knockout und der WT-Kontrolle getrennt behandelt und abschließend wichtige Aussagen in einem Kapitel zusammengetragen.

3.3.1 JNK1

Insgesamt wurden für die Serie 21 Tiere operiert (JNK1-KO: 11; WT1: 10).

3.3.1.1 Funktionsgewinn der Vibrissenbewegung

In der graphischen Darstellung des Regenerationsverlaufs ist zu erkennen, dass sich der Funktionsgewinn der Vibrissenbewegung von dem JNK1-KO schwächer und langsamer entwickelt (Abb. 12). Besonders in der ersten Hälfte des Versuches fällt auf, dass die Meilensteine der Regeneration von JNK1-KO im Vergleich zur WT-Kontrolle verzögert erreicht werden (Tab. 7). In der zweiten Hälfte des Versuches nähern sich die Werte des JNK1-KO denen von der WT-Kontrolle an. Beispielhaft hierzu beträgt die Differenz von den beiden Gruppen am Tag 21 0,55, am Tag 44 nur 0,37. Ein echtes Plateau, bei dem die Gruppen keine Steigerung mehr zeigen, entwickelt sich ab dem 28. Tag, wobei der KO nicht

über den Reflexwert von $1,98 \pm 0,33$ und die WT-Kontrolle nicht über einen Reflexwert von $2,12 \pm 0,2$ hinausgeht.

Tab. 7: Meilensteine der Regeneration von WT1 und JNK1-KO

Reflexwerte:	0,5	1	1,5	2	2,5
WT1 (d)	7	16	23	35	-
JNK1-KO (d)	14	23	28	-	-

Dargestellt sind die Tage nach Nervendurchtrennung, an denen die Mittelwerte der Gruppen die entsprechenden Reflexwerte erstmalig erreicht haben. d = Tage nach Durchtrennung; - = Reflexwert nicht erreicht.

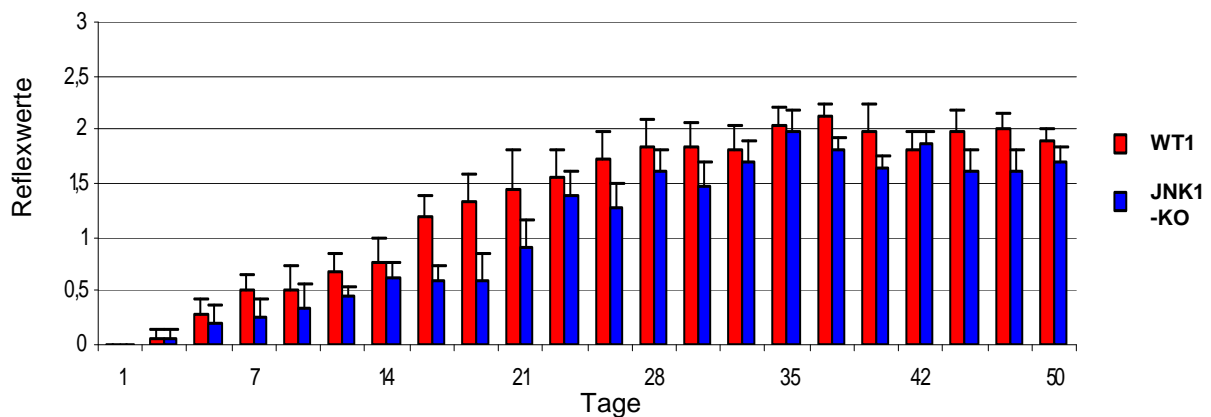


Abb. 11: Regenerationsverlauf Regenerationseffizienz von WT1 und JNK1-KO. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD) der Gruppe WT1 ($n = 11$) und JNK1-KO ($n = 10$) an 22 Messzeitpunkten. Maximalwert von WT1: $2,12 \pm 0,2$ am Tag 37, Maximalwert von JNK1-KO: $1,98 \pm 0,3$ am Tag 35. $n =$ Anzahl der Tiere.

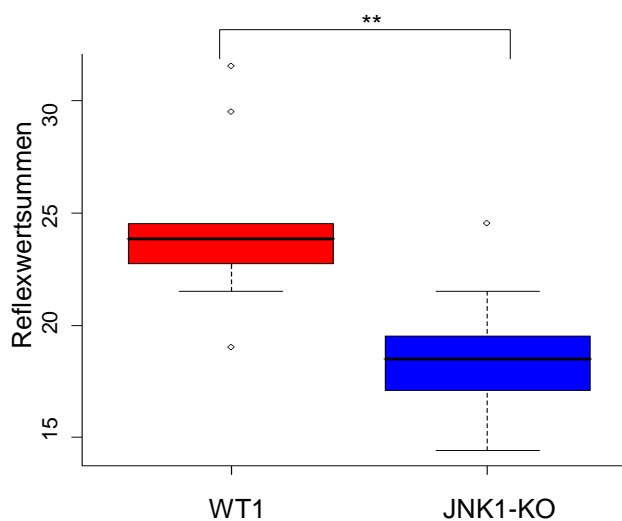


Abb. 12: Regenerationseffizienz von WT1 und JNK1KO. Dargestellt sind die Reflexwertsummen der einzelnen Tiere im Boxplot. **WT1:** Median: 28,82; IQR: 27,5 – 29,75; Minimum: 26,5, Ausreißer 1: 24, Ausreißer 2: 34,5; Ausreißer 3: 36,5; Ausreißer: 31. **JNK1-KO:** Median: 23,5; IQR: 22,15 – 24,93; Minimum: 19,44; Maximum: 26,5; Ausreißer: 29,5. **IQR (interquartile range):** Alle Werte zwischen der 1. Quartile und 3. Quartile ergeben den Interquartil Abstand, der 50% aller Werte repräsentiert. Ausreißer = 1,5 bis 3-fache des IQR. **** = $p \leq 0,01$**

Dieser positive Einfluss von JNK1 auf die Regeneration wird von der Regenerationseffizienz zusätzlich unterstützt. Hier liegt der Median von WT-Kontrolle um 8 Punktwerte höher als der Median von JNK1-KO (Abb. 13). Entsprechend ist der p-Wert aus den Rangsummen des gesamten Beobachtungszeitraums hochsignifikant ($p = 0,002$). Analog zum geringeren Unterschied am Ende des Regenerationsverlaufs verliert der statistisch errechnete Wert an Stärke (p -Wert = 0,02), behielt aber seine Signifikanz.

3.3.1.2 Retrograd markierte Kerne

Von der JNK1-KO Gruppe und von ihrer Kontrollgruppe wurden 7 bzw. 9 Gehirne präpariert. Durchschnittlich wurden zwischen 9 und 11 Schnitte pro Tier angefertigt.

Die Quotienten, gebildet aus den Mittelwerten der gezählten Kerne jeder Seite, zeigen eine geringere Streubreite als bei der c-Jun Serie. Der geometrische Mittelwert unterscheidet sich nicht (Tab. 8). Diese Angleichung beider Gruppen zeigt der Boxplot, in dem sich die Mediane um 2 Punktwerte unterscheiden (Abb. 14).

Tab. 8: Markierte Kerne von WT1 und JNK1-KO

WT1				JNK1-KO			
Kennung	ipsi	contra	i/c (%)	Kennung	ipsi	contra	i/c (%)
1L	1,3	5,3	25	5R	1,11	4,67	24
1LL	0,91	3,45	26	5LR	2,4	6,8	35
4NOM	1,7	4,3	40	5LL	3,1	7,7	40
4R	1,3	4,8	27	14NOM	1	3,5	29
6LL	1,5	6,55	23	14R	2,9	6	48
6RRL	1,42	7	20	14LL	0,8	2,8	29
9NOM	1,18	2,09	56	15NOM	1	4	25
9L	1,73	3,36	51				
9RL	1,58	3,67	43				
gMW			32	gMW			32

Dargestellt sind im Seitenvergleich die MW der markierten Kerne pro Tier. Aus den MW wurde der Quotient gebildet. Die Quotienten wurden durch den gMW zusammengefasst. Ausgewertete Schnitte pro Tier: WT1: 10,8; JNK1-KO: 9,4. Kennung = individuell protokollierte Tiere; ipsi = Nervendurchtrennung; contra = unbehandelte Seite; i/c (%) = Verhältnis von contra zu ipsi in %; gMW = geometrischer Mittelwert.

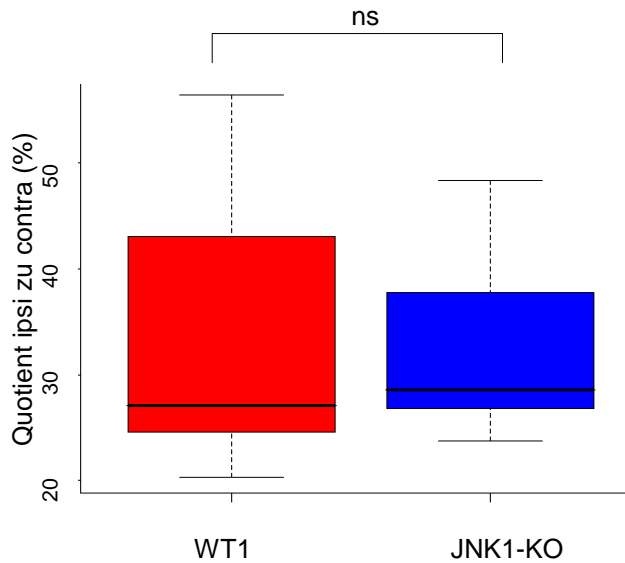


Abb. 13: Boxplot der markierten Kerne von WT1 und JNK1-KO. Dargestellt wird das Verhältnis der markierten Kerne auf der contralateralen zur ipsilateralen Seite. **WT1 Gruppe:** Median: 27; IQR: 25 - 43. Minimum: 20; Maximum: 56; **JNK1-KO:** Median: 29; IQR: 27 - 38; Minimum: 24; Maximum: 38. IQR (*interquartile range*) = Alle Werte zwischen der 1. Quartile und 3. Quartile ergeben den Interquartil Abstand, der 50% aller Werte repräsentiert. **ns = nicht signifikant**

3.3.1.3 Korrelation zwischen später Reflexantwort und markierten Kernen

Abschließend wurden, getrennt nach Gruppen, Ränge im jeweiligen Betrachtungsschwerpunkt vergeben (Tab. 9). Es zeigte sich, dass zwischen Reflexwertsummen am Ende und den markierten Kernen in beiden Gruppen eine positive Korrelation bestand (Abb. 14).

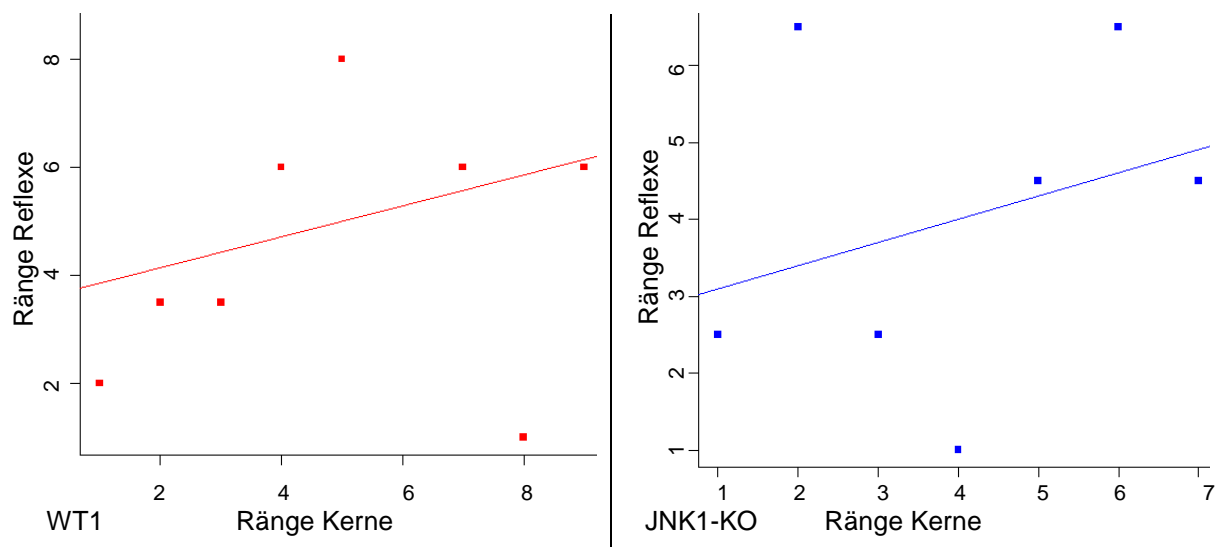


Abb. 14: Scatterplot Reflexantwort und markierte Kerne von WT1 und JNK1-KO. Für die jeweilige Gruppe ist die Beziehung zwischen den Reflexwerten zu den der markierten Kernen in einem Scatterplot dargestellt. Der Korrelationsindex von WT1 beträgt +0,6, JNK1-KO +0,8. Ränge = Rang Zuordnung innerhalb des Betrachtungsschwerpunktes, dabei erhält der niedrigste Wert den niedrigsten Rang. Reflexe: Reflexwertsummen der letzten 10 Tage; Kerne: Quotienten der markierten Kerne.

Tab. 9: Reflexantwort und markierte Kerne von WT1 und JNK1-KO

WT1 Kennung	Reflex		Kerne	
	Rang	Summe	Rang	i/c (%)
9L	1	8,00	8	51
6RRL	2	8,50	1	20
1L	3,5	9,50	3	25
6LL	3,5	9,50	2	23
1LL	6	10,00	4	26
9NOM	6	10,00	9	56
9RL	6	10,00	7	43
4R	8	10,50	5	27
4NOM	9	11,00	6	40

Korrelationsindex: +0,6

JNK1-KO Kennung	Reflex		Kerne	
	Rang	Summe	Rang	i/c (%)
14LL	1	6,61	4	29
5R	2,5	8,00	1	24
14NOM	2,5	8,00	3	29
5LR	4,5	8,50	5	35
14R	4,5	8,50	7	48
5LL	6,5	10,00	6	40
15NOM	6,5	10,00	2	25

Korrelationsindex: +0,8

In der Tabelle aufgelistet sind die Ränge von jedem Tier, erhalten aus den Reflexwertsummen zum Ende des Versuches und den markierten Kernen. Summe = Summe der Reflexwerte der letzten 10 Tage. i/c (%) = Quotient der ipsilateralen zur contralateralen Seite; Rang = Rang Zuordnung innerhalb des Betrachtungsschwerpunktes, dabei erhält der niedrigste Wert den niedrigsten Rang; Kennung = individuell protokollierte Tiere. Zusätzlich wurde Korrelationsindex eingetragen.

3.3.2 JNK3

In die Untersuchung von JNK3 wurden insgesamt 16 Tiere (JNK3-KO: 8; WT3: 8) aufgenommen.

3.3.2.1 Funktionsgewinn der Vibrissenbewegung

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Beobachtungen zeigen beide Gruppen zu Beginn des Versuches einen ähnlichen Verlauf in der Entwicklung der Vibrissenbewegung (Tab. 10). Dies spiegelt die Differenz der MW von -0,04 am Tag 23 zwischen der WT-Kontrolle und JNK3-KO (Abb. 15). Dies ändert sich in der zweiten Hälfte des Versuches. Am Tag 44 weist

JNK3-KO einen Reflexwert von 1,5 und WT3 einen Reflexwert von 1,9 auf. Beide Gruppen stagnieren in ihrem Regenerationsfortschritt auf unterschiedlichen Niveaus der Reflexstärke ab Tag 38.

Der Knockout überschreitet bis zum Ende der Beobachtung den Reflexwert 1,5 nicht. Im Vergleich hierzu hat die Kontrollgruppe einen Maximal Wert von $1,9 \pm 0,2$ (Abb. 16).

Die im Boxplot eingetragenen Mediane verdeutlichen, dass das aktive JNK3 Gen in der Kontrollgruppe die Regeneration beeinflusst (Abb. 16).

Tab. 10: Meilensteine der Regeneration von WT3 und JNK3-KO

Reflexwerte	0,5	1	1,5	2	2,5
WT3 (d)	16	28	35	-	-
JNK3-KO(d)	19	28	40	-	-

Dargestellt sind die Tage nach Nervendurchtrennung, an denen die Mittelwerte der Gruppen die entsprechenden Reflexwerte erstmalig erreicht haben. d = Tage nach Durchtrennung; - = Reflexwert nicht erreicht.

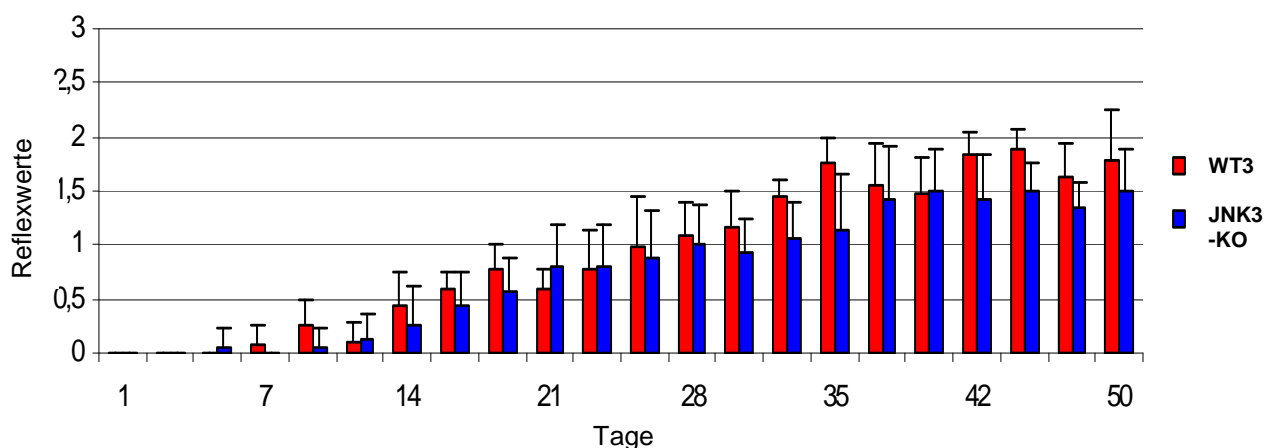


Abb. 15: Regenerationsverlauf von WT3 und JNK3-KO. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD) der Gruppe WT3 (n = 8) und JNK3-KO (n = 8) an 22 Messzeitpunkten. Maximalwert WT3: $1,9 (\pm 0,18)$ am Tag 44; Maximalwert JNK3-KO: $1,5 (\pm 0,38)$ am Tag 40. n = Anzahl der Tiere

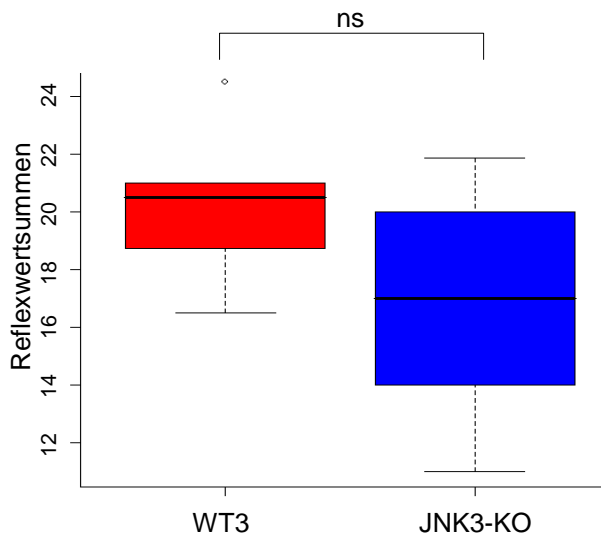


Abb. 16: Regenerationseffizienz von WT3 und JNK3-KO. Dargestellt sind die Reflexwertsummen der einzelnen Tiere im Boxplot. **WT3:** Median: 20,5; IQR: 18,88 – 21; Minimum: 16,5, Ausreißer: 24,5. **JNK3-KO:**Median: 17; IQR: 14 – 19,5; Minimum: 11; Maximum: 21,86. **IQR** (*interquartile range*): Alle Werte zwischen der 1.Quartile und 3. Quartile ergeben den Interquartilabstand, der 50% aller Werte repräsentiert. **ns = nicht signifikant**

Jedoch ergibt die statistische Prüfung einen nicht signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum. Allerdings fällt auf, dass die Reflexwertsummen zum Ende des Versuches sich signifikant unterscheiden ($p = 0,03$) (Abb. 16).

3.3.2.2 Retrograd markierte Kerne

Es wurden von JNK3-KO 7 und von der WT-Kontrolle 6 Gehirne und pro Tier durchschnittlich 7 bis 8 Schnitte ausgewertet.

Wie auch in den vorangegangenen Auswertungen der markierten Kerne unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht voneinander. Beide zeigen eine ähnliche Streubreite ihrer Quotienten und der geometrische Mittelwert unterscheidet sich nur um einen Punktwert (Tab. 11 + Abb. 17). Zwischen den beiden Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied.

Tab. 11: Markierte Kerne WT3 und JNK3-KO

WT3				JNK3-KO			
Kennung	ipsi	contra	i/c (%)	Kennung	ipsi	contra	i/c (%)
m-1-VI	2	4,11	49	m-2-VI	3,22	5,33	60
m-4-VI	1,75	4,13	42	m-6-VI	3	7,13	42
m-5-VI	2	5,25	38	m-7-VI	1,44	5,11	28
m-9-VI	2,56	3	85	m-8-VI	0,63	2,25	28
m-12-VI	1,67	6	28	m-10-VI	2,43	3,14	77
m-16-VI	0,86	2,71	32	m-14-VI	2	6,11	33
				m-15-VI	2,2	5	44
gMW			43	gMW			42

Dargestellt sind im Seitenvergleich die MW der markierten Kerne pro Tier. Aus den MW wurde der Quotient gebildet. Die Quotienten wurden durch den gMW zusammengefasst. Ausgewertete Schnitte pro Tier: WT3: 7,5; JNK3-KO: 8,4. Kennung = individuell protokollierte Tiere; ipsi = Nervendurchtrennung; contra = unbehandelte Seite; i/c (%) = Verhältnis von contra zu ipsi in %; gMW = geometrischer Mittelwert.

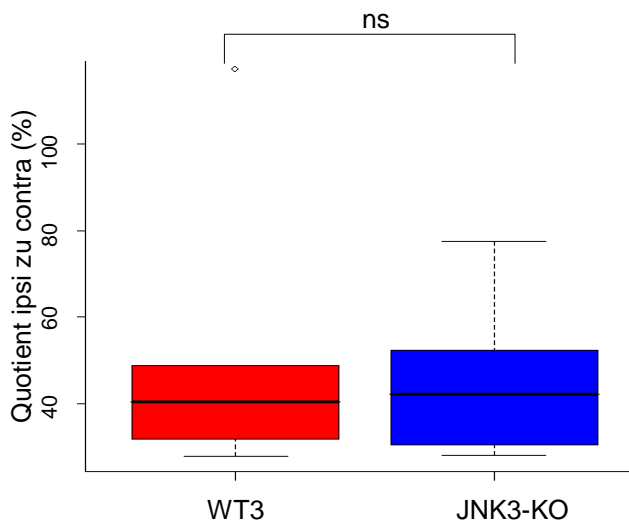


Abb. 17: Boxplot der markierten Kerne von WT3 und JNK3-KO. Dargestellt wird das Verhältnis der markierten Kerne auf der contralateralen zur ipsilateralen Seite. **WT3:** Median: 40; IQR: 33 – 47; Minimum: 33; Maximum: 47, Ausreißer: 85. **JNK3-KO:** Median: 42; IQR: 30 - 52; Minimum: 28; Maximum: 77. IQR (*interquartile range*) = Alle Werte zwischen der 1. Quartile und 3. Quartile ergeben den Interquartil Abstand, der 50% aller Werte repräsentiert. **ns = nicht signifikant**

3.3.2.3 Korrelation zwischen später Reflexantwort und markierten Kernen

Bei der Vergabe der Ränge zu den einzelnen Tieren getrennt nach Betrachtungsschwerpunkt zeigt der JNK3-KO eine positive Korrelation, so dass eine gute Reflexantwort mit einer hohen Anzahl an markierten Kernen einhergeht. Demgegenüber besteht bei der WT-Kontrolle eine negative Korrelation (Tab. 12 + Abb. 18).

Tab. 12: Reflexantwort und markierte Kerne WT3 und JNK3-KO

WT3 Kennung	Reflex		Kerne	
	Rang	Summe	Rang	i/c (%)
m-1-VI	1	7	5	49
m-4-VI	2,5	8	4	42
m-9-VI	2,5	8	6	85
m-12-VI	4	9	1	28
m-5-VI	5,5	9,5	3	38
m-16-VI	5,5	9,5	2	32

Korrelationsindex: -0,7

JNK3-KO Kennung	Reflex		Kerne	
	Rang	Summe	Rang	i/c (%)
m-6-VI	1,5	5,5	4	42
m-8-VI	1,5	5,5	1	28
m-14-VI	3	7	3	33
m-2-VI	4,5	8	6	60
m-7-VI	4,5	8	2	28
m-10-VI	6,5	8,5	7	77
m-15-VI	6,5	8,5	5	44

Korrelationsindex: +0,7

In der Tabelle aufgelistet sind die Ränge von jedem Tier, erhalten aus den Reflexwertsummen zum Ende des Versuches und den markierten Kernen. Summe = Summe der Reflexwerte der letzten 10 Tage. i/c (%) = Quotient der ipsilateralen zur contralateralen Seite; Rang = Rang Zuordnung innerhalb des Betrachtungsschwerpunktes, dabei erhält der niedrigste Wert den niedrigsten Rang; Kennung = individuell protokollierte Tiere. Zusätzlich wurde Korrelationsindex eingetragen.

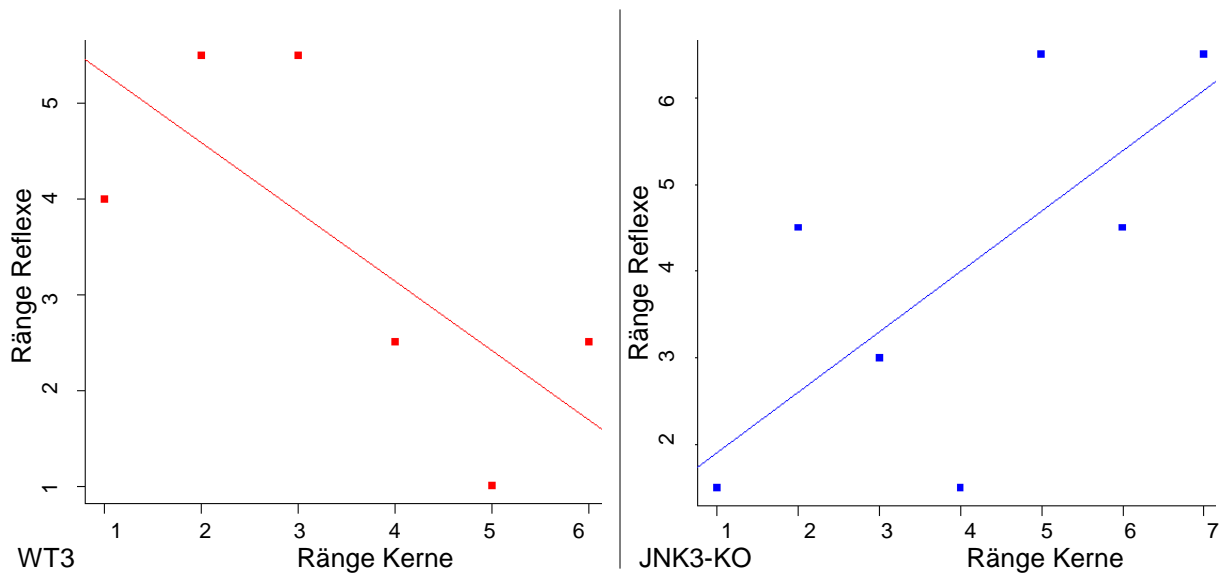


Abb. 18: Scatterplot Reflexantwort und markierte Kerne WT3 und JNK3-KO. Für die jeweilige Gruppe ist die Beziehung zwischen den Reflexwerten zu den markierten Kernen in einem Scatterplot dargestellt. Der Korrelationsindex von WT3 beträgt $-0,7$, JNK3-/- $+0,7$. Ränge = Rang Zuordnung innerhalb des Betrachtungsschwerpunktes, dabei erhält der niedrigste Wert den niedrigsten Rang. Reflexe: Reflexwertsummen der letzten 10 Tage; Kerne: Quotienten der markierten Kerne.

3.3.3 JNK2/3 Doppel-KO

In die Untersuchung des Doppel KO kamen insgesamt 10 Tiere (JNK2/3 KO: 5; WT3: 5).

3.3.3.1 Funktionsgewinn der Vibrissenbewegung

Im Regenerationsverlauf zeigt die WT-Kontrolle einen stärkeren Anstieg der Reflexstärke als der Doppel-KO (Abb. 20). Jedoch zeigen die Meilensteine der Regeneration, dass sich die Geschwindigkeiten des Funktionsgewinns nicht zwischen den beiden Gruppen unterscheiden (Tab. 13). Ab den Tag 30 zeichnet sich ein Plateau ab, wobei die Vibrissenbewegung der WT-Kontrolle stärker ist (Abb. 20).

Tab. 13: Meilensteine der Regeneration von WT3 und JNK2/3KO

Reflexwerte	0,5	1	1,5	2	2,5
WT3 (d)	16	26	30	-	-
JNK2/3-KO (d)	16	26	30	-	-

Dargestellt sind die Tage nach Nervendurchtrennung, an denen die Mittelwerte der Gruppen die entsprechenden Reflexwerte erstmalig erreicht haben. d = Tage nach Durchtrennung; - = Reflexwert nicht erreicht.

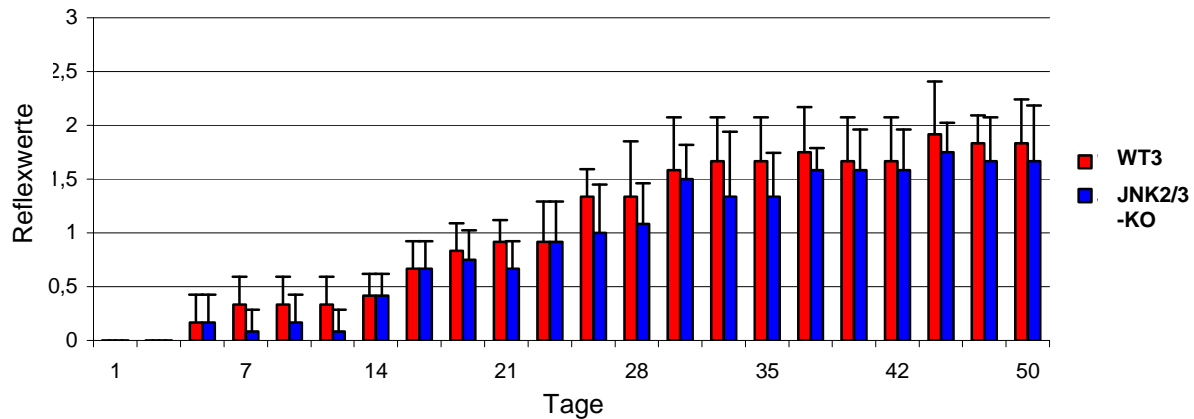


Abb. 19: Regenerationsverlauf von WT3 und JNK2/3-KO. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD) der Gruppe WT3 ($n = 5$) und JNK2/3-KO ($n = 5$) an 22 Messzeitpunkten. Maximalwert WT3: 1,92 (\pm 0,49) am Tag 44; Maximalwert JNK3-KO: 1,72 (\pm 0,27) am Tag 44. $n =$ Anzahl der Tiere.

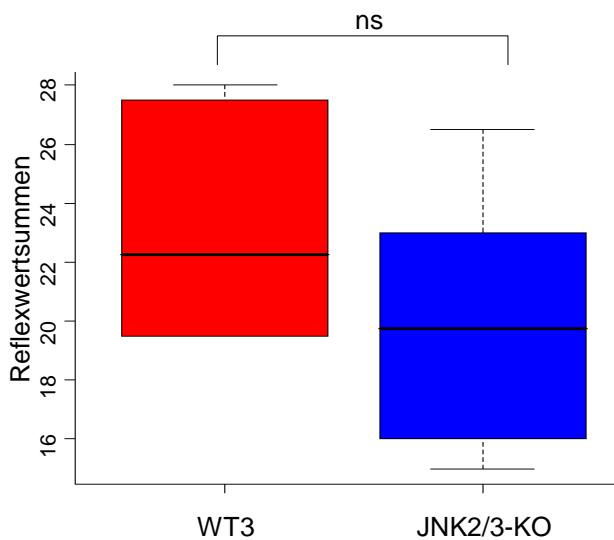


Abb. 20: Regenerationseffizienz von WT3 und JNK2/3-KO: Dargestellt sind die Reflexwertsummen der einzelnen Tiere im Boxplot. **WT3:** Median: 22,25; IQR: 19,75 – 26,62; Maximum: 28. **JNK2/3-KO:** Median: 19,75; IQR: 16,75 – 22,38; Minimum: 15; Maximum: 26,5. IQR (*interquartile range*): Alle Werte zwischen der 1. Quartile und 3. Quartile ergeben den Interquartil Abstand, der 50% aller Werte repräsentiert. Ausreißer = 1,5 bis 3-fache des IQR. ns = nicht signifikant

Der Boxplot veranschaulicht, dass der Doppel-KO die Regeneration hemmt, jedoch im Vergleich zu den Serien von JNK1 und JNK3 nicht so stark (Abb. 20). Die statistische Überprüfung ergibt einen nicht signifikanten Wert.

3.3.3.2 Retrograd markierte Kerne

Es wurden vom JNK2/3-KO und von der WT-Kontrolle 5 Gehirne ausgewertet. Die durchschnittliche Schnitzzahl lag bei 7.

Anders als bei den vorangegangenen Ergebnissen unterscheiden sich die Quotienten der beiden Gruppen zum Teil erheblich, so dass der geometrische Mittelwert um 12 Prozentpunkte auseinander liegt (Tab. 14). Hierbei hat die WT-Kontrolle eine größere Streubreite als der Doppel-KO (Abb. 21).

Tab. 14: Markierte Kerne WT3 und JNK2/3KO

WT3				JNK2/3-KO			
Kennung	ipsi	contra	i/c (%)	Kennung	ipsi	contra	i/c (%)
m-3-IV	2,4	4,3	56	m-2-IV	2,6	5	52
m-4-IV	2,3	3	77	m-5-IV	2,6	7,6	34
m-9-IV	5	5,2	96	m-6-IV	2	6,8	29
m-10-IV	2,1	5,1	41	m-7-IV	1,8	4,4	41
m-12-IV	1,3	6	22	m-8-IV	2,5	5,25	48
gMW			52	gMW			40

Dargestellt sind im Seitenvergleich die MW der markierten Kerne pro Tier. Aus den MW wurde der Quotient gebildet. Die Quotienten wurden durch den gMW zusammengefasst. Ausgewertete Schnitte pro Tier: WT3: 7,5; JNK2/3-KO 7. Kennung = individuell protokollierte Tiere; ipsi = Nervendurchtrennung; contra = unbehandelte Seite; i/c (%) = Verhältnis von contra zu ipsi in %; gMW = geometrischer Mittelwert.

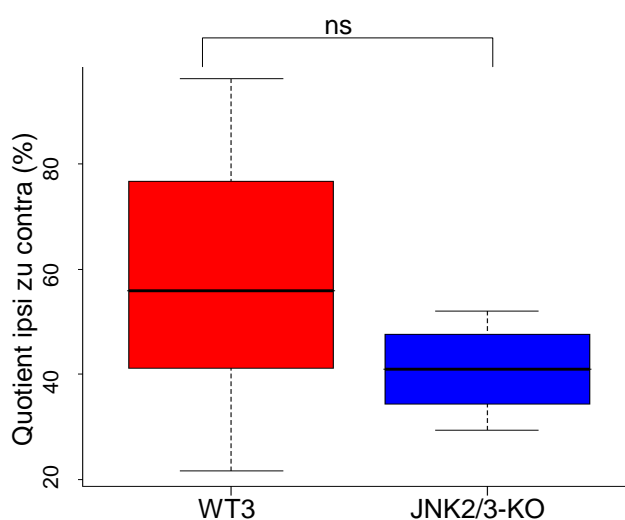


Abb. 21: Boxplot der markierten Kerne von WT3 und JNK2/3-KO. Dargestellt wird das Verhältnis der markierten Kerne auf der contralateralen zur ipsilateralen Seite. **WT3:** Median: 56; IQR: 41 – 77; Minimum: 22; Maximum: 96. **JNK2/3-KO:** Median: 41; IQR: 34 - 48; Minimum: 29; Maximum: 52. IQR (*interquartile range*) = Alle Werte zwischen der 1. Quartile und 3. Quartile ergeben den Interquartil Abstand, der 50% aller Werte repräsentiert. **ns = nicht signifikant**

3.3.3.3 Korrelation zwischen später Reflexantwort und markierten Kernen

Nach der Zuordnung der Ränge im jeweiligen Betrachtungsschwerpunkt besteht bei beiden Gruppen zwischen den Reflexwerten und den markierten Kernen eine negative Korrelation (Tab. 15). Hier korreliert ein niedriger Rang bei den Reflexwertsummen mit einem hohen Rang bei den retrograd markierten Kernen. Der Scatterplot stellt dieses gegensätzliche Verhalten der beiden Gruppen dar (Abb. 22).

Tab. 15: Reflexantwort und markierte Kerne WT3 und JNK2/3-KO

WT3 Kennung	Reflex		Kerne	
	Ränge	Summe	Ränge	i/c (%)
m-9-IV	1	7	5	96
m-3-IV	2	8	3	56
m-10-IV	3	8,5	2	41
m-4-IV	4	9,5	4	77
m-12-IV	5	10	1	22

Korrelationsindex: -0,7

JNK2/3-KO Kennung	Reflex		Kerne	
	Ränge	Summe	Ränge	i/c (%)
m-2-IV	1	6,50	5	52
m-8-IV	2	7	4	48
m-5-IV	3,5	8,50	2	34
m-7-IV	3,5	8,50	3	41
m-6-IV	5	10,50	1	29

Korrelationsindex: -0,97

In der Tabelle aufgelistet sind die Ränge von jedem Tier, erhalten aus den Reflexwertsummen zum Ende des Versuches und den markierten Kernen. Summe = Summe der Reflexwerte der letzten 10 Tage. i/c (%) = Quotient der ipsilateralen zur contralateralen Seite; Rang = Rang Zuordnung innerhalb des Betrachtungsschwerpunktes, dabei erhält der niedrigste Wert den niedrigsten Rang; Kennung = individuell protokollierte Tiere. Zusätzlich wurde Korrelationsindex eingetragen.

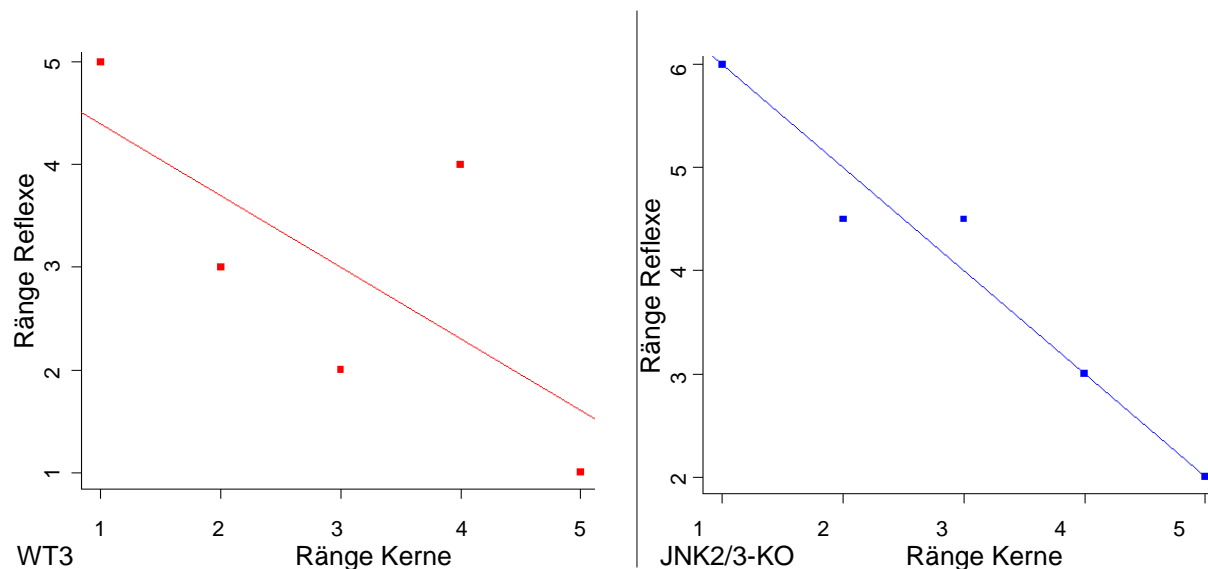


Abb. 22: Scatterplot Reflexantwort und markierte Kerne WT3 und JNK2/3-KO. Für die jeweilige Gruppe ist die Beziehung zwischen den Reflexwerten zu den der markierten Kernen in einem Scatterplot dargestellt. Der Korrelationsindex von WT3 beträgt -0,7, JNK2/3-KO -1. Ränge = Rang Zuordnung innerhalb des Betrachtungsschwerpunktes, dabei erhält der niedrigste Wert den niedrigsten Rang. Reflexe: Reflexwertsummen der letzten 10 Tage; Kerne: Quotienten der markierten Kerne.

3.3.4 JNK2-KO

Dieser Versuch umfasste 13 Tiere. Außerdem stand keine Kontrollgruppe zur Verfügung, so dass zunächst die Ergebnisse des Knockouts isoliert betrachtet und anschließend diese in einen Kontext mit den anderen Kontrollgruppen gebracht wurden.

3.3.4.1 Funktionsgewinn der Vibrissenbewegung

JNK2-KO hat über den gesamten Beobachtungszeitraum einen stetigen Anstieg der Reflexantwort. Am Tag 16 überschreitet JNK2-KO den Reflexwert 0,5 und 17 Tage später erreicht dieser den Reflexwert $1,6 \pm 0,3$. Der maximale Reflexwert beträgt am Tag 50 $1,96 \pm 0,25$ (Tab. 20, Abb. 23).

Tab. 16: Meilensteine der Regeneration von JNK2-KO

Reflexwerte	0,5	1	1,5	2	2,5
JNK2-KO(d)	16	23	33	-	-

Dargestellt sind die Tage nach Nervendurchtrennung, an denen die Mittelwerte der Gruppen die entsprechenden Reflexwerte erstmalig erreicht haben. d = Tage nach Durchtrennung; - = Reflexwert nicht erreicht.

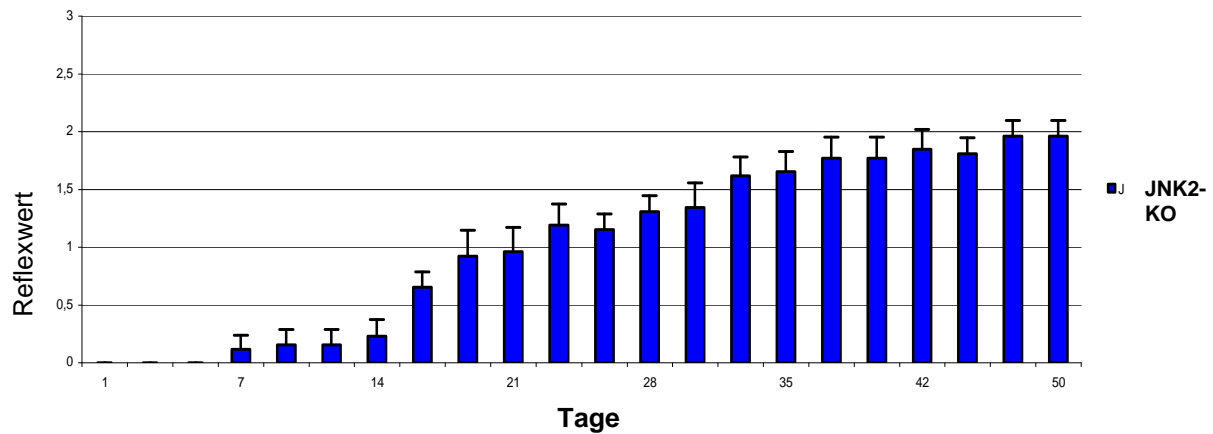


Abb. 23: Der Regenerationsverlauf von JNK2-KO. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD) der Gruppe JNK2-/- ($n = 13$) an 22 Messzeitpunkten. Maximalwert JNK2-KO: 1,96 (\pm 0,25) am Tag 50. $n =$ Anzahl der Tiere.

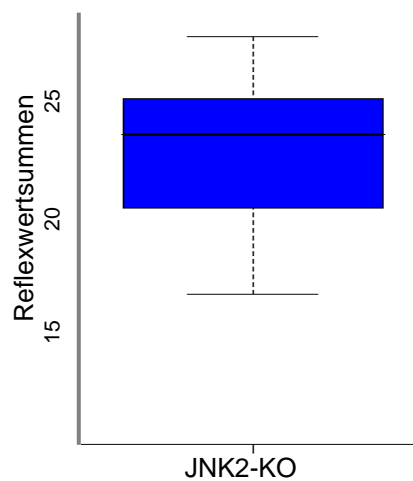


Abb. 24: Die Regenerationseffizienz von JNK2-KO. Dargestellt sind die Reflexwertsummen der einzelnen Tiere im Boxplot. **JNK2-KO:** Median: 23,5; IQR: 20,5 – 25; Minimum: 17; Maximum: 25. **IQR (interquartile range):** Alle Werte zwischen der 1. Quartile und 3. Quartile ergeben den Interquartil Abstand, der 50% aller Werte repräsentiert.

Im Gegensatz zu den Verläufen der anderen Serien entwickelt sich kein Plateau von JNK2-KO (Abb. 23). Der Median ist mit 23,5 relativ hoch (Abb. 24).

3.3.4.2 Retrograd markierte Kerne

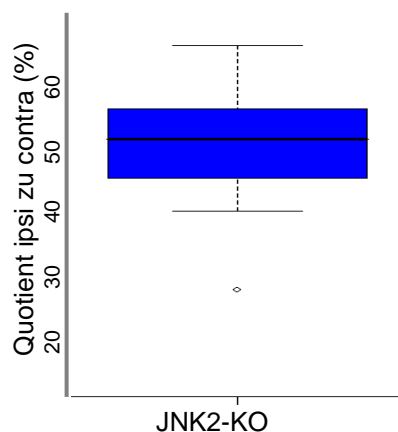
Es wurden von dem JNK2-KO 12 Gehirne untersucht und die durchschnittlich ausgewertete Schnittzahl betrug 9 Schnitte pro Tier.

Die in der Tabelle eingetragenen Ergebnisse zeigen, dass 8 Tiere im Kerngebiet über 50% markierte Kerne aufweisen. Der geometrische Mittelwert beträgt 50 und die Streubreite ist im Vergleich zu c-Jun und JNK gering (Tab. 17).

Tab. 17: Markierte Kerne von JNK2-KO

Kennung	ipsi	contra	i/c*100
m-2-III	2,22	3,89	57
m-10-III	4,4	7,9	56
m-14-III	2,1	4,2	50
m-16-III	1	3,36	30
m-19-III	2,2	5,8	38
m-21-III	3,09	6,09	51
m-3-V	3,33	5,00	67
m-4-V	3,00	6,40	47
m-5-V	1,86	2,86	65
m-12-V	1,75	4,00	44
m-13-V	2,89	5,22	55
m-14-V	2,50	5,30	52
gMW			50

Dargestellt sind im Seitenvergleich die MW der markierten Kerne pro Tier. Aus den MW wurde der Quotient gebildet. Die Quotienten wurden durch den gMW zusammengefasst. Ausgewertete Schnitte pro Tier: JNK2-KO: 9,4. Kennung = individuell protokollierte Tiere; ipsi = Nervendurchtrennung; contra = unbehandelte Seite; i/c (%) = Verhältnis von contra zu ipsi in %; gMW = geometrischer Mittelwert.

**Abb. 25: Boxplot der markierten Kerne von JNK2-KO.**

Dargestellt wird das Verhältnis der markierten Kerne auf der contralateralen zur ipsilateralen Seite. **JNK2-KO**: Median: 52; IQR: 46 - 56; Minimum: 40; Maximum: 67; Ausreißer: 27. Median Kontrolltiere: 42. IQR (*interquartile range*) = Alle Werte zwischen der 1. Quartile und 3. Quartile ergeben den Interquartil Abstand, der 50% aller Werte repräsentiert.

3.3.4.3 Korrelation zwischen später Reflexantwort und markierten Kernen

Die Prüfung nach einer möglichen Korrelation des JNK2-KO zwischen den Reflexwerten aus den letzten 10 Tagen und den Quotienten ergab einen schwach negativen Korrelationswert. Eine starke Reflexantwort geht nicht mit einer hohen Prozentzahl an Kernen einher, was im Scatterplot verdeutlicht wird (Tab. 18 u. Abb. 26).

Tab. 18: Reflexantwort und markierte Kerne JNK2-KO

JNK2-KO Kennung	Reflex		Kerne	
	Rang	Summe	Rang	i/c (%)
m-2-III	1	6,5	10	57
m-12-V	2	9	3	44
m-14-III	4	9,5	5	50
m-13-V	4	9,5	8	55
m-14-V	4	9,5	7	52
m-10-III	8	10	9	56
m-16-III	8	10	1	30
m-3-V	8	9	12	67
m-4-V	8	10	4	47
m-5-V	8	10	11	65
m-19-III	11,5	10,5	2	38
m-21-III	11,5	10,5	6	51

Korrelationsindex: -0,39

In der Tabelle aufgelistet sind die Ränge von jedem Tier, erhalten aus den Reflexwertsummen zum Ende des Versuches und den markierten Kernen. Summe = Summe der Reflexwerte der letzten 10 Tage. i/c (%) = Quotient der ipsilateralen zur contralateralen Seite; Rang = Rang Zuordnung innerhalb des Betrachtungsschwerpunktes, dabei erhält der niedrigste Wert den niedrigsten Rang; Kennung = individuell protokollierte Tiere.

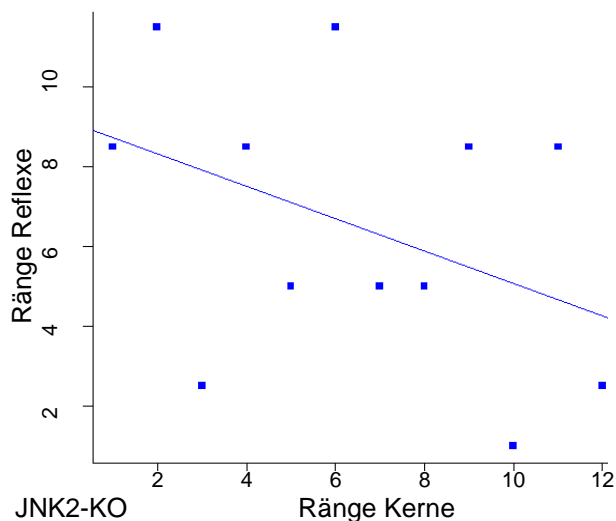


Abb. 26: Scatterplot Reflexantwort und markierte Kerne JNK2-KO. Für die jeweilige Gruppe ist die Beziehung zwischen den Reflexwerten zu den der markierten Kernen in einem Scatterplot dargestellt. Der Korrelationsindex von JNK2-/- beträgt -0,39. Ränge = Rang Zuordnung innerhalb des Betrachtungsschwerpunktes, dabei erhält der niedrigste Wert den niedrigsten Rang. Reflexe: Reflexwertsummen der letzten 10 Tage; Kerne: Quotienten der markierten Kerne.

3.3.4.4 JNK2 *Knock-out* in Beziehung gesetzt mit den Kontrollgruppen

Für diese Versuchserie stand keine Kontrollgruppe zur Verfügung. Deswegen entschieden wir uns den JNK2-KO nach der Darstellung der Ergebnisse mit den Kontrollgruppen aus den vorangegangenen Untersuchungen zu vergleichen. Eminel et al. stellte in ihrer Arbeit heraus, dass die Wildtyp-Gruppen sich nicht voneinander unterschieden (Eminel et al. 2008). Es wurde ein Kontroll-Pool gebildet, in denen die Werte jedes Kontrolltieres aufgenommen wurden. Es wurden die Regenerationseffizienz über den gesamten Zeitraum, über die letzten Tage und die geometrischen Mittelwerte verglichen (Tab.18).

Die Regenerationseffizienz von JNK2-KO liegt bei einem Wert von 23,5. Dieser ist um 2 Punktwerte schlechter als der vom Kontroll-Pool. Anders sieht es beim Vergleich der Mediane zum Ende der Regeneration aus. Dort unterscheidet sich der JNK2-KO nicht. Über diesen Beobachtungszeitraum beeinflusste JNK2-KO die Regeneration nicht.

Der geometrische Mittelwert ist von JNK2-KO um 8 Prozentpunkte höher als der vom Kontroll-Pool, wobei die Standardabweichung der Kontrolle ± 22 ist.

Tab.19: JNK2-KO im Vergleich mit c-Jun, WT1, WT3

	Mediane zur Regenerationseffizienz	Mediane am Ende der Regeneration	gMW der Kerne
Kontrolltiere	25,25 \pm 4,8	9,5 \pm 1,19	43 \pm 22
JNK2-KO	23,5 \pm 3,1	9,6 \pm 1,16	51 \pm 9,8

In der Tabelle sind die Mediane zur Regenerationseffizienz, die Mediane zum Ende der Regeneration und die Verhältniszahlen von den Kernen dargestellt. **Mediane zur Regenerationseffizienz:** Der aus den Reflexwerten des gesamten Beobachtungszeitraumes von jedem Tier errechnete Median (\pm SD). **Mediane am Ende der Regeneration:** Der aus den Reflexwerten der letzten 10 Tagen errechnete Median (\pm SD). **gMW Kerne:** Der aus den Quotienten der Kerne errechnete gMW (\pm SD). gMW: geometrische Mittelwert; Kontroll-Wert: Dieser Wert wurde aus dem Pool der gesamten Kontrolltiere errechnet. n-Kontrolle Regenerationseffizienz = 31; n-Kontrolle Kerne = 27.

3.8 Zusammenstellung der Ergebnisse

Im Folgenden werden die Kernaussagen aus den Versuchsserien in Form einer Tabelle zusammengestellt.

Tab. 20. Zusammenschau der Ergebnisse

Genotyp	Regenerationsverlauf				Kerngebiet	
	Tag 21	Tag 44	p-Wert ges.	p-Wert Ende	gMW	Korr.
c-Jun	1,08	2,08	*0,02	*0,03	54	0
c-JunAA	0,7	1,67			53	+0,34
WT1	1,45	1,97	**0,002	*0,02	32	+0,6
JNK1-KO	0,9	1,63			32	+0,8
WT3	0,61	1,9	0,1	*0,03	39	-0,7
JNK3-KO	0,81	1,5			45	+0,7
WT3	0,92	1,92	0,2	0,5	40	-0,7
JNK2/3-KO	0,67	1,75			52	-0,97
JNK2-KO	0,96	1,81			51	-0,39

Aus der Darstellung des Regenerationsverlaufes wurden die MW der Reflexwerte vom Tag 23 und Tag 44 genommen. Zusätzlich wurden die p-Werte, aus den Reflexwertsummen des gesamten Beobachtungszeitraumes und aus den Reflexwertsummen der letzten 10 Tagen, eingetragen. Für die Darstellung des Kerngebietes wurden von jeder Gruppe der gMW und der Korrelationsindex ausgewählt. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$

4. Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass JNK und c-Jun die neuronale Regeneration beeinflussen. Das Facialis-Modell stellt eine gute Möglichkeit dar, den Regenerationsverlauf von inaktiven Genen *in vivo* zu verfolgen. In einem solchen Modell wurde bereits der Transkriptionsfaktor c-Jun untersucht. Hierbei wurden c-Jun Knockout Mäuse (*c-Jun Δ n*), wobei das c-Jun Gen nur im ZNS ausgeschaltet wurde, mit Kontrolltieren verglichen (Raivich et al. 2004). Die JNK-Isoformen wurden bislang in keiner wissenschaftlichen Arbeit auf ihren Einfluss in der Regeneration durch ein *in vivo* Modell untersucht. Weiterhin gibt es von c-Jun und JNK noch keinen weiteren Hinweis, in welcher Phase des regenerativen Aufbauprozesses diese Moleküle wirken. Durch die genaue Dokumentation des Regenerationsverlaufs über einen Zeitraum von 50 Tagen konnten den jeweiligen Molekülen Zeitpunkte zugeordnet werden, an denen sie die Regeneration am stärksten beeinflussten.

Es stellte sich heraus, dass c-Jun, JNK1 und JNK3 einen signifikanten Einfluss auf den Funktionsgewinn der Vibrissenbewegungen besaßen und dies abhängig vom Genotyp an unterschiedlichen Phasen der Regeneration stattfand. Während c-Jun über den gesamten Zeitraum die Regeneration positiv beeinflusste, zeigte JNK1 zu Beginn und JNK3 am Ende eine signifikante Wirkung auf die Regeneration. Nur beim JNK2-Knockout und JNK2+3-Doppelknockout wurde kein signifikanter Unterschied in der Regeneration zur Kontrollgruppe nachgewiesen.

Die abschließende Untersuchung des Kerngebietes und damit der neuen *motoneuron-targeting* Achse ergaben in allen Gruppen keinen Hinweis darauf, ob ein guter Funktionsgewinn der Vibrissenbewegung mit einer hohen Anzahl an markierten Kernen vergesellschaftet ist.

4.1 Das Experimentelle Modell

4.1.1 JNK Knockout und c-JunAA

Das jeweilige JNK-Gen wurde durch homologe Rekombination ausgeschaltet, so dass eine bestimmte JNK-Isoform nicht in der Maus aktiv ist (Dong et al. 1998, Yang et al. 1997, Yang et al. 1998). Eine andere Methode wurde zur Untersuchung von c-Jun gewählt, da ein Knockout zum Absterben des Embryos führte (Behrens et al. 1999). Durch eine gerichtete Mutation wurden die Phosphorylierungsstellen Serin 63 und 73 durch Alanin ausgetauscht, wodurch die Aktivierung von c-Jun durch JNK blockiert wurde (Behrens et al. 1999, Hilberg

et al. 1993, Johnson et al. 1993). Dennoch bestand noch eine weitere Phosphorylierung von JNK an den Threonin 91 und 93 (Raivich 2008). Zusätzlich war c-Jun über andere Reize wie beispielsweise einem massiven Kalzium-Influx oder über einen Anstieg von ERK weiterhin aktivierbar (Cruzalegui et al. 1999, Herdegen et al. 1997, Morton et al 2003, Rizzo et al. 1999).

Der Genotyp jeder Maus aus jeder Generation wurde durch die PCR-Methode vor jedem Versuch im Institut kontrolliert.

4.1.2 Die Nervendurchtrennung

In dieser Arbeit wird anhand des Facialis-Modells der Einfluss von c-Jun und JNK auf die Regeneration beurteilt. Dieses Modell ist für die Erforschung der Nervenregeneration in vielen Arbeitsgruppen etabliert. Es zeichnet sich durch die zugängliche anatomische Lage der Nerven, die relativ einfache Beurteilbarkeit der Regeneration und der präzisen somatotopischen Projektion in das zentrale Nervensystem aus (Dörfl 1985, Moran und Graeber 2004). Durch den oberflächlichen und peripheren Verlauf des N. facialis besteht nach der Operation ein geringes Weichteiltrauma. Durch die Distanz zum ZNS wird die Blut-Hirn-Schranke nicht verletzt. Diese beiden Voraussetzungen gewähren, dass zusätzliche Störeinflüsse einer überschießenden Entzündungsreaktion lokal oder intrazerebral gering gehalten bzw. vermieden werden (Moran und Graeber 2004). Jede Operation wurde unter denselben Bedingungen durchgeführt, so dass die Nervendurchtrennung bei jedem Tier reproduzierbar war. Der Funktionsgewinn der Vibrissenbewegungen konnte durch den Vergleich zur unbehandelten Seite, anhand des in unserem Institut ausgearbeiteten Bewertungsschemas, unmittelbar notiert werden. Während des gesamten Versuchs wurde jede Maus dem gleichen Stress ausgesetzt und ihr Verhalten ausschließlich durch den gleichen Untersucher protokolliert. So wurde der zufällige Fehler reduziert.

4.1.2 Die Retrograde Markierung

FluoroGold als Marker für die axonale Verbindung zwischen Zellkörper und Muskel wird von vielen Arbeitsgruppen aufgrund der Fähigkeit benutzt, retrograd als neuronaler Tracer im verletzten Axon zum Perikaryon zu wandern (Schmued und Fallon 1986). Er wird nach der Applikation in den Muskel gut von den Axonen aufgenommen und reichert sich im Perikaryon und den Dendriten schnell an (Deller et al. 2000, Naumann et al. 2000, Wessendorf 1991). Dabei ist die Stärke des FluoroGold Signals in dem Perikaryon abhängig von der FluoroGold Konzentration und von der Überlebenszeit *post applicationem*, die

zwischen 2 Tagen und 1 bis 2 Wochen liegen kann (Choi und Raisman 2002, Schmued und Fallon 1986). Damit das Signal im Kern nicht von einer ausgeprägten Markierung der Dendriten überlagert wurde, wurden die Tiere nach 3 Tagen perfundiert. Der Vibrissenmuskel war sehr gut zugänglich, so dass zum einen die Operation gut reproduzierbar war und zum anderen größere Schädigungen des Gewebes vermieden wurden. Im Falle einer Verletzung von Gefäßen bestand keine Gefahr, dass FluoroGold über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn eintrat, sich diffus im Gewebe verteilte und so die Signale ausgehend von den Kernen überspielte (Schmued und Fallon 1986). Jedes Gehirn wurde durch die gleiche Person unter denselben Bedingungen manuell ausgezählt, womit der zufällige Fehler gering gehalten wurde. Diese Form der manuellen Auszählung ist wissenschaftlich etabliert (Choi und Raisman 2002). Aufgrund der sehr stabilen Fluoreszenz von FluoroGold spielte es keine Rolle, wie lange der Schnitt gegenüber dem UV-Licht exponiert war (Schmued und Fallon 1986).

4.2 Axonale Reinnervation

Periphere Nerven können zwar regenerieren, zeigen jedoch ein Funktionsdefizit aufgrund der fehlerhaften Reinnervation (Montserrat und Benito 1988). Dies ist einerseits auf die schlechte Führung des auswachsenden Axons zum Innervationsgebiet zurückzuführen (Aldskogius und Thomander 1986, Brushart und Seiler 1987, Esslen 1960). Andererseits besteht ein unkontrolliertes axonales Aussprossen, das in eine Fehlinnervation mündet (Ito et al. 1994, Morris et al. 1972).

In diesem Versuch ergab die morphologische Untersuchung des Kerngebietes vom Ncl. facialis eine Aufhebung der Somatotopie, wie sie auch in anderen Untersuchungen mit FluoroGold nachgewiesen wurden (Choi und Raisman 2002, Tomov et al. 2002). Die Motoneurone waren auf der axotomierten Seite nicht mehr im Gebiet des R. buccalis, sondern sie lagen im Facialisgebiet verstreut. Dieses Bild konnte keinem Genotyp als spezifisch zugeordnet werden. Die Arbeitsgruppe um Prof. W. Neiss (Universität zu Köln) hat in einem Experiment, bei dem ein Stück des N. facialis durch ein Stück des N. olfactorius ersetzt wurde, bewiesen, dass eine zielgerechte Reinnervation vom *microenvironment* abhängig ist (Guntinas-Lichus 2001). Die Regeneration wurde durch die Bereitstellung des entsprechenden *microenvironments* verbessert. Dies äußerte sich in einer geringer ausgeprägten Zerstörung der Somatotopie (Guntinas-Lichus 2001). Ob c-Jun und JNK auch bei dem von Guntinas-Lichus durchgeführten Versuch eine Rolle spielten, wäre noch zu erforschen.

Die Quantifizierung der ausgezählten Kerne ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den genetisch veränderten und den Kontrolltieren. Bei allen Tieren wurden auf der durchtrennten Seite deutlich weniger Kerne mit FluoroGold markiert als auf der Kontrollseite. Dieser Versuchsaufbau machte keine Aussage über den Zelluntergang, sondern beschrieb vielmehr, dass unabhängig von der Mutante oder der Kontrolle zwischen 50 und 70% weniger Motoneurone im Vergleich zur contralateralen Seite mit dem Innervationsgebiet verbunden waren (Deller et al. 2000, Tomov et al. 2002). Weil aber der Funktionsgewinn neurologisch sich zwischen Mutante und der Kontrolle unterschied, besteht die Möglichkeit, dass der Einfluss der Moleküle auf die Regeneration im strukturellen Neuaufbau des aussprossenden Axons oder in der neuen neuronalen Plastizität liegt. Eine andere morphologische Untersuchung zeigte, dass die Abwesenheit von c-Jun im ZNS zu einer Atrophie der Neurone führte (Raivich et al. 2004). Kann dieses morphologische Bild der Zellatrophie das funktionale Korrelat für eine Fehlfunktion des Neurons sein, wie sie im Regenerationsverlauf von c-JunAA dokumentiert wurde, ohne jedoch dabei die Anzahl an neuen axonalen Verbindungen zwischen Kern und Innervationsgebiet zu beeinflussen?

4.3 Die Rolle von JNK in der neuronalen Regeneration

4.3.1 Beteiligung von JNK an der Nervenregeneration

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass JNK an der Regeneration von Nerven beteiligt war und dass trotz der kompletten Inaktivierung einer JNK-Isoform eine partielle axonale Reinnervation noch stattgefunden hatte.

In PC12-Zellen, die neuronalen Zelllinien entstammten, sind die JNK-Isoformen nach NGF-Stimulation für die Ausbildung und das Wachstum von Neuriten verantwortlich (Leppa et al. 1998, Waetzig und Herdegen 2003, Eminel et al. 2008). Dabei sind alle drei JNK-Isoformen gleichermaßen stark am Neuritenwachstum beteiligt (Waetzig und Herdegen 2003). Eine weitere Aktivierung von JNK erfolgt durch PAK, *p-21 activated Kinase*, die wie NGF das Neuritenwachstum fördert (Daniels et al. 1998). Diese Ergebnisse zum Neuritenwachstum differenzieren allerdings nicht zwischen dem Auswachsen von Dendriten und der Elongation von Axonen.

4.3.2 Beteiligung von JNK am Aufbau des Axons

Die Analyse der Facialis-Kerne zeigte, dass die JNK-Knockout Tiere nicht die Zahl der Motoneurone, die in das Innervationsgebiet eingewachsen sind, beeinflusste, sondern dass

JNK offenbar am strukturellen Aufbau der Axone beteiligt ist. Gibt es Erkenntnisse über Substrate von JNK, die den strukturellen Aufbau unterstützen?

Neben c-Jun als Transkriptionsfaktor wurden zahlreiche weitere zytoplasmatische Substrate von JNK nachgewiesen, die an der Neuritenelongation und Neuritenorganisation beteiligt sind (Waetzig et al. 2006). STAT3, *signal transducer and transcription factor 3*, wird durch JNK aktiviert (Levy und Lee 2002). CNTF, *ciliary neurotrophic factor*, der von den Schwannzellen sezerniert wird, bindet an den CNTF-Rezeptor des Axons und aktiviert dadurch STAT3. Nach einer genetischen Deletion dieser beiden Moleküle wurde eine abgeschwächte Regeneration von Motoneuronen nachgewiesen (Makwana und Raivich 2005, Rende et al. 1992). Endothelin, ein Vasokonstriktor, ist ein weiterer Aktivator von JNK, welcher mit einer Neuritenelongation von kortikalen Zellkulturen assoziiert ist (Uesugi et al. 2009). Wiederum zeigten Soares et al., dass MAP1B, *microtubule associated proteins*, für den axonalen Aufbau von Bedeutung ist und von JNK aktiviert wird (Soares et al. 2007).

JNK ist also über zahlreiche Substrate am strukturellen Aufbau von Axonen beteiligt.

In Studien, in denen die einzelnen JNK-Isoformen auf ihre regenerative Potenz untersucht wurden, zeigte insbesondere JNK1 eine starke Affinität zu MAP2. Durch MAP2 wird der Zusammenbau bzw. die Organisation der Mikrotubuli gesteuert (Chang et al. 2003, Björkblom et al. 2005). Neben MAP2 werden die Mikrotubuli zusätzlich von SCG10 organisiert. SCG 10 befindet sich distal im Wachstumskolben. SCG10 ist ein weiteres zytoplasmatisches Substrat von JNK1 und von JNK3 (Neidhart et al. 2001, Tararuk et al. 2006). Auch JNK3 hat ein spezifisches Substrat. Die schwere Untereinheit vom Neurofilament, NFH, wird durch JNK3 phosphoryliert. NFH organisiert distal am auswachsenden Axon den Transport der weiteren Neurofilament Klassen, worüber anschließend insbesondere der Diameter des Axons beeinflusst wird (Brownlees et al. 2000). Spiegelt also der schlechte Regenerationsverlauf der JNK1- und JNK3-Knockout Tiere die fehlende Phosphorylierung der Substrate wider?

Für JNK2 wurden bis jetzt keine Assoziation mit Molekülen, die den strukturellen Aufbau beeinflussen, nachgewiesen (Waetzig et al. 2006).

Experimente zum Neuritenwachstum mit PC12-Zellen zeigten eine gesteigerte Expression von allen drei JNK-Isoformen unter einer Induktion mit NGF (Waetzig und Herdegen 2005). Damit konnte gezeigt werden, dass auch JNK2 an zytoskelettalen Funktionen, wie den Aufbau an Neuriten, beteiligt ist (Waetzig et al. 2006). Meine Ergebnisse zeigen, dass JNK2 keinen Einfluss auf die Regeneration hatte. Jedoch bleiben im JNK2-Knockout die anderen beiden JNK-Isoformen aktiv, so dass diese beiden Isoformen ihre regenerative Potenz abrufen

konnten und eine eventuelle Schwächung durch ein Fehlen der JNK2-Isoform kompensiert werden konnte.

Im Widerspruch zu dieser Überlegung steht folgende Beobachtung. Maus-Embryo-Fibroblasten von JNK2-Knockout Tiere proliferierten schneller als die Kontrollgruppe (Sabapathy und Wagner 2004). Somit hemmte JNK2 in diesem Falle proliferative Prozesse. Der Regenerationsverlauf des JNK2-Knockouts zeigte in dieser Arbeit einen kontinuierlichen Anstieg des Funktionsgewinns. Könnte also JNK2 im Vergleich zu den anderen JNK Isoformen doch entgegengesetzte Funktionen ausüben?

4.3.3 Einfluss der JNK-Isoformen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Regeneration

Es gibt bisher keine differenzierten Ergebnisse über die Rolle von den jeweiligen JNK-Isoformen in der Nervenregeneration. Eine zeitlich unterschiedliche Einflussnahme auf die Regeneration besteht zwischen ERK1/2, *extracellular signal-regulated kinase*, und JNK. ERK1/2 ist für die frühe Antwort des Neurons auf eine Nervendurchtrennung und JNK für die späte Antwort verantwortlich (Xiao und Liu 2003). In Experimenten mit PC-12 Zellen wiesen Eminel et al. ein von JNK1, 2 und 3 abhängiges Neuritenwachstum innerhalb der ersten 24 Stunden des Experimentes nach (Eminel et al. 2008). Demgegenüber zeigten JNK1 und 3 in dieser Arbeit unterschiedliche Verläufe. JNK1 war an der Regeneration vom N. facialis besonders zu Beginn signifikant beteiligt, während JNK3 erst zum Ende die Regeneration signifikant beeinflusste. 24 Stunden nach Nervendurchtrennung wird c-Jun an dem Serin-Rest 73 phosphoryliert, zur selben Zeit besteht eine erhöhte Aktivität von JNK1 und JNK2 (Herdegen et al. 1998). Diese Beobachtung unterstützt den frühen Einfluss von JNK1 in meiner Arbeit auf die Regeneration.

Ist JNK1 also mit dem frühen Beginn und der Formierung des Wachstumskolbens und JNK3 mit dem strukturellen Ausbau des Nervens zum Ende assoziiert? Zu dieser Fragestellung gibt es bislang keine weiteren Arbeiten, die die einzelnen JNK Isoformen einem bestimmten Abschnitt der Regeneration zuordneten.

4.4 Die Rolle von c-Jun in der neuronalen Regeneration

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass durch die Inaktivierung der JNK-Bindungsstellen Serin 63 und 73 die Regeneration verlangsamt und abgeschwächt wurde, und dass die verbleibenden Phosphorylierungsmotive am c-Jun-Molekül diese Blockade nicht kompensieren konnten.

Eine Verletzung peripherer und zentraler Neurone induziert eine c-Jun Expression (Herdegen et al. 1991, Herdegen und Leah 1998). Diesen Zusammenhang in der Neuroprotektion unterstützten Experimente mit PC12-Zellen. Die Überexpression von c-Jun führte zu einer Neuritenelongation und einer Neuritogenese von PC12-Zellen, ähnlich einer Stimulation mit NGF (Dragunow et al. 2000, Leppa et al. 1998).

Die Arbeitsgruppe von Raivich (University College London) hat im Facialis-Modell mit Tieren, die keine c-Jun Expression im ZNS aufwiesen, *c-Jun Δ n*, einen mit dieser Arbeit vergleichbaren Regenerationsverlauf beobachtet (Raivich et al. 2004). *c-Jun Δ n* hatte 28 Tage nach der Nervendurchtrennung in der Auswertung der Reflexwerte einen Mittelwert von $0,6 \pm 0,2$ und die Kontrolle einen Wert von $1,7 \pm 0,3$ (Raivich et al. 2004). Die Messungen meiner Arbeit ergaben an diesen Tagen vergleichbare Werte (Abb. 8). Im Gegensatz zu dem in meinem Experiment sich abzeichnenden Plateau am Ende des Beobachtungszeitraums und dem damit vermuteten Abschluss der Regeneration von c-Jun und c-JunAA, zeigten Raivich et al., dass *c-Jun Δ n* in einem Zeitraum von 15 Wochen noch im Bewegungsumfang der Vibrissen zunahm. Somit konnte das Neuron den Verlust von c-Jun im ZNS noch kompensieren.

4.5 Substrate von c-Jun und die axonale Verlängerung

GAP-43, CAP-23 und Laminin mit dem Adhäsions-Molekül $\alpha 7\beta 1$ -Integrin sind von der c-Jun kontrollierten Transkription abhängig (Herdegen and Leah 1998, Raivich et al. 2004, Werner et al. 2000, Wynick et al. 2001). Bei *c-Jun Δ n* Mäusen fehlte nach der Facialis-Durchtrennung die Induktion von $\alpha 7\beta 1$ -Integrin, wodurch der axonale Aufbau gestört wurde (Raivich et al. 2004). Auch die Moleküle GAP-43 und CAP-23 spielen für die neuronale Regeneration eine wichtige Rolle. Eine Überexpression von GAP-43 und CAP-23 führen zu einem gesteigerten axonalen Aussprossen, das dem Effekt einer konditionierten Läsion entsprach (Bomze et al. 2001). Der Hyaluronsäurerezeptor CD-44 wird unter Abwesenheit von c-Jun in Zellen nicht aktiviert (Raivich et al. 2004). Dieser ist aber für die axonale Elongation in der Interaktion mit nichtneuronalen Zellen und für den interzellulären Informationsaustausch verantwortlich (Jones et al. 1997, Jones et al. 2000). Dies erklärt, dass durch inaktiviertes c-Jun Substrate nicht gebildet werden können und somit die axonale und die periaxonale Aussprossung gestört ist (Werner et al. 2000).

Vergleichbar mit den Ergebnissen aus den Experimenten mit JNK wurde nach der retrograden Markierung kein Unterschied zwischen den c-JunAA Tieren und den Kontrolltieren gefunden. Die funktionelle Regeneration der Axone wird durch c-Jun positiv beeinflusst, nicht jedoch

der quantitative Anteil an Motoneuronen, die mit ihren Axonen mit dem Innervationsgebiet verbunden sind. Die neuronale Atrophie, die unter Abwesenheit von c-Jun besteht, könnte das morphologische Korrelat zu der diskutierten Fehlfunktion darstellen (Raivich et al. 2004). Eine möglichst hohe Anzahl an aktiven Kernen ist also für einen guten Funktionsgewinn sekundär.

4.6 Nervendurchtrennung und die c-Jun/JNK-Achse

JNK aktiviert c-Jun u.a. über die Bindung an den Serin-Resten 63 und 73 (Behrens et al. 1999). Neben diesen Bindungsstellen kann JNK in einer schwächeren Form c-Jun an den Threonin-Resten 91 und 93 binden (Raivich 2008). Diese bei den c-JunAA Tieren noch mögliche Bindung beeinflusste die Regeneration jedoch kaum. Denn der Regenerationsverlauf unter c-JunAA verhielt sich wie der von *c-Jun^{Δn}*, bei dem c-Jun im Nervensystem der transgenen Tiere komplett fehlte und somit keine Bindung von JNK möglich war (Raivich et al. 2004).

Die JNK-Isoformen kommen im gesamten Neuron vor, sie wurden in den Axonen, den Dendriten, Perikaryon und den präsynaptischen Endigungen nachgewiesen (Bjorkblom et al. 2005, Chang et al. 2003, Coffey et al. 2000). JNK und weitere Moleküle des MAP-Kinase Signalweges werden in dem Nerven retrograd transportiert (Fernyhough et al. 1999, Lindwall und Kanje 2005). An Kinesin gebunden in Komplexen aus JIP und transmembranen Molekülen wird JNK zum Kern transportiert und vermittelt so dem Perikaryon die Informationen aus der Peripherie (Verhey et al. 2001). Am Ende des Weges folgt eine vermehrte Expression und eine vermehrte Aktivierung von c-Jun als eine der frühesten Antworten auf beispielsweise Verletzungen (Leah et al. 1993, Lindwall et al. 2004, Lindwall und Kanje 2005). Die Ergebnisse meiner Arbeit stellen dar, dass die jeweiligen Moleküle an der Regeneration beteiligt sind. Jedoch sagen sie nichts darüber aus, ob der positive Einfluss der JNKs über die Aktivierung von c-Jun läuft, oder dieser Einfluss unabhängig davon stattfindet.

4.7 Offene Fragen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen c-Jun und JNK in den Kontext der neuronalen Regeneration. So scheint eine Stimulation von JNK und c-Jun für die Optimierung der Behandlung von Nervenverletzungen wünschenswert zu sein. Jedoch zeigen Untersuchungen auch, dass die c-Jun/JNK-Achse mit anderen Signalwegen verbunden ist, die je nach Kontext die Zellen zu einer neuronalen Regeneration oder zu einem neuronalen Zelluntergang führen.

Der Stimulus der Nervendurchtrennung führt Motoneurone unter den Einfluss von c-Jun in den Zelluntergang. Es wird aber auch gezeigt, dass unter dem Einfluss von c-Jun eine bessere Regeneration besteht.

Es ist noch unklar, wie und in welchen Zellen nach einer Axotomie die Entscheidung zwischen Untergang oder Regeneration getroffen wird.

Die Aufklärung der Regenerations-Degenerations-Kopplung ist noch immer eine wichtige neurobiologische Herausforderung selbst annähernd 20 Jahre nach der Entdeckung von c-Jun im Nervensystem und seiner Induktion als früheste Antwort auf eine Nervenverletzung (Herdegen et al. 1991, Leah, Herdegen, Bravo 1991).

5. Zusammenfassung

c-Jun und JNK gelten als wichtige Mediatoren der Neurodegeneration. So triggern c-Jun und JNK den Axotomie-induzierten Zelltod. Jedoch häufen sich Hinweise, dass die beiden Moleküle auch an physiologischen Funktionen beteiligt sind. Spielen c-Jun und JNK eine Rolle in der Regeneration?

Der Schwerpunkt dieser Arbeit war, den Einfluss von c-Jun und JNK auf die Regeneration peripherer Nervenfasern zu untersuchen. Dazu wurde in Mäusen, bei denen die Genloci von JNK1, 2 oder 3 genetisch inaktiviert wurden (JNK KO-Mäuse), sowie in Mäusen, bei denen die Bindungsstelle für JNK an Serin 63 und 73 durch Alanin im c-Jun Molekül ersetzt wurden (c-JunAA), der N. facialis durchtrennt. Über einen Zeitraum von 50 Tagen wurde der Regenerationsverlauf des Nervens durch die Analyse der Vibrissen-Funktion dokumentiert. Kurz vor dem Versuchsende wurde in das periphere Innervationsgebiet des N. facialis Fluorogold injiziert und die Wiederherstellung der *motoneuron-target-axis* durch die Quantifizierung der retrograd markierten Motoneurone des N. facialis bestimmt.

Die Inaktivierung der JNK-Bindungsstelle an c-Jun (c-JunAA) und die Ausschaltung der JNK-Isoformen 1 und 3 (JNK1 KO, JNK3 KO) resultierten in einer signifikant reduzierten Wiederherstellung der Vibrissenfunktion. Dabei war die Einflussnahme der jeweiligen Moleküle auf die Vibrissenfunktion im Verlauf unterschiedlich. Während c-Jun über den gesamten Beobachtungszeitraum den Regenerationsverlauf minderte, hatten JNK1 zu Beginn und JNK3 am Ende ihren stärksten Effekt auf die Regeneration. Hingegen hatten der Doppel-Knockout von JNK2+3 und der JNK2-KO keinen signifikanten Einfluss. Die Quantifizierung der retrograd markierten Motoneurone ergab keine signifikanten Unterschiede verglichen mit den Kontrollen. Außerdem war die ipsilaterale Somatotopie des Ncl. facialis bei allen Gruppen gleichermaßen aufgehoben.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die c-Jun/JNK-Achse eher die axonale Verlängerung beeinflusst als die Wiederherstellung der Somatotopie.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal *in vivo*, dass JNK-Isoformen die neuronale Regeneration positiv beeinflussen. Bei der therapeutischen Hemmung von JNK, die für zahlreiche Erkrankungen entwickelt wird, muss also mit negativen Folgen für regenerativ-reparative Vorgänge gerechnet werden.

6. Literaturverzeichnis

Abe N, Cavalli V (2008) Nerve injury signalling. *Curr Opin Neurobiol* 18: 276-283.

Aldskogius H, Thomander L (1986) Selective reinnervation of somatotopically appropriate muscles after facial nerve transection and regeneration in the neonatal rat. *Brain Res* 375:126-134.

Aoki K, Nakamura T, Matsuda M (2004) Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Biol Chem* 279:713-719.

Behrens A, Sibilina M, Wagner EF (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21:326-329.

Bjorkblom B, Ostman N, Hongisto V, Komarovski V, Filen JJ, Nyman TA, Kallunki T, Courtney MJ, Coffey ET (2005) Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector. *J Neurosci* 25:6350-6361.

Bomze HM, Bulsara KR, Iskandar BJ, Caroni P, Skene JH (2001) Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. *Nat Neurosci* 4:38-43.

Brecht S, Kirchhof R, Chromik A, Willesen M, Nicolaus T, Raivich G, Wessig J, Waetzig V, Goetz M, Claussen M, Pearse D, Kuan CY, Vaudano E, Behrens A, Wagner E, Flavell RA, Davis RJ, Herdegen T (2005) Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *Eur J Neurosci* 21:363-377.

Brownlees J, Yates A, Bajaj NP, Davis D, Anderton BH, Leigh PN, Shaw CE, Miller CC (2000) Phosphorylation of neurofilament heavy chain side-arms by stress activated protein kinase-1b/Jun N-terminal kinase-3. *J Cell Sci* 113 (Pt 3):401-407.

Brushart TM, Seiler WA (1987) Selective reinnervation of distal motor stumps by peripheral motor axons. *Exp Neurol* 97:289-300.

Carvell GE, Simons DJ (1990) Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci* 10:2638-2648.

Chang L, Jones Y, Ellisman MH, Goldstein LS, Karin M (2003) JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell* 4:521-533.

Choi D, Raisman G (2002) Somatotopic organization of the facial nucleus is disrupted after lesioning and regeneration of the facial nerve: the histological representation of synkinesis. *Neurosurgery* 50:355-362.

Coffey ET, Hongisto V, Dickens M, Davis RJ, Courtney MJ (2000) Dual roles for c-Jun N-terminal kinase in developmental and stress responses in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 20:7602-7613.

Cruzalegui FH, Hardingham GE, Bading H (1999) c-Jun functions as a calcium-regulated transcriptional activator in the absence of JNK/SAPK1 activation. *EMBO J* 18:1335-1344.

Daniels RH, Hall PS, Bokoch GM (1998) Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. *EMBO J* 17:754-764.

Deller T, Naumann T, Frotscher M (2000) Retrograde and anterograde tracing combined with transmitter identification and electron microscopy. *J Neurosci Methods* 103:117-126.

Dong C, Yang DD, Wysk M, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Flavell RA (1998) Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 282:2092-2095.

Dörfel J (1985) The innervation of the mystacial region of the white mouse: A topographical study. *J Anat* 142:173-184.

Dragunow M, Xu R, Walton M, Woodgate A, Lawlor P, MacGibbon GA, Young D, Gibbons H, Lipski J, Muravlev A, Pearson A, During M (2000) c-Jun promotes neurite outgrowth and survival in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 83:20-33.

Eilers A, Whitfield J, Babij C, Rubin LL, Ham J (1998) Role of the Jun kinase pathway in the regulation of c-Jun expression and apoptosis in sympathetic neurons. *J Neurosci* 18:1713-1724.

Eminel S, Roemer L, Waetzig V, Herdegen T (2008) c-Jun N-terminal kinases trigger both degeneration and neurite outgrowth in primary hippocampal and cortical neurons. *J Neurochem* 104:957-969.

Esslen E (1960) Electromyographic findings on two types of misdirection of regenerating axons. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 12:738-741.

Evans GRD (2001) Peripheral Nerve Injury: A Review and Approach to Tissue Engineered Constructs. *The Anatomical Record* 263:396-404.

Fernyhough P, Gallagher A, Averill SA, Priestley JV, Hounsom L, Patel J, Tomlinson DR (1999) Aberrant neurofilament phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy. *Diabetes* 48:881-889.

Fournier AE, Strittmatter SM (2001) Repulsive factors and axon regeneration in the CNS. *Curr Opin Neurobiol* 11:89-94.

Frey D, Laux T, Xu L, Schneider C, Caroni P (2000) Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *J Cell Biol* 149: 1455-1472.

Fukaya K, Hasegawa M, Mashitani T, Kadoya T, Horie H, Hayashi Y, Fujisawa H, Tachibana O, Kida S, Yamashita J (2003) Oxidized galectin-1 stimulates the migration of Schwann cells from both proximal and distal stumps of transected nerves and promotes axonal regeneration after peripheral nerve injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:162-172.

Gdalyahu A, Ghosh I, Levy T, Sapir T, Sapoznik S, Fishler Y, Azoulai D, Reiner O (2004) DCX, a new mediator of the JNK pathway. *EMBO J* 23:823-832.

Ghosh A, Greenberg ME (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268:239-247.

Gertz SD (2001) *Basiswissen Neuroanatomie*. 3 Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart.

Giasson BI, Bruening W, Durham HD, Mushynski WE (1999) Activation of stress-activated protein kinases correlates with neurite outgrowth induced by protease inhibition in PC12 cells. *J Neurochem* 72:1081-1087.

Gillingwater TH, Ribchester RR (2001) Compartmental neurodegeneration and synaptic plasticity in the Wld(s) mutant mouse. *J Physiol* 534:627-639.

Guntinas-Lichius O, Angelov DN, Tomov TL, Dramiga J, Neiss WF, Wewetzer K (2001) Transplantation of olfactory ensheathing cells stimulates the collateral sprouting from axotomized adult rat facial motoneurons. *Exp Neurol* 172:70-80.

Guntinas-Lichius O, Wewetzer K, Tomov TL, Azzolin N, Kazemi S, Streppel M, Neiss WF, Angelov DN (2002) Transplantation of olfactory mucosa minimizes axonal branching and promotes the recovery of vibrissae motor performance after facial nerve repair in rats. *J Neurosci* 22:7121-7131.

Hanz S and Fainzilber M(2006) Retrograde signaling in injured nerve--the axon reaction revisited. *J.Neurochem.* 99 (1):13-19.

Harrington AW, Kim JY, Yoon SO (2002) Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci* 22:156-166.

Herdegen T, Kummer W, Fiallos CE, Leah J, Bravo R (1991) Expression of c-JUN, JUN B and JUN D proteins in rat nervous system following transection of vagus nerve and cervical sympathetic trunk. *Neuroscience* 45:413-422.

Herdegen T, Blume A, Buschmann T, Georgakopoulos E, Winter C, Schmid W, Hsieh TF, Zimmermann M, Gass P (1997) Expression of activating transcription factor-2, serum response factor and cAMP/Ca response element binding protein in the adult rat brain following generalized seizures, nerve fibre lesion and ultraviolet irradiation. *Neuroscience* 81:199-212.

Herdegen T, Claret FX, Kallunki T, Martin-Villalba A, Winter C, Hunter T, Karin M (1998) Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci* 18:5124-5135.

Herdegen T, Waetzig V (2001) The JNK and p38 signal transduction following axotomy. *Restorative Neurology and Neuroscience* 19: 29-39.

Hilberg F, Aguzzi A, Howells N, Wagner EF (1993) c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* 365:179-181.

Hof PR, Young WG, Bloom FE, Belichenko PV, Celio MR (2000) *Comparative Cytoarchitectonic Atlas of the C57BL/6 and 129/SV Mouse Brains*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.

Holstege G (1997) The Basic, Somatic and Emotional Components of the Motor System in Mammals. In: *The Rat Nervous System*. 2nd Ed. Paxinos G (Hrsg). Academic Press. San Diego, California.

Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, Rakic P, Flavell RA (2004) JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:665-670.

Ip YT, Davis RJ (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10:205-219.

Ito M, Okoyama S, Furukawa M, Kitao Y, Moriizumi T, Kudo M (1994) Non-selective reinnervation by regenerating facial motoneurons after peripheral nerve crush in the developing rat. *Kaibogaku Zasshi* 69:168-174.

Johnson RS, van LB, Papaioannou VE, Spiegelman BM (1993) A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev* 7:1309-1317.

Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G (1997) Regulation of CD44 in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Eur J Neurosci* 9:1854-1863.

Jones LL, Liu Z, Shen J, Werner A, Kreutzberg GW, Raivich G (2000) Regulation of the cell adhesion molecule CD44 after nerve transection and direct trauma to the mouse brain. *J Comp Neurol* 426:468-492.

Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR (1998) DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell* 1:543-551.

Kenney AM, Kocsis JD (1998) Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and junD in adult rat dorsal root ganglia In vivo. *J Neurosci* 18:1318-1328.

Kirsch M, Terheggen U, Hofmann HD (2003) Ciliary neurotrophic factor is an early lesion-induced retrograde signal for axotomized facial motoneurons. *Mol Cell Neurosci* 24:130-138.

Kita Y, Kimura KD, Kobayashi M, Ihara S, Kaibuchi K, Kuroda S, Ui M, Iba H, Konishi H, Kikkawa U, Nagata S, Fukui Y (1998) Microinjection of activated phosphatidylinositol-3 kinase induces process outgrowth in rat PC12 cells through the Rac-JNK signal transduction pathway. *J Cell Sci* 111 (Pt 7):907-915.

Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22:667-676.

Leah JD, Herdegen T, Bravo R (1991) Selective expression of Jun proteins following axotomy and axonal transport block in peripheral nerves in the rat: evidence for a role in the regeneration process. *Brain Res* 566:198-207.

Leah JD, Herdegen T, Murashov A, Dragunow M, Bravo R (1993) Expression of immediate early gene proteins following axotomy and inhibition of axonal transport in the rat central nervous system. *Neuroscience* 57:53-66.

Lee N, Neitzel KL, Devlin BK, MacLennan AJ (2004) STAT3 phosphorylation in injured axons before sensory and motor neuron nuclei: potential role for STAT3 as a retrograde signaling transcription factor. *J Comp Neurol* 474:535-545.

Leppa S, Saffrich R, Ansorge W, Bohmann D (1998) Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J* 17:4404-4413.

Levy DE, Lee CK (2002) What does Stat3 do? *J Clin Invest* 109:1143-1148.

Lindwall C, Dahlin L, Lundborg G, Kanje M (2004) Inhibition of c-Jun phosphorylation reduces axonal outgrowth of adult rat nodose ganglia and dorsal root ganglia sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 27:267-279.

Lindwall C, Kanje M (2005) Retrograde axonal transport of JNK signaling molecules influence injury induced nuclear changes in p-c-Jun and ATF3 in adult rat sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 29:269-282.

Löffler G, Petrides PE (2003) Stoffwechsel der Zelle. In: *Biochemie und Pathobiochemie* 7. Aufl., Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg.

Lohmeyer J, Zimmermann S, Sommer B, Machens HG, Lange T, Mailänder P (2007) Überbrückung peripherer Nervendefekte durch den Einsatz von Nervenröhrchen. *Der Chirurg, Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg* 78:142–147.

Makwana M, Raivich G (2005) Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS J* 272:2628-2638.

Masuhr F, Neumann M (2005) Schädigung des peripheren Nervensystems. In: *Neurologie*, 5. Ed Thieme Verlag, Stuttgart.

Montserrat L, Benito M (1988) Facial synkinesis and aberrant regeneration of facial nerve. *Adv Neurol* 49:211-224.

Moran LB, Graeber MB (2004) The facial nerve axotomy model. *Brain Res Brain Res Rev* 44:154-178.

Morris JH, Hudson AR, Weddell G (1972) A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. II. The development of the "regenerating unit". *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 124:103-130.

Morrison DK, Davis RJ (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:91-118.

Morton S, Davis RJ, McLaren A, Cohen P (2003) A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J* 22:3876-3886.

Naumann T, Hartig W, Frotscher M (2000) Retrograde tracing with Fluoro-Gold: different methods of tracer detection at the ultrastructural level and neurodegenerative changes of back-filled neurons in long-term studies. *J Neurosci Methods* 103:11-21.

Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A (2007) Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 82:163-201.

Neidhart S, Antonsson B, Gillieron C, Vilbois F, Grenningloh G, Arkininstall S (2001) c-Jun N-terminal kinase-3 (JNK3)/stress-activated protein kinase-beta (SAPKbeta) binds and phosphorylates the neuronal microtubule regulator SCG10. *FEBS Lett* 508:259-264.

Newbern J, Taylor A, Robinson M, Lively MO, Milligan CE (2007) c-Jun N-terminal kinase signaling regulates events associated with both health and degeneration in motoneurons. *Neuroscience* 147:680-692.

Raivich G, Hellweg R, Kreutzberg GW (1991) NGF receptor-mediated reduction in axonal NGF uptake and retrograde transport following sciatic nerve injury and during regeneration. *Neuron* 7:151-164.

Raivich G, Bohatschek M, Da CC, Iwata O, Galiano M, Hristova M, Nateri AS, Makwana M, Riera-Sans L, Wolfer DP, Lipp HP, Aguzzi A, Wagner EF, Behrens A (2004) The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron* 43:57-67.

Raivich G (2008) c-Jun expression, activation and function in neural cell death, inflammation and repair. *J Neurochem* 107:898-906.

Rende M, Muir D, Ruoslahti E, Hagg T, Varon S, Manthorpe M (1992) Immunolocalization of ciliary neuronotrophic factor in adult rat sciatic nerve. *Glia* 5:25-32.

Rizzo MT, Leaver AH, Yu WM, Kovacs RJ (1999) Arachidonic acid induces mobilization of calcium stores and c-jun gene expression: evidence that intracellular calcium release is associated with c-jun activation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 60:187-198.

Sabapathy K, Wagner EF (2004) JNK2: a negative regulator of cellular proliferation. *Cell Cycle* 3:1520-1523.

Schiebler TH, Schmidt W (2003) Zentralnervensystem. In: Anatomie 8 Aufl. Schmidt W (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg.

Schmued LC, Fallon JH (1986) Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 377:147-154.

Schweizer U, Gunnensen J, Karch C, Wiese S, Holtmann B, Takeda K, Akira S, Sendtner M (2002) Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. *J Cell Biol* 156:287-297.

Sendtner M, Dittrich F, Hughes RA, Thoenen H (1994) Actions of CNTF and neurotrophins on degenerating motoneurons: preclinical studies and clinical implications. *J Neurol Sci* 124 Suppl:77-83.

Sendtner M, Gotz R, Holtmann B, Thoenen H (1997) Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci* 17:6999-7006.

Shadiack AM, Sun Y, Zigmond RE (2001) Nerve growth factor antiserum induces axotomy-like changes in neuropeptide expression in intact sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci* 21:363-371.

Shmueli O, Gdalyahu A, Sorokina K, Nevo E, Avivi A, Reiner O (2001) DCX in PC12 cells: CREB-mediated transcription and neurite outgrowth. *Hum Mol Genet* 10:1061-1070.

Soares S, Barnat M, Salim C, von BY, Ravaille-Veron M, Nothias F (2007) Extensive structural remodeling of the injured spinal cord revealed by phosphorylated MAP1B in sprouting axons and degenerating neurons. *Eur J Neurosci* 26:1446-1461.

Sommer C, Gass P, Kiessling M (1995) Selective c-JUN expression in CA1 neurons of the gerbil hippocampus during and after acquisition of an ischemia-tolerant state. *Brain Pathol* 5:135-144.

Tararuk T, Ostman N, Li W, Bjorkblom B, Padzik A, Zdrojewska J, Hongisto V, Herdegen T, Konopka W, Courtney MJ, Coffey ET (2006) JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *J Cell Biol* 173:265-277.

Tomov TL, Guntinas-Lichius O, Grosheva M, Streppel M, Schraermeyer U, Neiss WF, and Angelov DN (2002) An example of neural plasticity evoked by putative behavioral demand and early use of vibrissal hairs after facial nerve transection. *Exp.Neurol.* 178 (2):207-218.

Tonge DA, Golding JP (1993) Regeneration and repair of the peripheral nervous system. *The Neuroscience Vol. 5:* 385-390.

Tracey DJ, Waite PME (1995) Somatosensory System. In: *The Rat Nervous System. 2nd Ed.* Paxinos G (Hrsg). Academic Press. San Diego, California.

Trumble TE, Archibald S, Allan CH (2004) Bioengineering for nerve repair in the future. *J. Of the American Society for Surgery of the Hand Vol. 4, No. 3.*

Uesugi N, Muramatsu R, Yamashita T (2009) Endothelin promotes neurite elongation by a mechanism dependent on c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 383:509-512.

Verhey KJ, Rapoport TA (2001) Kinesin carries the signal. *Trends Biochem Sci* 26:545-550.

Vosler PS, Graham SH, Wechsler LR, Chen J (2009) Mitochondrial Targets for Stroke: Focusing Basic Science Research Toward Development of Clinically Translatable Therapeutics *Stroke* 40: 3149-3155

Waetzig V, Herdegen T (2003) The concerted signaling of ERK1/2 and JNKs is essential for PC12 cell neuritogenesis and converges at the level of target proteins. *Mol Cell Neurosci* 24:238-249.

Waetzig V, Herdegen T (2005) Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci* 26:455-461.

Waetzig V, Zhao Y, Herdegen T (2006) The bright sight of JNKs – Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Progress in Neurobiology* 80: 84-97.

Waetzig V, Loose K, Haeusgen W, Herdegen T (2008) c-Jun N-terminal kinases mediate Fas-induced neurite regeneration in PC12 cells. *Biochem Pharmacol.* 76(11):1476-84.

Werner A, Willem M, Jones LL, Kreutzberg GW, Mayer U, Raivich G (2000) Impaired axonal regeneration in alpha7 integrin-deficient mice. *J Neurosci* 20:1822-1830.

Wessendorf MW (1991) Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake. *Brain Res* 553:135-148.

Whitmarsh AJ, Davis RJ (2000) Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1172-1183.

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79:143-180.

Wynick D, Thompson SW, McMahon SB (2001) The role of galanin as a multi-functional neuropeptide in the nervous system. *Curr Opin Pharmacol* 1:73-77.

Xiao J, Liu Y (2003) Differential roles of ERK and JNK in early and late stages of neuritogenesis: a study in a novel PC12 model system. *J Neurochem* 86:1516-1523.

Xu J, Kim GM, Ahmed SH, Xu J, Yan P, Xu XM, Hsu CY (2001) Glucocorticoid receptor-mediated suppression of activator protein-1 activation and matrix metalloproteinase expression after spinal cord injury. *J Neurosci* 21:92-97.

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389:865-870.

Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ, Barrett T, Davis RJ, Rincon M, Flavell RA (1998) Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* 9:575-585.

Yoo S, Nguyen MP, Fukuda M, Bittner GD, Fishman HM (2003) Plasmalemmal sealing of transected mammalian neurites is a gradual process mediated by Ca(2+)-regulated proteins. *J Neurosci Res* 74:541-551.

Zimmermann M, Herdegen T (1996) Plasticity of the nervous system at the systematic, cellular and molecular levels: a mechanism of chronic pain and hyperalgesia. *Prog Brain Res* 110:233-259.

Zucker E, Welker WI (1969) Coding of somatic sensory input by vibrissae neurons in the rat's trigeminal ganglion. *Brain Res* 12:138-156.

7. Danksagungen

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Thomas Herdegen, möchte ich für die motivierende, unermüdliche und begeisterte Betreuung vom ganzen Herzen danken. Ich schätze seine intensive und auf den Grund gehende Arbeitsweise in Verbindung mit seiner offenen Art sehr.

Herrn Dr. Ruwen Böhm möchte ich für die große Hilfe danken, dass die Zahlen in eine statistische und wissenschaftliche Form gebracht wurden.

Ich möchte Herrn Dipl. Inform. Hedderich (Institut für medizinische Informatik und Statistik, Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel) für die Ideen zur statistischen Umsetzung danken.

Den Tierpflegern möchte ich für die unermüdliche Arbeit in der Aufzucht und der Pflege von den Mäusen danken.

Den Mitarbeitern im Labor der AG-Herdegen möchte ich für die genaue Anleitung in die Laborarbeiten danken.

Meiner Freundin, Svenja Friedrichsen, danke ich für ihre Kondition sich als Fachfremde mit der Promotionsarbeit auseinandergesetzt zu haben, wodurch die Arbeit an Struktur gewonnen hat.

Meiner Familie, Sabine und Thomas Staak, Gabriele Hill, Jan Hendrik und Emine Staak, möchte ich für die Unterstützung und das Vorantreiben zur Beendigung dieser Arbeit danken.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

- Geburtstag: 21. Januar 1981 in Reinbek
- Familienstand: ledig

Hochschulbildung

- 2002 - 2009 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- 11.06.09 Abschluss des Zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
- 18.08.04 Abschluss des Ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung

Promotion

- 2005 - 2009 Promotion bei Prof. Dr. med. T. Herdegen am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie UK-SH, Campus Kiel: „Einfluss von c-Jun und der c-Jun N-terminalen Kinasen, 1, 2 und 3 auf die Regeneration des Nervus facialis“

Veröffentlichungen

- Liu, Zhao, Patzer, Staak, Böhm, Deuschl, Culman, Bonny, Herdegen, Eschenfelder: „The JNK-inhibitor XG-102 enhances the neuroprotection of hyperbaric oxygen after cerebral ischemia in adult rats.“ Neuropathol Appl. Neurobio 2009, in Druck
- Raivich, Staak, Herdegen et al.: „Role of JNK in peripheral nerve fiber regeneration.“ in Vorbereitung

Zivildienst

- 2001 - 2002 Zivildienstleistender im Krankenhaus St. Adolf Stift in Reinbek

Schulbildung

- 1991 - 2001 Sachsenwald Gymnasium; 2001 Abitur
- 1997 - 1998 Schuljahr in Houston Texas, USA
- 1987 - 1991 Grundschule Neuschönningstedt

Sprachkenntnisse

- Englisch fließend, Türkisch