

Untersuchung ausgewählter Translationsinitiationsfaktoren nach Spreading Depolarization zur Analyse der globalen Proteinsynthese

Dissertation zur Erlangung
des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Hannah Maria Zipprich
geboren am 25.09.1984 in Heidelberg

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Otto W. Witte, Jena
2. Prof. Dr. med. Frank Richter, Jena
3. Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling, Rostock

Tag der öffentlichen Verteidigung: Dienstag, 07. März 2017

Für Papa.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vi
Zusammenfassung	viii
1. Einleitung	1
1.1. Einführung	1
1.2. Spreading Depolarizations	2
1.2.1. Spreading Depolarization und Spreading Depression	3
1.2.2. Entstehungs- und Ausbreitungstheorien	4
1.2.3. Elektrophysiologische Vorgänge und Auswirkungen	6
1.2.4. Klinische Bedeutung	8
Migräne mit Aura	9
Epilepsie	11
Ischämie, Schädel-Hirn-Trauma und Blutung	12
1.2.5. Einfluss auf die Proteinexpression	15
1.3. Translationsinitiationsfaktoren	17
1.3.1. Translation	17
1.3.2. Initiation	17
1.3.3. Regulation der Translation	18
1.3.4. Auswahl der Translationsinitiationsfaktoren	18
eIF2 α	20
eIF4E	21
p70S6-Kinase	23
2. Zielsetzung	24
3. Methoden	26
3.1. Versuchstiere	26
3.2. Operationen und Induktion der SD	26
3.3. Gehirnpräparation	29
3.4. Lyse und Fraktionierung	29
3.5. Analyse	30
3.5.1. Bestimmung der Proteinkonzentrationen	30

Inhaltsverzeichnis

3.5.2. Gelelektrophorese und Western Blot	31
3.5.3. Antikörper	32
3.5.4. Housekeeping Proteine	33
3.5.5. Auswertung mittels Chemilumineszenz und GeneTools	33
3.6. Berechnungen	34
4. Ergebnisse	35
4.1. eIF2 α und eIF2 α -P _{Ser51}	36
4.2. eIF4E und eIF4E-P _{Ser209}	38
4.3. p70S6-Kinase und p70S6-Kinase-P _{Thr389}	40
5. Diskussion	44
5.1. Diskussion der Methoden	46
5.2. Diskussion der Ergebnisse	49
5.2.1. eIF2 α	49
5.2.2. eIF4E	52
5.2.3. p70S6-Kinase	54
5.2.4. Koregulationen in SD- und sham-Tieren	56
5.3. Einfluss von SD auf die globale Proteinsynthese	57
6. Fazit und Ausblick	62
Abbildungsverzeichnis	64
Tabellenverzeichnis	65
Literaturverzeichnis	66
A. Chemikalien und Lösungen	83
B. Ergänzende Tabellen	88
C. Lebenslauf	100
D. Danksagung	102
E. Ehrenwörtliche Erklärung	104

Abkürzungsverzeichnis

aCSF	<i>artificial Cerebro Spinal Fluid</i> = künstliche Zerebrospinalflüssigkeit
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF	<i>Activating Transcription Factor</i> = aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
COSBID	<i>Co-Operative Studies on Brain Injury Depolarizations</i>
COX	Cyclooxygenase
CSD	<i>Cortical Spreading Depression</i>
DC	<i>Direct Current</i> = Gleichstrom, wird auch für Gleichspannung verwendet
ECoG	<i>Electrocorticography</i> = Elektrokortikogramm
EEG	Elektroenzephalogramm
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> = Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GABA	γ -Aminobuttersäure, inhibitorischer Neurotransmitter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> = Saures Gliafaserprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
IRES	Interne Ribosomale Eintrittsstellen
K ⁺	Kalium(ion)

Abkürzungsverzeichnis

KCl	Kaliumchlorid
Met	Aminosäure Methionin
Met-tRNA _i	..	Initiator-tRNA
mRNA	<i>messenger RNA</i> = Boten-RNA
Na ⁺	Natrium(ion)
NaCl	Natriumchlorid
NP-40	Nonidet P-40 (Octylphenoxypolyethoxyethanol)
ODC	Ornithindecaboxylase
p70S6-K	p70S6-Kinase
rCBF	<i>regional Cerebral Blood Flow</i> = regionaler zerebraler Blutfluss
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
S	Svedberg = Maßeinheit des Sedimentationskoeffizienten, Massenangabe für Ribosomen und Proteine
SAB	Subarachnoidalblutung
SD	<i>Spreading Depolarization(s)</i> , steht in der vorliegenden Studie auch für die Gesamtheit des Phänomens mit <i>Spreading Depression</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> = Natriumdodecylsulfat, anionisches Tensid
SDS-Page	...	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis</i> = Gelelektrophorese mittels SDS-Polyacrylamid-Gel
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> = Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes
Ser	Aminosäure Serin
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> = Trisgepufferte Salzlösung
TBS-T	Trisgepufferte Salzlösung mit Tween 20
Thr	Aminosäure Threonin
TIF	Translationsinitiationsfaktor(en)
tRNA	Transfer-RNA
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> = Wachstumsfaktor, der insbesondere das vaskuläre Endothel stimuliert

Zusammenfassung

Spreading Depolarizations (SD) sind ein pathophysiologisches Phänomen, das bei verschiedenen Erkrankungen des Gehirns wie z. B. der Ischämie auftritt. Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur Aufklärung ihrer Pathophysiologie im Hinblick auf die Proteinsynthese.

In früheren Studien ist bereits eine Beeinflussung der Proteinsynthese durch SD gezeigt worden. Auch nach Ischämie ist eine Regulation der Proteinsynthese durch Regulation der Expression und Aktivität von Translationsinitiationsfaktoren (TIF) bereits bekannt. Allerdings wurde hier meist ischämisches Gewebe mituntersucht, in dem neben den SD weitere pathologische Mechanismen ablaufen, die die Proteinsynthese beeinflussen. In dieser Arbeit wurden die Expression, Lokalisation und Phosphorylierung dreier TIF nach isolierten SD (im ansonsten gesunden Gewebe) untersucht. Um zu erforschen, ob SD als zugrunde liegender Mechanismus für die Hemmung der Proteinsynthese nach Ischämie in Frage kommen, wurde dadurch der Einfluss der SD auf die Proteinsynthese im zeitlichen Verlauf analysiert.

In der vorliegenden Studie wurden erstmalig drei für die Proteinsynthese essentielle TIF in einem Zeitraum bis zu 30 Tagen nach SD untersucht. Hierfür wurden SD bei Wistar-Ratten *in vivo* mittels Applikation von 1 M KCl induziert und die Tiere zu sieben unterschiedlichen Zeitpunkten nach SD dekapitiert und das Gehirngewebe präpariert. Zur Kontrolle dienten sham-Tiere, an denen die gleiche Operation ohne das Auslösen der SD durchgeführt wurde. Nach der Aufbereitung wurden in dem Gewebe mittels Antikörper und Western Blot nicht nur die Expression der TIF (eIF2 α , eIF4E und p70S6-Kinase), sondern auch ihre Lokalisation (im

Zusammenfassung

Zytosol bzw. in der Membranfraktion) und ihr Phosphorylierungsgrad untersucht.

Dabei wurde eine signifikante Steigerung der Expression der p70S6-Kinase vier und acht Stunden nach SD sowie der Phosphorylierung von eIF2 α acht Stunden nach SD gefunden. Daneben konnten tendenzielle Regulationen sowohl der Expression als auch der Phosphorylierung aller drei TIF über den gesamten untersuchten Zeitraum hinweg gezeigt werden.

Insgesamt weisen die in dieser Studie erhobenen Daten darauf hin, dass zumindest einige der bisher nach SD beobachteten Veränderungen der Proteinsynthese auf eine Regulation der hier untersuchten TIF zurückzuführen sind. Auch mit der bereits beschriebenen Regulation der Proteinsynthese nach Ischämie gibt es Übereinstimmungen. Dies deutet darauf hin, dass SD an der Beeinflussung der Proteinsynthese nach globaler und fokaler Ischämie beteiligt sind. Die hier beobachteten Effekte waren teilweise nicht so stark ausgeprägt wie nach Ischämie beschrieben. Dies ist u. a. darauf zurückzuführen, dass gerade im ischämischen Gewebe noch weitere pathophysiologische Vorgänge Einfluss auf die Proteinsynthese ausüben.

Weiterhin konnten in der vorliegenden Studie Hinweise auf Zusammenhänge der Regulation der Proteinsynthese nach SD mit anderen pathophysiologischen Vorgängen wie der Stressreaktion und der Induktion einer Ischämietoleranz nach SD gefunden werden. Eine teilweise gegensätzliche Regulation der Proteinsynthese durch die untersuchten TIF könnte durch die unterschiedliche Bedeutung der einzelnen TIF für die globale Proteinsynthese wie auch für die Synthese spezifischer Proteine, die z. B. an der Stressreaktion beteiligt sind oder für Kompensationsmechanismen benötigt werden, zu erklären sein.

Die vorliegende Studie trägt zur Erweiterung des Verständnisses der Pathophysiologie von SD bei. Kenntnisse über die Regulation der Proteinsynthese und die daran beteiligten Mechanismen können Ansätze für Therapien von klinischen Konditionen, bei denen SD auftreten, liefern.

1. Einleitung

1.1. Einführung

Spreading Depolarizations (SD) treten als Reaktion der grauen Substanz des Gehirns auf bestimmte Reize auf. Ihre Bedeutung für biophysiological Vorgänge und die Gehirnfunktion wird seit längerem untersucht. Erst in den letzten Jahren konnten SD im Menschen im Rahmen von Gehirnschädigungen nachgewiesen werden. Es gibt Hinweise, dass sie bei bestimmten neurologischen Konditionen wie z.B. der Ischämie nicht nur auftreten, sondern auch kausal an deren Entstehung und pathophysiologischen Konsequenzen beteiligt sind. Daher ist die Erforschung der SD für ein vollständiges Verständnis der entsprechenden neurophysiologischen Vorgänge unabdingbar.

Im Zusammenhang mit SD wurden unterschiedliche Regulierungen der globalen Proteinsynthese und der Expression bestimmter Proteine gezeigt. Allerdings lassen bisherigen Studien keine klare Schlussfolgerung für die Beeinflussung der Proteinsynthese durch SD zu. Daher sind für ein besseres Verständnis der Auswirkungen von SD weitere Untersuchungen notwendig. Diese Studie widmet sich der Analyse der Proteinsynthese anhand der Translationsinitiationsfaktoren (TIF) zu verschiedenen Zeitpunkten bis zu 30 Tage nach SD im ansonsten gesunden Gewebe.

1.2. Spreading Depolarizations

Der Begriff *Spreading Depolarizations* beschreibt Wellen von abrupten, steilen Depolarisationen im zentralen Nervensystem. Diese sind charakterisiert durch einen fast vollständigen Zusammenbruch der Ionenkonzentrationsgefälle und einer Depolarisation von Neuronen und Gliazellen einhergehend mit Neuronenschwellung und Blutflussveränderungen (Dreier 2011). Die Depolarisationen breiten sich wellenförmig in der grauen Substanz aus, messbar ist dabei eine schnelle und starke Änderung des langsamen elektrischen Potentials (Dreier 2011).

Man muss unterscheiden zwischen *Spreading Depolarizations* mit spontaner Erholung der normalen neuronalen Funktion und Depolarisationen mit verzögerter oder fehlender Erholung der Neuronen. Die Regeneration der Nervenzellen ist abhängig von der energieaufwändigen Funktion der Natrium-Kalium-Pumpe ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$), welche unter pathologischen Bedingungen erheblich gestört sein kann (LaManna und Rosenthal 1975, Dreier 2011). Wenn es nicht zu einer Repolarisation der Neuronen kommt, wird auch von einer „*Terminal Spreading Depolarization*“ gesprochen, die meist bei schweren Vorschädigungen auftritt und zum neuronalen Zelltod führt (Farkas et al. 2010). Je nach Dauer der Depolarisation unterscheiden vor allem neuere Arbeiten außerdem noch *Short-lasting* und *Intermediate Depolarizations* (Dreier 2011). Erstere beschreiben kurze *Spreading Depolarizations*, die nach schnellem Abklingen keine bleibenden Auswirkungen auf die Zellen bewirken; „*intermediate*“ steht für verlängerte Depolarisationen, deren Charakter zwischen den beiden vorgenannten liegt (Hossmann 1994, Dreier 2011). Diese Formen treten aufgrund verschiedener Ausgangsbedingungen auf und haben unterschiedliche klinische Auswirkungen.

1.2.1. Spreading Depolarization und Spreading Depression

Die mit *Spreading Depolarizations* einhergehenden elektrophysiologischen Veränderungen verhindern das Aufbauen von Aktionspotentialen in den Neuronen. Dadurch wird eine Unterdrückung der elektrischen Aktivität des Gehirns verursacht, die sich zusammen mit der Depolarisationswelle ausbreitet. Dieser Vorgang wurde als erstes von Leão beschrieben, *Spreading Depression* genannt und für pathophysiologische Vorgänge verantwortlich gemacht (Leão 1944). Heute wird allerdings davon ausgegangen, dass die Depolarisationen pathophysiologisch entscheidend sind und somit z. B. einen Ansatzpunkt für neue Therapieansätze bieten könnten. Die mit ihnen einhergehende *Spreading Depression* hingegen wird als pathophysiologisches Korrelat verschiedener klinischer Phänomene, bei denen *Spreading Depolarizations* beobachtet werden können, angesehen. Daher sind v. a. neuere klinische Studien auf die Messung und Beobachtung von *Spreading Depolarizations* und deren Folgen ausgerichtet. Auch in dieser Arbeit wurden Depolarisationen gemessen und deren Anzahl als Auswahlkriterium für Versuchstiere verwendet.

Leão nannte seine Beobachtungen *Spreading Depression* und erfasste damit sowohl die sich ausbreitende Unterdrückung der elektrischen Aktivität, die im Wortlaut enthalten ist, als auch die Depolarisationen, die stets damit einhergehen. Unter Berücksichtigung der Ursache und Wirkung, wie auch der oben beschriebenen pathophysiologischen Unterschiede ist es jedoch wichtig, beide Vorgänge zu unterscheiden. *Spreading Depolarizations* können sowohl mit einer *Spreading Depression* einhergehen (Leão 1944), als auch mit einer so genannten „*Nonspreading Depression*“ (Leão 1947, Hossmann 1994). Letztere tritt bei Vorschädigung des Gehirnes vor den Depolarisationen auf und verhindert damit eine mit der Depolarisation einhergehende *Spreading Depression* (Leão 1947, Dreier 2011). Die „*Spreading Depression*“ im wörtlichen Sinne ist also eine Folge der *Spreading Depolarization*, wenn diese im ansonsten gesunden Gehirn

1. Einleitung

auftritt (Leão 1947, Hossmann 1994, Dreier 2011). Allerdings wurden beide Phänomene lange gemeinsam unter dem Titel *Spreading Depression* untersucht und beschrieben. In den folgenden pathophysiologischen Ausführungen wird daher dieser Begriff aus historischen Gründen wie bei Leão verwandt. Auch die Abkürzung SD steht in dieser Arbeit für die Gesamtheit beider Phänomene.

Der Ausdruck *Spreading Depolarization* (SD) beschreibt demnach eine transiente Depolarisation des Membranpotentials, die sich mit einer Geschwindigkeit von 2–5 mm/min vom Ort der Auslösung wellenartig über die graue Substanz des Gehirns ausbreitet (Leão 1944). Dieser Welle der Depolarisation von Neuronen und Gliazellen folgt eine Unterdrückung der spontanen neuronalen Aktivität sowie komplexe Veränderungen des Gefäßdurchmessers, des Blutflusses, der Ionenhomöostase und des Stoffwechsels, die in Kapitel 1.2.3 näher beschrieben werden (Charles und Brennan 2009).

1.2.2. Entstehungs- und Ausbreitungstheorien

SD wurden zunächst und auch am ausführlichsten im Kortex untersucht, woraufhin auch die Bezeichnung *Cortical Spreading Depression* (CSD) geprägt wurde. Eine SD kann jedoch in der grauen Substanz fast aller Areale des zentralen Nervensystems ausgelöst werden (Charles und Brennan 2009, Somjen 2001, Bureš et al. 1974). Es gibt allerdings Regionen, in denen sie leichter auslösbar ist als in anderen. Die Suszeptibilität für SD steigt vor allem mit einer hohen Neuronendichte und es wird angenommen, dass die Empfänglichkeit des Neokortex für SD durch eine steigende Anzahl myelinisierter Fasern herabgesetzt wird (Röther 2000). Auch ist eine SD in oberflächlicheren Kortexschichten leichter auslösbar als in tiefer gelegenen (Leão 1944, Charles und Brennan 2009). Die Ausbreitung einer SD wird allerdings um so schwieriger, je höher sich der Organismus auf der phylogenetischen Leiter befindet. Bisherige Untersuchungen wurden vorwiegend an Nagetieren und Fischen durchgeführt. Dies hängt damit zusammen,

1. Einleitung

dass eine SD mit zunehmender kortikaler Gyrierung schwieriger auszulösen ist (Somjen 2001). Die Ursache hierfür ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings stellen größere Furchen anatomische Grenzen für die Ausbreitung einer SD dar, während sich diese bei lissenzephalen Tieren rasch über den gesamten ipsilateralen Kortex ausbreitet (Somjen 2001). SD ist aber auch bei weiter entwickelten Wirbeltieren wie Affen auslösbar, und mittlerweile auch beim Menschen nachgewiesen (Röther 2000, Dreier et al. 2006, Fabricius et al. 2006, Fabricius et al. 2008, Dohmen et al. 2008, Dreier et al. 2009, Dreier et al. 2012). Zuletzt spielen auch das Geschlecht und das Alter eine Rolle. Im adulten Gehirn lässt sich eine SD einfacher auslösen als im jungen Gehirn (Somjen 2001). Dies lässt sich mit der altersbedingten Schrumpfung des Interstitiums oder der Reifung von Transmittersystemen und der Zellkommunikation erklären (Somjen 2001).

Eine SD kann durch unterschiedliche kortikale Reize ausgelöst werden, darunter mechanische Stimuli (auch Verletzungen), elektrische Reizung und die Applikation chemischer Substanzen wie Kaliumchlorid, depolarisierender Aminosäuren (z. B. Glutamat oder Aspartat) oder metabolischer Inhibitoren wie Ouabain (Leão 1944, Leão und Morison 1945, Bureš et al. 1974).

Die Mechanismen und pathophysiologischen Vorgänge, die z. B. bei Migräne, Ischämie oder Schädel-Hirn-Trauma zum spontanen Auftreten von SD führen, sind bisher nicht vollständig geklärt. Lange koexistierten zwei Haupttheorien zur Auslösung und Ausbreitung, die jeweils für sich genommen jedoch nicht alle mit SD assoziierten Phänomene erklären (Bureš et al. 1974). Die eine, 1956 von Grafstein aufgestellt, schreibt einer Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration, ausgelöst durch starke neuronale Aktivität, die entscheidende Rolle zu (Grafstein 1956). Durch Diffusion der Kaliumionen zu benachbarten Zellen würden diese wiederum depolarisiert usw. Die andere Theorie von Van Harreveld postuliert, dass Glutamat als erregender Neurotransmitter über veränderte Natriumströme für die Ausbreitung der SD verantwortlich sei (Van Harreveld 1959, Van Harreveld und Fifková 1970, Lauritzen 1992). Mittlerweile gibt es

1. Einleitung

zu beiden Theorien experimentelle Studien, die sie in Frage stellen. Da eine nichtsynaptische Ausbreitung unabhängig von vaskulären Gebieten belegt zu sein scheint (Röther 2000), wurden transzelluläre Ausbreitungsmechanismen, evtl. über *Gap junctions* diskutiert (Nedergaard et al. 1995, Martins-Ferreira und Ribeiro 1995, Somjen 2004). Ein neueres Modell deutet auf eine Beteiligung von Kalziumwellen bei Initiation und Ausbreitung der SD hin (Martins-Ferreira et al. 2000). Letztendlich wurde bisher noch kein alleiniger Auslöser gefunden und eine singuläre Kausalkette, die zur SD führt, konnte experimentell nicht belegt werden. Vielmehr scheinen verschiedene komplexe Prozesse Anteil an der Entstehung und Ausbreitung der SD zu haben. Während manche dieser Ereignisse kausal für die Entstehung von SD sein mögen, sind andere eher als kompensatorische Reaktion darauf zu verstehen (Charles und Brennan 2009).

1.2.3. Elektrophysiologische Vorgänge und Auswirkungen

Während der SD kommt es als Ausdruck der Mindererregung der Neurone zu einer Depression der spontanen Aktivität im Elektroenzephalogramm (EEG), die erst nach einigen Minuten wieder vollständig hergestellt ist. Gleichzeitig tritt aufgrund der simultanen Depolarisation der Zellen des Hirnparenchyms eine Negativierung des Gleichspannungspotentials (DC) um 5–20 mV ein (Leão 1944, Grafstein 1956). Nach ein bis zwei Minuten erfolgt die Repolarisation, die oft in einer schwachen Hyperpolarisation gipfelt, um nach drei bis fünf Minuten wieder das Ausgangsniveau zu erreichen (Leão 1947). Teilweise kann der Negativierung vorangehend eine kleinere positive Welle beobachtet werden (Leão 1947, Bureš et al. 1974, Grafstein 1956).

Ein massiver Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration führt zur Depolarisationswelle von Neuronen und Gliazellen. Diese hat einen weiteren Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration zur Folge, was zu einer Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle der präsynaptischen

1. Einleitung

Terminale führt. Neben einem Kalziumioneneinstrom in die Zellen erfolgt eine Ausschüttung exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmitter. Zum einen aktiviert Glutamat rezeptorgekoppelte Kationenkanäle der postsynaptischen Membran von Nachbarzellen, was durch einen Natrium- und Kalziumioneneinstrom in einer Depolarisation dieser Zellen resultiert. Zum anderen öffnen inhibitorische Neurotransmitter Anionenkanäle, was einen Einstrom von Chloridionen bewirkt. (Bureš et al. 1974, Somjen 2001). Den resultierenden Ionenströmen folgt freies Wasser nach, was zu einer Zellschwellung und Schrumpfung des Extrazellulärspaces um bis zu 50 % führt (Hansen und Olsen 1980, Van Harreveld und Khattab 1967).

Unter normoxischen Bedingungen und ausreichender Glukosebereitstellung erfolgt eine Repolarisation und eine Rückkehr der Ionengradienten auf die Ausgangswerte innerhalb weniger Minuten (Lauritzen 1994). Bei diesen Vorgängen spielen sowohl Neuronen als auch Gliazellen eine Rolle. Letztere erfüllen eine Pufferfunktion gegenüber dem hohen Kaliumionengradienten, indem sie überschüssige Kaliumionen aus dem Extrazellulärraum aufnehmen. Das beteiligte Glutamat kommt anteilig aus den Gliazellen (Somjen 2001, Lian und Stringer 2004) und wird von der Astroglia wieder aufgenommen.

Die Depolarisationen und die wiederholt notwendige Wiederherstellung der transmembranen Ionengradienten sind sehr energieaufwändige Prozesse (Grafstein 1956). So verdoppelt sich nach repetitiven SD der Glukoseverbrauch und der Sauerstoffverbrauch steigt um 50 % (Mayevsky und Weiss 1991, Gjedde et al. 1981). Durch eine teilweise anaerobe Stoffwechsellage verdoppelt sich die Laktatkonzentration und der pH-Wert fällt vorübergehend auf 6,9 ab (Mutch und Hansen 1984). Die Konzentrationen der energiereichen Substrate Adenosintriphosphat (ATP), Phosphokreatin und Glykogen fallen ab (Křivánek 1958, Mies und Paschen 1984, Gault et al. 1994). Kompensatorisch gehen SD mit einer Erhöhung des regionalen zerebralen Blutflusses (*regional Cerebral Blood Flow*, rCBF) durch Weitstellung der Blutgefäße einher. Regional lässt sich hierbei eine Steigerung

1. Einleitung

des Blutflusses um bis zu 250 % messen (Mayevsky und Weiss 1991, Piper et al. 1991). Nach ein bis drei Minuten folgt eine Vasokonstriktion mit um 20–30 % vermindertem rCBF, die ca. eine Stunde anhält (Lauritzen et al. 1982, Lauritzen 1984, Piper et al. 1991). Im gesunden, nicht anderweitig beeinträchtigten Gewebe kann der gesteigerte Energiebedarf durch die Vasodilatation ausgeglichen werden und die SD klingt ohne Folgeschäden ab. Im vorgeschädigten Gehirn oder bei weiteren pathologischen Ereignissen wie einer Ischämie oder einer Blutung dauert die Erholung länger und teilweise kann die normale Funktion gar nicht wieder hergestellt werden. Die Bedeutung und Folgen dieser Vorgänge werden in den folgenden Kapiteln erläutert.

1.2.4. Klinische Bedeutung

Anfänglich wurden die SD als Artefakte abgetan (Davis 1984, Teive et al. 2005). Als ihre Reproduzierbarkeit dies widerlegte, wurde das Phänomen akribisch beschrieben (initial durch Leão und Bureš (Bureš et al. 1974)). Ursprünglich in Versuchen zur Epilepsie entdeckt, zeigte sich der erste mögliche Zusammenhang mit Erkrankungen des Menschen mit der Beschreibung des Flimmerskotoms bei Migräne (Lashley 1941, Milner 1958, Teive et al. 2005). Lange bestand Uneinigkeit darüber, ob SD bei Menschen überhaupt auftreten. Die Messung des Elektrokortikogramms (*Electrocorticography*, ECoG) zu ihrem Nachweis war aufgrund der hohen Invasivität der Untersuchung bis vor kurzem nicht bei Patienten durchgeführt worden. Dennoch gab es immer mehr Hinweise, dass SD eine bedeutende Rolle bei bestimmten Krankheitsbildern spielen (Gorji 2001). Die ersten Studien, in denen SD beim Menschen zweifelsfrei nachgewiesen werden konnten, sind von der COSBID-Gruppe (*Co-Operative Studies on Brain Injury Depolarizations*) durchgeführt worden. Sie lieferten eindeutige Belege für das Auftreten von SD beim Menschen bei Migräne mit Aura, ischämischen Hirninfarkten, intrazerebraler Blutung, Subarachnoidalblutung und dem Schädel-Hirn-Trauma (Dreier 2011).

Migräne mit Aura

Die ersten Hinweise für das Auftreten von SD beim Menschen wurden bei der Untersuchung des Flimmerskotoms als Aura bei Migräne gefunden (Lashley 1941, Leão und Morison 1945, Milner 1958, Basser 1969, Gardner-Medwin 1981, Teive et al. 2005). Sowohl die Migräneaura als auch SD gehen mit einer neuronalen Dysfunktion mit zunächst gesteigerter und anschließend verminderter neuronaler Aktivität einher (Leão 1986). Bei beiden laufen pathophysiologische Vorgänge in der oberen Kortexschicht ab, beide sind auf eine Hemisphäre begrenzt und Sulci oder Narben bilden anatomische Grenzen. Die Migräneaura startet im primären visuellen Kortex, einer Region mit hoher Neuronendichte, die sie auch für SD prädisponiert (Bureš et al. 1974, Lauritzen 1994). Weitere Gemeinsamkeiten sind die erhaltene Autoregulation, eine eingeschränkte CO₂-Reaktivität, ein gewisser Grad an Hypoperfusion ohne Erreichen einer Ischämie und ein normaler Metabolismus (Lauritzen 1994, Tfelt-Hansen 2010).

Jahrelang wurde die Ursache für die Aura in Gefäßspasmen und einer kortikalen Minderperfusion gesehen. Durch die Möglichkeit der exakten Messung des rCBF konnte diese vaskuläre Theorie weitgehend widerlegt werden. Stattdessen wurde gezeigt, dass der Migräneaura mit SD eine neurogene Ursache zugrunde liegt (Lauritzen 1992, Lauritzen 1994, Tfelt-Hansen 2010). Bildgebenden Verfahren (wie die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (*Single-Photon Emission Computed Tomography*, SPECT)) unterstützen diese Theorie (Tfelt-Hansen 2010). Funktionelle Magnetresonanztomographie-Untersuchungen in Abhängigkeit vom Blutsauerstoffgehalt (*Blood Oxygenation Level Dependent*, MRT-BOLD) bestätigten die Ergebnisse: Parallel zur Aura von Migränepatienten wurden wandernde Signalveränderungen gemessen, die eine Welle verminderter neuronaler Aktivität im Anschluss an neuronale Erregung widerspiegelten (Cao et al. 1999, Hadjikhani et al. 2001). Auch magnetenzephalographische Methoden wurden zur Detektion von CSD während einer Migräneaura eingesetzt (Tfelt-Hansen 2010) und damit langsame

1. Einleitung

DC-Potentialänderungen nachgewiesen, die sich einhergehend mit einer gesteigerten neuronalen Aktivität wellenförmig über den Kortex ausbreiteten (Bowyer et al. 2001). *Knock-out*-Mäuse, in deren Genom eine Mutation für familiäre hemiplegische Migräne eingefügt wurde, zeigten eine erhöhte Empfänglichkeit für SD (Van den Maagdenberg et al. 2004, Cutrer 2009).

Heute wird aufgrund der genannten Erkenntnisse davon ausgegangen, dass die Migräne-Aura von SD verursacht wird (vergleiche Abbildung 1.1) (Gorji 2001, Lauritzen 2001, Teive et al. 2005). Allerdings muss hier die Migräne ohne Aura abgegrenzt werden, die sich von der mit Aura auch auf pathophysiologischer Ebene unterscheidet.

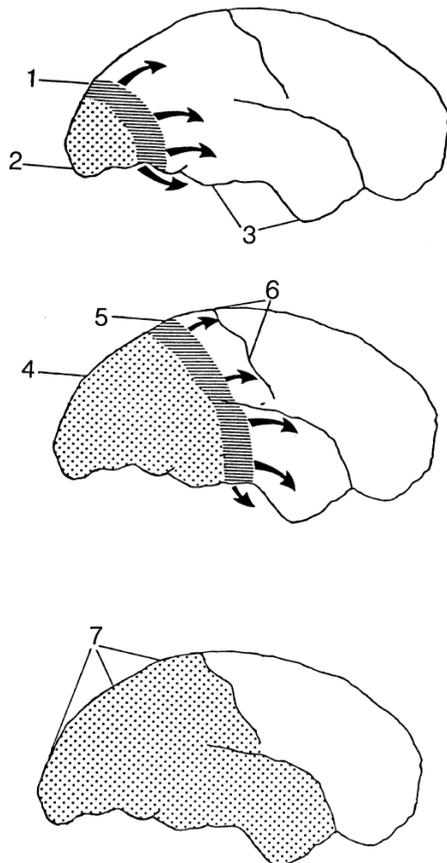


Abbildung 1.1.:

Hypothese zur Entwicklung einer Migräneattacke mit Aura basierend auf SD aus Lauritzen 2001. Seitenansicht eines menschlichen Gehirns in ca. 30-minütigen Intervallen. Gepunktet: Region des reduzierten rCBF, gestreift: Bereich der neuronalen Depolarisation während SD, Pfeile: Richtung der Ausbreitung der SD. 1: Zu Beginn der Attacke wird eine SD am okzipitalen Pol ausgelöst und breitet sich nach anterior aus. An der Front verursacht ein transientes ionisches und metabolisches Ungleichgewicht eine gestörte neuronale Funktion, Veränderungen des rCBF und neurologische Symptome. 2: Der SD folgend fällt der kortikale rCBF für 2–6 h um 20–30 %. 3: Der rCBF in anderen Regionen bleibt normal bis diese von SD betroffen werden (4). 5: Somatosensorische Symptome von den Extremitäten treten auf, wenn die SD den primär sensorischen Kortex im postzentralen Gyrus erreicht. 6: SD sistieren für gewöhnlich spätestens, sobald sie den *Sulcus centralis* erreichen. Die ventrale Ausbreitung verursacht eine Aktivierung schmerzempfindlicher Fasern und Kopfschmerzen. 7: Vollbild einer Attacke. Die SD ist vorüber und es persistiert eine Reduktion des kortikalen rCBF. Zu diesem Zeitpunkt leidet der Patient unter Kopfschmerzen, weist aber keine fokalen Ausfälle auf. (Lauritzen 1987, Lauritzen 2001).

Epilepsie

Eine weitere Gruppe von Erkrankungen mit vorübergehenden, oft fokalen neurologischen Defiziten sind Epilepsien. Bereits Leão vermutete einen Zusammenhang zwischen SD und Epilepsie (Leão 1944). In Tierstudien wurde das parallele Auftreten von CSD und epileptischer Aktivität ebenso beobachtet (Van Harreveld und Stamm 1953) wie in menschlichem Kortexgewebe *in vitro* nach Auslösen von CSD (Gorji und Speckmann 2004). Van Harreveld und Stamm nannten *Spreading Depolarizations*, auf die ictale epileptische Feldpotentiale folgten, *Spreading Convulsions* (Van Harreveld und Stamm 1953). Zu den indirekten Hinweisen auf einen Zusammenhang von SD und Epilepsien zählen folgende Gemeinsamkeiten: fokale Defizite, die allmähliche Ausbreitung über den Kortex und klinische sowie meist auch pathophysiologische Unauffälligkeit zwischen zwei Ereignissen. Des Weiteren weisen auch die Veränderungen des rCBF Gemeinsamkeiten auf (Gorji 2001, Somjen 2001, Kunkler et al. 2004, Berger et al. 2008, Parisi et al. 2008, Verrotti et al. 2011).

Zur Auslösung und nachfolgender Ausbreitung muss sowohl bei Epilepsie, als auch bei SD eine bestimmte Schwelle überschritten werden. Diese ist allerdings für SD niedriger als für epileptische Anfälle (Verrotti et al. 2011). Außerdem nehmen unterschiedliche Autoren an, dass eine Epilepsie das Auftreten von SD erleichtert und umgekehrt, was an der gemeinsamen Endstrecke der Depolarisation und „Hypersynchronisation“ liegen könnte (Parisi et al. 2008, Parisi 2009, Berger et al. 2008). Wiederkehrende epileptische Anfälle könnten Patienten für SD empfänglicher machen und dadurch migräneartige periiktale Kopfschmerzen begünstigen (Verrotti et al. 2011).

Verschiedene Mechanismen wie Glutamat-, Serotonin-, Dopaminstoffwechsel und Ionenkanalfunktionen spielen bei beiden Phänomenen eine Rolle (Verrotti et al. 2011). In einem Zellmodell zur nichtsynaptischen Erregungsübertragung untersuchten Florence et al. die Rolle der extrazellulären Kaliumkonzentration und der Na^+ - K^+ -Pumpe bei SD und *ictal*

1. Einleitung

bursting (anfallsartigen Entladungen). Sie fanden gemeinsame Ursachen für die jeweils gesteigerte neuronale Erregbarkeit (Florence et al. 2009).

Mit der ECoG-Messungen nach Kraniektomie bei Patienten mit akuten Gehirnverletzungen konnten Fabricius et al. eine Koinzidenz von epileptischen Anfällen und SD nachweisen (Fabricius et al. 2008). Dabei folgten beide Phänomene in unterschiedlichen Mustern aufeinander. Auch bei diesen Untersuchungen wies das isolierte Auftreten von SD bei einigen Patienten darauf hin, dass die Schwelle hierfür geringer ist als für epileptische Anfälle. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass *Spreading Convulsions* auch bei Patienten mit aneurysmatischen Subarachnoidalblutungen (SAB) auftreten (Dreier et al. 2009). Trotz all dieser Erkenntnisse bleibt der Zusammenhang zwischen epileptischer Aktivität und SD kontrovers und bedarf zukünftig weiterer Untersuchungen.

Ischämie, Schädel-Hirn-Trauma und Blutung

Die nach experimentell induziertem fokalen ischämischen Hirninfarkt zu beobachtenden Depolarisationen wurden zunächst „*Spreading Depression*-ähnliche Periinfarktdepolarisationen“ genannt (Nedergaard und Astrup 1986, Mies 1993, Nedergaard und Hansen 1993, Back et al. 1994, Dietrich et al. 1994, Hossmann 1996). Diese Depolarisationen breiten sich ebenfalls aus und zwar vom Rand des infarzierten Gewebes über die Penumbra bis hin in benachbarte, normoxische und ungeschädigte Regionen. Das vorgeschädigte Gewebe mit verminderter Versorgung und zusätzlichem Stress kann den durch die Depolarisationen gesteigerten Energiebedarf nicht decken. So führen diese zu einer irreversiblen Schädigung des Hirngewebes, das zunächst als Penumbra noch Regenerationspotential besaß (Mies et al. 1993, Nedergaard und Hansen 1993, Takano et al. 1996). Hierbei gibt es eine lineare Korrelation zwischen der Anzahl der Depolarisationen sowohl mit dem endgültigen Infarktvolumen (Mies et al. 1993, Takano et al. 1996, Hartings et al. 2003) als auch mit der Wachstumsdynamik des Infarktes (Hartings et al. 2003).

1. Einleitung

In neueren Arbeiten werden diese Depolarisationen als *Intermediate Depolarizations* zwischen die kurzen, das gesunde Hirngewebe nicht beeinträchtigenden, und die sogenannten *Terminal Depolarizations* gestellt (Lauritzen et al. 2011) (s. Kapitel 1.2). Bei dieser Einteilung sind fließende Übergänge möglich. Normalerweise treten die Depolarisationen in Clustern auf und oft persistiert die Unterdrückung der elektrischen Hirnaktivität zwischen den Ereignissen (Hossmann 1994, Dreier et al. 2006, Fabricius et al. 2006). Dadurch könnte die schädliche Wirkung der Depolarisationen verstärkt werden, was auch in Maus-Modellen mit Okklusion der Arteria cerebri media (*Middle Cerebral Artery Occlusion*, MCAO) gezeigt werden konnte (Takano et al. 1996, Hartings et al. 2006).

Die genauen Pathomechanismen, aufgrund derer es beim Schlaganfall zu *Spreading Depolarizations* kommt, sind noch nicht geklärt. Eine Theorie spricht für eine anoxische Freisetzung von Kaliumionen und Glutamat aus dem Infarktkern als Auslöser (Nedergaard und Hansen 1993, Back et al. 1994, Dietrich et al. 1994).

In Studien der COSBID-Gruppe wurden Elektroden zur Messung des ECoG in Patienten mit einem malignen ischämischen Schlaganfall implantiert (Dohmen et al. 2008). Diese stark raumfordernde Form des Schlaganfalls wird seit einiger Zeit mit dekompressiven Operationstechniken (Hemikranektomie) behandelt, die dem schwellenden Gehirn Platz verschaffen und ein Implantieren der subduralen Elektroden ermöglichen. Im Tiermodell wurden Depolarisationen zunächst innerhalb fünf bis sechs Stunden nach Ischämie und nach einer Pause von mehreren Stunden bis zu einem Tag in einer zweiten Phase beobachtet (Hartings et al. 2003). In den Studien der COSBID-Gruppe am Menschen konnten SD über sieben Tage nach dem Schlaganfall nachgewiesen werden (Dohmen et al. 2008).

Daneben spielen SD auch bei nicht primär ischämischen Gehirnschädigungen eine Rolle. Tatsächlich konnten die ersten elektrophysiologischen Korrelate *in vivo* bei einem Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma nachgewiesen werden (Mayevsky et al. 1996). Strong et al. konnten mit subduralen Elektroden *Spreading Depression* in 50 % der untersuchten Patienten

1. Einleitung

mit Schädel-Hirn-Trauma nachweisen (Strong et al. 2002). Ebenso gelang der Nachweis bei Patienten mit aneurysmaler Subarachnoidalblutung oder intrazerebralen Blutungen (Dreier et al. 2006, Fabricius et al. 2006, Dreier et al. 2009, Dreier 2011, Hartings et al. 2011a, Hartings et al. 2011b, Dreier et al. 2012). Es konnte gezeigt werden dass, SD mit einem verzögert auftretenden neurologischen Defizit und einer Verschlechterung des klinischen Outcomes der Patienten assoziiert sind (Dreier et al. 2006, Dohmen et al. 2008). Außerdem stehen SD bei diesen Erkrankungen in Verdacht, neben der Verursachung sekundärer Hirnschäden auch zu einer erhöhten Langzeit-Morbidität beizutragen (Lauritzen et al. 2011).

SD können – im Gegensatz zu ihren gehirnschädigenden Effekten – auch zu einer Toleranzentwicklung gegenüber einer nachfolgenden Ischämie führen. Zwischen der Präkonditionierung des normoxischen Gehirns mit SD und der Ischämieinduktion muss mindestens ein Tag liegen (Urbach 2006). Ein Anhalten dieses Effektes konnte bis zu sieben Tage nach SD gezeigt werden (Taga et al. 1997). Durch die Präkonditionierung mittels SD konnte sowohl bei globaler (Kawahara et al. 1995) als auch bei fokaler (Kobayashi et al. 1995, Matsushima et al. 1996, Taga et al. 1997, Yanamoto et al. 1998, Otori et al. 2003) Ischämie eine deutliche Reduktion des Infarktolumens beobachtet werden. Die molekularen Mechanismen, die zur Ischämietoleranz nach SD führen, sind noch nicht geklärt. Als mögliche Faktoren kommen Transkriptionsfaktoren und *immediate early* Gene, Hitzeschockproteine, antioxidative Proteine oder neurotrophe Faktoren in Frage (Plumier et al. 1997, Weih et al. 2001). So kann z.B. der durch SD induzierte protektive Effekt gegenüber einer Ischämie durch *knock out* eines Allels des Wachstumsfaktors BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) verhindert werden (Yanamoto et al. 2004). Wahrscheinlich beruht der Mechanismus der Toleranzinduktion jedoch auf einem Zusammenspiel mehrerer Faktoren (Urbach 2006).

1.2.5. Einfluss auf die Proteinexpression

Der Einfluss von SD auf die Proteinsynthese wird seit Jahren kontrovers diskutiert. Erste Ansatzpunkte lieferten Untersuchungen der Proteinsynthese nach experimentell induzierter Ischämie (Cooper et al. 1977, DeGracia et al. 1996, Christensen et al. 1999, Althausen et al. 2001, Mengesdorf et al. 2002). In den meisten Studien wurde hierzu ausschließlich oder zumindest teilweise auch ischämisches Gewebe untersucht. Dabei wurde in den ersten Stunden der Reperfusion nach Ischämie ein verminderter Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in Proteinen beobachtet. Daraus wurde auf eine ipsilaterale Hemmung der Proteinsynthese sowohl nach globaler (Cooper et al. 1977, DeGracia et al. 1996) als auch nach fokaler (Christensen et al. 1999, Althausen et al. 2001, Mengesdorf et al. 2002) Ischämie geschlossen.

Eine weitere Methode zur Analyse der Proteinsynthese stellt die Untersuchung der Expression und des Phosphorylierungsstatus einzelner Translationsinitiationsfaktoren dar. Diese Methode wendeten Althausen und Mengesdorf et al. an und schlossen aus ihren Ergebnissen ebenfalls auf eine Herunterregulation der Proteinsynthese (DeGracia et al. 1996, Althausen et al. 2001, Mengesdorf et al. 2002). Auch in dieser Studie wurde ischämisches Gewebe untersucht.

Studien der Expression von GABA_A-Rezeptor-mRNA und der entsprechenden Proteine im post-ischämischen periläsionellen Gewebe weisen auf eine zumindest partielle Inhibition der Proteinsynthese hin (Neumann-Haefelin et al. 1998, Neumann-Haefelin et al. 1999). Hierbei wurde gezeigt, dass sieben Tagen nach einem fokalen kortikalen Infarkt die Konzentration der mRNA der α 1- und α 2-Untereinheiten des Rezeptors anstieg, während die Synthese der korrespondierenden Proteine nicht gesteigert oder sogar herabreguliert war. Diese Veränderungen traten außerhalb des ischämischen Gebietes auf, was zu der Vermutung führte, dass SD die Ursache für einen Proteinsyntheseblock sein könnten. Dabei wurde allerdings von der Transkription und Expression von nur einem Rezeptoren auf eine generelle

1. Einleitung

Hemmung der Proteinsynthese geschlossen.

Bislang untersuchten nur wenige Studien den Proteinmetabolismus nach kortikaler SD im gesunden Gehirn. Křivánek und Mies beobachteten in einem Zeitraum von ein bis drei Stunden nach SD eine verminderte Inkorporation von ^{14}C -Leucin, was auf eine Hemmung der Proteinsynthese hindeutet (Křivánek 1970, Mies 1993). Dem stehen mehrere Studien gegenüber, die eine gesteigerte Proteinsynthese nach SD zeigen. Drei Tage nach SD wurde ein leichter Anstieg der ipsilateralen kortikalen Proteinsynthese anhand eines vermehrten Einbaus von ^3H -Leucin beobachtet (Kawahara et al. 1999). Diese globale Steigerung der Proteinsynthese geht einher mit einer Steigerung des *Glial fibrillary acidic proteins* (GFAP) und des *Basic fibroblast growth factors* (FGF-2) (Kawahara et al. 1999). Auch in weiteren Studien wurde eine Hochregulierung der Synthese spezifischer Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach SD beobachtet. Eine vermehrte Expression von GFAP wurde zwei Tage nach SD gezeigt. Diese hielt sieben Tage, teilweise auch länger als 14 Tage, an (Kraig et al. 1991, Herrera et al. 1998). In einem ähnlichen Zeitraum nach SD (zwei bis vier Tage) konnte eine Steigerung der Expression für das Hitzeschockprotein Hsp27 gezeigt werden (Plumier et al. 1997, Urbach 2006). Unmittelbar nach SD (ein bis vier Stunden) ist die Synthese weiterer spezifischer Proteine hochreguliert. So konnte immunhistochemisch eine Steigerung der Proteinexpression z.B. von c-Fos und der Cyclooxygenase COX-2 gezeigt werden (Miettinen et al. 1997, Herrera et al. 1998, Urbach 2006). Diese Beobachtungen wurden von mRNA-Expressions-Untersuchungen unterstützt, welche eine Koregulation der entsprechenden mRNA zeigten (Miettinen et al. 1997, Herrera et al. 1998, Urbach et al. 2006, Urbach 2006).

Somit stehen der Hypothese einer generellen Hemmung der Proteinsynthese nach SD mehrere Studien gegenüber, die eine Hochregulation spezifischer Proteine nachweisen konnten. Auffällig ist hierbei, dass viele dieser Proteine an Stressreaktionen beteiligt sind.

1.3. Translationsinitiationsfaktoren

1.3.1. Translation

Die Translation ist der Schritt der Proteinsynthese, bei dem die mRNA an Ribosomen außerhalb des Kerns abgelesen und das entsprechende Protein zusammengesetzt wird. Sie lässt sich in Initiation, Elongation und Termination unterteilen (Cooper und Hausman 2000). Bei der Initiation bindet ein Ribosom am Start-Codon an der mRNA. Während der Elongation (in 5'-3'-Richtung) werden Aminosäuren zu einem Polypeptid zusammengefügt und wenn ein Stop-Codon erreicht wird, wird in der Termination das fertige Protein abgetrennt und das Ribosom zerfällt wieder in seine Untereinheiten. Die Produktion von Proteinen muss sich den Bedürfnissen der Zelle und äußeren Einflussfaktoren wie z.B. Wachstum, Stress oder Substratmangel anpassen können. Die hierzu notwendige Regulation der Proteinsynthese findet auf mehreren Ebenen statt, wobei die Regulation der Translation eine herausragende Rolle spielt.

1.3.2. Initiation

Die Initiation der Translation lässt sich in drei Schritte unterteilen. Zuerst erfolgt die Bindung der Initiator-tRNA (Met-tRNA_i) an die kleine (40 S) ribosomale Untereinheit. Anschließend bindet der entstandene Komplex an die mRNA einhergehend mit der Lokalisierung des Initiations-Codons. Zuletzt erfolgt der Zusammenschluss mit der großen (60 S) ribosomalen Untereinheit, was zum translationsfähigen Komplex führt (Sonenberg und Dever 2003). Jeder dieser Schritte hängt von löslichen Proteinen ab, die Translationsinitiationsfaktoren (TIF) genannt werden (Hershey und Merrick 2000, Sonenberg und Dever 2003). Die für die vorliegende Arbeit zur Analyse ausgewählten TIF spielen jeweils eine Schlüsselrolle in den beschriebenen Teilschritten und haben damit eine zentrale Bedeutung bei der Kontrolle der Initiation der Translation.

1.3.3. Regulation der Translation

Eine Zelle exprimiert nie alle Genprodukte, die theoretisch möglich wären. Die meisten Gene sind z. B. durch Methylierung dauerhaft stillgelegt, da die kodierten Proteine nicht benötigt werden. Aber auch die mRNA-Abschnitte, die erstellt und ins Zytoplasma transportiert werden, werden nicht immer in gleichem Maße abgelesen. Die Regulation der Translation spielt bei der Proteinsynthese eine herausragende Rolle. Verglichen mit einer Regulation der Transkription ermöglicht die gezielte Kontrolle der Translation bereits existierender mRNA eine schnellere Einflussnahme auf die zelluläre Konzentration der synthetisierten Proteine (Sonenberg und Hinnebusch 2009). Sie dient neben der schnellen Reaktion auf externe Stimuli (wie z. B. Stress) auch dauerhaften Änderungen der Zellphysiologie, ohne in die Vorgänge der Transkription im Kern eingreifen zu müssen (Sonenberg und Hinnebusch 2009). Grundsätzlich kann man eine globale und eine selektive Translationskontrolle unterscheiden. Die Steuerung erfolgt über verschiedene Mechanismen überwiegend auf der Ebene der Initiation, aber auch bei der Elongation und der Termination. Letztere dienen allerdings eher als Sicherheitsmaßnahme, während die Regulation der Translationsinitiation die am biologisch sinnvollste, da ressourcenschonendste, ist (Sonenberg und Hinnebusch 2007).

1.3.4. Auswahl der Translationsinitiationsfaktoren für diese Arbeit und deren Funktion

Die in dieser Arbeit untersuchten TIF spielen bei den drei Teilschritten der Translationsinitiation jeweils eine zentrale Rolle. So phosphoryliert die p70S6-Kinase die 40 S-ribosomale Untereinheit, der eukaryotische Initiationsfaktor eIF2 α bindet die Met-tRNA_i und führt zur Bildung des Präinitiationskomplexes, und eIF4E schließlich vermittelt die Bindung des eIF4F-Komplexes an die mRNA, womit der translationsfähige Komplex vervollständigt ist. Die Zusammenhänge auch mit anderen TIF sind in

1. Einleitung

der Abbildung 1.2 nach Cooper (Cooper und Hausman 2000) schematisch dargestellt.

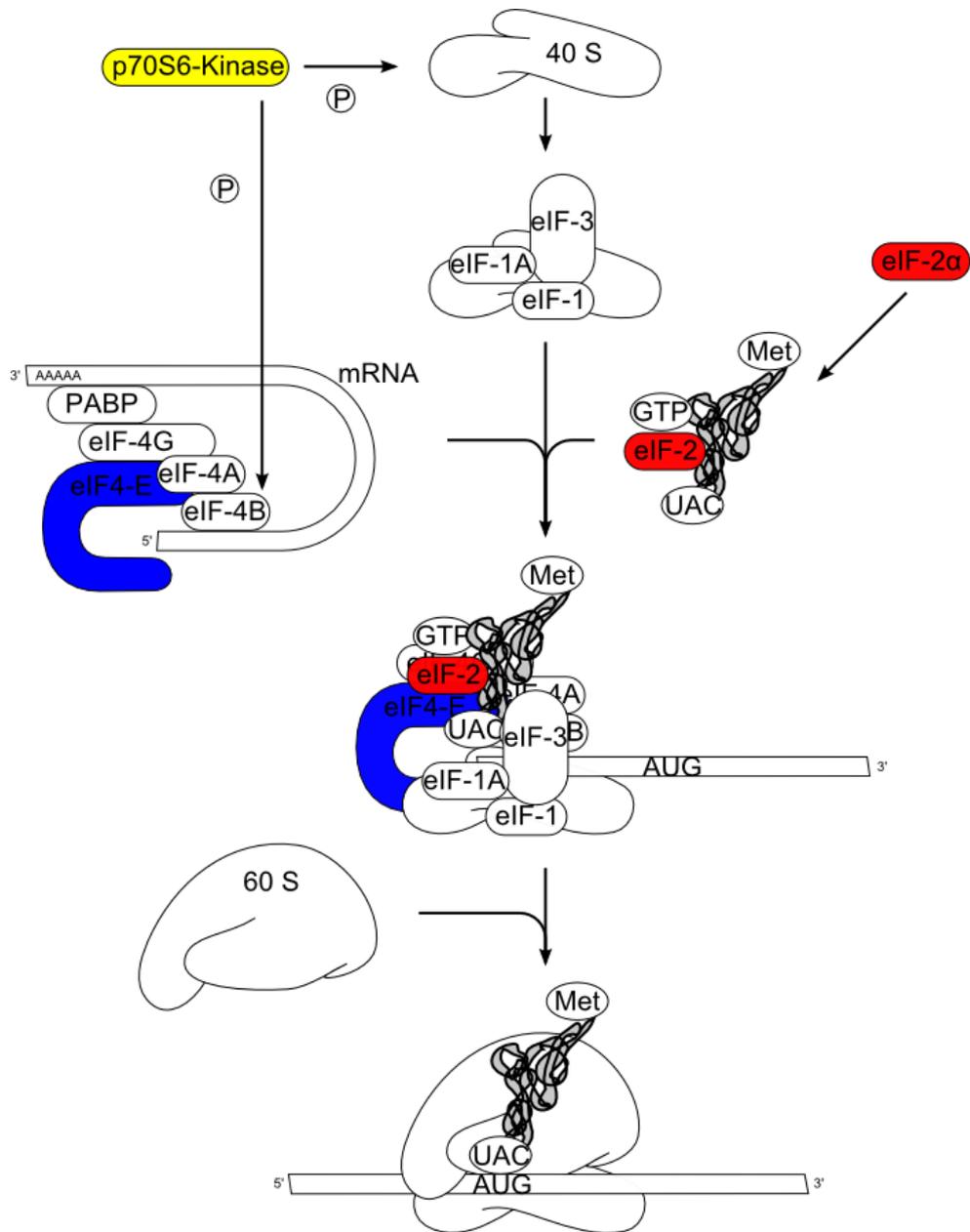


Abbildung 1.2.: Schema der Translationsinitiation nach Cooper (Cooper und Hausman 2000); in dieser Arbeit untersuchte TIF (farbig) und ihre Rolle in der Translationsinitiation.

1. Einleitung

Die untersuchten TIF liegen relativ zu den übrigen TIF nur in geringen Konzentrationen vor. Daher gelten sie als Translationsraten-limitierend und ihnen wird eine große Bedeutung für die Regulation der Translationsinitiation zugeschrieben.

Die Phosphorylierungsstellen, gegen die die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper gerichtet sind, sind jeweils maßgeblich für die Aktivität der entsprechenden TIF und damit auch für deren Auswirkungen auf die Proteinsynthese. Basierend auf diesen Eigenschaften sollte die Analyse der Konzentrationen und des Phosphorylierungsstatus der einzelnen TIF Rückschlüsse auf die momentane Regulation der globalen Proteinsynthese erlauben. Diese Methode der indirekten Bestimmung der Translationsrate wurde bereits in vorangehenden Studien erfolgreich angewandt. Beispielsweise wurde eine Regulation der Expression bzw. Phosphorylierung von TIF in ischämischem Gewebe beobachtet (Burda et al. 1994, Althausen et al. 2001, Mengesdorf et al. 2002). Eine gleichgerichtete Regulation eben dieser TIF nach SD würde folglich für die Hypothese sprechen, dass SD für die Beeinflussung der Proteinsynthese nach Ischämie verantwortlich sind.

Nicht zuletzt spricht für die Untersuchung dieser TIF, dass sie an zwei bereits gut erforschten Mechanismen beteiligt sind, die maßgeblich zur Regulation der Translationsinitiation beitragen (PI3K/akt über mTOR und Ras-MAPK (Sonenberg und Hinnebusch 2007, Sonenberg und Hinnebusch 2009)).

eIF2 α

EIF2 besteht aus drei Untereinheiten (α , β und γ) und bindet mit Hilfe von Guanosintriphosphat (GTP) die Initiator-tRNA (Met-tRNA_i). Der entstandene Komplex bindet an die kleine (40 S) ribosomale Untereinheit, was zur Bindung des Anticodons der Met-tRNA_i und des Startcodons der mRNA (AUG) führt. Mit diesem Präinitiationskomplex wird die Translation eingeleitet. Anschließend ist der Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor

1. Einleitung

eIF2B notwendig, um eIF2 freizusetzen und diesem als eIF2-GTP eine erneute Bindung zu ermöglichen.

An dieser Stelle fungiert die eIF2 α -Untereinheit als wichtige Zielstruktur der Translationsregulation. Unter anderem führen unterschiedliche Arten von zellulärem Stress zur Phosphorylierung von eIF2 α , was seine Bedeutung als Integrator von Stressantworten verdeutlicht. Die an Ser51 phosphorylierte Form von eIF2 α inhibiert den Austauschfaktor eIF2B (Sonenberg und Dever 2003, Sonenberg und Hinnebusch 2007, Sonenberg und Hinnebusch 2009). Dies verhindert die Freisetzung von eIF2 und hat folglich eine Hemmung der Translationsinitiation zur Folge (de Haro et al. 1996, Kimball 1999, Hershey und Merrick 2000, Proud 2005). Dies reduziert bei Stress den Energieverbrauch durch nicht-überlebensnotwendige Vorgänge. Gleichzeitig wird die Phosphorylierung von eIF2 α an Ser51 auch mit einer Hochregulation spezifischer Transkriptionsfaktoren in Verbindung gebracht. Bei zellulärem Stress fördern diese die Transkription von *stress-response*-Genen (z. B. ATF3 und ATF4) (Proud 2005, Sonenberg und Hinnebusch 2009, B'chir et al. 2013).

eIF4E

EIF4E bildet mit eIF4A und eIF4G einen stabilen Komplex, der eIF4F genannt wird. Dieser bindet über seine eIF4E-Untereinheit direkt an die mRNA 5'-Cap (modifizierter Guanosinrest am 5' Ende der mRNA). Die Untereinheit eIF4G interagiert mit eIF3 und dem *poly-A-binding protein* (PABP), die beide an die mRNA binden. Daraus resultiert eine Ringbindung der mRNA.

Die im Vergleich zu anderen TIF relativ niedrige Konzentration von eIF4E gilt als limitierender Faktor für die globale Proteinsynthese (Hiremath et al. 1985, Duncan et al. 1987, Mathews et al. 1996, Martín de la Vega et al. 2001). Daher wird angenommen, dass seine Regulierung eine wichtige Rolle in der Translationsregulation spielt (Richter und Sonenberg 2005).

1. Einleitung

Allerdings zeigten verschiedene Studien, dass eine Überexpression von eIF4E keine Steigerung der globalen Translation zur Folge hat, sondern lediglich die Translation bestimmter mRNAs fördert. Diese scheinen ein besonders hohes Level von eIF4E zu benötigen, während für die globale Translation eine basale Menge ausreicht (Duncan et al. 1987, Lejbkowitz et al. 1992, Sonenberg 1993, Rau et al. 1996, Gingras et al. 1999, Richter und Sonenberg 2005). Diese mRNAs, die z.B. für die Ornithindecaboxylase (ODC), Myc und Wachstumsfaktoren (FGF und VEGF) kodieren (Koromilas et al. 1992, Sonenberg 1993, Plumier et al. 1997, Gingras et al. 1999, Graff und Zimmer 2003), spielen eine wichtige Rollen in der Kontrolle von Zellwachstum und Proliferation (Richter und Sonenberg 2005).

Außerdem gibt es mRNAs mit sogenannten internen ribosomalen Eintrittsstellen (IRES), die unabhängig von eIF4E translatiert werden können. Hierzu zählen unter anderem mRNA für Wachstumsfaktoren, der TIF eIF4G und einige Hitzeschockproteine (Gingras et al. 1999, Hellen und Sarnow 2001).

Phosphoryliertes eIF4E bindet mit einer höheren Affinität an die Cap-Struktur, daher hat diese Modifikation eine Steigerung der Translationsinitiation zur Folge (Kaspar et al. 1990, Minich et al. 1994, Feigenblum und Schneider 1996, Kleijn et al. 1998, Scheper und Proud 2002, Sonenberg und Dever 2003). Somit geht die Dephosphorylierung von eIF4E nach Hitzeschock mit einem Abfall der globalen Proteinsynthese einher (Gingras et al. 1999).

Demgegenüber führen andere Formen von Stress (z.B. Anisomycin) zu einer vermehrten Phosphorylierung von eIF4E, während die Translationsrate deutlich fällt (Morley und McKendrick 1997, Wang et al. 1998). In diesen Fällen scheint der Abfall der Proteinsynthese durch andere Mechanismen der Translationsregulation verursacht zu sein, z.B. der Phosphorylierung von eIF2 α (Gingras et al. 1999).

Die Aktivität von eIF4E kann auch über andere Mechanismen, wie z. B. die 4E-bindenden Proteine (4E-BP), reguliert werden (Sonenberg und Gingras 1998, Gingras et al. 1999, Raught und Gingras 1999). Daher stellen

1. Einleitung

manche Autoren die Bedeutung der Regulation von eIF4E durch Phosphorylierung teilweise in Frage (McKendrick et al. 2001, Scheper et al. 2002, Zuberek et al. 2003, Sonenberg und Dever 2003).

p70S6-Kinase

Die p70S6-Kinase hat über verschiedene Wege einen stimulierenden Effekt auf die Translation. Sie ist eine Serin/Threonin-Kinase, die das S6 ribosomale Protein der 40 S ribosomalen Untereinheit phosphoryliert, was die Proteinsynthese am Ribosom induziert. Des Weiteren phosphoryliert die p70S6-Kinase eIF4B und steigert dessen Aktivität (Holz et al. 2005, Sonenberg und Hinnebusch 2009). Außerdem steigert die p70S6-Kinase indirekt die Aktivität von eIF4A durch Phosphorylierung dessen Inhibitors Pdc4 (Yang et al. 2003, Dorrello et al. 2006, Sonenberg und Hinnebusch 2009).

Die Aktivität der p70S6-Kinase wird durch verschiedene Phosphorylierungsereignisse in den katalytischen, Linker- und Pseudosubstratdomänen gesteuert. Die Phosphorylierung an Thr389 wird durch Wachstumsfaktoren (z.B. Insulin, den epidermalen Wachstumsfaktor EGF, und den Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF) stimuliert. Sie spielt die herausragende Rolle, da hier die stärkste Korrelation mit der Kinaseaktivität besteht (Pullen und Thomas 1997, Weng et al. 1998).

Vereinzelt wurde auch beobachtet, dass die p70S6-Kinase nur die Translation bestimmter mRNAs beeinflusst und nicht die allgemeine Proteinsynthese (Jefferies et al. 1997).

2. Zielsetzung

Spreading Depolarizations (SD) spielen bei einem breiten Spektrum unterschiedlicher Pathologien von der Migräne bis zum ischämischen Schlaganfall eine Rolle. Um die Erkrankungen besser verstehen und schließlich auch Therapiekonzepte entwickeln zu können, ist es notwendig, die Pathophysiologie der SD zu erforschen. Hierzu müssen diese unabhängig von anderen pathologischen Einflüssen betrachtet werden, damit ihre Auswirkungen untersucht und verstanden werden können.

Bisher gibt es ausführliche Untersuchungen zu Veränderungen der Proteinexpression nach globaler wie auch fokaler Ischämie. Als potentielle Regulationsmechanismen der in diesen Studien beobachteten Veränderungen wurden die Expression bzw. eine Änderung des Phosphorylierungsstatus von Translationsinitiationsfaktoren (TIF) identifiziert. Bei diesen Untersuchungen wurde allerdings stets die Proteinsynthese im ischämischen Gewebe mituntersucht. Im nicht-ischämischen Gewebe, in dem SD eine tragende Rolle der Pathophysiologie spielen dürften, wurde bislang nur eine partielle Inhibition der Expression spezifischer mRNA und der entsprechenden Proteine gezeigt.

SD wurden als möglicher Pathomechanismus für die Veränderungen der Proteinsynthese angesehen. Wie in Kapitel 1.2.5 beschrieben, zeigten Studien hierzu jedoch unterschiedliche, teils widersprüchliche Regulationen der Proteinsynthese nach SD. Allerdings fehlt bisher eine konsequente Analyse der zeitlichen Dynamik der Veränderungen, die nur in wenigen Studien berücksichtigt worden ist.

Falls SD kausal an der nach Ischämie beobachteten Inhibition der Proteinsynthese beteiligt sind, wäre nach SD eine vergleichbare Regulation

2. Zielsetzung

der Proteinsynthese zu erwarten. Folglich sollte eine entsprechende Regulation der TIF nachweisbar sein. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, ist dies ein Hauptmechanismus der Regulation der Proteinsynthese und wie oben ausgeführt, wurde eine Beeinflussung der TIF als Regulationsmechanismus nach Ischämie bereits gezeigt. Dabei ist zu beachten, dass das ischämische Gewebe noch anderen pathophysiologischen Einflüssen unterliegt als Gewebe, in dem lediglich SD induziert werden.

Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, die Pathophysiologie der SD besser zu verstehen. Es soll untersucht werden, ob und wie SD die Proteinsynthese regulieren und in wie weit sie an den Veränderungen nach Ischämie beteiligt sein könnten. Hierzu werden SD im Rattenkortex *in vivo* isoliert ausgelöst, um ihre Effekte frei von anderen pathologischen Einflüssen beobachten zu können. Durch die Analyse der Expression, Phosphorylierung sowie der Lokalisation essentieller TIF können Rückschlüsse auf die Proteinsynthese gezogen werden. Hierfür wurden aufgrund ihrer entscheidenden Rollen bei der Translationsinitiation eIF2 α , eIF4E und die p70S6-Kinase ausgewählt. Eine Beeinflussung dieser Faktoren war als Regulationsmechanismus der Proteinsynthese nach Ischämie bereits gezeigt worden. Eine konsequente Analyse zu sieben verschiedenen Zeitpunkten in einem Zeitraum bis zu 30 d nach SD soll eine Beschreibung der zeitlichen Dynamik der Regulation der Proteinsynthese ermöglichen. Dies soll Rückschlüsse auf die im Rahmen der SD ablaufenden pathophysiologischen Vorgänge erlauben und dazu beitragen, bisherige Daten besser einordnen zu können. Darüber hinaus sollen Hinweise gefunden werden, inwieweit SD zu den nach globaler und fokaler Ischämie auftretenden Veränderungen der Proteinsynthese beitragen könnten.

3. Methoden

Die Rezepte für die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen, Puffer und Gele sind im Anhang A aufgeführt.

3.1. Versuchstiere

Die Operationen wurden an männlichen, jungen adulten Wistar-Ratten aus der Zucht des Instituts für Versuchstierkunde Jena durchgeführt, die zum Zeitpunkt der Operation 9 ± 2 Wochen alt und 290 ± 20 g schwer waren. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und hatten jederzeit Zugang zu Futter und Wasser.

Die Tierexperimente wurden durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Dezernat Tierschutz, geprüft und entsprechend den Vorschriften des Tierschutzgesetzes durchgeführt (Tierversuchsantrag 02-11/07).

3.2. Operationen und Induktion der SD

Für die Operation wurden die Tiere mit 3,5%igen Isofluran (Actavis) in einem 1:2 Sauerstoff/Distickstoffmonoxid-Gemisch (30 l:60 l) anästhesiert und der Kopf in einem Stereotakt fixiert. Nach ungefähr drei Minuten wurde die Narkose auf 2,5% Isofluran reduziert. Nach Freilegung der Kalotte wurden über der linken Hemisphäre zwei Trepanationen mit einem Durchmesser von 1,8 mm angelegt, wobei die *Dura mater* intakt blieb. Die

3. Methoden

Trepanationen befanden sich bei *Bregma* +2,0 mm und -6,8 mm, jeweils 2,0 mm lateral der Mittellinie (s. Abb. 3.2).

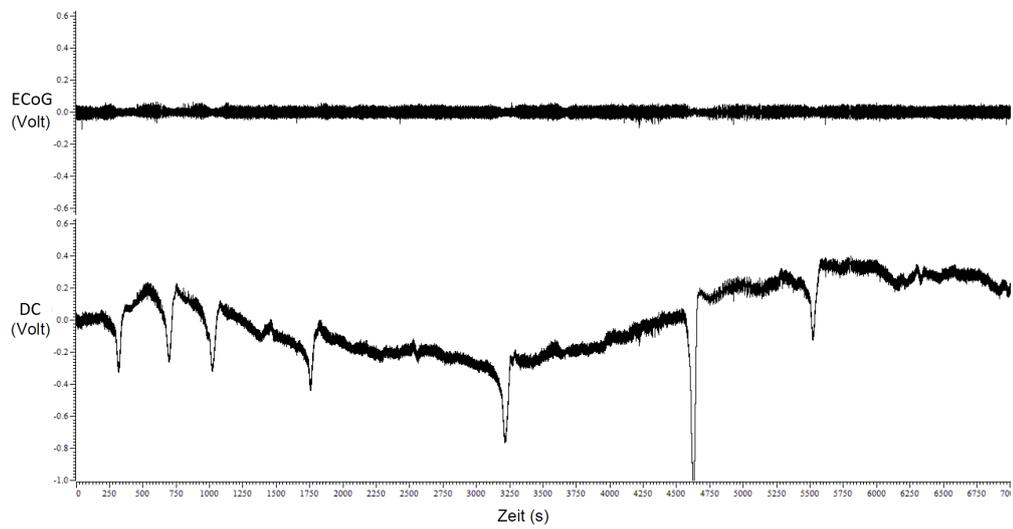
Zur Ableitung des Gleichstrom-Potentials (DC) und des Elektrokortikogramms (ECoG) wurde eine Borosilikatglaselektrode (2–4 M Ω), gefüllt mit künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (*artificial Cerebro Spinal Fluid*, aCSF), im anterioren Bohrloch vorsichtig auf die *Dura mater* aufgesetzt. In der Borosilikatglaselektrode war ein chlorierter Silberdraht eingebracht worden, der mit einem Gleichstrom- und Elektroenzephalogramm-Verstärker verschaltet wurde. Als Referenzpotential diente das über einen chlorierten Silberdraht abgegriffene subkutane Nackenpotential.

Nach den potentiell schmerzhaften Eingriffen wurde die Narkose sukzessive auf 1,5% Isofluran herabgesetzt. In der dafür benötigten Zeit konnten sich außerdem die Elektrodenpotentiale stabilisieren. Alle Signale wurden 100-fach verstärkt, analog-digital gewandelt und mittels der Software Spike2 aufgezeichnet. Zur Induktion der SD wurde 1 M KCl mittels eines Tupfers auf die *Dura mater* im posterioren Bohrloch appliziert. Nachdem innerhalb von 110–120 min 7 ± 2 SD registriert worden waren, wurde der Tupfer entfernt, mehrmals mit aCSF gespült und die Trepanation mit Knochenwachs verschlossen. Bei den Scheinoperationen (sham-Tiere) wurde für 110 min 1 M NaCl-Lösung appliziert. Abb. 3.1 zeigt Beispiele der DC-Potentiale und ECoG-Ableitung in SD- und sham-Tieren.

Während der Operation wurde die Körpertemperatur mittels eines elektronischen Rektalthermometers überwacht und über eine rückgekoppelte Heizmatte bei $37\pm 0,5$ °C gehalten. Zum Schluss wurde unter 2% Isofluran die Haut über der Kalotte wieder geschlossen und die Narkose unter 100%iger Sauerstoffzufuhr ausgeleitet.

3. Methoden

(A) SD



(B) sham

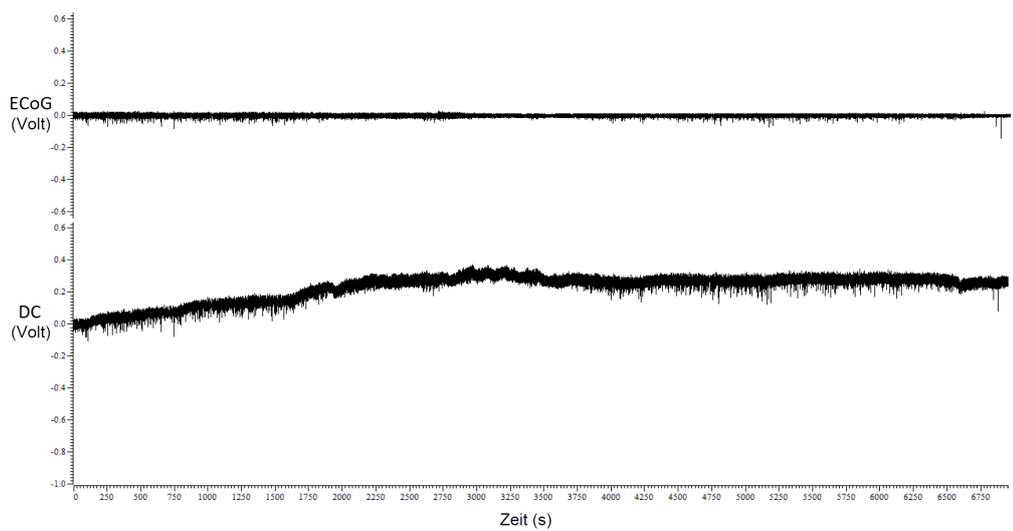


Abbildung 3.1.: DC-Potential und Elektrokortikogramm (ECoG) (A) während der Auslösung von SD, (B) während der sham-Operation

3.3. Gehirnpräparation

Die Tiere (n=99) wurden 3 h, 4 h, 8 h, 1 d, 3 d, 7 d und 30 d (n=7-10 in SD-Gruppen, n=6-7 in sham-Gruppen) nach erster Applikation von KCl bzw. NaCl unter Isoflurannarkose dekapitiert. Anschließend wurde vorsichtig das Gehirn freigelegt. Dann wurde unter ständiger Kühlung mit 4 °C kaltem aCSF der Kortex unter Aussparung der Läsion (ipsilateral) bzw. eines entsprechenden Areals (kontralateral) entsprechend der Skizze in Abb. 3.2 abpräpariert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

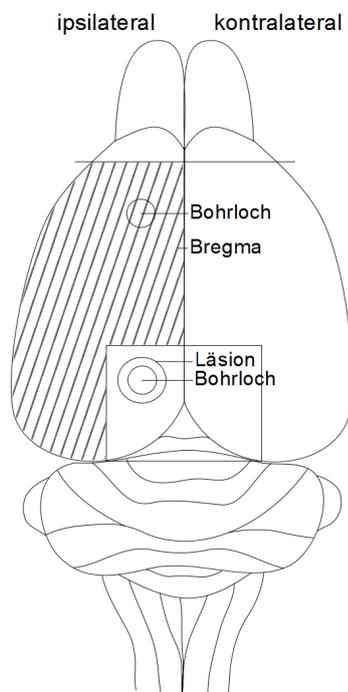


Abbildung 3.2.:

Kortexpräparation. Der schraffierte Bereich des ipsilateralen Kortex inklusive der lateralen Anteile wurde abpräpariert und für die vorliegende Studie verwendet

3.4. Lyse und Fraktionierung

Zur Proteinisolierung und Auftrennung in die zytosolische und Membranfraktion wurden die Gewebstücke zunächst gewogen und nach Zugabe einer entsprechenden Menge Lysepuffers I mit dem Ultra-Turrax T8 (IKA

3. Methoden

Labortechnik) homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 4 °C mit 1000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in weiteren 5 min bei 1200 x g der verbleibende Zelldebris abzentrifugiert.

Der Überstand wurde 45 min bei 4 °C mit 30.000 x g ultrazentrifugiert.

Danach konnte der die zytosolische Fraktion enthaltende Überstand abpipettiert werden. Das verbliebene Pellet wurde nach Zugabe des Lysepuffers II unter Vermeidung von Blasenbildung resuspendiert und nochmal 20 min bei 4 °C mit 15.000 x g ultrazentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand, der die Membranfraktion enthielt, abgenommen. Während der gesamten Fraktionierung wurden die Gewebe, alle Lösungen und Lysate auf 4 °C gekühlt und in den Pausen auf Eis gelagert.

3.5. Analyse

3.5.1. Bestimmung der Proteinkonzentrationen und Poolen der Proben

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde direkt nach der Trennung der Fraktionen durchgeführt und diente der späteren Einstellung des Verhältnisses der Einzelproben beim Poolen. Sie erfolgte in abgewandelter Form nach der von Bradford beschriebenen Methode (Bradford 1976). Hierzu wurde zunächst eine Eichreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich) angesetzt mit den Konzentrationen c (mg/ml) = 0,125; 0,250; 0,500; 0,750; 1,00 und 2,00. In Vorversuchen war festgestellt worden, dass die Einzelproben bei einer Verdünnung von 1:40 optimal im Messbereich liegen. Zur Eichreihe wie auch zu den 1:40 verdünnten Proben wurde Bradford Reagenz (Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Nach Durchmischung und 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde mittels des Infinite F200 Multiplattenreader (Tecan) die Lichtabsorption bei 620 nm gemessen. Es wurden jeweils drei Messreihen durchgeführt und die jeweiligen Konzentrationen anhand der Messwerte für die Eichreihe berechnet.

3. Methoden

Im Anschluss wurden die Proben entsprechend ihrer Proteinkonzentration innerhalb der jeweiligen Gruppen gepoolt, so dass von jedem Einzeltier gleich viel Gesamtprotein in die später zu analysierenden Proben einging.

3.5.2. Gelelektrophorese und Western Blot

In den weiteren Arbeitsschritten wurden jeweils Proben aller Zeitpunkte gleichzeitig in den selben Puffern und Lösungen mit den selben Geräten verarbeitet. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass systematische Fehler bei der Verarbeitung die Ergebnisse beeinflussen.

Die Proteinauftrennung erfolgte mittels SDS-Page (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis*). Die Proben wurden zunächst mit 2x Laemmli-Puffer 1:2 verdünnt, so dass die resultierende Gesamtprotein-konzentration 1 mg/ml bzw. 2 mg/ml betrug, um in der Gelelektrophorese jeweils die gleiche Menge Gesamtprotein auftragen zu können. Anschließend wurden sie im T3-Thermocycler (Biometra) auf 95 °C erhitzt und 5 min inkubiert. Dann wurden die Proben in die Taschen eines vorbereiteten Flachgels, bestehend aus Sammel- und Trenngel, aufgetragen (Rezept im Anhang A). Dabei wurden je nach zu analysierendem Translations-initiationsfaktor 10 bzw. 20 µg Gesamtprotein aufgetragen, entsprechend der Tabelle 3.1. Als Referenz für das Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine wurde in der ersten Tasche Precision Plus Protein Western C #161-0376 der Firma Bio-Rad mitgeführt. An das von Laufpuffer umgebene Gel wurde für 1 h 45 min eine konstante Spannung von 100 V angelegt. Anschließend wurde der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Membran (Hybound-C Extra Nitrocellulose 0,45 Micron; Katalog-Nr. RPN203E) mittels Western Blot durchgeführt. In Transferpuffer wurde 1 h bei 100 V nass geblottet. Nach Beendigung des Transfervorgangs wurde die Membran in 5 % BSA in TBS-T (Trisgepufferte Salzlösung mit Tween 20) 1 h geblockt.

3. Methoden

Zielprotein	Größe (kDa)	AK-Verd.	GP (μ g)	Housekeeper
eIF2 α	36	1:500	20	β -Tubulin-III
eIF2 α -phospho	36	1:500	20	β -Tubulin-III
eIF4E	25	1:1000	20	GAPDH
eIF4E-phospho	25	1:1000	20	GAPDH
p70S6-Kinase	70	1:1000	10	GAPDH
p70S6-Kinase-phospho	70	1:1000	10	GAPDH

Tabelle 3.1.: Eigenschaften und Verwendung der Antikörper zur Proteindetektion. Die angegebene Größe ist die Größe des Zielproteins, AK-Verd. = Verdünnung der Antikörper, GP = in der Gelelektrophorese eingesetztes Gesamtprotein.

3.5.3. Antikörper

Zur Analyse dienten Antikörper gegen die verschiedenen TIF und sekundäre Antikörper (*goat-anti-rabbit*), an welchen ein Konjugat der Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gebunden ist. Technische Details können der Tabelle B.1 im Anhang B entnommen werden.

Die primären Antikörper wurden in Verdünnungen entsprechend der Tabelle 3.1 in 2%igem BSA in TBS-T auf die Membran gegeben und diese über Nacht bei 4 °C unter ständiger Bewegung inkubiert und vor den weiteren Arbeitsschritten nochmal 1 h 45 min bei Raumtemperatur belassen.

Zur Entfernung überschüssiger und unspezifisch gebundener Antikörper wurden die Membranen dreimal 10 min in TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörper, die in einer Verdünnung 1:2000 eingesetzt wurden, erfolgte in 2%igem BSA in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur. Das HRP-Konjugat, das am mitgeführten Marker bindet (Precision Protein StrepTactin-HRP #161-0380 der Firma Bio-Rad), wurde in einer Verdünnung 1:50.000 eingesetzt. Zuletzt schlossen sich nochmal drei zehnminütige Waschschrte in TBS-T an.

3.5.4. Housekeeping Proteine

Um die gepoolten Proben der verschiedenen Zeitpunkte vergleichbar zu machen, wurde jede Membran zusätzlich zu dem gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper mit einem Antikörper gegen ein *Housekeeping* Protein inkubiert. *Housekeeping* Proteine sind Proteine, welche für elementare zelluläre Prozesse essentiell sind (z.B. Stoffwechsel-, Strukturproteine). Typischerweise werden sie im Organismus bzw. jeweiligen Gewebe unabhängig von exogenen Einflüssen konstitutiv exprimiert. In der vorliegenden Studie wurden aufgrund der unterschiedlichen Laufrhöhen der Zielproteine hierfür wie in der Tabelle 3.1 angeführt entweder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH: 37 kDa, 1:20.000) oder β -Tubulin-III (50 kDa, 1:100.000) eingesetzt. Unsere Voruntersuchungen zeigten, dass beide Proteine nach SD weitgehend stabil exprimiert werden. Bei der Verwendung von β -Tubulin-III wurde noch ein weiterer sekundärer Antikörper (*goat-anti-mouse*) eingesetzt.

3.5.5. Auswertung mittels Chemilumineszenz und GeneTools

Die Messung der TIF erfolgte über die Antikörper mittels Chemilumineszenz. Hierfür verwendeten wir den ImmnuoStar Western C Kit der Firma BioRad. Die Chemilumineszenzreaktion des Luminols, bei der Licht mit einer Wellenlänge λ von 428 nm emittiert wird, wird dabei durch die HRP katalysiert. Zur Erfassung der Chemilumineszenz auf den Membranen diente das LAS-3000 (Fujifilm) mit der Software Image Reader. Zum Auswerten und Dokumentieren diente die Software GeneTools von SynGene. Hiermit werden die Banden zunächst als ein Volumen angegeben. Dieses Volumen wird aus den Pixeln unter der Kurve der Funktion eines Histogramms errechnet, welches die Bande in Größe und Intensität repräsentiert.

3.6. Berechnungen

Mit den Volumen-Werten der Banden wurden die im Folgenden beschriebenen Berechnungen durchgeführt. Der Wert für das Zielprotein (TIF bzw. TIF-P) wurde auf das jeweilige *Housekeeping* Protein normiert und wird damit als TIF pro *Housekeeping* Protein angegeben. Anschließend wurde für jeden TIF das arithmetische Mittel der drei technischen Replikate berechnet. Hiervon wurde bei einer Stichprobengröße von $n = 3$ der Standardfehler bestimmt (*Standard Error of the Mean*, SEM). Dieser wird auch in den Tabellen B.2–B.12 im Anhang B aufgeführt. In den Ergebnissen (Kapitel 4) ist der SEM in den Diagrammen als positiver Fehlerbalken angegeben. Die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle berechnen sich wie folgt: Arithmetischer Mittelwert \pm SEM \times 1,96. Unterschiede zwischen zwei Gruppen werden dann als signifikant angesehen, wenn sich die 95%-Konfidenzintervalle nicht überschneiden. Als tendenziell unterschiedlich werden Messungen angesehen, bei denen sich die Werte der SD- und sham-Tiere jeweils zu- und abzüglich des SEM nicht überschneiden.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Translationsinitiationsfaktoren und deren Phosphorylierungsstatus auf Proteinebene analysiert, um daraus Rückschlüsse auf die Regulation der Translation nach SD ziehen zu können. In Vorversuchen wurden Antikörper gegen folgende TIF sowie ihre phosphorylierten Formen eingesetzt: eIF2 α , eIF2 β , eIF4A1, eIF4E, eIF4G und die p70S6-Kinase. Hierbei konnten im angewandten Versuchsaufbau nicht für alle Antikörper reproduzierbare Messergebnisse erzielt bzw. der Phosphorylierungszustand nachgewiesen werden. Daher wurden folgende Gesamt- und phosphospezifische Antikörper zur Auswertung herangezogen: anti-eIF2 α und anti-eIF2 α -P_{Ser51}, anti-eIF4E und anti-eIF4E-P_{Ser209} sowie anti-p70S6-Kinase und anti-p70S6-Kinase-P_{Thr389}.

Die Analyse erfolgte jeweils getrennt im Zytosol und in der Membranfraktion, zu folgenden Zeitpunkten nach SD bzw. sham-Operation: 3 h, 4 h, 8 h, 1 d, 3 d, 7 d und 30 d.

Die jeweiligen Messergebnisse der drei technischen Replikate der Western Blots sind in den Tabellen B.2–B.12 im Anhang B dargestellt. Es werden die (wie in den Kapiteln 3.5.5 und 3.6 beschrieben) mittels GeneTools berechneten und auf die entsprechenden Housekeeping-Proteine normierten Volumen-Werte der Banden mit ihren Standardfehlern angegeben. Sie sind ein Maß für die Größe und die in anderen Studien bei Western Blots angegebenen „optischen Dichte“ der Banden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die einzelnen TIF aufgeführt. Hierbei werden jeweils die Tiergruppen (Operation mit SD bzw. sham-Operation) miteinander verglichen.

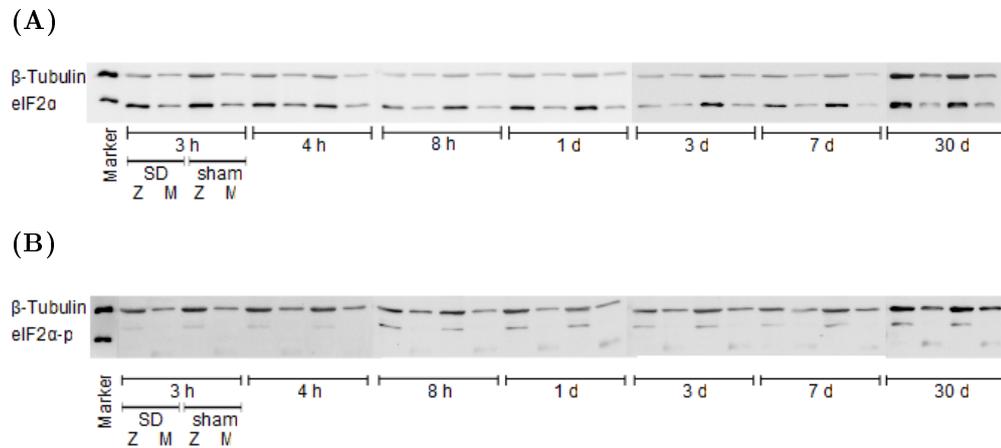
4.1. eIF2 α und eIF2 α -P_{Ser51}

Abbildung 4.1.: Western Blot mit den Antikörpern gegen eIF2 α (A) und eIF2 α -P_{Ser51} (B) (36 kDa) mit dem Housekeeper β -Tubulin-III (50 kDa, obere Bande). Die obere Markerbande liegt bei 50 kDa, die untere bei 37 kDa. Der Zeitpunkt entspricht dem Überleben nach SD bzw. sham-Operation, Z = Zytosol, M = Membranfraktion.

Die Expression von eIF2 α zeigte in beiden Gruppen (SD- und sham-Tiere) einen biphasischen Verlauf, sowohl in der zytosolischen als auch in der Membranfraktion: Unmittelbar nach der SD- oder sham-Operation (3 h und 4 h) sowie 3 d und 7 d danach war die Expression von eIF2 α im Vergleich zu den dazwischen liegenden Zeitpunkten (8 h, 1 d und 30 d) erhöht (Abb. 4.1 A und 4.2).

Ungeachtet dieser gruppenübergreifenden Schwankungen lag eIF2 α in Zytosol und Membranfraktion bei allen Tieren in vergleichbaren Mengen vor. Ausgeprägte Effekte von SD auf die Expression von eIF2 α wurden weder in der zytosolischen noch in der Membranfraktion beobachtet (Abb. 4.1 und 4.2). Lediglich 8 h und 3 d nach SD zeigte sich eine tendenzielle Heraufregulation von eIF2 α in der zytosolischen Fraktion (Abb. 4.2 A).

An Ser51 phosphoryliertes eIF2 α war im Vergleich zum Housekeeping-Protein in viel geringeren Mengen detektierbar als unphosphoryliertes eIF2 α . Insgesamt war der Phosphorylierungsstatus von eIF2 α im Zytosol bei SD- und sham-operierten Tieren zu den meisten Zeitpunkten ähnlich.

4. Ergebnisse

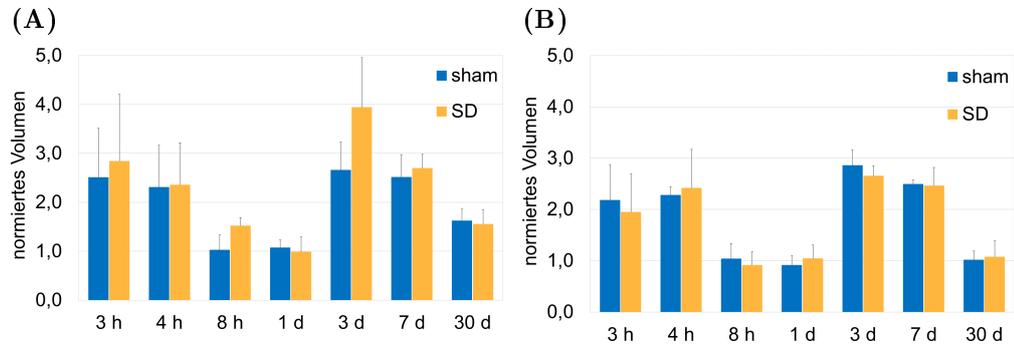


Abbildung 4.2.: Expression von eIF2 α normiert auf β -Tubulin-III (A) im Zytosol (B) in der Membranfraktion. Der Zeitpunkt entspricht dem Überleben nach SD (gelb) bzw. sham-Operation (blau).

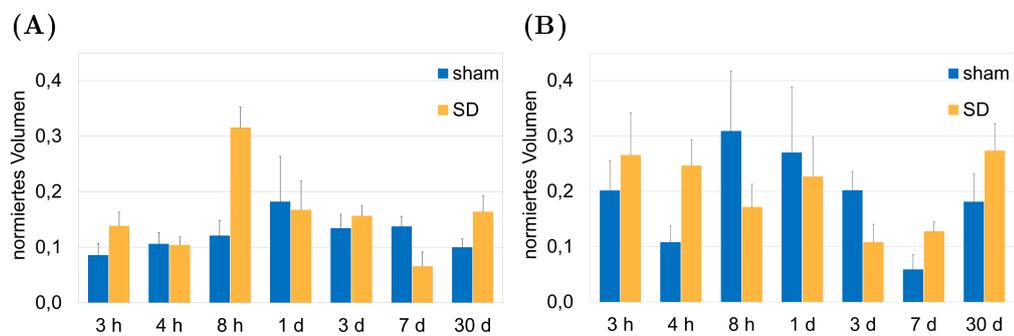


Abbildung 4.3.: An Ser51 phosphoryliertes eIF2 α normiert auf β -Tubulin-III (A) im Zytosol (B) in der Membranfraktion. Der Zeitpunkt entspricht dem Überleben nach SD (gelb) bzw. sham-Operation (blau).

4. Ergebnisse

Ein signifikanter Unterschied fand sich 8 h nach SD mit einem mehr als 2,5-fachen Anstieg von $eIF2\alpha$ -P_{Ser51}. Geringe SD-bedingte Unterschiede zeigten sich tendenziell auch 3 h, 7 d und 30 d nach SD, wobei $eIF2\alpha$ in SD-Tieren nach 3 h und 30 d stärker, nach 7 d dagegen schwächer phosphoryliert war als in den Kontrolltieren (Abb. 4.1 B und 4.3 A).

Bei der Phosphorylierung von $eIF2\alpha$ an Ser51 in der Membranfraktion zeigte sich eine tendenziell stärkere Phosphorylierung 4 h und 7 d nach SD, sowie eine verringerte Phosphorylierung 3 d nach SD. Außerdem war in der Membranfraktion bei insgesamt schwächerem Signal eine größere Streuung der Messwerte auffällig, die eventuell signifikante Unterschiede zwischen SD- und scheinoperierten Tieren maskieren könnte (Abb. 4.1 B und 4.3 B).

4.2. $eIF4E$ und $eIF4E$ -P_{Ser209}

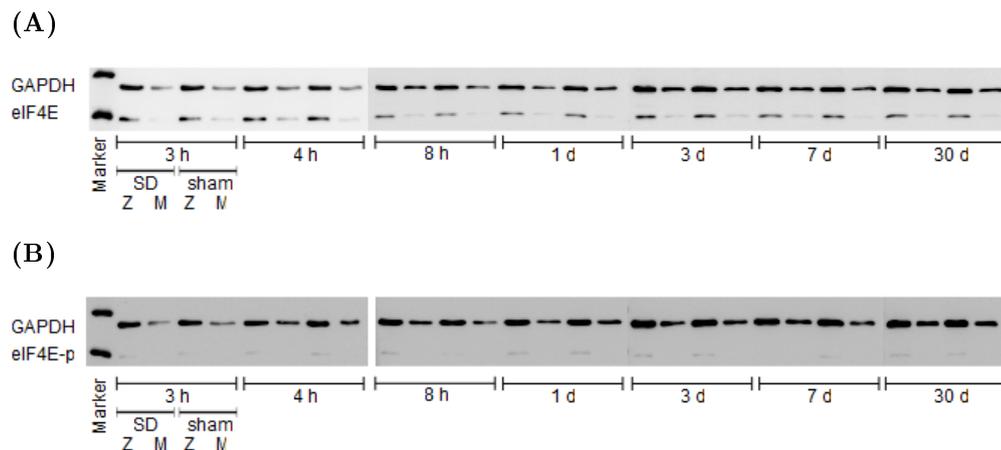


Abbildung 4.4.: Western Blot mit den Antikörpern gegen $eIF4E$ (A) und $eIF4E$ -P_{Ser209} (B) (25 kDa) mit dem Housekeeper GAPDH (37 kDa, obere Bande). Die obere Markerbande liegt bei 37 kDa, die untere bei 25 kDa. Der Zeitpunkt entspricht dem Überleben nach SD bzw. sham-Operation, Z = Zytosol, M = Membranfraktion.

Bei der Expression von $eIF4E$ im Zytosol zeigte sich eine gruppenübergreifende zeitliche Dynamik: Sowohl in den SD- als auch in sham-Tieren

4. Ergebnisse

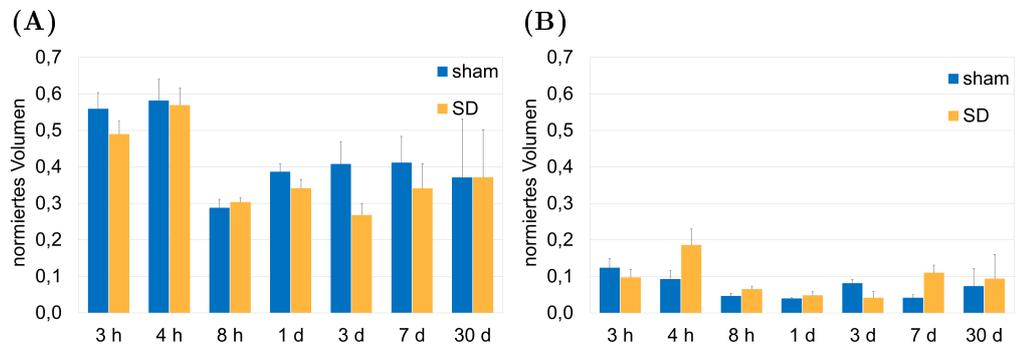


Abbildung 4.5.: Expression von eIF4E normiert auf GAPDH (A) im Zytosol (B) in der Membranfraktion. Der Zeitpunkt entspricht dem Überleben nach SD (gelb) bzw. sham-Operation (blau).

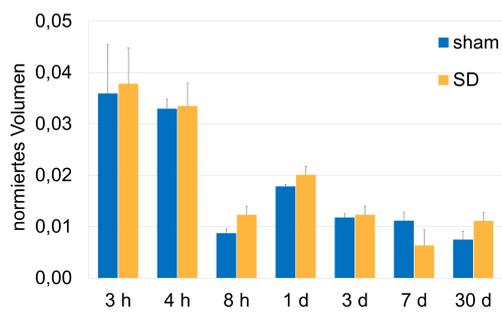


Abbildung 4.6.: An Ser209 phosphoryliertes eIF4E im Zytosol normiert auf GAPDH. Der Zeitpunkt entspricht dem Überleben nach SD (gelb) bzw. sham-Operation (blau).

4. Ergebnisse

zeigten sich 3 h und 4 h nach OP größere Mengen von eIF4E im Zytosol als zu den späteren Zeitpunkten (Abb. 4.4 A und 4.5 A).

In der Expression von eIF4E im Zytosol zeigten sich keine deutlichen gruppenspezifischen Unterschiede, lediglich 3 d nach OP bestand die Tendenz zu einer verminderten Expression von eIF4E nach SD im Vergleich zur Scheinoperation (Abb. 4.4 A und 4.5 A).

In der Membranfraktion fanden sich deutlich geringere Mengen von eIF4E als im Zytosol. Darüber hinaus wurde 4 h und 7 d nach SD eine Verdopplung von eIF4E relativ zu den jeweiligen sham-Gruppen beobachtet, was sich jedoch bei einem sehr niedrigen Gesamtniveau nach den angewandten Kriterien nicht als signifikant erwies (Abb. 4.4 A und 4.5 B).

Das phosphorylierte eIF4E-P_{Ser209} konnte nur in sehr geringen Mengen im Zytosol nachgewiesen werden (Abb. 4.4 B). Der Phosphorylierungsstatus von eIF4E an Ser209 wies sowohl in SD- als auch in sham-Tieren eine zeitliche Dynamik mit einer stärkeren Phosphorylierung von eIF4E zu den frühen Zeitpunkten (3 und 4 h nach OP) auf. Signifikante SD-bedingte Unterschiede wurden nicht detektiert, es fielen lediglich eine tendenzielle Erhöhung des Phosphorylierungsgrades 8 h nach SD und eine verringerte Phosphorylierung 7 d nach SD auf (Abb. 4.4 B und 4.6).

In der Membranfraktion wurde eIF4E-P_{Ser209} nicht nachgewiesen.

4.3. p70S6-Kinase und p70S6-Kinase-P_{Thr389}

Die detektierten Mengen der p70S6-Kinase waren sowohl nach SD als auch nach sham-OP in Zytosol und Membranfraktion sehr viel geringer als die der anderen beiden TIF (Abb. 4.7 A und 4.8).

In der zytosolischen Fraktion zeigte sich ein signifikanter gruppenspezifischer Unterschied 8 h nach OP. Hier war die Expression der p70S6-Kinase nach SD auf das Doppelte gesteigert (Abb. 4.8 A). Eine entsprechende Tendenz bestand auch 3 d und 7 d nach OP, diese erwies sich hier bei einem niedrigen Gesamtniveau allerdings nicht als signifikant (Abb. 4.8 A).

4. Ergebnisse

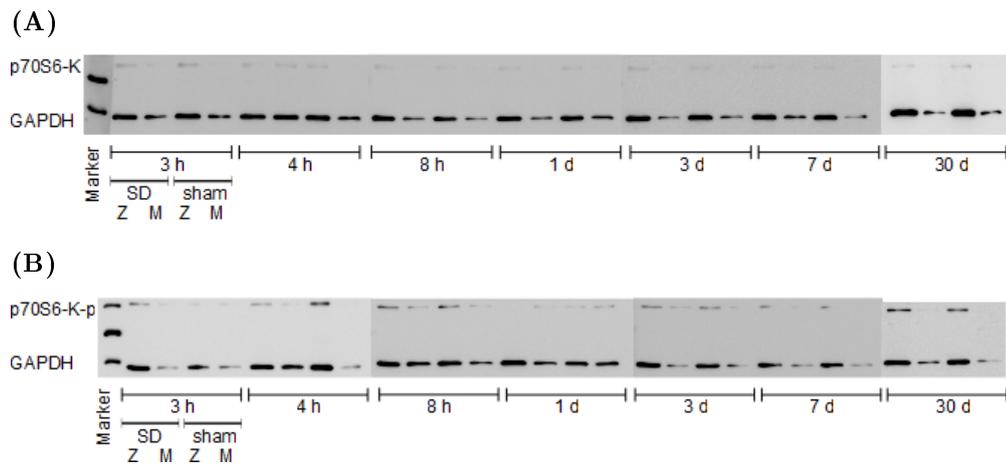


Abbildung 4.7.: Western Blot mit den Antikörpern gegen die p70S6-Kinase (A) und die p70S6-Kinase-P_{Thr389} (B) (70 kDa) mit dem Housekeeper GAPDH (37 kDa, untere Bande). Die obere Markerbande liegt bei 50 kDa, die untere bei 37 kDa. Der Zeitpunkt entspricht dem Überleben nach SD bzw. sham-Operation, Z = Zytosol, M = Membranfraktion

Die Expression der p70S6-Kinase in der Membranfraktion war generell noch niedriger als im Zytosol (siehe auch Tabellen B.9 und B.10 im Anhang B). In sham-Tieren lag die Menge zum Teil unter der Detektionsgrenze (7 d nach OP) (Abb. 4.8 B). Es zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung der Expression der p70S6-Kinase (zweifach) 4 h nach SD im Vergleich zu sham, auf geringerem Gesamtniveau war eine ähnliche Tendenz auch 1 d und 7 d nach SD zu beobachten. 30 d nach SD zeigte sich eine deutliche Verringerung der p70S6-Kinase, die sich allerdings wie auch die zuvor genannten Tendenzen nach den angewandten Kriterien nicht als signifikant erwies (Abb. 4.8 B).

Auch bei der phosphorylierten p70S6-Kinase gab es v. a. in der Membranfraktion aufgrund der sehr geringen Mengen Proben, in denen keine p70S6-Kinase-P_{Thr389} detektiert werden konnte (siehe Abb. 4.7 B und Tabellen B.11 und B.12 im Anhang B).

Im Zytosol war die Phosphorylierung der p70S6-Kinase an Thr389 4 h und 7 d nach SD im Vergleich zu sham tendenziell verringert (Abb. 4.9 A).

4. Ergebnisse

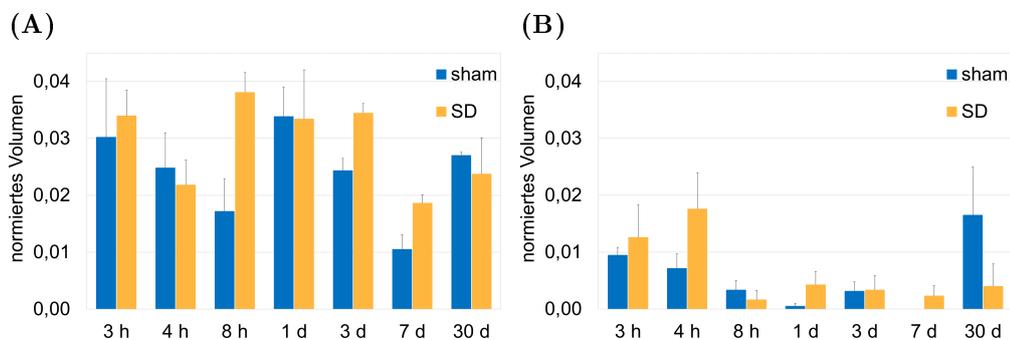


Abbildung 4.8.: Expression der p70S6-Kinase normiert auf GAPDH (A) im Zytosol (B) in der Membranfraktion. Der Zeitpunkt entspricht dem Überleben nach SD (gelb) bzw. sham-Operation (blau).

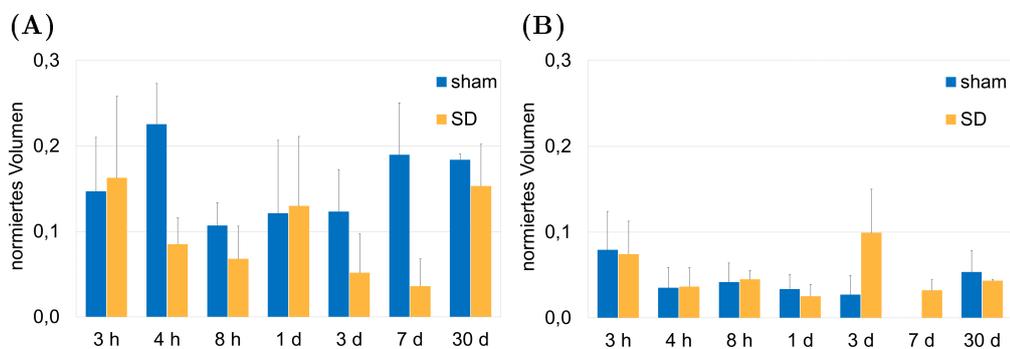


Abbildung 4.9.: An Thr389 phosphorylierte p70S6-Kinase normiert auf GAPDH (A) im Zytosol (B) in der Membranfraktion. Der Zeitpunkt entspricht dem Überleben nach SD (gelb) bzw. sham-Operation (blau).

4. Ergebnisse

In der Membranfraktion waren kaum Unterschiede zwischen SD- und sham-operierten Tieren detektierbar. Es fiel lediglich eine tendenzielle Steigerung der Phosphorylierung der p70S6-Kinase 3 und 7 d nach SD auf (Abb. 4.9 B). Bemerkenswert war hierbei, dass sich in den sham-Tieren 7 d nach OP auch bei wiederholter Messung keine phosphorylierte p70S6-Kinase in der Membranfraktion nachweisen ließ (siehe Tabelle B.12 im Anhang B).

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war die Untersuchung, inwiefern SD die Proteinsynthese im direkt betroffenen zerebralen Kortex beeinflusst. Insbesondere sollte geklärt werden, ob SD auch für die Beeinflussung der Proteinsynthese nach Ischämie verantwortlich sein könnte. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, spielt die Regulation der Translation bei der Kontrolle von Proteinkonzentrationen eine herausragende Rolle. Hierbei liegt der größte Anteil der Kontrolle beim Teilschritt der Initiation (Sonenberg 1996). Da auch nach Ischämie mehrfach der Mechanismus der Hemmung der Translationsinitiation beschrieben wurde (siehe Kapitel 2), konzentrierte sich die vorliegende Arbeit auf die Analyse essentieller TIF und deren Phosphorylierungsstatus. Wie in Kapitel 1.3.4 beschrieben, wurden hierzu eIF2 α , eIF4E und die p70S6-Kinase betrachtet.

Die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten deuten darauf hin, dass SD über die Regulation der TIF die Proteinsynthese im Kortex beeinflusst. So ist im Vergleich zu sham-operierten Tieren 4 h nach SD die P70S6-Kinase in der Membranfraktion verringert, was auf eine Steigerung der Proteinsynthese hindeutet. 8 h nach SD zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression der p70S6-Kinase im Zytosol als Hinweis auf eine Steigerung der Proteinsynthese sowie eine Steigerung der Phosphorylierung von eIF2 α , was eine Hemmung der Proteinsynthese impliziert. Außerdem konnten zu verschiedenen Zeitpunkten Tendenzen in der Regulation der TIF gezeigt werden, die teilweise mit den Beobachtungen nach Ischämie übereinstimmen.

Die Verminderung der Proteinsynthese ist eine typische Antwort von Zellen auf verschiedene Formen von Stress (Jagus et al. 1999, Sheikh und

5. Diskussion

Fornace 1999, Clemens et al. 2000, Gale et al. 2000, Ron und Harding 2000, Schneider 2000). Dies konnte auch in verschiedenen Ischämie-Modellen beobachtet werden. Unter anderem wurde gezeigt, dass nach transientser zerebraler Ischämie der Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren vermindert ist (Cooper et al. 1977, Wong et al. 1991, Bonnekoh et al. 1992, Burda et al. 1994, DeGracia et al. 1996). Diese postischämische Hemmung der Proteinsynthese wird auf eine Inhibition der Translationsinitiation zurückgeführt (Krause und Tiffany 1993, Burda et al. 1994). Die genannten postischämischen Studien betrachteten dabei hauptsächlich die Proteinsynthese in betroffenem Gewebe bis zu einem Tag nach Ischämie. Zudem wurde nach fokaler Ischämie gezeigt, dass andere Mechanismen, wie z. B. die Regulation der Elongation über den Elongationsfaktor eEF2 keine große Rolle bei der Suppression der Proteinsynthese spielen (Althausen et al. 2001).

Bei der Regulation der Translationsinitiation ist zum einen die zur Verfügung stehende Menge der TIF bedeutend (Buckley und Ehrenfeld 1987, Kleijn et al. 1998), zum anderen deren Phosphorylierungsgrad (Hershey 1990, Kleijn et al. 1998). Dabei werden die eIF2- und eIF4-Komplexe als wichtigste Angriffspunkte für die Regulation angesehen (Hershey 1990, Redpath und Proud 1994). Es wurden auch bereits Hinweise auf eine konkrete Rolle der TIF eIF2 α , eIF4E und p70S6-Kinase in der Hemmung der Translation nach transientser globaler Ischämie beschrieben (Martín de la Vega et al. 2001). Da in den zitierten Studien stets ischämisches Gewebe untersucht wurde (direkt infarziertes Gewebe oder die Penumbra), sind Rückschlüsse auf die konkreten zugrunde liegenden Pathomechanismen oder die räumliche Verteilung im postischämischen Gehirn nicht bzw. nur bedingt möglich. Hierzu gibt es, soweit mir bekannt ist, lediglich einige Hinweise aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe, die darauf hindeuten, dass im nichtischämischen, periläsionellen Gewebe eine partielle Hemmung der Proteinsynthese stattfindet (Neumann-Haefelin et al. 1998, Neumann-Haefelin et al. 1999) (siehe auch Kapitel 1.2.5).

Im Folgenden werden nach der Diskussion der Methoden die Ergebnisse

der vorliegenden Studie zu den Erkenntnissen aus Untersuchungen zur Proteinsynthese und der Translationsinitiation nach Ischämie und SD in Beziehung gesetzt.

5.1. Diskussion der Methoden

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von *Spreading Depolarizations* auf die Proteinexpression anhand der Analyse von Translationsinitiationsfaktoren untersucht. Hierzu wurden die Expression, die Lokalisation und der Phosphorylierungsstatus dreier für die Proteinexpression essentieller Translationsinitiationsfaktoren untersucht: eIF2 α , eIF4E und die p70S6-Kinase. Initial wurden außerdem Antikörper gegen eIF4G, eIF2Be und eIF4AI eingesetzt, wobei diese in den vorliegenden Untersuchungen entweder keine reproduzierbaren Messergebnisse erbrachten oder ihr Phosphorylierungsstatus nicht sicher bestimmt werden konnte. Entscheidend für die endgültige Auswahl war, dass für jeden der drei Teilschritte der Translationsinitiation jeweils ein essentieller Faktor in die Untersuchung eingeschlossen werden konnte. Aus der Expression der untersuchten TIF sowie deren Translokation in die Membranfraktion und des Phosphorylierungsstatus auf Proteinebene können Rückschlüsse auf die Regulation der Translation und damit der Proteinsynthese nach SD gezogen werden.

In Hinblick auf den Einfluss von SD auf die globale Proteinsynthese wurden bisher nur Untersuchungen zu frühen Zeitpunkten (1–3 h) und 1–3 d nach SD durchgeführt. Hierbei wurde eine Hemmung der Proteinsynthese zu den frühen Zeitpunkten (1–3 h) und ein leichter Anstieg der Proteinsynthese 3 d nach SD gezeigt. Diesen Untersuchungen der globalen Proteinsynthese stehen einige Studien zur Synthese spezifischer Proteine gegenüber, die eine Steigerung unmittelbar (1–3 h) und in einem Zeitraum von 2–7 d nach SD gezeigt haben (siehe auch Kapitel 1.2.5). Um hier zeitliche Lücken in der Betrachtung zu schließen und einen möglichst vollständigen Überblick über den Verlauf der Proteinsynthese nach SD zu

5. Diskussion

erhalten, wurden in der vorliegenden Studie die oben aufgeführten TIF zu folgenden Zeitpunkten nach SD bzw. sham untersucht: 3 h, 4 h, 8 h, 1 d, 3 d, 7 d und 30 d.

Für die Untersuchung der Proteinsynthese im Tiermodell gibt es verschiedene Verfahren. Die meisten Studien (auch die zitierten Arbeiten zur Ischämie) basieren auf der Injektion und anschließenden Detektion radioaktiv markierter Aminosäuren. Anhand ihres Einbaus in Proteine kann die Proteinsynthese in einem definierten Zeitraum im zu untersuchenden Gewebe direkt gemessen werden. Dies ist ein aufwendiges, invasives Verfahren und mit der Verwendung sowie der anschließend notwendigen Entsorgung radioaktiver Stoffe verbunden. Verschiedene Faktoren können den Einbau der markierten Aminosäuren in die Proteine beeinflussen, wie z. B. das Alter der Tiere, die Körpertemperatur, aber auch die Nahrungsaufnahme usw. (Dunlop et al. 1975). Außerdem gibt es Diskussionen über den Einfluss des Verfahrens auf die Proteinsynthese selbst, z. B. über die Konzentration der Aminosäure und Wahl des radioaktiven Tracers (Dunlop et al. 1975, Smith und Azam 1992). Nicht zuletzt wird in der Literatur diskutiert, welche Infusions-Technik (die konstante Infusion oder eine Bolusgabe) die verlässlicheren Messergebnisse erbringt (Garlick et al. 1994, Rennie et al. 1994).

Daher haben wir uns für eine weniger invasive Methode entschieden und über die Bestimmung der Expression und Phosphorylierung der TIF Rückschlüsse auf die Proteinsynthese gezogen. Zunächst ist diese Methode mittels primärer und sekundärer Antikörper einfach und schnell durchzuführen und damit valide, reproduzierbar und wenig fehleranfällig. Außerdem erfordert sie keine Eingriffe in den Organismus, welche die Proteinsynthese im untersuchten Zeitraum beeinflussen könnten. Darüber hinaus sind keine radioaktiven Substanzen von Nöten, was die Grundvoraussetzungen vereinfacht und wiederholte Messungen zu sieben unterschiedlichen Zeitpunkten ermöglicht.

Ein stringenter Operationsplan stellte sicher, dass die Tiere aus den einzelnen Gruppen jeweils zu unterschiedlichen Tageszeiten operiert wurden.

5. Diskussion

Darüber hinaus wurden die unterschiedlichen Gruppen über den gesamten Zeitraum, in dem Operationen stattfanden, verteilt. Dies minimierte die Gefahr, dass äußere Einflüsse zu systematischen Fehlern in einzelnen Tiergruppen führen könnten.

Ab dem Zeitpunkt der Gehirnpräparation bestand die Gefahr des Zerfalls der Proteine bzw. der Dephosphorylierung, weshalb die Arbeitsschritte der Gehirnpräparation, Lyse und Fraktionierung unter ständiger Kühlung stattfanden. Die Gehirnpräparation wurde auf Eis und unter Kühlung mittels 4 °C kaltem aCSF durchgeführt. Außerdem wurde stets zu zweit gearbeitet, um beide Kortexhälften möglichst schnell präparieren zu können und damit ebenfalls eine Degeneration der Proteine bis zum Einfrieren bei −80 °C möglichst gering zu halten. Lyse und Fraktionierung fanden auf Eis, mit 4 °C kalten Puffern und in gekühlten Zentrifugen statt.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Fraktionierung mittels des verwendeten Protokolls wurden membranspezifische Antikörper getestet. Hierbei war jedoch bei den positiv-Proben kein Signal detektierbar. Ein Hinweis für die dennoch erfolgreiche Trennung der Fraktionen ist das Fehlen von eIF4E-P_{Ser209} in der Membranfraktion, das übereinstimmend mit der Literatur nur im Zytosol nachgewiesen wurde.

In den einzelnen zu analysierenden Gruppen entschieden wir uns für das Poolen der Einzelproben, um mit vertretbarem Aufwand eine Mittelung der biologischen Unterschiede der jeweils sechs bis zehn Einzeltiere zu erreichen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben gruppenweise gepoolt, so dass von jedem Einzeltier gleich viel Gesamtprotein einging (siehe Kapitel 3.5.1). Bei diesem Verfahren können extreme Ausreißer nach oben oder unten das Ergebnis der gesamten Gruppe verschieben. Außerdem können keine Aussagen zur biologischen Variabilität innerhalb der Stichprobe getroffen werden. Daher wurden die nach dem Poolen verbliebenen Proben der Einzeltiere für fortführende Untersuchungen mit Einzelanalysen getrennt aufbewahrt.

Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten gleichzeitig mit Proben aus allen Gruppen (SD- und sham-Tiere zu allen Zeitpunkten), um systematische

Fehler innerhalb einer oder weniger Gruppen zu verhindern. So wurden die Proben zunächst jeweils mit den gleichen Puffern auf vier gleichzeitig gegossenen Gelen in der gleichen Gelelektrophorese-Kammer aufgetrennt, um Abweichungen der Ergebnisse aufgrund von Laufunterschieden zu verhindern. Dabei wurden jeweils die Randspuren frei gelassen, um Verzerrungen bei der Gelelektrophorese und damit eine schlechtere Messbarkeit der Banden zu verhindern. Um die Vergleichbarkeit weiter zu erhöhen, wurden die SD- und sham-Gruppen eines Zeitpunktes immer auf demselben Gel untersucht, auf dieselbe Membran geblottet und dann analysiert. Zur weiteren Minimierung der Fehleranfälligkeit der Methoden wurden jeweils drei technische Replikate der Western-Blots wiederum an unterschiedlichen Tagen angefertigt und analysiert. Von diesen wurde schließlich das arithmetische Mittel gebildet und dessen Standardfehler (SEM) berechnet.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. eIF2 α

Wie bereits in Kapitel 1.3.4 erläutert, ist eIF2 mit der Bindung der Initiator-tRNA und der Bindung an die 40 S-ribosomale Untereinheit maßgeblich für die Translationsinitiation verantwortlich. Über die Untereinheit eIF2 α wird die Aktivität von eIF2 reguliert. Aufgrund der Vielfalt der unterschiedlichen, oft durch Stress ausgelösten Signalwege, die alle zur Phosphorylierung von eIF2 α führen, wird diese auch generell als Integrator der Stress-Antwort angesehen (Ron und Harding 2007, B'chir et al. 2013). Die Phosphorylierung von eIF2 α an Ser51 moduliert die Translation zum einen über die kompetitive Hemmung des eigenen Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktors eIF2B im Sinne einer globalen Herunterregulation der Translation (de Haro et al. 1996, Hershey und Merrick 2000, Proud 2005, Sonenberg und Hinnebusch 2007). Zum anderen induziert eIF2 α -P_{Ser51} die Translation bestimmter, für die adaptive Stressantwort relevanter Transkriptionsfaktoren wie ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*) (Proud

5. Diskussion

2005, Sonenberg und Hinnebusch 2009, B'chir et al. 2013). In der Summe überwiegt jedoch die kompetitive Hemmung von eIF2B (Hershey und Merrick 2000, Ron und Harding 2007). Daher resultiert eine stärkere Phosphorylierung von eIF2 α , basierend auf seiner zentralen Rolle als Integrator von Stressantworten, in einer Hemmung der allgemeinen Proteinsynthese, um Energie und Substrate zu sparen (B'chir et al. 2013). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von eIF2 α an Ser51 verantwortlich für die Hemmung der Proteinsynthese während der Reperfusion nach Ischämie ist (Thilmann et al. 1986, Burda et al. 1994, DeGracia et al. 1997). Neben einer Phosphorylierung können Änderungen der Aktivität des phosphorylierten eIF2 α auch durch Translokation oder durch Degradation zustande kommen (Mengesdorf et al. 2002). Eine Translokation von eIF2 α -P in die Membranfraktion ist beispielsweise im Tiermodell nach Ischämie und Reperfusion beobachtet worden (DeGracia et al. 1997, Mengesdorf et al. 2002). Ein Abbau von eIF2 α konnte in verschiedenen Apoptose-Modellen gezeigt werden (Bushell et al. 2000, Morley et al. 1997, Satoh et al. 1999). Daher untersuchten wir in der vorliegenden Studie die Expression und die Phosphorylierung von eIF2 α im Zytosol und in der Membranfraktion.

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, wurden in der vorliegenden Studie etwa die gleiche Menge eIF2 α in Zytosol und Membranfraktion detektiert. Auffällig war dabei eine vergleichbare zeitliche Dynamik der Expression von eIF2 α in SD- und sham-Tieren sowohl im Zytosol, als auch in der Membranfraktion über den gesamten untersuchten Zeitraum hinweg (ähnliches Level von eIF2 α nach 3 h, 4 h, 3 d und 7 d, welches das nach 8 h, 1 d und 30 d überschritt). Dies deutet auf eine in beiden Gruppen gleichsinnige Regulation des eIF2 α -Proteins hin. Diese könnte durch die kleinen kortikalen Läsionen ausgelöst werden, welche sowohl nach Applikation hyperosmolarer KCl-Lösung (zur Auslösung von SD) als auch bei NaCl-Lösung (in den sham-Tieren) entstehen. Außerdem könnten hier Effekte der Narkose, die bei allen Tieren auf die gleiche Art durchgeführt wurde, eine Rolle spielen.

Die tendenzielle Steigerung der Expression von eIF2 α im Zytosol 8 h

5. Diskussion

und 3 d nach SD ist gering, deutet aber darauf hin, dass die Translation nach SD zu diesen Zeitpunkten gesteigert sein könnte, was auch schon in früheren Studien für einzelne Proteine oder die gesamte Proteinsynthese beschrieben wurde (Buckley und Ehrenfeld 1987, Herrera et al. 1998, Kawahara et al. 1999).

Die geringe Hochregulation der Expression im Zytosol 8 h nach SD korreliert allerdings mit einer stärkeren Phosphorylierung an Ser51, die für eine Hemmung der Translation verantwortlich gemacht wird (de Haro et al. 1996, Kimball 1999, Hershey und Merrick 2000, Proud 2005, Ron und Harding 2007). Dieser Befund könnte durch die Rolle von eIF2 α bei Stressreaktionen zu erklären sein. Eine Phosphorylierung von eIF2 α bewirkt die Förderung der Transkription von *stress-response*-Genen. Diese ist für eine adaptive Stressreaktion trotz der gleichzeitigen Hemmung der globalen Proteinsynthese notwendig. Auch 3 h und 30 d nach SD liegt im Zytosol im Vergleich zu sham tendenziell mehr eIF2 α -P_{Ser51} vor, was ebenfalls auf eine Hemmung der Translationsinitiation zu diesen Zeitpunkten hinweist.

7 d nach SD ist die Phosphorylierung von eIF2 α an Ser51 tendenziell vermindert, was auf einen Rückgang der Hemmung der Translationsinitiation zu diesem Zeitpunkt hindeutet. Diese wurde in Ischämie-Modellen bereits beschrieben (Neumann-Haefelin et al. 1998, Neumann-Haefelin et al. 1999) und könnte zu einer Normalisierung der Translationsrate nach erfolgter Stressreaktion beitragen. Ebenfalls nach ca. 7 d endet die durch SD induzierte Ischämietoleranz (siehe hierzu Kapitel 1.2.4).

In der Membranfraktion waren zwischen SD- und sham-Tieren keine Mengenunterschiede von eIF2 α nachweisbar, allerdings wurde hier auch v. a. die Translokation des phosphorylierten eIF2 α -P_{Ser51} als Regulationsmechanismus beschrieben (DeGracia et al. 1997, Mengesdorf et al. 2002).

Der Grad der Phosphorylierung von eIF2 α in der Membranfraktion war 4 h und 7 d nach SD tendenziell gesteigert. 3 d nach SD fand sich tendenziell ein gegenläufiger Effekt mit Verringerung der Phosphorylierung von eIF2 α an Ser51, was auf eine Steigerung der Translationsinitiation

durch SD zu diesem Zeitpunkt hindeutet, wie sie bereits in früheren Studien gezeigt wurde (Kawahara et al. 1999). Bisher gibt es noch keine Untersuchungen zu den genauen Mechanismen und Auswirkungen, die die Translokation von eIF2 α -P_{Ser51} auf die Proteinsynthese hat. Eine gesteigerte Phosphorylierung membranständigen eIF2 α wurde allerdings bereits mit einer Hemmung der Translationsinitiation nach Ischämie in Verbindung gebracht (DeGracia et al. 1997, Mengesdorf et al. 2002).

5.2.2. eIF4E

Wie in Kapitel 1.3.4 beschrieben, gilt die zelluläre Konzentration von eIF4E als *rate limiting* für die Translation. Eine höhere Expression wird daher im Allgemeinen als translationssteigernd angesehen (Duncan et al. 1987, Krause und Tiffany 1993, Morley et al. 1997, Kleijn et al. 1998). Eine verminderte Expression von eIF4E gilt hingegen als Mechanismus für eine Hemmung der Translation und wurde auch nach Ischämie beobachtet (Martín de la Vega et al. 2001). Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass eIF4E teilweise bereits im Nukleus an die mRNA-Cap bindet und mit der mRNA ins Zytosol transportiert wird, wo dann die Proteinsynthese am endoplasmatischen Retikulum (ER) abläuft (Lejbkowitz et al. 1992). Nach diesen Überlegungen ist es wichtig, Zytosol und Membranfraktion in die Untersuchungen miteinzubeziehen, um einen kompletten Überblick über die Regulation dieses TIF zu erhalten.

Zum Zeitpunkt 3 d nach SD ist die Konzentration von eIF4E im Zytosol geringer, was für eine durch SD induzierte Hemmung der Translation spricht (Buckley und Ehrenfeld 1987, Krause und Tiffany 1993, Morley et al. 1997, Lejbkowitz et al. 1992). Die tendenziell gesteigerte Konzentration von eIF4E in der Membranfraktion 4 h und 7 d nach SD könnte hingegen auf eine Induktion der Translation hinweisen (Lejbkowitz et al. 1992).

Ein höherer Phosphorylierungsgrad von eIF4E an Ser209 führt zu einer stärkeren Affinität an die Cap-Strukturen und wird mit einer Steigerung

5. Diskussion

der Translation in Verbindung gebracht (Kaspar et al. 1990, Minich et al. 1994, Scheper und Proud 2002, Sonenberg und Dever 2003). Entsprechende Korrelationen einer reduzierten Phosphorylierung von eIF4E an Ser209 mit einer Hemmung der Proteinsynthese konnten u.a. beim Hitzeschock (Duncan et al. 1987, Zapata et al. 1991, Duncan 1996), Mitose (Bonneau und Sonenberg 1987, Huang und Schneider 1991) und bei virusinfizierten Zellen (Huang und Schneider 1991, Feigenblum und Schneider 1993) gezeigt werden. Dieser Mechanismus wurde schließlich auch bei der Hemmung der Proteinsynthese nach Ischämie beobachtet (DeGracia et al. 1996, Burda et al. 1998, Martín de la Vega et al. 2001).

Unsere Untersuchungen zeigen eine tendenziell stärkere Phosphorylierung von eIF4E an Ser209 im Zytosol 8 h nach SD, was auf eine Steigerung der Translation zu diesem Zeitpunkt hinweist. Demgegenüber ist 7 d nach SD die Phosphorylierung tendenziell vermindert, was auf eine Hemmung der Translation hinweist und dem in der Membranfraktion erhöhten eIF4E entgegenwirkt. In der Literatur gibt es bisher keinen Hinweis auf eine Translokation von an Ser209 phosphoryliertem eIF4E aus dem Zytosol in andere Zellkompartimente. Auch in dieser Studie wurde kein eIF4E-P_{Ser209} in der Membranfraktion nachgewiesen.

Insgesamt sind in unserer Studie keine signifikanten Änderungen der Expression oder Phosphorylierung von eIF4E durch SD beobachtet worden. Den tendenziellen Unterschieden zu den verschiedenen Zeitpunkten wird teilweise ein gegenläufigen Effekt auf die Proteinsynthese zugeschrieben, so dass deren Bedeutung kritisch beurteilt werden muss. Hier könnte durch verschiedene Regulationsmechanismen eine Feineinstellung der Proteinsynthese erfolgen, um ein Gleichgewicht zwischen ressourcensparender Reduktion der Translation und ihrer Steigerung z. B. zum Erhalt der Zelle zu bewahren. Mehrere Studien haben gezeigt, dass eine übermäßige Erhöhung der Expression oder Aktivität von eIF4E lediglich zu einer Steigerung der Translation bestimmter mRNAs führt (Sonenberg 1993, Gingras et al. 1999, Richter und Sonenberg 2005). Dazu gehören unter anderen die Ornithindecaboxylase (ODC), Myc und Wachstumsfaktoren (FGF, VEGF).

5. Diskussion

Diese spielen insbesondere bei der Kontrolle von Zellwachstum und der Proliferation eine wichtige Rolle, weshalb der Regulation von eIF4E eventuell gerade bei diesen Prozessen eine gesonderte Bedeutung zugeschrieben wird (Sonenberg 1996, Gingras et al. 1999, Richter und Sonenberg 2005).

In anderen Studien mit Stress-Modellen wurde trotz einer Phosphorylierung von eIF4E an Ser 209 eine deutliche Reduktion der Translationsrate festgestellt (Morley und McKendrick 1997, Wang et al. 1998). Hier wird angenommen, dass andere Mechanismen wie z. B. die Phosphorylierung von eIF2 α , überwiegen und für die Hemmung der Translation verantwortlich sind (Gingras et al. 1999). Das gleichzeitige Auftreten dieser beiden gegenläufigen Regulationsmechanismen wurde auch in unserer Studie beobachtet. Die Phosphorylierung von eIF4E könnte eine Art Kompensationsmechanismus darstellen, wodurch die Translation spezifischer mRNAs gefördert wird, deren Proteine für Wachstum und Proliferation bedeutend sind.

5.2.3. p70S6-Kinase

Die p70S6-Kinase ist eine Proteinkinase, die ebenfalls eine zentrale Rolle in der Regulation der Translation spielt (Proud 1996, Review). Der Phosphorylierungsstatus des ribosomalen Proteins S6 korreliert mit Veränderungen in der Rate der Proteinsynthese (Fumagalli und Thomas 2000). Die Phosphorylierung des Proteins S6 erfolgt durch die p70S6-Kinase (Fumagalli und Thomas 2000). Sowohl nach fokaler als auch nach globaler Ischämie und Reperfusion war von verschiedenen Arbeitsgruppen im betroffenen Gewebe eine Herabsetzung ihrer Expression bzw. Aktivität (für 30 min bis 6 h) in Zusammenhang mit einer Hemmung der Proteinsynthese beobachtet worden (Mengesdorf et al. 2002, Martín de la Vega et al. 2001). Allerdings gibt es auch für die p70S6-Kinase Hinweise, dass durch ihre Phosphorylierung der p70S6-Kinase nur die Translation selektiver mRNAs beeinflusst wird (Jefferies et al. 1997).

Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung der p70S6-Kinase an

5. Diskussion

Thr389 ihre Aktivität verstärkt und folglich die Translation steigert (Sonenberg und Hinnebusch 2009). Ein solcher Zusammenhang wurde z. B. für die nach fokaler Ischämie beobachtete Hemmung der Proteinsynthese verantwortlich gemacht (Pullen und Thomas 1997, Althausen et al. 2001, Mengesdorf et al. 2002). Bis 24 h nach fokaler Ischämie wurde eine verminderte Menge der an Thr389 phosphorylierten p70S6-Kinase gefunden. Die Lokalisation der p70S6-Kinase in der Membranfraktion und die Bedeutung für die Translationsinitiation wurde bisher nicht untersucht. Sie ist zu keiner Zeit direkt ans Ribosom und damit am ER gebunden, dennoch wurde in der vorliegenden Studie auch der Expressions- und der Phosphorylierungsgrad der p70S6-Kinase in der Membranfraktion untersucht.

Wie in Kapitel 4.3 beschrieben, konnten in dieser Studie sowohl nach SD als auch nach sham-OP nur sehr geringe Mengen der p70S6-Kinase detektiert werden. Die dennoch signifikante Heraufregulation der Expression der p70S6-Kinase im Zytosol 8 h nach SD im Vergleich zu sham sowie tendenziell 3 d und 7 d nach SD deuten auf eine Induktion der Translation durch SD hin. Dies wurde in früheren Studien bereits für einzelne Proteine, aber auch für die globale Proteinsynthese beschrieben (Herrera et al. 1998, Kawahara et al. 1999).

Außerdem wurde 4 h nach SD eine signifikant größere Menge der p70S6-Kinase in der Membranfraktion gefunden als nach sham. Eine vergleichbare Tendenz zeigte sich auch 1 d und 7 d nach SD. Dahingegen ist die Konzentration der p70S6-Kinase in der Membranfraktion 30 d nach SD deutlich geringer als in sham-Tieren. Wie bereits oben erläutert, wurde die Funktion membranständiger p70S6-Kinase noch nicht untersucht und es bleibt fraglich, ob sie sich direkt oder indirekt auf die Proteinsynthese auswirken.

Des Weiteren lässt sich in dieser Studie eine tendenzielle Verringerung der Phosphorylierung der p70S6-Kinase an Thr389 4 h und 7 d nach OP nachweisen, was nach Sonenberg auf eine Hemmung der Translation zu diesen Zeitpunkten hinweist (Sonenberg und Hinnebusch 2009). Der 4 h nach SD erhobene Befund passt zu den Ergebnissen aus früheren Studien,

5. Diskussion

die eine Hemmung der Proteinsynthese wenige Stunden nach SD (Křivánek 1970, Mies 1993) bzw. nach Ischämie zeigten (Althausen et al. 2001, Mengesdorf et al. 2002, Martín de la Vega et al. 2001).

In der Membranfraktion fällt auf, dass 3 d und 7 d nach SD eine Steigerung der Phosphorylierung der p70S6-Kinase an Thr389 in der Membranfraktion vorliegt (wenn auch auf geringem Gesamtniveau als im Zytosol). Die Abnahme von an Thr389 phosphorylierter p70S6-Kinase im Zytosol und gleichzeitige Zunahme in der Membranfraktion 7 d nach SD deuten auf eine Translokation in die Membranfraktion hin, was analog zur stärkeren Expression im Zytosol auf eine Steigerung der Translation hinweisen könnte. Die funktionelle Relevanz dieser Translokation ist jedoch noch nicht geklärt. Bisher gibt es in der Fachliteratur keine Untersuchungen hierzu und eventuelle Auswirkungen auf die Proteinsynthese sind noch unbekannt.

5.2.4. Koregulationen in SD- und sham-Tieren

Bei der Betrachtung des Gesamtbildes der Regulation der TIF in dieser Studie fallen zunächst einige Koregulationen in SD- und sham-Tieren auf. Diese sind als Effekte anzusehen, die auf generelle Einflüsse der OP (z. B. die Narkose, den Stress durch die OP, die Kortexläsion) zurückzuführen sind. Prinzipiell könnten solche gleichsinnigen Ergebnisse beider Tiergruppen auch das Resultat von systematischen Fehlern sein. So könnten sich z. B. Fehler bei der getrennten Prozessierung der Proben oder Analyse mittels Gelelektrophorese und Western Blot in anscheinend gleichsinniger Regulation der Proteine in den verschiedenen Gruppen niederschlagen. Wie in der Methodendiskussion in Kapitel 5.1 dargestellt, wurde zur weitestgehenden Vermeidung solcher systematischen Fehler eine konsequente gleichzeitige Prozessierung und Analyse aller Proben mit denselben Materialien und Geräten durchgeführt.

In der vorliegenden Studie zeigte sich eine gleichsinnige Regulation der TIF bei SD- und Kontrolltieren besonders bei der Expression von eIF2 α

5. Diskussion

und eIF4E sowie bei der Phosphorylierung von eIF4E. Dabei zeigt eIF2 α in beiden Tiergruppen sowohl im Zytosol als auch in der Membranfraktion einen biphasischen Verlauf (s. Kapitel 4.1). Die Expression ist unmittelbar (3 h und 4 h) sowie 3 d und 7 d nach Operation im Vergleich zu den übrigen Zeitpunkten (8 h, 1 d und 30 d) erhöht (Abb. 4.1 und 4.2). Dies weist auf eine relativ zu den übrigen Zeitpunkten gesteigerte Proteinsynthese 3 h, 4 h sowie 3 d und 7 d nach OP hin. SD scheinen diesen generellen Effekt nach 3 d zu verstärken. Der hier zur besseren Einordnung und Beurteilung fehlende *Baseline*-Wert einer nichtoperierten Kontrollgruppe sollte für die weitere Diskussion in kommenden Studien mitbestimmt werden. Die Expression von eIF4E wie auch dessen Phosphorylierungsstatus weist in beiden Gruppen zu den frühen Zeitpunkten 3 h und 4 h nach OP eine stärkere Ausprägung auf als zu den nachfolgenden Zeitpunkten (Abb. 4.5 und 4.6). Dies deutet auf eine relative Hemmung der Proteinsynthese ab 8 h nach OP durch Läsions-, OP- und Narkoseeffekte hin. Auch hier sollte ein *Baseline*-Wert zur weiteren Beurteilung hinzugezogen werden.

5.3. Einfluss von SD auf die globale Proteinsynthese

Im Folgenden werden alle untersuchten TIF einschließlich ihres Phosphorylierungsstatus gleichzeitig betrachtet und die daraus resultierenden Einflüsse auf die Proteinsynthese diskutiert.

4 h nach SD wurde eine signifikante Erhöhung der p70S6-Kinase in der Membranfraktion beobachtet. Dies deutet auf eine Steigerung der Proteintranslation hin. Begleitend dazu ist jedoch eIF2 α nach SD tendenziell stärker phosphoryliert (nach 3 h im Zytosol, nach 4 h in der Membranfraktion), was auf eine Hemmung der globalen Proteinsynthese weisen könnte. Dies ist möglicherweise Ausdruck einer Stressreaktion der Zellen, in der die globale Proteinsynthese gehemmt wird, stressspezifische mRNAs aber durch das phosphorylierte eIF2 α vermehrt transkribiert werden (vergleiche

5. Diskussion

hierzu Kapitel 1.3.4). Dazu passt die beobachtete tendenziell verminderte Phosphorylierung der p70S6-Kinase, die deren Aktivität reduziert und damit der Expressionserhöhung entgegen wirken könnte.

In älteren Studien zu diesen frühen Zeitpunkten nach SD war durch Analyse des Einbaus radioaktiv markierten Leucins bereits eine Hemmung der Proteinsynthese um bis zu 40 % beobachtet worden (Křivánek 1970, Mies 1993). Diese früheren Studien deuten darauf hin, dass die in unserer Studie beobachtete Phosphorylierung von eIF2 α an Ser51 und die Verminderung der Phosphorylierung der p70S6-Kinase an Thr389 zu diesen Zeitpunkten die ausschlaggebenden Mechanismen für die Translationsregulation sind. Die oben erwähnte Stressreaktion könnte auch Beobachtungen aus früheren Studien erklären, welche für ausgewählte Proteine (u. a. *immediate-early*-Gene wie c-Fos, COX-2 und Hsp27) auch zu frühen Zeitpunkten nach SD eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression zeigten (Herrera et al. 1998, Kawahara et al. 1999, Kraig et al. 1991, Urbach et al. 2006).

8 h nach SD wurde eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung von eIF2 α und Expression der p70S6-Kinase im Zytosol beobachtet. Auch hier könnte wie zu den früheren Zeitpunkten über eIF2 α -P_{Ser51} die Synthese ausgewählter Proteine gesteigert werden, während die globale Translation vermindert ist. Die gering erhöhte Expression von eIF2 α gegenüber der sham-Gruppe spielt durch die starke Phosphorylierung eine untergeordnete Rolle. Bisher gibt es keine Untersuchungen zur globalen Proteinsynthese 8 h nach SD.

Die 4 und 8 h nach SD beobachtete Steigerung der Expression der p70S6-Kinase könnte aufgrund ihrer multiplen Funktionen auch die Ischämietoleranz vorbereiten. Einen ebensolchen Effekt könnte auch die Phosphorylierung von eIF2 α bewirken, indem die globale Proteinsynthese gehemmt, die Synthese spezifischer Proteine jedoch gefördert wird. Die dadurch in Anstoß gebrachte Veränderung der Zellfunktionen würde dann erst mit Zeitverzögerung zur Toleranz nach 1 d führen (siehe Kapitel 1.2.4).

1 d nach OP besteht der einzige gemessene Unterschied zwischen den

5. Diskussion

SD- und sham-Tieren in einem tendenziell erhöhten Level der p70S6-Kinase in der Membranfraktion, zu deren isolierten Auswirkung auf die Translation bisher keine Studien durchgeführt wurden.

3 d nach SD sprechen mehrere Beobachtungen für eine tendenzielle Steigerung der Proteinsynthese: eine gesteigerte Expression von eIF2 α und der p70S6-Kinase im Zytosol sowie eine Steigerung der Phosphorylierung der p70S6-Kinase in der Membranfraktion und die leichte Abnahme des an Ser51 phosphorylierten eIF2 α in der Membranfraktion. Diese Regulationsmechanismen bieten eine Erklärung für den in anderen Studien zu diesem Zeitpunkt beobachteten gesteigerten Einbau von ¹⁴C-Leucin (Kawahara et al. 1999, Herrera et al. 1998). Dies könnte auf eine einsetzende Erholung und ein Abklingen der Stressreaktion nach SD hindeuten.

7 d nach SD ist nach wie vor eine tendenzielle Überexpression der p70S6-Kinase in beiden Fraktionen zu beobachten. Diese ist schwächer als zu vorhergehenden Zeitpunkten. Dies könnte Ausdruck der abklingenden Ischämietoleranz sein, die bis zu 7 d nach SD beschrieben wurde. Gleichzeitig wurde eine Veränderung der Phosphorylierung sowohl der p70S6-Kinase als auch von eIF2 α im Vergleich zu den sham-Gruppen beobachtet. Die Phosphorylierung der TIF wird als entscheidender Regulationsmechanismus angesehen. Da die in dieser Studie beobachteten Phosphorylierungsänderungen gegenläufige Effekte auf die Proteintranslation haben, könnte dies auf eine getrennte Regulation bestimmter Untergruppen von Proteinen hinweisen. Die tendenzielle Dephosphorylierung von eIF2 α im Zytosol weist auf ein mögliches Abklingen der Stressreaktion hin.

30 d nach SD liegt eine tendenziell gesteigerte Phosphorylierung von eIF2 α im Zytosol und eine tendenziell verminderte Konzentration der p70S6-Kinase in der Membranfraktion vor. Für diesen späten Zeitpunkt gibt es bisher keine Daten, die die Proteinsynthese nach SD beschreiben. Beide Mechanismen deuten auf eine Abnahme der globalen Proteinsynthese hin, eventuell im Rahmen der Rückführung auf das Normalniveau.

Über den gesamten Zeitverlauf wurde zu einzelnen Zeitpunkten eine tendenzielle Regulation der Expression und Phosphorylierung von eIF4E

5. Diskussion

beobachtet. Dabei scheint diesem TIF die Rolle einer Feinregulation zuzukommen, z. B. zur Steigerung der Translation bestimmter Proteine, die insbesondere Wachstum und Proliferation fördern (Koromilas et al. 1992, Sonenberg 1993, Plumier et al. 1997, Gingras et al. 1999, Graff und Zimmer 2003, Richter und Sonenberg 2005). Eine mit einer Abnahme der Translation einhergehende gesteigerte Phosphorylierung von eIF4E wurde bereits nach anderen Formen von Stress beobachtet (Morley und McKendrick 1997, Wang et al. 1998). Hierbei wird angenommen, dass die Phosphorylierung von eIF4E als Kompensationsmechanismus dient, um der globalen Hemmung der Translation für selektive Gene entgegenzuwirken (Gingras et al. 1999). Hinzu kommt, dass ein Teil der für die Stressantwort nach SD bedeutenden Proteine (z. B. Hitzeschockproteine) mittels IRES unabhängig von eIF4E translatiert werden können und somit deren Expression von einer Regulation dieses TIFs nicht beeinflusst wird.

Insgesamt weisen die in dieser Studie erhobenen Daten darauf hin, dass zumindest einige der bisher nach SD beobachteten Veränderungen der Proteinsynthese auf eine Regulation der TIF zurückzuführen sind. Auch mit der beobachteten Regulation der Proteinsynthese nach Ischämie gibt es Übereinstimmungen. Dies deutet darauf hin, dass SD an der Beeinflussung der Proteinsynthese nach globaler und fokaler Ischämie beteiligt sind.

Die in unserer Studie beobachteten Regulationen, welche zu den in früheren Studien gezeigten Veränderungen nach Ischämie passen, waren zum Teil jedoch nicht signifikant. Außerdem gab es Ergebnisse, die den bisherigen Erkenntnissen zu widersprechen scheinen. Hierbei muss beachtet werden, dass bei einer Ischämie neben den SD noch weitere Faktoren Einfluss auf die globale und spezifische Proteinsynthese haben. Dies ist insbesondere bei der Einbeziehung von infarziertem Gewebe in die Analyse zu berücksichtigen, welches bei den meisten früheren Studien der Fall war.

Unsere Studie liefert weiterhin Hinweise auf Zusammenhänge der Regulation der Proteinsynthese nach SD mit anderen pathophysiologischen Vorgängen. Im zeitlichen Verlauf konnte eine Regulation der TIF 3 h und

5. Diskussion

4 h nach SD gezeigt werden, die auf eine Hemmung der globalen Proteinsynthese hindeutet. Damit einhergehend wurden Hinweise für eine Förderung der Translation insbesondere von *stress response*- und *immediate-early*-Gene über eIF2 α und die p70-S6-Kinase gefunden. Diese Befunde passen zu einer Stressreaktion nach SD. 3 d nach SD wurden Hinweise auf eine TIF-vermittelte Steigerung der Proteinsynthese und demnach auf eine Erholung von der Stressreaktion beobachtet. Auch 7 d nach SD weist eine tendenzielle Abnahme der Phosphorylierung von eIF2 α auf ein Abklingen der Stressreaktion hin. 30 d nach SD scheinen nur geringe Regulationen der TIF darauf hinzuweisen, dass die Proteinsynthese wieder auf ein Normalniveau zurückgeführt wurde.

Auch wurden Hinweise auf mögliche Mechanismen für die durch SD vermittelte Ischämietoleranz gefunden. Eine signifikant erhöhte Expression der p70-S6-Kinase 4 und 8 h nach SD wurde ebenso beobachtet wie eine vermehrte Phosphorylierung von eIF2 α 8 h nach SD. Eine leicht erhöhte Expression und Phosphorylierung der p70S6-Kinase konnte auch zu den folgenden Zeitpunkten bis zu 7 d nach SD beobachtet werden, passend zur zeitlichen Begrenzung der Ischämietoleranz. Aus früheren Studien geht hervor, dass die Toleranz gegenüber einer nachfolgenden Ischämie nicht auf eine Reduktion des Energiemetabolismus zurückzuführen ist, sondern vielmehr mit einer Hochregulation trophischer Faktoren (und Gliazell-Aktivierung) assoziiert ist (Kawahara et al. 1999). Dem Hitzeschockprotein Hsp27 wird eine Rolle bei der durch SD induzierten Ischämietoleranz zugewiesen (Plumier et al. 1997). In früheren Studien wurde eine Steigerung der Expression von Hsp27 gezeigt (Plumier1997,Urbach2006). Auch die in unserer Studie beobachtete vermehrte Phosphorylierung von eIF2 α kann zu einer Steigerung der Expression von *stress response*-Genen führen.

Die Narkose und die Operation sowie deren Auswirkungen haben ebenfalls einen Einfluss auf die Regulation der TIF. Dies zeigen die in den beiden Tiergruppen gefundenen Koregulationen (s. Kapitel 5.2.4).

6. Fazit und Ausblick

Mit den Ergebnissen dieser Studie leisten wir einen Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie der SD und ihrer Bedeutung bei der Regulation der Proteinsynthese nach Ischämie. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression und Phosphorylierung von TIF nach SD auf vielfältige Weise reguliert wird. Unsere Analyse dreier essentieller TIF deuten darauf hin, dass SD kausal an den Änderungen der Proteinsynthese nach fokaler und globaler Ischämie beteiligt sein könnten. Daneben konnten wichtige Hinweise auf mögliche Pathomechanismen identifiziert werden, die die Stressreaktion nach SD näher charakterisieren. Desweiteren konnten zeitliche Zusammenhänge zwischen der Regulation der globalen und spezifischen Proteinsynthese durch TIF und der Ischämietoleranz nach SD aufgezeigt werden. Diese könnten Hinweise auf die Beteiligung spezifischer Proteine und deren Regulationswege bei der Vermittlung der Ischämietoleranz geben.

Veränderungen der Proteinsynthese ergeben sich meist nicht aus der Aktivität eines einzelnen TIF, sondern vielmehr aus simultaner Aktivierung oder Hemmung mehrerer Faktoren (Kleijn et al. 1998). Die Translation wird über Expression und Phosphorylierung der TIF über eine komplexe Regulationsmaschinerie beeinflusst und Steigerung sowie Hemmung der Proteinsynthese ergeben sich aus der Summation aller Einflüsse. So existieren neben der in dieser Studie untersuchten Phosphorylierung noch weitere Mechanismen, die die Aktivität der TIF regulieren. Ein Beispiel ist die Regulation von eIF4E durch sogenannte eIF4E-bindende-Proteine und deren Phosphorylierung (Feigenblum und Schneider 1996, Sonenberg und Gingras 1998, Gingras et al. 1999, Raught und Gingras 1999, Sonenberg

6. Fazit und Ausblick

2008), die in kommenden Studien ebenfalls betrachtet werden sollten.

Dabei scheint es eine gewisse Redundanz bei der Regulierung der TIF zu geben. Ob diese eher als Sicherungsmechanismus zu sehen ist, oder alle Faktoren eine unterschiedliche Rolle spielen, ist noch nicht endgültig geklärt (Raught und Gingras 1999). Bezüglich der einzelnen TIF und ihrer Phosphorylierung werden weitere Erkenntnisse benötigt, um die Effekte auf die globale Proteinsynthese oder auf eine Translation spezifischer mRNAs besser zu verstehen (Sonenberg 1993, Gingras et al. 1999). So sind die in dieser Studie gefundenen tendenziellen Regulationen von eIF4E am ehesten als ein Mechanismus zur Feinjustierung der Proteinsynthese zu sehen.

Um diese Zusammenhänge genauer zu untersuchen, sind weitere Studien vonnöten, in denen neben der Regulation der TIF gleichzeitig eine Analyse sowohl der globalen als auch der spezifischen Synthese einzelner Proteine erfolgen sollte. Des Weiteren sollte auch die möglicherweise unterschiedliche Beeinflussung der Translation bestimmter Proteine durch eIF4E und die p70S6-Kinase berücksichtigt werden. Um relevante Unterschiede beobachten zu können, sollten die Analysen mit den nicht gepoolten Einzelproben wiederholt werden. Einen Ansatzpunkt bieten hier die Zeitpunkte, zu denen in dieser Studie eine deutliche Regulation der TIF gezeigt werden konnte. Des Weiteren wäre ein *Baseline*-Wert der TIF Expression und deren Einfluss auf die Proteinsynthese im nativen Tier aufschlussreich, um die Koregulation in SD und scheinoperierten Tieren besser deuten zu können.

Untersuchungen der TIF und der Mechanismen, die bei der Regulation der Proteinsynthese eine Rolle spielen, können zur Aufklärung der Pathophysiologie der gehirnschädigen Auswirkungen der SD beitragen. Kenntnisse über die durch SD beeinflussten Mechanismen könnten letztendlich Ansatzstellen zur Verhinderung von Schäden bei Pathologien mit SD liefern. In der vorliegenden Studie wurde hierfür ein Grundstein gelegt, indem wesentliche Zeitpunkte und Mechanismen der Regulation der Proteinsynthese im zeitlichen Verlauf über 30 d nach SD aufgezeigt wurden.

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Hypothese zur Entwicklung einer Migräneattacke	10
1.2.	Schema der Translationsinitiation	19
3.1.	DC-Potential und Elektrokortikogramm	28
3.2.	Kortexpräparation	29
4.1.	Western Blot eIF2 α und eIF2 α -P _{Ser51}	36
4.2.	Expression von eIF2 α	37
4.3.	An Ser51 phosphoryliertes eIF2 α	37
4.4.	Western Blot eIF4E und eIF4E-P _{Ser209}	38
4.5.	Expression von eIF4E	39
4.6.	An Ser209 phosphoryliertes eIF4E	39
4.7.	Western Blot p70S6-Kinase und p70S6-Kinase-P _{Thr389}	41
4.8.	Expression der p70S6-Kinase	42
4.9.	An Thr389 phosphorylierte p70S6-Kinase	42

Tabellenverzeichnis

3.1. Antikörper zur Proteindetektion	32
B.1. Antikörper mit Details zur Bestellung	88
B.2. eIF2 α im Zytosol	89
B.3. eIF2 α in der Membranfraktion	90
B.4. eIF2 α -P _{Ser51} im Zytosol	91
B.5. eIF2 α -P _{Ser51} in der Membranfraktion	92
B.6. eIF4E im Zytosol	93
B.7. eIF4E in der Membranfraktion	94
B.8. eIF4E-P _{Ser209} im Zytosol	95
B.9. p70S6-Kinase im Zytosol	96
B.10. p70S6-Kinase in der Membranfraktion	97
B.11. p70S6-Kinase-P _{Thr389} im Zytosol	98
B.12. p70S6-Kinase-P _{Thr389} in der Membranfraktion	99

Literaturverzeichnis

- Althausen S, Mengesdorf T, Mies G, Oláh L, Nairn AC, Proud CG, Paschen W. 2001. Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2 α , elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice. *J Neurochem*, 78(4):779–787.
- Back T, Kohno K, Hossmann KA. 1994. Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *J Cereb Blood Flow Metab*, 14(1):12–19.
- Basser LS. 1969. The relation of migraine and epilepsy. *Brain*, 92(2):285–300.
- B'chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A. 2013. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res*, 41(16):7683–7699.
- Berger M, Speckmann EJ, Pape HC, Gorji A. 2008. Spreading depression enhances human neocortical excitability in vitro. *Cephalalgia*, 28(5):558–562.
- Bonneau AM, Sonenberg N. 1987. Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J Biol Chem*, 262(23):11134–11139.
- Bonnekoh P, Kuroiwa T, Oschlies U, Hossmann KA. 1992. Barbiturate promotes post-ischemic reaggregation of polyribosomes in gerbil hippocampus. *Neurosci Lett*, 146(1):75–78.
- Bowyer SM, Aurora KS, Moran JE, Tepley N, Welch KM. 2001. Magnetoencephalographic fields from patients with spontaneous and induced migraine aura. *Ann Neurol*, 50(5):582–587.

Literaturverzeichnis

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254.
- Buckley B, Ehrenfeld E. 1987. The cap-binding protein complex in uninfected and poliovirus-infected HeLa cells. *J Biol Chem*, 262(28):13599–13606.
- Burda J, Martín ME, García A, Alcázar A, Fando JL, Salinas M. 1994. Phosphorylation of the alpha subunit of initiation factor 2 correlates with the inhibition of translation following transient cerebral ischaemia in the rat. *Biochem J*, 302 (Pt 2):335–338.
- Burda J, Martín ME, Gottlieb M, Chavko M, Marsala J, Alcázar A, Pavón M, Fando JL, Salinas M. 1998. The intraischemic and early reperfusion changes of protein synthesis in the rat brain. eIF-2 alpha kinase activity and role of initiation factors eIF-2 alpha and eIF-4E. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18(1):59–66.
- Bureš J, Burešová O, Křivánek J. 1974. The mechanism and application of Leao's spreading depression of electroencephalographic activity. New York: Academic Press.
- Bushell M, Wood W, Clemens MJ, Morley SJ. 2000. Changes in integrity and association of eukaryotic protein synthesis initiation factors during apoptosis. *Eur J Biochem*, 267(4):1083–1091.
- Cao Y, Welch KM, Aurora S, Vikingstad EM. 1999. Functional MRI-BOLD of visually triggered headache in patients with migraine. *Arch Neurol*, 56(5):548–554.
- Charles A, Brennan K. 2009. Cortical spreading depression-new insights and persistent questions. *Cephalalgia*, 29(10):1115–1124.
- Christensen T, Balchen T, Bruhn T, Diemer NH. 1999. Double-tracer autoradiographic study of protein synthesis and glucose consumption in rats with focal cerebral ischemia. *Neurol Res*, 21(7):687–694.
- Clemens MJ, Bushell M, Jeffrey IW, Pain VM, Morley SJ. 2000. Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death Differ*, 7(7):603–615.

- Cooper GM, Hausman RE. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. Zweite Aufl. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Cooper HK, Zalewska T, Kawakami S, Hossmann KA, Kleihues P. 1977. The effect of ischaemia and recirculation on protein synthesis in the rat brain. *J Neurochem*, 28(5):929–934.
- Cutrer F. 2009. New information in our evolving understanding of migraine aura and cortical spreading depression. *Cephalalgia*, 29(10):1129–1131.
- Davis H. 1984. Introductory words. In: *Current views on Leão's spreading depression*. *An Acad Bras Cienc*, 56(4):369–531.
- de Haro C, Méndez R, Santoyo J. 1996. The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J*, 10(12):1378–1387.
- DeGracia DJ, Neumar RW, White BC, Krause GS. 1996. Global brain ischemia and reperfusion: modifications in eukaryotic initiation factors associated with inhibition of translation initiation. *J Neurochem*, 67(5):2005–2012.
- DeGracia DJ, Sullivan JM, Neumar RW, Alousi SS, Hikade KR, Pittman JE, White BC, Rafols JA, Krause GS. 1997. Effect of brain ischemia and reperfusion on the localization of phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 alpha. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17(12):1291–1302.
- Dietrich WD, Feng ZC, Leistra H, Watson BD, Rosenthal M. 1994. Photothrombotic infarction triggers multiple episodes of cortical spreading depression in distant brain regions. *J Cereb Blood Flow Metab*, 14(1):20–28.
- Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, Bosche B, Reithmeier T, Ernestus RI, Brinker G, Dreier JP, Woitzik J, Strong AJ, Graf R, COSoBID. 2008. Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol*, 63(6):720–728.
- Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. 2006. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*, 314(5798):467–471.

- Dreier JP. 2011. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med*, 17(4):439–447.
- Dreier JP, Major S, Manning A, Woitzik J, Drenckhahn C, Steinbrink J, Tolias C, Oliveira-Ferreira AI, Fabricius M, Hartings JA, Vajkoczy P, Lauritzen M, Dirnagl U, Bohner G, Strong AJ, COSBIDsg. 2009. Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Brain*, 132(Pt 7):1866–1881.
- Dreier JP, Major S, Pannek HW, Woitzik J, Scheel M, Wiesenthal D, Martus P, Winkler MKL, Hartings JA, Fabricius M, Speckmann EJ, Gorji A, COSBIDsg. 2012. Spreading convulsions, spreading depolarization and epileptogenesis in human cerebral cortex. *Brain*, 135(Pt 1):259–275.
- Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, Bhatia R, Major S, Drenckhahn C, Lehmann TN, Sarrafzadeh A, Willumsen L, Hartings JA, Sakowitz OW, Seemann JH, Thieme A, Lauritzen M, Strong AJ. 2006. Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain*, 129(Pt 12):3224–3237.
- Duncan R, Milburn SC, Hershey JW. 1987. Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J Biol Chem*, 262(1):380–388.
- Duncan RF. 1996. Translational Control during Heat Shock. In: Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N, Hrsg. *Translational Control*, Bd 30. Erste Aufl, Kap 9. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 271–293.
- Dunlop DS, van Elden W, Lajtha A. 1975. A method for measuring brain protein synthesis rates in young and adult rats. *J Neurochem*, 24(2):337–344.
- Fabricius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ, Lauritzen M. 2006. Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain*, 129(Pt 3):778–790.

- Fabricius M, Fuhr S, Willumsen L, Dreier JP, Bhatia R, Boutelle MG, Hartings JA, Bullock R, Strong AJ, Lauritzen M. 2008. Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. *Clin Neurophysiol*, 119(9):1973–1984.
- Farkas E, Bari F, Obrenovitch TP. 2010. Multi-modal imaging of anoxic depolarization and hemodynamic changes induced by cardiac arrest in the rat cerebral cortex. *Neuroimage*, 51(2):734–742.
- Feigenblum D, Schneider RJ. 1993. Modification of eukaryotic initiation factor 4F during infection by influenza virus. *J Virol*, 67(6):3027–3035.
- Feigenblum D, Schneider RJ. 1996. Cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) and 4E-inactivating protein BP-1 independently regulate cap-dependent translation. *Mol Cell Biol*, 16(10):5450–5457.
- Florence G, Dahlem MA, Almeida ACG, Bassani JWM, Kurths J. 2009. The role of extracellular potassium dynamics in the different stages of ictal bursting and spreading depression: a computational study. *J Theor Biol*, 258(2):219–228.
- Fumagalli S, Thomas G. 2000. S6 Phosphorylation and Signal Transduction. In: Sonenberg N, Hershey JW, Mathews MB, Hrsg. *Translational Control of Gene Expression*, Bd 39. Zweite Aufl, Kap 23. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 695–717.
- Gale M Jr, Tan SL, Katze MG. 2000. Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(2):239–280.
- Gardner-Medwin AR. 1981. Possible roles of vertebrate neuroglia in potassium dynamics, spreading depression and migraine. *J Exp Biol*, 95:111–127.
- Garlick PJ, McNurlan MA, Essén P, Wernerman J. 1994. Measurement of tissue protein synthesis rates in vivo: a critical analysis of contrasting methods. *Am J Physiol*, 266(3 Pt 1):E287–E297.
- Gault LM, Lin CW, LaManna JC, Lust WD. 1994. Changes in energy metabolites, cGMP and intracellular pH during cortical spreading depression. *Brain Res*, 641(1):176–180.

Literaturverzeichnis

- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*, 68:913–963.
- Gjedde A, Hansen AJ, Quistorff B. 1981. Blood-brain glucose transfer in spreading depression. *J Neurochem*, 37(4):807–812.
- Gorji A. 2001. Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Res Brain Res Rev*, 38(1-2):33–60.
- Gorji A, Speckmann EJ. 2004. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. *Eur J Neurosci*, 19(12):3371–3374.
- Graff JR, Zimmer SG. 2003. Translational control and metastatic progression: enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs. *Clin Exp Metastasis*, 20(3):265–273.
- Grafstein B. 1956. Mechanism of spreading cortical depression. *Journal of Neurophysiology*, 19(2):154–71.
- Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, Kwong KK, Cutrer FM, Rosen BR, Tootell RB, Sorensen AG, Moskowitz MA. 2001. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8):4687–4692.
- Hansen AJ, Olsen CE. 1980. Brain extracellular space during spreading depression and ischemia. *Acta Physiol Scand*, 108(4):355–365.
- Hartings JA, Bullock MR, Okonkwo DO, Murray LS, Murray GD, Fabricius M, Maas AI, Woitzik J, Sakowitz O, Mathern B, Roozenbeek B, Lingsma H, Dreier JP, Puccio AM, Shutter LA, Pahl C, Strong AJ, COSoBID. 2011a. Spreading depolarisations and outcome after traumatic brain injury: a prospective observational study. *Lancet Neurol*, 10(12):1058–1064.
- Hartings JA, Rolli ML, Lu XCM, Tortella FC. 2003. Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection. *J Neurosci*, 23(37):11602–11610.

- Hartings JA, Tortella FC, Rolli ML. 2006. AC electrocorticographic correlates of peri-infarct depolarizations during transient focal ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(5):696–707.
- Hartings JA, Watanabe T, Bullock MR, Okonkwo DO, Fabricius M, Woitzik J, Dreier JP, Puccio A, Shutter LA, Pahl C, Strong AJ, COSO-BID. 2011b. Spreading depolarizations have prolonged direct current shifts and are associated with poor outcome in brain trauma. *Brain*, 134(Pt 5):1529–1540.
- Hellen CU, Sarnow P. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev*, 15(13):1593–1612.
- Herrera DG, Maysinger D, Almazan G, Funnel R, Cuello AC. 1998. Analysis of c-Fos and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression following topical application of potassium chloride (KCl) to the brain surface. *Brain Res*, 784(1-2):71–81.
- Hershey JW. 1990. Overview: phosphorylation and translation control. *Enzyme*, 44(1-4):17–27.
- Hershey JWB, Merrick WC. 2000. The Pathway and Mechanism of Initiation of Protein Synthesis. In: Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, Hrsg. *Translational Control of Gene Expression*. Zweite Aufl, Kap 2. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 33–88.
- Hiremath LS, Webb NR, Rhoads RE. 1985. Immunological detection of the messenger RNA cap-binding protein. *J Biol Chem*, 260(13):7843–7849.
- Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. 2005. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, 123(4):569–580.
- Hossmann KA. 1994. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*, 36(4):557–565.
- Hossmann KA. 1996. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 8(3):195–208.

Literaturverzeichnis

- Huang JT, Schneider RJ. 1991. Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein. *Cell*, 65(2):271–280.
- Jagus R, Joshi B, Barber GN. 1999. PKR, apoptosis and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(1):123–138.
- Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. 1997. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J*, 16(12):3693–3704.
- Kaspar RL, Rychlik W, White MW, Rhoads RE, Morris DR. 1990. Simultaneous cytoplasmic redistribution of ribosomal protein L32 mRNA and phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E after mitogenic stimulation of Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*, 265(7):3619–3622.
- Kawahara N, Ruetzler CA, Klatzo I. 1995. Protective effect of spreading depression against neuronal damage following cardiac arrest cerebral ischaemia. *Neurol Res*, 17(1):9–16.
- Kawahara N, Ruetzler CA, Mies G, Klatzo I. 1999. Cortical spreading depression increases protein synthesis and upregulates basic fibroblast growth factor. *Exp Neurol*, 158(1):27–36.
- Kimball SR. 1999. Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(1):25–29.
- Kleijn M, Scheper GC, Voorma HO, Thomas AA. 1998. Regulation of translation initiation factors by signal transduction. *Eur J Biochem*, 253(3):531–544.
- Kobayashi S, Harris VA, Welsh FA. 1995. Spreading depression induces tolerance of cortical neurons to ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15(5):721–727.
- Koromilas AE, Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N. 1992. mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *EMBO J*, 11(11):4153–4158.
- Kraig RP, Dong LM, Thisted R, Jaeger CB. 1991. Spreading depression increases immunohistochemical staining of glial fibrillary acidic protein. *J Neurosci*, 11(7):2187–2198.

- Krause GS, Tiffany BR. 1993. Suppression of protein synthesis in the reperfused brain. *Stroke*, 24(5):747–55; discussion 755–6.
- Kunkler PE, Hulse RE, Kraig RP. 2004. Multiplexed cytokine protein expression profiles from spreading depression in hippocampal organotypic cultures. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24(8):829–839.
- Křivánek J. 1958. Changes of brain glycogen in the spreading EEG-depression of Leao. *J Neurochem*, 2(4):337–343.
- Křivánek J. 1970. Effects of spreading cortical depression on the incorporation of [14C]leucine into proteins of rat brain. *J Neurochem*, 17(4):531–538.
- LaManna JC, Rosenthal M. 1975. Effect of ouabain and phenobarbital on oxidative metabolic activity associated with spreading cortical depression in cats. *Brain Res*, 88(1):145–149.
- Lashley KS. 1941. Patterns of cerebral integration indicated by the scotomas of migraine. *Arch Neurol Psychiatry*, 46(2):331–339.
- Lauritzen M. 1984. Long-lasting reduction of cortical blood flow of the brain after spreading depression with preserved autoregulation and impaired CO₂ response. *J Cereb Blood Flow Metab*, 4(4):546–554.
- Lauritzen M. 1987. Cortical spreading depression as a putative migraine mechanism. *Trends in Neurosciences*, 10(1):8–13.
- Lauritzen M. 1992. Spreading depression and migraine. *Pathol Biol (Paris)*, 40(4):332–337.
- Lauritzen M. 1994. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain*, 117 (Pt 1):199–210.
- Lauritzen M. 2001. Cortical spreading depression in migraine. *Cephalalgia*, 21(7):757–760.
- Lauritzen M, Dreier JP, Fabricius M, Hartings JA, Graf R, Strong AJ. 2011. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(1):17–35.

Literaturverzeichnis

- Lauritzen M, Jørgensen MB, Diemer NH, Gjedde A, Hansen AJ. 1982. Persistent oligemia of rat cerebral cortex in the wake of spreading depression. *Ann Neurol*, 12(5):469–474.
- Lejbkowitz F, Goyer C, Darveau A, Neron S, Lemieux R, Sonenberg N. 1992. A fraction of the mRNA 5' cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(20):9612–9616.
- Leão AA. 1986. Spreading depression. *Funct Neurol*, 1(4):363–366.
- Leão AAP. 1944. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*, 7(6):359–390.
- Leão AAP. 1947. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol*, 10(6):409–414.
- Leão AAP, Morison RS. 1945. Propagation of Spreading Cortical Depression. *J Neurophysiol*, 8(1):33–45.
- Lian XY, Stringer JL. 2004. Astrocytes contribute to regulation of extracellular calcium and potassium in the rat cerebral cortex during spreading depression. *Brain Res*, 1012(1-2):177–184.
- Martins-Ferreira H, Nedergaard M, Nicholson C. 2000. Perspectives on spreading depression. *Brain Res Brain Res Rev*, 32(1):215–234.
- Martins-Ferreira H, Ribeiro LJ. 1995. Biphasic effects of gap junctional uncoupling agents on the propagation of retinal spreading depression. *Braz J Med Biol Res*, 28(9):991–994.
- Martín de la Vega C, Burda J, Nemethova M, Quevedo C, Alcázar A, Martín ME, Danielisova V, Fando JL, Salinas M. 2001. Possible mechanisms involved in the down-regulation of translation during transient global ischaemia in the rat brain. *Biochem J*, 357(Pt 3):819–826.
- Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JW. 1996. Origins and Targets of Translational Control. In: Hershey JW, Mathews MB, Sonenberg N, Hrsg. *Translational Control*. Erste Aufl, Kap 1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1–29.
- Matsushima K, Hogan MJ, Hakim AM. 1996. Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16(2):221–226.

- Mayevsky A, Doron A, Manor T, Meilin S, Zarchin N, Ouaknine GE. 1996. Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Res*, 740(1-2):268–274.
- Mayevsky A, Weiss HR. 1991. Cerebral blood flow and oxygen consumption in cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*, 11(5):829–836.
- McKendrick L, Morley SJ, Pain VM, Jagus R, Joshi B. 2001. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) at Ser209 is not required for protein synthesis in vitro and in vivo. *Eur J Biochem*, 268(20):5375–5385.
- Mengesdorf T, Proud CG, Mies G, Paschen W. 2002. Mechanisms underlying suppression of protein synthesis induced by transient focal cerebral ischemia in mouse brain. *Exp Neurol*, 177(2):538–546.
- Mies G. 1993. Inhibition of protein synthesis during repetitive cortical spreading depression. *J Neurochem*, 60(1):360–363.
- Mies G, Iijima T, Hossmann KA. 1993. Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport*, 4(6):709–711.
- Mies G, Paschen W. 1984. Regional changes of blood flow, glucose, and ATP content determined on brain sections during a single passage of spreading depression in rat brain cortex. *Exp Neurol*, 84(2):249–258.
- Miettinen S, Fusco FR, Yrjänheikki J, Keinänen R, Hirvonen T, Roivainen R, Närhi M, Hökfelt T, Koistinaho J. 1997. Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptors and phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(12):6500–6505.
- Milner PM. 1958. Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leão. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 10(4):705.
- Minich WB, Balasta ML, Goss DJ, Rhoads RE. 1994. Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(16):7668–7672.

Literaturverzeichnis

- Morley SJ, Curtis PS, Pain VM. 1997. eIF4G: translation's mystery factor begins to yield its secrets. *RNA*, 3(10):1085–1104.
- Morley SJ, McKendrick L. 1997. Involvement of stress-activated protein kinase and p38/RK mitogen-activated protein kinase signaling pathways in the enhanced phosphorylation of initiation factor 4E in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem*, 272(28):17887–17893.
- Mutch WA, Hansen AJ. 1984. Extracellular pH changes during spreading depression and cerebral ischemia: mechanisms of brain pH regulation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 4(1):17–27.
- Nedergaard M, Astrup J. 1986. Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and [14C]2-deoxyglucose phosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 6(5):607–615.
- Nedergaard M, Cooper AJ, Goldman SA. 1995. Gap junctions are required for the propagation of spreading depression. *J Neurobiol*, 28(4):433–444.
- Nedergaard M, Hansen AJ. 1993. Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13(4):568–574.
- Neumann-Haefelin T, Bosse F, Redecker C, Müller HW, Witte OW. 1999. Upregulation of GABAA-receptor alpha1- and alpha2-subunit mRNAs following ischemic cortical lesions in rats. *Brain Res*, 816(1):234–237.
- Neumann-Haefelin T, Staiger JF, Redecker C, Zilles K, Fritschy JM, Möhler H, Witte OW. 1998. Immunohistochemical evidence for dysregulation of the GABAergic system ipsilateral to photochemically induced cortical infarcts in rats. *Neuroscience*, 87(4):871–879.
- Otori T, Greenberg JH, Welsh FA. 2003. Cortical spreading depression causes a long-lasting decrease in cerebral blood flow and induces tolerance to permanent focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(1):43–50.
- Parisi P. 2009. Why is migraine rarely, and not usually, the sole ictal epileptic manifestation? *Seizure*, 18(5):309–312.

- Parisi P, Piccioli M, Villa MP, Buttinelli C, Kasteleijn-Nolst Trenité DGA. 2008. Hypothesis on neurophysiopathological mechanisms linking epilepsy and headache. *Med Hypotheses*, 70(6):1150–1154.
- Piper RD, Lambert GA, Duckworth JW. 1991. Cortical blood flow changes during spreading depression in cats. *Am J Physiol*, 261(1 Pt 2):H96–102.
- Plumier JC, David JC, Robertson HA, Currie RW. 1997. Cortical application of potassium chloride induces the low-molecular weight heat shock protein (Hsp27) in astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17(7):781–790.
- Proud CG. 1996. p70 S6 kinase: an enigma with variations. *Trends Biochem Sci*, 21(5):181–185.
- Proud CG. 2005. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol*, 16(1):3–12.
- Pullen N, Thomas G. 1997. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett*, 410(1):78–82.
- Rau M, Ohlmann T, Morley SJ, Pain VM. 1996. A reevaluation of the cap-binding protein, eIF4E, as a rate-limiting factor for initiation of translation in reticulocyte lysate. *J Biol Chem*, 271(15):8983–8990.
- Raught B, Gingras AC. 1999. eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(1):43–57.
- Redpath NT, Proud CG. 1994. Molecular mechanisms in the control of translation by hormones and growth factors. *Biochim Biophys Acta*, 1220(2):147–162.
- Rennie MJ, Smith K, Watt PW. 1994. Measurement of human tissue protein synthesis: an optimal approach. *Am J Physiol*, 266(3 Pt 1):E298–E307.
- Richter JD, Sonenberg N. 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, 433(7025):477–480.
- Ron D, Harding H. 2007. eIF2 α Phosphorylation in Cellular Stress Responses and Disease. In: Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JW, Hrsg. *Translational Control in Biology and Medicine*. Erste Aufl,

- Kap 13. 48. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 345–368.
- Ron D, Harding HP. 2000. PERK and Translational Control by Stress in the Endoplasmic Reticulum. In: Sonenberg N, Hershey JW, Mathews MB, Hrsg. *Translational Control of Gene Expression*, Bd 39. Zweite Aufl, Kap 15. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 547–560.
- Röther J. 2000. „Spreading depression“ und Periinfarktdepolarisationen Relevante Pathomechanismen bei Migräne und Schlaganfall? *Nervenarzt*, 71(2):84–90.
- Satoh S, Hijikata M, Handa H, Shimotohno K. 1999. Caspase-mediated cleavage of eukaryotic translation initiation factor subunit 2alpha. *Biochem J*, 342 (Pt 1):65–70.
- Scheper GC, Proud CG. 2002. Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur J Biochem*, 269(22):5350–5359.
- Scheper GC, van Kollenburg B, Hu J, Luo Y, Goss DJ, Proud CG. 2002. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *J Biol Chem*, 277(5):3303–3309.
- Schneider RJ. 2000. Translational Control during Heat Shock. In: Sonenberg N, Hershey JW, Mathews MB, Hrsg. *Translational Control of Gene Expression*, Bd 39. Zweite Aufl, Kap 17. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 581–593.
- Sheikh MS, Fornace A Jr. 1999. Regulation of translation initiation following stress. *Oncogene*, 18(45):6121–6128.
- Smith DC, Azam F. 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using 3H-leucine. *Mar Microb Food Webs*, 6(2):107–114.
- Somjen GG. 2001. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev*, 81(3):1065–1096.
- Somjen GG. 2004. *Ions in the Brain Normal Function, Seizures, and Stroke*. New York: Oxford University Press.

Literaturverzeichnis

- Sonenberg N. 1993. Translation factors as effectors of cell growth and tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 5(6):955–960.
- Sonenberg N. 1996. mRNA 5' CAP-binding Protein eIF4E and Control of Cell Growth. In: Hershey JW, Mathews MB, Sonenberg N, Hrsg. *Translational Control*. Erste Aufl, Kap 8. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 245–269.
- Sonenberg N. 2008. eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochem Cell Biol*, 86(2):178–183.
- Sonenberg N, Dever TE. 2003. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol*, 13(1):56–63.
- Sonenberg N, Gingras AC. 1998. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol*, 10(2):268–275.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG. 2007. New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol Cell*, 28(5):721–729.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4):731–745.
- Strong AJ, Fabricius M, Boutelle MG, Hibbins SJ, Hopwood SE, Jones R, Parkin MC, Lauritzen M. 2002. Spreading and synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain. *Stroke*, 33(12):2738–2743.
- Taga K, Patel PM, Drummond JC, Cole DJ, Kelly PJ. 1997. Transient neuronal depolarization induces tolerance to subsequent forebrain ischemia in rats. *Anesthesiology*, 87(4):918–925.
- Takano K, Latour LL, Formato JE, Carano RA, Helmer KG, Hasegawa Y, Sotak CH, Fisher M. 1996. The role of spreading depression in focal ischemia evaluated by diffusion mapping. *Ann Neurol*, 39(3):308–318.
- Teive HAG, Kowacs PA, Maranhão Filho P, Piovesan EJ, Werneck LC. 2005. Leão's cortical spreading depression: from experimental „artifact“ to physiological principle. *Neurology*, 65(9):1455–1459.
- Tfelt-Hansen PC. 2010. History of migraine with aura and cortical spreading depression from 1941 and onwards. *Cephalalgia*, 30(7):780–792.

- Thilmann R, Xie Y, Kleihues P, Kiessling M. 1986. Persistent inhibition of protein synthesis precedes delayed neuronal death in postischemic gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol*, 71(1-2):88–93.
- Urbach A. 2006. Funktionelle Langzeiteffekte kortikaler Spreading Depressions [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Urbach A, Bruehl C, Witte OW. 2006. Microarray-based long-term detection of genes differentially expressed after cortical spreading depression. *Eur J Neurosci*, 24(3):841–856.
- Van den Maagdenberg AMJM, Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S, Broos LAM, Cesetti T, van de Ven RCG, Tottene A, van der Kaa J, Plomp JJ, Frants RR, Ferrari MD. 2004. A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron*, 41(5):701–710.
- Van Harreveld A. 1959. Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. *J Neurochem*, 3(4):300–315.
- Van Harreveld A, Fifková E. 1970. Glutamate release from the retina during spreading depression. *J Neurobiol*, 2(1):13–29.
- Van Harreveld A, Khattab FI. 1967. Changes in cortical extracellular space during spreading depression investigated with the electron microscope. *J Neurophysiol*, 30(4):911–929.
- Van Harreveld A, Stamm JS. 1953. Spreading cortical convulsions and depressions. *J Neurophysiol*, 16(4):352–366.
- Verrotti A, Striano P, Belcastro V, Matricardi S, Villa MP, Parisi P. 2011. Migralepsy and related conditions: advances in pathophysiology and classification. *Seizure*, 20(4):271–275.
- Wang X, Flynn A, Waskiewicz AJ, Webb BL, Vries RG, Baines IA, Cooper JA, Proud CG. 1998. The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. *J Biol Chem*, 273(16):9373–9377.

Literaturverzeichnis

- Weih M, Prass K, Ruscher K, Trendelenburg G, Dirnagl U, Riepe MW, Meisel A. 2001. [Ischemia tolerance; model for research, hope for clinical practice?]. *Nervenarzt*, 72(4):255–260.
- Weng QP, Kozlowski M, Belham C, Zhang A, Comb MJ, Avruch J. 1998. Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies. *J Biol Chem*, 273(26):16621–16629.
- Wong WL, Brostrom MA, Brostrom CO. 1991. Effects of Ca²⁺ and ionophore A23187 on protein synthesis in intact rabbit reticulocytes. *Int J Biochem*, 23(5-6):605–608.
- Yanamoto H, Hashimoto N, Nagata I, Kikuchi H. 1998. Infarct tolerance against temporary focal ischemia following spreading depression in rat brain. *Brain Res*, 784(1-2):239–249.
- Yanamoto H, Xue JH, Miyamoto S, Nagata I, Nakano Y, Murao K, Kikuchi H. 2004. Spreading depression induces long-lasting brain protection against infarcted lesion development via BDNF gene-dependent mechanism. *Brain Res*, 1019(1-2):178–188.
- Yang HS, Jansen AP, Komar AA, Zheng X, Merrick WC, Costes S, Lockett SJ, Sonenberg N, Colburn NH. 2003. The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol Cell Biol*, 23(1):26–37.
- Zapata JM, Maroto FG, Sierra JM. 1991. Inactivation of mRNA cap-binding protein complex in *Drosophila melanogaster* embryos under heat shock. *J Biol Chem*, 266(24):16007–16014.
- Zuberek J, Wyslouch-Cieszynska A, Niedzwiecka A, Dadlez M, Stepinski J, Augustyniak W, Gingras AC, Zhang Z, Burley SK, Sonenberg N, Stolarski R, Darzynkiewicz E. 2003. Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA 5' cap analogs by electrostatic repulsion: intein-mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein. *RNA*, 9(1):52–61.

A. Chemikalien und Lösungen

Operation und SD-Induktion

aCSF-Stock

3,5064 g	NaCl	Roth
147,0 mg	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Merck
186,5 mg	KCl	Merck
183,0 mg	MgCl ₂ · 2 H ₂ O	Merck
1,5118 g	HEPES	Sigma
86,20 mg	NaH ₂ PO ₄	Merck

in 470 ml H₂O_{dest} lösen, pH mit NaOH auf 7,4 einstellen, auf 490 ml auffüllen, sterilfiltrieren.

500 mM Glukose

360,4 mg	D-Glukose	Merck
4 ml	H ₂ O _{dest}	

aCSF

9,8 ml	aCSF-Stock
200 µl	500 mM Glukose

1 M KCl

7,455 g	KCl	Merck
100 ml	H ₂ O _{dest}	

1 M NaCl

5,844 g	NaCl	Roth
100 ml	H ₂ O _{dest}	

Lyse

TBS für Lysepuffer

0,242 g	Tris-Base	Sigma
0,800 g	NaCl	Roth

in 80 ml DNase/RNase freiem H₂O (Gibco) lösen, auf 100 ml auffüllen.

A. Chemikalien und Lösungen

0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

93,06 g EDTA Merck (Titriplex III)

in 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ lösen und mit ca. 10 g NaOH auf pH 8,0 einstellen.

200 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

1,00 g PMSF Sigma

28,7 ml 100 % Isopropanol Roth

zu je 250 μl aliquotiert bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

1 mg/ml Leupeptin

5 mg Leupeptin Sigma

5 ml Ethanol absolut Roth

zu je 100 μl aliquotiert bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

1 mg/ml Pepstatin A

5 mg Pepstatin A Sigma

5 ml Methanol:Essigsäure (9:1) Roth

zu je 100 μl aliquotiert bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

200 mM Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)

368 mg Na_3VO_4 Aldrich

10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

mit NaOH oder HCl pH 10 einstellen, Lösung wird gelblich. 10 min kochen, bis die Lösung farblos wird. Auf Raumtemperatur abkühlen lassen und erneut pH 10 einstellen und wieder kochen, bis der pH nach dem Kochen konstant bleibt. Zu je 100 μl aliquotiert bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

10 % Triton-X

1 ml Triton-X-100 Sigma

9 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

10 % Natrium-Desoxycholat (DOC)

5 g DOC Sigma

in 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gelöst und lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Lysepuffer wurden in der benötigten Menge jeweils kurz vor Verwendung angesetzt. Es folgt das Rezept für 11 ml Lysepuffer I und 2,2 ml Lysepuffer II. Diese Mengen wurden für die Lyse von 10 Hemisphären (1 Hemisphäre entspricht ca. 250–300 mg Kortexgewebe) verwendet.

A. Chemikalien und Lösungen

Lysepuffer-Stock

1,32 ml	TBS für Lysepuffer	
26,4 μ l	0,5 M EDTA	
66,0 μ l	200 mM PMSF	
132 μ l	Aprotinin	Sigma
13,2 μ l	Leupeptin	
13,2 μ l	Pepstatin A	
2,64 ml	Phosphatase-Inhibitor-Set III	Calbiochem
66,0 μ l	200 mM Natriumorthovanadat	

Lysepuffer I

3,564 ml	Lysepuffer-Stock	
7,436 ml	H ₂ O RNase/DNase frei	Gibco

Lysepuffer II

712,8 μ l	Lysepuffer-Stock	
220 μ l	10 % Triton-X	
22,0 μ l	Nonidet P-40 (Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Roche
55,0 μ l	10 % DOC	
1,19 ml	H ₂ O RNase/DNase frei	Gibco

Gelelektrophorese und Western-Blot

5 x Laemmli-Puffer

11,76 ml	85 %iges Glycerol	Roth
1,20 g	Tris Base	Sigma
30,0 mg	Na ₂ -EDTA	Sigma
4,00 g	SDS	Serva
0,50 ml	β -Mercaptoethanol	Sigma
0,02 g	Bromphenolblau	Merck

in H₂O_{dest} lösen, auf 20 ml auffüllen und mit HCl auf pH 6,8 einstellen.
Zu je 1 ml aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt.

2 x Laemmli-Puffer

1,0 ml	5 x Laemmli-Puffer	
1,5 ml	H ₂ O _{dest}	

A. Chemikalien und Lösungen

0,5 M Tris/SDS pH 6,8

6,05 g	Tris-Base	Sigma
0,40 g	SDS	Serva

in 100 ml H₂O_{dest} lösen und mit HCl auf pH 6,8 einstellen.

1,5 M Tris/SDS pH 8,8

36,34 g	Tris-Base	Sigma
0,80 g	SDS	Serva

in 200 ml H₂O_{dest} lösen und mit HCl auf pH 8,8 einstellen.

10 % Ammoniumperoxidsulfat (APS)

1,00 g	APS	Sigma
10,0 ml	H ₂ O _{dest}	

zu je 100 µl aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt.

Sammelgel (4 %)

650 µl	30 % Acrylamid	Roth (Rotiphorese Gel)
1250 µl	0,5 M Tris/SDS pH 6,8	
3050 µl	H ₂ O _{dest}	
25 µl	10 % APS	
10 µl	TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Roth

Trenngel (10 %)

5000 µl	30 % Acrylamid	Roth (Rotiphorese Gel)
3750 µl	1,5 M Tris/SDS pH 8,8	
6250 µl	H ₂ O _{dest}	
50 µl	10 % APS	
10 µl	TEMED	Roth

10 x Laufpuffer

30,24 g	Tris Base	Sigma
142,50 g	Glycin	Sigma
10,00 g	SDS	Serva

in 800 ml H₂O_{dest} lösen, auf 1000 ml auffüllen.

1 x Laufpuffer

100 ml	10 x Laufpuffer
900 ml	H ₂ O _{dest}

A. Chemikalien und Lösungen

10 x Transferpuffer-Stammlösung

23,23 g	Tris-Base	Sigma
112,60 g	Glycin	Sigma

in 800 ml H₂O_{dest} lösen, auf 1000 ml auffüllen.

1 x Transferpuffer

100 ml	10 x Transferpuffer-Stammlösung	
200 ml	Methanol	Roth

mit H₂O_{dest} auf 1000 ml auffüllen.

10 x TBS

24,2 g	Tris-Base	Sigma
80,0 g	NaCl	Roth

in 800 ml H₂O_{dest} lösen, auf 1000 ml auffüllen.

1 x TBS

100 ml	10 x TBS
900 ml	H ₂ O _{dest}

0,1 % TBS-T

100 ml	10 x TBS	
1 ml	Tween 20	Sigma

in 800 ml H₂O_{dest} lösen, auf 1000 ml auffüllen.

5 % BSA in TBS-T

10,0 g	BSA	Sigma
200 ml	TBS-T	

2 % BSA in TBS-T

40 ml	5 % BSA in TBS-T
-------	------------------

mit TBS-T bis 100 ml auffüllen.

Zum Einstellen des jeweiligen pH-Wertes wurde NaOH der Firma Riedel-de Haën bzw. HCl (37 %) der Firma Merck verwendet.

B. Ergänzende Tabellen

Zielprotein	Phosph.	Quelle	Firma	Nummer
eIF2 α	-	rabbit	Cell Signaling	9722
eIF2 α -phospho	Ser51	rabbit	Cell Signaling	9721S
eIF4E	-	rabbit	Cell Signaling	9742
eIF4E-phospho	Ser209	rabbit	Cell Signaling	9741S
p70S6-Kinase	-	rabbit	Cell Signaling	9202
p70S6-Kinase-phospho	Thr389	rabbit	Cell Signaling	9205S
GAPDH	-	rabbit	Cell Signaling	2118L
β -Tubulin-III	-	mouse	Covance	MMS-435P
anti-rabbit (sekundär)	-	goat	Santa Cruz	sc-2004
anti-mouse (sekundär)	-	goat	Santa Cruz	sc-2005

Tabelle B.1.: Antikörper mit Details zur Bestellung.

Phosph. = Phosphorylierungsstelle des Zielproteins (TIF).

B. Ergänzende Tabellen

Gruppe	AM	SEM	GM	SE GM	1. TR		2. TR		3. TR	
					eIF α	HK	eIF2 α	HK	eIF2 α	HK
3h SD	2,839	1,37	106,674	9,24	448.076	289.421	411.429	73.763	489.395	351.980
3h sham	2,507	1,01			512.841	420.911	344.065	76.475	475.353	263.445
4h SD	2,352	0,86	102,115	1,11	462.591	355.422	399.425	98.282	520.524	307.926
4h sham	2,307	0,86			450.106	342.754	405.710	100.998	466.067	292.783
8h SD	1,521	0,17	166,714	42,38	318.321	197.598	184.735	105.384	568.401	474.127
8h sham	1,026	0,31			483.657	367.296	96.030	233.338	549.405	407.506
1d SD	0,987	0,30	82,195	10,83	524.801	411.557	109.465	286.222	603.082	462.386
1d sham	1,072	0,16			533.166	421.839	250.005	328.119	567.203	476.866
3d SD	3,939	1,02	145,394	4,21	325.217	54.681	540.852	205.067	505.513	156.349
3d sham	2,657	0,57			257.205	67.690	491.155	243.450	510.277	237.055
7d SD	2,696	0,29	109,281	9,52	253.277	87.370	457.694	215.195	558.516	182.365
7d sham	2,514	0,46			278.687	81.057	516.518	254.096	140.899	68.060
30d SD	1,553	0,30	94,595	12,76	364.441	320.330	487.859	229.136	289.912	208.354
30d sham	1,623	0,24			381.620	191.266	470.136	277.082	187.497	159.411

Tabelle B.2.: Messwerte von eIF2 α und des Housekeepers β -Tubulin-III im Zytosol. AM = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels, GM = geometrischer Mittelwert der SD-Werte in Bezug auf sham = 100%, SE GM = Standardfehler des geometrischen Mittelwertes, TR = Technisches Replikat, HK = Housekeeper.

B. Ergänzende Tabellen

Gruppe	AM	SEM	GM	SE GM	1. TR		2. TR		3. TR	
					eIF α	HK	eIF2 α	HK	eIF2 α	HK
3h SD	1,950	0,75	85,500	3,72	239.768	171.001	120.173	35.094	121.895	119.121
3h sham	2,180	0,69			262.199	166.712	135.292	37.935	153.843	109.776
4h SD	2,415	0,76	97,357	12,20	312.926	211.858	190.265	48.681	271.365	146.046
4h sham	2,277	0,16			226.786	115.261	68.408	27.268	359.402	152.617
8h SD	0,914	0,26	87,570	0,94	237.905	206.000	39.348	101.660	296.399	247.286
8h sham	1,039	0,30			273.576	215.920	38.353	85.333	204.097	145.674
1d SD	1,041	0,27	110,498	4,10	318.440	222.297	54.775	104.942	186.195	159.263
1d sham	0,914	0,19			274.088	239.047	83.514	157.044	222.862	209.733
3d SD	2,654	0,20	93,493	7,32	99.008	36.032	277.815	94.359	236.695	104.243
3d sham	2,858	0,31			98.496	43.837	305.198	94.027	282.926	91.793
7d SD	2,463	0,35	96,608	6,41	79.001	44.676	321.796	119.835	280.273	95.527
7d sham	2,493	0,08			99.795	42.776	232.830	89.888	552.023	215.886
30d SD	1,073	0,32	99,451	9,54	135.732	139.808	224.360	134.825	36.537	62.434
30d sham	1,014	0,17			84.810	101.430	212.083	155.512	51.261	60.815

Tabelle B.3.: Messwerte von eIF2 α und des Housekeepers β -Tubulin-III in der Membranfraktion. AM = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels, GM = geometrischer Mittelwert der SD-Werte in Bezug auf sham = 100%, SE GM = Standardfehler des geometrischen Mittelwertes, TR = Technisches Replikat, HK = Housekeeper.

B. Ergänzende Tabellen

Gruppe	AM	SEM	GM	SE GM	1. TR		2. TR		3. TR	
					eIF α -P	HK	eIF2 α -P	HK	eIF2 α -P	HK
3h SD	0,138	0,03	166,408	14,08	48.503	328.632	33.324	188.890	14.422	160.452
3h sham	0,086	0,02			44.016	361.659	36.564	415.856	6.672	140.564
4h SD	0,104	0,01	99,993	15,10	46.766	351.888	42.713	451.828	13.944	165.553
4h sham	0,106	0,02			31.489	347.612	32.401	406.601	46.479	316.996
8h SD	0,315	0,04	272,287	24,29	23.732	81.846	57.041	211.984	118.002	304.804
8h sham	0,121	0,03			24.366	319.789	32.933	287.303	62.438	364.461
1d SD	0,167	0,05	99,794	9,37	30.595	402.678	53.986	318.859	96.656	377.400
1d sham	0,182	0,08			30.341	387.936	48.138	390.023	93.312	271.727
3d SD	0,156	0,02	118,911	5,07	21.053	164.987	29.000	193.312	47.408	248.572
3d sham	0,134	0,03			39.527	372.935	40.183	363.558	66.550	359.036
7d SD	0,066	0,03	42,167	5,32	11.591	332.297	14.469	323.109	30.650	261.981
7d sham	0,137	0,02			45.141	406.333	48.054	380.254	60.816	350.308
30d SD	0,164	0,03	162,584	6,97	22.502	210.636	72.580	364.716	56.062	303.523
30d sham	0,100	0,02			22.344	314.578	47.128	452.405	41.613	336.994

Tabelle B.4.: Messwerte von eIF2 α -P_{ser51} und des Housekeepers β -Tubulin-III im Zytosol. AM = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels, GM = geometrischer Mittelwert der SD-Werte in Bezug auf sham = 100%, SE GM = Standardfehler des geometrischen Mittelwertes, TR = Technisches Replikat, HK = Housekeeper.

B. Ergänzende Tabellen

Gruppe	AM	SEM	GM	SE GM	1. TR		2. TR		3. TR	
					eIF α -P	HK	eIF2 α -P	HK	eIF2 α -P	HK
3h SD	0,265	0,08	130,652	30,53	33,160	188,968	27,173	134,302	19,852	47,469
3h sham	0,201	0,05			30,330	200,304	54,246	175,040	35,413	249,595
4h SD	0,246	0,05	236,417	13,85	38,879	229,838	82,123	247,290	29,689	125,322
4h sham	0,108	0,03			14,426	195,945	26,621	159,111	20,855	255,053
8h SD	0,171	0,04	58,200	13,69	17,782	76,613	35,019	184,259	17,783	193,592
8h sham	0,309	0,11			22,107	134,123	63,687	121,861	35,656	149,428
1d SD	0,226	0,07	91,222	11,04	28,271	151,613	18,685	146,333	43,459	119,258
1d sham	0,270	0,12			15,977	123,198	36,145	207,262	75,376	149,140
3d SD	0,108	0,03	51,015	6,57	10,942	138,359	12,237	169,753	31,581	182,935
3d sham	0,202	0,03			24,332	181,507	46,071	203,168	44,207	181,278
7d SD	0,128	0,02	266,314	61,68	24,225	178,989	19,147	202,076	24,187	158,138
7d sham	0,059	0,03			3,359	149,384	7,964	194,089	20,166	179,184
30d SD	0,273	0,05	157,959	28,36	56,109	151,479	51,333	229,776	26,574	118,055
30d sham	0,181	0,05			35,128	222,165	67,726	244,596	15,540	143,958

Tabelle B.5.: Messwerte von eIF2 α -P_{ser51} und des Housekeepers β -Tubulin-III in der Membranfraktion. AM = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels, GM = geometrischer Mittelwert der SD-Werte in Bezug auf sham = 100%, SE GM = Standardfehler des geometrischen Mittelwertes, TR = Technisches Replikat, HK = Housekeeper.

B. Ergänzende Tabellen

Gruppe	AM	SEM	GM	SE GM	1. TR		2. TR		3. TR	
					eIF4E	HK	eIF4E	HK	eIF4E	HK
3h SD	0,489	0,04	87,702	3,04	190.334	437.852	201.892	362.278	197.430	414.980
3h sham	0,559	0,05			223.237	403.726	217.388	339.864	199.065	412.085
4h SD	0,568	0,05	98,189	1,14	203.419	427.696	210.401	352.295	252.032	398.607
4h sham	0,581	0,06			184.530	393.969	219.683	363.915	242.162	360.903
8h SD	0,303	0,01	105,976	6,71	140.963	432.828	109.892	371.369	145.859	506.326
8h sham	0,288	0,02			110.192	449.125	90.520	309.721	132.055	405.961
1d SD	0,341	0,02	88,184	1,70	144.345	481.430	149.994	443.871	155.368	403.455
1d sham	0,386	0,02			158.418	461.359	175.778	433.201	180.825	442.813
3d SD	0,267	0,03	66,341	8,96	117.700	412.009	130.403	420.957	88.835	429.108
3d sham	0,407	0,06			117.176	401.596	165.653	387.467	251.900	500.785
7d SD	0,340	0,07	82,073	1,23	84.028	365.322	122.198	375.425	209.427	450.317
7d sham	0,411	0,07			98.944	347.323	159.440	386.787	260.971	486.603
30d SD	0,371	0,13	105,925	5,47	101.997	476.908	123.072	461.937	293.358	463.847
30d sham	0,370	0,16			88.912	425.656	94.181	449.375	266.278	384.442

Tabelle B.6.: Messwerte von eIF4E und des Housekeepers GAPDH im Zytosol. AM = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels, GM = geometrischer Mittelwert der SD-Werte in Bezug auf sham = 100 %, SE GM = Standardfehler des geometrischen Mittelwertes, TR = Technisches Replikat, HK = Housekeeper.

B. Ergänzende Tabellen

Gruppe	AM	SEM	GM	SE GM	1. TR		2. TR		3. TR	
					eIF4E	HK	eIF4E	HK	eIF4E	HK
3h SD	0,097	0,02	76,020	18,34	29.362	223.870	22.827	215.948	6.058	113.786
3h sham	0,123	0,02			25.210	248.532	22.490	234.432	22.932	132.809
4h SD	0,186	0,04	204,785	13,90	41.594	297.461	40.430	282.648	48.902	178.501
4h sham	0,092	0,02			17.927	213.180	13.437	242.580	18.231	133.096
8h SD	0,065	0,01	142,619	2,19	18.849	288.444	12.066	245.502	16.711	209.136
8h sham	0,046	0,01			9.422	205.205	5.978	182.549	9.684	164.600
1d SD	0,048	0,01	116,544	13,19	13.857	217.928	7.182	244.012	7.886	155.075
1d sham	0,039	0,00			12.618	289.627	11.169	289.047	7.973	223.260
3d SD	0,041	0,02	38,571	13,42	10.201	256.909	9.454	128.980	1.666	168.942
3d sham	0,081	0,01			12.429	208.745	16.217	181.586	20.739	220.449
7d SD	0,109	0,02	266,931	14,21	17.340	217.617	19.876	205.294	34.684	228.496
7d sham	0,041	0,01			4.193	163.013	7.956	181.338	13.447	246.455
30d SD	0,093	0,07	119,135	9,28	7.093	233.005	4.941	222.877	26.015	114.520
30d sham	0,073	0,05			7.321	214.184	3.943	251.897	25.124	148.248

Tabelle B.7.: Messwerte von eIF4E und des Housekeepers GAPDH in der Membranfraktion. AM = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels, GM = geometrischer Mittelwert der SD-Werte in Bezug auf sham = 100%, SE GM = Standardfehler des geometrischen Mittelwertes, TR = Technisches Replikat, HK = Housekeeper.

B. Ergänzende Tabellen

Gruppe	AM	SEM	GM	SE GM	1. TR		2. TR		3. TR	
					eIF4E-P	HK	eIF4E-P	HK	eIF4E-P	HK
3h SD	0,03776	0,0070	109,702	5,63	12.208	239.209	11.374	325.423	11.802	432.381
3h sham	0,03586	0,0096			27.907	519.168	12.390	374.208	8.373	404.082
4h SD	0,03343	0,0045	99,817	6,34	19.315	521.696	14.374	370.734	9.802	400.306
4h sham	0,03292	0,0019			15.832	506.919	13.152	358.597	13.505	437.688
8h SD	0,01227	0,0016	140,718	16,99	4.576	425.661	5.865	377.869	3.391	322.070
8h sham	0,00867	0,0009			2.983	341.235	2.501	352.992	4.209	413.441
1d SD	0,02004	0,0017	111,969	4,40	6.356	285.996	7.230	431.409	10.108	478.029
1d sham	0,01778	0,0004			6.370	361.898	7.108	415.136	9.038	485.557
3d SD	0,01225	0,0017	102,854	6,19	4.033	386.609	4.551	430.043	8.188	519.928
3d sham	0,01175	0,0008			4.373	430.688	6.208	496.122	5.879	467.361
7d SD	0,00632	0,0031	37,255	12,38	2.572	398.436	5.019	431.975	378	426.962
7d sham	0,01114	0,0017			4.904	435.592	6.527	465.916	3.807	466.881
30d SD	0,01106	0,0017	152,483	5,87	4.311	409.789	4.825	567.486	6.913	488.389
30d sham	0,00745	0,0017			2.748	402.765	2.626	530.596	4.758	449.791

Tabelle B.8.: Messwerte von eIF4E-P_{ser209} und des Housekeepers GAPDH im Zytosol. AM = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels, GM = geometrischer Mittelwert der SD-Werte in Bezug auf sham = 100%, SE GM = Standardfehler des geometrischen Mittelwertes, TR = Technisches Replikat, HK = Housekeeper.

B. Ergänzende Tabellen

Gruppe	AM	SEM	GM	SE GM	1. TR		2. TR		3. TR	
					p70S6K	HK	p70S6K	HK	p70S6K	HK
3h SD	0,034	0,004	132,636	26,08	12,666	380,013	11,651	276,977	8,714	327,780
3h sham	0,030	0,010			15,954	377,922	12,234	316,849	3,640	371,462
4h SD	0,022	0,004	89,577	2,13	6,074	322,351	9,314	306,173	6,148	380,350
4h sham	0,025	0,006			7,396	355,339	12,102	328,249	5,993	356,799
8h SD	0,038	0,003	249,969	54,38	14,322	337,012	7,076	226,285	14,322	353,446
8h sham	0,017	0,006			2,711	356,831	2,493	150,905	7,857	286,078
1d SD	0,033	0,009	93,596	6,56	9,035	517,638	11,217	238,758	12,928	360,920
1d sham	0,034	0,005			13,197	557,461	12,325	304,731	12,616	337,197
3d SD	0,034	0,002	142,118	5,81	12,484	400,241	8,027	227,643	9,628	261,114
3d sham	0,024	0,002			8,555	367,330	5,061	237,588	6,912	242,681
7d SD	0,019	0,001	189,516	24,82	6,625	367,682	4,764	289,710	4,915	229,525
7d sham	0,011	0,003			4,768	333,279	1,523	273,129	2,368	202,605
30d SD	0,024	0,006	81,923	10,79	8,379	591,855	6,719	313,292	12,840	359,868
30d sham	0,027	0,001			14,251	548,739	13,401	491,794	9,187	329,953

Tabelle B.9.: Messwerte der p70S6-Kinase (p70S6K) und des Housekeepers GAPDH im Zytosol. AM = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels, GM = geometrischer Mittelwert der SD-Werte in Bezug auf sham = 100%, SE GM = Standardfehler des geometrischen Mittelwertes, TR = Technisches Replikat, HK = Housekeeper.

B. Ergänzende Tabellen

Gruppe	AM	SEM	GM	SE GM	1. TR		2. TR		3. TR	
					p70S6K	HK	p70S6K	HK	p70S6K	HK
3h SD	0,013	0,006	84,502	32,06	2.187	137.262	2.076	101.560	121	82.021
3h sham	0,009	0,001			1.568	133.502	936	97.927	665	93.911
4h SD	0,018	0,006	242,002	111,41	8.022	323.319	6.051	262.055	1.488	301.237
4h sham	0,007	0,003			354	162.532	1.501	141.772	1.775	205.196
8h SD	0,002	0,002	-	-	0	299.457	217	44.403	0	133.100
8h sham	0,003	0,002			1.186	222.766	101	21.283	0	89.647
1d SD	0,004	0,002	-	-	2.292	286.714	282	58.943	0	120.722
1d sham	0,001	0,001			0	325.047	171	113.545	0	190.413
3d SD	0,003	0,003	-	-	0	60.651	116	65.796	432	52.155
3d sham	0,003	0,002			0	77.554	308	81.569	219	38.895
7d SD	0,002	0,002	-	-	0	126.942	157	148.239	165	28.080
7d sham	0,000	0,000			0	52.958	0	75.028	0	17.261
30d SD	0,004	0,004	-	-	0	113.819	1.442	120.785	0	55.573
30d sham	0,017	0,008			0	126.633	2.664	95.793	1.389	63.737

Tabelle B.10.: Messwerte der p70S6-Kinase (p70S6K) und des Housekeepers GAPDH in der Membranfraktion. AM = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels, GM = geometrischer Mittelwert der SD-Werte in Bezug auf sham = 100%, SE GM = Standardfehler des geometrischen Mittelwertes, TR = Technisches Replikat, HK = Housekeeper. Wenn das Zielprotein nicht nachweisbar ist (Messwert = 0), ist die Bildung des geometrischen Mittelwerts der Verhältnisse SD- zu sham-Tieren mathematisch nicht möglich.

B. Ergänzende Tabellen

Gruppe	AM	SEM	GM	SE GM	1. TR		2. TR		3. TR	
					p70S6K-P	HK	p70S6K-P	HK	p70S6K-P	HK
3h SD	0,163	0,10	46,955	48,66	70.547	462.556	714	291.819	123.544	371.047
3h sham	0,147	0,06			7.214	242.743	78.243	316.479	56.824	348.100
4h SD	0,085	0,03	31,578	5,26	44.082	374.483	6.542	285.352	37.026	324.928
4h sham	0,225	0,05			145.686	490.187	41.208	305.825	81.532	334.335
8h SD	0,068	0,04	-	-	0	311.665	43.435	327.370	29.487	413.891
8h sham	0,107	0,03			8.907	168.159	41.068	318.109	50.098	362.308
1d SD	0,130	0,08	46,618	33,14	38.184	351.944	371	383.390	126.705	452.213
1d sham	0,121	0,09			123.377	423.726	4.408	236.494	22.152	413.922
3d SD	0,052	0,05	-	-	3.529	283.637	0	352.061	59.207	415.252
3d sham	0,123	0,05			81.965	437.182	8.286	321.891	53.014	340.362
7d SD	0,036	0,03	-	-	1.907	273.633	0	198.488	28.554	284.155
7d sham	0,189	0,06			85.033	429.462	115.510	397.293	23.653	296.684
30d SD	0,153	0,05	76,046	10,49	105.873	421.507	36.361	341.608	48.166	473.636
30d sham	0,184	0,01			74.007	376.375	67.469	371.883	88.723	511.961

Tabelle B.11.1.: Messwerte der p70S6-Kinase-P_{Thr389} (p70S6K-P) und des Housekeepers GAPDH im Zytosol. AM = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels, GM = geometrischer Mittelwert der SD-Werte in Bezug auf sham = 100%, SE GM = Standardfehler des geometrischen Mittelwertes, TR = Technisches Replikat, HK = Housekeeper. Wenn das Zielprotein nicht nachweisbar ist (Messwert = 0), ist die Bildung des geometrischen Mittelwerts der Verhältnisse SD- zu sham-Tieren mathematisch nicht möglich.

B. Ergänzende Tabellen

Gruppe	AM	SEM	GM	SE GM	1. TR		2. TR		3. TR	
					p70S6K-P	HK	p70S6K-P	HK	p70S6K-P	HK
3h SD	0,074	0,04	-	-	6.383	69.235	0	108.481	13.511	103.591
3h sham	0,079	0,04	-	-	6.499	79.487	0	88.541	17.011	109.179
4h SD	0,036	0,02	-	-	10.292	312.339	0	237.375	21.515	282.837
4h sham	0,035	0,02	-	-	1.588	66.722	0	54.541	17.738	219.218
8h SD	0,045	0,01	-	-	2.892	111.742	10.791	227.578	8.020	130.408
8h sham	0,042	0,02	-	-	0	48.314	4.759	99.695	6.587	85.700
1d SD	0,025	0,01	-	-	0	89.258	3.461	129.128	5.115	104.875
1d sham	0,033	0,02	-	-	0	102.653	10.842	191.255	7.871	182.011
3d SD	0,099	0,05	-	-	0	5.500	14.105	110.828	12.720	74.804
3d sham	0,027	0,02	-	-	0	50.585	1.460	154.313	5.655	79.096
7d SD	0,032	0,01	-	-	4.938	133.373	1.525	186.138	3.153	62.076
7d sham	0,000	0,00	-	-	0	55.829	0	34.954	0	41.571
30d SD	0,043	0,00	106,682	30,34	3.488	86.021	5.191	112.418	7.089	164.294
30d sham	0,053	0,03	-	-	533	35.848	4.025	90.566	8.384	83.206

Tabelle B.12.: Messwerte der p70S6-Kinase-P_{Thr389} (p70S6K-P) und des Housekeepers GAPDH in der Membranfraktion. AM = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels, GM = geometrischer Mittelwert der SD-Werte in Bezug auf sham = 100%, SE GM = Standardfehler des geometrischen Mittelwertes, TR = Technisches Replikat, HK = Housekeeper. Wenn das Zielprotein nicht nachweisbar ist (Messwert = 0), ist die Bildung des geometrischen Mittelwertes der Verhältnisse SD- zu sham-Tieren mathematisch nicht möglich.

C. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Hannah Maria Zipprich
Geburtsdatum	25. September 1984
Geburtsort	Heidelberg
Familienstand	ledig

Ausbildung

1995 – 2004	Pestalozzi-Gymnasium Biberach, Abitur
02 2001 – 08 2001	<i>Highschool</i> -Besuch in Greenville, SC, USA
08 2003	„Fraktale in Theorie und Anwendung“ Multinationale SchülerAkademie in Metten
10 2004 – 11 2011	Medizinstudium mit Staatsexamen an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
11 2004 – 12 2007	Stipendiatin Studienstiftung des deutschen Volkes
2006 – 2009	Organisation der interdisziplinären Jenaer Denkanstöße
08 2008	Leistungsassistenz bei der Multinationalen SchülerAkademie Torgelow
10 2009 – 07 2010	IZKF-Promotionsstipendium (Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung)
08 2010 – 07 2011	Praktisches Jahr in Valparaíso, Chile mit Stipendium des DAAD, Jena (Wahlfach Neurologie), und Nordhausen
01 2012	Approbation

C. Lebenslauf

Beruflicher Werdegang

Seit 02 2012	Assistenzärztin in der Hans-Berger-Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Jena (UKJ)
Seit 10 2011 2013	Mitgestaltung der Lehre in der Neurologie Kurse für Prüfer und Prüfgruppen: Grundlagen und Praxis klinischer Prüfungen
Seit 2013	Prüfärztin bei klinischen Studien
06 2014 – 05 2015	IZKF-Rotationsstelle für die PRE-Delir-Studie: Prävalenz und Risikofaktoren des Delirs bei älteren Patienten in einem Universitätsklinikum
Seit 05 2016	Assistenzärztin in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des UKJ (Rotationsjahr)

Publikationen

05.09.2015	1. Posterpreis auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Geriatrie für die PRE-Delir-Studie
24.09.2015	Freier Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie zur PRE-Delir-Studie

Sprachen

Deutsch (Muttersprache),
Englisch (sehr gute Kenntnisse),
Französisch, Spanisch und Ungarisch (gute Kenntnisse),
Latinum

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

D. Danksagung

Zuerst danke ich Herrn Prof. Dr. O. W. Witte für die Möglichkeit, in seinem Labor an diesem interessanten Thema arbeiten zu können. Er hat meine Arbeit mit hilfreichen Anregungen und konstruktiver Kritik begleitet. Gleichzeitig hat er mich beim Start in das Berufsleben sowie bei meiner fachlichen und persönlichen Entwicklung sehr unterstützt.

Bei Frau Dr. Anja Urbach möchte ich mich für die intensive, sachkundige und wertvolle Betreuung zu jedem Zeitpunkt meiner Arbeit danken. Mein Dank geht auch an unsere Arbeitsgruppe für die angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre und insbesondere an Anne Ansorg und Eileen Baum, für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der experimentellen Neurologie für die gute Zusammenarbeit. Stellvertretend für alle medizinisch-technischen Assistentinnen danke ich Swetlana Tausch und Sindy Beck für die fachkundige technische Unterstützung im Labor. Besonders danke ich Herrn Dr. Christian Schmeer für die jederzeit freundliche und tatkräftige Hilfe, geduldige Erklärungen und das Teilen seiner Erfahrung bei der Erarbeitung der Methoden. Auch für die moralische Unterstützung in späteren Phasen der Arbeit danke ich ihm. Frau Dr. Nadine Jänisch danke ich für die Erläuterungen und praktischen Tipps bei der Etablierung und Umsetzung der Methoden.

Weiterhin möchte ich allen Freunden und Kollegen danken, durch deren Anregungen meine Arbeit kontinuierlich verbessert wurde und die mir

D. Danksagung

mit viel Geduld, Interesse und Hilfsbereitschaft zur Seite standen. Herzlich danke ich allen, die mich zum Durchhalten motiviert, immer emotionalen Rückhalt geboten und mir besonders in den anstrengenden Zeiten auch beim Abschalten geholfen haben. Jan Hering danke ich für seine Freundschaft und die Unterstützung bei Fragen zu Latex und zur Bildbearbeitung sowie für zahlreiche konstruktive und motivierende Gespräche. Ganz besonders danke ich Tanja Rundel für die freundschaftliche Hartnäckigkeit.

Abschließend möchte ich meiner Familie danken, die mich zu allen Zeiten unterstützt hat. Gideon danke ich besonders für die Hilfe bei der Umsetzung des Layouts mittels Latex, Jakob für die konstruktive inhaltliche Kritik und das intensive Korrekturlesen. Meine beiden Brüder sind immer für mich da. Meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung des Studiums, den Rückhalt bei dieser Arbeit und für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung auf meinem Lebensweg. Dániel danke ich für seinen bedingungslosen Beistand, seine Liebe und das Aushalten der schwierigen Zeiten sowie das gemeinsame Genießen der schönen Zeiten. Ich danke Euch von ganzem Herzen.

E. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. O. W. Witte, Dr. A. Urbach, Dr. C. Schmeer, Dr. N. Jänisch, Dr. J. Zipprich,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers