

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

Der Einfluss von JNK-Isoformen auf die zerebrale Ischämie
in jungen und alten Mäusen

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

Vorgelegt von
Mustapha Addali
aus Kiel

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Herdegen

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Arya Nabavi

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel den: 17.02.2011

gez.: Mustapha Addali

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildungsverzeichnis..... | IV |
| Tabellenverzeichnis..... | V |
| Glossarium..... | VI |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Der Schlaganfall..... | 1 |
| 1.1.1 Ätiologie..... | 1 |
| 1.1.2 Epidemiologie..... | 1 |
| 1.2 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie..... | 2 |
| 1.2.1 Übersicht..... | 2 |
| 1.2.2 Das Penumbra-Konzept..... | 3 |
| 1.2.3 Der neuronale Zelltod..... | 4 |
| 1.3 Die Rolle der Transkriptionsfaktoren..... | 5 |
| 1.4 Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK)..... | 6 |
| 1.4.1 Übersicht..... | 6 |
| 1.4.2 Isoformen und Vorkommen der JNK..... | 6 |
| 1.4.3 Rolle der JNK nach physiologischer und pathophysiologischer Stimulation im Nervensystem..... | 7 |
| 1.5 Das Tiermodell und anatomische Identifikation der MCA Varianten..... | 8 |
| 1.6 JNK und Alter..... | 8 |
| 1.7 Wissenschaftliche Fragestellungen..... | 10 |
| 2 Material und Methoden..... | 11 |
| 2.1 Chemikalien und Gemische..... | 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 Knock out Mäuse..... | 13 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.3 | Genotypisierung | 14 |
| 2.4 | Tierhaltung und Zucht..... | 14 |
| 2.5 | Die Operation..... | 14 |
| 2.5.1 | Grundlegendes zur Operation..... | 14 |
| 2.5.2 | Verwendete technische Geräte und Instrumente..... | 15 |
| 2.5.3 | Operationsprotokoll..... | 16 |
| 2.5.4 | Anästhesie..... | 17 |
| 2.5.5 | Operationstechnik..... | 17 |
| 2.5.6 | Transkardiale Perfusion..... | 23 |
| 2.5.7 | Entnahme des Gehirns..... | 24 |
| 2.6 | Aufarbeitung der Gehirne..... | 24 |
| 2.7 | Übersicht über die Versuchsgruppen und Fallzahlen..... | 25 |
| 2.8 | Morphometrie..... | 26 |
| 2.8.1 | Kresylviolett-färbung..... | 26 |
| 2.8.2 | Infarktgrößenbestimmung..... | 27 |
| 2.8.3 | Einlesen der Hirnschnitte..... | 27 |
| 2.8.4 | Messung der Infarktgröße (Volumetrie) | 29 |
| 2.9 | Kontrolle der Messmethode..... | 30 |
| 2.10 | Variabilität der A. cerebri media..... | 31 |
| 2.11 | Statistische Auswertung..... | 32 |
| 3 | Ergebnisse..... | 34 |
| 3.1 | Komplikationen und Mortalität durch die MCAO..... | 34 |
| 3.2 | Infarktvolumen der einzelnen Tiergruppen 3 Tagen nach pMCAO..... | 35 |
| 3.2.1 | Räumliche Ausdehnung des Infarktareals..... | 35 |
| 3.3 | Statistische Berechnung und Dokumentation..... | 45 |
| 3.4 | Bestimmung des Verhältnisfaktors..... | 53 |
| 3.5 | Anatomische Variation der MCA..... | 54 |
| 4 | Diskussion..... | 62 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.1 | Allgemeiner Teil..... | 62 |
| 4.2 | Validität und Grenzen des verwendeten Ischämie Modells..... | 62 |
| 4.3 | Mögliche Einflussfaktoren auf die Ergebnisse..... | 63 |
| 4.4 | Körpergewicht..... | 64 |
| 4.5 | Temperatur..... | 64 |
| 4.6 | Arterieller Blutdruck..... | 64 |
| 4.7 | Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit..... | 65 |
| 4.7.1 | Alter und Komplikationen durch die pMCAO..... | 65 |
| 4.7.2 | Anatomische Variation des Gefäßverlaufes der MCA und möglicher Einfluss auf die Ergebnisse..... | 66 |
| 4.7.3 | Infarktgrößenbestimmung..... | 67 |
| 4.7.4 | Experimentelle Schlaganfall und Neuroprotektion im Alter..... | 71 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 73 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 74 |
| | Danksagung..... | 88 |
| | Lebenslauf..... | 89 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|--|-------|
| Abbildung 1: | Übersicht über die Gruppenteilung | 15 |
| Abbildung 2: | Unterschiedliche Operationsschritte | 20-21 |
| Abbildung 3: | Infarktareal..... | 22 |
| Abbildung 4: | Anatomische Schnittebenen in kranio-kaudaler Orientierung..... | 28 |
| Abbildung 5: | Schematische Darstellung zur Berechnung des Infarktvolumens..... | 29 |
| Abbildung 6: | Gemessene Flächen in Kresylviolettfröbung und negativen Bild..... | 30 |
| Abbildung 7: | Anatomische Lokalisation der MCA..... | 32 |
| Abbildung 8: | Infarktausdehnung für WT der Gruppe „JUNG“..... | 36-37 |
| Abbildung 9: | Infarktausdehnung für JNK der Gruppe „JUNG“..... | 38-39 |
| Abbildung 10: | Infarktausdehnung für WT der Gruppe „ALT“..... | 40-41 |
| Abbildung 11: | Infarktausdehnung für JNK der Gruppe „ALT“..... | 42-43 |
| Abbildung 12: | Anteil der Infarktvolumen an der Hemisphäre in %..... | 47-49 |
| Abbildung 13: | Direkt und Indirekt gemessene Infarktvolumina (mm ³)..... | 51 |
| Abbildung 14: | Nicht infarzierte Volumen und das Gewebsverlustvolumen..... | 53 |
| Abbildung 15: | Anatomische Muster der MCA bei WT 1, -2..... | 56 |
| | Anatomische Muster der MCA bei WT 3..... | 59 |
| Abbildung 16: | Anatomische Muster der MCA bei JNK1 Ko, -2Ko, -3Ko..... | 57-59 |
| Abbildung 17: | Schematische Darstellung der anatomischen Variation der MCA bei WT1, -2,-3..... | 60 |
| Abbildung 18: | Schematische Darstellung der anatomischen Variation der MCA bei JNK1 Ko, -2Ko, -3Ko..... | 61 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabelle 4: | Verwendete Chemikalien..... | 11 |
| Tabelle 5: | Verwendete technische Geräte..... | 15 |
| Tabelle 6: | Verwendete Instrumente und Zubehör..... | 16 |
| Tabelle 4: | Die transkardiale Perfusion (verwendete Instrumente)..... | 23 |
| Tabelle 5: | Übersicht über Versuchsgruppen und der untersuchten Fallzahlen..... | 25 |
| Tabelle 6: | Färbeprotokoll der Kresylviolett-färbung..... | 26 |
| Tabelle 7: | Komplikationen und Mortalität..... | 34 |
| Tabelle 8: | Infarktausdehnung für die Gruppen „JUNG“ und „ALT“..... | 44 |
| Tabelle 9: | Infarkt volumina..... | 46 |
| Tabelle 10: | Bestimmung des Verhältnisfaktors..... | 54 |

Glossarium

| | |
|---------------|---|
| AFT3 | activating transcription factor 3 |
| ATF2 | activating transcription factor 2 |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Aβ-Peptide | beta-amyloid-Protein |
| BCAO | bilaterale Okklusion der Arteria carotis |
| BDNF | brain derived neurotrophic factor |
| Cox-2 | Cyclooxygenase-2 |
| c-JunAA | Transkriptionsfaktor c-Jun, Serin 63 und 73 durch Alanin ersetzt. |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| ERK | extracellular signal-regulated kinase |
| IEG | immediately early gene |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| JNK | c-Jun N-terminal kinase |
| ko | knock out |
| MAPK | mitogen activated protein kinase |
| MCA | middle cerebral artery |
| MCAO | middle cerebral artery occlusion |
| MPTP | 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| NGF | nerve growth factor |
| pJNK | N-terminal phosphoryliertes JNK |
| PKR | Doppelstrang-RNA abhängige Proteinkinase |
| pMCAO | permanent middle cerebral artery occlusion |
| phospho-c-Jun | N-terminal phosphoryliertes c-Jun |
| p38 | 38 kDa Kinase |
| RNA | ribonucleic acid |
| SAPK | stress activated protein kinase |
| WT | Wildtyp-Kontrollen von JNK ko Mäusen |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

1 Einleitung

Zielsetzung dieser Promotionsarbeit war es, den Effekt von JNK-Isoformen auf die zerebrale Ischämie vergleichend in jungen und alten Mäusen zu untersuchen.

Anhand eines Tierversuchsmodells der permanenten fokalen Ischämie in der Maus wurde untersucht, welche Auswirkungen die Inaktivierung der JNK-Gene (JNK knock out) auf die Infarktgröße haben. Zusätzlich wurde der anatomische Verlauf des Gefäßgebietes der A. cerebri media für jeden Mausstamm untersucht.

1.1 Der Schlaganfall

1.1.1 Ätiologie

Bei den Begriffen „Schlaganfall“, „cerebraler Insult“ und „Apoplex“ handelt es sich um synonyme Begriffe, die eine heterogene Gruppe von vaskulären Erkrankungen zusammenfassen, die zum akuten Untergang von Hirnparenchym führen (Mummenthaler und Mattle, 2002; Grehl und Reinhardt, 2005).

Ätiologisch gesehen lassen sich Schlaganfälle in ischämischer und hämorrhagischer Genese einteilen. Die hämorrhagisch bedingten Schlaganfälle treten mit 20% seltener als die ischämisch bedingten auf (Sudlow und Warlow, 1997), wobei 15% durch spontane intrazerebrale Blutung (ICB) und 5% durch Subarachnoidalblutung hervorgerufen werden (Poeck und Hacke, 2006).

Schlaganfälle ischämischer Genese treten in Folge einer mangelnden Blutversorgung auf. Der thromboembolische Verschluss einer zerebralen Arterie stellt mit 30% die häufigste Ursache eines Schlaganfalls dar (Poeck und Hacke, 2001).

1.1.2 Epidemiologie

Pro Jahr erleiden in Deutschland ca. 200.000 Einwohner einen ischämischen Hirninfarkt (Poeck und Hacke, 2001). Daneben ist der Schlaganfall eine der häufigsten Ursachen einer Behinderung und die dritthäufigste Todesursache weltweit (The National Institute of Neurological disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995; Poeck und Hacke, 2006). Dabei zählen genetische Disposition, Rauchen, Diabetes, Bluthochdruck und kardiale Erkrankungen zu den Risikofaktoren, die die Prävalenz und Inzidenz für einen Schlaganfall steigern (Hademenos und Massoud, 1997; Diener HC, 2002).

Weiterhin steigt das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden, mit zunehmendem Alter an, obwohl auch immer mehr junge Menschen hiervon betroffen sind (Diener HC, 2002). In internationalen Studien wurde eine Prävalenz von 1 - 3,5% für die Altersgruppe 55 - 64 Jahre und von 5 - 8% für die Altersgruppe über 75 Jahre nachgewiesen (Toole et al., 1993; Bots et al., 1996). Für Deutschland liegt die Wahrscheinlichkeit, einen Schlaganfall bis zum 45. Lebensjahr zu erleiden, bei 30 pro 100 000 Einwohner und steigt ab dem 75. Lebensjahr auf etwa 1230 pro 100 000 Einwohner (Deutsche Schlaganfall Stiftung e.V. 1999). In der Augsburger Seniorenstudie wurde eine Prävalenz von 6,8% für die Altersgruppe über 65 Jahre festgestellt (Berger et al., 2000). Vor allem wegen des zunehmenden Arterioskleroserisikos im Alter kommt es bei ca. 5 - 7% der weiblichen und 6 - 11% der männlichen Bevölkerung im Alter über 60 Jahren zu Stenosen und Verschlüssen der hirnversorgenden Gefäße (Hillen et al., 2000; Mosso und Baumgartner, 2000).

Die Aussichten einen Schlaganfall ohne bleibenden neurologischen Schaden zu überstehen, sind mäßig. Etwa ein Viertel der Patienten stirbt innerhalb der ersten vier Wochen, 40% innerhalb eines Jahres. Für die Überlebenden gilt die so genannte „Drittel-Regel“: Ein Drittel der Patienten übersteht den Insult ohne jegliche Einschränkung für den täglichen Alltag und kann ohne besondere Entbehrung wieder genauso wie vor dem Ereignis leben. Bei dem zweiten Drittel bleiben erhebliche Behinderungen zurück, die mit Einengungen im privaten und beruflichen Bereich verbunden sind. Das letzte Drittel der Patienten muss ständig gepflegt werden.

Es sind nicht nur die immensen volkswirtschaftlichen Kosten, entstehend aus dem Pflegeaufwand, wie auch durch den Ausfall der Arbeitskraft des Patienten (Deutsche Schlaganfall Stiftung e.V. 1999), welche die große Bedeutung dieser Erkrankung für die Gesellschaft begründen, sondern vor allem der häufig invalidierende Verlauf der Erkrankung.

Diese epidemiologischen Daten machen deutlich, dass die Behandlung des Schlaganfalls verbessert werden muss.

1.2 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

1.2.1 Übersicht

Das Gehirn gehört zu den am besten mit Blut versorgten Organen des Körpers. Der Sauerstoffverbrauch liegt in körperlicher Ruhe bei 20% des Gesamtverbrauchs.

Da das Gehirn keine Substratspeicher besitzt, sind die Zellen bei überproportional hohem Energiebedarf auf eine kontinuierliche Zufuhr von Glukose und Sauerstoff aus dem Blut angewiesen, um ihre Funktionalität und Vitalität aufrecht zu erhalten (Hossmann, 1993).

So verursacht bereits eine kurzfristige Unterbrechung der Hirndurchblutung schwere metabolische Störungen und löst eine Reihe von unterschiedlichen pathophysiologischen Kaskaden aus, die je nach Schwere und Dauer der Ischämie in Neuronen und Gliazellen zum Hirninfarkt führen (Lipton, 1999; Stoll et al., 1998; Kuschinsky, 1996).

Ein zentraler Ausgangspunkt ist die Störung der Atmungskette bzw. der oxidativen Phosphorylierung durch Sauerstoffmangel und folgendem ATP-Mangel.

Weitere Schritte in der ischämischen Kaskade sind: anaeroben Glykolyse, Laktatbildung, Azidose, Störung des Ionengleichgewichtes, 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. Diese massive Anhäufung von freiem intrazellulären Ca^{2+} stellt einen entscheidenden Schritt für die zytotoxische Wirkung dar, weil dadurch zahlreiche Enzyme, wie zum Beispiel die neuronale Stickstoffoxyd synthetase, Phospholipasen, Proteasen und Lipidoxidasen aktiviert werden (Werner, 2000).

Auf verschiedenen Wegen kommt es 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).

Die Form, Intensität, Lokalisation und Dauer der Ischämie sowie die Reperfusion und eventuelle intra- oder postischämische protektive Maßnahmen sind ausschlaggebende Faktoren für das Ausmaß und die Qualität der Zellschädigung und des Gewebeuntergangs (Werner, 2000).

Diese Vorgänge führen im Zentrum des Infarkts innerhalb eines bestimmten Zeitraums (einige Minuten bis wenige Stunden) zum neuronalen, gliären und endothelialen Zelltod, der überwiegend durch Nekrosen verursacht wird. Im Gegensatz dazu gibt es im Infarkt-randbereich Areale, die weniger stark geschädigt werden. Dort kommt es nicht sofort zum Zelluntergang und zur Nekrose.

1.2.2 Das Penumbra-Konzept

Die unterschiedliche Pathophysiologie des Kerngebietes und des Randbereiches eines ischämischen Infarktareals hat zu dem Konzept der Penumbra geführt. Das Modell lässt sich auch auf permanente zerebrale Ischämien anwenden, bei denen es zu einer Minderdurchblutung in einem Hirngefäß bzw. seinem Versorgungsgebiet kommt. Der Infarktkern des ischämischen Insults stellt ein Gewebe dar, das stark von der Versorgung durch die Arterie abhängig und somit am schwersten von der hämodynamischen Störung betroffen ist. Dort kommt es in Folge des totalen Durchblutungszusammenbruchs zur irreversiblen Schädigung der betrof-

fenen Zellen mit nachfolgender Nekrose. In diesem Bereich besteht die einzige therapeutische Möglichkeit in einer innerhalb weniger Stunden unmittelbar eingeleiteten Rekanalisierung des verschlossenen Gefäßes, was im klinischen Alltag sehr selten ist.

Die Randbereiche des betroffenen Gewebes sind ringförmig von dem oligämischen Halbschatten, der sogenannten Penumbra, umgeben. Diese stellt die Übergangszone zwischen dem nicht perfundierten Kerngebiet und dem normal perfundierten Gewebe dar (Astrup et al., 1981). In diesem Bereich kommt es durch den reduzierten Blutfluss zu biochemischen und elektrophysiologischen Veränderungen, die zwar zu einer Beeinträchtigung des Funktionsstoffwechsels der Zellen führen, aber dennoch einen intakten Strukturstoffwechsel und damit eine strukturelle Integrität bewahren (Garcia et al., 1993).

Prinzipiell ist die ischämische Schädigung der Penumbra reversibel und kann durch eine Wiederherstellung der Perfusion oder durch andere neuroprotektive Maßnahmen vor dem nekrotischen Zelluntergang bewahrt werden (Hossmann, 1994; Hamann, 1997). 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 einbezogen werden und damit irreversibel geschädigt werden.

1.2.3 Der neuronale Zelltod

Nach ischämischer Schädigung der Nervenzellen kommt es nicht nur zur Nekrose, sondern auch zur Apoptose (Übersicht bei Bredesen, 1995; Lipton, 1999; Mattson, 2000).

Als Nekrose wird das schnelle Absterben meist ganzer Zellgruppen, infolge stark unphysiologischer Milieubedingungen bezeichnet. Es handelt sich dabei 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 verteilen sich im Extrazellulärraum und lösen so eine inflammatorische Reaktion aus (Graham und Lantos, 1997).

Die zeitlich verzögerte und ATP-verbrauchende Form des Zelltodes wird als Apoptose bezeichnet (Eguchi et al., 1997). Dieser Vorgang kommt auch unter physiologischen Bedingungen vor, so zum Beispiel während der Embryonalentwicklung oder im adulten Organismus zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase. Morphologisch kommt es zu einer Verdichtung des Zytoplasmas (Pyknose), Kondensation und Fragmentation des Chromatins (Karyorrhesis), DNA-Fragmentierung und fehlender inflammatorischen Reaktion. Ein weiteres typisches Bild der Apoptose ist das Auftreten von Apoptosekörperchen („apoptotic bodies“). Dies sind abgeschnürte Zellbestandteile aus kondensiertem Intrazellulärmaterial, welches von einer intakten Zellmembran umgeben ist (Graham und Lantos, 1997).

Zur Induktion der Apoptose muss die Zelle Effektorproteine neu synthetisieren, welches mit einer Genexpressionsveränderung einhergeht. Dieser Vorgang wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert. Einer der Transkriptionsfaktoren, die die Expression pro-apoptotischer Gene regulieren können, ist das c-Jun.

1.3 Die Rolle der Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren regulieren die Transkription von Genen und damit deren Expression (Herdegen und Leah, 1998; Herdegen und Waetzig, 2001). Sie vermitteln unter anderem die Reaktion einer Zelle auf pathophysiologische Veränderungen beziehungsweise Veränderungen der Homöostase. So reagiert beispielsweise ein Neuron auf einen Stimulus, in dem es seine Genexpression anpasst.

In der Zelle wird zwischen konstitutiven und induzierbaren Transkriptionsfaktoren unterschieden. Konstitutive Transkriptionsfaktoren befinden sich ständig im Nukleus oder im Zytoplasma der Zelle und werden auf einen bestimmten Reiz durch Phosphorylierung aktiviert. Induzierbare Transkriptionsfaktoren dagegen müssen auf bestimmte physiologische und pathophysiologische Reize hin (zerebrale Ischämie) erst exprimiert werden (Herdegen und Leah, 1998). Dies kann sehr schnell geschehen, weshalb einige induzierbare Transkriptionsfaktoren auch die Bezeichnung IEG (immediately early genes) tragen.

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 Kinase“ (JNK) (Gupta et al., 1996; Kallunki et al., 1994, 1996; Minden und Karin, 1997). Es existieren viele Hinweise sowohl für eine neuroregenerative, als auch für eine apoptotische/neurodegenerative Funktion von c-Jun und seiner N-terminalen Phosphorylierung durch die JNKs (Eilers et al., 1998; Watson et al., 1998; Herdegen et al., 1998; Herdegen und Waetzig, 2001; Raivich et al., 2006). Nach einer zerebralen Ischämie, kommt es schon nach drei Stunden zur einsetzenden Expression und N-terminalen Phosphorylierung von c-Jun in Nervenzellen, im Randgebiet des ischämischen Infarktareals (Herdegen et al., 1998). Auch die Axotomie von Nervenzellen des ZNS stellt einen Reiz für die c-Jun Expression und N-terminale Phosphorylierung dar (Herdegen und Waetzig, 2005; Waetzig et al., 2006). In einem Tiermodell bei Ratten führte die Hemmung des JNK/AP1 Signalwegs nach perinatal hyoxisch-ischämischer Hirnschädigung mittel unilateraler Okklusion der Arterie carotis zur Reduzierung des neuronalen Zelltodes (Nijboer et al., 2009). Ebenfalls zeigte Pan et al. (2010) eine Neuroprotektion gegen MPTP induzierte

Verlust von dopaminergen Neuronen bei Parkinson-Krankheit durch die hemmende Wirkung eines Peptids, als TAT-JBD bezeichnet, auf die JNK-Kaskade Aktivierung.

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).

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). Die JNK Signalwegaktivierung spielt auch eine Rolle nach traumatischer Hirnverletzung. Die Hemmung dieser Kaskade nach einer traumatischen zerebralen Kontusion in humanem Hirngewebe und in Maushirnen führte zu einer signifikanten Neuroprotektion mit Verbesserung des neuronalen Defizites (Ortolano et al., 2009).

Es scheint so, dass c-Jun bzw. das N-terminal phosphorylierte c-Jun eine duale Funktion erfüllt. Zum einen spielt es eine Rolle als Vermittler des apoptotischen Zelltodes, zum anderen als Induktor der neuronalen Regeneration.

1.4 Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK)

1.4.1 Übersicht

Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs) bilden eine Unterfamilie der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) (Gupta et al., 1995; Mielke und Herdegen, 2000). Da die JNKs durch verschiedene Formen von Zellstress, wie UV-Strahlung, Hypoxie, Ischämie, axonale Verletzung, entzündungsfördernden Zytokinen aktiviert (Mielke und Herdegen, 2000) werden, werden sie auch SAPK (stress activated protein kinase) genannt.

Der JNK-Signalweg ist in viele zelluläre Funktionsabläufe involviert, unter anderem in die Wachstumskontrolle, die Transformation und die Apoptose. Neben den proapoptotischen werden ihr auch antiapoptotische Eigenschaften zugeschrieben, wie physiologische Funktionen (Harper, 2000; Lin, 2002; Herdegen und Waetzig, 2001) und die Beteiligung am Überleben von Zellen (Deng, 2001; Lin, 2002). JNKs sind nicht zwangsläufig zur Induktion der Apoptose notwendig (Liu et al., 1996), aber sehr oft.

1.4.2 Isoformen und Vorkommen der JNK

Die JNKs werden von drei unterschiedlichen Genen kodiert, dem jnk1, jnk2 und jnk3, aus deren Primärtranskripten durch alternatives Spleißen und Translation 10 Kinase-Isoformen (je vier aus jnk1 und jnk2, zwei aus jnk3) entstehen (Dériard et al., 1994; Kallunki

et al., 1994; Kyriakis et al., 1994; Mohit et al., 1995). Einerseits wird die durch JNK1, -2 und -3 kodierte messenger-RNA (mRNA) am 3'-Ende auf zwei unterschiedliche Weisen prozessiert, so dass sich am Ende für alle drei Gene entweder JNK-Proteine von 46 kDa oder 54 kDa ergeben. Andererseits enthalten die Gene *jnk1* und *jnk2*, nicht aber *jnk3*, sowohl ein α - als auch ein β -Exon, wobei jeweils eines von beiden durch alternatives Spleißen aus der mRNA eliminiert wird. Die Exone α und β liegen in der Kinase-Domäne des JNK-Proteins.

Darüber hinaus haben JNK- Isoformen unterschiedliche Affinitäten zu ihren Substraten und zu den bindenden Proteinen (Gupta et al., 1996, Kallunki et al., 1996). Weiterhin werden sie auf unterschiedliche Art und Weise durch Kinasen und Scaffold-Proteine reguliert (Chang und Karin, 2001; Rincon et al., 2001; Davis, 1999). So verfügt beispielweise JNK2 über eine 25-fach höhere Bindungsaffinität für c-Jun als JNK1 (Kallunki et al., 1994). Andere Experimente haben gezeigt, dass die JNK1 Isoformen etwas effizienter c-Jun phosphorylieren (Gupta et al., 1996). Unter den drei Mitgliedern des JNK-Familie kommt JNK3 hauptsächlich im Gehirn vor, dagegen werden JNK1, -2 ubiquitär exprimiert (Waetzig et Herdegen, 2005).

1.4.3 Rolle der JNK nach physiologischer und pathophysiologischer Stimulation im Nervensystem

Zum besseren Verständnis der verschiedenen Funktionen der individuellen JNK Isoformen trugen Experimente mit transgenen Mäusen bei, in welchen jeweils eines der drei Gene inaktiviert wurde. Hinweise auf Funktionen der JNK in der embryonalen Entwicklung ergaben Versuche mit JNK 1+2-Doppel-knock out Mäusen, bei denen sowohl das JNK1, als auch das JNK2 inaktiviert wurde. Diese Tiere verstarben bereits in Embryonalstadium aufgrund einer Dysregulation der apoptotischen Abläufe in der Embryogenese mit Defekt der Schließung des Neuralrohres (Kuan et al., 1999).

Auch die Modifikation der Aktivität der JNK während der prä- und postnatalen Entwicklung lässt auf weitere Funktionen bei der Entwicklung schließen (Carboni et al., 1998; Yang et al., 1997). Für die physiologische Entwicklung des Gehirns sind Beteiligungen von JNK1 und JNK 2 beschrieben (Kuan et al., 1999; Sabapathy et al., 1999; Weston et Davis, 2002; Change et al., 2003).

Mit Hilfe von JNK ko Mäusen konnten zudem die ersten entscheidenden Hinweise für proapoptische Eigenschaften der JNKs festgestellt werden. Hierbei wiesen JNK3 ko Mäuse sowohl eine Reduktion der konvulsiven Aktivität als auch des neuronalen Zelltodes im Hippocampus nach Gabe des prokonvulsiven Stoffes Kainat, einem Agonisten am NMDA-Glutamat-Rezeptor, auf (Yang et al., 1997). Ähnliche Effekte konnten in einem Hypoxie-

modell (Kuan et al., 2003) und nach Intoxikation mit MPTP beobachtet werden (Hunot et al., 2004). So zeigten sich wieder eine Reduktion der epileptischen Aktivität und des neuronalen Zellunterganges bei JNK3 ko, nicht jedoch bei JNK1 ko Mäusen.

Diese Beobachtungen erlauben aber nicht das Fazit, dass JNK3 lediglich eine degenerative Funktion hat und JNK1 eher physiologische Aufgaben besitzt. Mäuse ohne JNK1 und -2 zeigen eine antiapoptotische Morphologie (Kuan et al., 1999), JNK3 hingegen kann auch die NGF- (nerve growth factor) induzierte Differenzierung von PC12-Zellen verstärken (Waetzig und Herdegen, 2003).

Ferner wird die Beteiligung der JNKs an neuropathologischen Prozessen (Herdegen und Waetzig, 2001) bei M. Alzheimer (Marques et al., 2003) und M. Parkinson (Saporito et al., 1999; Crocker et al., 2001; Hunot et al., 2004) diskutiert.

Es gibt nun immer mehr Versuche und Ansätze, JNK-Inhibitoren (Scapin et al., 2003) als neuroprotektive Substanzen einzusetzen (Borsello et al., 2003; Hunot et al., 2004). Unabdingbar für deren zielgerichtete Anwendung ist jedoch eine Entschlüsselung der physiologischen sowie der pathologischen Funktionen der JNK-Isoformen.

1.5 Das Tiermodell und anatomische Identifikation der MCA Varianten

Als Tiermodell für den ischämischen Hirninfarkt wurde ein Modell der fokalen permanenten Ischämie verwendet, die pMCAO (permanent middle cerebral artery occlusion). Nach einer subtemporalen Kraniotomie wurden der Hauptstamm der A. cerebri media und die beiden abgehenden Äste elektrisch kauterisiert (Bedersen et al., 1986; Tamura et al., 1981). Es resultiert ein ischämischer Hirninfarkt im gesamten Versorgungsgebiet der A. cerebri media.

Da auch bei den meisten anderen Tiermodellen für Studien zu zerebralen Ischämien die Okklusion der A. cerebri media (MCAO) im Mittelpunkt vieler Untersuchungen steht, war die Erfassung und Analyse der Anatomie der MCA und ihrer Hauptäste, und damit diese als mögliche potentielle Quelle der Variation der quantitativen Infarktmessungen Teil der laufenden Studie. Weiterhin wird diesem Gefäß eine enorme Bedeutung beim thromboembolischen Schlaganfall zugeschrieben (Garcia, 1984).

1.6 JNK und Alter

Alter ist einer der Hauptfaktoren, der zur Dysfunktion der normalen zellulären Regulation führt und damit das Nerven und Immun-System beeinflusst (Kawakami et al., 1999). Es gilt als wichtiger Risikofaktor von verschiedenen chronischen Krankheiten, hierzu zählen maligne, kardiovaskuläre, autoimmune und neurodegenerative Erkrankungen.

Als Beispiel solcher neurodegenerativen Erkrankungen ist hier Morbus Alzheimer zu nennen, der in seiner häufigsten Form bei Personen über dem 65. Lebensjahr auftritt und pathophysiologisch durch extrazelluläre senile Plaques, intrazelluläre Neurofibrillärenbündel und extensiven neuronalen Tod charakterisiert ist (Yankner, 1996; selkose, 1999). Den Kern der Plaques bildet ein β -Amyloid-Protein ($A\beta$ -Peptide). Es konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass die Aktivierung von Stresskinasen wie c-Jun N-Terminal Kinase (JNK), p38, MAP Kinase und Doppel-Strang-RNA abhängige Protein Kinase (PKR) mit dem $A\beta$ -auslösenden apoptotischen Zelltod assoziierte (Suen et al., 2003; Tamagno et al., 2003). Morishima et al. (2001) haben festgestellt, dass die β -Amyloid induzierte neuronale Apoptose über einen Mechanismus läuft, in dem der JNK-Signalweg den Zelltodinduktor FasL aktiviert. Eine andere Studie zeigte einen weiteren Molekularmechanismus, in dem ASK1 in der $A\beta$ -induzierten JNK Aktivierung involviert ist (Kadowaki et al., 2005).

Darüber hinaus konnten in neuronalen Zellkulturen die Charakteristika der Apoptose im Alzheimer Gehirn nachgewiesen werden (Chang et al., 2002; Lin et al., 2004; Loo et al., 1993; Suen et al., 2003). Weitere Hinweise für erhöhte Aktivierung der JNK und seinem nachgeordneten Molekül c-Jun im Alter lieferten bei alten Ratten das Modell der transienten bilateralen Okklusion der Arteria carotis (BCAO). Mit Hilfe von Edaravone, einem potenten Antioxidans, kam es zu einer erheblichen Reduzierung der neuronalen Schäden nach einer Ischämie von 85 min, gefolgt von einer Reperfusionzeit von 45 min, durch die Hemmung des oxidativen Stress und der JNK-c-Jun Signalweges bei gleichzeitiger Hemmung der gesamten MAPK Aktivität im Gehirn alter Ratten.

Diese und weitere Erkenntnisse über die Rolle des JNK-Signalwegs bei den neurodegenerativen Erkrankungen sowie cerebralen Ischämien führte zur klinischen Untersuchung von Inhibitoren und Prüfung ihres Potentials als Medikamente.

Guan et al. (2006) zeigte, dass die Hemmung der Aktivierung von JNK-Kaskade durch SP 600125, einem potenten selektiven und reversiblen Inhibitor der JNK, zur Induktion eine Neuroprotektion gegen Ischämie/Reperfusion in der CA1-Region des Hippocampus über die Unterdrückung von äußeren und inneren Wege der Apoptose führte. XG-102 (früher D-JNKI1), ein weiter entwickelter Inhibitor der JNK, verhinderte in vitro den neuronalen Tod vollständig (Borsello et al., 2003). In vivo wurde der wirksame Schutz dieses Moleküls in zwei unterschiedlichen Modellen der zerebralen Ischämie nachgewiesen, nämlich bei transientem proximalem Verschluss der mittleren Hirnarterie bei adulten Mäusen und bei permanentem distalem Verschluss bei jungen Ratten (Borsello et al., 2003). Weiterhin konnte durch die Kombination der JNK-Inhibitor XG-102 mit hyperbarer Oxygenation eine Verbesserung

der Neuroprotektion sowie eine Reduzierung des Hirnödems nach zerebraler Ischämie bei erwachsenen Ratten gezeigt werden (Liu et al., 2009).

AS 601245 ist ebenfalls ein JNK Inhibitor mit neuroprotektiven Eigenschaften. AS 601245 vermindert die Schäden an Neuronen, reduziert die Astrozytose und die kognitive Defizite nach globaler zerebraler Ischämie (Carboni et al., 2008). Diese neuroprotektive Wirkung von JNK Inhibitoren lässt damit neue Hoffnung für die Behandlung für die große Anzahl von Schlaganfallpatienten, die aus der Thrombolyse keinen Nutzen ziehen können, aufkommen.

1.7 Wissenschaftliche Fragestellungen

Trotz des zunehmenden Verständnisses der Pathophysiologie des ischämischen Hirninfarktes gibt es immer noch wissenschaftlichen Klärungsbedarf hinsichtlich der Auswirkung des Alters auf dieses Krankheitsbild in Abhängigkeit von JNK.

In dieser Doktorarbeit wird die Auswirkung der ischämischen Hirnschädigung auf die verschiedenen Altersgruppen, Jung versus Alt, untersucht. Es wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Führt der Knock-out einer JNK Isoform zu einer Veränderung der Infarktgröße im Vergleich zu den Kontrolltiergruppen? Und wenn ja, wie verhält sich die Infarktgröße der Knock-outs untereinander?
- Führt der Knock-out einer JNK Isoform zu einer Veränderung der morphologischen Infarktausdehnung in unterschiedlichen Hirnregionen?
- Gibt es einen Unterschied im anatomischen Verlauf der Arterie cerebri media bei den verschiedenen Genotypen?
- Steigt Sterblichkeitsrate mit dem Alter der Nagetierpopulationen an?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Gemische

2.1.1 Verwendete Chemikalien

| | |
|------------------------------|-------------------------------------|
| Chloralhydrat | Merck, 64271 Darmstadt, Deutschland |
| Ethanol, absolut | “ “ “ “ |
| Essigsäure | “ “ “ “ |
| Gelatine | “ “ “ “ |
| KCl | “ “ “ “ |
| $K_2Cr(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ | “ “ “ “ |
| KH_2PO_4 | “ “ “ “ |
| Kresylviolettacetat | Sigma, 89552 Steinheim, Deutschland |
| NaCl | Merck, 64271 Darmstadt, Deutschland |
| $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ | “ “ “ “ |
| Methanol | “ “ “ “ |
| Paraformaldehyd | “ “ “ “ |
| Saccharose | “ “ “ “ |
| Triton® X-100 | “ “ “ “ |
| 30%-iges Wasserstoffperoxid | “ “ “ “ |
| Xylol | “ “ “ “ |
| 0,9% NaCl Lösung | Braun, 34209 Melsungen, Deutschland |

Tabelle 1 : Verwendete Chemikalien

2.1.2 Ansatz von Lösungen

Chloralhydrat

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

Ethanol-Essigsäurelösung

10% Essigsäure= 5 ml (100% Essigsäure) + 45 ml Aqua bidest. Gelöst; dann wurden 450 ml absolutes Ethanol hinzugegeben.

Gelantinelösung zur Objektträgerbeschichtung

12 g Gelatine und 1,2 g $K_2Cr(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ oder 14,42g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ oder 9,94 Na_2HPO_4 , 2 g KH_2PO_4 und 2 g KCl wurden in 800 ml Aqua bidest. gelöst. Nachdem der pH-Wert auf 7,4 eingestellt worden war, wurde mit Aqua bidest. auf 1000 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

Es gab zwei Methoden, die Lösung anzusetzen:

a) 11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ oder 14,42g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ oder 9,94 Na_2HPO_4 , 2 g KH_2PO_4 , 2 g KCl und 80g NaCl wurden in 800 ml Aqua bidest. gelöst. Nachdem der pH auf 7,4 eingestellt worden war, wurde mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt.

b) 100ml PB(10x), 800ml Aqua bidest und 8g NaCl. Nachdem der pH-Wert auf 7,4 eingestellt worden war, wurde mit Aqua bidest. auf 1000 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 auf 500 ml Aqua bidest. wurden 24 Stunden in der Zentrifuge gelöst und dann filtriert.

4%-ige Paraformaldehydlösung, pH 7,4

40 g Paraformaldehyd wurden in 800 ml PB (1x) gelöst, auf 68° C in der Zentrifuge erwärmt bis die Lösung klar war, und danach mit PB (1x) auf 1000 ml aufgefüllt. Anschließend wird die Lösung in eine braune Flasche umgefüllt und bei 4° C gelagert.

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 sechs unterschiedlichen Genotypen verwendet. Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i. d. F. vom 25.05.1998, BGBl I S. 1105) durch das Ministerium für Landwirtschaft und Naturschutz des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

2.2.1 Wildtyp-Mäuse

Als Versuchstiere für die Kontrollgruppe wurden genetisch nicht veränderte männliche Mäuse vom C57Bl/6 Stamm verwendet. Sie werden im Folgenden als Wildtyp (WT) bezeichnet.

2.2.2 JNK knock-out Mäuse (JNK ko)

Die verwendeten JNK ko Tiere, bei denen je eine der drei JNK-Formen genetisch inaktiviert wurde, wurden mit Hilfe des „gene targeting“ bzw. „targeted disruption“ Verfahrens generiert. Die Vektoren (targeting vectors) enthielten Gene aus der genomischen Bibliothek von 129/SV-Mäusen. In den Vektoren wurde das Phosphorylierungsmotiv Threonin-Prolin-Tyrosin durch eine Neomycin- (bei JNK2 und 3) bzw. eine Hygromycin-Kassette (bei JNK1) ersetzt, die als positive Selektionsmarker diente (Dong et al., 1998; Yang et al., 1998; Yang DD et al., 1997). Beim Vektor für JNK3 wurde außerdem ein weiteres Exon aus dem Gen entfernt. Beim JNK1 und 2 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 eventuell 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 wurden.

Um die große Anzahl der in den Experimenten verwendeten Tiere generieren zu können, wurden JNK ko Mäuse einmal mit Mäusen des Stammes C57/BL/6 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 Generation gingen dann die Versuchstiergruppen hervor (F3-Generation). Diese Vorgehensweise minimierte einerseits die genetische Variabilität von Knock outs und Wildtypen und sicherte andererseits eine für die durchzuführenden Experimente ausreichende Menge an Versuchstieren.

2.3 Genotypisierung

Stichprobenartig wurde der Genotyp der Tiere mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kontrolliert. Dabei erfolgte die Isolierung der DNA aus Mäuseschwänzen mit Hilfe des Quiagen Kits für die DNA Präparation.

2.4 Tierhaltung und Zucht

Die Tiere wurden im Tierstall des Institutes für Experimentellen und Klinischen Pharmakologie der Universität Kiel 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 wurde ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Rhythmus, eine Raumtemperatur von 20-24° C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50-60% gewährleistet.

Die Wildtypen wurden aus dem zentralen Mäusetierstall der CAU Kiel bezogen. Die Tiere wurden frühestens 48 Stunden nach Eintreffen im Tierhaus des Institutes für Pharmakologie operiert.

Die JNK ko 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 Die Operation

2.5.1 Grundlegendes zur Operation

Um zu gewährleisten, dass die Ergebnisse möglichst wenig durch die zirkadiane Rhythmik der Tiere beeinflusst wurden, fanden Operationen nur in der Zeit zwischen 8 und 14 Uhr statt. Außerdem wurden nur männliche Tiere für die Versuche verwendet, um eine Beeinflussung der hormonellen Unterschiede zu minimieren.

Die Tiere wurden anhand ihres Alters in zwei Gruppen eingeteilt und anhand ihres Genotyps jeweils in sechs Klassen unterteilt (Abb. 1).

Gruppendefinition:

JUNG = 2 Monate \leq Alter \leq 4 Monate

ALT = 13 Monate \leq Alter \leq 16 Monate

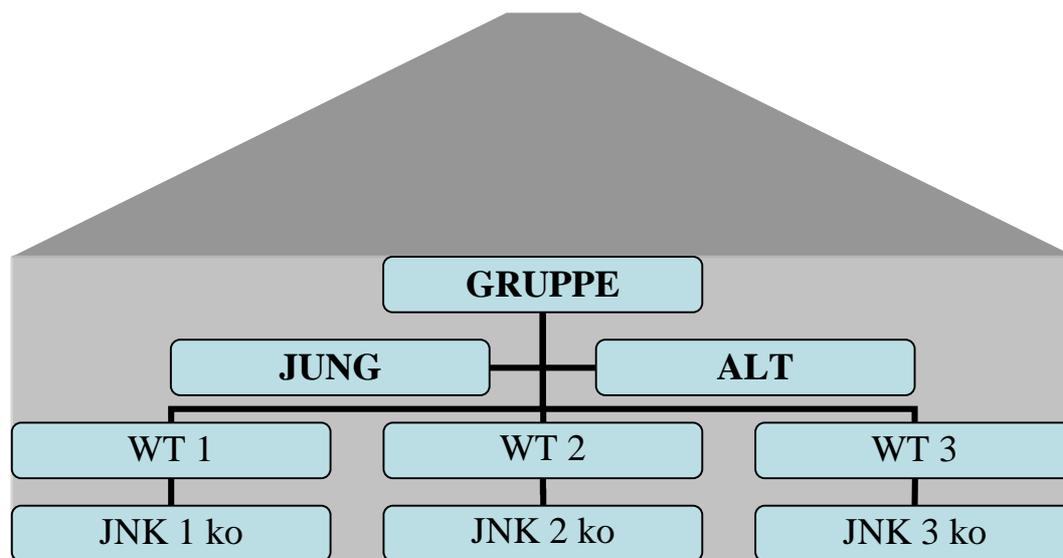


Abbildung 1: Übersicht über die Gruppenteilung.

2.5.2 Verwendete technische Geräte und Instrumente

| | | |
|---------------|---------------------------|---|
| Bohrgerät | Micromot 50/E 00088067 | Proxxon GmbH, Im Spanischen 18-24, D-54518 Niersbach |
| Bohrköpfe | | Hager & Meislinger GmbH, P.O.B. 102744, D-40018 Düsseldorf |
| Elektrokauter | ERBE / CC 50 | Erbe Elektromedizin GmbH, Waldhornstr. 17, D-72072 Tübingen |
| Mikroskop | Highlight 3001 | Olympus Europa GmbH, Wendenstr. 14-18, D-20097 Hamburg |
| Haarschneider | Typ V-42947 | Aesculap AG und KO.KG, D-Tuttlingen. |

Tabelle 2: Verwendete technische Geräte

| Instrumentenbezeichnung | Bestell-Nr. | Kontakt |
|-------------------------|-----------------|--|
| Chirurgische Pinzette | No. 11023-10 | Fine Science Tools (F.S.T.), Fahrtgasse 7-13, D-69117 Heidelberg |
| Präzisionspinzette | No. 96 S 13 | “ “ “ |
| Präzisionspinzette | No. 99 S 13 | “ “ “ |
| 2x Pinzette-gebogen- | | “ “ “ |
| Nadelhalter | No. 12500-12 | “ “ “ |
| Nadeln | No. 12050-03 | “ “ “ |
| Chirurgische Schere | No. 14059-09 | “ “ “ |
| Klemme | No.13-150-08 | KLS Martin Group Ludwigstaler Str. 132, D-78532 Tuttlingen |
| Kanülen | No. 20 0,4 x 19 | Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12, D-69126 Heidelberg |
| NaCl 0.9% | | Braun, 34209 Melsungen, Deutschland |
| Sugi ® Saugtupfer | | Kettenbach GmbH & Co. KG Postfach 1161 D-35709 Eschenburg |
| Kodan® | | Schülke & Mayr GmbH D-22840 Norderstedt |
| Wattestäbchen | No. 0415-0105 | Beese Verbandstoffe, Großer Kamp 14, D-22885 Barsbüttel |

Tabelle 3: Verwendete Instrumente und Zubehör.

2.5.3 Operationsprotokoll

Bei jeder Operation wurde auf bestimmte Merkmale, wie zum Beispiel 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
- Anästhesie und zusätzlicher Narkosebedarf
- postoperative Infusionsmenge
- Besonderheiten/Komplikationen während und nach der Operation
- anatomischer Gefäßverlauf (Fotographisch)
- transkardiale Perfusion: Besonderheiten/Komplikationen
- makroskopische Besonderheiten des Hirnaufbaus und makroskopische Bestimmung der Infarktausdehnung

➤ Ergebnisse

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, so zum Beispiel ob eine anatomische Variation des Gefäßverlaufes der MCA bestand.

2.5.4 Anästhesie

Zu Beginn der Operation wurden die Tiere mit Chloralhydrat 0,01 ml/g KG (Körpergewicht in Gramm) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Bis zum Eintritt der Narkose vergingen 1,5 bis 2 Minuten. Die volle Wirkung wurde fünf Minuten nach Injektion erreicht und hielt ca. 35 Minuten an. Danach oder bei wieder einsetzender Reaktion auf Schmerzreize wurden Nachinjektionen, von 0,05 ml, im Abstand von 20 min vorgenommen, um eine konstante Narkosetiefe zu gewährleisten.

Die Durchführung der permanenten fokalen Ischämie erforderte eine Narkosedauer von insgesamt 50 bis 70 Minuten.

2.5.5 Operationstechnik

2.5.5.1 Eröffnung des Operationssitus und Freilegung der Gefäße

Die Tiere wurden nach Erlöschen der Reaktion auf Schmerzreize an den Hinterpfoten und dem letzten Drittel der Tierschwänze in der Schläfenbeinregion rasiert. Danach wurden die Tiere in Rechtsseitenlage positioniert, ihre Vorder- und Hinterläufe auf der Operationsunterlage mit Klebestreifen fixiert, das Operationsgebiet desinfiziert und ein vertikaler, ca. 15 mm langer Schnitt zwischen linkem Auge und linkem Ohr angefertigt (Abb. 2: B-C). Die Haut wurde mit v-förmigen Klebestreifen zur Seite gespannt, das Bindegewebe mit einer atraumatischen Pinzette und einer Schere abgelöst, so dass der darunter liegende M. temporalis zum Vorschein kam (Abb. 2 D). Der Kopf wurde leicht rekliniert und mit Holzstäbchen von ventral gestützt. Bei alten Tieren, die über 35 Gramm wogen, wurde zusätzlich der Kopf mit Hilfe von Kompressen 1 cm über die Horizontale gelagert, um eine Kompression der Halsgefäße und dadurch eine Durchblutungsstörung des Gehirns während der Operation zu verhindern und eine optimale Kraniotomie durchführen zu können. Die Augen wurden mit getränkten NaCl-Streifen bedeckt, um eine Austrocknung der Kornea zu verhindern. Das Operationsbesteck wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert, um weitestgehend aseptische Bedingungen zu gewährleisten und einer Infektion vorzubeugen.

Von diesem Zeitpunkt an wurde mit dem Operationsmikroskop, das auf 12-fache Vergrößerung eingestellt war, weiterpräpariert. Der Elektrokauter wurde auf folgende Werte

eingestellt: Cut auf Effekt: 1; Stärke: 30; GOAG auf Bipolar Stärke: 18. Der M. temporalis wurde am aurikulären Ansatzpunkt (X) (Abb. 2 D) mittels einer elektrischen Pinzette und Wassertropfen (H₂O) gelöst, aus dem Operationsfeld herausgeklappt und mit einer Klemme fixiert, so dass die darunter liegende Schädeldecke zum Vorschein kam (Abb. 2: E-F). Hierbei wurde auf die den Muskel und die Glandula parotis umgebenden Venen geachtet und diese geschont. Die A. cerebri media war jetzt mit ihrer Aufzweigung erkennbar, da sie durch die Schädeldecke hindurch scheint.

2.5.5.2 *Kraniotomie*

Für die folgenden Präparationsschritte wurde ein Operationsmikroskop mit einer bis zu 40-fachen Vergrößerung benötigt. Zuerst wurde das Operationsgebiet unter dem Operationsmikroskop auf 25-fache Vergrößerung eingestellt und alle nachfolgenden Schritte unter derselben Vergrößerung ausgeführt.

Bei der Durchführung der Kraniotomie im Bereich der arteriellen Aufzweigung wurde eine ausreichende, jedoch möglichst wenig vulnerable Drehkraft des Bohrers gewählt. Bei den Tiergruppen -ALT- wurde anfangs vorsichtig mit der Drehstärke 10 ausgefräst und dann im Verlauf auf Stärke 6 reduziert. Während des Bohrvorganges wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gekühlt, um das umgebende Gewebe vor Überhitzung zu schützen. Im Gegensatz dazu wurde bei den anderen Tiergruppen die gesamte Kraniotomie mit Drehstärke 6 durchgeführt. Das trepanierte Knochenstück wurde vorsichtig mit zwei kleinen Pinzetten zur Seite geklappt und die darunter liegende Dura mater entfernt. Hierbei war darauf zu achten, dass die Öffnung im Knochen ausreichend groß war, um sowohl den Stamm als auch die Seitenäste der A. cerebri media mit der Pinzette problemlos zu erreichen (Abb. 2: G-I). Die Blutstillung wurde mit sterilen Tupfern (Sugi ® Saugtupfer) durchgeführt.

2.5.5.3 *Gefäßverschluss und postoperative Behandlung*

Zum Verschluss der A. cerebri media wurde das Verfahren der direkten Elektrokoagulation (oder auch Elektrokauterisierung) mittels einer elektrischen Pinzette (Erbe Elektromedizin GmbH, ICC 50,72072 Tübingen, Deutschland) angewendet. Um die Gefahr einer intraoperativen Blutung und einer postoperativen Reperfusion auf ein Minimum zu reduzieren, wurde der Gefäßverschluss in fester Reihenfolge an drei Stellen durchgeführt: zuerst wurde der linke abgehende Arterienast, dann der rechte und anschließend der Gefäßstamm (ca. 3x1 sec lang) elektrokoaguliert (Abb. 2: G-K).

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

Postoperativ bekamen die Tiere, je nach Blutverlust und Gewicht, zum Flüssigkeitsausgleich eine intraperitoneale Injektion von 0,5 bis 0,8 ml NaCl 0,9%. Anschließend wurde das Tier zur Beobachtung für zwei Stunden in einen Käfig unter eine Wärmelampe gelegt. Es folgte eine tägliche neurologische Untersuchung bis zum Perfusionstag. Hierbei zeigten sich individuelle Unterschiede hinsichtlich der neurologischen Ausfälle, wie Extensionsdefizite der rechten Vorderpfote und Gangabweichung zur paretischen Seite. Diese Unterschiede waren gruppenunabhängig und zeigten keine Korrelation zur makroskopisch bestimmten Infarktgröße (Abb. 3: A-B). Die Wundheilung der Operationswunde verlief komplikationslos.

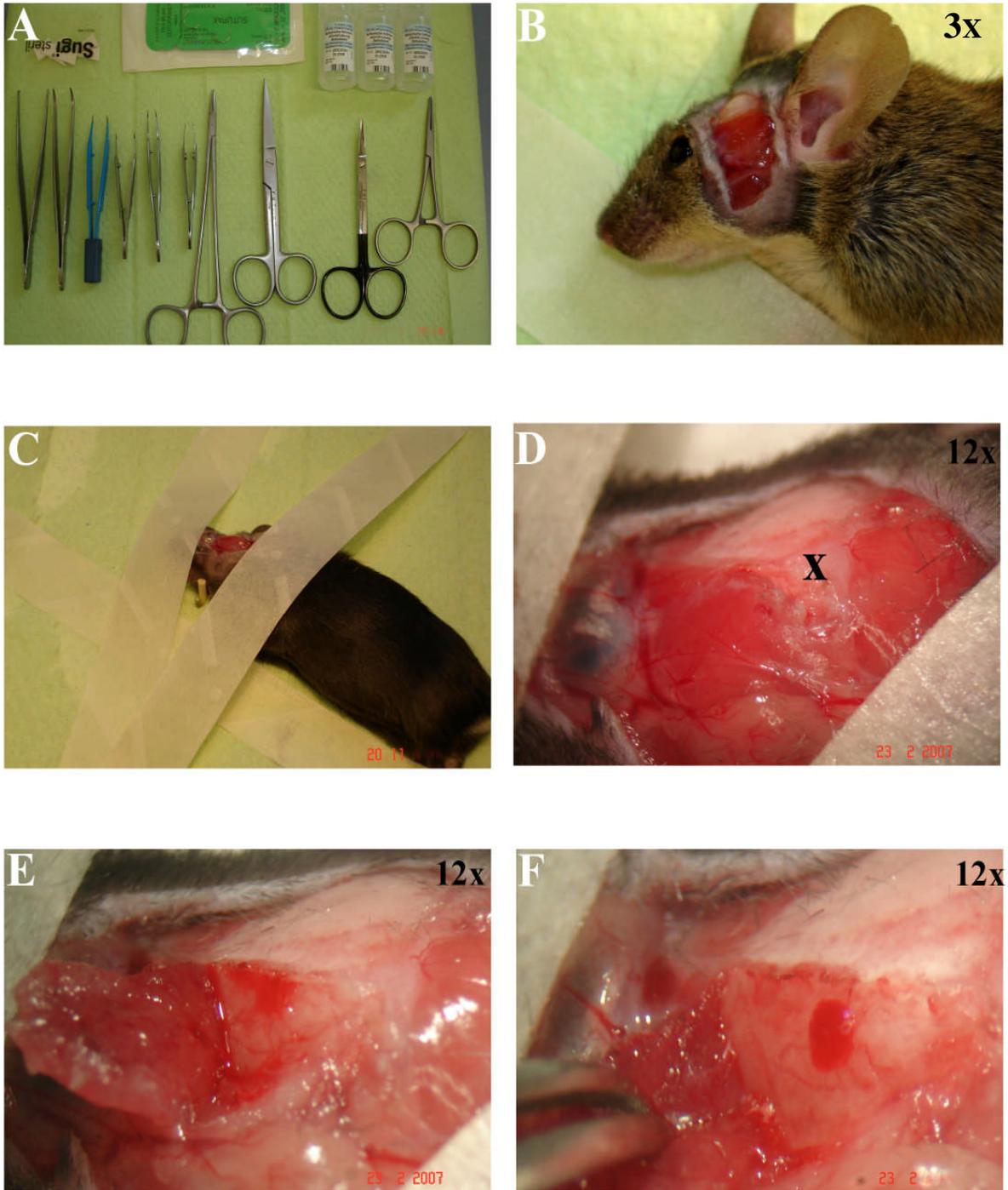


Abbildung 2 (A-F): Unterschiedliche Operationsschritte.

A: OP-Instrumente; B: Hautschnitt; C: Tierlagerung; D: OP-Feld; E-F: Freipräparation des M. temporalis am aurikulären Ansatzpunkt (X). Der Vergrößerungsfaktor ist jeweils oben rechts angegeben.

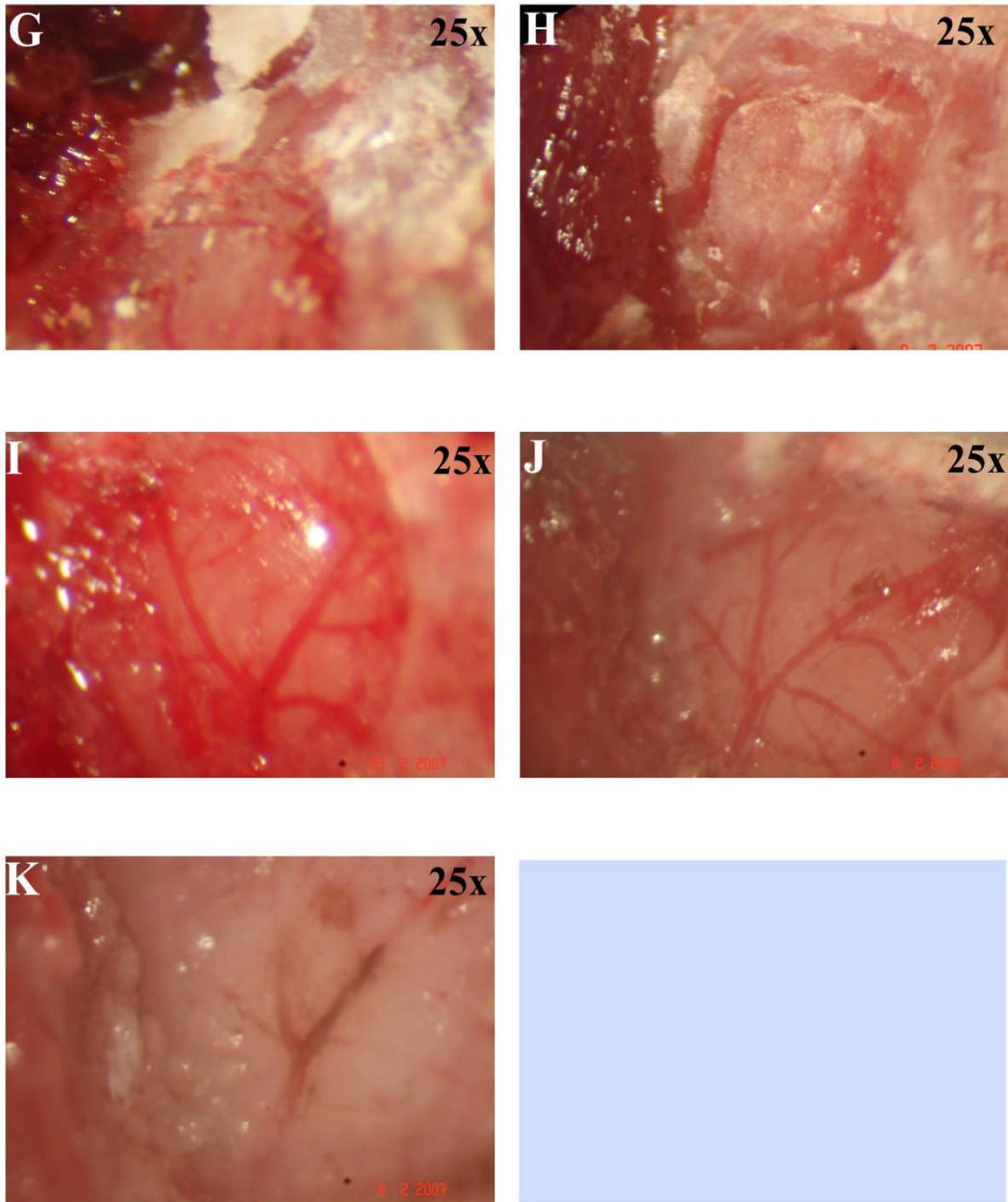


Abbildung 2 (G-K): *Unterschiedliche Operationsschritte.*

G-H: *Kraniotomie; I-J: Dura mater-Eröffnung; K: Elektrokoagulation. Der Vergrößerungsfaktor ist jeweils oben rechts angegeben (25X).*

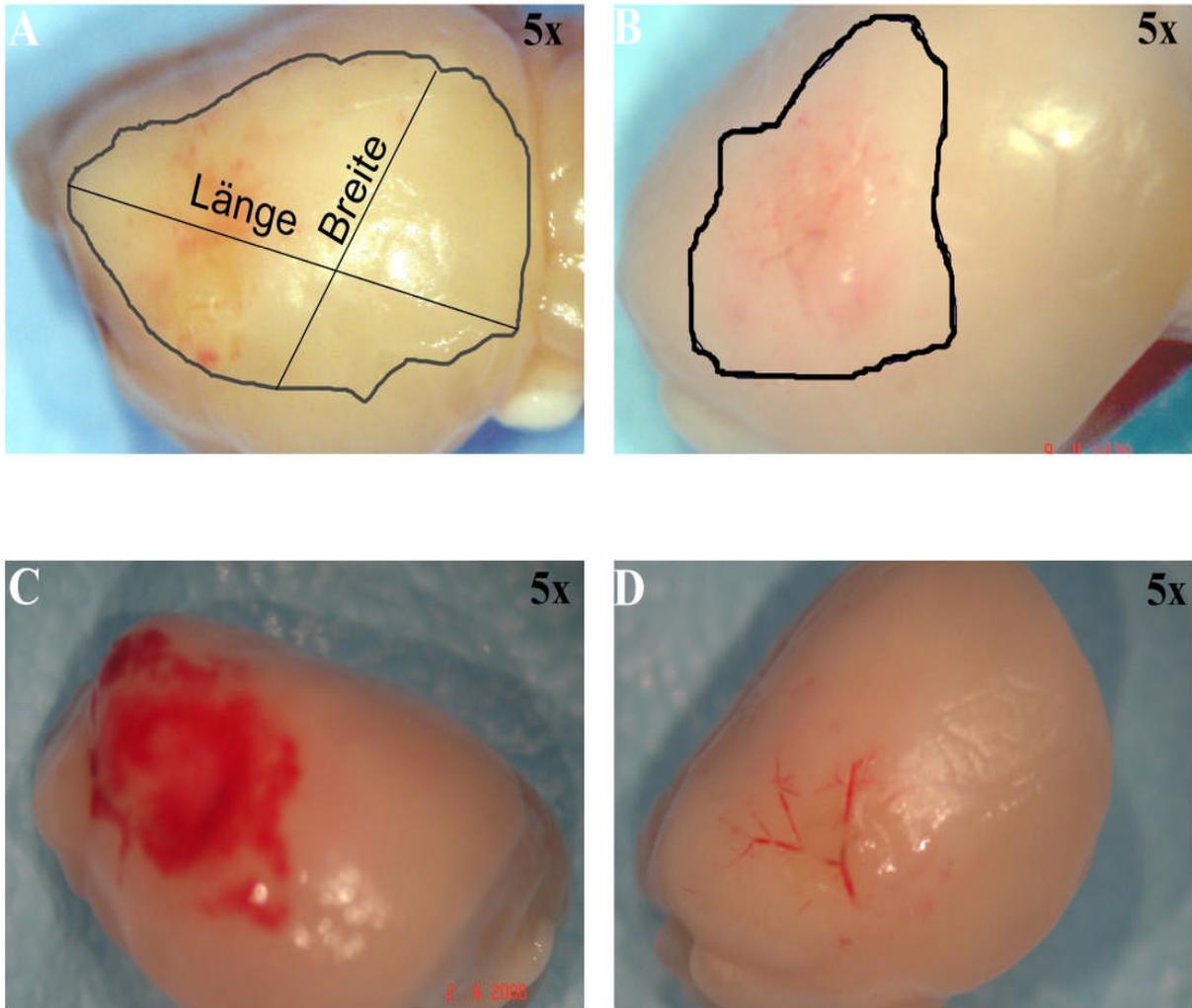


Abbildung 3 (A-D): Infarktareal: (A+B) Makroskopisch gemessene Infarktareale; C: Gehirn mit intrazerebraler Blutung, D: Erfolgreiche Koagulation. Der Vergrößerungsfaktor ist jeweils oben rechts angegeben (5X).

2.5.6 *Transkardiale Perfusion*

2.5.6.1 *Verwendete Instrumente*

| Instrument | Artikelnummer | Kontakt |
|---------------------------------|--------------------------------|--|
| Chirurgische Pinzette | No. 11023-10 | F.S.T., Fahrtgasse 7-13, D-69117 Heidelberg |
| Chirurgische Schere | No. 14002-13 No. 14059-11 | “ “ “ |
| Chirurgische Schere | No. 11-328-14 No. 11-102-11 | KLS Martin Group Ludwigstaler Str. 132, D-78532 Tuttlingen |
| Chirurgische Klemme | No. 13-15008 | “ “ “ |
| Chirurgische Klemme | No. Cs-5361 | Codman J & J Medical Oststrasse 1 D-22844 Norderstedt |
| Butterflykanüle | 21G, Ø 0,8 mm | Neofly®, Ohmeda AB, SE-25106 Helsingborg |
| Doppelspatel | No. E- 1375 | Neolab Rischerstr. 7-9 D- 69123 Heidelberg |
| Digital Messschieber | No. 1-0036 | “ “ “ |
| Kunststoffbeutel mit Verschluss | No. 1-7089 | “ “ “ |

Tabelle 4 : Die transkardiale Perfusion (verwendete Instrumente)

2.5.6.2 *Durchführung*

Die Tötung der Tiere durch transkardiale Perfusion wurde in tiefer Chloralhydrat-Narkose nach 72 Stunden durchgeführt. Die Dosis an Chloralhydrat betrug 15 µl pro 1 g Körpergewicht. Dies entsprach einer Steigerung auf das 1,5- bis 2-fache 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 in Rückenlage mit Klebestreifen fixiert, das Oberbauchfell mit einer chirurgischen Pinzette hochgezogen und durchtrennt, dann erfolgte die Eröffnung des Bauch- und Brustraumes. Der Brustkorb wurde beidseits nach lateral mobilisiert und kranial fixiert (Klemme: Cs-5361). Dabei wurde auf einen freien Flüssigkeitsstrom in den Kopfbereich geachtet. Nun wurde vorsichtig das Herz freigelegt und der rechte Vorhof dargestellt, möglichst unter Schonung der Lunge. Durch kleine Inzision (Schere: No 140002-13) wurde der rechte Vorhof eröffnet, so dass das Tier schnell ausblutete. Eine modifizierte Butterfly-Kanüle, bei der die scharfe Spitze abgetrennt worden war, wurde durch die minimal eröffnete Herzspitze im linken Ventrikel platziert und von außen fixiert (Klemme:13-15008). Der Kreislauf wurde mit 30 ml körperwarmem PBS durchspült, gefolgt von 30 ml auf 4° C gekühlte 4%-ige Paraformaldehydlösung, die der Fixation des Gewebes diente.

2.5.7 Entnahme des Gehirns

Der Kopf der Maus wurde vom Rumpf abgetrennt und das Fell entfernt. Die Schädelkalotte wurde vorsichtig über drei verschiedene Schnittführungen bis zum Bregma hin geöffnet: Zwei laterale Schnitte über dem Condylus occipitalis mit einer gebogenen Schere und ein medianer Schnitt in der Sutura sagittalis mit einer spitzen Schere. Der Schädelknochen wurde zu beiden Seiten hin aufgeklappt und entfernt. Das Gehirn wurde mit einem feinen Spatel sorgsam von seinen basalen Strukturen gelöst, aus der Kalotte entnommen und makroskopisch auf das Vorliegen eines Infarktes untersucht. Die makroskopisch nachgewiesenen Infarktareale wurden manuell mittels eines digitalen Messgerätes ausgemessen und dokumentiert. Die Gehirne, die makroskopisch und mit Hilfe einer zweifach vergrößernden Lupe keinen Infarkt aufwiesen oder eine intrazerebrale Blutung bekamen, wurden verworfen (Abb. 3). Alle anderen wurden für 24 Stunden in 4%-iger Paraformaldehydlösung, bei 4° C, zur Nachfixation aufbewahrt.

2.6 Aufarbeitung der Gehirne

Die gewonnenen Gehirne wurden, nachdem sie zur Nachfixation für 24 Stunden in 4%-iger Paraformaldehydlösung aufbewahrt worden waren, für weitere 48 Stunden in 30%-iger Saccharoselösung bis zu ihrer vollständigen Ausfällung bei 4° C entwässert.

Nach dieser Entwässerung wurden die Gehirne in kleinen luftdichten Kunststoffbeuteln, bei – 20° C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. In einem auf -18° C gekühlten Kryostaten (2800 Frigocut, Leica, D-35530 Wetzlar) wurden die Gehirne in 40 µm dünne, koronare Schnitte in rostro-kaudaler Richtung geschnitten. Mit Beginn des Infarktareals wurde für spätere Kresylviolett-färbungen jeder neunte und zehnte Schnitt mittels zweier Pinsel direkt auf zwei mit Gelatine beschichtete Glasobjektträger aufgetragen. Der achte Schnitt wurde auf unbeschichtete Objektträger gebracht (Direktabnahme). Die übrigen sieben Schnitte wurden in je ein Loch einer 24-Loch-Mikrotiterplatte überführt, in der sie freischwimmend in PBS mit einem 0,1%-igen Paraformaldehydgehalt bei 4° C für immunohistochemische Färbungen asserviert wurden. Dieses Schema wurde so lange beibehalten, bis das Ende des Infarktareals erreicht war. Im Durchschnitt wurden pro Maus 106 Schnitte hergestellt, davon 26 für Kresylviolett-färbung und 80 für spätere immunohistochemische oder biochemische Untersuchungen.

Diese Methode der Aufarbeitung hatte drei große Vorteile. Erstens können durch die räumliche Nähe der Schnitte sehr exakte Analysen und Aussagen z. B. über die Ausdehnung des Infarkts gemacht werden. Zweitens ist sie sehr materialschonend, d.h. die Versuchstier-

zahl konnte gering gehalten werden. Drittens wurde nur etwa ein Drittel der 106 Schnitte für die Untersuchungen benötigt, weshalb für weitere Untersuchungen im Rahmen neuer interessanter Fragestellungen noch Gehirnschnitte zur Verfügung stehen.

Alle Schnitte wurden nach dem Schneiden bis zur endgültigen Aufarbeitung bei -20°C in Objektträgerkästen asserviert.

2.7 Übersicht über die Versuchsgruppen und Fallzahlen

| JUNG | WT 1 | WT 2 | WT 3 | JNK 1 ko | JNK 2 ko | JNK 3 ko |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| N gesamt | 18 | 16 | 21 | 22 | 19 | 13 |
| N (morph. Vol) | 10 | 7 | 9 | 7 | 8 | 4 |
| N (morph. Fläche) | 10 | 7 | 12 | 9 | 8 | 6 |
| Alter MW in Tagen \pm SD | 114,6 \pm 38,5 | 122,2 \pm 14,7 | 73,4 \pm 16,9 | 106,4 \pm 53,9 | 81,0 \pm 22,5 | 86,0 \pm 0,0 |

| ALT | WT 1 | WT 2 | WT 3 | JNK 1 ko | JNK 2 ko | JNK 3 ko |
|-------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| N gesamt | 10 | 7 | 11 | 17 | 10 | 12 |
| N (morph. Vol) | 10 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| N (morph. Fläche) | 10 | 7 | 8 | 11 | 13 | 14 |
| Alter MW in Tagen \pm SD | 421,8 \pm 27,9 | 438,7 \pm 4,9 | 447,0 \pm 22,9 | 443,1 \pm 21,2 | 484,2 \pm 69,1 | 460,2 \pm 25,1 |

Tabelle 5: Übersicht über die Größe der Versuchsgruppen und der untersuchten Fallzahlen für die Infarktgrößenbestimmung. N gesamt: Zahl der operierten Tiere mit nachgewiesener Infarkt. N (morph. Vol): Eingeschlossene Tiere in die Infarktvolumenbestimmung. N (morph. Fläche): Ausgewertete Tiere an bestimmte Bregma-Koordinaten. Alter MW: Mittelwert des Alters der Tiere. SD: Standardabweichung

Es ist für jede Versuchsgruppe die Anzahl der operierten Tiere mit nachgewiesener Infarkt angegeben (N gesamt) und die Anzahl derer, die davon in die Infarktvolumenbestimmung N (morph. Vol) eingegangen sind. Ebenfalls ist die Anzahl der Tiere aufgeführt, bei denen ein direkter Vergleich des prozentualen Anteils des Infarktareals an vier definierten stereotaktischen Koordinaten nach Paxinos (Bregma: + 1,02 mm; - 0,58mm; - 1,78 mm; - 2,18 mm) durchgeführt wurde N (morph. Fläche). Weiterhin wurde der Mittelwert des Alters der jeweiligen Versuchsgruppe aufgeführt.

2.8 Morphometrie

Um eine Aussage über die Größe und Beschaffenheit der Infarkte treffen zu können, wurden die Gehirnschnitte zuerst einer morphologischen Färbung unterzogen. Danach konnte die Ausdehnung des Infarktareals gemessen werden.

2.8.1 Kresylviolett-färbung

Als morphologische Färbung der Hirnschnitte wurde die Kresylviolett-färbung verwendet, da diese Färbung die Unterscheidung zwischen infarziertem und intaktem Gewebe möglich macht. Sie färbt basophile Bestandteile an, so z. B. das Chromatin des Zellkerns oder die Nissl-Substanz (Schollen aus rauhem endoplasmatischen Retikulum) in Neuronen.

Folgende Materialien wurden zur Färbungsdurchführung benötigt: ein Objektträgerständer, mehrere Glasgefäße für die Färbereagenzien, eine feine Pinzette, Deckgläschen und Färbereagenzien. Als Färbelösung wurde 0,1% Kresylviolettacetatlösung verwendet. Die bei -20° C eingefrorenen, auf beschichtete Objektträger gezogenen Hirnschnitte wurden vor der Färbung für mindestens 45 Minuten unter dem Abzug zum Auftauen gebracht. Dann wurde der Objektträgerständer mit den Objektträgern in das jeweilige Gefäß nach folgendem Färbungsprotokoll eingetaucht:

| Färbeschritt | Zeit |
|-----------------------------|-------------|
| 1. Aqua bidest. | 1 Minute |
| 2. Ethanol, absolut | 3 Minuten |
| 3. Xylol | 15 Minuten |
| 4. Ethanol, absolut | 3 Minuten |
| 5. Aqua bidest. | 1 Minute |
| 6. Kresylviolettlösung | 5 Minuten |
| 7. Aqua bidest. | 1 Minute |
| 8. Alkohol-Essigsäurelösung | 10 Sekunden |
| 9. Aqua bidest. | 1 Minute |

Table 6: Färbeprotokoll der Kresylviolett-färbung.

Nachdem die gefärbten Objektträger getrocknet waren, wurden sie mit Hilfe des Schnelleindeckmittels Pertex (Pertex®, medite, 38272 Burgdorf, Deutschland) mit den Deckgläschen versehen.

2.8.2 *Infarktgrößenbestimmung*

Die histologischen Schnitte wurden mit dem Flachbrettscanner (HP scanjet 3800, FCLSD-0512, China) gescannt und digitalisiert. Die Dateien des Scans wurden in das Bildverarbeitungsprogramm Microsoft Picture It Foto Premium 10 eingelesen und im bmp-Datenformat auf der Festplatte abgespeichert. Die Messung der Infarktgröße wurde mit Hilfe der Bildanalyse-Software Image J (Image J 1,25s; National Institutes of Health, USA) durchgeführt. Vor jeder Messung erfolgte die gleiche standardisierte Kalibrierung des Systems durch Nutzung eines gescannten Millimeterpapiers und eines festen Maßstabs (Distance: 38,01 Pixel, Markierungsabschnitte: 5 mm, globale Fläche: 25 mm²).

2.8.3 *Einlesen der Hirnschnitte*

Um das gesamte Infarktvolumen zu bestimmen, wurden pro Tier 12 mit Kresylviolett gefärbte, koronare Hirnschnitte gesammelt, die in Abbildung 4 dargestellt und durch folgende stereotaktische Koordinaten nach Paxinos (Paxinos 1990) definiert sind (in rostro-kaudaler Orientierung) :

| | | | | | |
|-----------|--------|----------|------------|--------|----------|
| Schnitt 1 | Bregma | +1,42 mm | Schnitt 7 | Bregma | -0,98 mm |
| Schnitt 2 | Bregma | +1,02 mm | Schnitt 8 | Bregma | -1,38 mm |
| Schnitt 3 | Bregma | +0,62 mm | Schnitt 9 | Bregma | -1,78 mm |
| Schnitt 4 | Bregma | +0,22 mm | Schnitt 10 | Bregma | -2,18 mm |
| Schnitt 5 | Bregma | -0,18 mm | Schnitt 11 | Bregma | -2,58 mm |
| Schnitt 6 | Bregma | -0,58 mm | Schnitt 12 | Bregma | -2,98 mm |

Von jedem Tier wurden dann vier Hirnschnitte (a, b, c, d) bestimmter anatomischer Regionen ausgewählt, um eine Analyse der Infarktausdehnung in diesen definierten Bregma-Koordinaten zu machen.

| | | | | | |
|-----------|--------|----------|-----------|--------|----------|
| Schnitt a | Bregma | +1,02 mm | Schnitt c | Bregma | -1,78 mm |
| Schnitt b | Bregma | -0,58 mm | Schnitt d | Bregma | -2,18 mm |

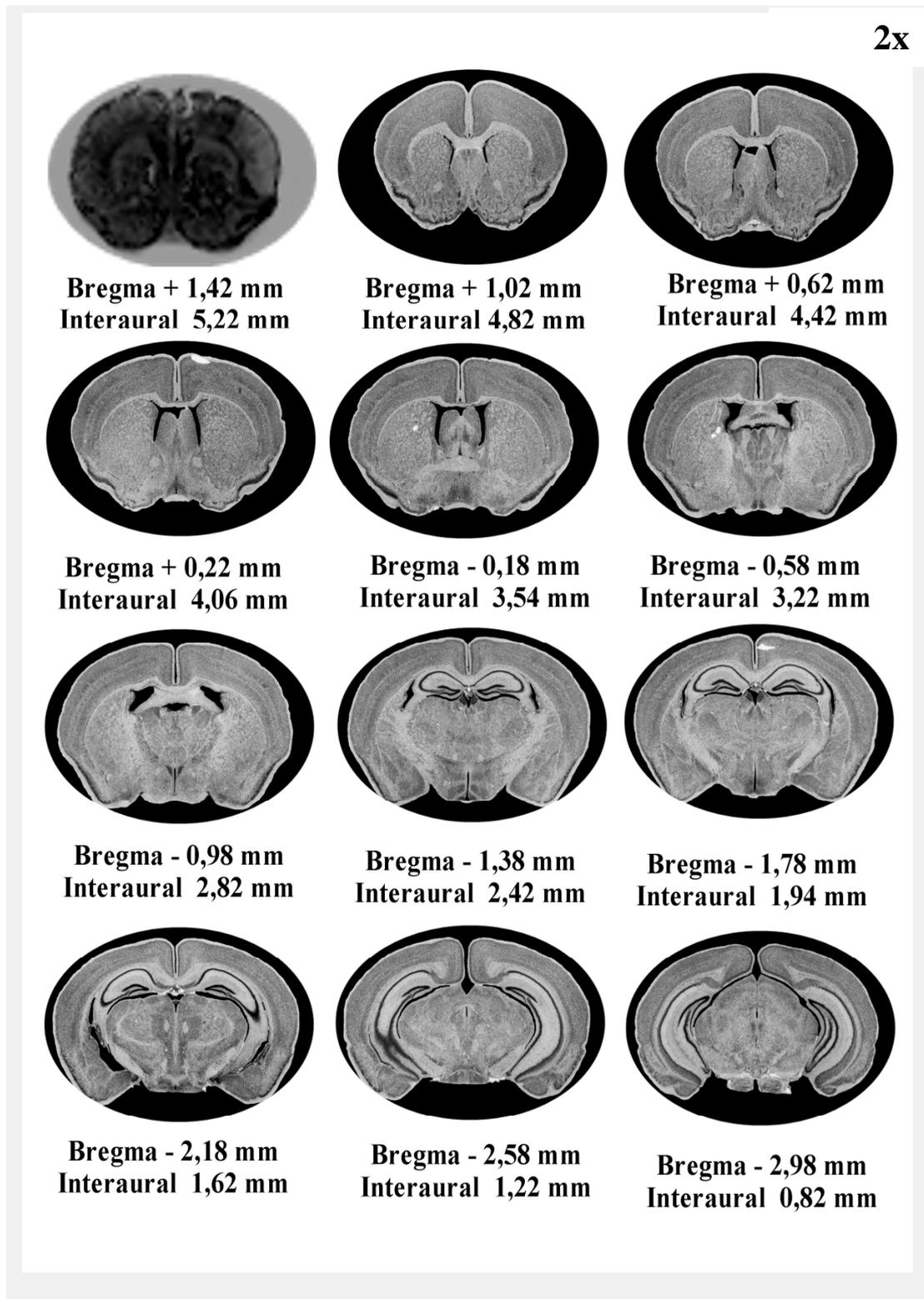


Abbildung 4: Darstellung der untersuchten anatomischen Schnittebenen in kranio-kaudaler Orientierung. 2x = Der Vergrößerungsfaktor.

2.8.4 Messung der Infarktgröße (Volumetrie)

2.8.4.1 Bestimmung des gesamten Infarktvolumens

Die Messung der Infarktgröße wurde mit Hilfe der vorher erwähnten Bildanalyse-Software Image J durchgeführt. Nach Kalibrierung des Messsystems wurden die vorher eingelesenen Bilder des jeweiligen Tieres in diesem Programm aufgerufen, auf dem Bildschirm dargestellt und gleichzeitig wurde der entsprechende Objektträger bei 300% Vergrößerung betrachtet. So war es möglich, bestimmte Bereiche des Hirnschnittes wie z. B. den Verlauf der Infarktgrenze, genauer beurteilen zu können. Innerhalb des Programms wurden zur Bestimmung der Infarktgröße die unterschiedlichen Messschritte genau beachtet und die Polygon-Funktion benutzt. Es wurden für jede koronare Schicht folgende Größen gemessen und gespeichert (Abb. 5):

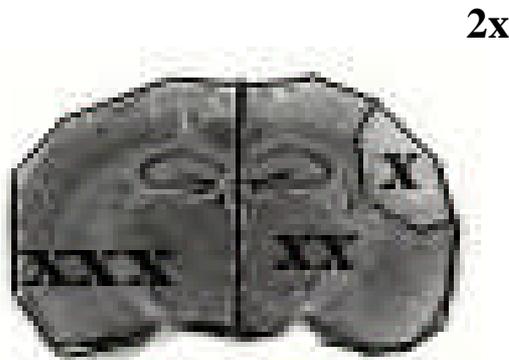


Abbildung 5: Schematische Darstellung der gemessenen Größen zur Berechnung und Bestimmung des Infarktvolumens. 2X = Der Vergrößerungsfaktor.

- X : Areal c: direkte Läsionsfläche
- XX : Areal b: nicht-infarzierte Fläche der ipsilateralen Hemisphäre
- XXX : Areal a: nicht-infarzierte kontralaterale Hemisphärenfläche
- Areal i: indirekte Läsionsfläche = Areal a - Areal b (XXX – XX)

Danach wurden zwei Messmethoden verwendet, um die totalen Infarktvolumina in mm^3 zu berechnen:

- 1) **Totales Infarktvolumen Direkt (Tot. Dir) $\text{mm}^3 = \sum (\text{Areal } c_{(1,n)}) \times 0,36$**
- 2) **Totales Infarktvolumen Indirekt (Tot. Ind) $\text{mm}^3 = \sum (\text{Areal } i_{(1,n)}) \times 0,36$**

Um die unterschiedlichen Größen der Gehirne zu beurteilen, wurden die Hirnvolumina der nicht infarzierten rechten Hemisphäre berechnet:

$$\text{Noninfarkt } R_h \text{ Vol. (mm}^3) = \sum (\text{Areal } a_{(1,n)}) \times 0,36$$

Die Abschnitte Areal a_{1,2,3...n}, Areal b_{1,2,3...n} und Areal c_{1,2,3...n} sind Schnitte mit Infarktarealen, wobei Areal₁ und Areal_n der erste und der letzte Schnitt mit Infarktareal sind.

0,36 mm = Abstand zwischen den Schnitten = 9 x 40 µm = 360 µm

2.8.4.2 Prozentualer Anteil des Läsionsvolumens und Gewebsverlust

Mit Hilfe des prozentualen Anteils des Läsionsvolumens (pIV) schließt man Störgrößen, wie beispielweise die unterschiedlichen Größen der Gehirne oder den Gewebsverlust im Infarktgebiet, aus der Berechnung der Infarktvolumina aus. Es handelt sich um einen prozentualen Wert, der den Infarkt als Anteil der kontralateralen Gehirnhälfte angibt. Er lässt sich wie folgt berechnen:

$$pIV = (HV_K - HV_b) / HV_k \cdot 100$$

pIV = der prozentuale Anteil der Läsionsvolumens

HV_k = das kontralaterale Hemisphärenvolumen

HV_b = das nicht-infarzierte Volumen der ipsilateralen Hemisphäre

Das Gewebeverlustvolumen wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$GVs (mm^3) = \sum [HV_k - (HV_b + LV_d)]$$

GVs : Das Gewebeverlustvolumen in mm³

LV_d : Das direkte gemessene Läsionsvolumen.

2.9 Kontrolle der Messmethode

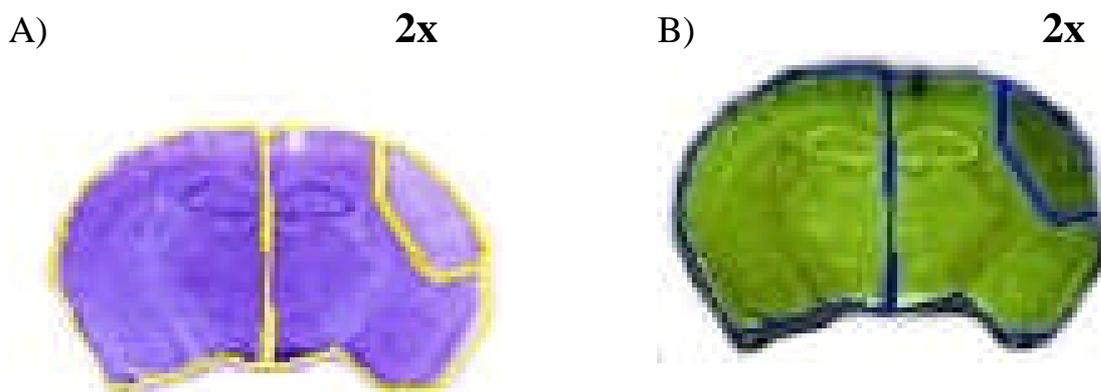


Abbildung 6: A) Gemessene Flächen in Kresylviolett-färbung. B) Gemessene Flächen im negativen erzeugten Bild. 2X = Der Vergrößerungsfaktor.

Unter Verwendung der Bildanalyse-Software Image J wurden wie vorher erwähnt die erfassten Daten für jeden coronaren Schnitt planimetriert und dokumentiert.

Um eine Aussage über diese Messmethode treffen zu können, wurden zur Kontrolle dieser Messverfahren 13 Tiere zweimal mit der Bildanalyse-Software Image J bewertet. Hierbei wurden die Hirnschnitte bei der ersten Messung in originalen Kresylviolett-färbungen bewertet (Infarktvolumen KV ; Abb. 6: A). Die zweite Messung wurde mit den erzeugten negativen Bildern durch das Bildverarbeitungsprogramm Microsoft Picture It Foto Premium 10 (Infarktvolumen NB ; Abb. 6: B) durchgeführt.

Mit Hilfe der beiden Messungen konnte der Verhältnisfaktor α für die direkten und indirekten gemessenen Infarktvolumina nach der folgenden Formel berechnet werden.

$$\text{Verhältnisfaktor } \alpha_{Dir} = \frac{\text{Totales Infarktvolumen Direkt }_{KV} (\text{Tot. Dir }_{KV}) \text{ mm}^3}{\text{Totales Infarktvolumen Direkt }_{NB} (\text{Tot. Dir }_{NB}) \text{ mm}^3}$$

$$\text{Verhältnisfaktor } \alpha_{Ind} = \frac{\text{Totales Infarktvolumen Indirekt }_{KV} (\text{Tot. Ind }_{KV}) \text{ mm}^3}{\text{Totales Infarktvolumen Indirekt }_{NB} (\text{Tot. Ind }_{NB}) \text{ mm}^3}$$

Dadurch konnte man feststellen, ob es zu einer großen Streubreite der morphometrischen erhobenen Infarktvolumen-Daten bei wiederholten Messungen der gleichen Schnitte mit anderen Färbungen gekommen ist. Es sollte auch gezeigt werden, dass das ausgewählte Messverfahren mittels der Bildanalyse –Software Image J genaue Messwerte lieferte.

2.10 Variabilität der *A. cerebri media*

Im Rahmen der pMCAO wurde bei allen Versuchsgruppen nach der Kraniotomie der anatomischen Verlauf der *A. cerebri media* und ihrer Äste sorgfältig unter mikroskopischer Sicht inspiziert. Daneben wurde die Relation zwischen MCA und der *V. cerebri inferior* dokumentiert und anschließend mit einer digitalen Kamera-Sony W15- fotografiert. Die Bilder wurden mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramm Microsoft Picture It Foto Premium 10 eingelesen und bearbeitet.

Da eine einheitliche Nomenklatur für die zerebrale Gefäße der Maus fehlt und Mäuse phylogenetisch ähnlich zu Ratten sind (beide gehören zu der Subfamilie Murinea der Suprafamilie Muroidea (Wilson und Reeder, 2006), haben wir bei der Benennung und Identifikation der MCA-Äste (Abb. 7) des gut untersuchten anatomischen zerebralen Vaskulärsystems

der Ratte zu Hilfe gezogen und als Leitlinie benutzt (Scremin, 1995). Es wurde auch die dreidimensionale zerebrale Gefäßnomenklatur von der CBA Maus berücksichtigt (Dorr et al., 2007).

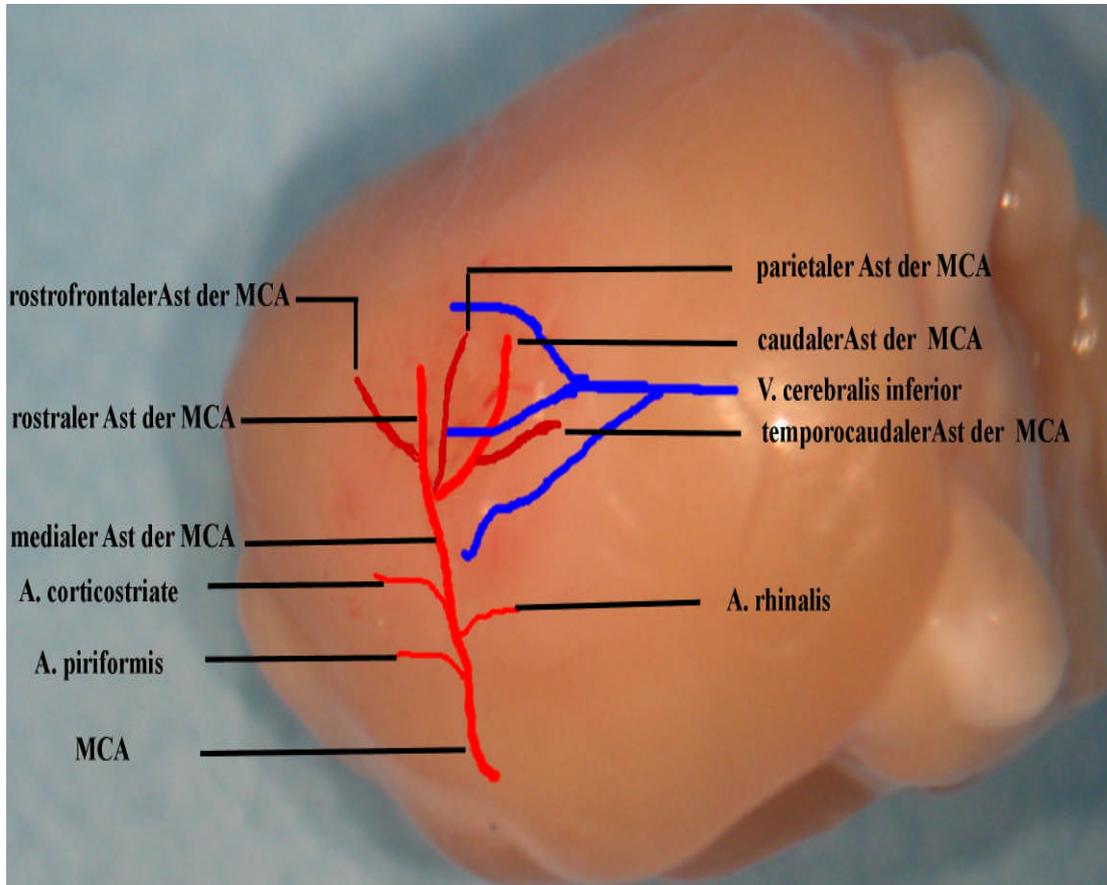


Abbildung 7: Gehirnoberfläche mit der anatomischen Lokalisation der MCA, mit ihren Haupt- und Nebenästen sowie begleitenden Venen.

2.11 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden folgende Testverfahren herangezogen und mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS[®] für Windows (Standardversion 11.5.1, SPSS) ausgewertet. Die Daten sind als Mittelwert \pm □ Standardabweichung präsentiert.

Nicht-parametrische Werte, wie die subarachnoidale Blutung oder die Anzahl der gestorbenen Tiere bis zum Zeitpunkt der Perfusion, wurden bei dem Chi²-Test (X²-Test) analysiert.

Die Signifikanzen der prozentualen Anteile des Läsionsvolumens (pIV) und die Hirnvolumina der kontralateralen Hemisphären (Ko.Hem.Vol.) wurden mittels ANOVA Varianzanalyse berechnet. Danach wurden die einzelnen Gruppen einem post-hoc Vergleich mit der Scheffe-Methode unterzogen, wenn sich signifikante Unterschiede mit ANOVA herausgestellt hatten.

Der gepaarte t-Test wurde für den Vergleich zwischen den gemessenen direkten und indirekten Infarkt volumina angewendet. Als statistisch signifikant wurden p - Werte $< 0,05$ gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Komplikationen und Mortalität durch die MCAO

| A | | | | | | |
|--|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| JUNG | WT1 | WT2 | WT3 | JNK1 ko | JNK2 ko | JNK3 ko |
| N gesamt | 26 | 22 | 26 | 27 | 26 | 18 |
| Tod | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 |
| SAB | 3 | 0 | 2 | 4 | 1 | 0 |
| Kein Infarkt | 5 | 6 | 3 | 0 | 4 | 3 |
| Gewicht präoperativ (g) ± SD | 28,8 ± 3,6 | 26,5 ± 1,4 | 27,8 ± 3,1 | 25,3 ± 3,8 | 25,6 ± 2,4 | 33,4 ± 1,9 |
| Gewicht postoperativ (g) ± SD | 27,7 ± 3,3 | 25,3 ± 1,3 | 25,6 ± 2,5 | 24,8 ± 3,9 | 24,1 ± 2,5 | 30,9 ± 1,8 |
| Gewichtsverlust in % | 3,9 | 4,6 | 7,9 | 3,1 | 5,9 | 7,3 |
| Infarktfläche (mm ²) ± SD | 18,6 ± 7,9 | 12,1 ± 3,4 | 17,9 ± 7,9 | 15,9 ± 4,2 | 16,2 ± 6,0 | 21,9 ± 11,9 |

| B | | | | | | |
|--|---------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| ALT | WT1 | WT2 | WT3 | JNK1 ko | JNK2 ko | JNK3 ko |
| N gesamt | 18 | 13 | 12 | 20 | 18 | 17 |
| Tod | 1 | 2 | 0 | 2 | 3 | 0 |
| SAB | 3 | 2 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| Kein Infarkt | 4 | 6 | 1 | 0 | 4 | 5 |
| Gewicht präoperativ (g) ± SD | 39,4 ± 3,5 | 32,9 ± 3,0 | 39,4 ± 6,4 | 30,4 ± 1,7 | 37,5 ± 3,7 | 43,7 ± 6,3 |
| Gewicht postoperativ (g) ± SD | 35,9 ± 3,2 | 31,1 ± 2,7 | 37,1 ± 6,7 | 28,3 ± 1,8 | 34,0 ± 3,1 | 40,2 ± 6,6 |
| Gewichtsverlust in % | 9,2 | 3,4 | 5,9 | 7 | 8,8 | 8 |
| Infarktfläche (mm ²) ± SD | 19,7 ± 5,9 | 14,6 ± 10,1 | 19,7 ± 10,3 | 22,3 ± 8,8 | 21,5 ± 8,4 | 22,9 ± 6,7 |

Tabelle 7 (A-B): Übersicht aller Komplikationen und Mortalität durch die MCAO bei den Gruppen „JUNG“ und „ALT“; N gesamt = Anzahl der operierten Tieren, Tod = Anzahl der gestorbenen Tieren bis zum Zeitpunkt der Perfusion, SAB = Subarachnoidalblutung, Kein Infarkt = Anzahl der Operierten Tieren ohne makroskopisch nachweisbare Infarkt, Infarktfläche Makro (mm²) = manuell gemessene Infarktfläche mit dem Digitalmessgerät ist als Mittelwert angegeben. SD: Standardabweichung.

Von den insgesamt 145 operierten Tieren der Gruppe „JUNG“ wurden folgenden Daten erfasst:

- 3,5% überlebten die MCAO nicht bis zum Zeitpunkt der Perfusion
- 6,9% der operierten Tiere bekamen eine Subarachnoidalblutung (SAB) und wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

- 14,5% der operierten Tiere entwickelten trotz unauffälligen Operationsverlaufes keinen Infarkt und konnten daher nicht in die Auswertung aufgenommen werden.

Insgesamt wurden 98 Tiere der Gruppe „ALT“ operiert mit folgender Feststellung:

- 7,1% überlebten die MCAO nicht bis zum Zeitpunkt der Perfusion
- bei 8,2% der operierten Tieren kam es zu SAB
- 20,4 % zeigten keinen Infarkt.

Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen „JUNG“ vs. „ALT“ ($p > 0,05$) im bezug auf die Sterblichkeitsrate $p = 0,096$, Subarachnoidalblutung $p = 0,447$ und das Fehlen des Infarktes $p = 0,150$. Bei der statistischen Untersuchung aller negativen Ereignisse zusammen (Tod + SAB + Fehlen des Infarktes) zeigte sich ebenfalls keine Signifikanz $p = 0,06$.

Aufgrund nur sehr geringer Abweichungen bezüglich des Körpergewichtes innerhalb der zwölf Versuchsgruppen kann von einer homogenen Tiergruppe ausgegangen werden. Hierbei wurde hinsichtlich Alter und Gewichtszunahme Folgendes festgestellt:

- Bei der Kontrollgruppe WT2 wurde im Alter eine deutlich niedrigere Gewichtszunahme von 21,5% im Vergleich zu WT1 37,5% und WT3 41,7% beobachtet.
- Bei den Knock-out Tieren zeigte JNK1 ko ein Gewichtswachstum bei adulten Tieren von 18,7% und damit deutlich geringer als JNK2 ko 45,4% und JNK3 ko 30,8%.
- Drei Tage nach der pMCAO wurden Gewichtsverluste zwischen 3% und 10% in beiden Gruppen beobachtet.

3.2 Infarktvolumen der einzelnen Tiergruppen 3 Tagen nach pMCAO

3.2.1 Räumliche Ausdehnung des Infarktareals

Im folgenden Abschnitt soll die räumliche Ausdehnung der Infarkte bei den unterschiedlichen Genotypen und Gruppen beschrieben werden.

In den Abbildungen (8-11) wurden für einige der Versuchsgruppen repräsentative Infarkte dargestellt. Alle Abbildungen wurden mit Hilfe des Fotoprogrammes Image J angefertigt. Dabei sind die 12 Schnittebenen in rostro-kaudaler Orientierung angeordnet, die kortikalen Defekte stellten sich als dunklere Areale dar. Es handelt sich um Genotypen WT1, -2,-3 und JNK1, -2,-3 ko mit den beiden Gruppen „JUNG“ und „ALT“.

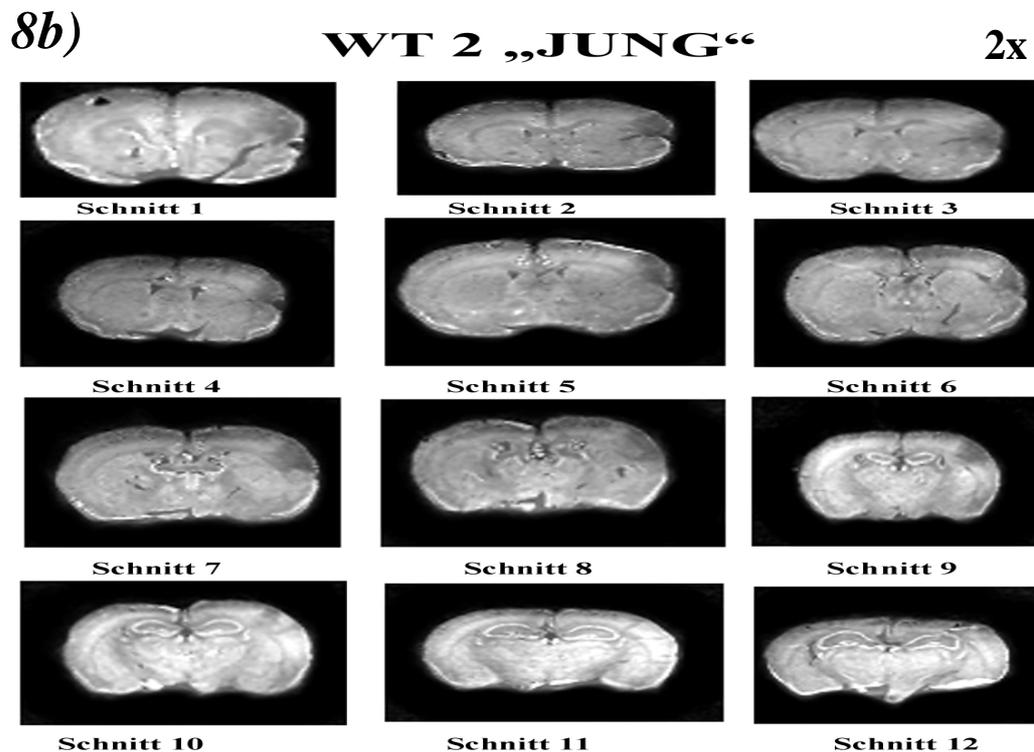
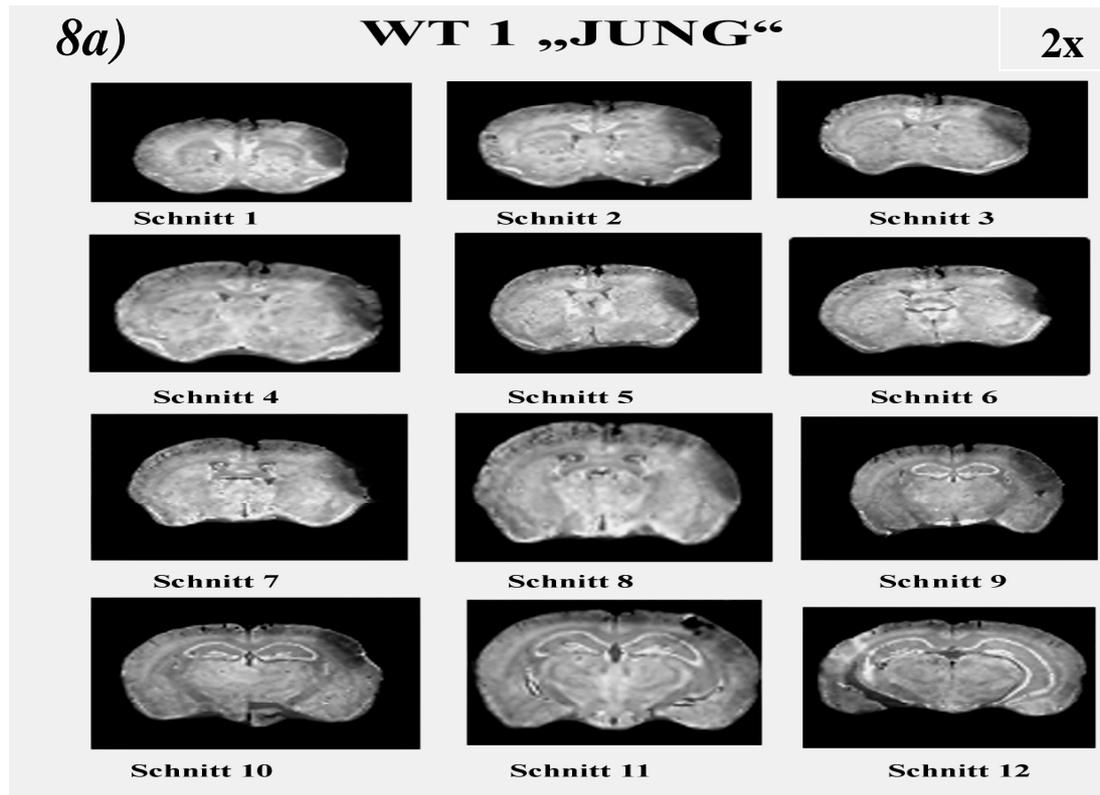


Abbildung 8 (a-b): Rostro-kaudale Infarktausdehnung bei den Genotypen WT1, -2 für die Gruppe „JUNG“ drei Tage nach pMCAO. Der Vergrößerungsfaktor ist Oben rechts angegeben.

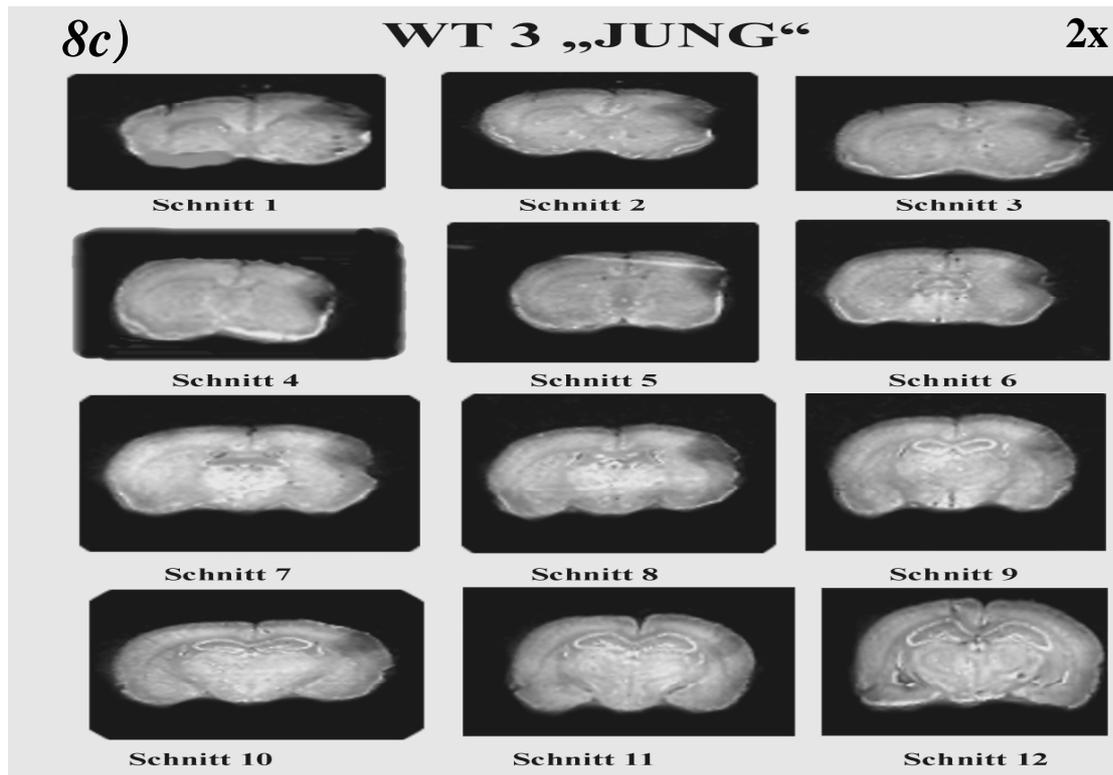
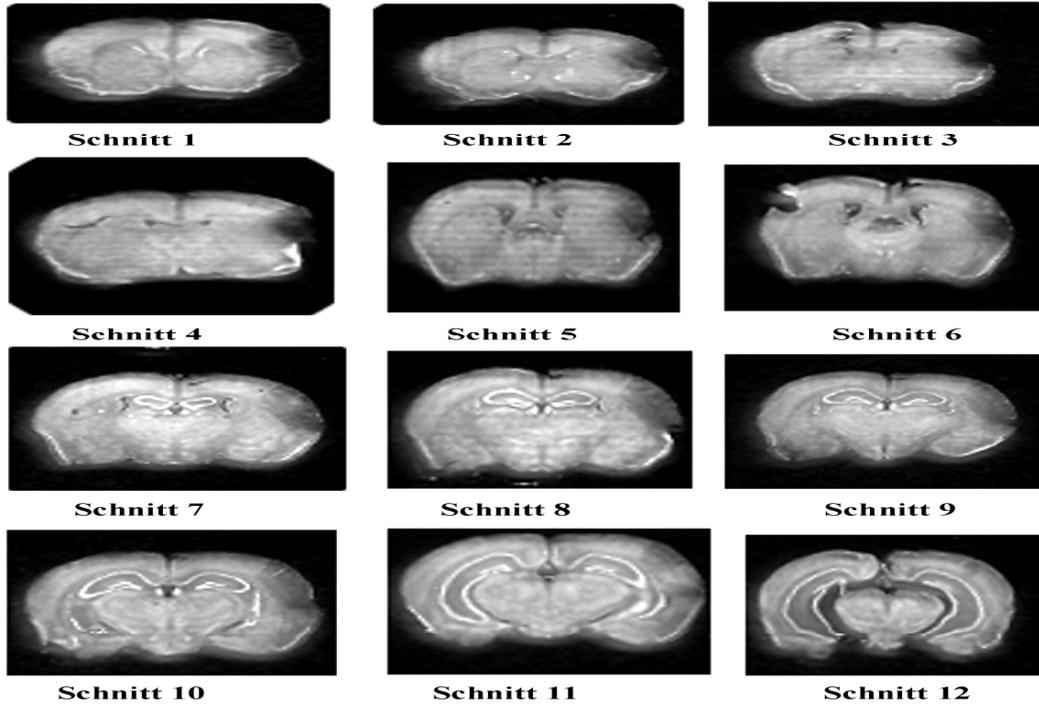


Abbildung 8 c: Rostro-kaudale Infarktausdehnung bei den Genotyp WT3 für die Gruppe „JUNG“ drei Tage nach pMCAO. Der Vergrößerungsfaktor ist oben rechts angegeben.

9a) JNK 1 ko „JUNG“ 2x



9b) JNK 2 ko „JUNG“ 2x

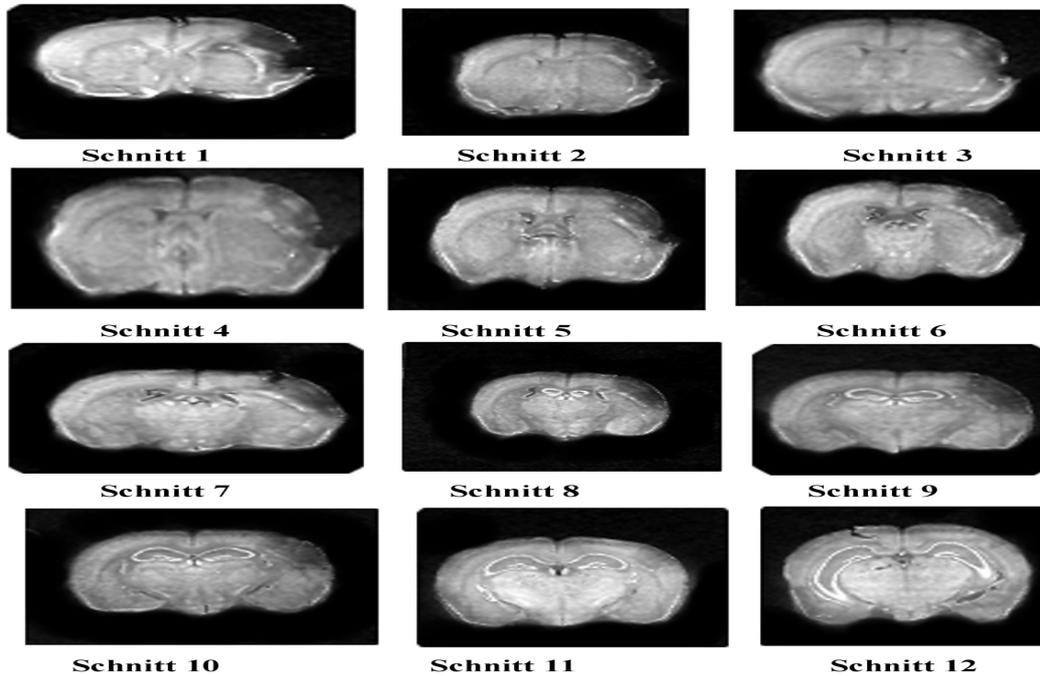


Abbildung 9 (a-b): Rostro-kaudale Infarktausdehnung bei den Genotypen JNK1 ko, -2 ko für die Gruppe „JUNG“ drei Tage nach pMCAO. Der Vergrößerungsfaktor ist oben rechts angegeben.

9c) JNK 3 ko „JUNG“ 2x

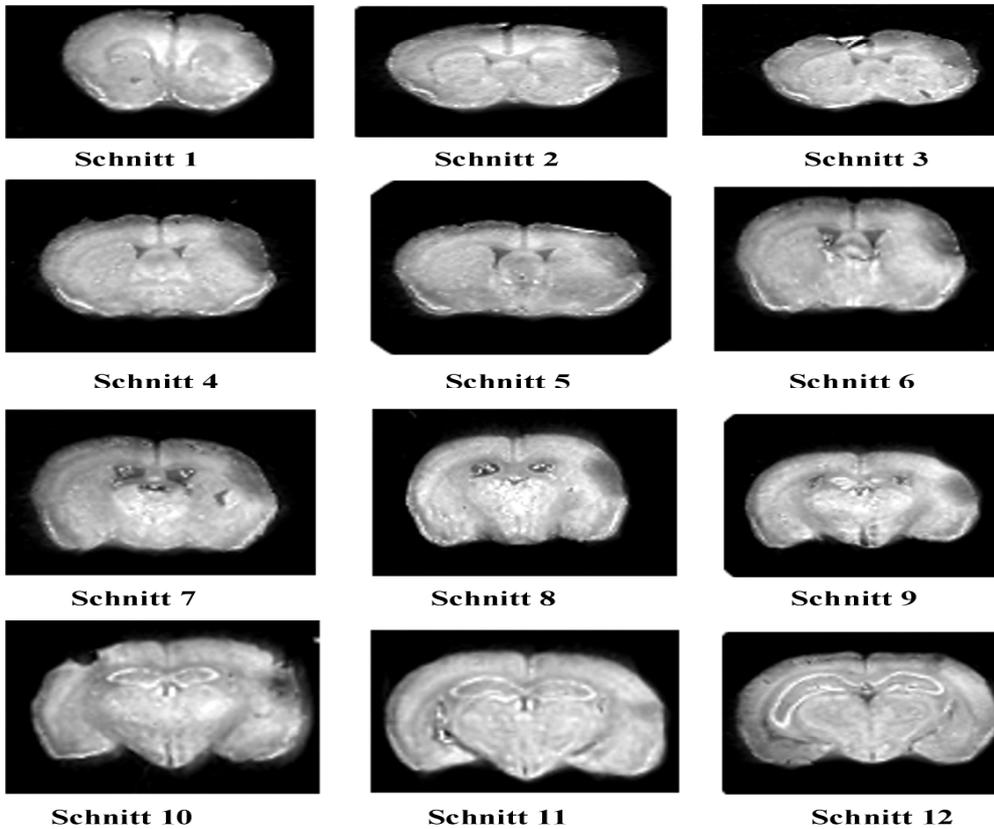
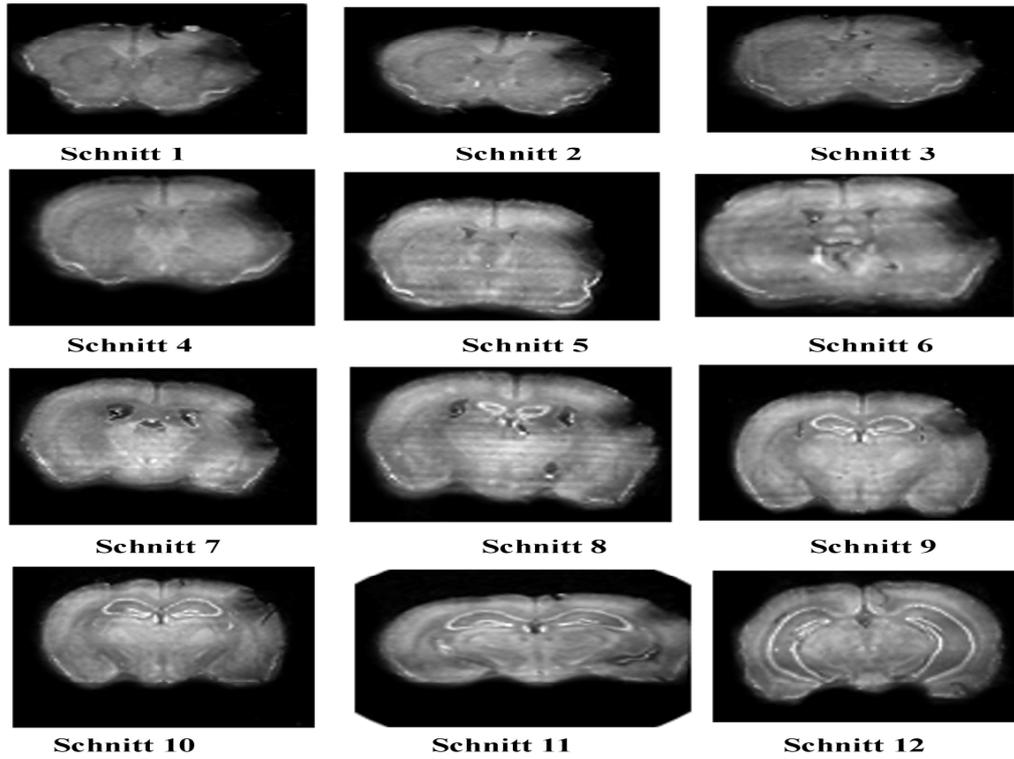


Abbildung 9 c: Rostro-kaudale Infarktausdehnung bei den Genotyp JNK3 ko, für die Gruppe „JUNG“ drei Tage nach pMCAO. Der Vergrößerungsfaktor ist oben rechts angegeben.

10a) WT 1 „ALT“ 2x



10b) WT 2 „ALT“ 2x

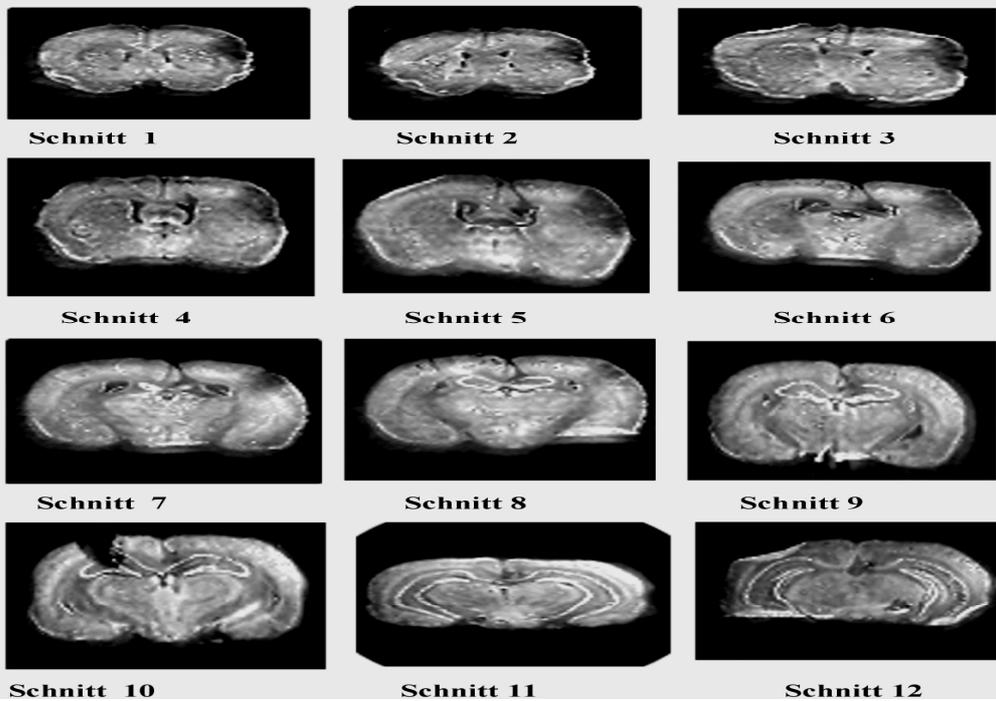


Abbildung 10 (a-b): Rostro-kaudale Infarktausdehnung bei den Genotypen WT1, -2 für die Gruppe „ALT“ drei Tage nach pMCAO. Der Vergrößerungsfaktor ist oben rechts angegeben.

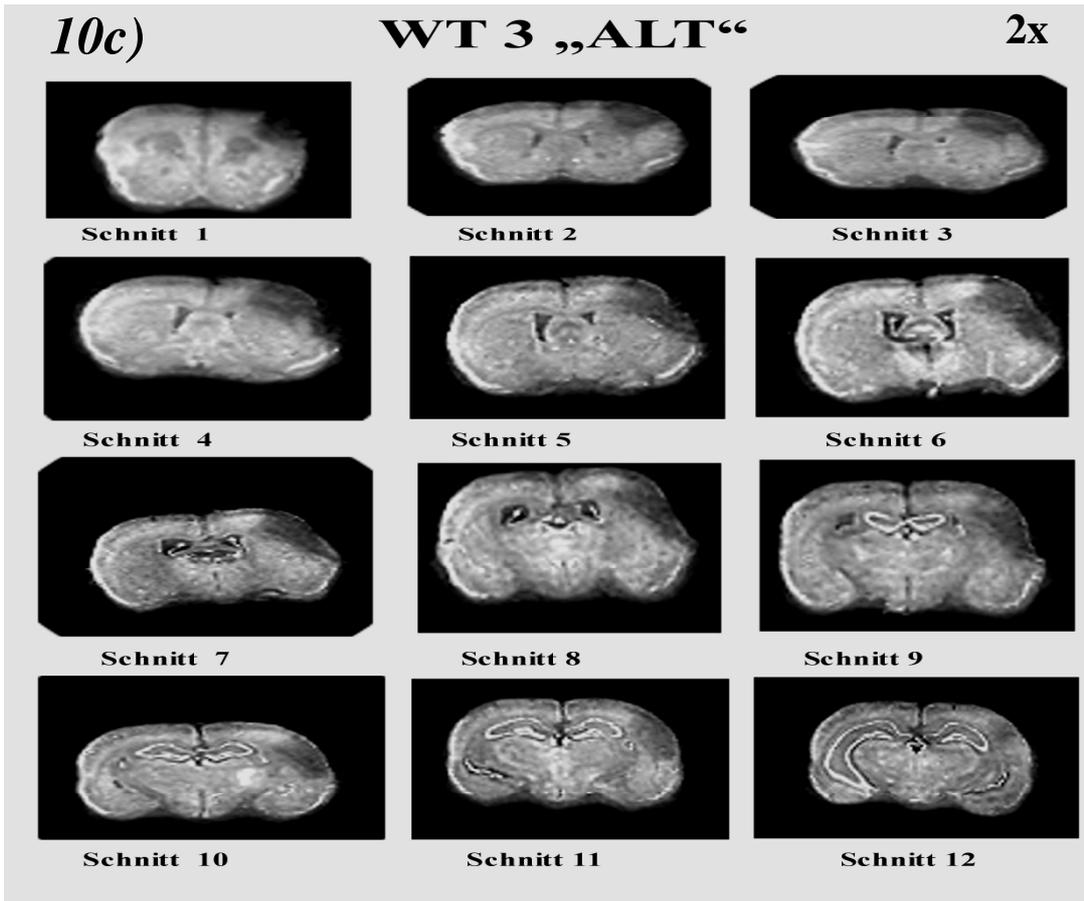
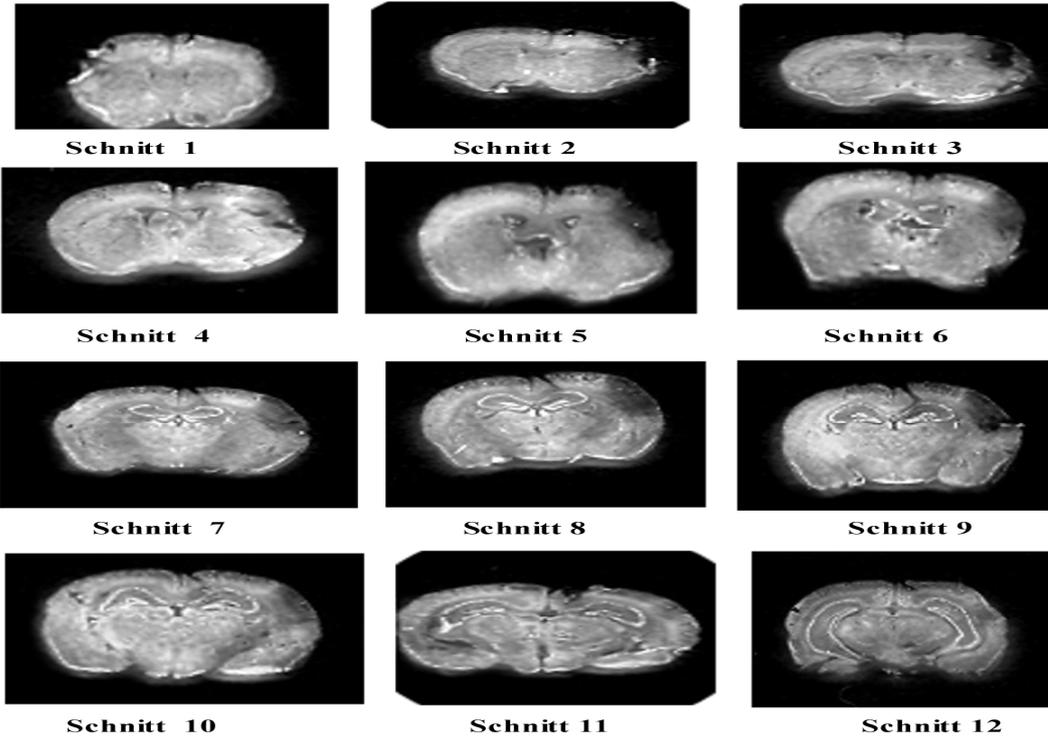


Abbildung 10 c: Rostro-kaudale Infarktausdehnung bei den Genotyp WT3 für die Gruppe „ALT“ drei Tage nach pMCAO. Der Vergrößerungsfaktor ist oben rechts angegeben.

11a)

JNK1 ko „ALT“

2x



11b)

JNK 2 Ko „ALT“

2x

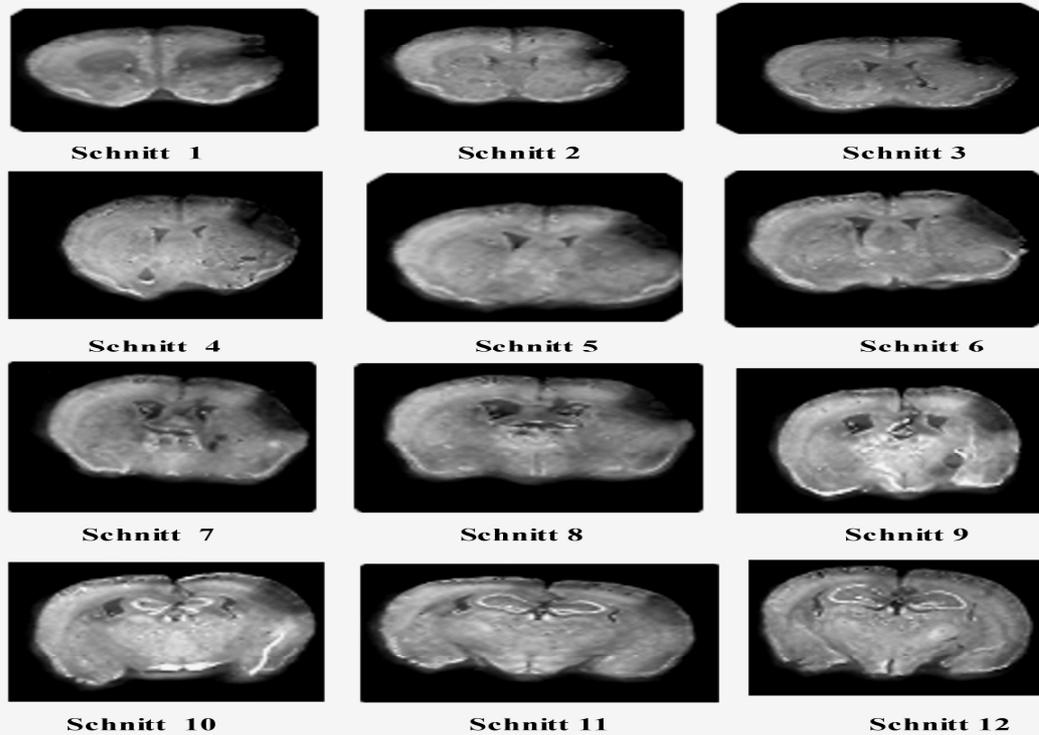


Abbildung 11 (a-c): Rostro-kaudale Infarktausdehnung bei den Genotypen JNK1 ko, -2 ko für die Gruppe „ALT“ drei Tage nach pMCAO. Der Vergrößerungsfaktor ist oben rechts angegeben.

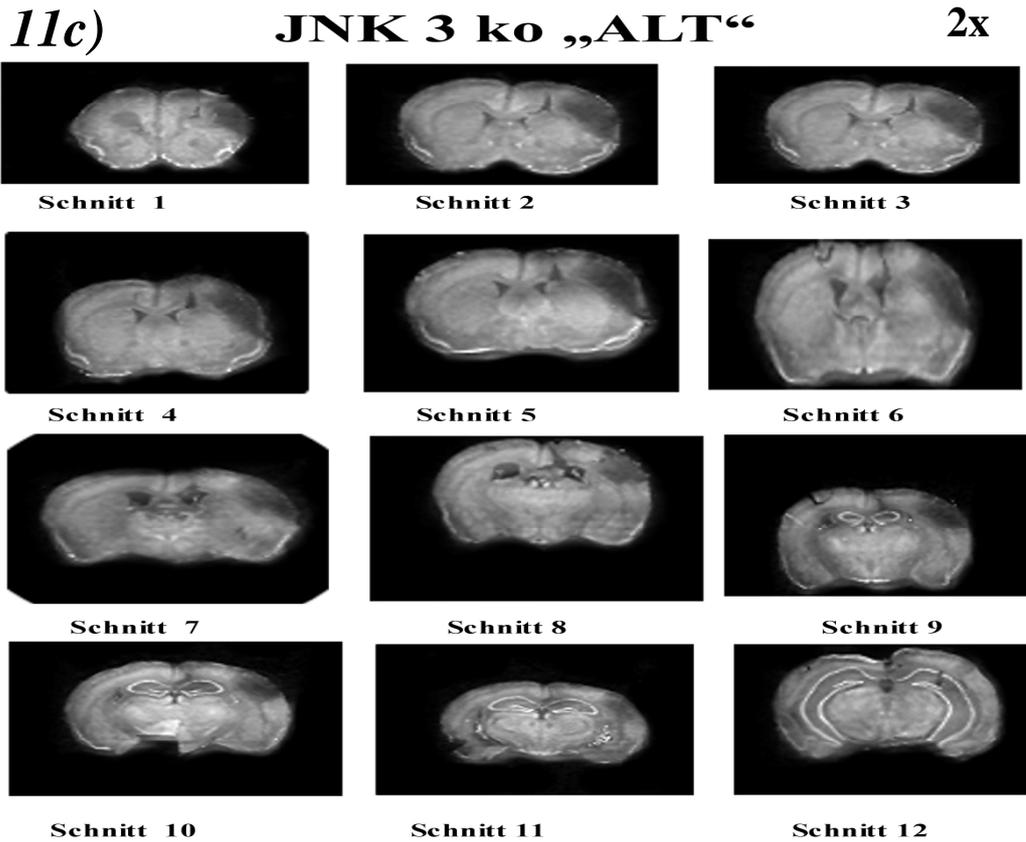


Abbildung 11 c: Rostro-kaudale Infarktausdehnung bei den Genotyp JNK3 ko, für die Gruppe „ALT“ drei Tage nach pMCAO. Der Vergrößerungsfaktor ist oben rechts angegeben.

Um genauere Aussagen über die Infarktausdehnung und einen Vergleich der beiden Gruppen „JUNG“ vs. „ALT“ zu machen, wurden die vier ausgesuchten anatomischen Schnitte (Abb. 7) genau betrachtet und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

| Tiergruppe | Größte Infarktausdehnung | Kleinste Infarktausdehnung | Zunahme der Infarkfläche nach kaudal | Abnahme der Infarkfläche nach kaudal | Keinen Infarkt auf Schnitt-c | Keinen Infarkt auf Schnitt-d |
|---------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| WT 1 JUNG | 6xa / 4xb | 7xd / 3xc | 3x | 4x | Ø | Ø |
| WT 2 JUNG | 6xa / 1xb | 5xd | Ø | Ø | 3 | 6 |
| WT 3 JUNG | 9xa / 1xb | 9xd / 1xc | 1x | 9x | Ø | Ø |
| JNK 1 ko JUNG | 2xa / 2xb / 2xd / 1xc | 1xa / 5xc / 1xd | 5x | 2x | Ø | Ø |
| JNK 2 ko JUNG | 4xa / 3x b / 1xc | 1xb / 2xc / 5xd | 2x | 6x | Ø | Ø |
| JNK 3 ko JUNG | 4xa | 1xc / 3xd | 1x | 3x | Ø | Ø |
| WT 1 ALT | 7xa / 1xb | 8xd | 1x | 7x | | 2x |
| WT 2 ALT | 4xa / 2xb / 1xc | 6xd / 1xb | Ø | 7x | 5x | 6x |
| WT 3 ALT | 5xa / 3xb | 7xd / 1xa | 1x | 7x | 1x | 3x |
| JNK 1 ko ALT | 2xa / 3xb / 3xd | 2xb / 3xc / 3xd | 5x | 3x | Ø | Ø |
| JNK 2 ko ALT | 6xa / 5xb / 1xc | 1xc / 11xd | 1x | 11x | 1x | 3x |
| JNK 3 ko ALT | 6xa / 3xb / 1xd | 6xd / 6xc | 6x | 6x | Ø | Ø |

Tabelle 8: Merkmale der Infarktausdehnung bei den Genotypen WT1, -2, -3 und JNK1-ko, -2 ko, -3 ko für die Gruppen „JUNG“ und „ALT“; a = Bregma +1,02 mm, b = Bregma -0,58 mm, c = Bregma -1,78 mm, d = Bregma -2,18 mm.

Durch die Untersuchung der räumlichen Ausdehnung der Infarktareale auf den 12 anatomischen Schnittebenen (Abb. 8-11) und mit Hilfe der Tabelle lassen sich folgende Schlussfolgerung über die Infarktausdehnung ziehen: Es ist zwar die Morphologie und Ausdehnung der Infarkte von Tier zu Tier sehr unterschiedlich, dennoch gibt es einige typische Merkmale, die sich bei der überwiegenden Zahl der Fälle beobachten ließen:

- Bei allen Tieren, die einen Infarkt aufwiesen, war im ersten Schnitt (Bregma 1,42 mm) eine Ischämie identifizierbar.
- Nach kaudal nahm die Infarktfläche ab, eine Ausnahme bildeten die JNK1 ko Tiere; sie zeigten bei 75% der Fälle eine Zunahme der Infarktflächen bei Übergang von Bregma -1,38 mm zu -2,18 mm.

- Bei den Genotypen WT2 „JUNG“ und „ALT“ wurden im Gegensatz zu allen anderen Genotypen keine Infarkte ab Bregma –1,38 mm beobachtet.
- Bei allen Genotypen war ab Bregma –3,38 mm kein Infarkt mehr nachweisbar.
- Es wurde kein Unterschied in der Morphologie der Infarktausdehnung bei Vergleich der beiden Gruppen „JUNG“ vs. „ALT“ festgestellt.

3.3 Statistische Berechnung und Dokumentation

Gemessene Variablen werden als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) angegeben.

Die statistische Auswertung erfolgte wie unter Punkt 2.10 beschrieben.

| Messwerte | WT1 | JNK1 ko | WT2 | JNK2 ko | WT3 | JNK3 ko |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Ges.Dir „JUNG“ (mm ³) | 21,6 ± 5,3 | 18,5 ± 3,9 | 11,7 ± 3,1 | 23,6 ± 4,0 | 22,5 ± 3,7 | 20,2 ± 2,6 |
| Ges.Dir „ALT“ (mm ³) | 17,9 ± 2,6 | 17,3 ± 5,3 | 11,1 ± 4,2 | 18,3 ± 5,2 | 17,2 ± 6,1 | 20,1 ± 5,0 |
| Ges.Ind „JUNG“ (mm ³) | 26,3 ± 7,1 | 24,2 ± 6,0 | 23,0 ± 5,5 | 31,0 ± 6,3 | 26,9 ± 4,6 | 30,0 ± 4,2 |
| Ges.Ind „ALT“ (mm ³) | 19,5 ± 4,0 | 23,1 ± 6,8 | 17,9 ± 5,8 | 25,6 ± 4,5 | 23,7 ± 5,7 | 25,9 ± 5,5 |
| pIV Total „JUNG“ % | 21,6 ± 4,6 | 22,1 ± 5,2 | 20,2 ± 3,3 | 24,1 ± 4,0 | 22,9 ± 3,4 | 23,6 ± 4,2 |
| pIV Total „ALT“ % | 18,0 ± 2,5 | 20,7 ± 5,0 | 21,7 ± 3,6 | 22,3 ± 2,5 | 23,6 ± 4,0 | 22,7 ± 4,9 |
| pIV a „JUNG“ % | 22,9 ± 9,1 | 24,5 ± 6,7 | 24,9 ± 6,1 | 25,0 ± 5,1 | 28,3 ± 3,2 | 29,8 ± 5,9 |
| pIV a „ALT“ % | 26,0 ± 4,3 | 22,4 ± 4,5 | 21,8 ± 7,7 | 23,2 ± 4,8 | 27,7 ± 8,8 | 27,5 ± 5,4 |
| pIV b „JUNG“ % | 24,4 ± 5,7 | 23,8 ± 4,7 | 23,1 ± 7,8 | 23,5 ± 4,1 | 24,2 ± 4,6 | 23,6 ± 4,6 |
| pIV b „ALT“ % | 19,1 ± 3,4 | 23,0 ± 6,4 | 19,0 ± 6,4 | 23,2 ± 3,9 | 25,2 ± 7,1 | 25,7 ± 5,3 |
| pIV c „JUNG“ % | 19,3 ± 7,3 | 22 ± 8,1 | 06,3 ± 7,1 | 21,0 ± 5,7 | 16,5 ± 5,0 | 17,4 ± 10,4 |
| pIV c „ALT“ % | 15,6 ± 4,8 | 18,5 ± 4,2 | 04,6 ± 8,3 | 17,6 ± 7,5 | 15,7 ± 9,8 | 17,8 ± 7,2 |
| pIV d „JUNG“ % | 17,9 ± 6,4 | 21,5 ± 4,6 | 01,3 ± 3,4 | 18,5 ± 4,8 | 12,4 ± 4,2 | 13,8 ± 10,5 |
| pIV d „ALT“ % | 08,4 ± 5,8 | 20 ± 3,8 | 02,2 ± 5,7 | 09,8 ± 7,7 | 11,9 ± 11,8 | 17,9 ± 7,8 |
| Noninfarkt R _h Vol. „JUNG“ (mm ³) | 120,4 ± 7,5 | 111,4 ± 24,6 | 113,5 ± 11,6 | 134,4 ± 12,8 | 125,7 ± 17,0 | 121,9 ± 15,0 |
| Noninfarkt R _h Vol. „ALT“ (mm ³) | 106,3 ± 22,3 | 108,8 ± 9,8 | 81,4 ± 15,8 | 112,4 ± 12,9 | 101,2 ± 10,1 | 112,8 ± 7,5 |
| Gewebsverlust (GVs) „JUNG“ (mm ³) | 4,9 ± 4,8 | 3,5 ± 5,4 | 11,3 ± 2,9 | 7,4 ± 5,3 | 5,6 ± 4,4 | 8,7 ± 4,3 |
| Gewebsverlust (GVs) „ALT“ (mm ³) | 3,7 ± 6,2 | 4,8 ± 3,4 | 6,8 ± 2,9 | 7,3 ± 3,3 | 6,5 ± 3,7 | 6,0 ± 7,1 |

Tabelle 9: Gemessene Infarktvolumina der Hirne der Versuchsgruppen.

Ges.Dir bzw. Ges.Ind = Direkte und Indirekte gemessene gesamte Infarktvolumina; pIV Total= der prozentuale Anteil des Infarktvolumens bezogen auf das Volumen der gesamten kontralateralen Hemisphäre; pIV (a-d) = der prozentuale Anteil der Infarktvolumen an der kontralateralen Hemisphäre der Hirnschnitte (a-d); Noninfarkt R_hVol.(mm³) = nicht infarzierte Volumen der rechten Hemisphäre. Zahlen sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

Die Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung sind graphisch in Abbildung 12 dargestellt. Es handelt sich dabei um sogenannte Box-and-Whiskers-Plots, die sich besonders gut zur Darstellung quantitativer Merkmale eignen. Jede Gruppe wird durch eine rechteckige Box repräsentiert, die unten und oben vom 1. und 3. Quartil begrenzt wird und 50% der Stichprobenwerte beinhaltet. Innerhalb der Box wird der Median durch einen Balken gekennzeichnet; die von der Box ausgehenden Striche (whiskers) zeigen die Lage des Minimums und des Maximums der jeweiligen Stichprobe an. Ebenfalls eingezeichnet sind die Ausreißer (o) und die Stichprobengröße (N).

Abb. 12a: Hirnschnitte 1 bis 12 (Bregma +1,02 mm bis - 2,18 mm)

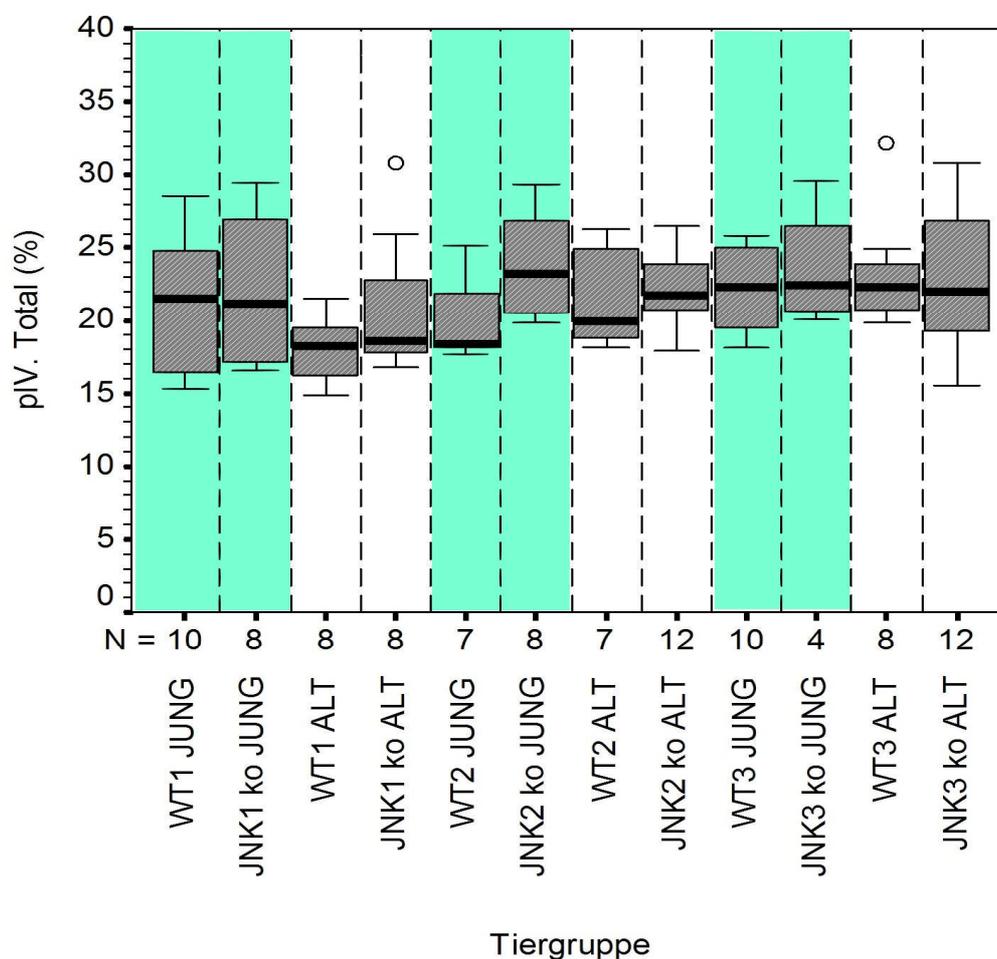


Abb. 12b: Hirnschnitt 1 (Bregma +1,02 mm)

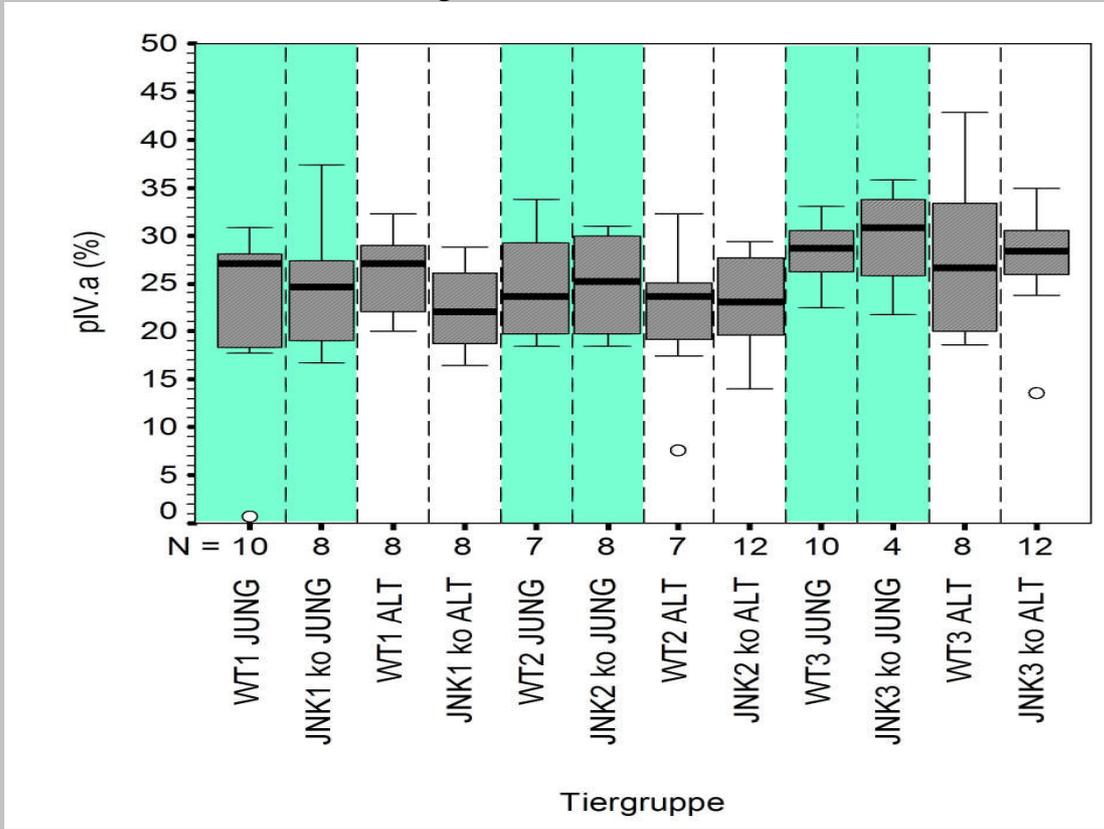


Abb. 12c: Hirnschnitt 2 (Bregma - 0,58 mm)

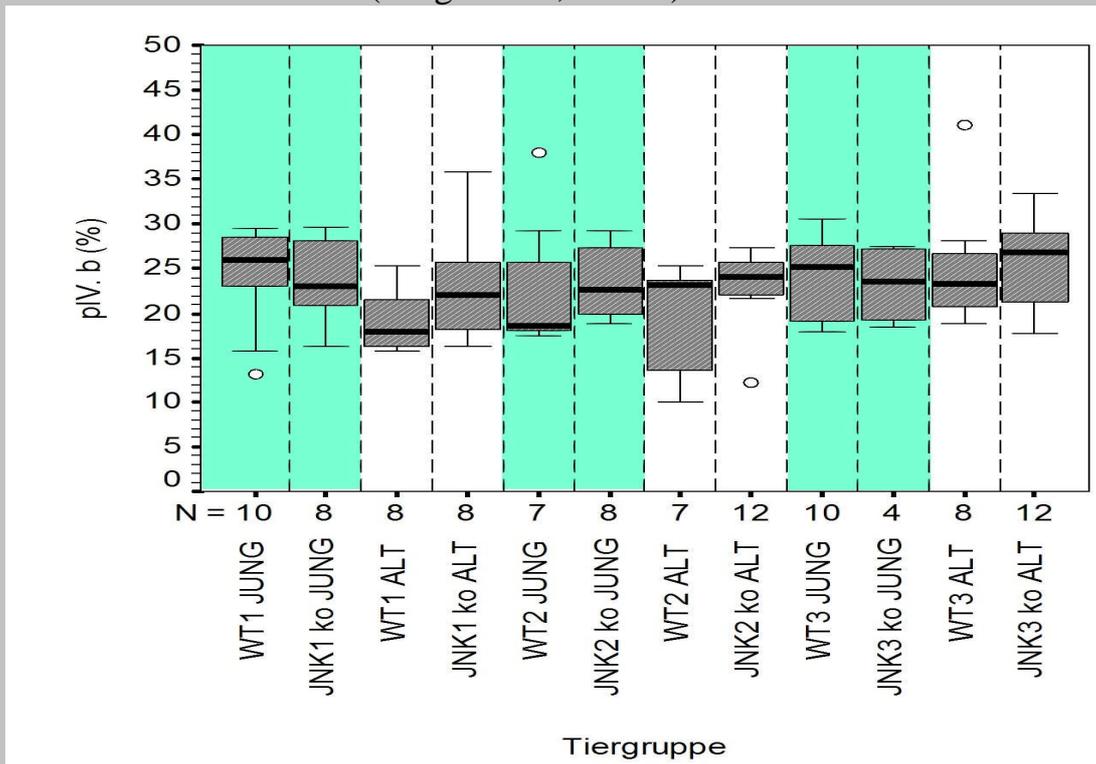


Abb. 12d: Hirnschnitt 3 (Bregma -1,78 mm)

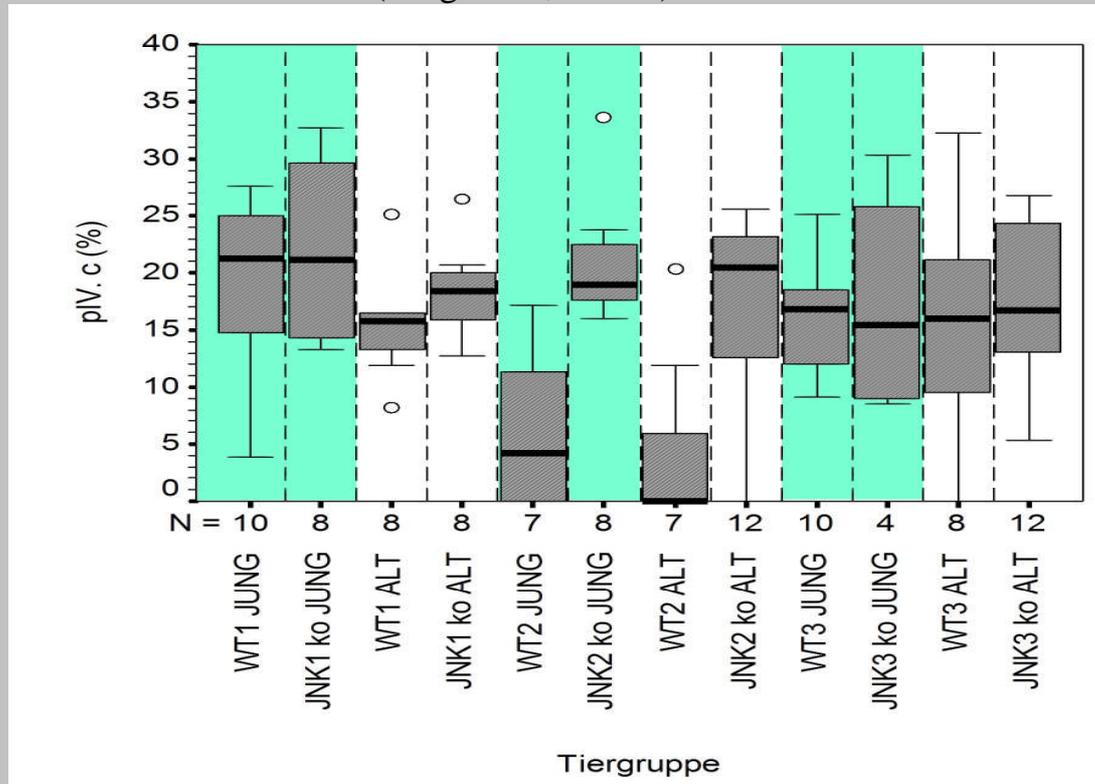


Abb. 12e: Hirnschnitt 4 (Bregma -2,18 mm)

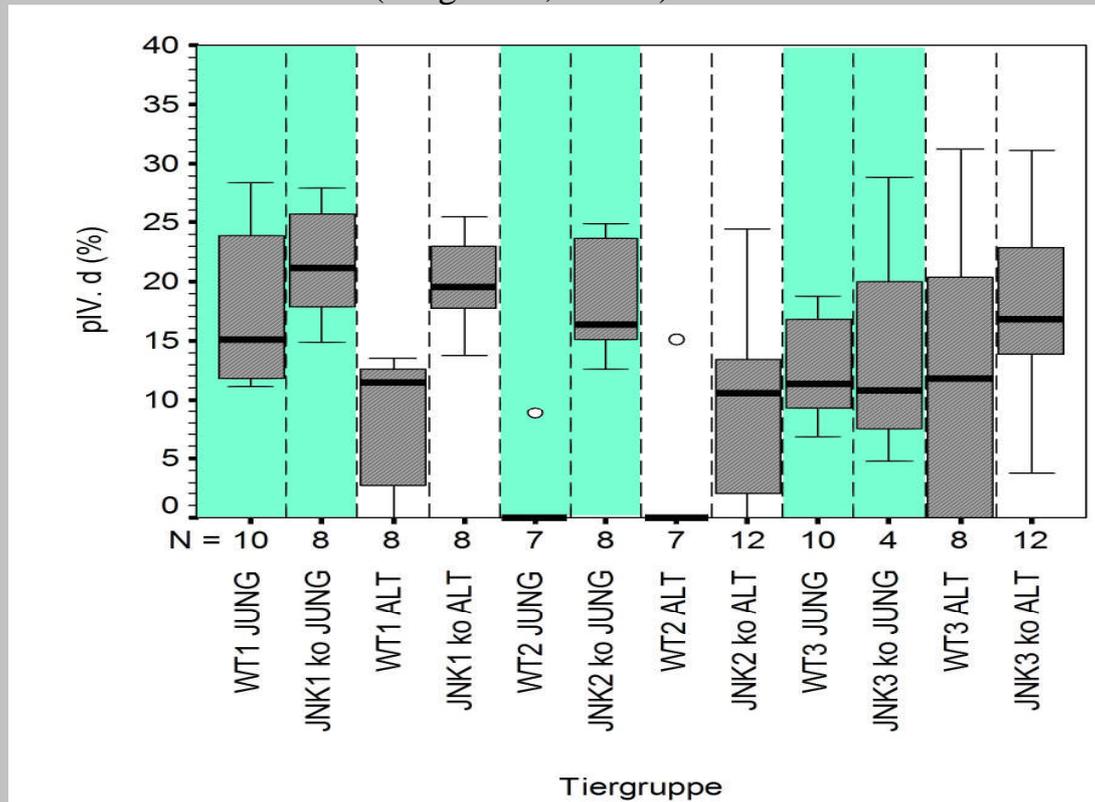


Abbildung 12: Anteil der Infarktvolumen an der Hemisphäre in % für die Genotypen WT1,-2,-3 und JNK1,-2,-3 ko bei beiden Gruppen „JUNG“ und „ALT“ drei Tage nach pMCAO; a) stellt der gesamte Infarktvolumenanteil in einer Hemisphäre dar; b-e) stellen die Infarktvolumenanteile der vier definierten anatomischen Schnittebenen dar (Abb. 4).

Beim Vergleich des Infarktvolumenanteils der gesamten kontralateralen Hemisphären (pIV TOT) zwischen den einzelnen Gruppen konnte keine statistische Signifikanz hinsichtlich Alter und JNK Knock out bei Anwendung der univarianten Varianzanalyse gefunden werden. Bei gepaarten Stichproben zeigte sich bei der Gruppe pIV TOT JNK2 ko „JUNG“ ($24,1\% \pm 4,0$) vs. pIV TOT JNK2 ko „ALT“ ($22,3\% \pm 2,5$) eine statistische Signifikanz von $p = 0,044$. Ebenso wurde eine Signifikanz von $p = 0,025$ beim Vergleich pIV TOT WT2 „JUNG“ ($20,2\% \pm 3,3$) vs. pIV TOT JNK2 ko „JUNG“ ($24,1\% \pm 3,96$) nachgewiesen.

Im Hirnschnitt d (Bregma -2,18 mm) zeigte sich eine statistische Signifikanz sowohl in Hinsicht auf Alter $P = 0,006$ als auch auf JNK knock out $p < 0,05$, beim Vergleich der Gruppen WT1 und JNK1 ko [WT1 (JUNG= $17,9\% \pm 6,4$ / ALT= $08,4\% \pm 5,8$); JNK1 ko (JUNG= $21,5\% \pm 4,6$ / ALT= $19,9\% \pm 3,8$)]. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Interaktion zwischen Alter und knock out ($p = 0,03$).

Auch beim Vergleich der Gruppen WT2 und JNK2 ko konnte im Hirnschnitt d eine statistische Signifikanz $p < 0,05$ hinsichtlich JNK knock out, nicht aber des Alters festgestellt werden. [WT2 (JUNG= $1,3\% \pm 3,4$ / ALT= $2,2\% \pm 5,7$); JNK2 ko (JUNG= $18,5\% \pm 4,8$ / ALT= $9,8\% \pm 7,7$)].

Im Hirnschnitt c (Bregma -1,78 mm) zeigte sich beim Vergleich der Gruppen WT2 und JNK2 -ko eine statistische Signifikanz im Bezug auf JNK knock out $p < 0,05$ [WT2 (JUNG= $06,3\% \pm 7,1$ / ALT= $04,6\% \pm 8,3$); JNK2 ko JUNG= $20,9\% \pm 5,7$ / ALT= $17,6\% \pm 7,5$].

Beim Vergleich der Gruppen WT3 und JNK3 ko konnte beim pIV TOT und RB (a-d) keine statistische Signifikanz bezüglich Alter oder JNK knock out nachgewiesen werden.

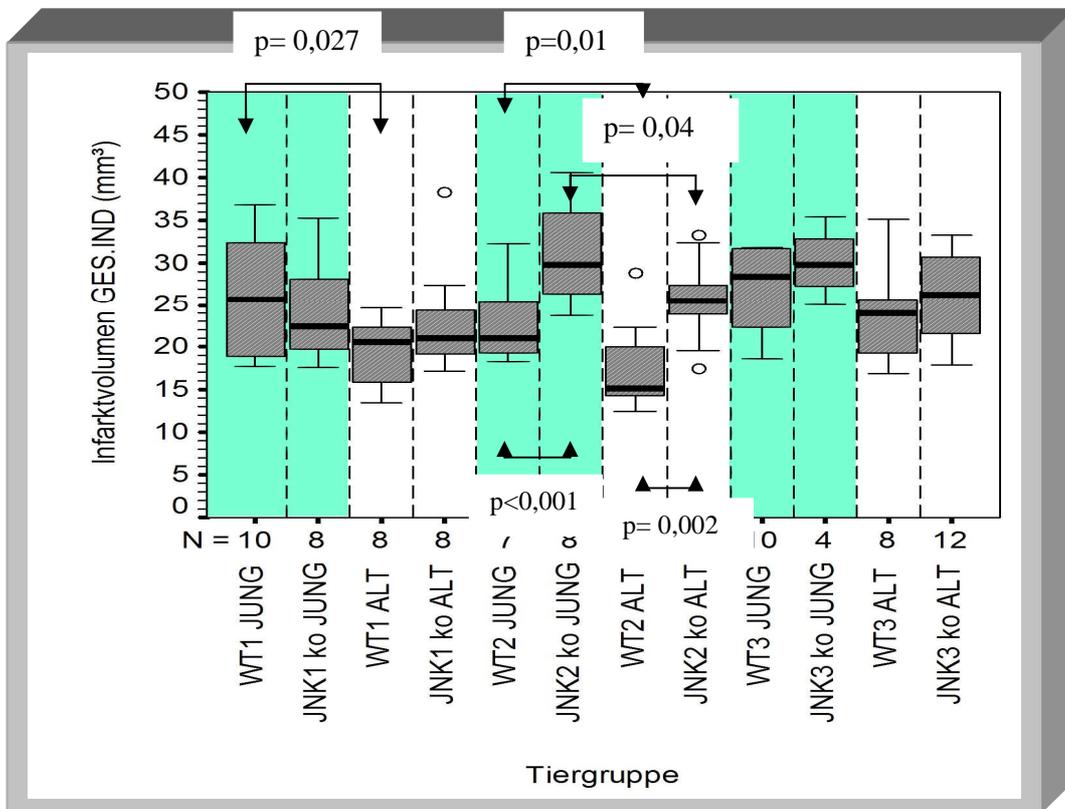
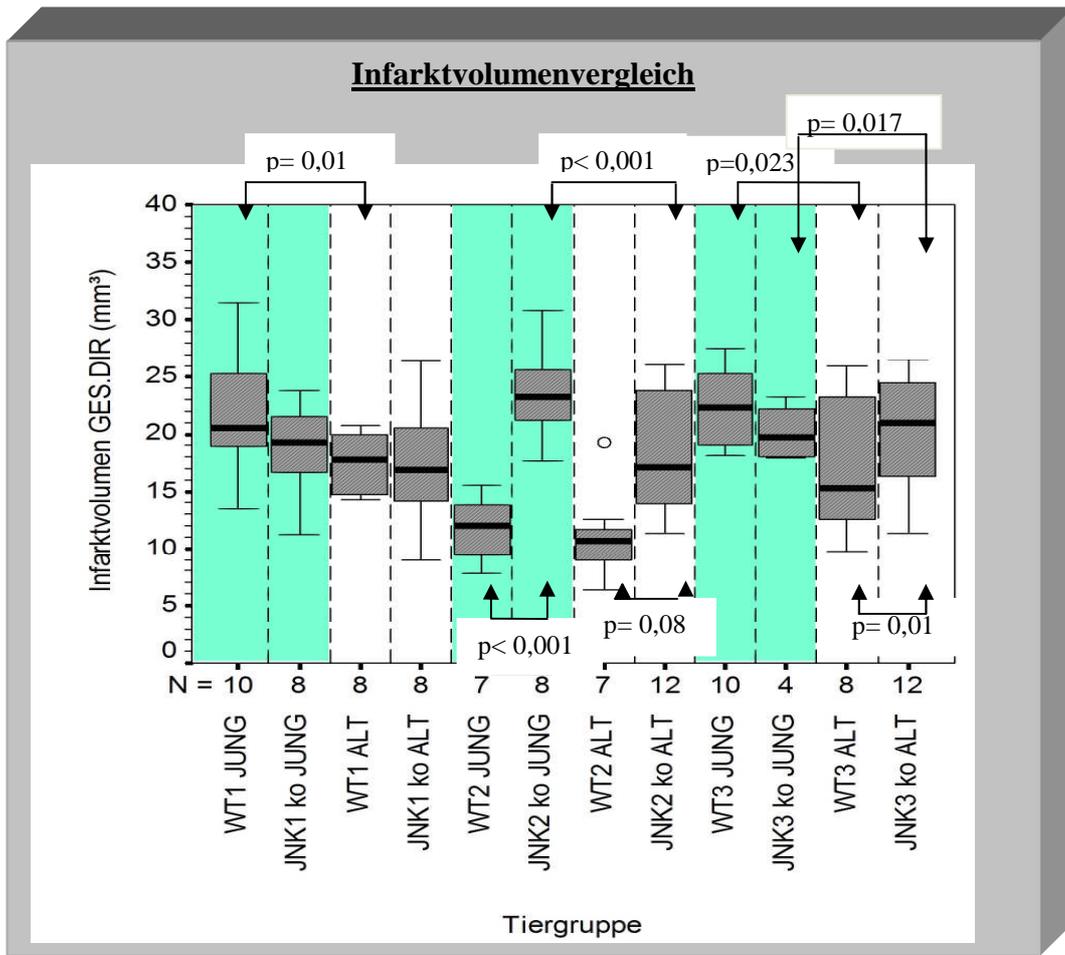


Abbildung 13: Direkt und Indirekt gemessene Infarktvolumina der 12 Versuchsgruppen (mm^3).

Die Ergebnisse der direkten und indirekten Infarktvolumenmessung sind in der Abbildung 13 zusammengefasst. Es wurde dabei der Effekt des Alters und des JNK knock-outs mittels des gepaarten t-Tests herangezogen. Falls eine statistische Signifikanz vorhanden war, wurde diese in der Abbildung 13 dargestellt. Dabei sind die statistischen Signifikanzen für das Alter oberhalb und für JNK knock-out unterhalb des Box-Plots zu finden.

Abschließend ist noch zu bemerken, dass bei der Untersuchung der Volumina der nichtinfarzierten rechten Hemisphäre (Abb. 14) eine statistische Signifikanz hinsichtlich Alter und JNK Knock-out bei Vergleich der Genotypen WT2 und JNK2 ko ($p < 0,05$) nachgewiesen wurde. Bei dem Genotyp WT1 konnte eine Signifikanz nur hinsichtlich der Knock-out und nur bei der Gruppe „JUNG“ (WT1 = $120,4 \pm 7,5$ versus JNK1 ko = $111,4 \pm 24,6$; $p = 0,03$) festgestellt werden. Bei der letzten Gruppe wurden folgende Signifikanzen aufgefunden beim Vergleich von: WT3 JUNG vs. WT3 ALT ($125,6 \pm 17,0$ vs. $101,2 \pm 10,1$; $p = 0,01$); WT3 JUNG vs. JNK3 ko JUNG ($125,6 \pm 17,0$ vs. $121,9 \pm 15,0$; $p = 0,016$) und WT3 ALT vs. JNK3 ALT ($101,2 \pm 10,1$ vs. $112,82 \pm 7,54$; $p = 0,046$).

Um der Frage nachzugehen, inwieweit Alter und Genotyp bei der Untersuchung des Gewebeverlustes eine Rolle spielen und damit ein Artefakt bei der Messung der Infarktvolumina bewirken, wurden auch hier die Versuchsgruppen vergleichend betrachtet. Dabei waren keine signifikante Unterschiede festzustellen.

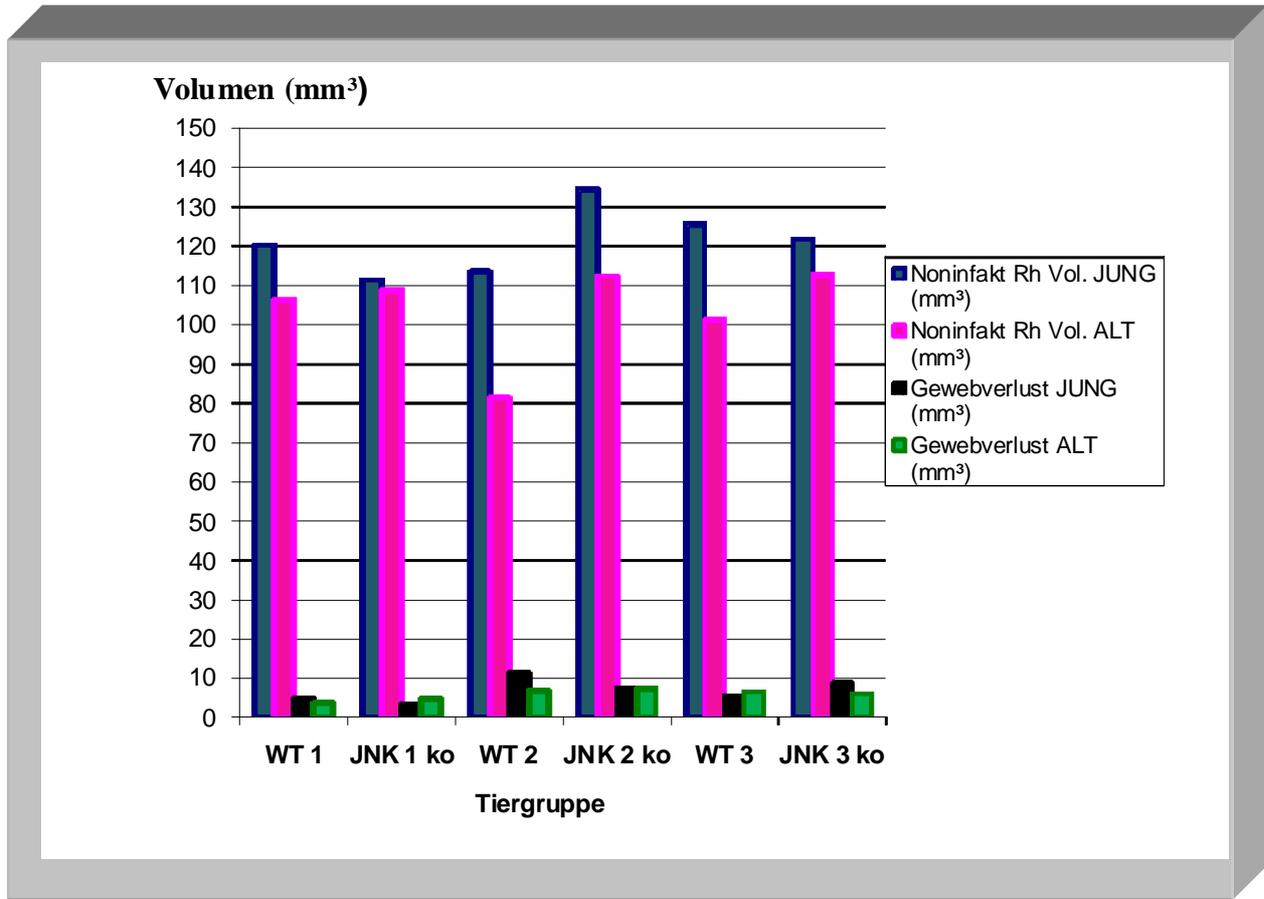


Abbildung 14: Nicht infarzierte Volumen der rechten Hemisphäre (Noninfarkt R_h Vol.) und Gewebeverlustvolumen GV (mm^3) drei Tage nach pMCAO der zwölf untersuchten Genotypen.

3.4 Bestimmung des Verhältnissfaktors

Um eine Schwankung der gemessenen Daten aufgrund eines Fehlers in den ausgewählten Messverfahren auszuschließen, wurde der Verhältnissfaktor für die gemessenen direkten und indirekten Volumina bestimmt.

| | Verhältnissfaktor α_{Dir} | Verhältnissfaktor α_{Ind} |
|------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | 1,24 | 1,27 |
| | 0,90 | 0,95 |
| | 1,10 | 1,08 |
| | 1,08 | 1,10 |
| | 1,01 | 0,89 |
| | 0,99 | 1,18 |
| | 1,01 | 1,25 |
| | 1,02 | 1,34 |
| | 1,03 | 1,06 |
| | 0,97 | 0,87 |
| | 0,99 | 1,10 |
| | 0,93 | 1,05 |
| | 0,93 | 1,42 |
| Mittelwert | 1,02 | 1,12 |

Tabelle 10: Beurteilung des Messverfahrens durch Bestimmung des Verhältnissfaktors bei dreizehn zufällig ausgewählten Tieren.

Die anhand der erzeugten negativen Bilder ermittelten Volumina korrelierten gut mit den Ergebnissen der Kresylviolett-färbung (MW $\alpha_{Dir} = 1,02$; MW $\alpha_{Ind} = 1,12$).

Aufgrund dieser kleinen Schwankung war eine Korrektur der gemessenen Infarkt-volumina nicht notwendig. Außerdem zeigte sich, dass das ausgewählte Messverfahren mittels der Bildanalyse-Software Image J genaue Messwerte lieferte.

3.5 Anatomische Variation der MCA

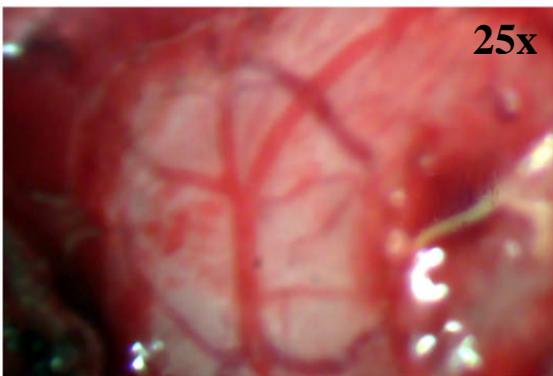
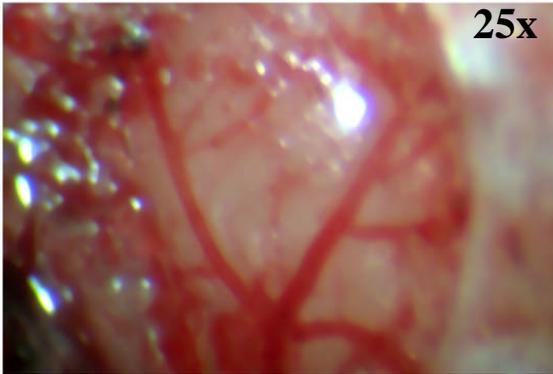
Es zeigte sich bei der Untersuchung eine beträchtliche Variabilität in der Zahl und Lokalisation der A. cerebri media sowohl im Hauptstamm als auch in seinen Seitenästen. Ebenfalls war ein wechselhafter Verlauf der V. cerebri inferior im Bezug zur MCA zu verzeichnen.

Der MCA-Stamm hat eine standardisierte Y Konfiguration und teilt sich 2-4 mm oberhalb der Fissura rhinalis. Nach der Bifurkation führt er seine beide Hauptäste, rostraler und caudaler Ast, weiter. In einigen Fällen teilt sich von dem MCA Stamm ein weiterer dritter Hauptast, der parietale Ast. Der Durchmesser der Äste variierte von Tier zu Tier stark. Falls links von dem rostralen Ast der MCA ein weiterer Hauptast abzweigte, wurde dieser rostrofrontaler Ast der MCA genannt. Bei einer weiteren Astabzweigung rechts von dem caudalen Ast der MCA, wurde diese als temporocaudaler Ast der MCA bezeichnet (Abb. 7).

Es wurden bei den Wildtypen insgesamt zehn verschiedene Muster der MCA verzeichnet (Abb. 15 und 17). Bei den genveränderten Mäusen haben wir bei den JNK1 ko Tieren die geringste Variabilität in der MCA Anatomie. Ich stellte zwar sechs Muster der MCA fest, die aber meist einen Unterschied in der Bifurkationslokalisierung und im Verlauf der V. cerebri inferior und nicht in den MCA Hauptästen zeigten. Bei den JNK2 ko Tieren konnten wir vier MCA und bei JNK3 ko drei MCA Verzweigungsmuster identifizieren (Abb. 16 und 18).

15a)

WT 1



15b)

WT 2

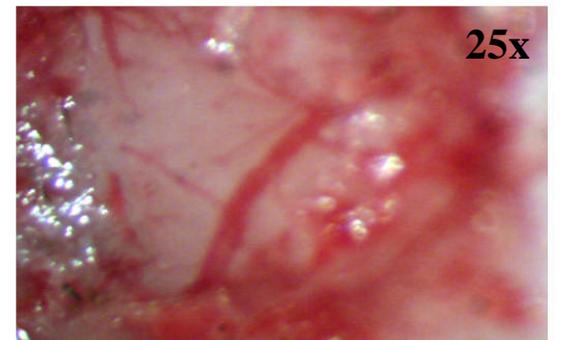
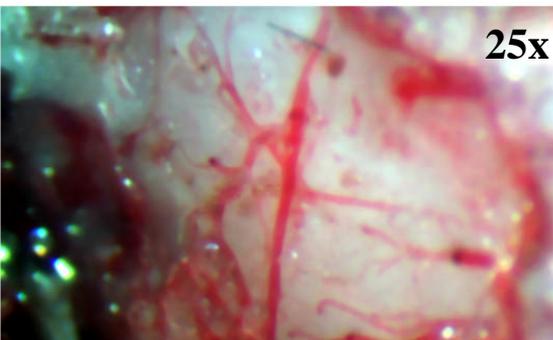


Abbildung 15 (a-b): Anatomische Muster der MCA bei WT1, -2, -3. Der Vergrößerungsfaktor ist jeweils oben rechts angegeben (25X).

16a)

JNK 1 ko

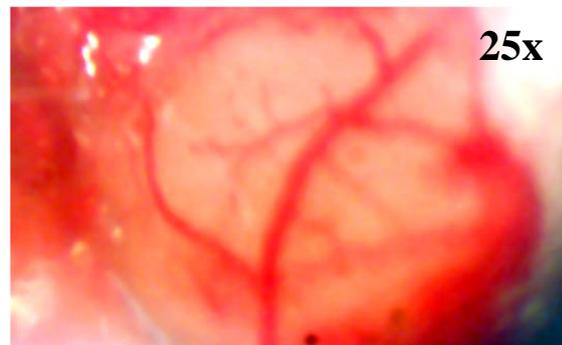
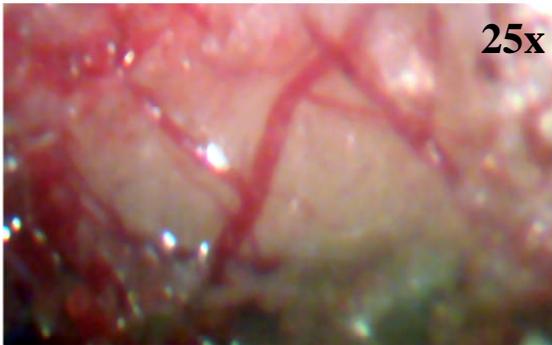
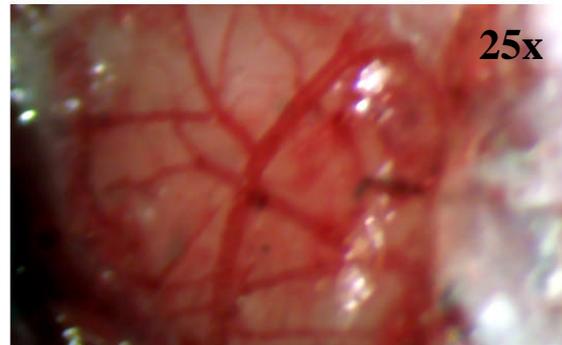
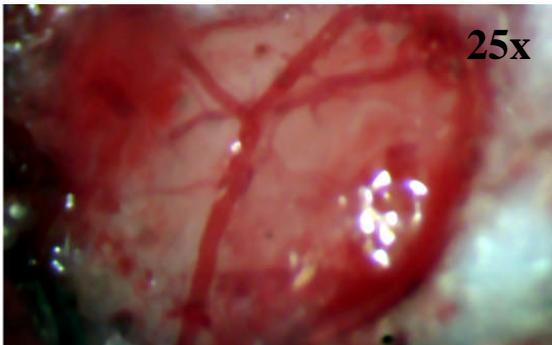


Abbildung 16 a: Anatomische Muster der MCA bei JNK1 Ko, -2 Ko, -3 Ko. Der Vergrößerungsfaktor ist jeweils oben rechts angegeben (25x).

16b)

JNK2 ko

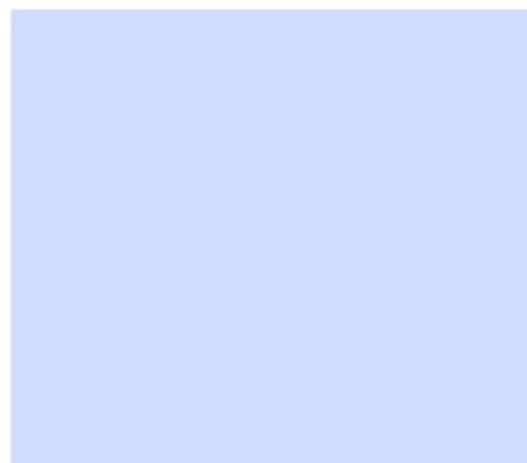
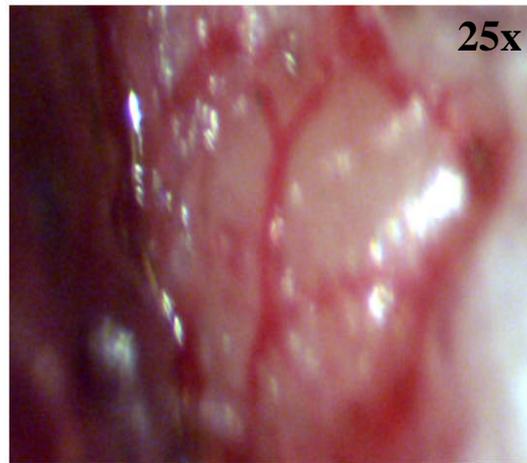
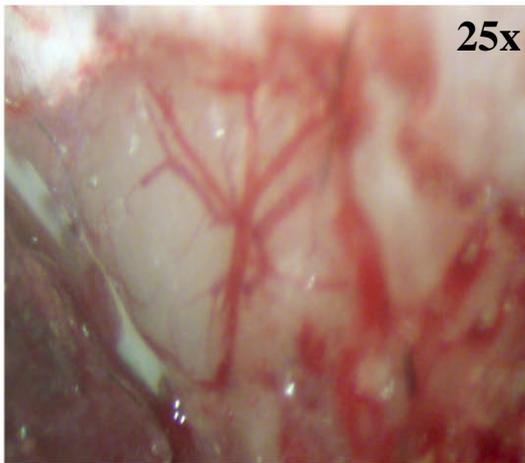
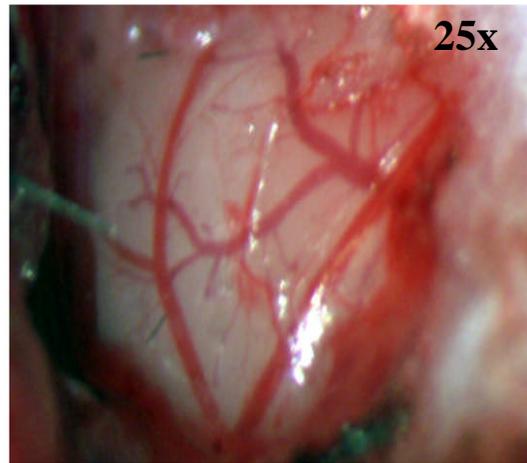
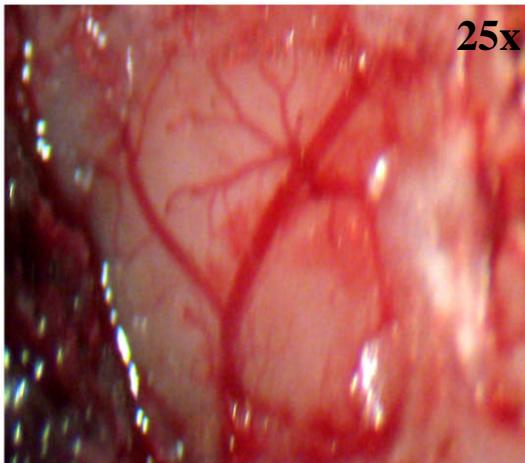
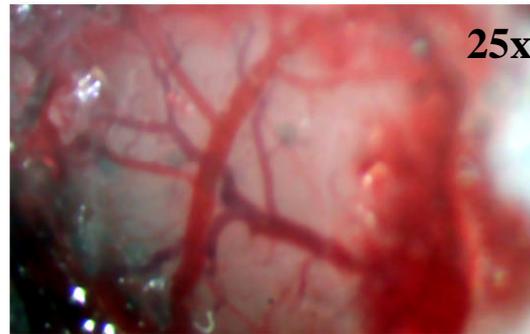
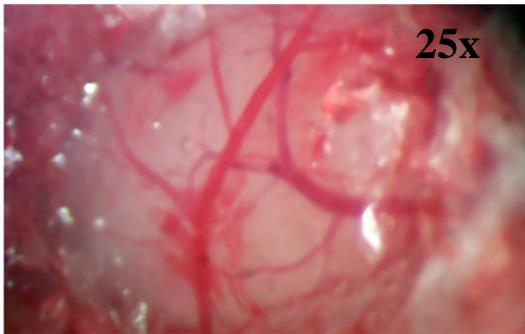


Abbildung 16 b: Anatomische Muster der MCA bei JNK1 Ko, -2 Ko, -3 Ko. Der Vergrößerungsfaktor ist jeweils oben rechts angegeben (25X).

15c)

WT3



16c)

JNK3 ko

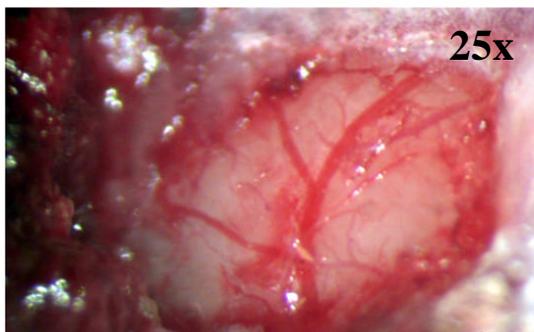
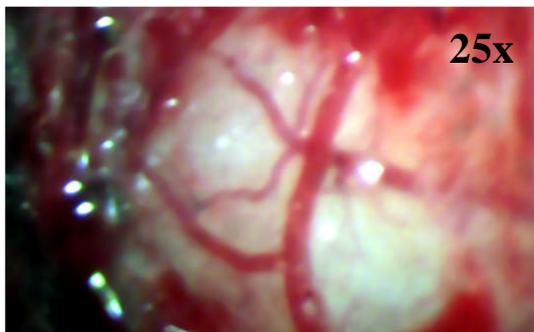


Abbildung 15 c: Anatomische Muster der MCA bei WT1, -2, -3.

Abbildung 16 c: Anatomische Muster der MCA bei JNK1 Ko, -2 Ko, -3 Ko. Der Vergrößerungsfaktor ist jeweils oben rechts angegeben (25X).

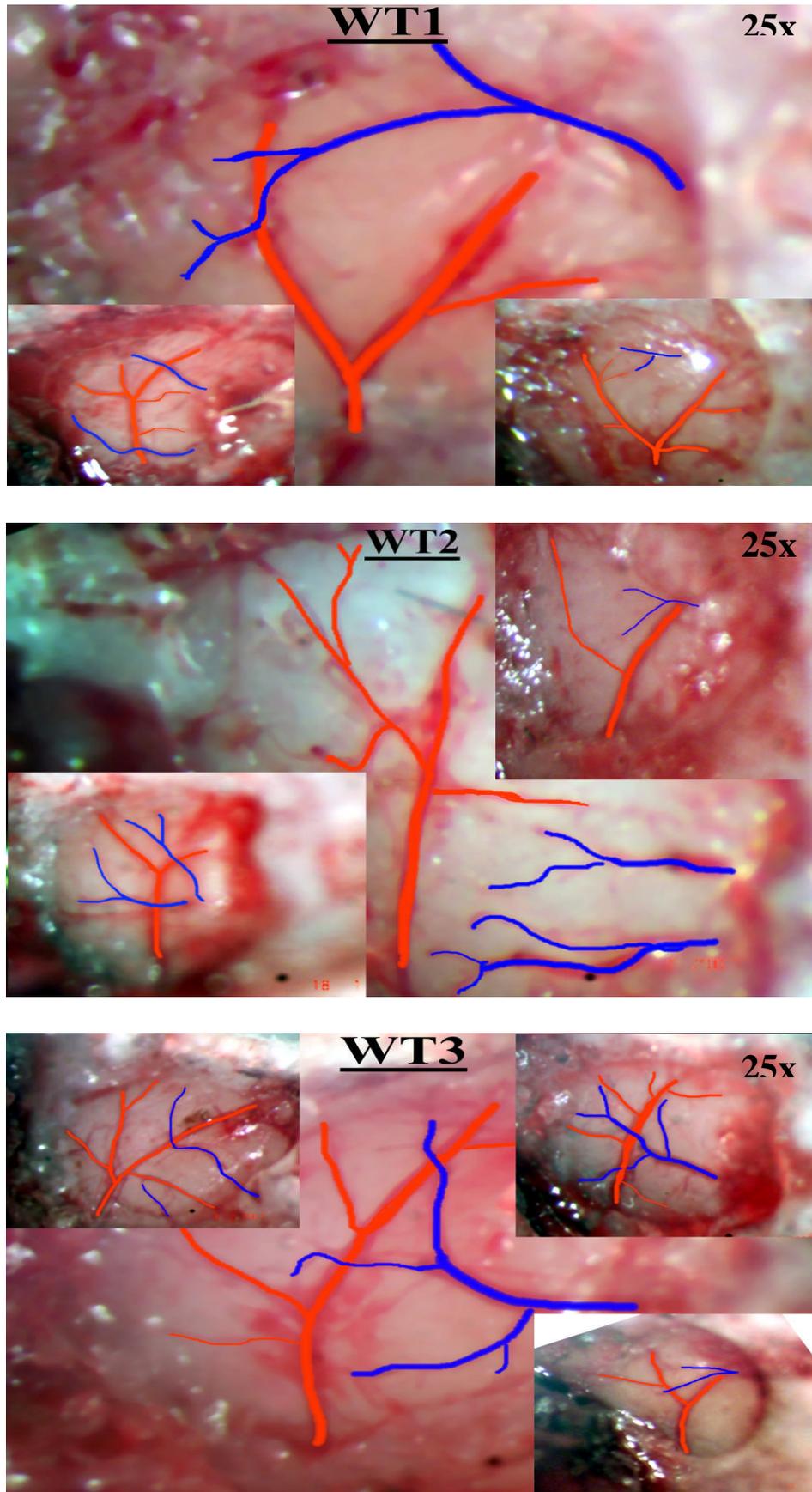


Abbildung 17: Schematische Darstellung der anatomischen Variation der MCA bei WT1, -2, -3. MCA ist rot nachgezeichnet. Begleitenden Venen sind blau nachgezeichnet.

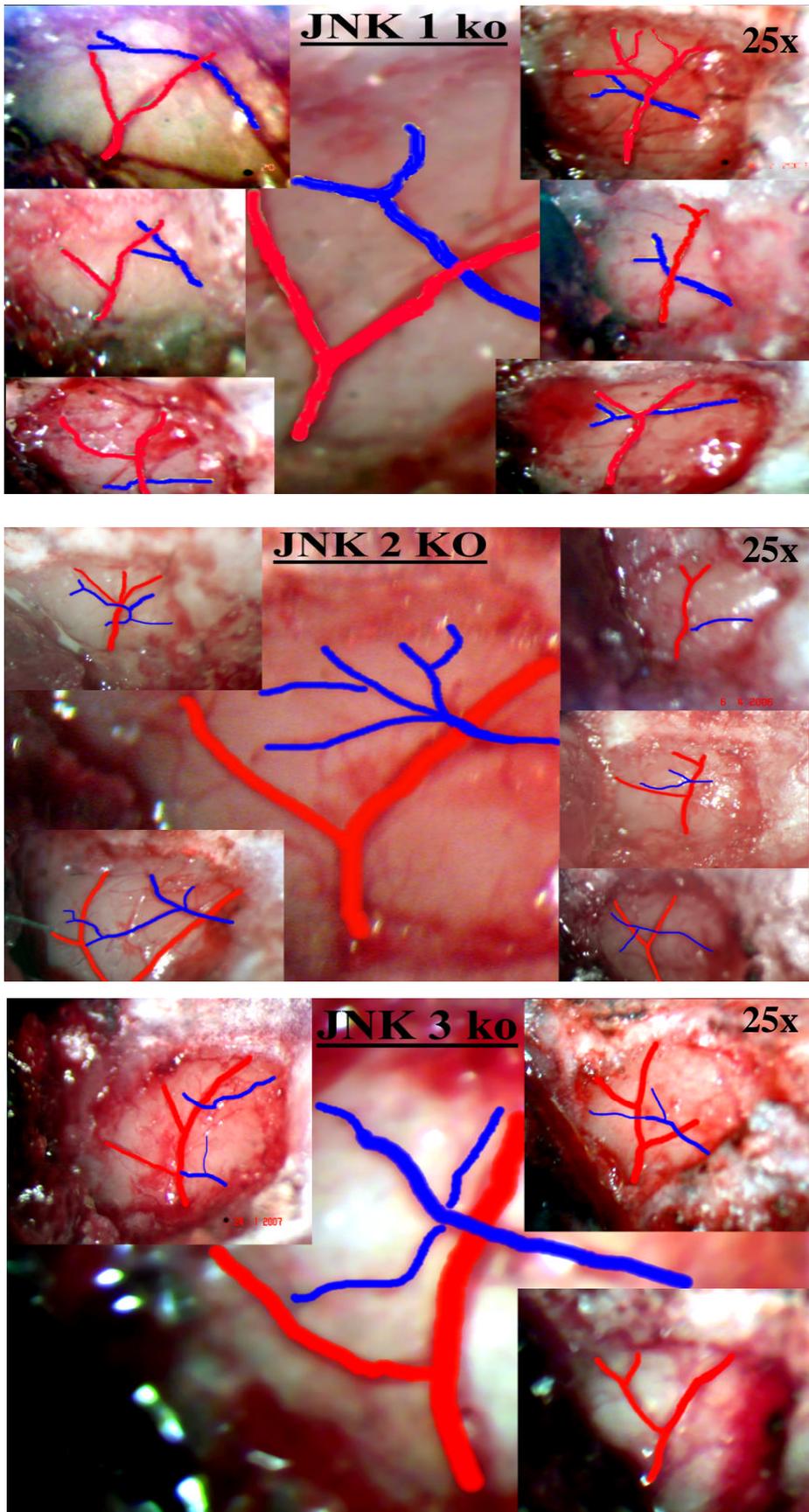


Abbildung 18: Schematische Darstellung der anatomischen Variation der MCA bei *JNK1* Ko, -2 Ko, -3 Ko. MCA ist rot nachgezeichnet. Begleitenden Venen sind blau nachgezeichnet. Der Vergrößerungsfaktor ist jeweils oben rechts angegeben (25X)

4 Diskussion

4.1 Allgemeiner Teil

Die meisten experimentellen Tierversuche zur Untersuchung der komplexen pathophysiologischen Vorgänge im Gehirn und möglicher therapeutischer Ansätze der zerebralen Ischämie beziehen sich auf relativ junge Tiere im Alter zwischen 2 und 6 Monaten. Dennoch ereignen sich die wesentlichen morphologischen und neurochemischen Verhaltensveränderungen bei den Nagetierpopulationen besonders nach dem 6. Monat. Ebenso spielt das Alter beim Menschen hinsichtlich cerebrovaskulärer Erkrankungen eine wichtige Rolle.

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt des Alters und die Inaktivierung der JNK-Gene in der Pathophysiologie des ischämischen Hirninfarkts anhand der permanenten fokalen Ischämie in der Maus zu untersuchen.

4.2 Validität und Grenzen des verwendeten Ischämie-modells

Zur Induktion cerebraler Ischämien bei Tieren werden zahlreiche unterschiedliche Operationstechniken verwendet. Grundsätzlich lassen sich endovaskuläre und nicht-endovaskuläre Verfahren unterscheiden. Die beiden Modelle werden zum einen nach der Lokalisation der Gewebsschädigung (fokal versus global), zum anderen nach der Dauer der Ischämie (transient versus permanent) unterschieden (Lipton et al., 1998; McAuley 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode der permanenten Okklusion mittels Kauterisieren der A. cerebri media (pMCAO „permanent middle cerebral artery occlusion“ genannt) angewendet. Die Originalmethode wurde im Laufe der Jahre von zahlreichen Arbeitsgruppen modifiziert und erlangte große Akzeptanz zur Untersuchung der pathophysiologischen Vorgänge im Gehirn und zur Evaluation neuer Therapieverfahren der zerebralen Ischämie (Garcia et al., 1993; Bederson et al., 1986; Tamura et al., 1981). Dabei werden nach einer subtemporalen Kraniotomie der Hauptstamm der A. cerebri media sowie die im Umkreis von 2 bis 3 mm abgehenden Äste elektrisch kauterisiert. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen in dem zuverlässigen Verschluss der A. cerebri media und in der guten Reproduzierbarkeit der Infarkte, weil hier im Vergleich zu anderen Operationsmodellen unter mikroskopischer Sicht das Gefäß verschlossen wird. Im Gegensatz zu anderen Ischämie-Modellen wie beispielsweise dem Fadenmodell, bei dem durch eine Arteriotomie der A. carotis interna ein Faden anterograd bis zur MCA eingeführt wird, kann intraoperativ eine Aussage über den Erfolg der Okklusion und eine Erfassung der anatomischen Variation der MCA gemacht werden. Daher sollte durch zusätzliche Methoden, wie z.B. die Magnetresonanz-Angiographie, die Okklusion der MCA überprüft 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 sind nicht betroffen. Außerdem führt unsere gewählte Technik zu keinem Verschluss der A. hypothalamica und dadurch zu keiner Beeinträchtigung der Hypothalamusperfusion mit resultierender Hyperthermie und Verstärkung der ischämischen Schädigung des Gehirns (Li et al., 1999; Zhao et al., 1994). Weiterhin ist die Gefahr einer subarachnoidalen Blutung im Gegensatz zum Fadenmodell geringer.

Zudem konnten wir weitere Komplikationen, die bei der Verwendung der Fadentechnik vorkommen können, vermeiden wie durch Gefäßperforationen bedingte unkontrollierbare subarachnoidale Blutung, intraluminale Thrombenbildung durch mechanische Endothelsschädigung und unvollständiger Verschluss der MCA durch unzureichende Einführungstiefe des Fadens.

Allerdings ist auch dieses Modell nicht frei von Nebenwirkungen, so ist das Verfahren durch die Kraniotomie sehr invasiv und zeitaufwendig. Ferner werden durch die direkte Elektrokoagulation thermische und elektrische Schädigung des Cortex verursacht mit Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke, der lokalen Hirntemperatur und des intrakraniellen Drucks. Insgesamt sind aber bei dem hier angewendeten Operationsmodell die postoperative Komplikationsrate und Mortalität im Vergleich zu anderen experimentellen Verfahren geringer ausgeprägt.

4.3 Mögliche Einflussfaktoren auf die Ergebnisse

Um experimentelle Studien miteinander vergleichbar zu machen und genaue Konsequenzen aus den gewonnenen Ergebnissen ziehen zu können, ist es nötig, definierte, standardisierte und reproduzierbare Versuchsbedingungen zu schaffen bzw. einzuhalten.

Dies verhindert Störfaktoren, die sich auf das Ausmaß des zerebralen Schadens auswirken und damit die Ergebnisse verfälschen können. Bei der Versuchsplanung wurde 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. Ferner wurden für den Versuch nur männliche Mäuse herangezogen, um geschlechtsspezifische Unterschiede sowie zyklische Schwankungen des Hormonhaushalts auszuschließen.

Im Folgenden sollen Faktoren, die einen Einfluss auf das Infarktvolumen und somit auf die Streubreite von Ergebnissen haben können, diskutiert werden.

4.4 Körpergewicht

Die Tiere der sechs Versuchsgruppen sowie der Kontrollgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrem Gewicht. Das Durchschnittsgewicht betrug präoperativ bei den jungen Tieren $27,9 \pm 2,9$ g bzw. bei den alten Tieren $37,1 \pm 4,9$ g. Das gemessene Körpergewicht vor der Perfusion drei Tage nach pMCAO ergab einen Gewichtsverlust bei den jungen Tieren von $5,5 \pm 1,9\%$ bzw. $7,5 \pm 2,1\%$ bei den alten Tieren.

Aufgrund dieser nur sehr geringen Abweichung des Körpergewichts unter den Tieren jeder Gruppe kann von einer homogenen Tiergruppe ausgegangen und eine mögliche Beeinflussung des neurologischen Schadens durch das Körpergewicht wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

4.5 Temperatur

Zahlreiche experimentelle Untersuchungen konnten den protektiven Effekt der Hypothermie bei einer zerebralen Ischämie beweisen. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass eine postischämische Hypothermie die negative Auswirkung in Bezug auf Infarktgröße, Verlust der Integrität der Basalmembran und des neurologischen Outcomes einer zerebralen Ischämie signifikant verringern kann (Bernard et al., 2002; Hammann et al., 2004; Kawai et al., 2000; Yanamoto et al., 1999). Aus diesem Grund konnte bei einem akuten Hirninfarkt beim Menschen durch einen thrombotischen Gefäßverschluss eine postischämische künstliche Hypothermie das Infarktvolumen und das Auftreten und die Schwere einer Hämorrhagie bei einer thrombolytischen Therapie reduzieren.

Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass eine künstliche Hyperthermie von 40°C nach der MCAO für eine Stunde in der Ratte zu größeren Infarkten geführt hat (Chen et al., 1991). Wurde die Hyperthermie durch physikalische Methoden unterdrückt und so Normothermie erreicht, kam es zu einem signifikant kleineren Infarkt (Reglodi et al., 2000).

Inwieweit bei den Versuchstieren eine Störung der Thermoregulation vorgelegen hat, ist schwer abzuschätzen. Im Vergleich der verschiedenen Ischämiegruppen untereinander wird der Einfluss der Gehirntemperaturschwankungen nicht weiter berücksichtigt. Es wurde intra- und postoperativ keine Messung der intrakraniellen Temperatur vorgenommen.

4.6 Arterieller Blutdruck

Die Kontrolle des arteriellen Blutdruckes hat ebenfalls einen Einfluss bei cerebralen Ischämie-Modellen. Er verhält sich umgekehrt proportional zur Größe des Infarktareals (Zhu et al., 1995). In mehreren Studien konnte eine günstige Auswirkung einer milden arteriellen Hypertonie auf das Infarktvolumen gezeigt werden (Chileuitt et al., 1996). Auch hier erfolgte in

allen Gruppen während des gesamten Experimentes bei den Versuchstieren keine Überwachung des arteriellen Blutdruckes, so dass hier mögliche Ursachen für die Ergebnisstreuung liegen können.

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit

4.7.1 Alter und Komplikationen durch die pMCAO

Bei der pMCAO Durchführung sind einige Probleme und Komplikationen aufgetreten. Insgesamt sind aber bei dem hier angewendeten Operationsmodell die postoperative Komplikationsrate und Mortalität im Vergleich zu anderen experimentellen Verfahren gering ausgeprägt. Im Folgenden soll die Frage geklärt werden, inwieweit das höhere Alter dabei eine Rolle spielt.

In unserer Studie konnten wir keine signifikante Korrelation zwischen Alter und höherer Sterblichkeitsrate feststellen. So lag die allgemeine Sterblichkeit der alten Mäuse bei 7,1% und war damit nicht signifikant höher als die der jungen Mäuse mit 3,5% ($p = 0,09$).

Eine höhere Sterblichkeitsrate im Alter wurde in einem MCAO Model in der Ratte 43,5% vs. 6,3% beobachtet (Wang et al., 2003). Hier war aber das Alter der adulten Ratten mit 22-24 Monaten deutlich größer als dasjenige bei unseren verwendeten adulten Mäusen mit 13-16 Monaten.

Eine weitere mögliche Komplikation der MCAO war das Auftreten einer Subarachnoidalblutung (SAB) durch eine postoperative Nachblutung aus dem verschlossenen Gefäßstumpf. Hier konnte zwar eine niedrige Häufigkeitsrate von 7,5% im Gegensatz zu der Fadenmethode, die mit einer Häufigkeit von ca. 20-30% beschrieben wurde (Schmid-Elsaesser et al., 1998), beobachtet werden, es war aber keine hochgradige SAB im Alter zu sehen 6,9% vs. 8,1% ($p = 0,4$).

Ob die Operation zur Induktion eines ischämischen Infarktes geführt hatte, konnte zweifelsfrei erst nach der transkardialen Perfusion in einer zweifachen Vergrößerung festgestellt werden. Bei den jungen bzw. adulten Tieren zeigten 14,5% bzw. 20,4% keinen Infarkt trotz unauffälligen Operationsverlaufes und konnten daher nicht in die Auswertung aufgenommen werden. Es ist zu bemerken, dass unter allen untersuchten Genotypen JNK1 ko JUNG und ALT als einzige Gruppen postoperativ zu 100% einen Infarkt aufwiesen.

Bei der Analyse der totalen Volumina der nicht infarzierten Hemisphäre konnte zwar bei allen Gruppen eine Größenabnahme im Alter festgestellt werden, jedoch war dies ohne statistische Signifikanz. Hierbei ist zu bemerken, dass der durch den zerebralen Infarkt entstehende Gewebsverlust unabhängig vom Alter bei allen Gruppen ungefähr gleich war. Damit die physiologischen vorliegenden Unterschiede der Gehirnvolumina im Alter bei der Auswer-

tung keinen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse bewirken und um eine größere Streubreite zu verhindern, wurde neben den direkten auch die indirekten Infarkt volumina sowie der prozentuale Anteil des Infarktvolumens bezogen auf das Volumen der gesamten kontralateralen Hemisphäre gemessen und bewertet. Wie erwartet zeigte sich, dass die Infarkt volumina bei der direkten Messung zu hochgeschätzt waren und unterstützte damit frühere Studienergebnisse (Brint et al., 1988; Swanson et al., 1991). In einer Vorstudie bei Ratten resultierte aus indirekten Messungen im Gegensatz zu direkten Messungen der Infarkt volumina 6h bis drei Tage nach zerebralem Infarkt ebenfalls eine Reduzierung der zeitabhängigen Variation und Abweichung der Ergebnisse (Lin et al., 1993).

4.7.2 Anatomische Variation des Gefäßverlaufes der MCA und möglicher Einfluss auf die Ergebnisse

Die meisten Ischämie modelle zur Induktion fokaler Ischämien bei klinischen Studien führen eine Okklusion der A. cerebri media (MCA) durch, da diesem Gefäß eine große Bedeutung in Bezug auf den thromboembolischen Schlaganfall beim Menschen beigemessen wird und somit im Mittelpunkt vieler Untersuchungen steht. Dies bedarf einer genauen Analyse und Erfassung der anatomischen Variation der MCA und ihrer Äste bei den verschiedenen Genotypen, um einen zuverlässigen und einheitlichen zerebralen Infarkt zu erzielen. Dadurch gelingt es uns, eine potentielle Quelle der Variation der quantitativen Infarktmessungen zu erfassen.

Als Teil dieser laufenden Studie haben wir routinemäßig jede Variation der MCA bei den Versuchstieren identifiziert und photographisch dokumentiert. Im Folgenden soll das Problem der anatomischen Variation der MCA zwischen den Genotypen diskutiert werden. Bis heute wurde nur selten die zerebrale Gefäßversorgung der Maus untersucht worden, wobei sich die meisten Studien auf die Prüfung der Circulus arteriosus Willisii konzentrierten. So zeigten Balb/C Maus-Stamm signifikant häufiger einen nicht kompletten Circulus arteriosus cerebri mit fehlender oder nur teilweise angelegter A. communicans posterior (Baron et al., 1993). Außerdem wurde gezeigt, dass diese Arterie in über 90% der Fälle bei C57/BL/6 Tieren fehlte (Majid et al., 2000). Weiterhin waren die meisten Vergleiche zwischen Maus und Ratte auf die Circulus arteriosus cerebri fokussiert (Okuyama et al., 2004; Beckmann et al., 2003; Beckmann, 2000; Kitagawa et al., 1998).

Die derzeit vorliegenden Befunde über die anatomische Variation des horizontalen Segments der MCA stammen aus Rattenexperimenten. Rubino und Young (1988) beobachteten sechs anatomische Variationen der MCA bei adulten Sprague-Dawley Ratten. In einer anderen Studie des gleichen Tierstammes wurden fünf vaskuläre Typen der MCA identifiziert

(Kahveci et al., 1999). Dabei waren bei 88% der Versuchstiere zwei Haupttypen der MCA festzustellen. Zum einen Typ A mit piriformem und frontalem anterioren Ast sowie posteriorem temporalen Ast (45%); zum anderen Typ B mit fehlendem temporalen Ast und dem Vorhandensein der beiden piriformen und frontalen Äste (43%).

In der vorliegenden Arbeit haben wir den horizontalen Ast und die Hauptabzweigungs-äste der MCA, die bei den Techniken zur tierexperimentellen Induktion von Hirninfarkten eine zentrale Rolle spielen, bei der Maus untersucht. Genauso wie bei den Ratten wurde eine große Heterogenität der Gefäßanatomie der MCA bei den verschiedenen Genotypen identifiziert. Dies wurde dokumentiert und in einem kleinen Atlas präsentiert (Abb. 15 bis 18). Dieser Heterogenität innerhalb der Gefäßanatomie sowie der daraus resultierenden Pathophysiologie Rechnung zu tragen, stellt eine erhebliche Herausforderung für die Simulation humaner Schlaganfälle im Tiermodell dar. Ebenfalls bleibt offen, inwieweit die Unterschiede in der Gefäßanatomie als Ursache für die Streubreite der Infarktgrößen anzusehen sind. Unter diesem Gesichtspunkt sollten neue neuroprotektive Therapieverfahren dies auch in Betracht ziehen.

4.7.3 Infarktgrößenbestimmung

4.7.3.1 Funktionen der JNK im Nervensystem

Ehe die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert werden, sollen im folgenden Abschnitt physiologische Funktionen der einzelnen JNK Isoformen erläutert werden. Unter den drei Mitgliedern der JNK-Familie werden JNK1 und 2 ubiquitär exprimiert, während JNK3 neben Herz, endokrinen Pankreas und Hoden vor allem im Gehirn gebildet wird.

Bereits in der embryonalen Entwicklung haben die JNKs eine entscheidende Bedeutung. JNK1+2 -Doppel-knockout Mäuse waren aufgrund des Defektes der Neuralrohrschließung nicht lebensfähig (Kuan et al., 1999). Die überlebenden JNK1 -/-, JNK1 -/+ oder JNK2 -/-, JNK2 -/+ zeigten eine spezifische Malformation der Anatomie des ZNS (Sabapathy et al., 1999). Auch die Modulation der Expression der JNK während der prä- und postnatalen Entwicklung lässt auf weitere Funktionen für das Ausreifen eines Organismus schließen (Carboni et al., 1998; Yang et al., 1997). Für die physiologische Entwicklung des Gehirns sind Beteiligungen von JNK1 und JNK2 beschrieben (Kuan et al., 1999; Sabapathy et al., 1999; Weston et Davis, 2002; Change et al., 2003). Weiterhin gibt es Hinweise auf Funktionen der JNK innerhalb der Modulation der Zytoskelettsreorganisation, neuroplastischer Adaptation und der Regeneration. In vitro konnte hierbei im Rahmen der Organisation des Zytoskeletts gezeigt werden, dass JNK Tau, Aktin (Standen et al., 2001; Yoshida et al., 2004) oder dem Neurofilament phosphorylieren (Waetzig et Herdegen, 2003). Auch Verlet-

zungen der Nerven führen zur raschen Aktivierung der JNK im adulten Nervensystem (Herdegen et al., 1998).

Um die unterschiedlichen Funktionen der individuellen JNK Isoformen zu untersuchen, werden JNK Knock-out Mäuse verwendet. So provoziert JNK1 ko beispielweise einen progressiven Verlust von Mikrotubuli in Axonen und Dendriten (Chang et al., 2003). JNK1 und JNK2 sind für die Auslösung einer Apoptose im Rahmen der embryonalen Entwicklung notwendig (Sabapathy et al., 1999; Kuan et al., 1999). Andererseits ist JNK3 in der Lage, die NGF (nerve growth factor) vermittelte Differenzierung von PC12 Zellen in vitro zu steigern (Waetzig et Herdegen, 2003). Bei JNK3 ko Mäusen konnte ebenfalls ein verbesserter Schutz gegen Epilepsie (Yang et al., 1997) nach Intoxikation mit MPTP (Hunot et al., 2004) und nach Gabe des prokonvulsiven Stoffes Kainat beobachtet werden, wohingegen dieser durch genetische Inhibition der JNK1 nicht zu beobachten war. In der Studie von Kuan et al. (2003) an einem kombinierten Hypoxie-Ischämie-Modell bei einem Monat alten Mäusen, konnte ein Schutz vor Ischämie-induzierter Neurodegeneration bei JNK3 Ko gezeigt werden. Zudem konnten Tian et al. (2003) eine starke JNK3-Aktivierung nach globaler Ischämie messen. JNK3 wurde nicht nur in neurodegenerativen Prozessen identifiziert, sondern ebenfalls auch als Effektor in physiologischen Zusammenhängen eingebunden (Übersicht bei Waetzig et Herdegen, 2005; Waetzig et al., 2006).

Die Erkenntnis, dass den JNK neben den neurodegenerativen auch physiologische Funktionen zugeschrieben sind, ist bei der Entwicklung und klinischen Anwendung von JNK-Inhibitoren zu berücksichtigen. Insbesondere bei chronisch neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer (Zhu et al., 2003) und M. Parkinson (Hunot et al., 2004) wird bei einer langfristigen Administration von JNK-Inhibitoren eine Beeinflussung der physiologischen Funktionen zu bedenken sein.

4.7.3.2 Beteiligung der JNK Isoformen bei der ischämieinduzierten Neurodegeneration

Im folgenden Kapitel soll eine Aussage über die erzielten Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung bei den unterschiedlichen Genotypen getroffen werden, um so eine mögliche Abhängigkeit zwischen Genotyp und Größe der ischämischen Schädigung aufzuzeigen.

Borsello et al. (2003) konnten feststellen, dass die Inhibition von JNK, durch einen Peptidinhibitor vor Exzitotoxizität und cerebraler Ischämie schützt. Es stellt sich des Weiteren die Frage, welche der JNK Isoformen an der Ischämie-induzierten Neurodegeneration beteiligt ist. In dieser Hinsicht konnten wir in unserer Studie Folgendes feststellen:

Im Hirnschnitt d (Bregma -2,18 mm) zeigte sich beim Vergleich der WT1 gegenüber der JNK1 ko sowohl bei den jungen ($17,8\% \pm 6,4$ vs. $21,5\% \pm 4,6$; $p < 0,05$) als auch bei den alten ($8,4\% \pm 5,7$ vs. $19,9\% \pm 3,8$; $p < 0,05$) eine signifikante Zunahme des prozentualen Infarktanteils. Diese Vergrößerung war viel stärker ausgeprägt beim Vergleich der adulten Tieren. Wir konnten damit frühere Befunde unserer Arbeitsgruppe bestätigen (Brecht et al., 2005) und weisen auf die protektive Rolle der JNK1 in der cerebralen Ischämie hin. In der Literatur sind bereits protektive Aufgaben der JNK1 beschrieben. So induziert JNK1 in Kombination mit AFT3 (activating transcription factor 3) das Hitzeschockprotein HSP27, ein antiapoptotisches Protein, welches den durch JNK induzierten neuronalen Zelltod hemmt (Nakagomi et al., 2003). Ebenfalls kann TAK1-vermittelte Aktivierung von JNK1 eine zelluläre Protektion durch Aktivierung des antiapoptotischen XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) vermitteln (Sanna et al., 2002).

Ebenfalls wurde eine statistisch signifikante Zunahme des prozentualen Infarktanteils beim Vergleich der Wildtiergruppe WT2 (JUNG= $1,3\% \pm 3,4$, ALT= $2,1\% \pm 5,7$) und den entsprechenden Knock-out Mäusen JNK2 (JUNG= $18,5\% \pm 4,8$, ALT= $9,8\% \pm 7,7$) festgestellt. Hier ist aber zu bemerken, dass der WT2 Stamm einen deutlichen Größenunterschied der Durchschnittsinfarktvolumina verglichen mit den anderen Wildtyp-Gruppen WT1, -3 gezeigt hat. Außerdem wurden bei der Untersuchung der räumlichen Ausdehnung der Infarktareale (Tab. 8) bei den WT2 im Gegensatz zu allen anderen Genotypen keine Infarkte ab Bregma -1,38 beobachtet. Diese Diskrepanz in der WT2 Gruppe zu den anderen Wildtyp-Gruppen WT1 und WT3 schränkt die Beurteilung der Ergebnisse für diese Gruppe ein und ist möglicherweise auf eine Hintergrundmutation bei der Zucht zurückzuführen. In anderen Arbeiten konnte bis jetzt keine Funktion von JNK2 bei ischämischer Pathologie nachgewiesen werden (Kuan et al., 2003). Andererseits wurde ein zytoprotektiver Effekt von JNK2 und JNK1 beschrieben. Dies war aber in einem Ischämiemodell mit anderen Zellen - der Kardiomyozyten - der Fall, so dass keine generellen Vergleiche bezüglich der Funktionen angestellt werden können.

In vitro zeigten Eminel et al. (2004) einen negativen Effekt von JNK2, nicht aber für JNK1 nach 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) Applikation, einem vitalen Stress für die Zellen durch Steigerung der Cytochrome C-Freisetzung, welches wiederum zu einem erhöhten Zelltod führte. Bei den mit dominant-negativem JNK2 (JNK2 $-/-$) transfizierten PC12 Zellen gingen dabei nach Zugabe von 6-OHDA 60% weniger Zellen als bei JNK2 ($+/+$) zugrunde.

Schließlich konnte beim Vergleich der Gruppen JNK 3 ko und der entsprechenden Kontrollgruppe hinsichtlich pIV TOT (der prozentuale Anteil der Läsionsvolumens) und pIV

(a-d) keine statistische Signifikanz im Bezug auf Knock-out oder Alter nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse widersprechen den Erwartungen und Beobachtungen, die sich aus den bereits genannten Epilepsieversuche ergeben haben: Es konnte kein direkter neuroprotektiver Effekt von JNK3 Ko festgestellt werden, sofern man die Infarktgröße als Untersuchungsparameter wie in den Epilepsieversuchen ansah (Yang et al., 1997). Es muss allerdings angemerkt werden, dass sich dieser neuroprotektive Effekt insbesondere in der CA3-Region des Hippokampus manifestierte, einem gegenüber Exzitotoxizität besonders vulnerablen Bereich. Bei dem verwendeten Ischämiemodell in der laufenden Studie kommt es zu einem kortikalen Infarkt im gesamten Versorgungsgebiet der A. cerebri media, so dass eine Verschiebung der Relation der Neuronen der einzelnen Regionen in Betracht gezogen werden muss. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass sich die cerebrale Ischämie durch MCAO und die durch Kainat induzierte Epilepsie als Beispiele neuronaler Schädigung prinzipiell unterscheiden. Es handelt sich bei cerebralem Insult um ein äußerst komplexes Ereignis, bei dem zahlreiche zusätzliche Einflüsse in der Pathophysiologie eine wichtige Rolle spielen wie beispielweise Schädigung der Blut-Hirn-Schranke oder die Neuroglia-Aktivierung. Diese Faktoren können durchaus für unterschiedliche Resultate zwischen cerebraler Insult und Epilepsie verantwortlich sein.

Desweiteren ist bei der Betrachtung der Ergebnisse auf die nachgewiesenen teilweise großen Unterschiede des durchschnittlichen Infarktvolumens zwischen den einzelnen Wildtyp-Gruppen hinzuweisen (Tab. 9 sowie Abb. 13). Dieser Unterschied lässt sich noch nicht ausreichend erklären. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen unsere Arbeitsgruppe, beobachteten wir, dass WT3 Mäuse größere Infarktvolumina als WT1 Mäuse gezeigt haben. Die Annahme, dass WT3 der permanenten MCAO gegenüber empfänglich ist, während WT1 diesen Versuchsmodell gegenüber resistent ist, wurde dadurch erhärtet.

Eine weitere Erklärung für die fehlenden Unterschiede bei den knock-out Tieren in unsere Studie liefert die niedrige Fallzahl der einzelnen Gruppen. Obwohl 176 Mäuse operiert wurden, konnten pro Gruppe nur zwischen 7 und 12 Tiere eingeschlossen werden; die übrigen Tiere erfüllten nicht die Einschlusskriterien.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass der Verlust von JNK1 die Schadensgröße verstärkt. Die Variabilität der anatomischen Gefäßverhältnisse trägt zur Variabilität der Infarktgrößen bei.

4.7.4 Experimentelle Schlaganfall und Neuroprotektion im Alter

Der ischämische Schlaganfall ist eine Krankheit, die mit zunehmendem Alter auftritt und mit hoher Sterblichkeit oder anhaltender Behinderung einhergeht. Es existieren bisher nur

wenige Studien, in denen Ischämie Modelle zur Induktion von Schlaganfällen benutzt wurden und sich mit dem Einfluss von fortgeschrittenem Alter auf den zerebralen Infarkt und dem neuroprotektiven Potential beschäftigen.

Im hohen Alter sind in mehreren Arbeiten diverse neurologische und neurobiologische Veränderungen untersucht und dokumentiert. Dies beinhaltet beispielweise Veränderungen der Katecholamine (Fench et al., 1978), geringe und niedrige Sensitivität der Dopamin-Rezeptoren (Govoni et al., 1977; Cortes et al., 1989), Abnahme der Neuronen-Glia Zellrelation (Miquel et al., 1983) sowie eine Abnahme der Dichte und Funktion von NMDA-Rezeptoren (Wenk et al., 1991). Weiterhin kommt es im Alter zu einer Veränderung der Mikrozirkulation. Dies beinhaltet eine Abnahme des Kapillarlumens (Hajdu et al., 1989), Verdickung der Basallamina (Topple et al., 1991), Zunahme von Elastin und Kollagen mit Arteriosklerose und Beeinträchtigung der Reaktivierung von Stimulation der Vasodilatoren (Mayhan et al., 1990; Hongo et al., 1988). Diese strukturellen Veränderungen in dem vaskulären System tragen im Alter zur Reduzierung der Fähigkeit der Zerebralfäße zu Autoregulation gegen Hypoxie und Ischämie bei. Ebenfalls kommt es im Alter zu einer Verschlechterung der immunologischen Reaktionen (Futrell et al., 1991).

In der laufenden Studie haben wir den Effekt des Alters auf die Infarkt volumengröße bei den Mäusen untersucht. Eine altersabhängige Zunahme der Infarktvolumen wurde in einem fokalen Ischämie Modell bei Ratten (Jung: 17 Monate, Alt: 30 Monate) beobachtet (Davis et al., 1995). Diese Studie hat ebenfalls demonstriert, dass Gehirne ältere Mäuse zugänglicher für eine neuroprotektive Behandlung mit NMDA-Rezeptor Antagonist D-CPPene als diejenigen der jüngeren Tiere waren. Diesen Effekt des Alters konnte jedoch Wang et al. (2003) nicht bestätigen. Hierbei gab es keinen signifikanten Unterschied in den gemessenen Infarktvolumina zwischen den jungen (3-4 Monate) und alten Ratten 24 h sowie 28 Tage nach dem ischämischen Ereignis (Wang et al., 2003).

Sutherland et al. (1996) betonten neben dem Effekt des Alters zusätzlich die Bedeutung der regionalen Unterschiede in einem transienten Ischämie Modell MCAO am Vorderhirn. Während nach der Ischämie am Vorderhirn ältere Ratten (24 Monaten) deutlich weniger CA1 neuronale Nekrosen als junge Tiere (2-6 Monaten) zeigten, kam es bei den älteren Gruppen in den beiden striatalen und neokortikalen Anteilen zu einem signifikant hohen Neuronenuntergang. Weiterhin fand sich eine Zunahme der Volumen der infarzierten Areale und der Anzahl der nekrotischen Neuronen bei den alten Ratten an einer fokalen zerebralen Ischämie. In der laufenden Studie konnten wir keine Zunahme der Infarktvolumina im Alter beobachten. Im Gegensatz dazu beobachteten wir Abnahmen der gemessenen Volumina bei

den älteren Tieren sowohl bei den knock-out Mäusen als auch bei den Kontrollgruppen (Tab. 9). Hierbei ist zu bemerken, dass das Alter unsere Versuchstiere mit 13-16 Monaten niedriger als das der verwendeten Tiere anderer Arbeitsgruppen ist.

Diese voneinander abweichenden Ergebnisse verschiedener Studien konnten bis jetzt nicht ausreichend geklärt werden. So wird im Alter die große Ausdehnung der Infarktvolu-
men bei kortikalen Infarkten und nicht bei Basalganglien-Infarkten aufgrund der unterschied-
lichen Gefäßversorgung beide Hirnregionen erklärt. Während die Blutzufuhr für den Cortex
auch über Kollateralkreisläufe läuft, werden die Basalganglien ausschließlich durch Endarte-
rien versorgt. Ebenfalls spielen morphologische Veränderungen der cerebralen Gefäße im
hohen Alter wie bereits oben erwähnt eine entscheidende Rolle und tragen zur Reduzierung
der Autoregulation der Cerebralf Gefäße gegen Ischämie und Hypoxie bei. Zusammenfassend
ist zu sagen, dass altersabhängige Mechanismen beim cerebralen Insult weiterhin offen blei-
ben. Es sollte die Natur und Art des ischämischen Insults, regionale Unterschiede und mögli-
che neuronale Verbindungen in der Interpretation der Ergebnisse in Betracht gezogen werden.
Die Interaktion zwischen alterbedingten Veränderungen in der Morphologie, der Neuroche-
mie und dem Verhalten der ischämischen Kaskade erschwert ebenfalls die Interpretation der
Daten. Zudem basieren alle Studien auf Nagetieren mit einer Lebensspanne von wenigen Jah-
ren, was die Übertragung der erhobenen Daten auf das hohe Alter des Menschen entgegenzu-
setzen ist.

5 Zusammenfassung

Neurodegenerative Stimuli lösen in Abhängigkeit von der embryonalen, postnatalen, juvenilen oder adulten Entwicklung spezifische altersabhängige Reaktionen aus. Diesen Reaktionen liegen altersspezifische genetische Programme der Apoptose, Anti-Apoptose oder Regeneration zugrunde. Daher kann der Einfluss von pathophysiologisch relevanten Molekülen zu altersabhängigen Veränderungen führen. In der vorliegenden Promotion habe ich den Einfluss von JNK-Isoformen auf die Gewebedegeneration nach zerebraler Ischämie an jüngeren und älteren Mäusen mit genetischer JNK-Defizienz (JNK knock-out) untersucht.

Es wurde eine Okklusion der A. cerebri media in jüngeren männlichen Mäusen (2-4 Monate alt) mit derjenigen in älteren Mäusen (13-16 Monate alt) untersucht. Nach 3 Tagen wurde das Infarktareal bestimmt und mit den jeweiligen Wildtyp-Kontrollen verglichen. Zusätzlich wurde der anatomische Verlauf des Gefäßgebietes der A. cerebri media für jeden Mausstamm untersucht.

Das Alter veränderte nicht die Sterblichkeit. Die Tiere zeigten teils erhebliche Variabilitäten des anatomischen Gefäßverlaufes, teilweise innerhalb einer Gruppe als auch zwischen den Mausstämmen. Dieser Heterogenität innerhalb der Gefäßanatomie sowie der daraus resultierenden Pathophysiologie Rechnung zu tragen, stellt eine erhebliche Herausforderung für die Simulation humaner Schlaganfälle im Tiermodell dar. Ferner bleibt dadurch offen inwieweit diese Unterschiede in der Gefäßanatomie einen Einfluss auf die Infarktgrößen haben können.

JNK1 ko zeigte in einigen anatomischen Bereichen eine Zunahme des Infarktareals, was auf eine physiologisch-protective Rolle von JNK1 deutet. JNK2 ko war nicht zu beurteilen, da die Kontrollgruppe untypische Änderungen des Infarktareals und auch der Gefäßanatomie zeigte, was sich am ehesten auf unspezifische Änderungen im genetischen Hintergrund zurückführen lässt. Der JNK3 knock-out unterschied sich nicht hinsichtlich der Kontrollen, und es gab auch keine altersspezifischen Unterschiede.

6 *Literaturverzeichnis*

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.

Astrup J SL, Siesjö BK. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 1981; 12: 723-725.

Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; 17: 472-476.

Beckmann N. High resolution magnetic resonance angiography noninvasively reveals mouse strain differences in the cerebrovascular anatomy in vivo. *Magn Reson Med* 2000; 44: 252-258.

Beckmann N, Schuler A, Mueggler T, Meyer EP, Wiederhold KH, Staufenbiel M, Krucker T. Age-dependent cerebrovascular abnormalities and blood flow disturbances in APP23 mice modeling Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2003; 23: 8453-8459.

Berger K, Hense HW, Rothdach A, Weltermann B, Keil U. A single question about prior stroke versus a stroke questionnaire to assess stroke prevalence in populations. *Neuroepidemiology* 2000; 19: 245-257

Bernard SA, Gray TW, Buist MD. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med* 2002; 346: 557-563

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.

Bots ML, Looman SJ, Koudstaal PJ, Hofman A, Hoes AW, Grobbee DE. Prevalence of stroke in the general population. The Rotterdam Study 1996; 27(9): 1499-1501

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

Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli WA. Focal brain ischemia in the rat: Methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988; 8: 474-485.

Carboni S, Boschert U, Gaillard P, Gotteland JP, Gillon JY, Vitte PA. AS601245, a c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) inhibitor, reduces axon/dendrite damage and cognitive deficits after global cerebral ischaemia in gerbils. *Br J Pharmacol* 2008; 153(1): 157-163.

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.

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

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 artery occlusion in rats. *Surg Neurol* 1996; 46: 229-234.

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.

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.

Crocker SJ, Lamba WR, Smith PD, Callaghan SM, Slack RS, Anisman H, Park DS. c-Jun mediates axotomy-induced dopamine neuron death in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(23): 13385-13390.

Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103: 239–252.

Davis M, Mendelow AD, Perry RH, Chambers IR, James OF. Experimental Stroke and Neuroprotection in the Aging Rat Brain. American Heart Association. *Stroke* 1995; 26: 1072-1078.

Deng X, Xiao L, Lang W, Gao F, Ruvolo P, May WS Jr. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem* 2001; 276(26): 23681-23688.

Dérillard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by uv light and ha-ras that binds and phosphorylates the c-jun activation domain. *Cell* 1994; 76: 1025-1037.

Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 1995; 267: 682-685.

Deutsche Schlaganfall Stiftung e.V. Epidemiologische Daten 1999.

Diener HC FM. Schlaganfall. Stuttgart: George Thieme Verlag 2002.

Dickens M, Rogers JS, Cavanagh J, Raitano A, Xia Z, Halpern JR, Greenberg M.E, Sawyers CL, Davis RJ. A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 1997; 277: 693-696.

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.

Dorr A, Sled JG, Kabani N. Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: A magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *NeuroImage* 2007; 35: 1409-1423.

Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 1997; 57: 1835-1840.

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, Herdegen T, Waetzig V, Roemer L. JNK2 Translocates to the Mitochondria and Mediates Cytochrome c Release in PC12 Cells in Response to 6-Hydroxydopamine. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 55385-55392.

Garcia J. Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke* 1984; 15: 5-14.

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.

Garcia JH. A reliable method to occlude a middle cerebral artery in Wistar rats. *Stroke* 1993; 24: 1423-1424.

Giasson BI, Mushynski WE. Study of proline-directed protein kinases involved in phosphorylation of the heavy neurofilament subunit. *J Neurosci* 1997; 17: 9466-9472.

Graham DI, Lantos PL. *Greenfield's Neuropathology* Arnold, London 1997; 86-90.

Grehl H, Reinhardt F. *Checkliste Neurologie*. Thieme Verlag, Stuttgart 2005.

Guan Q, Pei D, Liu X, Wang XT, Xu TL, Zhang GY. Neuroprotection against ischemic brain injury by SP600125 via suppressing the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. *Brain Res* 2006; 1092(1): 36-46.

Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. 1995; 267: 389-393.

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.

Hademenos G, Massoud T. Biophysical Mechanisms of Stroke. *Stroke* 1997; 28: 2067-2077.

Hamann G. Der akute Hirninfarkt: Pathophysiologie und moderne Therapiekonzepte. *Radiologie* 1997; 37: 843-852.

Hamann GF, Liebetrau M, Martens HK. Microvascular basal lamina injury following experimental focal cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 526-533.

Harper SJ, Saporito MS, Hewson L, Young L, Smith D, Rigby M, Jackson P, Curtis N, Swain C, Hefti F, Vaught JL, Sirinathsingji D. CEP-1347 increases ChAT activity in culture and promotes cholinergic neurone survival following fimbria-fornix lesion. *Neuroreport* 2000; 11(10): 2271-2276.

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* 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): 781-788.

Hillen T, Nieczaj R, Munzberg H, Schaub R, Borchelt M, Steinhagen-Thiessen E. Carotid atherosclerosis, vascular risk profile and mortality in a population-based sample of functionally healthy elderly subjects: the Berlin ageing study. *J Intern Med* 2000; 247: 679-688.

Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994; 36: 557-565.

Hossmann KA. Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death. *Prog Brain Res* 1993; 96: 161-177.

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.

Ito M, Yoshioka K, Akechi M, Yamashita S, Takamatsu N, Sugiyama K, Hibi M, Nakabeppu Y, Shiba T, Yamamoto KI. JSAP-1, a novel Jun N-terminal protein, kinase (JNK)-binding protein that functions as a scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol Cell Biol* 1999; 19(11): 7539-7548.

Kadowaki H, Nishitoh H, Urano F, Sadamitsu C, Matsuzawa A, Takeda K, Masutani H, Yodoi J, Urano Y, Nagano T, Ichijo H. Amyloid β induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death and Differentiation* 2005; 12: 19-24.

Kahveci N, Alkan T, Korfali E, Ozlük K. Middle Cerebral Artery Occlusion of Rats: Pathological and Neurological Evaluation of the Model. *Neurosurgery* 1999; 9: 52-58.

Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Dérijard 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.

Kawai N, Okauchi M, Morisaki K, Nagao S. Effects of delayed intraischemic and postischemic hypothermia on a focal model of transient cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2000; 31: 1982-1999.

Kempfski O. *Pathologische Neurophysiologie* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2000, 92-94.

Kitagawa K, Matsumoto M, Yang G, Mabuchi T, Yagita Y, Hori M, Yanagihara T. Cerebral ischemia after bilateral carotid artery occlusion and intraluminal suture occlusion in mice: evaluation of the patency of the posterior communicating artery. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 570-579.

Kogure K, Kato H. *Neurochemistry of stroke. Pathophysiology, diagnosis and management.* Churchill Livingstone, New York Edinburgh London 1992; 69-101..

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.

Kuschinsky Y. *Lehrbuch der Physiologie* In: Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.), *Blut-Hirn-Schranke, Liquor cerebrospinalis, Hirndurchblutung und Hirnstoffgewechsel.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1996; 721-732.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. Die Stress-aktivierte Proteinkinase Unterfamilie der c-Jun-Kinasen. *Nature* 1994; 369: 156-160.

Lawler S, Fleming Y, Goedert M, Cohen P. Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr Biol* 1998; 8: 1387-1390.

Le-Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, Claret FX, Green DR, Karin M. Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol Cell Biol* 1999; 19(1): 751-763.

Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74: 49-139.

Li F, Omae T, Fisher M. Spontaneous hyperthermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke* 1999; 30: 2464-2470.

Lin A, Dibling B. The true face of JNK activation in apoptosis. *Aging Cell* 2002; 2: 112-116.

Lin TN, Er JJ, Wu G, Khan M, Hsu CY. Effect of Brain Edema on Infarct Volume in a Focal Cerebral Ischemia Model in Rats. *Stroke* 1993; 24: 117-121.

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

Liu JR, Zhao Y, Patzer A, Staak N, Boehm R, Deuschl G, Culman J, Bonny C, Herdegen T, Eschenfelder C. The JNK-inhibitor XG-102 enhances the neuroprotection of hyperbaric oxygen after cerebral ischaemia in adult rats. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2009. PMID: 19849792.

Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappa B activation prevents cell death. *Cell* 1996; 87: 565-576.

Marques CA, Keil U, Bonert A, Steiner B, Haass C, Muller WE, Eckert A. Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway. *J Biol Chem* 2003; 278(30): 28294-28302.

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.

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

Mielke K, Herdegen T. JNK and p38 stress kinases - degenerative effectors of signal-transduction cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol* 2000; 61: 45-60.

Minden A, Karin M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP Kinases. *Biochem Biophys Acta* 1997; 1333: F85-F104.

Mohit AA, Martin JH and Miller CA. p49^{MAPK12} kinase: a novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system. *Neuron*. 1995; 14: 67-78.

Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J. Neurosci.* 2001; 21: 7551-7560.

Mosso M, Baumgartner RW. Carotid stenosis: epidemiology and symptomatology. *Schweiz Med Wochenschr.* 2000; 130(35): 1226-30. Review. German. PMID: 11013927.

Mumenthaler M, Mattle H. *Neurologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. Juli 2002.

Nijboer CH, van der Kooij MA, van Bel F, Ohl F, Heijnen CJ, Kavelaars A. Inhibition of the JNK/AP-1 pathway reduces neuronal death and improves behavioral outcome after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Behav Immun.* 2009. PMID: 19766183.

Okuyama S, Okuyama J, Tamatsu Y, Shimada K, Hoshi H, Iwai J. The arterial circle of Willis of the mouse helps to decipher secrets of cerebral vascular accidents in the human. *Med. Hypotheses*. 2004; 63: 997-1009.

Ortolano F, Colombo A, Zanier ER, Scip A, Longhi L, Perego C, Stocchetti N, Borsello T, De Simoni MG. c-Jun N-terminal kinase pathway activation in human and experimental cerebral contusion. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009; 68(9): 964-971.

Pan J, Qian J, Zhang Y, Ma J, Wang G, Xiao Q, Chen S, Ding J. Small peptide inhibitor of JNKs protects against MPTP-induced nigral dopaminergic injury via inhibiting the JNK-signaling pathway. *Lab Invest*. 2010; 90(2): 156-167.

Poeck K, Hacke W. *Zerebrale Durchblutungsstörungen: Ischämische Infarkte*. Neurologie. Springer Verlag, Heidelberg. 2001. 185-238.

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

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, Somogyvari-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.

Reynolds CH, Uton MA, Gibb GM, Yates A, Anderton BH. Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J Neurochem*. 1997; 68: 1736-1744.

Rincón M, Flavell RA, Davis RJ. Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes. *Oncogene*. 2001; 20(19): 2490-2497.

Rubino GJ, Young W. Ischemic cortical lesions after permanent occlusion of individual middle cerebral artery branches in rats. *Stroke* 1988; 19: 870-877.

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.

Saporito MS, Brown EM, Miller MS, Carswell S. CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons *In vivo*. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 288(2): 421-427. PMID: 9918541

Sutherland GR, Dix GA, Auer RN. Effect of Age in Rodent Models of Focal and Forebrain Ischemia. *American Heart Association Stroke.* 1996; 27: 1663-1668.

Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 1998; 29: 2162-2170.

Scremin OU. Cerebral vascular system. In: Paxinos, G. (Ed.), *the Rat Nervous System*. Academic Press, San Diego. 1995; 3-35.

Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature.* 1999; 399: 23-31.

Siesjö BK. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981; 1: 155-185.

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

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

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

Strahl T, Gille H, Shaw PE. Selective response of ternary complex factor Sap1a to different mitogen-activated protein kinase subgroups. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(21): 11563-11568.

Sudlow C, Warlow C. Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. *Stroke.* 1997; 28, 491-499.

Suen KC, Yu MS, So KF, Chang RC, Hugon J. Upstream signaling pathways leading to the activation of double-stranded RNA dependent serine/threonine protein kinase in beta-amyloid peptide neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 2003; 278, 49819-49827.

Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990, 10: 290-293.

Tamagno E, Robino G, Obbili A, Bardini P, Aragno M, Parola M, Danni O. H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38 MAPK. *Exp. Neurol.* 2003; 180: 144-155.

Tamura A GD, Mc Culloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by (14C) iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981; 1: 61-69.

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.

Tibbles LA, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 1999; 55: 1230-1254.

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.

Toole JF, Chambless LE, Heiss G, Tyroler HA, Paton CC. Prevalence of stroke and transient ischemic attacks in the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Ann Epidemiol.* 1993; 3(5): 500-503.

Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH₂-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 7337-7342.

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

Wang RY, Wang PS, Yang YR. Effect of age in rats following middle cerebral artery occlusion. *Gerontology.* 2003; 49(1): 27-32. PMID: 12457047.

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.

Werner C. Neuroprotektion. In: Jantzen J, Löffler W (Hrsg.), *Neuroanästhesie*. Thieme Verlag. Stuttgart, 2000: 121-142.

Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin. Genet. Dev.* 2002; 12: 14-21.

Whitfield J, Neame SJ, Paquet L, Bernard O, Ham J. Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron.* 2001; 29(3): 629-643.

Whitmarsh, AJ, RJ Davis. Transcription factor AP-1 regulation by mitogenactivated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med.* 1996; 74: 589-607.

White BC, Sullivan JM, Degracia DJ, O'neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci.* 2000; 179: 1-33.

Wilson DE, Reeder DA. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore. 2006.

Yanamoto H, Nagata I, Nakahara I, Tohnai N, Zhang Z, Kikuchi H. Combination of intraischemic and postischemic hypothermia provides potent and persistent neuroprotection against temporary focal ischemia in rats. *Stroke.* 1999; 30: 2720-2726

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.

Yankner BA. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 1996; 16: 921-932.

Yashar BM, Kelley C, Yee K, Errede B and Zon LI. Novel members of the mitogen-activated protein kinase activator family in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 5738-5748.

Yasuda J, Whitmarsh AL, Cavanagh J, Sharma M, Davis RJ. The JIP group of mitogenactivated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* 1999; 10: 7245-7254.

Zhao Q, Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK. Hyperthermia complicates middle cerebral artery occlusion induced by an intraluminal filament. *Brain Res* 1994; 649: 253-259.

Zhu CZ, Auer RN. Graded hypotension and MCA occlusion duration: effect in transient focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15: 980-988.

Zivin JA, Choi DW. Stroke therapy, *Sci. Am.* 1991; 265: 56-63.

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Thomas Herdegen für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die stete und engagierte Unterstützung sowie hervorragende Betreuung und auch möchte ich mich für die vielen anregenden Diskussionen sowie seine bei zahlreichen konstruktiven Gesprächen entgegengebrachte Geduld bedanken.

Herrn Dr. Mario Götz danke ich für seine Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen und technischen Fragen, insbesondere für die Einweisung in die operativen und immunhistochemischen Methoden sowie für die lehrreichen Gespräche.

Weiteren Dank schulde ich allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Dr. Yi Zhao für die Bereitstellung und Pflege einer stabilen und effektiven Hard- und Softwareumgebung, Bildanalyse Software Image J, sowie für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei allen Mitarbeitern der Tierhaltung für die gute Zusammenarbeit und Versorgung der Tiere in ihren Stallungsgebäuden.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Anke Caliebe des Instituts für Medizinische Informatik und Statistik für die vielfältige Unterstützung in statistischen und programmiertechnischen Fragen sowie für die immer hilfreichen Gespräche meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Ganz besonders danken muss ich aber meinen Eltern, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Mustapha Addali
Geburtsdatum 28.09.1977 in Kénitra/Marokko
Nationalität Deutsch / Marokkaner
Familienstand Verheiratet

Berufsausbildung

Seit 01.01.2010

Assistenzarzt Urologie in St.-Antonius-Hospital Gronau

01.08.2008-31.12.2009

Assistenzarzt Urologie in St.-Antonius-Hospital Kleve

Praktisches Jahr

3. Tertial: 09.10.2006-28.01.2007

Chirurgie im Friedrich-Ebert-Krankenhaus (FEK) Neumünster

2. Tertial: 19.06.2006-08.10.2006

Urologie und Kinderurologie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Kiel

1. Tertial: 27.02.2006-18.06.2006

Innere Medizin im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Kiel

Hochschulbildung

Dezember, 2007

Bestehen Der Ärztliche Prüfung

März, 2003

Bestehen der Physikum an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

September, 2000

Aufnahme des Studiums, Studiengang Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Juli 2000

**Erbringung des Vorbildungsnachweises nach den Normen des Schwerpunkt-
kurzes: M (Medizinische und biologische Studien)**

1999 - 2000

Besuch des Staatlichen Studienkollegs an der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg in Halle-Saale

1998 - 1999

Deutsch-Sprachkurs am GOETH-INSTITUT, Rabat, Marokko

1995 - 1998

**Studium der Naturwissenschaftliche Studien an der Technische Universität du
Settat, Settat, Marokko**

Schulausbildung

Juni. 1995

Erlangung des Abiturs

Abschluss: Naturwissenschaftliche Abitur

1992 - 1995

Gymnasium, Mohammed V, Kénitra

1988 - 1992

Sekundarstufe, Collège Almokhtar Elsoussi, Kénitra

1983 - 1988

Grundschule, École primair, Elzahraa, Kénitra

Engagement

2004-2007

Vorsitzender der Studentengruppe des Maghrebs e.V

- Vertretung der Ausländischen Studenten bei der CAU zu Kiel und der Stadt Kiel
- Betreuung von ausländischen Studenten
- Organisation von sportlichen und kulturellen Veranstaltungen

Sept.2004- Mai 2005

Betreuung einer Muskeldystrophie-Patientin

August 2003

Mitwirkler bei dem 1. Kieler Teddybärkrankenhaus

Promotionsarbeit

Okt.2005 – Juni 2008

Forschungstätigkeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Herdegen am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie der Universität Kiel.

Thema der Promotionsarbeit: Der Einfluss von JNK-Isoformen auf die cerebrale Ischämie in jungen und alten Mäusen.