

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. I. Cascorbi)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel

Funktionen der
c-Jun N-terminalen Kinasen in der permanenten cerebralen Ischämie
der adulten Maus

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

vorgelegt von
Thomas Nicolaus
aus Kiel

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Herdegen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Stingele

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2010

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 29.11.2010

gez. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi
Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Glossarium.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Der Schlaganfall	1
1.2 Pathophysiologie der cerebralen Ischämie	2
1.2.1 Übersicht	2
1.2.2 Die Penumbra	2
1.2.3 Die Mikroglia	3
1.2.4 Der neuronale Zelltod.....	4
1.3 Die Rolle der Transkriptionsfaktoren in den Zellen.....	5
1.4 Der Transkriptionsfaktor c-Jun	5
1.5 Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) – neurodegenerative vs neuroregenerative Funktionen.....	7
1.6 Die Generierung des JNK knockouts und des Wildtyps	9
1.7 Das Tiermodell	9
1.8 Wissenschaftliche Fragestellungen	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Chemikalien und Ansatz von Lösungen.....	11
2.1.1 Verwendete Chemikalien	11
2.1.2 Ansatz von Lösungen	11
2.2 Versuchstiere	13
2.2.1 Wildtyp Mäuse	13
2.2.2 JNK knockout Mäuse	13
2.3 Genotypisierung	14
2.4 Tierhaltung und Zucht.....	14
2.5 Okklusion der MCA	14
2.5.1 Operationsprotokoll.....	15
2.5.2 Anästhesie	15

2.5.3	Verwendete technische Geräte und Instrumente	16
2.5.4	Eröffnung des Operationssitus und Darstellung der Gefäße	16
2.5.5	Gefäßverschluss mittels direkter Elektrokoagulation	17
2.5.6	Wundverschluss und postoperative Behandlung.....	17
2.5.7	Mortalität und mögliche Komplikationen bei der Operation.....	19
2.6	Transkardiale Perfusion.....	19
2.6.1	Verwendete Instrumente	19
2.6.2	Durchführung	20
2.7	Unbehandelte Kontrolltiere	20
2.8	Übersicht über die Versuchsgruppen und Fallzahlen.....	21
2.9	Gewebeaufbereitung.....	22
2.10	Morphometrie.....	22
2.10.1	Kresylviolett-färbung.....	22
2.10.2	Infarktgrößenbestimmung	24
2.10.2.1	Einlesen der Hirnschnitte	24
2.10.2.2	Infarktgrößenbestimmung.....	24
2.10.2.3	Statistische Auswertung.....	25
2.11	Immunhistochemie	25
2.11.1	Durchführung der Färbung.....	25
2.11.2	Immunhistochemische Färbungen - Herkunft, Verdünnung und Immunisierungssystem der ersten Antikörper.....	26
2.11.3	Beschreibung der verwendeten zweiten Antikörper	27
2.11.4	Analyse der Färbungen.....	27
2.11.4.1	Phospho-c-Jun und Mikroglia im Infarkttrandgebiet.....	27
2.11.5	Western Blots	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Infarktvolumen der einzelnen Tiergruppen 3 Tage nach pMCAO	29
3.2	Expression und Aktivierung der JNK Isoformen im Kortex.....	32
3.2.1	Basale Expression und Aktivierung der JNK Isoformen	32
3.2.1.1	Basale Expression der einzelnen JNK Isoformen.....	32
3.2.1.2	Anteil der einzelnen Isoformen an der Gesamt-JNK-Expression.....	32
3.2.1.3	Anteil der einzelnen Isoformen am phosphorylierten JNK	32
3.2.2	Expression und Aktivierung der JNK Isoformen nach 24 Stunden	36
3.2.2.1	Kontralateraler Kortex	37

3.2.2.2	Penumbra	37
3.2.2.3	Zentrales Infarktgebiet	37
3.3	N-terminale Phosphorylierung von c-Jun (phospho-c-Jun)	40
3.3.1	Basale Expression von phospho-c-Jun	40
3.3.2	Expression von phospho-c-Jun 3 Tage nach pMCAO	41
3.4	Aktivierung der Mikroglia nach pMCAO	43
3.4.1	Basale Mikrogliaaktivierung	44
3.4.2	Mikrogliaaktivierung drei Tage nach pMCAO	45
4	Diskussion	47
4.1.1	Das Operationsmodell	48
4.1.2	Mögliche Einflussfaktoren auf die Ergebnisse	49
4.2	JNK Expression und Aktivierung	50
4.2.1	Anteil der JNK Isoformen an der Gesamtexpression und -aktivierung von JNK im Kortex bei unbehandelten Tieren	50
4.2.1.1	JNK1 als Hauptträger von phosphoryliertem JNK	51
4.2.1.2	JNK2 als Hauptträger von nicht phosphoryliertem JNK	52
4.2.1.3	Geringer Anteil von JNK3 am Gesamt-JNK-Pool – Anzeichen einer pathologisch geprägten Funktion?	52
4.2.2	Veränderung der JNK-Expression und -Aktivierung 24 Stunden nach MCAO 53	
4.3	Beteiligung der einzelnen JNK Isoformen bei der ischämieinduzierten Neurodegeneration	53
4.3.1	Rolle von JNK1 und JNK3 bei ischämischer Pathologie	53
4.3.2	JNK2 in der cerebralen Ischämie	55
4.3.3	Der Doppel knockout JNK2+3 in der cerebralen Ischämie	55
4.3.4	Die c-JunAA-Mutation	56
4.3.5	Die Kontrollgruppen	56
4.4	Die Funktion von c-Jun	56
4.4.1	Die N-terminale Phosphorylierung von c-Jun – Diskussion der Ergebnisse ...	57
4.5	Mikroglia	57
4.5.1	JNK Expression	57
4.5.1.1	Rolle der JNK bei der Mikrogliaaktivierung	58
4.5.1.2	Rolle der JNK bei der metabolischen Aktivität von Mikroglia	59

4.5.2	Überwiegen in der cerebralen Ischämie zytotoxische oder zytoprotektive Mikrogliaeffekte?	59
5	Zusammenfassung	61
	Literaturverzeichnis	VIII
	Lebenslauf	XVII
	Danksagung	XIX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Darstellung einer Okklusion der MCA	18
Abbildung 2 Kresylviolett-färbung	23
Abbildung 3 Größe des Infarkt volumens	30
Abbildung 4 Kortikaler Defekt	31
Abbildung 5 Infarkt volumina der Wildtypen.....	31
Abbildung 6 Western Blot Kortex	34
Abbildung 7 Western Blots 24h nach pMCAO	38
Abbildung 8 Basale phospho-c-Jun-Färbung.....	40
Abbildung 9 phospho-c-Jun-Färbung in JNK ko und Wildtypkontrollen.....	42
Abbildung 10 phospho-c-Jun-Aktivierung.....	43
Abbildung 11 Mikrogliafärbung	44
Abbildung 12 Mikrogliafärbung 72 h nach MCAO.....	46
Abbildung 13 Mikrogliaaktivierung in JNK ko und Wildtypkontrollen nach 72h	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Chemikalien	11
Tabelle 2	Verwendete technische Geräte	16
Tabelle 3	Verwendete Instrumente	16
Tabelle 4	Verwendete Instrumente für die transkardiale Perfusion	19
Tabelle 5	Größe der Versuchsgruppen	21
Tabelle 6	Färbeprotokoll Kresylviolett	24
Tabelle 7	Immunhistochemische Färbung: Erster Antikörper	26
Tabelle 8	Verwendete Antikörper Western Blot	28
Tabelle 9	Semiquantitative Beschreibung der JNK-Signale von unbehandelten Mäusen	35
Tabelle 10	Semiquantitative Beschreibung der Signaländerungen zwischen JNK ko und WT-Mäusen	36
Tabelle 11	Beschreibung der Signaländerungen von JNK 24 h nach pMCAO	39

Glossarium

ATF 2	activating transcription factor 2
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain derived neurotrophic factor
Cox-2	Cyclooxygenase-2
c-JunAA	Transkriptionsfaktor c-Jun mit Serin, die an Position 63 und 73 durch Alanin ersetzt wird
DNA	deoxyribonucleic acid
ERK	extracellular signal-regulated kinase
HSP27	heat shock protein 27
IEG	immediate early gene
IL-6	Interleukin-6
JNK	c-Jun N-terminal kinase
ko	Knockout
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCA	middle cerebral artery
MCAO	middle cerebral artery occlusion
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
mRNA	messenger ribonucleic acid
NGF	nerve growth factor
pJNK	phosphoryliertes JNK
pMCAO	permanent middle cerebral artery occlusion
phospho-c-Jun	N-terminal phosphoryliertes c-Jun
p38	38 kDa Kinase
RNA	ribonucleid acid
SAPK	stress activated protein kinase
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TF	Transkriptionsfaktor
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labelling
WT	Wildtypkontrollen von JNK ko Mäusen
ZNS	zentrales Nervensystem
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Funktionen der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) in der Pathophysiologie des ischämischen Hirninfarkts. In den Experimenten wurde das Tierversuchsmodell der permanenten, fokalen cerebralen Ischämie bei der Maus angewendet. Anhand dieses Modells wurden die Auswirkungen der Inaktivierung der JNK-Gene auf die Infarktgröße, die Expression und N-terminale Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun und die morphologischen Veränderungen von Mikrogliazellen untersucht.

1.1 Der Schlaganfall

Bei den Begriffen „Schlaganfall“, „cerebraler Insult“ und „Apoplex“ handelt es sich um synonyme Begriffe, die eine heterogene Gruppe von Erkrankungen zusammenfassen, die zum akuten Untergang von Hirnparenchym führen (Mummenthaler und Mattle, 2008; Grehl und Reinhardt, 2008). Der ischämische Hirninfarkt, bei dem es aufgrund einer umschriebenen akuten Durchblutungsstörung zum Untergang von Hirngewebe kommt, stellt dabei mit ca. 80 % die häufigste Ursache eines cerebralen Insults dar. Zu den weiteren häufigen Ursachen eines cerebralen Insults zählen mit ca. 15 % die spontane intracerebrale Blutung (ICB) und die Subarachnoidalblutung (SAB) mit ca. 5 % (Poeck und Hacke, 2006).

In den Todes-Ursachen-Statistiken der USA und Europas steht der Schlaganfall hinter der koronaren Herzkrankheit und den Malignomen an dritter Stelle und stellt die häufigste Ursache für Invalidität im höheren Alter dar (The National Institute of Neurological disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995; Poeck und Hacke, 2006). In Deutschland erleiden ungefähr 200.000 Einwohner pro Jahr einen ischämischen Hirninfarkt, was eine Inzidenz von ca. 150/100.000/Jahr ergibt. Etwa 15 – 20 % der Patienten sterben innerhalb der ersten vier Wochen. Für die Überlebenden gilt die so genannte „Drittel-Regel“. Ein Drittel der Patienten übersteht den Insult ohne bleibende Schäden, d.h. die Patienten können ohne besondere Einschränkung wieder genau so wie vor dem Ereignis leben. Das zweite Drittel kann zwar einfache Tätigkeiten des täglichen Lebens selbst verrichten, es bleiben aber Schäden wie Lähmungen o. ä. zurück, die zur Inanspruchnahme fremder Hilfe zwingen. Das letzte Drittel der Patienten bleibt dauerhaft pflegebedürftig.

Nicht nur die hohen volkswirtschaftlichen Kosten sind es, welche die große Bedeutung dieser Erkrankung für die Gesellschaft begründen, sondern auch der häufig invalidierende Verlauf der Erkrankung.

1.2 Pathophysiologie der cerebralen Ischämie

In diesem Teil wird die Pathophysiologie des ischämischen Hirninfarktes erläutert. Dabei wird insbesondere auf das Penumbra- und Apoptosekonzept sowie die Neuroglia eingegangen.

1.2.1 Übersicht

Durch die cerebrale Ischämie wird eine Reihe von unterschiedlichen pathophysiologischen Kaskaden ausgelöst, die je nach Schwere der Ischämie zum Hirninfarkt führen (Lipton, 1999; Stoll et al., 1998; Dirnagl et al., 1999; Mergenthaler et al., 2004). Ein zentraler Ausgangspunkt ist der Sauerstoffmangel in den Zellen, der zur Störung der Atmungskette bzw. der oxidativen Phosphorylierung führt und damit zum ATP-Mangel. Je nach Schwere der Ischämie kommt es dann zur Stimulation der anaeroben Glykolyse mit nachfolgender (Lactat-) Azidose. Weitere Schritte in der ischämischen Kaskade sind: Störung des Ionengleichgewichtes durch Versagen der $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$ -ATPase, Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration, Zusammenbruch des Membranpotentials mit hypoxischer Depolarisation der Zelle, exzessive Freisetzung exzitatorischer Transmitter wie z. B. Glutamat und Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die Akkumulation von freiem intrazellulären Ca^{2+} führt über Calmodulin und andere Ca^{2+} -bindende Proteine zur Aktivierung zahlreicher Enzymsysteme wie Phospholipasen, Proteasen und Endonucleasen. Es kommt zur Ausschüttung von freien Fettsäuren und Arachidonsäure, zur Bildung und mangelnden Entgiftung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffradikale, zum proteolytischen Abbau von zellulären Strukturproteinen sowie zur Hemmung der Proteinbiosynthese und DNA-Schädigung (Lipton, 1999; Dirnagl et al., 1999; Mergenthaler et al., 2004).

Diese Vorgänge führen im Zentrum des Infarkts innerhalb eines bestimmten Zeitraums (einige Minuten bis wenige Stunden) zum neuronalen, gliären und endothelialen Zelltod, überwiegend durch Nekrose verursacht. Im Gegensatz dazu gibt es im Infarkttrandbereich Areale, die weniger stark geschädigt werden. Dort kommt es nicht sofort zum Zelluntergang und zur Nekrose (Endres et al., 1998, 2002).

1.2.2 Die Penumbra

Die unterschiedliche Pathophysiologie zwischen dem Kerngebiet und dem Randbereich eines ischämischen Infarkts hat das Konzept der Penumbra begründet. Dieses Konzept kann viele Pathomechanismen und klinische Phänomene der cerebralen Ischämie erklären (Memezawa et al., 1992; Siesjö, 1992). Das Modell lässt sich auch auf permanente cerebrale

Ischämien anwenden, bei denen es zu einer Minderdurchblutung in einem Hirngefäß bzw. seinem Versorgungsgebiet kommt. In der Mitte des Versorgungsgebietes des betroffenen Gefäßes liegt der nekrotische Kern der Läsion. Hier ist die Verminderung des Blutflusses so stark, dass es schnell zum nekrotischen Zelluntergang kommt (siehe oben). In diesem Bereich besteht die einzige therapeutische Möglichkeit in einer unmittelbar eingeleiteten (innerhalb weniger Minuten nach Gefäßverschluss) Rekanalisierung des verschlossenen Gefäßes. Diese Situation ist im klinischen Alltag sehr selten. Ein Teil des Gewebes, das den Infarktkern umgibt, stellt die Penumbra dar. In diesem Bereich kommt es durch den reduzierten Blutfluss zwar zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Zellen, aber sie bewahren ihre strukturelle Integrität (Garcia et al., 1993). Der Energie-Metabolismus der Zellen reicht noch aus, um einige wichtige Aufgaben wie z. B. die Erhaltung der Stabilität der Zellmembran zu gewährleisten, andere wichtige Funktionen wie die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials können allerdings gestört sein, was z. B. zur hypoxischen Depolarisation mit unregelmäßiger Transmitter-Freisetzung führen kann. Neben dieser allgemeinen Definition lässt sich das Konzept der Penumbra auch auf einzelne pathophysiologische Parameter wie die Reduktion des Blutflusses, das Ausmaß des ATP-Mangels oder die Expression bestimmter Proteine anwenden. Dabei kann die Penumbra je nach untersuchtem Parameter variieren (Memezawa et al., 1992; Hossmann, 1994). Prinzipiell ist die ischämische Schädigung der Penumbra reversibel (Hossmann, 1994). Ein gutes Beispiel für die Reversibilität bietet die klinische Beobachtung von Apoplexie-Patienten, bei denen sich fokal-neurologische Symptome nach einer fokalen Ischämie partiell oder vollständig zurückbilden können. Allerdings kann sich die Penumbra auch in die entgegengesetzte Richtung entwickeln: ein Teil der Penumbra kann, sollte keine therapeutische Intervention erfolgen, in den nekrotischen Bereich des Infarkts mit einbezogen werden und damit unwiderbringlich geschädigt werden.

Die grundsätzliche Reversibilität und die therapeutische Beeinflussbarkeit der Schädigung machen die Penumbra zum Gegenstand des Forschungsinteresses. Daher steht auch die Pathophysiologie der Penumbra im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

1.2.3 Die Mikroglia

Im Gehirn werden durch cerebrale Ischämie nicht nur die Nervenzellen, sondern auch andere Zellen geschädigt, die unter dem Oberbegriff der Neuroglia zusammengefasst werden. Die Neuroglia wird weiter unterteilt in die Makroglia, die sich aus Astrozyten und Oligodendrozyten zusammensetzt, und in die Mikroglia. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich unter anderem mit Aktivierung von Mikrogliazellen nach cerebraler Ischämie.

Mikrogliazellen sind die Gewebsmakrophagen des Gehirns. Sie wandern während der Entwicklung aus dem Knochenmark ins Gehirnparenchym ein, ehe sich die Blut-Hirn-Schranke ausgebildet. Neben der Fähigkeit zur Phagozytose nehmen sie zahlreiche immunologische Funktionen wahr, wie z. B. die Antigenpräsentation (Raivich et al., 1999). Im Infarktkern sterben Mikrogliazellen schnell den nekrotischen Zelltod (Stoll et al., 1998), in der Penumbra des Infarkts und in nicht geschädigten Arealen werden sie dagegen aktiviert, was sich u. a. in der Veränderung ihrer Morphologie zeigt.

Mikrogliazellen scheinen eine wichtige Funktion bei der Pathophysiologie der cerebralen Ischämie innezuhaben, allerdings ist noch nicht endgültig geklärt, ob es sich dabei um zytotoxische und/oder zytoprotektive Funktionen handelt. Durch die Bildung und Freisetzung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, durch die Synthese von Proteasen oder durch die Zunahme ihrer phagozytotischen Aktivität können Mikrogliazellen zytotoxisch wirken. Andererseits können sie auch wachstums- und regenerationsfördernde Stoffe wie z. B. BDNF (brain-derived neurotrophic factor) und GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) freisetzen (Batchelor et al., 1999; Aman-tea et al., 2009; Tuttolomondo et al., 2008).

1.2.4 Der neuronale Zelltod

Seit einigen Jahren gibt es mehrere Hinweise, dass es nach ischämischer Schädigung der Nervenzellen nicht nur zur Nekrose, sondern auch zur Apoptose kommt (Übersicht bei Bredesen, 1995; Lipton, 1999; Mattson, 2000). Der Begriff Nekrose wird wie folgt definiert: „Die Veränderungen einer Zelle, die nach irreversiblen Ausfall der Zellfunktionen (sog. Zelltod) auftreten“ (Pschyrembel, 261. Auflage). Es handelt sich bei der Nekrose also um passive Vorgänge als Reaktion auf einen letalen Stimulus, die zu Veränderungen der Nervenzelle wie Schwellung, Funktionsverlust der Zellmembranen und letztlich Zytolyse führen. Zytoplasmatische Bestandteile werden im Extrazellulärraum verteilt und lösen so eine inflammatorische Reaktion aus.

Die Apoptose wird dagegen definiert als: „Zelluntergang, der durch genetische Informationen der betroffenen Zelle selbst reguliert wird“ (Pschyrembel, 261. Auflage). Es handelt sich also um einen „programmierten Zelltod“, der durch das zelleigene „Selbstzerstörungsprogramm“ ausgelöst wird. Dieser Vorgang kommt auch unter physiologischen Bedingungen vor, so z. B. während der Embryonalentwicklung oder im adulten Organismus bei der Zellmauserung (z. B. Epithelzellen der Haut). Morphologisch kommt es zu einer Verdichtung des Zytoplasmas (Pyknose), Kondensation und Fragmentation des Chromatins (Karyorrhexis),

internukleosomaler DNA-Fragmentierung durch Endonucleasen, Bildung sogenannter apoptotischer Körperchen und das Fehlen einer inflammatorischen Reaktion.

Es handelt sich bei der Apoptose um einen Energie verbrauchenden Prozess, bei dem die Zelle Effektorproteine de novo synthetisieren muss. Dazu kommt es zu einer Veränderung der Genexpression, die durch Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Einer der Transkriptionsfaktoren, die die Expression pro-apoptotischer Gene regulieren können, ist c-Jun.

1.3 Die Rolle der Transkriptionsfaktoren in den Zellen

Transkriptionsfaktoren regulieren in den Zellen über die Transkription von Genen deren Expression (Herdegen und Leah, 1998; Wätzig und Herdegen, 2005; Wätzig et al., 2006). Wie oben bereits erwähnt, vermitteln sie u. a. die Reaktion einer Zelle auf pathophysiologische Veränderungen bzw. Veränderungen der Homöostase. So reagiert z. B. ein Neuron auf einen Stimulus, indem es sein genetisches Programm ändert: die Gene, die vorher nicht exprimiert wurden, werden zur Expression gebracht und andere, die vorher aktiviert waren, werden supprimiert.

Man unterscheidet in der Zelle zwischen konstitutiven und induzierbaren Transkriptionsfaktoren. Konstitutive Transkriptionsfaktoren befinden sich ständig im Nukleus oder im Zytoplasma der Zelle und werden auf einen bestimmten Reiz hin durch Phosphorylierung aktiviert. Induzierbare Transkriptionsfaktoren dagegen müssen auf bestimmte physiologische und pathophysiologische Reize hin – wie z. B. auch bei der cerebralen Ischämie – erst exprimiert werden (Herdegen und Leah, 1998). Das geschieht sehr schnell, weswegen die induzierbaren Transkriptionsfaktoren auch die Bezeichnung IEG (immediate early genes) tragen. Beide Arten von Transkriptionsfaktoren sind Teil einer Signalkaskade, die auch als „Stimulus-Transkriptions-Kopplung“ bezeichnet wird. In dieser Signalkaskade werden extrazelluläre Stimuli über membrangebundene Rezeptoren (1st messenger) aufgenommen und an zytoplasmatische Proteine weitergegeben (2nd messenger). Diese aktivieren dann über diverse Zwischenschritte konstitutive Transkriptionsfaktoren (3rd messenger), welche ihrerseits die de novo Expression von induzierbaren Transkriptionsfaktoren (4th messenger) anregen.

1.4 Der Transkriptionsfaktor c-Jun

Der Transkriptionsfaktor c-Jun gehört zur Gruppe der induzierbaren Transkriptionsfaktoren. Um aktiv werden zu können, muss er an zwei OH-Gruppen am N-Terminus, und zwar an den Serin-Resten in Position 63 und 73, phosphoryliert werden. Diese N-terminale

Phosphorylierung katalysiert die „c-Jun N-terminale Kinasen“ (JNK) (Gupta et al., 1996; Kallunki et al., 1994, 1996; Minden und Karin, 1997). Es existieren viele Beobachtungen sowohl für eine neuroregenerative als auch für eine apoptotische/neurodegenerative Funktion von c-Jun und seine N-terminale Phosphorylierung durch die JNK (Eilers et al., 1998; Watson et al., 1998; Herdegen et al., 1998; Herdegen und Waetzig, 2001, 2005; Raivich et al., 2006). Nach cerebraler Ischämie kommt es so z. B. zur schon nach drei Stunden einsetzenden Expression und N-terminalen Phosphorylierung von c-Jun in Nervenzellen im Randgebiet des ischämischen Infarktareals (Herdegen et al. 1998). Zu späteren Zeitpunkten - ab zwölf Stunden - zeigte sich darüber hinaus eine Erhöhung der sog. TUNEL-Aktivität (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labeling), was als Indikator für apoptotischen Zelltod gilt. Das bedeutet, dass dem apoptotischen Zelltod eine c-Jun Expression und Phosphorylierung vorausgeht (Herdegen et al., 1998; Martin-Villalba et al., 1999). Auch die Axotomie von Nervenzellen des ZNS stellt einen Reiz für die c-Jun Expression und N-terminale Phosphorylierung dar. In den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra pars compacta findet sich z. B. nach Durchtrennung ihrer Axone im medialen Vorderhirnbündel eine starke Expression und N-terminale Phosphorylierung von c-Jun (Herdegen et al., 1998). Neuronale Zellkulturen, denen die für das Überleben in Kultur notwendigen Wachstumsfaktoren entzogen werden, sind ebenfalls ein Modell für den neuronalen Zelltod. Auch dort konnten die verstärkte Expression von c-Jun, die Aktivierung von JNK sowie die Zeichen der Apoptose als Reaktionen auf den pathophysiologischen Stimulus gewertet werden (Eilers et al., 1998; Watson et al., 1998).

Es gibt allerdings auch Hinweise, dass c-Jun nicht nur neurodegenerative, sondern unter physiologischen Bedingungen auch neuroprotektive und adaptive Funktionen wahrnimmt (Sommer et al., 1995; Herdegen et al., 1997; Übersicht bei Raivich et al., 2004, 2006; Wätzig et al., 2006). So konnte in einem Modell zur Induktion von Ischämietoleranz für globale Ischämie gezeigt werden, dass c-Jun selektiv in Neuronen der CA1-Region exprimiert wird, die sich als ischämietolerant erweisen (Sommer et al., 1995).

Es scheint so, dass c-Jun bzw. das N-terminal phosphorylierte c-Jun eine duale Funktion erfüllen. Zum einen spielt es eine Rolle als Vermittler des apoptotischen Zelltodes, zum anderen als Promoter der neuronalen Regeneration. Möglicherweise sind die pro-apoptischen Eigenschaften von c-Jun auch von der N-terminalen Phosphorylierung durch die JNK abhängig.

1.5 Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) – neurodegenerative vs neuro-regenerative Funktionen

Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) gehören zur Familie der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen). Sie haben eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion im Säugetiergehirn (Herdegen und Waetzig, 2001; Waetzig und Herdegen, 2005; Waetzig et al., 2006) inne. Sie werden im Nervensystem z. B. nach Exzitotoxizität (Le-Niculescu et al., 1999; Coffey et al., 2000, 2002; Whitfield et al., 2001; Brecht et al., 2005), ischämischem Zelltod (Kuan et al., 2003), Aktivierung von Mikroglia (Hidding et al., 2002) oder in Modellen der Alzheimererkrankung (Marques et al., 2003) und Parkinsonerkrankung (Saporito et al., 1999; Crocker et al., 2001; Brecht et al. 2005) aktiviert. Sie werden auch als „stress activated protein kinases“ bezeichnet. Ihre Aufgabe ist die Signaltransduktion durch Aktivierung mittels Phosphorylierung von Substraten wie z. B. c-Jun.

Eine große Herausforderung für das Verstehen der Funktionsweise der JNK in vivo liegt in der Größe und Komplexität der JNK-Genfamilie. Es existieren zehn bekannte Isoformen, die durch alternatives Spleißen von drei Genen entstehen (Kyriakis et al., 1994). Bis jetzt wurden zwei Arten dieser posttranskriptionellen Modifikation beschrieben:

1. Die durch JNK1, -2 und -3 kodierte messenger-RNA (mRNA) kann am 3`-Ende auf 2 unterschiedliche Arten prozessiert werden, so dass sich am Ende für alle drei Gene entweder JNK-Proteine von 46 kDa oder 54 kDa entstehen.
2. Nur für die Gene JNK1 und -2 gibt es sowohl ein α - als auch ein β -Exon, wobei eines von beiden durch alternatives Spleißen aus der mRNA eliminiert wird. Die Exons α und β liegen in der Kinase-Domäne der JNK-Proteine.

Diese zehn Isoformen (je vier für JNK1 und -2, zwei für JNK3) haben alle eine unterschiedliche Spezifität zu ihren Substraten und bindenden Proteinen (Gupta et al., 1996; Kallunki et al., 1996) sowie in ihrer Regulation durch andere Kinasen und Scaffold-Proteine (Chang und Karin, 2001; Rincon et al., 2001; Davis, 1999).

Zu diesen Substraten gehören neben dem oben schon erwähnten Transkriptionsfaktor c-Jun noch weitere nukleäre als auch zytoplasmatische Substrate. Als nukleäre Substrate zu nennen sind z. B. die Transkriptionsfaktoren ATF2 und ELK-1. Erwähnenswert als zytoplasmatische Substrate sind z. B. das tau-Protein, das zur Familie der mikrotubuli-assoziierten Proteine gehört und dessen Hyperphosphorylierung ein typischer Befund bei Morbus Alzheimer

mer darstellt (Reynolds et al., 1997, 2000), sowie das Protein Bcl-2, welches zur Bcl-2-Genfamilie gehört und antiapoptotische Eigenschaften besitzt (Adams und Cory, 1998).

JNK kommen in zahlreichen Geweben vor. Auch innerhalb des Gehirns sind sie zu finden. Allerdings treten die unterschiedlichen Isoformen dort nicht in jedem Areal auf, sondern sie sind teilweise spezifisch nur in einem Kerngebiet vorzufinden. Dies lässt vermuten, dass die drei JNK Isoformen unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. Im erwachsenen Säugetiergehirn entwickelt sich das Wissen über diese „Aufschlüsselung der Funktionen der individuellen JNK“ nur langsam.

In transgenetischen Mäusen, wo jeweils eine der drei JNK Isoformen inaktiviert wurde, konnten in ersten Versuchen Schlüsse auf deren Funktionen gezogen werden. So konnte z. B. bei Versuchen an sogenannten JNK3 ko (knockout) Mäusen, wo das Enzym JNK3 genetisch inaktiviert wurde, sowie an deren genetisch nicht veränderten Kontrolltieren (Wildtypen) nachgewiesen werden, dass es bei der Gabe des prokonvulsiven Medikamentes Kainat bei den Wildtypen zu einer wesentlich stärkeren epileptischen Aktivität und einem größeren Zelluntergang im Hippocampus kam als bei den JNK3 ko Mäusen (Yang et al., 1997). Ein ähnlicher Effekt konnte in einem Hypoxiemodell beobachtet werden, wo der JNK3 ko bei Hypoxie einen geringeren Zelluntergang zeigte als die Kontrollen (Kuan et al., 2003). Auf der anderen Seite hat man herausgefunden, dass vor allem JNK1 und JNK2 eine wichtige Rolle in der prä- und postnatalen Entwicklung spielen und dort in ihrer Expression moduliert werden (Carboni et al., 1998; Yang et al., 1997). Bei dem Versuch der Generierung von „Doppel-knockout Mäusen“, bei denen sowohl das JNK1- als auch das JNK2-Gen inaktiviert wurden, verstarben die Tiere bereits im Embryonalstadium, da die physiologische Apoptose in der Neuralrinne ausblieb und es nicht zum Schluss des Neuralrohres kam.

Aus diesen Beispielen nun aber die Schlussfolgerung zu ziehen, dass JNK3 eine degenerative Rolle innehat und JNK1 eine physiologische Funktion, ist sicherlich falsch. JNK1 und JNK2 korrelieren auch mit Antiapoptose (Kuan et al., 1999) und JNK3 kann auch die NGF- (nerve growth factor) induzierte Differenzierung von PC12-Zellen verstärken (Waetzig und Herdegen, 2003).

Es gibt nun immer mehr Versuche und Ansätze, JNK-Inhibitoren als neuroprotektive Substanzen einzusetzen (Borsello et al., 2003; Hunot et al., 2004; Scapin et al., 2003; Lee et al., 2010). Dafür unabdingbar ist aber weiterhin die Entschlüsselung der physiologischen wie der pathologischen Funktionen der JNK-Isoformen.

1.6 Die Generierung des JNK knockouts und des Wildtyps

Als Versuchstiere wurden Mäuse-Stämme verwendet, bei denen je eine (JNK1, -2, -3 ko) bzw. zwei (JNK2 und JNK3 Doppel ko) der drei JNK Isoformen genetisch inaktiviert wurden. Bei diesen Tieren wurde mit Hilfe des „gene targeting“ bzw. „targeted disruption“-Verfahrens die Phosphorylierungsstelle, die in der Untereinheit VIII der Kinase liegt und für die Aktivierung der Kinase notwendig ist (Ip und Davis, 1998), durch eine Neomycin- bei JNK2 und -3 bzw. eine Hygromycin-Kassette bei JNK1 ersetzt. So konnten die JNK nicht mehr durch Phosphorylierung am Threonin-Prolin-Tyrosin Phosphorylierungsmotiv aktiviert werden (Kuan et al., 1999; Dong et al., 1998; Yang et al., 1997, 1998).

Bei den c-JunAA Mäusen wurde die Aminosäure Serin an den Phosphorylierungsstellen 63 und 73 durch die Aminosäure Alanin ersetzt (Behrens et al., 1999), so dass eine Phosphorylierung und damit eine Aktivierung nicht mehr möglich waren.

Als Kontrollgruppe dienten genetisch unveränderte Mäuse des Stammes C57/BL6, sogenannte Wildtypen.

Um die notwendige Anzahl der Tiere decken zu können, wurden JNK ko Mäuse einmal mit Mäusen des Stammes C57/BL6 rückgekreuzt. Die daraus hervorgehenden heterozygoten Mäuse der F1-Generation wurden wieder gekreuzt, so dass in der F2-Generation homozygote JNK ko und Wildtypen entstanden. Aus dieser Generation gingen dann die Versuchstiergruppen hervor (F3-Generation). Diese Vorgehensweise minimierte einerseits die genetische Variabilität von knockouts und Wildtypen, und sicherte andererseits eine für die durchzuführenden Experimente ausreichende Menge an Versuchstieren.

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und waren vom Ministerium für Landwirtschaft und Naturschutz des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (AZ: V-252-72241, 121-22 (87-10/02)).

1.7 Das Tiermodell

Als Tiermodell für den ischämischen Hirninfarkt wurde das Modell der permanenten, fokalen cerebralen Ischämie angewendet (permanent middle cerebral artery occlusion = pMCAO). Hierbei wird mittels Eröffnung der Schädeldecke und bipolarer Koagulation der Arteria cerebri media (MCA) ein permanenter Gefäßverschluss verursacht. Hierdurch entsteht ein kortikaler Infarkt, der auch die Untersuchung der Penumbra erlaubt. Im zweiten Teil wird auf die einzelnen Operationsschritte noch im Detail eingegangen.

1.8 Wissenschaftliche Fragestellungen

Diese Arbeit sollte folgende Fragen untersuchen:

- Wie ist die basale Expression und Aktivität der einzelnen JNK Isoformen im unbehandelten Gehirn?
- Wie verändern sich Verteilung und Aktivierung der JNK nach pMCAO?
- Führt der Knockout einer oder zweier JNK Isoformen zu einer Veränderung der Infarktgröße im Vergleich zu Kontrolltieren?
- Verändert der Knockout einer oder zweier JNK Isoformen die N-terminale Phosphorylierung von c-Jun?
- Wie beeinflusst der JNK Knockout die Aktivierung von Mikrogliazellen nach einer Ischämie?
- Korrelieren die Veränderungen der c-Jun-Phosphorylierung und der Mikrogliaaktivierung mit der Infarktgröße?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Ansatz von Lösungen

2.1.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien

Chloralhydrat	Merck, 64271 Darmstadt, Deutschland
Ethanol, absolut	“ “ “ “
Essigsäure	“ “ “ “
Gelatine	“ “ “ “
KCL	“ “ “ “
$\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	“ “ “ “
KH_2PO_4	“ “ “ “
Kresylviolettacetat	Sigma, 89552 Steinheim, Deutschland
NaCl	Merck, 64271 Darmstadt, Deutschland
0,9 % NaCl Lösung	Braun, 34209 Melsungen, Deutschland
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck, 64271 Darmstadt, Deutschland
Methanol	“ “ “ “
Paraformaldehyd	“ “ “ “
Saccharose	“ “ “ “
Triton® X – 100	“ “ “ “
30 %-iges Wasserstoff- peroxid	“ “ “ “
Xylol	“ “ “ “

2.1.2 Ansatz von Lösungen

Chloralhydrat

10 g Chloralhydrat wurden in 250 ml Aqua bidest. gelöst.

Ethanol-Essigsäurelösung

5 ml Essigsäure wurden in 45 ml Aqua bidest. gelöst; dann wurden 450 ml absolutes Ethanol hinzugegeben.

Gelantinelösung zur Objektträgerbeschichtung

12 g Gelantine und 1,2 g $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Chromalaun) wurden in 1800 ml Aqua bidest. durch Erhitzen gelöst und danach mit Aqua bidest. auf 2000 ml aufgefüllt.

PB (10 x), pH 7,4

11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 und 2 g KCL wurden in 800 ml Aqua bidest. gelöst. Nachdem der pH auf 7,4 eingestellt worden war, wurde mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

PB (1 x), pH 7,4

PB (10x) wurde mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:10 verdünnt.

PBS (10 x), pH 7,4

80 g NaCl, 11,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 und 2 g KCL wurden in 800 ml Aqua bidest. gelöst. Nachdem der pH auf 7,4 eingestellt worden war, wurde mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

PBS (1 x), pH 7,4

PBS (10x) wurde mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:10 verdünnt.

PBST

In 500 ml PBS (1x) wurde 1 ml Triton – X - 100 gelöst.

0,1 %-ige Kresylviolettlösung

500 mg Kresylviolettacetat wurden in 500 ml Aqua bidest. durch Rühren über einen Zeitraum von 7 Tagen gelöst.

4 %-ige Paraformaldehydlösung, pH 7,4

40 g Paraformaldehyd wurden in 800 ml PB (1 x) gelöst und danach mit PB auf 1000 ml aufgefüllt.

0,1 %-ige Paraformaldehydlösung

10 ml 4 %-ige Paraformaldehydlösung wurden in 390 ml PBS (1x) gelöst.

30 %-ige Saccharoselösung

30 g Saccharose wurde in 60 ml Aqua bidest. gelöst und danach mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

2.2 Versuchstiere

Für die Tierexperimente wurden männliche Mäuse von neun unterschiedlichen Genotypen verwendet.

2.2.1 Wildtyp Mäuse

Als Versuchstiere für die Kontrollgruppe wurden genetisch unveränderte männliche Mäuse vom C57/BL6 Stamm verwendet. Sie werden im Folgenden als Wildtyp (WT_{1,2,3}) bezeichnet.

2.2.2 JNK knockout Mäuse

Als Versuchstiere wurden Mausstämmen verwendet, bei denen je eine oder zwei der drei JNK Isoformen genetisch inaktiviert wurde.

Die verwendeten JNK ko Tiere wurden mit Hilfe des „gene targeting“ bzw. „targeted disruption“ Verfahrens generiert. Die Vektoren enthielten Gene aus der genomischen Bibliothek von 129/SV-Mäusen. In den Vektoren war das Phosphorylierungsmotiv Threonin-Prolin-Tyrosin durch eine Neomycin- (bei JNK2 und 3) bzw. eine Hygromycin-Kassette (bei JNK1) ersetzt worden, die als positive Selektionsmarker diente (Dong et al., 1998; Yang et al., 1998; Yang DD et al., 1997). Bei dem Vektor für JNK3 wurde außerdem ein weiteres Exon aus dem Gen entfernt. Bei dem Vektor für JNK1 und JNK2 wurden neben dem Phosphorylierungsmotiv noch die jeweiligen Exons der Isoformen α und β entfernt. Die Vektoren wurden in embryonale Stammzellen von unterschiedlichen Mausstämmen elektroporiert: beim JNK2 ko in embryonale Stammzellen vom Stamm D3 und beim JNK1 ko und JNK3 ko in embryonale Stammzellen vom Stamm W9.5.

Nach positiver Selektion der embryonalen Stammzellen mit Neomycin bzw. Hygromycin und negativer Selektion mit Gancyclovir (bzw. Herpes simplex Thymidinkinase) wurden die rekombinanten embryonalen Stammzellen in C57/BL6 Blastocysten injiziert. So wurden zuerst Chimäre gewonnen, die die erwünschte Mutation in der Keimbahn trugen und sie so auf ihre Nachkommen weitergeben konnten, die dann als Heterozygote nach den Mendel'schen Regeln für die Züchtung homozygoter Tiere verwendet werden konnten.

2.3 Genotypisierung

Bei jedem 2. Tier wurde der Genotyp mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kontrolliert. Dabei erfolgte die Isolierung der DNA aus Mäuseschwänzen mit Hilfe des Quia-gen Kits für DNA Präparation.

2.4 Tierhaltung und Zucht

Die Tiere wurden im Tierstall der Universität Kiel in der Hospitalstrasse gezüchtet und in Gruppen von fünf bis acht gleichgeschlechtlichen Tieren in durchsichtigen Polycarbon-Käfigen auf Weichholzgranulat gehalten. Die Ernährung bestand aus einer autoklavierten, pelletierten Alleindiät, Haferflocken sowie Leitungswasser ad libitum. Es wurden ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Rhythmus, eine Raumtemperatur von 24 °C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50-60 % gewährleistet.

Die JNK ko bzw. die c-JunAA Tiere wurden in Bereichen mit Sicherheitsstufe 1 (S1) gezüchtet, gehalten und operiert. Weichholzgranulat, Käfige, Trinkflaschen und Instrumente, die mit den JNK ko Tieren in Kontakt gekommen waren, wurden getrennt entsorgt bzw. gereinigt.

2.5 Okklusion der MCA

Um zu gewährleisten, dass die Ergebnisse möglichst wenig durch die zirkadiane Rhythmik der Tiere beeinflusst wurden, fanden die Operationen nur in der Vormittagszeit zwischen 8 und 12 Uhr statt. Außerdem wurden nur männliche Tiere für die Versuche verwendet, um eine Beeinflussung der Ergebnisse aufgrund der hormonellen Unterschiede zu minimieren.

Es wurden nur Tiere operiert, die mindestens drei Monate alt waren und ein Gewicht von 25-35 g hatten.

2.5.1 Operationsprotokoll

Bei jeder Operation wurde auf bestimmte Merkmale wie z. B. den anatomischen Verlauf der Strukturen bzw. anatomische Variationen geachtet. Um bei der Vielzahl der Operationen hierüber einen Überblick zu behalten, wurde ein Tierprotokoll entwickelt, welches bei jedem Tier Anwendung fand. In ihm wurden Besonderheiten und Verlauf der Operation sowie Besonderheiten während der weiteren Experimente festgehalten.

Im Folgenden sind die Merkmale/Informationen, die in dem Protokoll festgehalten wurden, aufgezählt:

- Alter und Gewicht
- Dauer der Operation
- anatomischer Gefäßverlauf (Zeichnung)
- Besonderheiten/Komplikationen während der Operation
- postoperative Überlebenszeit: Besonderheiten/Komplikationen
- transkardiale Perfusion: Besonderheiten/Komplikationen
- makroskopische Besonderheiten des Hirnaufbaus und makroskopische Infarktausdehnung
- Ergebnisse (Auswertung des Infarktolumens und der immunhistochemischen Färbungen).

So konnte nach Vorliegen der Ergebnisse verglichen werden, ob bei auffälligen Werten eventuell ein Bezug zu Besonderheiten/Komplikationen während oder nach der Operation bestand. Außerdem konnten Vergleiche zwischen den einzelnen Tiergruppen angestellt werden, z. B. ob eine anatomische Variation des Gefäßverlaufes der MCA bestand.

2.5.2 Anästhesie

Die Anästhesie wurde mit Chloralhydrat (400 mg/kgKG) durchgeführt. Sie erfolgte mittels einer intraperitonealen Injektion.

Die anästhesierende Wirkung setzte nach zwei Minuten ein, erreichte ihre volle Wirkung nach fünf Minuten und hielt ca. 35 Minuten an. Danach oder bei wieder einsetzender Reaktion auf Schmerzreize wurde nachinjiziert.

2.5.3 Verwendete technische Geräte und Instrumente

Tabelle 2 Verwendete technische Geräte

Elektrokauter	Erbe ICC 50	Erbe Elektromedizin GmbH, Waldhörnstr. 17, D-72072 Tübingen
Bohrgerät	Micromot 50/E	Proxxon GmbH, Im Spanischen 18-24, D-54518 Niersbach
Bohrköpfe		Hager & Meislinger GmbH, P.O.B. 102744, D-40018 Düsseldorf
Mikroskop	Highlight 3001	Olympus Europa GmbH, Wendenstr. 14-18, D-20097 Hamburg

Tabelle 3 Verwendete Instrumente

Instrument	Bestell-Nr.	Kontakt
Chirurgische Pinzette	No. 11023-10	Fine Science Tools (F.S.T.), Fahrtgasse 7-13, D-69117 Heidelberg
2 kleine Pinzetten	No. 11065-07	„
Nadelhalter	No. 12500-12	„
Nadeln	No. 12050-03	„
Chirurgische Schere	No. 14059-09	„
Wattestäbchen	No. 0415-0105	Beese Verbandstoffe, Großer Kamp 14, D-22885 Barsbüttel

2.5.4 Eröffnung des Operationssitus und Darstellung der Gefäße

Die Tiere wurden nach Erlöschen der Reaktion auf Schmerzreize - als Zeichen der richtigen Narkosetiefe - in Rechtsseitenlage an ihren Vorder- und Hinterläufen auf der Operationsunterlage fixiert. Von jetzt an wurde unter dem Operationsmikroskop operiert, welches eine 10-fache Vergrößerung lieferte. Zuerst wurde zwischen linkem Auge und linkem Ohr ein medianer Hautschnitt von 0,75 – bis 1 cm Länge gesetzt (Abb. 1 a), so dass der darunter lie-

gende Musculus temporalis zum Vorschein kam (Abb. 1 b). Nach Fixation der Wundränder wurde als nächstes der M. temporalis am aurikulären Ansatzpunkt gelöst und aus dem Operationsfeld herausgeklappt (Abb. 1 c), so dass darunter liegend die Schädeldecke zum Vorschein kam. Nun war die A. cerebri media mit ihrer Aufzweigung bereits zu erkennen, da sie durch die Schädeldecke hindurch schien.

Als nächstes wurde mit Hilfe des Bohrers die Kraniotomie im Bereich der arteriellen Aufzweigung durchgeführt. Hierbei war darauf zu achten, dass die Öffnung im Knochen ausreichend groß war, um sowohl den Stamm der A. cerebri media als auch die beiden Äste der Arterie mit der Pinzette zur Elektrokauterisierung ohne Probleme zu erreichen (Abb. 1 d und e).

2.5.5 Gefäßverschluss mittels direkter Elektrokoagulation

Zum Verschluss der A. cerebri media wurde das Verfahren der bipolaren Elektrokoagulation (oder auch Elektrokauterisierung) mittels einer elektrischen Pinzette angewendet. Um die Gefahr einer postoperativen Reperfusion auf ein Minimum zu reduzieren, wurde der Gefäßverschluss an drei Stellen durchgeführt (Abb. 1 e). Zuerst wurden die beiden abgehenden Arterienäste elektrokoaguliert, danach der Gefäßstamm.

2.5.6 Wundverschluss und postoperative Behandlung

Nach erfolgreichem Gefäßverschluss wurde der M. temporalis an seine ursprüngliche Position zurückgeklappt. Danach wurde die Operationswunde mit Hilfe von transkutanen Einzelknopfnähten verschlossen (Abb. 1 f).

Postoperativ erhielten die Tiere zum Flüssigkeitsausgleich noch eine intraperitoneale Injektion mit 0,5 ml NaCl 0,9 % (Braun, 34209 Melsungen, Deutschland). Außerdem wurden die Vitalfunktionen täglich kontrolliert.

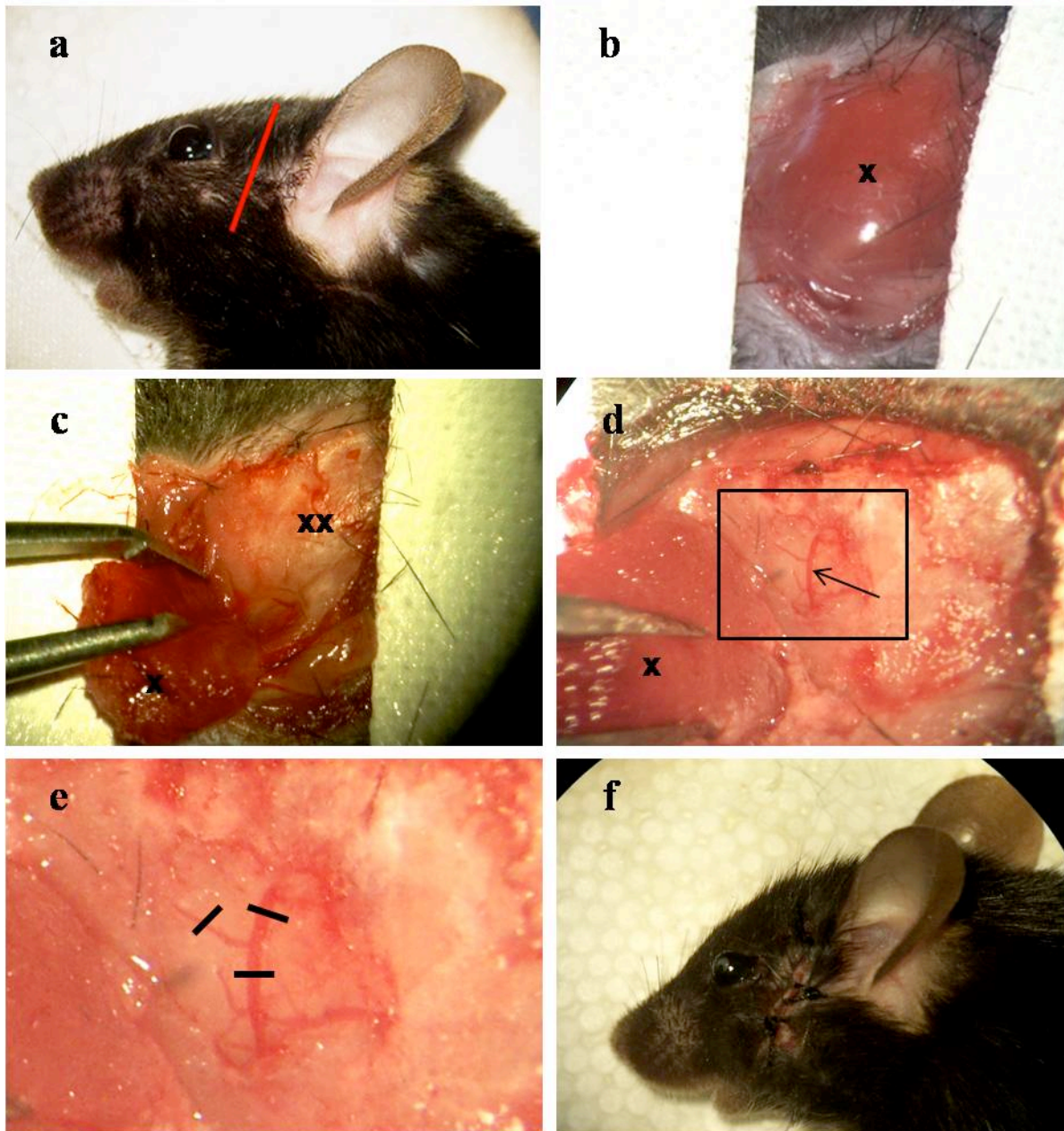


Abbildung 1 Darstellung einer Okklusion der MCA

Abb. 1 a Fixierung der Maus unter dem Mikroskop (10-fache Vergrößerung). Die rote Linie markiert die Schnittführung für den Zugangsweg.

Abb. 1 b Nach Fixierung der Wundränder kommt der Musculus temporalis in Sicht (x).

Abb. 1 c Blick auf das Os temporale (xx). Der Muskel ist nach links hochgeklappt (x).

Abb. 1 d Blick auf die MCA (↑) nach Kraniotomie. Oberhalb der Pfeilmarkierung Aufteilung in die beiden Endäste. Das Rechteck markiert die Ausschnittvergrößerung in Abb. 1 e.

Abb. 1 e: Man sieht die MCA. Die Balken markieren die Verschlusspunkte.

Abb. 1 f: Wunde nach Hautverschluss mit Einzelknopfnäht

2.5.7 Mortalität und mögliche Komplikationen bei der Operation

In dem hier geschilderten Operationsablauf kam es nur zu wenigen Komplikationen. Relevant war die Blutungskomplikation: Bei ca. 15 % der operierten Tiere kam es beim Verschluss der MCA zur Verletzung und Blutung aus der Arterie. Von diesen 15 % ließ sich die Blutung in ca. 50 % der Fälle schnell stoppen, so dass mit der Operation fortgefahren werden konnte. Bei den anderen Tieren musste die Operation abgebrochen werden, da aufgrund der Einblutung die anatomischen Strukturen nicht mehr eindeutig zu identifizieren waren und sich somit ein sicherer Verschluss nicht durchführen ließ.

Ca. 5 % der operierten Tiere verstarben innerhalb der ersten 24 Stunden, wobei sich in der überwiegenden Anzahl der Fälle keine eindeutige Ursache feststellen ließ, in wenigen Fällen war wahrscheinlich eine Nachblutung aus dem verschlossenen Gefäßstumpf die Ursache.

2.6 Transkardiale Perfusion

2.6.1 Verwendete Instrumente

Tabelle 4 Verwendete Instrumente für die transkardiale Perfusion

Instrument	Bestell-Nr.	Kontakt
Butterflykanüle	21G, Ø 0,8 mm	Neofly®, Ohmeda AB, SE-25106 Helsingborg
Chirurgische Pinzette	No. 11023-10	F.S.T., Fahrtgasse 7-13, D-69117 Heidelberg
Chirurgische Klemme	No. 13002-10	“
Lüer-Haken	No. 16000-14	“
Chirurgische Schere	No. 14059-09	“
Skalpell	No. 10004-13	“
Skalpellklingen	No. 10015-00	“

2.6.2 Durchführung

Die Tiere wurden durch transkardiale Perfusion in tiefer Chloralhydrat-Narkose getötet. Die zur Narkose verwendete Menge an Chloralhydrat betrug die doppelte der zur Operation verwendeten Menge. Dadurch war gewährleistet, dass die Perfusion in tiefer Narkose, aber noch bei erhaltener kardial-zirkulatorischer Kreislauffunktion ausgeführt werden konnte.

Nach Eintritt der Narkose wurde das Tier auf dem Rücken fixiert und mit einer Schere wurden das Abdomen und der Thorax eröffnet. Nun wurde vorsichtig das Herz freigelegt und der rechte Vorhof unter Schonung der Lunge dargestellt. Durch Inzision wurde der rechte Vorhof eröffnet, so dass das Tier schnell ausblutete. Eine Butterfly-Kanüle wurde durch die Herzspitze in dem linken Ventrikel platziert und zuerst mit 20 ml körperwarmem PBS durchspült, gefolgt von 20 ml auf 4° C gekühlter 4 %-iger Paraformaldehydlösung zur Fixation des Gewebes.

Danach wurde mit einem Skalpell die Schädeldecke eröffnet und mittels eines Lühr-Hakens die Schädelkalotte entfernt, so dass das Gehirn entnommen und makroskopisch auf das Vorliegen eines Infarktes untersucht werden konnte. Die Gehirne, die makroskopisch und mit Hilfe einer zweifach vergrößernden Lupe keinen Infarkt aufwiesen, wurden verworfen, alle anderen wurden für 24 Stunden in 4 %-iger Paraformaldehydlösung bei 4 °C zur Nachfixation aufbewahrt.

2.7 Unbehandelte Kontrolltiere

Aus jeder der neun Gruppen wurden zwei männliche Tiere ohne vorherige Operation durch transkardiale Perfusion getötet, um für die immunhistochemischen Färbungen Basal- bzw. Kontrollwerte zu erhalten.

2.8 Übersicht über die Versuchsgruppen und Fallzahlen

Tabelle 5 Größe der Versuchsgruppen

a	Überleben 72 h								
	WT1	JNK1 ko	WT2	JNK2 ko	JNK2/3 ko	WT3	JNK3 ko	WT c- Jun	c- JunAA
n _(ges)	8	8	8	8	8	8	8	8	8
n _(morph)	6	7	6	6	7	7	8	7	7
n _(p-Jun)	6	6	6	6	6	6	6	6	6
n _(Mg)	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Tiere Gesamt	72								

b	Überleben 24 h								
	WT1	JNK1 ko	WT2	JNK2 ko	JNK2/3 ko	WT3	JNK3 ko	WT c- Jun	c- JunAA
n _(ges)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
n _(Wb)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tiere Gesamt	18								

a = Tiergruppen mit einer Überlebenszeit von 72 h; b = Tiergruppen mit einer Überlebenszeit von 24 h. n_(ges) = Gesamtzahl der operierten Tiere einer Gruppe; n_(morph) = Anzahl der Tiere, bei denen eine morphologische Färbung durchgeführt wurde; n_(p-Jun) = Anzahl der Tiere, bei denen eine immunhistochemische Färbung zur Untersuchung der phospho-c-Junaktivität durchgeführt wurde; n_(Mg) = Anzahl der Tiere, bei denen eine immunhistochemische Färbung zur Untersuchung der Mikrogliaaktivität durchgeführt wurde; n_(Wb) = Anzahl der Tiere, bei denen eine Western Blot Untersuchung durchgeführt wurde. Die Gruppen n_(morph), n_(p-Jun), n_(Mg) und n_(Wb) sind Untergruppen der Gruppe n_(ges).

Die Gruppen mit Überlebenszeiten von 24 und 72 Stunden bestehen aus den Genotypen WT1-3 (Wildtyp 1-3), WT c-Jun (Wildtyp von c-Jun), JNK1-3 ko (JNK1-3 knockout), JNK2/3 ko (Doppel knockout von JNK2 und -3) und c-JunAA (Genotyp mit Alanin statt Serin an den Positionen 63 und 73). Bei allen Versuchsgruppen ist die Gesamtzahl der Tiere mit Hirninfarkt angegeben ($n_{(ges)}$) sowie die Anzahl der Tiere in der Infarktgrößenbestimmung ($n_{(morph)}$). Für die immunhistochemischen Untersuchungen von phospho-c-Jun ($n_{(p-Jun)}$), Mikroglia ($n_{(Mg)}$) und den Western Blot Untersuchungen ($n_{(wb)}$) sind ebenfalls die Anzahl der ausgewerteten Tiere aufgeführt (Tab. 5 a und b).

Auf die Auflistung der unbehandelten Tiere zur Bestimmung von Basalwerten wurde hier verzichtet. Es wurden zwei Tiere pro Genotyp operiert, um Basalwerte zu erhalten, was einer Gesamtzahl von 18 Tieren entspricht.

Insgesamt wurden für diese Dissertationsarbeit 108 Tiere analysiert.

2.9 Gewebeaufbereitung

Nach der Nachfixation mit 4 %-iger Paraformaldehydlösung wurden die Gehirne zur Entwässerung für 48 Stunden in 30 %-iger Saccharoselösung bei 4° C entwässert.

Nach dieser Entwässerung wurden sie dann in einem Kryostaten in 40 µm dünne koronare Schichten in rostro-kaudaler Richtung geschnitten. Mit Beginn des Infarktareals wurde jeder fünfte Schnitt direkt auf einen mit Gelatine beschichteten Glasobjektträger gebracht (Direktabnahme). Die übrigen vier Schnitte wurden in je ein Loch einer 24-Loch-Mikrotiterplatte überführt, in der sie frei schwimmend in PBS mit einem 0,1 %-igen Paraformaldehydgehalt bei 4° C aufbewahrt wurden. Dieses Schema wurde so lange beibehalten, bis das Ende des Infarktareals erreicht war.

2.10 Morphometrie

Um eine Aussage über die Größe und Beschaffenheit der Infarkte treffen zu können, wurden die Gehirnschnitte zuerst einer morphologischen Färbung unterzogen. Danach wurde das Infarktvolumen gemessen.

2.10.1 Kresylviolett-färbung

Als morphologische Färbung der Hirnschnitte wurde die Kresylviolett-färbung verwendet (Abbildung 2), da sie es erlaubt, zwischen infarziertem und intaktem Gewebe zu unter-

scheiden. Sie färbt basophile Bestandteile an, so z. B. das Chromatin des Zellkerns oder die Nissl-Substanz (Schollen aus rauem endoplasmatischen Retikulum) in Neuronen.

Folgende Materialien wurden zur Durchführung der Färbung benötigt: ein Objektträger-Ständer, mehrere Glasgefäße für die Färbereagenzien, eine feine Pinzette, Deckgläschen und Färbereagenzien. Als Färbelösung wurde 0,1 % Kresylviolettacetatlösung verwendet. Es wurde das in Tabelle 6 aufgeführte Färbeprotokoll verwendet. Nachdem die gefärbten Objektträger getrocknet waren, wurden sie mit Hilfe des Schnelleindeckmittels Pertex (Pertex®, medite, 38272 Burgdorf, Deutschland) mit den Deckgläschen versiegelt.

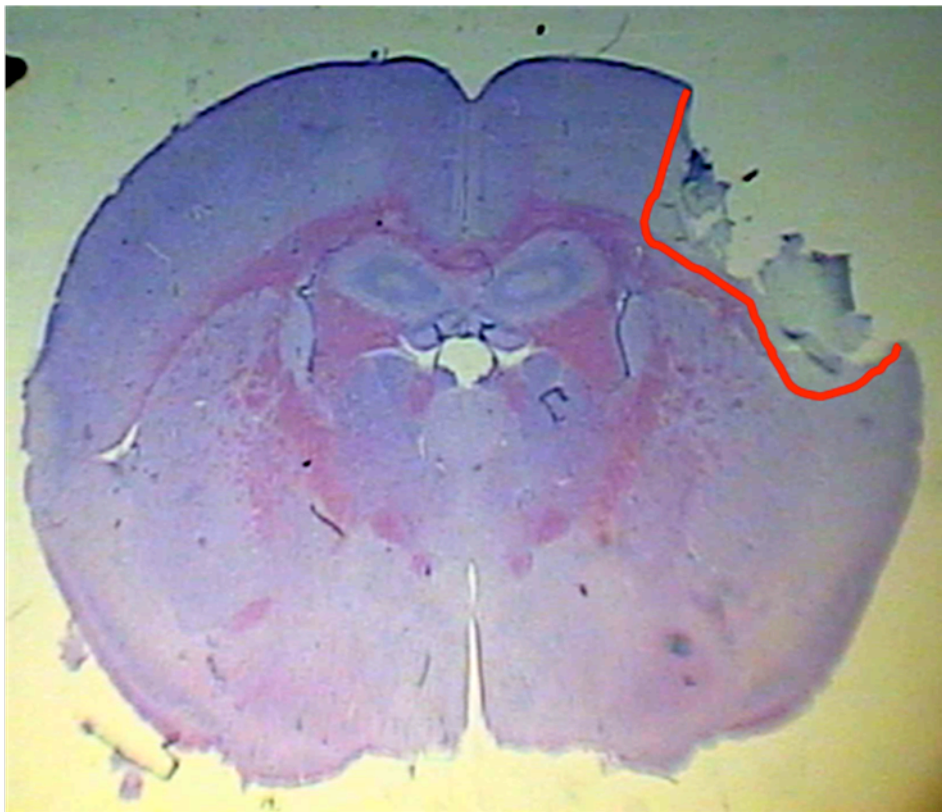


Abbildung 2 Kresylviolett-färbung

Man sieht einen Koronarschnitt des Gehirns nach Kresylviolett-färbung. Der Defekt entspricht dem Infarktgebiet. Die rote Linie markiert das Randgebiet. 20-fache Vergrößerung.

Tabelle 6 Färbeprotokoll Kresylviolett

Aqua bidest.	1 Minute
Ethanol, absolut	3 Minuten
Xylol	15 Minuten
Ethanol, absolut	3 Minuten
Aqua bidest.	1 Minute
Kresylviolettlösung	6 Minuten
Aqua bidest.	1 Minute
Alkohol-Essigsäurelösung	<1 Minute
Aqua bidest.	1 Minute

2.10.2 Infarktgrößenbestimmung

Die Messung der Infarktgrößen wurde mit einer Leica®-Morphometrie-Einheit durchgeführt, bestehend aus einem Mikroskop mit eingebauter Photokamera, einem Computer, an den die Photokamera angeschlossen ist und der Bildverarbeitungssoftware Leica QWin® (Leica, Bannockburn, USA).

2.10.2.1 Einlesen der Hirnschnitte

Von jedem Tier wurde mit Beginn des Infarktareals jeder fünfte Schnitt auf einen mit Gelatine beschichteten Objektträger aufgetragen und mit Kresylviolett angefärbt. Um nun die Infarktgröße bestimmen zu können, wurden die einzelnen Hirnschnitte so unter dem Mikroskop eingestellt, dass der gesamte Schnitt zur Darstellung kam. Mit Hilfe der Photokamera wurden diese Bilder nun eingelesen und im TIFF-Datenformat auf der Festplatte des angeschlossenen Computers abgespeichert.

2.10.2.2 Infarktgrößenbestimmung

Die Messung der Infarktgröße wurde mit Hilfe des Bildverarbeitungs-Programmes Leica QWin® (Leica, Bannockburn, USA) durchgeführt. Die vorher eingelesenen Bilder des jeweiligen Tieres wurden in diesem Programm aufgerufen, auf dem Bildschirm dargestellt und gleichzeitig wurde der entsprechende Objektträger unter dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung betrachtet. So war es möglich, bestimmte Bereiche des Hirnschnittes wie z. B. den Verlauf der Infarktgrenze genauer beurteilen zu können. Innerhalb des Programmes Leica

QWin® wurde zur Bestimmung der Infarktgröße ein Makro – auch Routine genannt – programmiert, das die unterschiedlichen Messschritte erleichterte.

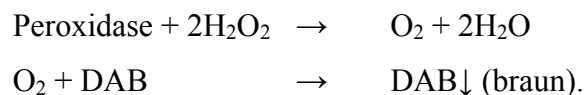
Zur Infarktgrößenbestimmung wurde eine direkte Messmethode angewendet, da es sich bei den verursachten Infarkten im Vergleich zu anderen Versuchsmethoden um relativ kleine Defekte handelte.

2.10.2.3 Statistische Auswertung

Frühere Publikationen haben gezeigt, dass der knockout verschiedener JNK Isoformen und die funktionelle Hemmung von c-Jun zu pathologischen anatomischen Strukturen führen kann (Raivich et al., 2004; Chang et al., 2003; Kuan et al., 1999; Sabapathy et al., 1999). Aus diesem Grund wurde zum Vergleich der einzelnen JNK ko Genotypen mit den dazugehörigen Wildtypgruppen der gepaarte t-Test ($P < 0,05$) angewendet.

2.11 Immunhistochemie

Mit immunhistochemischen Färbungen werden bestimmte Proteine (Zielantigene) in den Gehirnschnitten nachgewiesen: Ein Antikörper bindet spezifisch sein Zielantigen. Im nächsten Schritt wird er durch einen zweiten biotinylierten Antikörper erkannt, der an den Fc-Teil des ersten Antikörpers bindet. Der biotinylierte zweite Antikörper wird in einem dritten Schritt mit hoher Affinität durch das Avidin eines Enzymkomplexes, bestehend aus Avidin-DH und biotinylierter Meerrettichperoxidase, gebunden. Nach Zugabe von Diaminobenzidin (DAB) als Färbereagenz und Wasserstoffperoxid wird das DAB durch den molekularen Sauerstoff, der mit Hilfe der Peroxidase des Enzymkomplexes aus dem Wasserstoffperoxid entsteht, umgesetzt, erhält eine tiefbraune Farbe und fällt aus:



Auf diese Weise wurde die Bindung des ersten Antikörpers an sein Zielantigen im Gehirnschnitt nachgewiesen.

2.11.1 Durchführung der Färbung

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Gehirnschnitte aus der 24-Lochplatte (dort in 0,1 % Paraformaldehyd / PBS aufbewahrt) entnommen und in eine neue Lochplatte überführt. Zuerst wurden die Gehirnschnitte mit einer Lösung aus Wasserstoffpe-

roxid und Methanol im Verhältnis 3:100 für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die endogenen Peroxidasen des Gewebes und der Erythrozyten zu blockieren. Danach wurden die Schnitte dreimal für je zehn Minuten in PBST gewaschen und für 48 Stunden bei 4 °C mit dem ersten Antikörper – in spezifischer Verdünnung mit PBST – inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBST für je zehn Minuten erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten zweiten Antikörper für 45 Minuten bei 37 °C. Nach erneutem dreimaligen Waschen in PBST wurden die Gehirnschnitte mit dem Komplex aus Avidin DH und biotinylierter Meerrettichperoxidase (Vectastatin Elite ABC KIT®, Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010 USA) inkubiert – wiederum für 45 Minuten bei 37 °C. Danach wurden die Gehirnschnitte dreimal für je zehn Minuten in PBS gewaschen und die eigentliche Färbelösung, bestehend aus DAB und Wasserstoffperoxid (SIGMA FAST™ DAB Peroxidase Substrate Tablet Set, Sigma-Aldrich-Chemie, 89552 Steinheim, Deutschland), hinzugefügt. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde der Färbeprozess beobachtet und bei optimaler Farbtintensität durch Abpipettieren der Färbelösung und Waschen in Aqua bidest. gestoppt. Die Gehirnschnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und nach dem Trocknen mit Deckgläschen versiegelt.

2.11.2 Immunhistochemische Färbungen - Herkunft, Verdünnung und Immunisierungssystem der ersten Antikörper

Tabelle 7 Immunhistochemische Färbung: Erster Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Immunisierungssystem
ED1	Calbiochem, San Diego, USA	1 : 400	Kaninchen / polyclonal
phospho-c-Jun	Cell Signaling Technology, Beverly, USA	1 : 800	Kaninchen / polyclonal

Mikroglia

Der verwendete ED1-Antikörper erkennt selektiv die Oberflächenstruktur von Mikrogliazellen und lagert sich an diese an.

N-terminal phosphoryliertes c-Jun (phospho-c-Jun)

Wird c-Jun durch JNK (c-Jun N-terminale Kinase) am Serin 63 und 73 phosphoryliert, entsteht N-terminal phosphoryliertes c-Jun. Der verwendete Antikörper erkennt selektiv die Phosphorylierung am Serin 63. Er wurde von der Firma Cell Signaling Technology, Beverly, USA, bezogen.

2.11.3 Beschreibung der verwendeten zweiten Antikörper

Als zweiter Antikörper gegen die aus dem Kaninchen stammenden ersten Antikörper ED1 und phospho-c-Jun wurde ein biotinylierter, gegen den Fc-Teil des Kaninchen-IgG-Moleküls gerichteter Antikörper verwendet. Er wurde von Vector Laboratories (Burlingame, CA 94010, USA) bezogen.

2.11.4 Analyse der Färbungen

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden auch bei unbehandelten Kontrolltieren der jeweiligen Genotyp-Gruppen durchgeführt und analysiert.

2.11.4.1 Phospho-c-Jun und Mikroglia im Infarkttrandgebiet

Zur Bestimmung der phospho-c-Jun-positiven Neurone wurde folgendermaßen vorgegangen. Es wurden pro Tier vier vordefinierte Schnitte für die Färbung ausgesucht: jeweils einer aus dem frontalen und aus dem occipitalen Infarkttrandgebiet sowie ein Schnitt aus dem mittleren Gebiet, wo der Infarkt seine größte Ausdehnung besaß. In diesen Schnitten wurde jeweils eine definierte Fläche in der Penumbra aufgesucht, wo die phospho-c-Jun-positiven Neurone gezählt wurden. Aus den Werten der vier untersuchten Schnitte wurde dann der Mittelwert gebildet.

Auf dieselbe Art und Weise wurde die Menge der angefärbten Mikrogliazellen ermittelt.

2.11.5 Western Blots

Zur Durchführung der Western Blot Analysen wurden den Mäusen direkt nach Eintreten des Todes die Schädeldecke und -kalotte eröffnet, das Gehirn bzw. die betreffenden Hirnareale entnommen und sofort in Flüssigstickstoff eingefroren. Nach mechanischer Homogenisierung im Flüssigstickstoff wurden die Proteinextrakte durch eine fünf Minuten dauernde Lyse des Gewebe-Homogenisates in einer speziellen Pufferlösung gewonnen. Diese setzt sich aus 1 % SDS-Lösung, 10 mM Tris (pH 7.4) und 1 % Phosphatase-Inhibitor-Mixtur II (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) zusammen. Nach zweimaliger jeweils fünf Sekunden dau-

ernder Ultraschallbehandlung wurde das nicht gelöste Material in der Zentrifuge (15 Min. bei 16000 x g bei 4 °C) vom gelösten Material entfernt. Die gelösten Proteinextrakte wurden wieder in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur weiteren Untersuchung wurden 20 µg vom Gesamtprotein in 12 % SDS-Polyacrylamid Gel getrennt und auf Polyvinylidene-Difluorid-Transfer-Membranen aufgebracht. Die Membranen wurden mit 4 % fettarmem Trockenmilchpulver geblockt und mit den ersten Antikörpern gegen phosphoryliertes JNK, JNK1, JNK2, JNK3, Gesamt-JNK und β -Actin (Tabelle 8) inkubiert. Nach drei Waschgängen mit PBST (siehe auch 2.1.2 = Ansatz der Lösungen) wurden die Membranen für 30 Minuten mit dem HRP-konjugierten zweiten Antikörper inkubiert. Die verwendeten Membranen wurden mittels des Chemilumineszenz-Systems und mittels Hyperfilm ECL (Amersham, Piscataway, USA) entwickelt. Für die weitere Untersuchung wurden die Blots mit 2 % SDS, 62,5 mM Tris und 100 mM Mercaptoethanol für 30 Minuten bei 50 °C abgelöst, dann mit PBST gewaschen und erneut geblockt. Alle dual-phosphorylierten Kinase-Pegel-Messungen wurden durch Hybridisierung mit Antikörpern gegen das Gesamt-Kinase-Protein genormt. Zur Normierung des gleichen Proteingehalts jeder Bahn sowie zur Bestätigung der gleichen Beladung wurden alle Membranen zuletzt mit einem Antikörper gegen β -Actin hybridisiert. Alle Western Blots wurden mit Stichproben von drei unterschiedlichen Experimenten durchgeführt.

Tabelle 8 Verwendete Antikörper Western Blot

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Immunisierungssystem
Phosphoryliertes JNK	Promega, Madison, USA	1 : 2500	Kaninchen / polyclonal
JNK1	PharMingen, San Diego, USA	1 : 1000	monoclonal
JNK2	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	1 : 2000	monoclonal
JNK3	UBI, Hauppauge, USA	1 : 1000	Kaninchen / polyclonal
Gesamt-JNK	Cell Signaling Technology, Beverly, USA	1 : 1000	Kaninchen / polyclonal
β -Actin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	1 : 5000	monoclonal

3 Ergebnisse

3.1 Infarktverhalten der einzelnen Tiergruppen 3 Tage nach pMCAO

Als Überlebenszeit wurden 3 Tage festgelegt, da die ischämische Degeneration der Zellen nach dieser Zeit ihre maximale Ausdehnung erreicht.

Bei der permanenten Occlusion der Endstrecke der linken Arteria cerebri media (pMCAO) kommt es zu einer unilateralen Degeneration des parietalen Kortex. In der Abbildung 2 sieht man den kortikalen Defekt, der sich im Infarktgebiet ausgebildet hat. Er entsteht im Rahmen des Färbeprozesses, wo sich nekrotisches Material bei den einzelnen Waschgängen (siehe unter 2.10.1) löst. Die eigentliche Infarktgrenze, bei der ischämisch geschädigte Zellen in intakte Zellen übergehen (Penumbra), wird unter dem Mikroskop festgelegt. Dort heben sich ischämisch geschädigte Zellen von der Umgebung durch eine stärkere Anfärbung sowie einen pyknotischen Zellkern ab.

Im Rahmen der Operation ließ sich bei den Wildtypen und den JNK knockouts ein Unterschied im Verlauf der MCA makroskopisch nicht nachweisen. Allerdings konnte das Fehlen der vorderen Kommissur bei dem JNK1 ko, wie bereits in einer anderen Publikation berichtet, bestätigt werden (Chang et al., 2003).

Die Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung sind auf einem Punktdiagramm abgebildet (Abbildung 3). Vergleicht man nun die Infarktgrößenwerte der einzelnen Gruppen miteinander, fällt auf, dass die Infarktgröße bei dem JNK1 ko ($15,9 \pm 2,5 \text{ mm}^3$) im Vergleich zur Wildtypkontrolle (WT1 = $10,5 \pm 1,6 \text{ mm}^3$) um 50 % größer ist bei statistischer Signifikanz ($p < 0,01$) (Abbildung 3 und 4). Dieses Ergebnis könnte auf einen protektiven Effekt des JNK1-Gens bei ischämischer Pathologie hinweisen.

Vergleicht man die Werte der anderen Gruppen miteinander, zeigt sich bei JNK2 ko ($9,0 \pm 2,6 \text{ mm}^3$) gegenüber WT2 ($13,3 \pm 4,1 \text{ mm}^3$) im Mittelwert eine signifikant kleinere Infarktgröße. Allerdings wird bei weiter Streuung der Einzelwerte keine statistische Signifikanz erreicht ($p = 0,14$). Im Vergleich der Infarktgrößen von JNK3 ($16,4 \pm 3,6 \text{ mm}^3$) mit WT3 ($15,8 \pm 4,8 \text{ mm}^3$) werden ähnliche Mittelwerte erreicht, wobei die Einzelwerte auch hier weiter streuen und somit keine statistische Signifikanz erreicht wird ($p = 0,8$).

Als Vergleichsgruppe für den Doppel knockout JNK2/3 ($12,9 \pm 2,3 \text{ mm}^3$) müssen jeweils die Wildtyp-Gruppen WT2 und WT3 herangezogen werden. Allerdings werden auch hier keine statistisch signifikanten Ergebnisse erzielt.

Bei den c-JunAA-Mäusen bzw. deren Kontrollgruppe (c-Jun) zeigt sich kein Unterschied im Infarktverhalten ($14,5 \pm 2,9 \text{ mm}^3$ vs. $14,2 \pm 1,9 \text{ mm}^3$).

Bei den Wildtypgruppen ergibt sich im Mittelwert ein unterschiedliches Infarktverhalten (Abbildung 5), welches im Vergleich untereinander aber keine statistische Signifikanz erreicht ($p = 0,6$).

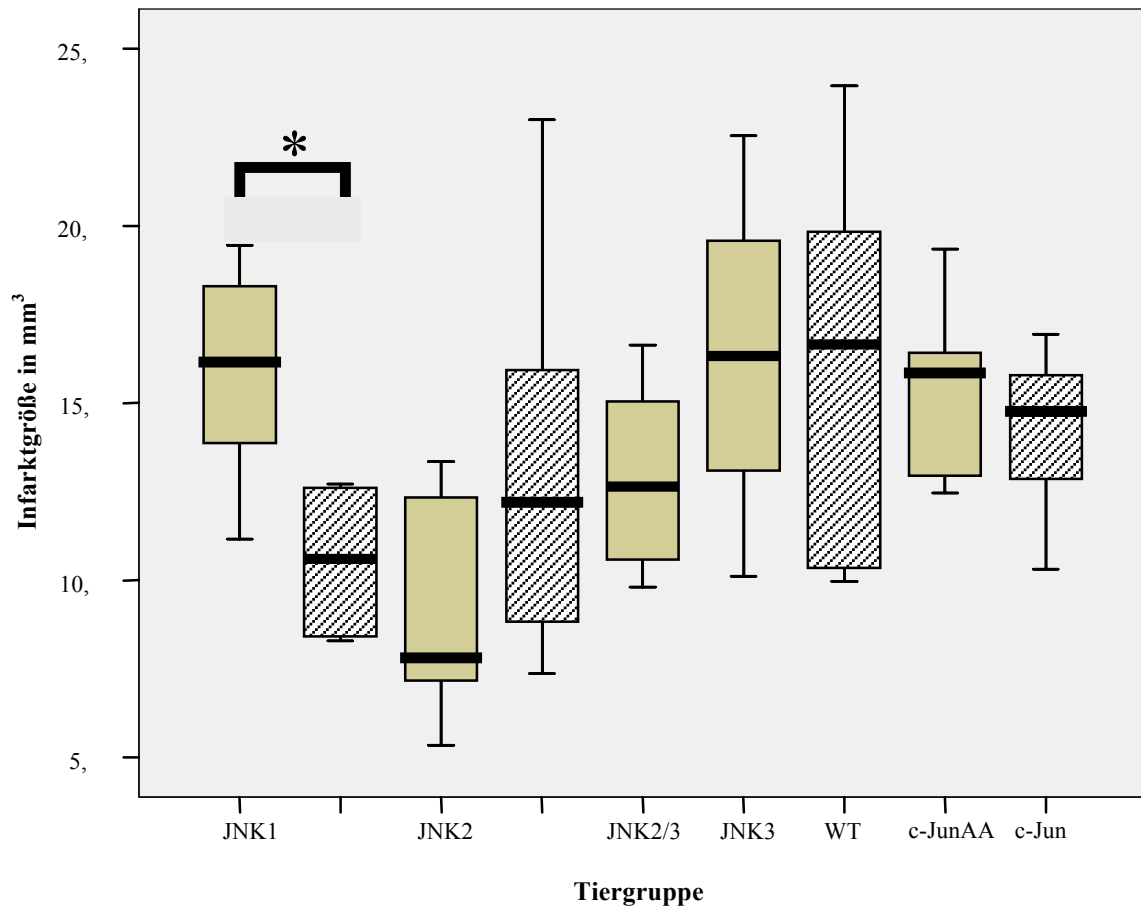


Abbildung 3 Größe des Infarktolumens

Man sieht auf dieser Abbildung die durchschnittliche Größe des Infarktolumens der einzelnen Tiergruppen. Die Infarktgröße wird in mm^3 angegeben. Auf der x-Achse sind die einzelnen Tiergruppen eingezeichnet. Die schraffierten Felder markieren die Wildtypgruppen. Die einzelnen Werte liegen innerhalb des grau hinterlegten Balkens. Angabe der Mittelwerte (—) und der Standardabweichung (I). Als statistischer Signifikanztest wurde, wie auch bei der Signifikanzbestimmung der phospho-c-Jun- und Mikrogliawerte, der gepaarte T-Test herangezogen ($p < 0,05$). (*) Angabe der statistischen Signifikanz zwischen 2 Gruppen ($p < 0,01$).

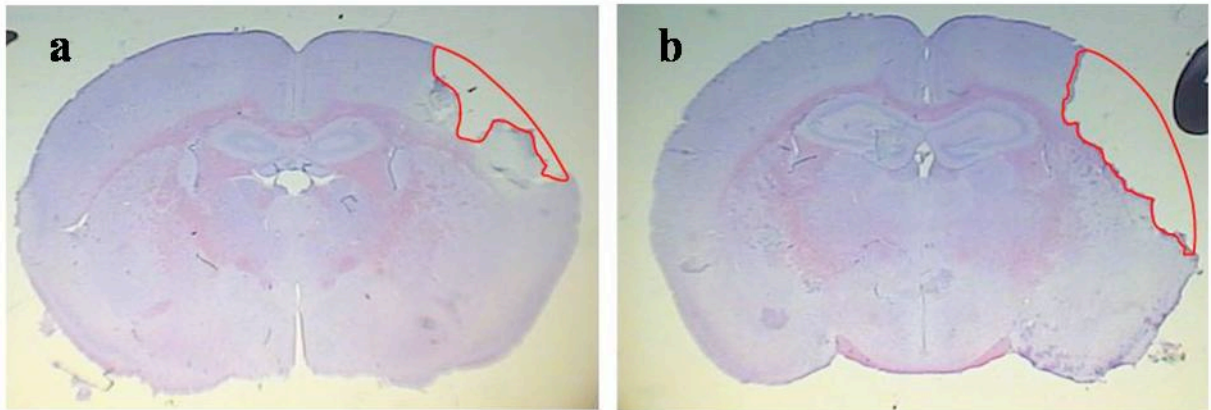


Abbildung 4 Kortikaler Defekt

Vergleich WT1 (a) und JNK1 ko (b) nach Kresylviolett-Färbung 3 Tage nach MCAO (20-fache Vergrößerung).

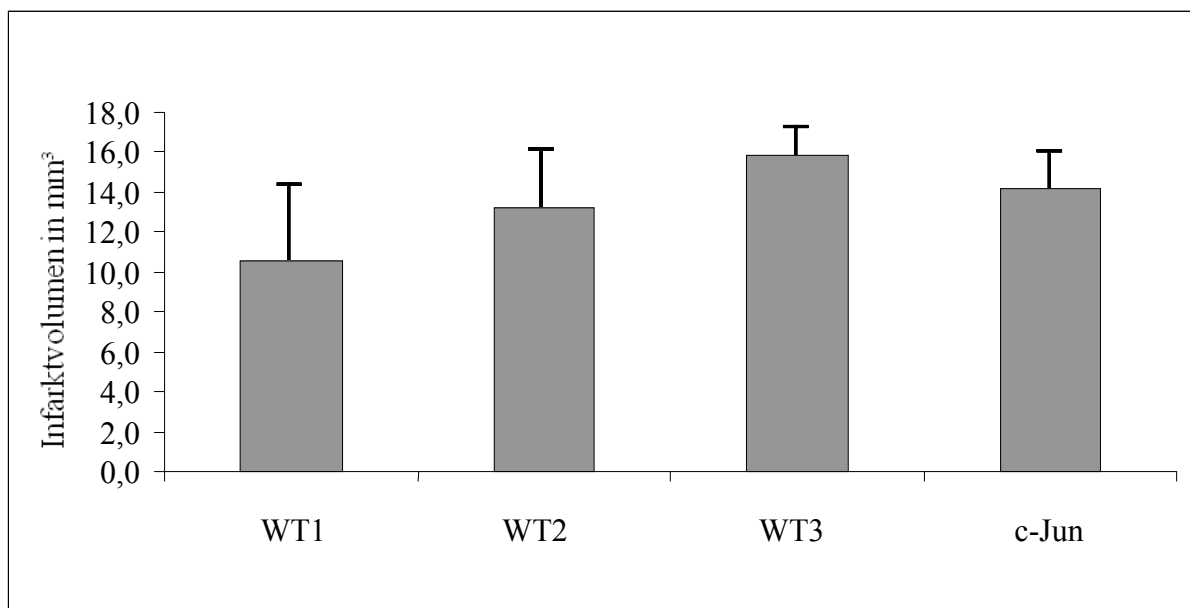


Abbildung 5 Infarktvolumina der Wildtypen

Vergleich der Wildtypgruppen. Angabe des Infarktvolumens in mm³ (\pm SD).

3.2 Expression und Aktivierung der JNK Isoformen im Kortex

In der hier durchgeführten Versuchsreihe wurde mittels Western Blot an Gewebeproben aus drei Hirnregionen – der ischämischen Kernregion, der Penumbra und dem gesunden kontralateralen Kortexareal – die Expression und Aktivierung der einzelnen JNK Isoformen und des Gesamt-JNK-Pools unter basalen Bedingungen sowie 24 Stunden nach pMCAO untersucht.

3.2.1 Basale Expression und Aktivierung der JNK Isoformen

Zunächst wurde die basale Expression der einzelnen JNK Isoformen im Kortex von unbehandelten JNK knockout und c-JunAA Mäusen sowie deren Wildtypen (Abb. 6, Tab. 9) bestimmt. Neben den einzelnen JNK Isoformen wurde auch die Menge an Gesamt-JNK sowie an phosphoryliertem (= aktiviertem) JNK dargestellt. Man sieht als Nachweis der Spezifität der benutzten Antisera, dass bei den JNK ko Mäusen das fehlende JNK-Protein in einem kompletten Signalverlust in der entsprechenden Bande resultierte (Abb. 6).

3.2.1.1 Basale Expression der einzelnen JNK Isoformen

Man erkennt, dass JNK1 überwiegend in der 46 kDa Isoform und nur schwach als 54 kDa Isoform exprimiert wurde. JNK2 wurde etwas stärker in der 54 kDa als in der 46 kDa Isoform exprimiert, während JNK3 als starke 46 kDa und nur als schwache 54 kDa Isoform vorlag (Abb. 6, Tab. 9).

3.2.1.2 Anteil der einzelnen Isoformen an der Gesamt-JNK-Expression

Nun wurde der Anteil der einzelnen JNK ko an der Gesamt-JNK-Expression ermittelt. Während der JNK1 ko das Gesamtsignal nicht wesentlich reduzierte, war bei dem JNK2 ko das 54 kDa Signal komplett verschwunden und das 46 kDa Signal stark abgeschwächt (Abb. 6, Tab. 10). Das deutet darauf hin, dass die JNK2 Isoform den größten Teil der Gesamt-JNK-54 kDa Fraktion stellt. Betrachtet man nun den JNK3 ko, dann sieht man, dass hier ein dem JNK1 ko vergleichbarer Anteil an der Gesamt-JNK-Expression vorliegt. Eine kompensatorische Veränderung der Genexpression der verbleibenden JNK Isoformen wurde bei einer Verstärkung der 46 kDa JNK2 Expression in den JNK3 ko Mäusen beobachtet (Abb. 6, Tab. 10).

3.2.1.3 Anteil der einzelnen Isoformen am phosphorylierten JNK

Wie hoch ist nun der Anteil der einzelnen JNK Isoformen am phosphorylierten (= aktivierten) JNK? Als erstes ließ sich beobachten, dass im unbehandelten Kortex nur die 46 kDa

Isoformen phosphoryliert wurden. Somit konnten prinzipiell alle drei JNK Isoformen unter Ruhebedingungen zum phosphorylierten JNK beitragen. Betrachtete man nun aber die Menge an phosphoryliertem JNK bei den knockout Gruppen, wurde schnell klar, dass JNK1 den größten Teil des phosphorylierten JNK bildete, denn bei dem JNK1 ko war der Pool an phosphoryliertem JNK am stärksten reduziert. Dies war bei JNK2 und JNK3 nicht der Fall (Abb. 6, Tab. 10). Darüber hinaus zeigte der Doppel knockout von JNK2/3, bei dem nur JNK1 exprimiert wurde, ein pJNK-Signal, wie es sonst nur bei den Wildtypen zu sehen war.

Wie zu erwarten war, zeigte die c-JunAA Mutation (Alanin statt Serin an den Positionen 63 und 73) die gleiche Expression und Aktivierung der JNK Isoformen wie die entsprechende Wildtyp-Kontrolle.

Der Vergleich der einzelnen Wildtyp-Gruppen untereinander zeigte keine signifikanten Unterschiede in der JNK Expression und Aktivierung (Abb. 6, Tab. 10).

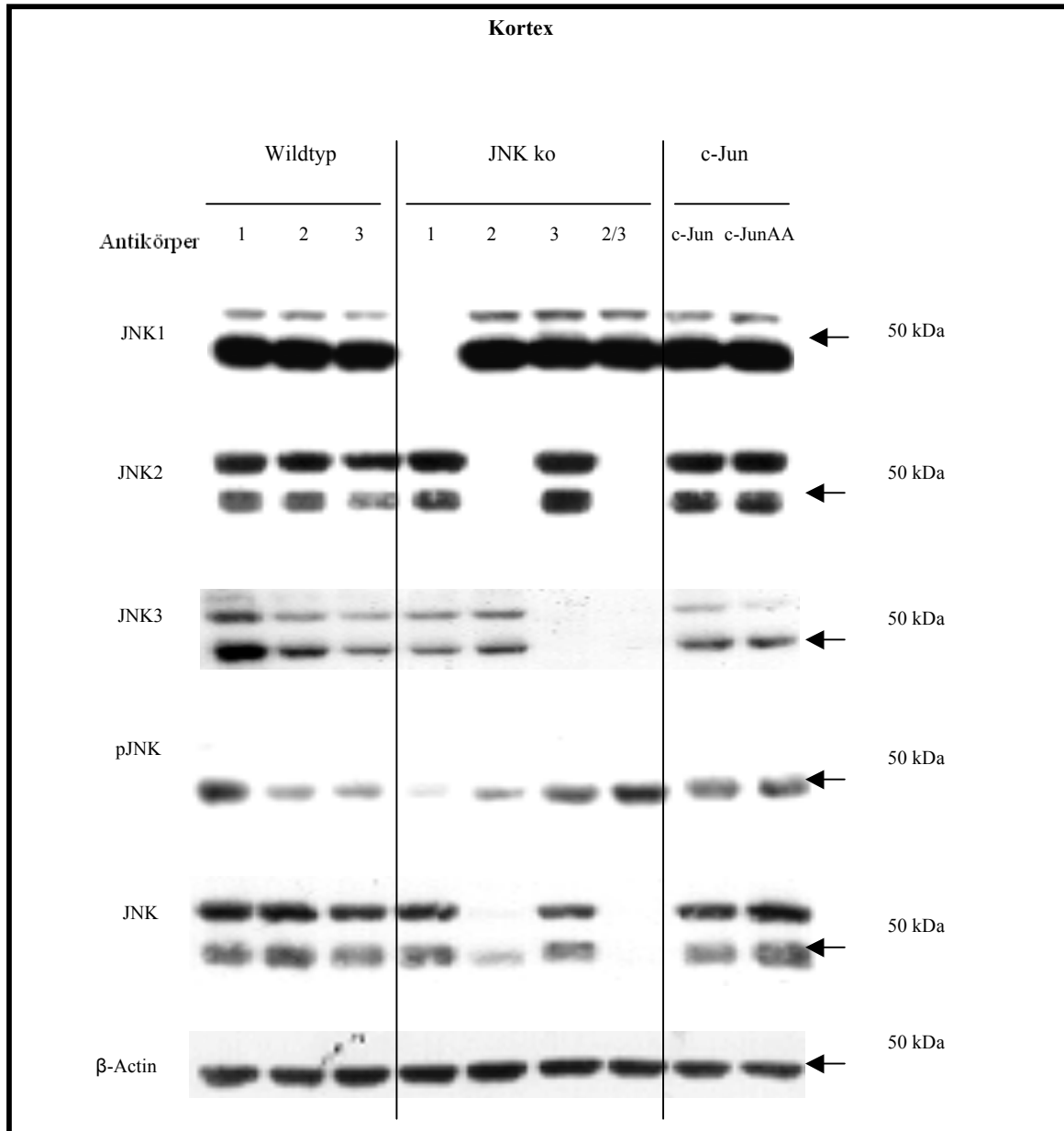


Abbildung 6 Western Blot Kortex

Das Gewebe für die Western Blots wurde von 2 Mäusen gewonnen. Ergebnisse des Kortex von unbehandelten JNK ko und c-JunAA Mäusen sowie ihrer Wildtypkontrollen.

pJNK = phosphoryliertes JNK; JNK = gesamtes JNK. Die am rechten Bildrand eingezeichneten Pfeile geben die Position des Molekulargewichtsmarkers bei 50 kDa an. Die darüber liegenden Signale entsprechen also den 54 kDa-, die darunter liegenden den 46 kDa-Signalen. das β -Actin-Signal läuft bei 46 kDa.

Tabelle 9 Semiquantitative Beschreibung der JNK-Signale von unbehandelten Mäusen

Isoformen	Kortex
JNK1	
54 kDa	+
46 kDa	+++
JNK2	
54 kDa	+++
46 kDa	++
JNK3	
54 kDa	+
46 kDa	++
pJNK	
54 kDa	0
46 kDa	+

Semiquantitative Darstellung der Bandenintensität der JNK Isoformen aus den Western Blots der Abb. 6 von unbehandelten Mäusen.

0 = nicht sichtbar, + = schwach, ++ = mittel, +++ = starkes Signal im Western Blot.

Tabelle 10 Semiquantitative Beschreibung der Signaländerungen zwischen JNK ko und WT-Mäusen

Isoformen	Signaländerungen verglichen mit WT im Kortex
JNK1 ko	
pJNK	↓↓
JNK2 ko	
JNK 54 kDa	↓↓
JNK 46 kDa	↓
JNK3 ko	
JNK2	↑
JNK2+3 ko	
JNK 54 kDa	↓↓
JNK 46 kDa	↓↓
pJNK	↑

Semiquantitative Darstellung der Veränderungen der Bandenintensität der JNK Isoformen aus den Western Blots der Abb. 6 von JNK knockout Mäusen verglichen mit unbehandelten Wildtypen. Signaländerungen für das gesamte JNK (JNK) und phosphorylierte JNK (pJNK) in den JNK ko: ↓, ↑ = leichte Abnahme oder Zunahme; ↓↓, ↑↑ = starke Abnahme oder Zunahme der Signalintensität im Western Blot (Abb. 6).

3.2.2 Expression und Aktivierung der JNK Isoformen nach 24 Stunden

In den nächsten Experimenten wurde das Muster der JNK Aktivierung und Expression im kontralateralen Kortex, in der Penumbra sowie in dem Infarktkerngebiet 24 Stunden nach permanenter MCA Okklusion bei JNK ko Mäusen, c-JunAA Mäusen und deren Wildtypkontrollen untersucht. Nach diesem Zeitraum werden der neuronale Zelltod und die ischämische Gewebeerstörung klar sichtbar. Bei dieser Versuchsreihe dienten WT2 Mäuse als basale Kontrolle, welche als repräsentativ für die WT Gruppen anzusehen waren (Abb. 7A-C, Tab. 11). Auch bei dieser Untersuchungsreihe zeigte sich die Spezifität der Antisera in einem

kompletten Signalverlust der JNK Bande beim korrespondierenden knockout, z. B. in der JNK2 Bande bei dem JNK2 ko.

3.2.2.1 Kontralateraler Kortex

Im kontralateralen Kortex von Tieren mit pMCAO wurden im Vergleich zu unbehandelten Tieren zwei Veränderungen beobachtet. Zum einen fiel im Gegensatz zu den basalen Untersuchungsergebnissen auf, dass das phosphorylierte JNK nicht mehr von der JNK1 Isoform dominiert wurde, denn der ko jeder Isoform reduzierte die JNK-Aktivierung. Zum anderen fand sich bei dem phosphorylierten JNK (pJNK) nun auch ein eindeutiges 54 kDa Signal, welches unter basalen Bedingungen nicht nachweisbar war. Dieses Signal fehlte bei dem JNK3 ko und JNK2/3 ko. Das 46 kDa Signal war bei diesen beiden Gruppen nicht abgeschwächt (Abb. 7a, Tab. 11). Die Aktivität von phosphoryliertem 54 kDa JNK war bei den Wildtypen leicht erhöht (Tab. 11).

3.2.2.2 Penumbra

In der Penumbra blieb die Expression und Aktivierung der JNK Isoformen bei den WT Kontrollen konstant. Hier war bei dem JNK1 ko die Phosphorylierung der 54 kDa Isoformen erhöht. Das Signal von JNK3 stieg bei JNK1 ko und JNK2 ko, was auf einen verstärkten Beitrag von JNK3 zum pJNK als Träger hindeutet. Bei JNK3 ko sinkt das pJNK-Signal, d. h. JNK3 wird der Träger von pJNK. Bei dem knockout von JNK2 und JNK2/3 fiel ein abgeschwächtes Signal des Gesamt-JNK auf (Abb. 7b, Tab. 11).

3.2.2.3 Zentrales Infarktgebiet

In der Infarktkernregion zeigten sich - wie in der Penumbra und im kontralateralen Kortex - eine starke Abschwächung des gesamten JNK bei den JNK2 und JNK2/3 knockouts. Im Gegensatz zur Penumbra wurde hier der Pool an phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem JNK hauptsächlich von JNK2 gebildet. Der knockout von JNK2 reduzierte das Signal bei 46 und 54 kDa am stärksten. Diese Beobachtung wurde auch beim JNK2/3 ko gemacht. Gleichzeitig sah man bei beiden Isoformen eine verstärkte Expression von JNK1. Das könnte als kompensatorische Antwort der „protektiven“ JNK1 Isoform gewertet werden (Abb. 7c, Tab. 11).

Schließlich lässt sich noch sagen, dass sich die Expression und die Aktivierung der JNK Isoformen in den c-JunAA Mäusen verglichen mit den Kontrollen in allen untersuchten Arealen nicht unterschieden.

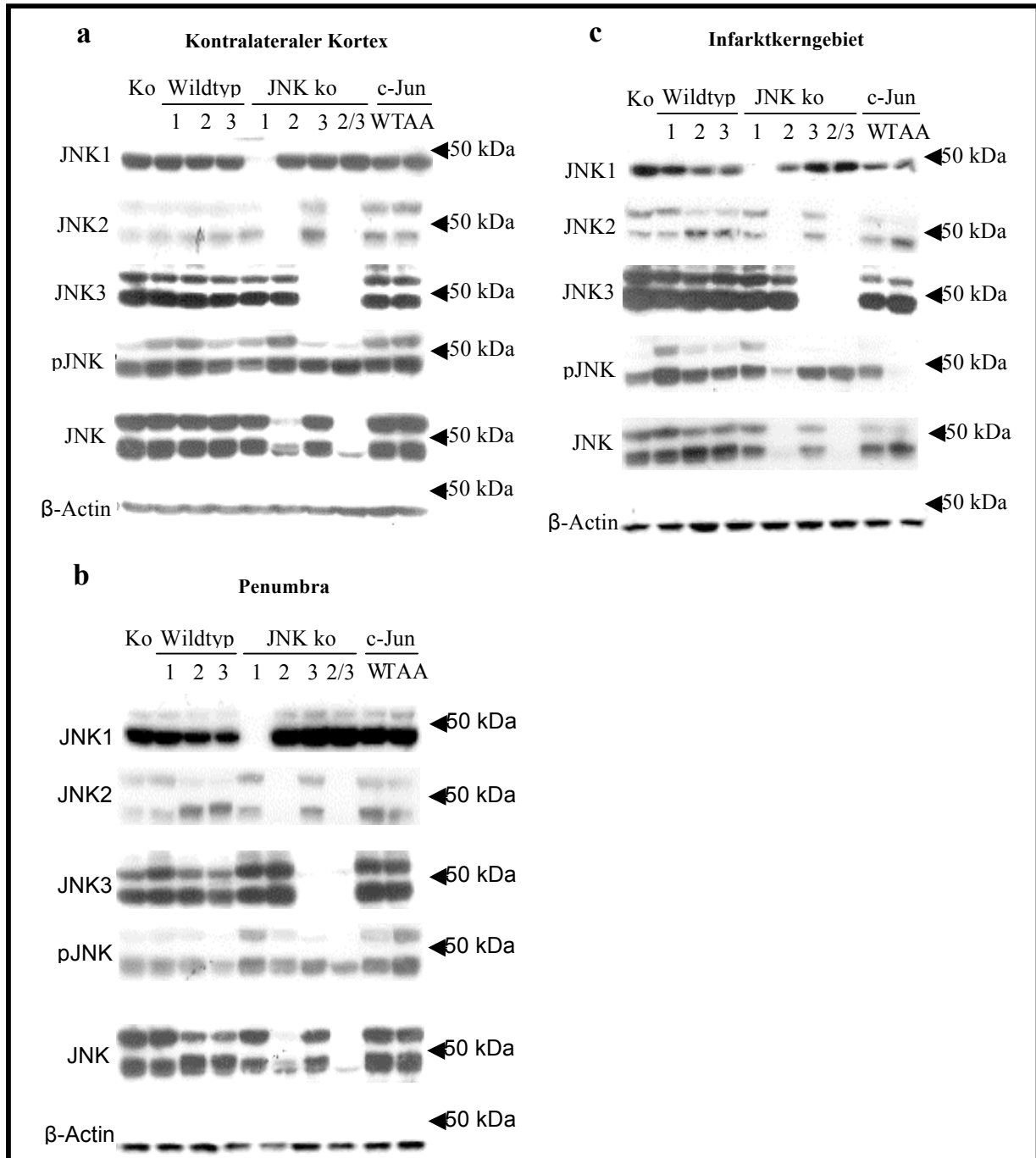


Abbildung 7 Western Blots 24h nach pMCAO

Gewebe aus dem kontralateralen Kortex (a), aus der Penumbra (b) sowie aus der Infarktkernregion (c). KO = unbehandelte Wildtyp-Kontrolle (WT2); pJNK = phosphoryliertes JNK; JNK = Gesamt JNK. Die Pfeile markieren den Molekulargewichtsmarker im Bereich 50 kDa. Die darüber liegenden JNK-Signale entsprechen also den 54 kDa-, die darunter liegenden den 46 kDa-Signalen.

Tabelle 11 Beschreibung der Signaländerungen von JNK 24 h nach pMCAO

Isoformen	Signaländerungen gegenüber WT-Kontrollen		
	Kontralat. Kortex	Penumbra	Infarktkernregion
JNK1 ko			
pJNK	↓		
pJNK 54 kDa		↑↑	
JNK3		↑	
JNK2 ko			
JNK-54 kDa		↓↓	↓↓
JNK-46 kDa		↓	↓↓
pJNK-54 kDa			↓↓
pJNK-46 kDa			↓↓
JNK3		↑	
JNK3 ko			
JNK-54 kDa			↓
JNK-46 kDa			↓
pJNK-54 kDa	↓		
JNK2	↑		
JNK1			↑
JNK2+3 ko			
JNK-54 kDa		↓↓	↓↓
JNK-46 kDa		↓↓	↓↓
pJNK-54 kDa	↓		
JNK1			↑

Semiquantitative Beschreibung der Signaländerungen in Abb. 7 a-c für die Expression und Aktivierung von JNK 24h nach pMCAO. JNK ko Mäuse wurden mit der korrespondierenden WT Gruppe verglichen. ↓, ↑ = leichte Abnahme oder Zunahme; ↓↓, ↑↑ = starke Abnahme oder Zunahme der Signalintensität.

3.3 N-terminale Phosphorylierung von c-Jun (phospho-c-Jun)

Nachdem nun mittels Western Blot die JNK-Expression und Aktivierung untersucht worden war, sollte nun die N-terminale Phosphorylierung von c-Jun drei Tage nach pMCAO als Indikator der neuronalen bzw. nukleären JNK-Aktivität beobachtet werden.

Diese Untersuchung erfolgte nach immunhistologischer Anfärbung der Zellen in der Penumbra (siehe auch 2.11).

3.3.1 Basale Expression von phospho-c-Jun

Es wurde von allen Versuchsgruppen bei unbehandelten Tieren eine phospho-c-Jun-Färbung zur Ermittlung basaler Expressionswerte im Kortex durchgeführt. Hier zeigte sich jedoch bei allen untersuchten Genotypen und Kontrolltypen das gleiche Bild: im Bereich des Kortex war durch eine immunhistochemische Anfärbung eine phospho-c-Jun-Immunreaktivität nicht bzw nur vereinzelt nachweisbar (Abb. 8).



Abbildung 8 Basale phospho-c-Jun-Färbung

Basale Färbung eines WT2-Tieres. Keine nachweisbare phospho-c-Jun-Immunreaktivität (vergl. Abb. 9). Vergrößerung 50-fach.

3.3.2 Expression von phospho-c-Jun 3 Tage nach pMCAO

Entlang der Infarktgrenze (in der Penumbra) kam es drei Tage nach pMCAO in zahlreichen Neuronen zu einer nukleären N-terminalen c-Jun-Phosphorylierung. Sie fand ausgehend von der Infarktgrenze in Neuronen in einem vier bis zehn neuronalen Zellreihen umfassenden Bereich statt (Abb. 9).

Die ermittelten Werte (Zellen pro Gesichtsfeld) erreichten keine statistische Signifikanz (Abb. 9 und 10).

Wie erwartet und als Beweis der Spezifität des benutzten Antiserums war bei der Gruppe der c-JunAA Mäuse, in der an den Phosphorylierungsstellen 63 und 73 Serin durch die Aminosäure Alanin ausgewechselt wurde, eine phospho-c-Jun-Immunreaktivität nicht nachweisbar (Abb. 9).

Auch bei dieser Untersuchung zeigt sich, wie schon bei dem Infarktgrößenvergleich, bei einem Vergleich der Kontrollgruppen untereinander kein Unterschied in der phospho-c-Jun-Immunreaktion (Abb. 9 und 10).

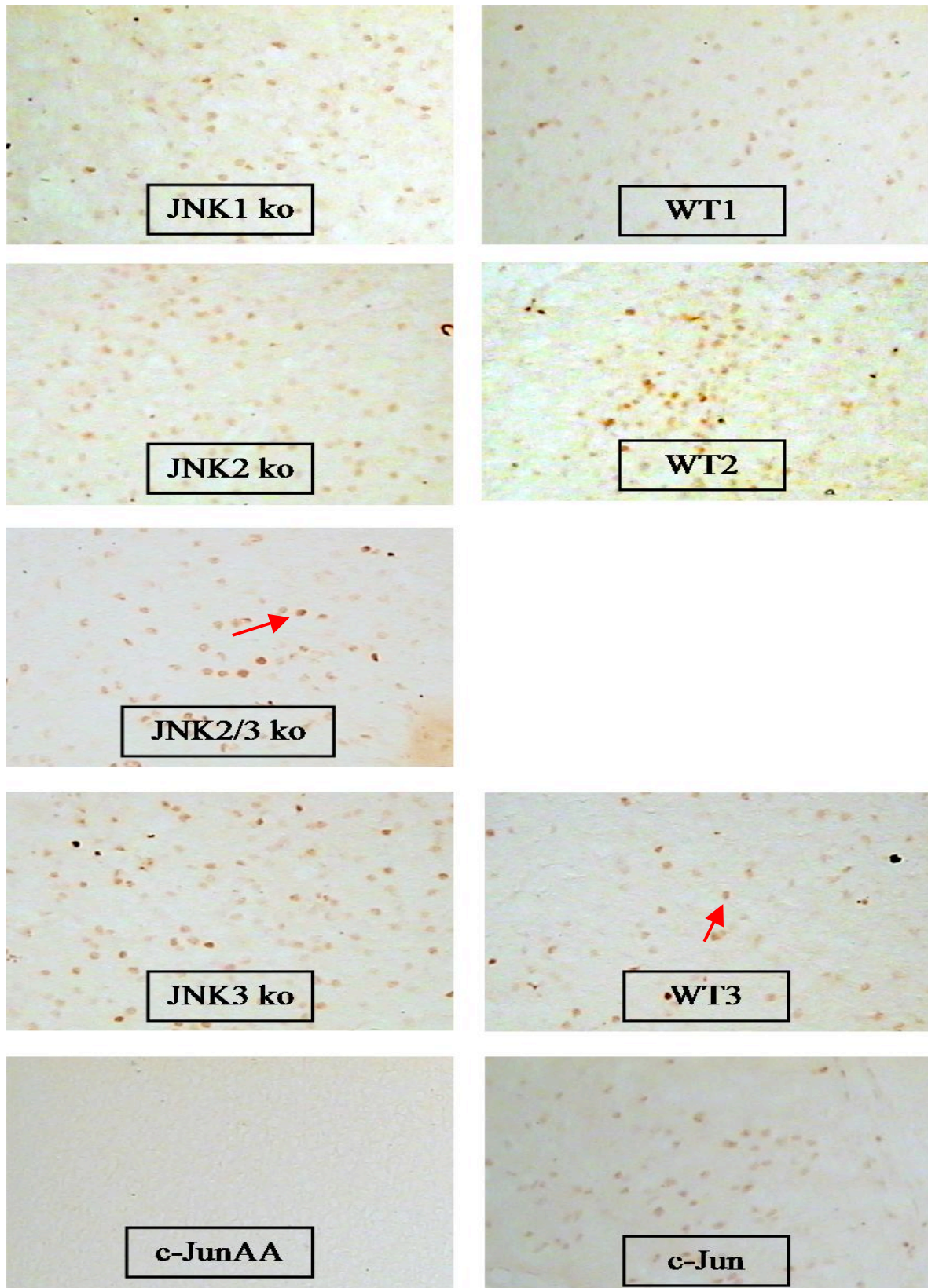


Abbildung 9 phospho-c-Jun-Färbung in JNK ko und Wildtypkontrollen

Die roten Pfeile markieren exemplarisch angefärbte Zellen. Zeitpunkt 3 Tage nach MCAO. 50-fache Vergrößerung.

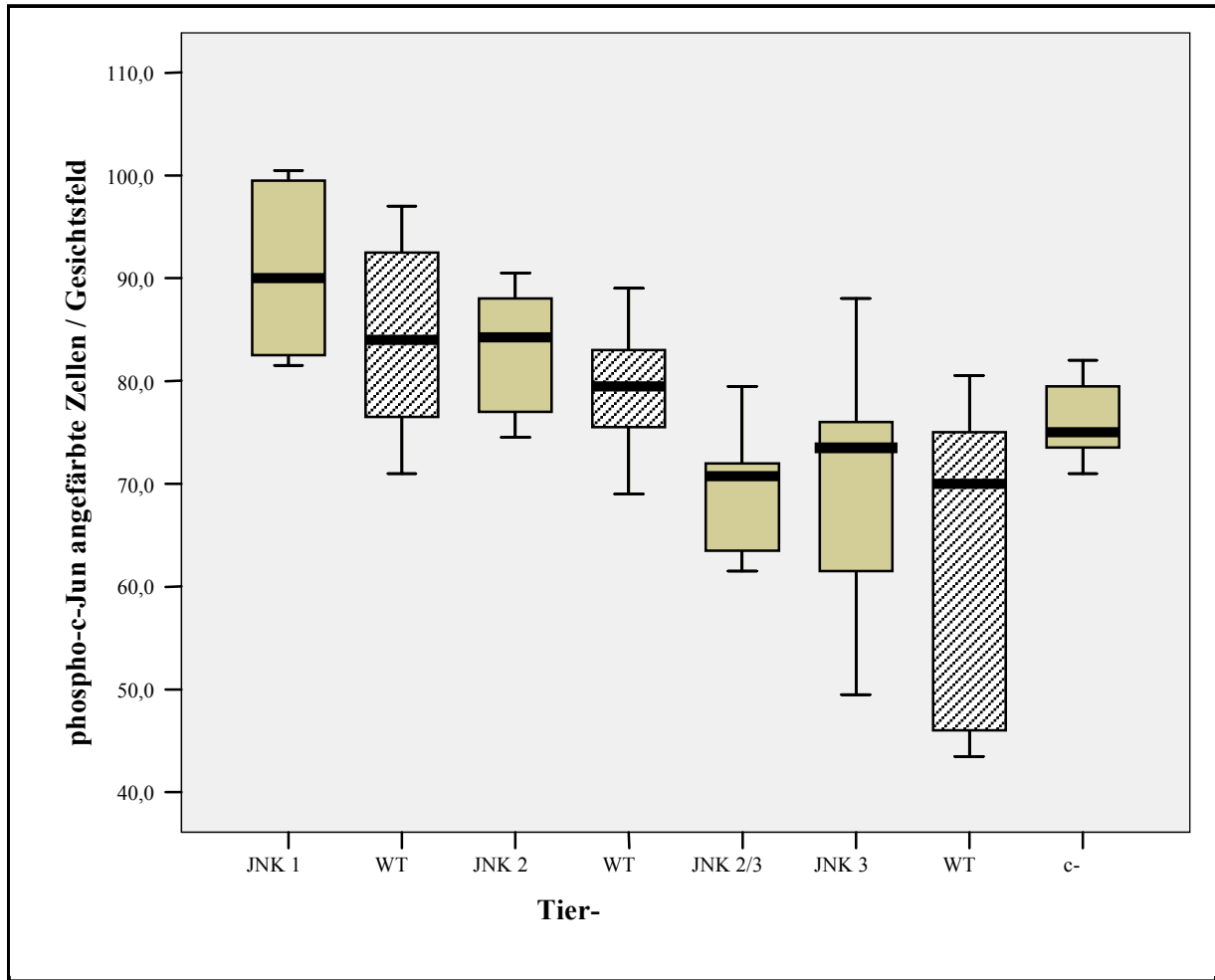


Abbildung 10 phospho-c-Jun-Aktivierung

Zahl von Zellkernen mit phospho-c-Jun-Immunreaktion in der Penumbra von JNK ko und Wildtypkontrollen 72 h nach MCAO. Die einzelnen Werte liegen innerhalb des grau hinterlegten Balkens. Angabe der Mittelwerte (—) \pm SD. Schraffierte Felder = Wildtypen, graue Felder = JNK knockout-Mäuse.

3.4 Aktivierung der Mikroglia nach pMCAO

Nun wurde mittels immunhistochemischer Anfärbung mit dem ED1-Antikörper (s. 2.11) die Aktivierung der Mikroglia drei Tage nach pMCAO untersucht (Abb. 12).

In dieser Reihe von Experimenten wurde der Aktivitätsgrad bzw. das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung 3 Tage nach pMCAO mittels immunhistologischer Anfärbung untersucht. Bei diesem Zelltyp handelt es sich um die sogenannten „Gewebsmakrophagen des Gehirns“. Sie stammen von den Blutmonozyten ab und wandern während der fetalen Entwicklung in das Gehirn ein und haben neben einer phagozytotischen Aktivität auch immunologische Aufgaben inne.

Die Mikroglia durchläuft während ihrer Aktivierung einen morphologischen Wandel. Im Ruhezustand liegt ein verkleinerter Zellkörper mit mehreren teilweise stark nach distal verzweigten Zellfortsätzen (sog. Ramifizierung). Bei der Aktivierung kommt es zu einer Zunahme des Zellkörpers, einer Verdickung der proximalen und einer Abnahme der distalen Zellfortsätze (Abb. 12).

Die bei diesen Versuchen verwendete immunhistochemische Färbung erlaubt keine Unterscheidung zwischen Mikrogliazellen und eingewanderten Makrophagen. Normalerweise verhindert die Blut-Hirn-Schranke das Einwandern von Blutmonozyten in das Gehirn. Nach bestimmten Traumata oder Parenchymschädigungen, wie z. B. der MCAO, wird die Blut-Hirn-Schranke aber permeabel für Blutmonozyten, die sie somit passieren und sich im Hirnparenchym zu Makrophagen umwandeln. Aufgrund des entwicklungsgeschichtlich gleichen Ursprungs gibt es bislang keinen bekannten Antikörper, der zwischen Mikroglia und eingewanderten Makrophagen unterscheidet.

In dem hier gewählten Zeitabstand von 72 Stunden zwischen pMCAO und transkardialer Perfusion ist die Einwanderung von Blutmonozyten in das untersuchte Hirnareal durchaus möglich.

3.4.1 Basale Mikrogliaaktivierung

Unter basalen Bedingungen wurden durch die Färbung im unbehandelten Kortex nur einzelne in der morphologisch aktiven Form sichtbare Mikrogliazellen angefärbt (Abb. 11).

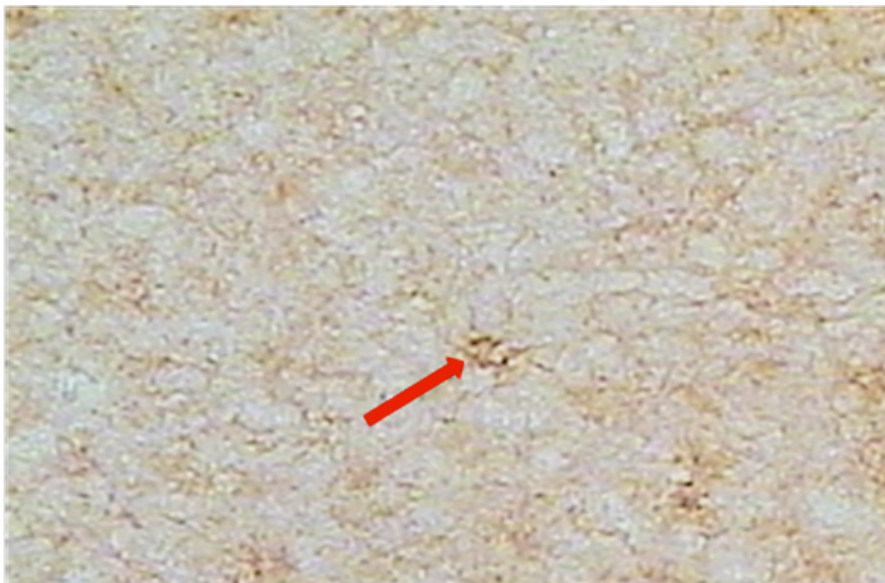


Abbildung 11 Mikrogliafärbung

ED1-Färbung (Pfeil) im Cortex eines unbehandelten WT2 Tieres. Vergrößerung 50-fach.

3.4.2 Mikrogliaaktivierung drei Tage nach pMCAO

Bei der hier angefärbten Mikroglia handelt es sich um die morphologisch aktivierte Form drei Tage nach MCAO.

Es zeigt sich beim WT1 (34 ± 1 ZpG) im Vergleich zum JNK1 ko (29 ± 1 ZpG; Abb. 12 und 13) eine signifikant stärkere Mikrogliaaktivität ($p < 0,05$). Diese Beobachtung ist vor dem Hintergrund interessant, dass die Tiergruppe WT1 ein geringeres Infarktvolumen aufwies als die dazugehörige knockout Gruppe.

Des Weiteren zeigte sich bei dieser Untersuchung eine ebenfalls signifikant stärkere Mikrogliaaktivierung bei dem WT3 (34 ± 2 ZpG) im Vergleich zum JNK3 ko (30 ± 3 ZpG; $p < 0,05$; Abb. 12 und 13). Der JNK2/3 ko (33 ± 4 ZpG vs. $32 \pm 3/34 \pm 2$ ZpG) zeigte ebenso wie c-JunAA (32 ± 2 ZpG vs. 32 ± 3 ZpG) eine gleichstarke Mikrogliaaktivierung wie die Kontrollgruppen WT2/WT3 bzw. c-Jun. Im JNK2 ko (35 ± 3 ZpG) war die stärkere Aktivierung der Mikroglia verglichen mit WT2 (32 ± 2) ohne statistische Signifikanz ($p < 0,18$; Abb. 12 und 13). Es stellt sich aufgrund dieser Ergebnisse die Frage, ob eventuell die Aktivierung der Mikroglia eine mögliche Rolle dabei spielt, dass es bei dem WT1 im Vergleich zum JNK1 ko zu einem geringeren Infarktvolumen gekommen ist. Diese Frage wird in der Diskussion erörtert.

Die jeweiligen Wildtypgruppen zeigten eine vergleichbare Aktivierung der Mikroglia (Abb. 12 und 13).

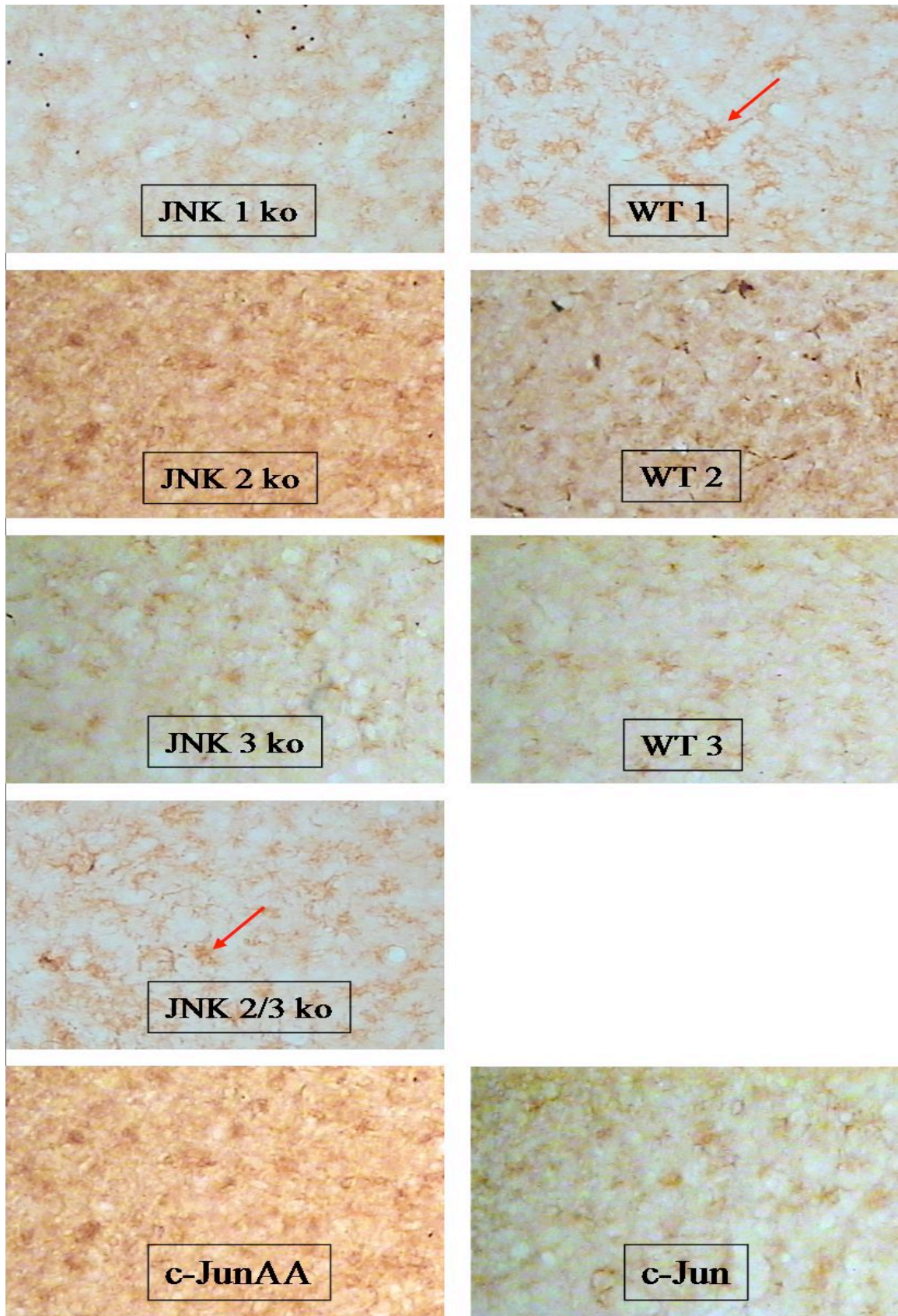


Abbildung 12 Mikrogliafärbung 72 h nach MCAO

Anfärbung aus der Penumbra. Die roten Pfeile markieren exemplarisch ED1-positive Zellen. 50-fache Vergrößerung.

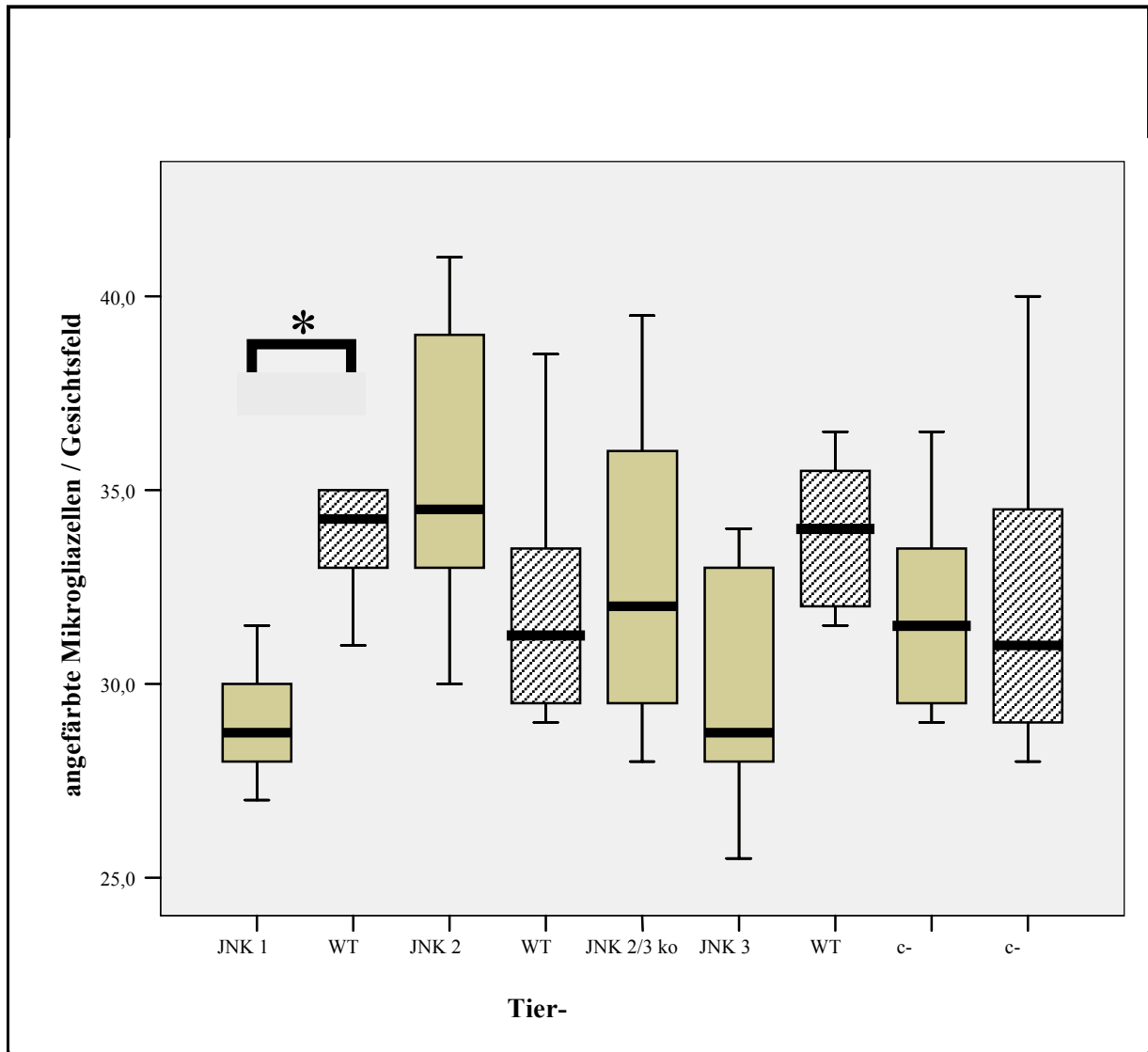


Abbildung 13 Mikrogliaaktivierung in JNK ko und Wildtypkontrollen nach 72h

Zahl von ED1-positiven Zellen in der Penumbra von JNK ko und Wildtypkontrollen 72 h nach MCAO. Die Werte aller Tiere (Zellen pro Gesichtsfeld) einer Gruppe liegen innerhalb des grau hinterlegten Balkens. Angabe der Mittelwerte (—) \pm SD. * Statistische Signifikanz zwischen 2 Gruppen ($p < 0,05$). Schraffierte Felder = Wildtypen, graue Felder = JNK knock-out-Mäuse.

4 Diskussion

4.1.1 Das Operationsmodell

Für die cerebrale Ischämie existieren viele verschiedene Modelle (Lipton et al. 1998, McAuley 1995). Sie werden generell nach zwei Gesichtspunkten unterschieden: zum einen nach der Größe und Lokalisation der Gewebsschädigung (fokal versus global), zum anderen nach der Dauer der Ischämie (transient versus permanent). Bei der Auswahl eines experimentellen Modells der cerebralen Ischämie muss natürlich das Ziel bzw. die experimentelle Fragestellung berücksichtigt werden. Da es in der vorliegenden Arbeit um die weitere Aufschlüsselung der Funktion der c-Jun N-terminalen Kinasen in der cerebralen Ischämie geht und in diesem Zusammenhang die genaue Infarktgröße im Gruppenvergleich eine wichtige Rolle spielt, wurde sich für die permanente MCAO („middle cerebral artery occlusion“) durch direkten und permanenten Gefäßverschluss mittels Elektrokoagulation als Tiermodell entschieden. Hier wird operativ durch eine Kraniotomie und Elektrokoagulation mittels eines Elektrokauters die MCA in ihrer Endstrecke verschlossen. Diese Methode besitzt den Vorteil, dass im Vergleich zu anderen Operationsmodellen hier unter Sicht durch das Operationsmikroskop das Gefäß verschlossen wird. Bei der Fadenokklusionsmethode zum Beispiel, einem indirekten Verschlussmodell, in dem über die A. carotis ein Faden bis zur MCA vorgeschoben wird und so das Gefäß im Abgangsbereich verschließen soll, kann postoperativ keine sichere Aussage über den vollständigen Verschluss der MCA gemacht werden.

Bei der pMCAO-Operationsmethode kann hingegen, da es sich um ein direktes Verfahren zum Gefäßverschluss handelt, sofort eine Aussage über den Erfolg der Operation gemacht werden. Durch den Verschluss der Endstrecke der MCA kommt es nur im Endbereich ihres Versorgungsgebietes zum Infarkt. Es handelt sich also nur um einen kortikalen Defekt. Andere Hirnregionen werden nicht betroffen. Außerdem kann es hier im Vergleich zum Fadenokklusionsmodell nicht zu einer Verletzung anderer Versorgungsgefäße beim Vorschieben des Fadens kommen, was eine weitere schwere Komplikation des Eingriffs bedeuten kann. Insgesamt sind bei dem hier angewendeten Operationsmodell die postoperative Komplikationsrate und Mortalität im Vergleich zu anderen experimentellen Verfahren geringer (siehe auch 2.5.8).

Ein Nachteil dieses Verfahrens ist natürlich, dass es durch eine anatomische Variation innerhalb der Tiergruppen zu einer Aufzweigung der Arterie an unterschiedlichen Stellen kommen kann oder zu einem unterschiedlich ausgeprägten Versorgungsgebiet der Äste. Makroskopisch wurden, wie schon erwähnt, keine Unterschiede im anatomischen Verlauf der großen Gefäße beobachtet (siehe auch 3.1.1). Allerdings reicht schon ein Unterschied von durch das Mikroskop nicht sichtbaren $0,1 \mu\text{m}$ im Gefäßdurchmesser aus, um die Größe des

mit Blut versorgten Hirngebietes signifikant zu verändern (McAuley, 1995; Endres et al., 2002). Das Problem der anatomischen Variation besteht aber unabhängig von der Operationmethode bei tierexperimentellen Versuchen und kann nicht vollständig beseitigt werden.

Eine andere Variable ist das Ausmaß des Eingriffes. Durch die Kraniotomie und die weiteren Operationsschritte werden die Tiere einem großen Stress ausgesetzt. Dadurch sind aber die Vergleiche der Ergebnisse innerhalb der Tiergruppen nicht gefährdet, da alle einem ähnlichen Stresspotential ausgesetzt waren.

4.1.2 Mögliche Einflussfaktoren auf die Ergebnisse

Bei dem Versuchsaufbau wurde, soweit es möglich war, darauf geachtet, für alle Tiere die gleichen äußeren Bedingungen zu schaffen. So wurden z. B. die Operation und die transkardiale Perfusion immer zur gleichen Tageszeit durchgeführt, um vorhandene tageszeitliche Schwankungen des Hormonsystems auszugleichen. Trotzdem gibt es bestimmte endogene Faktoren, die einen Einfluss auf das Infarktvolumen und somit auf die Streubreite der Ergebnisse haben können.

Ein wichtiger Faktor mit großem Einfluss auf das Infarktvolumen ist die Körpertemperatur. Bereits seit den 70er Jahren ist der Zusammenhang zwischen Hyperthermie und Sauerstoffverbrauch bekannt. So nimmt bei einer Erhöhung der Körperkerntemperatur der durchschnittliche Sauerstoffverbrauch im Gehirn um 5-6 % pro Grad Celsius zu (Carlsson et al., 1976). Nach MCAO kommt es zu einer für ca. 24 Stunden andauernden Hyperthermie von 39-40 °C. Bei globalen Ischämie modellen wurde diese als Auswirkung der Sauerstoffunterversorgung auf das Temperaturregulationszentrum im Hypothalamus interpretiert. Später wurde gezeigt, dass die Hyperthermie auch bei fokalen Ischämie modellen wie dem hier angewendeten auftritt. Bei Aufrechterhaltung einer künstlichen Hyperthermie nach transienter MCAO für eine Stunde kam es sogar zu größeren Infarkten (Chen et al., 1991). Wurde die Hyperthermie physikalisch unterdrückt, verkleinerte sich der Infarkt signifikant (Reglodi et al., 2000). Allerdings handelte es sich, wie schon erwähnt, bei diesen Arbeiten um transiente Ischämie modelle.

Inwieweit die Körpertemperatur einen Einfluss auf das Infarktvolumen bei einem Modell der permanenten Ischämie hat, lässt sich nicht genau abschätzen, wobei der Mechanismus, der dem ganzen zugrunde liegt, leicht nachzuvollziehen ist.

Da es bei Hyperthermie zu einem gesteigerten Zellstoffwechsel kommt, wird durch ein Vermeiden der Temperaturerhöhung oder sogar durch das Hervorrufen einer Hypothermie der Zellstoffwechsel und somit der Sauerstoffverbrauch der Zellen verringert. Die künstliche Hypothermie ist ein anerkanntes Therapieverfahren bei der Behandlung des akuten ischämi-

schen Hirninfarktes beim Menschen. Durch die Drosselung des Sauerstoffverbrauches kann bei der transienten Ischämie im Infarkttrandgebiet wertvolle Zeit bis zur Wiederherstellung des regulären Blutflusses gewonnen werden und es kommt zu einem geringeren Infarktvolumen. Bei der pMCAO hilft die durch Hypothermie gewonnene Zeitspanne nicht, da es keinen regulären Blutfluss mehr geben wird.

Es ist also eher als unwahrscheinlich anzusehen, dass die Körperkerntemperatur bei der pMCAO einen großen Einfluss auf das Infarktvolumen hat.

Eine intra- und postoperative Temperaturüberwachung wurden hier nicht durchgeführt, es wurde allerdings eine konstante Außentemperatur von 24 °C gewährleistet.

Ein anderer Faktor mit großem Einfluss bei cerebralen Ischämie modellen ist der arterielle Blutdruck. Er verhält sich umgekehrt proportional zum Volumen des Infarktareals (Zhu et al., 1995). In vielen Studien am Tier und am Menschen konnte eine günstige Auswirkung einer milden arteriellen Hypertonie auf das Infarktvolumen gezeigt werden (Chileuitt et al., 1996). Auch hier erfolgte bei den Versuchstieren keine intra- und postoperative Überwachung des arteriellen Blutdruckes, der bei der Maus sehr schwierig zu bestimmen ist.

4.2 JNK Expression und Aktivierung

In den Westernblot Untersuchungen wurde die Spezifität der verwendeten Antisera für die einzelnen JNK Isoformen dargestellt, da es durch die Spezifität einer Isoform zu einer kompletten Abwesenheit des zu bestimmenden Antigens kam (Abb. 7). Somit wurde es möglich, den ungefähren Anteil der einzelnen JNK Isoformen an der Gesamtexpression und Aktivierung bzw. Phosphorylierung darzustellen.

4.2.1 Anteil der JNK Isoformen an der Gesamtexpression und -aktivierung von JNK im Kortex bei unbehandelten Tieren

JNK1 trat vor allem in der 46 kDa und nur schwach in der 54 kDa Isoform auf. JNK2 war zu gleichen Teilen in der 46 kDa und in der 54 kDa Isoform vertreten, JNK3 wiederum wurde verstärkt als 46 kDa und nur schwach als 54 kDa Isoform gebildet.

Somit konnten wir bestätigen, dass die 46 kDa JNK Proteine alle drei Isoformen zu ähnlichen Teilen beinhalteten, der Gesamt-Pool an 54 kDa Proteinen vornehmlich von JNK2 und nur zu geringen Anteilen von JNK1 und 3 gebildet wurde (Kuan et al. 2003).

Anhand der JNK ko Mäuse konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen JNK Isoformen zu verschiedenen Anteilen zum Gesamt-JNK-Pool beitrugen. Bei dem JNK2 ko verschwand das 54 kDa Signal völlig, bei dem Doppel knockout JNK2/3 war darüber hinaus

auch das 46 Da Signal stark abgeschwächt. Diese Beobachtung legt nahe, dass JNK1 nur einen mäßigen Beitrag zum Gesamt-JNK-Pool beiträgt und dass der überwiegende Anteil auf JNK2 und 3 zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen veröffentlichten Daten überein (Kuan et al., 2003) (Abb. 7, Tab. 9 und 10).

4.2.1.1 JNK1 als Hauptträger von phosphoryliertem JNK

Interessanterweise war JNK1 die Isoform mit dem Hauptanteil an phosphoryliertem JNK. Sie bildete also den größten Anteil der JNK in aktiviertem Zustand unter basalen Bedingungen. In scheinbarem Widerspruch dazu bildete JNK1 allerdings nur einen geringen Anteil des nicht phosphorylierten JNK-Pools (Abb. 7, Tab. 10).

Wie in der Einleitung bereits erwähnt (vgl. 1.5.1) gibt es viele Hinweise, dass die JNK neben neurodegenerativen auch neuroregenerative Funktionen haben (Übersicht bei Waetzig et al., 2006; Waetzig und Herdegen, 2005). So ist JNK1 neben JNK2 essentiell für die embryonale Entwicklung (Sabapathy et al., 1999; Kuan et al., 1999). Der Doppel knockout JNK1/2 erwies sich als nicht lebensfähig, da am 11. Tag der embryonalen Entwicklung das Neuralrohr nicht verschlossen wurde (Sabapathy et al., 1999). Gleichzeitig wurde bei diesen Embryonen eine apoptotische Dysregulation festgestellt: die dem Schluss des Neuralrohres vorausgehende durch JNK1 und JNK2 getriggerte Apoptose blieb aus. Außerdem wurde parallel eine verstärkte Apoptose im Vorderhirn beobachtet (Kuan et al., 1999). Die Kombination JNK1 und JNK2 hat also gleichzeitig pro- und antiapoptotische Effekte.

Auch im adulten Gehirn spielt JNK1 eine wichtige physiologische Rolle, so z. B. bei der Migration von Gliazellen und bei der Stabilisierung von Mikrotubuli. JNK1 ist ein essentieller Bestandteil für die funktionelle Stabilität von SCG10, einem neuralspezifischen und wachstumsassoziierten Protein, welches sowohl beim Neuritenwachstum als auch bei der neuronalen Migration ein unverzichtbarer Bestandteil ist (Tararuk et al., 2006). Typischerweise kann es deshalb beim Fehlen von JNK1 zu verminderten Migrationseigenschaften von Zellen oder zu Abweichungen im Aufbau des Gehirns kommen. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnte bei dem knockout von JNK1 im Vergleich zu anderen Wildtyp- und knockout Gruppen das Fehlen der vorderen Kommissur (Chang et al., 2003) bestätigt werden.

Die hier beobachtete geringe Menge von JNK1 im adulten Mäusegehirn steht im Gegensatz zu seiner hohen Dichte bei neugeborenen Ratten (Chang et al., 2003; Carboni et al., 1998; Carboni et al., 1997). Diese Diskrepanz unterstreicht die Vermutungen und bisherigen Beobachtungen, dass JNK1 neben seiner Funktion im adulten Mäusegehirn auch einen Schwerpunkt bei der physiologisch stattfindenden neuronalen Differenzierung und Entwicklung hat.

Es ist also anzunehmen, dass die hohe Aktivität von phosphoryliertem JNK1 bei den unbehandelten Tieren mit einer physiologischen Funktion im Gehirn zusammenhängt (Coffey et al., 2002; Lee et al., 1999; Mielke et al., 1999).

4.2.1.2 JNK2 als Hauptträger von nicht phosphoryliertem JNK

Nach den Ergebnissen der Western Blot Untersuchungen lieferte JNK2 den Hauptanteil an nicht phosphoryliertem JNK, da das Gesamt-JNK-Signal bei diesem knockout bei 54 kDa komplett und bei 46 kDa deutlich aufgehoben war. Allerdings fiel der Anteil von JNK2 an phosphoryliertem JNK geringer aus: Er lag zwischen dem von JNK1 und JNK3 (Abb. 7, Tab. 9).

Diese Ergebnisse bestätigen die nachgewiesenen physiologischen Funktionen von JNK2. Es ist z. B. für die koordinierte Differenzierung und Aktivierung von Gehirnzellen notwendig (Yang et al., 1998). Außerdem ist es für die zusammen mit JNK1 im Rahmen der embryonalen Entwicklung für die Auslösung einer programmierten Apoptose notwendig, wie bereits unter 4.2.1.1 beschrieben (Sabapathy et al., 1999; Kuan et al., 1999).

4.2.1.3 Geringer Anteil von JNK3 am Gesamt-JNK-Pool – Anzeichen einer pathologisch geprägten Funktion?

Bei dem knockout von JNK3 entsprach die Aktivität von phosphoryliertem JNK im Gegensatz zu der beim JNK1 derjenigen bei den Wildtypen, was auf einen vernachlässigbaren Beitrag von JNK3 zum Gesamtpool des phosphorylierten JNK schließen lässt (Abb. 7, Tab. 9 und 10).

JNK3 wird neben dem Herz, dem endokrinen Pankreas und den Hoden vor allem im Gehirn gebildet (Widmann et al., 1999; Ip und Davis, 1998). Neben der vernachlässigbaren Menge an phosphoryliertem JNK3 (Abb. 7, Tab. 9 und 10) war aber auch die Menge von unphosphoryliertem JNK3 gering, was an einem nur leicht abgeschwächten Gesamt-JNK-Signal beim JNK3 ko sichtbar war. JNK2 bildete demnach den größten Anteil. Allerdings war bei dem JNK3 ko eine leicht erhöhte JNK2-Aktivität nachweisbar. Es erweckt den Eindruck, dass diese verstärkte JNK2-Anwesenheit das Fehlen von JNK3 kompensierte (Coffey et al., 2002; Hunot et al., 2004). Beide haben sowohl physiologische als auch degenerative bzw. apoptotische Funktionen (Übersicht bei Waetzig et al., 2006; Waetzig und Herdegen, 2004 und 2005). So ist JNK3 wichtig für Gliederung und den Strukturaufbau von Neuriten in PC12-Zellen nach Stimulation mit NGF (nerve growth factor) (Waetzig et al., 2006).

Es gibt außerdem einen beschriebenen klinischen Fall, in dem eine autosomal-rezessive Mutation im JNK3-Gen zu einer ausgeprägten pharmakoresistenten epileptischen

Enzephalopathie mit schweren neurologischen Entwicklungsstörungen führt (Shoichet et al., 2005). Diese beiden untersuchten Phänomene deuten auf eine wichtige Rolle von JNK3 bei der Entwicklung des Gehirns hin.

4.2.2 Veränderung der JNK-Expression und -Aktivierung 24 Stunden nach MCAO

Wie veränderte sich die JNK-Expression nun 24 Stunden nach permanenter MCAO? Zur weiteren Bestimmung wurden die Proben aus drei Arealen gewonnen: dem zentralen Infarktgebiet, der Penumbra sowie aus dem gesunden kontralateralen Kortex.

Im Vergleich zu den basalen Werten nahm phosphoryliertes JNK im kontralateralen Kortex zu. Dieses zeigte auch eine 54 kDa Bande, die bei unbehandelten Tieren nicht sichtbar war. Bei dem JNK3 ko und bei dem JNK2/3 ko war diese abgeschwächt, was auf einen stärkeren Beitrag von JNK3 zum phosphorylierten JNK hindeutet. Diese Aktivierung kann durch interhemisphärische Impulsübertragung via Axon-Kollateralen verursacht werden.

Ein ähnlicher Effekt wurde bereits in einem Modell der transienten MCAO über 90 Min. beobachtet (Herdegen und Leah, 1998). Dort kam es nach Ischämie zu einem nachweisbaren Anstieg von c-Jun im kontralateralen Kortex.

Die erhöhte Gesamt-JNK-Aktivität in der Penumbra des JNK1 ko könnte auf eine kompensatorische Aktivierung der übrigen JNK Isoformen bei Fehlen der protektiven JNK1 Isoform hindeuten. Auf diesen Aspekt wird aber in dem nun folgenden Kapitel noch näher eingegangen.

In der zentralen Infarktregion zeigt sich analog zu den Ergebnissen in der Penumbra beim JNK2 ko und JNK2/3 ko eine verminderte Gesamt-JNK-Aktivität. Außerdem wurde bei diesen beiden Gruppen eine Zunahme von JNK1 beobachtet. Das könnte als kompensatorische Antwort einer „protektiven“ JNK1 Isoform gewertet werden (Abb. 8 B und C, Tab. 11).

4.3 Beteiligung der einzelnen JNK Isoformen bei der ischämieinduzierten Neurodegeneration

4.3.1 Rolle von JNK1 und JNK3 bei ischämischer Pathologie

Bei dem JNK1 ko war die Infarktgröße statistisch signifikant ($p < 0,01$) um 50 % gegenüber der Wildtiergruppe erhöht (Abb. 4 und 5). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass JNK1 in der cerebralen Ischämie eine protektive Rolle zukommt.

Im unbehandelten adulten Mäusegehirn herrscht eine hohe basale JNK1-Aktivität (Abb. 7, Tab. 9 und 10). JNK1 hat dort physiologische Aufgaben in der Zelle inne (siehe auch

4.2.1.1). Sind diese Aufgaben auch protektiver Natur? In der Literatur sind bereits einige dieser Funktionen beschrieben. So kann aktiviertes JNK1 eine zelluläre Protektion durch Aktivierung des antiapoptotischen XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) vermitteln (Sanna et al., 2002). Des Weiteren induziert es die Expression von Hitzeschockproteinen wie HSP27 und kann damit den durch JNK induzierten neuronalen Zelltod verhindern (Nakagomi et al., 2003).

Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung von JNK3 bei ischämieinduzierter Neurodegeneration. In Studien wurde eine proapoptotische Rolle von JNK3 beschrieben. Bei der einen handelte es sich um ein kombiniertes Hypoxie-Ischämie-Modell bei einem Monat alten knockout Mäusen (Kuan et al., 2003). Die andere Studie bediente sich eines Modells der globalen Ischämie bei 250 - 300 g schweren Ratten (Tian et al., 2003). In der Studie von Kuan et al. zeigte der JNK3 ko einen Schutz vor durch Ischämie kombiniert mit Hypoxie verursachter Neurodegeneration. In der Studie von Tian et al. konnte eine starke JNK3-Aktivierung nach globaler Ischämie registriert werden. Bereits mit mehreren Modellen pathologischer Neurodegeneration wie kainat-induzierter Neurodegeneration, bei M. Alzheimer oder M. Parkinson wurde JNK3 als wichtiger Effektor assoziiert (Brecht et al., 2005; Harrington et al., 2002; Yang et al., 1997), so dass JNK3 hauptsächlich nur mit pathologischen Funktionen assoziiert wird. Diese Annahme konnte aber von mehreren Autoren widerlegt werden, die JNK3 auch als Effektor in physiologischen Zusammenhängen identifizierten (Übersicht bei Waetzig und Herdegen, 2005 und 2006).

In Kontrast zu diesen Studien wurde bei der hier vorgestellten Versuchsreihe keine protektive Wirkung beim JNK3 ko beobachtet (Abb. 4). Was ist die Ursache für diese Unterschiede? Vergleicht man den Aufbau der Versuchsreihen, fallen dort mehrere Unterschiede auf: zum einen unterscheiden sich das kombinierte Hypoxie-Ischämie-Modell bei neonatalen Mäusen und das globale Ischämie-Modell bei Ratten gravierend von dem hier durchgeführten Modell der permanenten fokalen Ischämie bei adulten Mäusen (Shackelford und Yeh, 2001); zum anderen wurde bei der Studie von Kuan et al. das Überleben der Tiere gemessen, nicht aber das Infarktausmaß und die Infarktgröße.

Bei den hier durchgeführten Western-Blot-Untersuchungen wurde in der Penumbra von JNK1 ko eine erhöhte JNK3-Aktivität gemessen (Abb. 8C, Tab. 11). Mögli-

cherweise ist diese verstärkte Aktivität darauf zurückzuführen, dass JNK3 stärker zur ischämischen Pathologie beim JNK1 ko beiträgt.

Die Signalkaskade von JNK1 in der Ischämie kann außer über c-Jun auch über zytoplasmatische Effekte vermittelt werden, da JNK1 nur einen geringeren Einfluss auf nukleär gelegene Substrate in Neuronen (Coffey et al., 2002) und in der Mikroglia hat (Eminel et al., 2004).

4.3.2 JNK2 in der cerebralen Ischämie

JNK2 veränderte nicht das Infarkt volumen, was unter anderem an der relativ großen Streubreite der Gruppen lag (siehe 4.1.1).

JNK2 ist ein Enzym, welches unter physiologischen Bedingungen z. B. die koordinierte Differenzierung und Aktivierung von Gehirnzellen realisiert (Yang et al., 1998). Außerdem ist es zusammen mit JNK1 für die im Rahmen der embryonalen Entwicklung stattfindende Auslösung einer programmierten Apoptose notwendig (Kuan et al., 1999) (siehe auch 4.2.2).

Bei schädigenden Stimuli ist bislang ein zytoprotektiver Effekt von JNK2 nach Applikation von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) beschrieben. Im in vitro Experiment mit PC12-Zellen verminderte die Transfektion mit dominant-negativem JNK2 den Zelltod und es gingen 60 % weniger Zellen zugrunde (Eminel et al., 2004).

Bei der cerebralen Ischämie gibt es bislang keinen Hinweis auf eine Beteiligung von JNK2 zum pathologischen Geschehen. Auch in anderen Arbeiten bezüglich der Rolle der c-Jun N-terminalen Kinasen bei ischämischer Pathologie konnte eine Rolle von JNK2 bislang nicht nachgewiesen werden bzw. wurde in diesem Zusammenhang als eher unwahrscheinlich angesehen (Kuan et al., 2003).

Lediglich in einem Ischämiemodell an Kardiomyozyten von Mäusen ist ein zytoprotektiver Effekt beim JNK1 ko und JNK2 ko beschrieben (Kaiser et al., 2005). Allerdings handelt es sich hierbei um einen anderen Zelltypus.

4.3.3 Der Doppel knockout JNK2+3 in der cerebralen Ischämie

Die JNK2/3 Doppel knockouts veränderten das Infarkt volumen nicht signifikant.

Wie bereits in den beiden vorhergehenden Abschnitten beschrieben, bedarf es hier noch weiterer Erforschung der Funktion in physiologischem und pathophysiologischem Zusammenhang. Diesbezüglich konnten bei der hier angewendeten Versuchsanordnung keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden.

4.3.4 Die c-JunAA-Mutation

Bei JunAA-Mäusen, in denen die Aminosäuren Serin an der Position 63 und 73 durch Alanin ersetzt wurden, und bei der entsprechenden Kontrollgruppe kam es bei allerdings hoher Streubreite der Einzelwerte zu fast gleichen durchschnittlichen Infarkt volumina.

Das ist insofern ein interessantes Ergebnis, da c-Jun und dessen Aktivierung mittels N-terminaler Phosphorylierung der Serine an den Positionen 63 und 73 als wichtige Glieder in der Weiterleitung pathophysiologischer/zytotoxischer Reize wie z. B. bei cerebraler Ischämie identifiziert wurden. Eine weitere Betrachtung soll im Kapitel 4.4 bei der Diskussion der Rolle von c-Jun und dessen N-terminaler Phosphorylierung erfolgen.

4.3.5 Die Kontrollgruppen

Der teilweise deutliche Größenunterschied des durchschnittlichen Infarktvolumens (Abb. 4 und 6) zwischen den einzelnen Wildtyp-Gruppen lässt sich nicht erklären. Die Vorgehensweise bei der Züchtung der einzelnen Tierversuchsgruppen sollte die genetische Variabilität zwischen den einzelnen knockouts und den Wildtyp-Gruppen so gering wie möglich halten (siehe auch 1.6). Die unterschiedlichen Wildtypen sollten den gleichen genetischen Hintergrund haben und somit nach Ischämie die gleichen intrazellulären Vorgänge bieten.

4.4 Die Funktion von c-Jun

Der Transkriptionsfaktor c-Jun ist in eine Vielzahl von Vorgängen eingebunden. Dazu gehören sowohl physiologische und neuroregenerative als auch neurodegenerative und apoptotische Vorgänge (Übersicht bei Raivich et al., 2006; Herdegen und Waetzig, 2005).

Nach ischämischen Zuständen wurde eine starke Induktion von c-Jun sowie anderen Transkriptionsfaktoren wie z. B. Fos und IEGs (immediate early genes) beobachtet (Kindy et al., 1991; Woodburn et al., 1993; Herdegen et al., 1998).

Auf eine dominierende Rolle von c-Jun in der cerebralen Ischämie deutet die Beobachtung hin, dass es bei einem Modell der kurzzeitigen transienten Ischämie zu einer Induktion von c-Jun, nicht aber anderer Transkriptionsfaktoren kam.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, neue Einblicke in die Funktionen von c-Jun in der cerebralen Ischämie zu erlangen.

4.4.1 Die N-terminale Phosphorylierung von c-Jun – Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde N-terminal phosphoryliertes c-Jun (phospho-c-Jun) mittels immunhistochemischer Färbung beobachtet, da es die überwiegend durch die JNK aktivierte Form darstellt. Die phospho-c-Jun-Aktivität ist auch ein Indikator für die nukleäre JNK-Aktivität drei Tage nach pMCAO.

Neben der Untersuchung der Aktivierung einzelner JNK Isoformen im Verhältnis zum Gesamt-JNK-Pool sollten so Rückschlüsse auf den Zusammenhang der c-Jun-Phosphorylierung geschlossen werden. JNK2 z. B. hat eine 25-fach höhere Affinität zu c-Jun als JNK1 (Kallunki et al., 1994).

Es kam in dieser Versuchsreihe zu keinem signifikanten Unterschied in der c-Jun-Phosphorylierung zwischen den Gruppen. In anderen Berichten wurde bei den JNK2 und/oder JNK3 knockout Mäusen eine verminderte c-Jun-Phosphorylierung beobachtet (Yang et al., 1997; Coffey et al., 2002; Kuan et al., 2003; Hunot et al., 2004).

Wie erklären sich diese Unterschiede? Eine mögliche Erklärung liegt in der Verwendung der Antikörper gegen phospho-c-Jun. Der in dieser Versuchsreihe verwendete Antikörper war gegen das phosphorylierte Serin an Position 63 gerichtet, während in anderen Veröffentlichungen ein gegen das phosphorylierte Serin an Position 73 gerichteter Antikörper verwendet wurde (Yang et al., 1997; Hunot et al., 2004). Dies ist sehr relevant, da beide Serinreste unabhängig voneinander von JNK phosphoryliert werden können.

Als Beweis der Spezifität des verwendeten Antiserums zeigten JunAA-Tiere kein phospho-c-Jun-Signal (Abb. 10).

4.5 Mikroglia

4.5.1 JNK Expression

Die Mikroglia stellt einen Teil des peripheren Immunsystems dar, welcher viele immunologische Funktionen wahrnimmt und die Fähigkeit zur Phagozytose besitzt. Nach pMCAO kam es in unseren Experimenten zu einem teilweise signifikanten Unterschied bei

der Mikrogliaaktivierung zwischen den knockout Gruppen und den korrespondierenden Wildtieren. Welche Faktoren können für diesen Unterschied verantwortlich sein?

Im Gegensatz zu den Nervenzellen sind die Funktionen der JNK in der Mikroglia weniger bekannt. Im peripheren Immunsystem sind JNK u.a an der Regulation von Immunantworten wie z. B. der Proliferation von T-Lymphozyten beteiligt (Arbor et al., 2002; Conze et al., 2002). Im experimentellen Versuch an Rattenmikroglia konnten alle drei JNK Isoformen nachgewiesen werden (Hidding et al., 2002; Waetzig et al., 2005). Es gibt mindestens zwei mögliche Angriffspunkte für JNK zur Veränderung der Mikrogliafunktion, auf welche im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

4.5.1.1 Rolle der JNK bei der Mikrogliaaktivierung.

Bei der Aktivierung durchlaufen Mikrogliazellen umfangreiche morphologische Veränderungen. Es kommt zu einer Größenzunahme des Zellkörpers, einer Zunahme des Durchmessers der proximalen Zellfortsätze und einer Abnahme der distalen Fortsätze sowie deren Verzweigungen. Daraus resultieren die Migrationsfähigkeit der Zellen sowie ihre Fähigkeit zur Phagozytose (Amantea et al., 2009; Kaur et al., 2009).

Bei in vitro Experimenten an Mikroglia-Zellkulturen des neonatalen Rattengehirns reduzierte der JNK-Inhibitor SP600125 die Größenzunahme um 28 % (Waetzig et al., 2005). Allerdings scheinen die JNK an der morphologischen Differenzierung nur einen kleineren Anteil zu haben, da in der gleichen Versuchsreihe bei der Hemmung der beiden anderen mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPKS) ERK1/2 und p38 α eine wesentlich stärkere Größenminderung erreicht werden konnte.

Möglicherweise resultiert die Größenminderung aus einer Störung der Zytoskelettfunktion. Es ist nachgewiesen, dass JNK wichtige Funktionen bei den Regulations- und Kontrollmechanismen des Zytoskeletts innehaben (Oliva et al., 2006; Eminel et al., 2008). Allerdings ist der Nachweis dieser Funktionen bislang nur in Nervenzellen erfolgt. Möglicherweise gelten ähnliche Funktionen auch in Mikrogliazellen. So ist JNK1 in Nervenzellen für die Aufrechterhaltung der zytoskelettalen Integrität mitverantwortlich (Brecht et al., 2005; Coffey et al., 2000; Yang et al., 1997). Aus diesem Grund wird bei JNK1 ko Mäusen eine vermehrte Degeneration von langen Nervenfasern beobachtet sowie ein Verlust der Integrität von Mikrotubuli in Dendriten. Außerdem sind JNK1 und JNK3 notwendig für die Stabilität von Mikrotubuli (Tararuk et al., 2006). Gelten ähnliche Funktionen auch für Mikrogliazellen, könnte dies eine mögliche Erklärung für die signifikant verminderte Mikrogliaaktivierung nach pMCAO in den hier durchgeführten Versuchsreihen bei den knockouts von JNK1 und JNK3 liefern.

Eine weitere Funktion von JNK betrifft die Zellmigration, wobei sich die Beobachtungen auch hier bisher ausschließlich auf Nervenzellen beziehen. So ist JNK1 essentiell für die funktionale Integrität des neuralspezifischen und wachstumsassoziierten Proteins SCG10 (Tarraruk et al., 2006), welches sowohl für neuronales Wachstum als auch für neuronale Migration wichtig ist. Außerdem können die JNK durch Phosphorylierung von Zytoskelettproteinen wie DCX die Zellmigration verhindern (Reiner et al., 2004).

Alle diese genannten Funktionen der JNK finden wahrscheinlich nicht nur in Nervenzellen statt, sondern auch in der Mikroglia.

4.5.1.2 Rolle der JNK bei der metabolischen Aktivität von Mikroglia

Mikrogliazellen bilden und sezernieren eine Vielzahl von Produkten wie z. B. reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, Proteasen und proinflammatorische Zytokine.

Waetzig et al. befassten sich 2005 mit der Frage des Einflusses der JNK auf die metabolische Aktivität und die Expression der proinflammatorischen Zielgene. Sie zeigten, dass nach Aktivierung der JNK mittels LPS (Lipopolysaccharid) durch Zugabe von SP600125 die metabolische Aktivität um 51-66 % reduziert wurde. Außerdem kam es zu einer verminderten Expression der proinflammatorischen Zielgene Cox-2, IL-6, MCP-1 und TNF- α .

4.5.2 Überwiegen in der cerebralen Ischämie zytotoxische oder zytoprotektive Mikrogliaeffekte?

Bei den Ergebnissen dieser Arbeit bezüglich der Mikrogliaaktivierung fallen vor allem zwei Werte auf: sowohl bei dem JNK1 ko als auch bei dem JNK3 ko fanden sich signifikant weniger Mikrogliazellen als bei der jeweiligen Kontrollgruppe. Wie verhält sich die Zahl der aktivierten Mikrogliazellen zu der Infarktgröße der jeweiligen Tiergruppe? Haben die Änderungen der Mikrogliazellen einen Einfluss auf die Infarktgröße und wenn ja, ist er zytotoxischer oder zytoprotektiver Natur?

Die zytotoxische Funktion der Mikroglia reicht von der Freisetzung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen über die Synthese von Proteasen bis hin zur Phagozytose. Zu den zytoprotektiven Funktionen zählen z. B. die Bildung der beiden Wachstumsfaktoren BDNF (brain-derived neurotrophic factor) und GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor). Ihre Freisetzung wurde einem mechanischen Trauma im Striatum beobachtet, wo sie das Wachstum der geschädigten Neurone fördern sollen (Batchelor et al., 1999).

Des Weiteren muss bei der Betrachtung der Ergebnisse auch die nachgewiesene enzymatische Funktion von JNK in Mikrogliazellen bei morphologischer Veränderung, metabo-

lischer Aktivität und Sekretion proinflammatorischer Zytokine beachtet werden (Waetzig et al., 2005).

Bei dem JNK3 ko und der entsprechenden Kontrollgruppe gab es keinen signifikanten Unterschied in der Infarktgröße. So scheint die Mikroglia trotz der unterschiedlichen Ergebnisse bei der Anfärbung in den beiden Tiergruppen keinen Einfluss auf die Infarktgröße zu haben. Womöglich resultierte die verminderte Mikrogliaaktivität beim JNK3 ko aus der mangelhaften Mikrotubulistabilität.

Bei dem JNK1 ko sah man interessanterweise bei einer gegenüber der Kontrollgruppe geringeren Mikrogliaanfärbung eine deutlich größere durchschnittliche Infarktgröße. Dies kann zwei mögliche Ursachen haben:

1. Bei der geringeren Mikrogliaaktivierung entfällt der neuroprotektive Effekt und es resultiert daraus ein größeres Infarktvolumen.
2. Die geringere Mikrogliaanfärbung ist das Resultat des Fehlens von JNK1 als ebenfalls wichtigem Enzym für die Aufrechterhaltung der zytoskelettalen Integrität und die größere durchschnittliche Infarktgröße der JNK1 ko Mäuse hat eine andere Ursache wie z. B. einen proapoptotischen Effekt von JNK1.

Gegen die Hypothese eines neuroprotektiven Effektes der Mikroglia spricht das gleiche Infarktvolumen bei den JNK3 ko Mäusen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Funktionen der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) beim ischämischen Hirninfarkt. Die Experimente erfolgten an knockout-Mäusen, in denen je eine oder zwei der drei vorkommenden JNK Isoformen genetisch inaktiviert wurden (JNK1 ko, JNK2 ko, JNK3 ko, JNK2/3 ko), sowie an einem Tierstamm mit einer c-Jun-Mutation, in der die Aminosäuren Serin an den Positionen 63 und 73 durch Alanin ersetzt wurden (c-JunAA). Als Kontrolle dienten genetisch verwandte Wildtypen (WT). Als Versuchsmodell wurde die permanente, fokale cerebrale Ischämie (pMCAO) angewendet. Dabei wird operativ die Schädeldecke der Maus eröffnet und die Endstrecke der linken A. cerebri media verschlossen. Nach 72 Stunden erfolgte die transkardiale Perfusion für morphologische und immunhistochemische Untersuchungen, nach 24 Stunden die Gewebeentnahme für Western Blot Untersuchungen.

Es wurde untersucht, welche Auswirkungen die Inaktivierung der JNK-Gene auf die Infarktgröße, die N-terminale Phosphorylierung von c-Jun und auf die Aktivierung der Mikroglia hat. Außerdem wurde mittels Western Blotting der Anteil der JNK Isoformen am Gesamt-JNK-Pool im Bereich der Infarktkernregion, dem Infarkttrandgebiet und dem kontralateralen Kortex vor und 24 Stunden nach pMCAO untersucht.

Bei der JNK1 knockout Gruppe war im Vergleich zu den Wildtypen das Infarktvolumen um 50 % signifikant erhöht. Bei den anderen Gruppen ergab sich für diesen Parameter kein signifikanter Unterschied. Die Western Blot Untersuchungen zeigten, dass unter basalen Bedingungen der Hauptanteil an phosphoryliertem JNK von JNK1 und der Hauptanteil an unphosphoryliertem JNK von JNK2 gebildet werden. Nach Ischämie kam es zu einer Zunahme der JNK-Phosphorylierung v.a. in der Infarktkernregion. Die Expression von JNK und die N-terminale Phosphorylierung von c-Jun wurden durch den JNK knockout nicht verändert. Die Anzahl von ED1-positiven Zellen als Marker der Mikroglia-Aktivierung war in JNK1 und JNK3 knockout Mäusen signifikant vermindert.

Diese Studie erbrachte Hinweise auf eine neuroprotektive Funktion von JNK1 nach cerebraler Ischämie, sowie für eine Rolle von JNK1 und JNK3 für die Mikroglia-Aktivierung.

Literaturverzeichnis

Amantea D, Nappi G, Bernadi G, Bagetta G, Corasaniti MT. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J.* 2009. 276: 13-26.

Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, Howells DW. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 1999. 19: 1708-1716.

Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, Bogousslavsky J, Bonny C. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nature Med.* 2003. 9: 1180-1186.

Brecht S, Kirchhof R, Chromik A, Willesem 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. Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *Eur. J. Neurosci.* 2005. 21: 363-377.

Bredesen DE. Neural apoptosis. *Ann Neurol.* 1995. 38: 839-851.

Carboni L, Tacconi S, Carletti R, Bettini E, Ferraguti F. Localization of the messenger RNA for the c-Jun NH₂-terminal kinase kinase in the adult and developing rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 1997. 80: 147-160.

Carboni L, Carletti R, Tacconi S, Corti C, Ferraguti F. Differential expression of SAPK isoforms in the rat brain. An in situ hybridization study in the adult rat brain and during post-natal development. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1998. 60: 57-68.

Carlsson C, Hägerdal M, Siesjö BK. The Effect of hyperthermia upon oxygen consumption and upon organic phosphates, glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids in rat cerebral cortex. *J. Neurochem* 1976. 26: 1001-1006.

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001. 410: 37-40.

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

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

Chen H, Chopp M, Welch KM. Effect of mild hyperthermia on the ischemic infarct volume after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology* 1991. 41: 1133-1135

Chileuitt L, Leber K, McCalden T, Weinstein PR. Induced hypertension during ischemia reduces infarct area after temporary middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Neurosci.* 1993. 118: 109-116.

Coffey ET, Hongisto V, Dickens M, Davis RJ, Courtney MJ. Dual roles for c-Jun N-terminal kinase in developmental and stress responses in cerebellar granule Neurons. *J. Neurosci.* 2000. 20: 7602-13.

Coffey ET, Smiciene G, Hongisto V, Cao J, Brecht S, Herdegen T, Courtney MJ. c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) 2/3 is specifically activated by stress, mediating c-Jun activation, in the presence of JNK1 activity in cerebellar neurons. *J. Neurosci.* 2002. 22: 4335-4345.

Conze D, Krahl T, Kennedy N, Weiss L, Lumsden J, Hess P, Flavell RA, Le Gros G, Davis RJ, Rincon M. c-Jun N-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have distinct roles in CD8(+) T cell activation. *J. Exp. Med.* 2002. 195: 811-823.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trend Neurosci* 1999. 22: 391-397.

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

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

Eminel S, Klettner A, Roemer L, Herdegen T, Waetzig V. JNK2 translocates to the mitochondria and mediates cytochrome c release in PC12 cells in response to 6-hydroxydopamine. *J. Biol. Chem* 2004. 279: 55385-55392.

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

Endres M, Kaps M, Moskowitz MA. Apoptosis and ischemic infarct. *Nervenarzt* 1998. 69(6): 459-464.

Endres M, Dirnagl U. Ischemia and stroke. *Adv Exp Med Biol.* 2002. 513: 455-473.

Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, Chen S, Chopp M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Ann. J. Pathol.* 1993. 142: 623-635.

Giasson BI, Mushynski WE. Study of proline-directed protein kinases involved in phosphorylation of the heavy neurofilament subunit. *J. Neurosci.* 1997. 17(24): 9466-72.

Giasson BI, Mushynski WE. Developmentally regulated stabilisation of neuronal intermediate filaments in rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 1997. 229 (2): 77-80.

Grehl H, Reinhardt F. *Checkliste Neurologie.* Thieme Verlag, Stuttgart. 4. Auflage. August 2008

Gupta S, Barrett T, Whitmarsch AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* 1996. 15: 2760-2770.

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

Herdegen T, Skene P, Bähr M. The c-Jun transcription factor – bipotential mediator of neuronal survival and regeneration. *Trends Neurosci.* 1997. 20: 227-231.

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

Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox and CREB/ATF proteins. *Brain Res. Mol. Brain Res. Rev.* 1998. 28: 370-490.

Herdegen T, Waetzig V. AP-1 proteins in the adult brain: facts and fiction about effectors of neuroprotection and neurodegeneration. *Oncogene* 2001. 20: 2424-2437.

Hidding U, Mielke K, Waetzig V, Brecht S, Hanisch U, Behrens A, Wagner E, Herdegen T. The c-Jun N-terminal kinases in cerebral microglia: immunological functions in the brain. *Biochem. Pharmacol.* 2002. 64(5-6): 781-8.

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

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

Lee JH, Jin H, Shim HE, Kim HN, Ha H, Lee ZH. Epigallocatechin-3-gallate inhibits osteoclastogenesis by down-regulating c-Fos expression and suppressing the nuclear factor-kappaB signal. *Mol Pharmacol.* 2010. 77: 17-25.

Kaiser RA, Liang Q, Bueno O, Huang Y, Lackey T, Klevitsky R, Hewett TE, Molkenin JD. Genetic Inhibition or activation of JNK1/2 protects the myocardium from ischemia-reperfusion-induced cell death in vivo. *J. Biol. Chem.* 2005. 280 (38): 32602-8.

Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Derijard B, Moore G, Davis RJ, Karin M. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes. Dev.* 1994. 8: 2996-3007.

Kallunki T, Deng T, Hibi M, Karin M. c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* 1996. 87: 929-939.

Kaur C, Ling EA. Periventricular white matter damage in the hypoxic neonatal brain: role of microglial cells. *Progr. Neurobiol.* 2009. 87: 264-280.

Kindy MS, Carney JP, Dempsey RJ, Carney JM. Ischemic induction of protooncogene expression in gerbil brain. *J. Mol. Neurosci.* 1991. 2 (4): 217-228.

Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. The JNK1 and JNK2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 1999. 22: 667-676.

Kuan CY, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ, Rakic P. A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003. 100: 15184-15189.

Lee JK, Park J, Lee YD, Lee SH, Han PL. Distinct localization of SAPK isoforms in neurons of adult mouse brain implies multiple signalling modes of SAPK pathway. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999. 70: 116-124.

Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 1999. 79: 1431-1568.

Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, Schenkel J, Herdegen T, Debatin KM. CD95 ligand (FAS-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-

inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J. Neurosci.* 1999. 19: 3809-3817

Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Cell Biol.* 2000. 1: 120-129.

McAuley MA. Rodent models of focal ischemia. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 1995. 7: 153-180.

Memezawa H, Smith ML, Siesjö BK. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1992. 23: 552-559.

Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 2004. 19(3-4): 151-167.

Mielke K, Brecht S, Dorst A, Herdegen T. Activity and expression of JNK1, p38 and ERK kinases, c-Jun N-terminal phosphorylation, and c-Jun promoter binding in the adult rat brain following kainate induced seizures. *Neurosci.* 1999. 91: 471-483.

Mummenthaler M, Mattle H. *Neurologie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart. August 2008

Nakagomi S, Suzuki Y, Namikawa K, Kiryu-Seo S, Kiyama H. Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation. *J. Neurosci.* 2003. 23: 5187-5196.

Okamoto M, Matsumoto M, Ohtsuki T, Taguchi A, Mikoshiba K, Yanagihara T, Kamada T. Internucleosomal DNA cleavage involved in ischemia-induced neuronal death. *Bochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. 196: 1356-1362.

Oliva AA, Atkins CM, Copenagle L, Banker GA. Activated c-Jun N-terminal kinase is required for axon formation. *JNEUROSCI.* 2006. 26: 9462-9470.

Poeck K, Hacke W. *Neurologie.* Springer Verlag, Berlin. 12. Auflage. Mai 2006

Pschyrembel W, de Gruyter W. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. De Gruyter Verlag, Berlin. 261. Auflage. September 2007

Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999. 30: 77-105.

Raivich G, Liu ZQ, Kloss CU, Labow M, Bluethmann H, Bohatschek M. Cytotoxic potential of proinflammatory cytokines: combined deletion of TNF receptors TNFR1 and TNFR2 prevents motoneuron cell death after facial axotomy in adult mouse. *Exp. Neurol.* 2002. 178: 186-193.

Raivich G, Bohatschek M, Da Costa C, Iwata O, Galiano M, Makwana M, Riera-Sans L, Wolfer DP, Lipp HP, Agguzi A, Wagner E, Behrens A. The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron* 2004. 43: 57-67.

Raivich G, Behrens A. Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, developing adult and injured brain. *P. Neurobiol.* 2006. 78: 347-363.

Reglodi D, Smogyvari-Vigh A, Maderdrut JL, Vigh S, Arimura A. Postischemic spontaneous hyperthermia and its effects in middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp. Neurol.* 2000. 163: 399-407.

Reiner O, Gdaljahu A, Gosh I, Levy T, Sapoznik S, Nir R, Sapir T. DCX's phosphorylation by not just another kinase (JNK). *Cell Cycle* 2004. 3 (6): 747-51.

Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF. Defective neuronal tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech. Dev.* 1999. 89: 115-124.

Sanna MG, da Silva Correia J, Luo Y, Chuang B, Palson LM, Nguyen B, Deveraux QL, Ulevitch RJ. ILPIP, a novel anti-apoptotic protein that enhances XIAP-mediated activation of JNK1 and protection against apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2002. 277: 30454-30462.

Shackelford DA & Yeh RY. Differential effects of ischemia and reperfusion on c-Jun N-terminal kinase isoform protein and activity. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2001. 94: 178-192.

Shoichet SA, Duprez L, Hagens O, Waetzig V, Menzel C, Herdegen T, Schweiger S, Dan B, Vamos E, Ropers HH, Kalscheuer VM. Truncation of the CNS-expressed JNK3 in a patient with a severe developmental epileptic encephalopathy. *Hum. Genet.* 2006. 118 (5): 559-67.

Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J. Neurosurg.* 1992. 77: 169-184.

Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog. Neurobiol.* 1998. 56: 149-171.

Tararuk T, Ostmann N, Li W, Bjorkblom B, Pazik A, Zdrojewska J, Hongisto V, Herdegen T, Konopka W, Courtney MJ, Coffey ET. JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *J. Cell Biol.* 2006.173: 265-277.

The National Institute of Neurological disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke *N. Engl. J. Med* 1995. 333: 1581-1587.

Tian H, Zhang G, Li H, Zhang Q. Antioxidant NAC and AMPA/KA receptor antagonist DNQX inhibited JNK3 activation following global ischemia in rat hippocampus. *Neurosci. Res.* 2003. 46: 191-197.

Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, Pinto A, Licata G. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr Pharm Des.* 2008. 14: 3574-89.

Waetzig V & Herdegen T. A single c-Jun N-terminal kinase isoform (JNK3-p54) is an effector in both neuronal differentiation and cell death. *J. Biol. Chem.* 2003. 278: 567-572.

Waetzig V & Herdegen T. Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Neurosci. Lett.* 2004. 361: 64-67.

Waetzig V & Herdegen T. Context-specific inhibition of JNKs: overcoming dilemma of protection and damage. *Trends Pharm. Sci.* 2005. 26: 455-461.

Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Brecht S, Lucius R, Herdegen T, Hanisch U. c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate inflammatory activation of microglia. *Glia* 2005. 50: 235-246.

Waetzig V, Zhao Y, Herdegen T. The bright side of JNKs – Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Prog. Neurobiol.* 2006. 80: 84-97.

Watson A, Eilers A, Lallemand D, Kyriakis F, Rubin LL, Ham J. Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 1998. 18: 751-762.

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

Woodburn VL, Hayward NJ, Poat JA, Woodruff GN, Hughes J. The effect of dizocilpine and enadoline on immediate early gene expression in the gerbil global ischemia model. *Neuropharmacology* 1993. 32 (10): 1047-1059.

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the JNK3 gene. *Nature* 1997. 389: 865-870

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

Zablocka B, Dluzniewska J, Zajak H, Domanska-Janik K. Opposite reaction of ERK and JNK in ischemia vulnerable and resistant regions of hippocampus: involvement of mitochondria. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2003. 110: 245-252.

Zhu CZ, Auer RN. Graded hypotension and MCA occlusion duration: effect in transient focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1995. 15: 980-88.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thomas Nicolaus
 Geburtsdatum/-ort: 15.07.1977 in Kiel
 Anschrift: Mittenwalder Str. 46, 10961 Berlin
 Telefon/Mobil: 030 5514 7392 / 0179 1137 141
 E-Mail: thomas.nicolaus@gmx.de

Schule und Zivildienst

08/1984-07/1988 Grundschule: Grund- und Hauptschule Kiel-Suchsdorf
 08/1988-06/1997 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife: Gymnasium Kronshagen
 07/1997-07/1998 Zivildienst: Johanniter-Unfallhilfe e.V. Kiel
 Pflege-/Hausnotrufdienst; Rettungs- und Sanitätsdienst

Studium

04/1999-03/2001 Vorklinisches Studium an der Justus-Liebig-Universität zu Gießen
 04/2001-03/2004 Klinisches Studium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 (1. und 2. klinischer Studienabschnitt)
 08/2004-07/2005 Praktisches Jahr (3. klinischer Studienabschnitt)
 11.10.2005 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 Gesamtnote: gut

Ärztliche Weiterbildung

10/2005 -10/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter/Assistenzarzt
 Klinik für Allgemein-, Thorax- und Gefäßchirurgie
 Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin
 Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Buhr
 Seit dem 01.11.2006 Assistenzarzt
 Klinik für Chirurgie
 DRK Kliniken Berlin Köpenick
 Direktor: Prof. Dr. med. M. Pross

Publikation

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. Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. Eur J Neurosci - 01-JAN-2005; 21(2): 363-77

Nicolaus T; Buhr HJ; Kruschewski M. Is hepatic portal venous gas the writing on the wall? Zentralbl Chir. 2008. 133: 76-78.

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Thomas Herdegen. Bei Problemen war er immer ein verlässlicher Ansprechpartner und hat sich uneingeschränkt für mich eingesetzt.

Des Weiteren möchte ich auch Herrn PD Dr. med. Stephan Brecht sehr herzlich für die große Unterstützung während der gesamten Zeit danken. Neben der ausgezeichneten Einweisung in die operativen und immunhistochemischen Methoden stand er mir ebenfalls immer mit Rat und Tat zur Seite.

Frau Annika Mütze (geb. Dorst) danke ich für ihre gründliche Einweisung in die Laborarbeit und ihre jederzeit vorhandene nette und hilfsbereite Art. Ein weiterer Dank gilt Fr. Dr. Vicki Wätzig für ihre Hilfe bei den Western Blot Untersuchungen. Außerdem möchte ich neben den restlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dr. Alexa Klettner und Dr. Sevgi Eminel. meinen MitdoktorandInnen Rainer Kirchhof, Karen Czeloth und Marc Kaschwich für die schöne gemeinsame Zeit bei der Arbeit und darüber hinaus danken. Es war immer eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zuletzt möchte ich noch meinen Eltern und meiner Frau Carolin für ihre Unterstützung während der gesamten Zeit danken. Sie waren mir vor allem in der letzten Phase meiner Promotionsarbeit eine sehr große Hilfe und haben mich unermüdlich unterstützt.