

Aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie

(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi)

am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

JNK UND SCHLAGANFALL



Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

DOROTHEA ELISABETH ROGGE

aus Berlin

Kiel, 2010

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Herdegen
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Jens Volkmann
Dekan:	Prof. Dr. Stefan Schreiber
Tag der mündlichen Prüfung:	02.09.11
Zum Druck genehmigt:	Kiel, den 02.09.2011
	gez.

Caminante, no hay camino,
Se hace camino al andar.

Wanderer, es gibt keinen Weg,
der Weg bahnt sich im Gehen.

Antonio Machado

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	I
1.1. Der Schlaganfall.....	I
1.2. JNK - ein neues therapeutisches Target.....	2
1.3. JNK haben sowohl physiologische als auch pathophysiologische Aufgaben.....	2
1.4. Die Rolle der JNK bei der Degeneration im Nervensystem.....	2
1.5. Inhibitoren der JNK.....	4
1.5.1. SP600125 - ein „ <i>small-molecule JNK-inhibitor</i> “.....	4
1.5.2. Peptidinhibitoren, die aus dem JNK-Substrat c-Jun entwickelt wurden.....	5
1.5.3. JNK-Peptidinhibitoren, die aus JNK-Interaktionsproteinen gewonnen wurden....	5
1.6. Fragestellung.....	5
2. Material und Methode.....	7
2.1. Die Versuchstiere.....	7
2.2. Vorbereitung der Versuchstiere.....	7
2.3. Überprüfung des intrakraniellen Blutflusses.....	8
2.4. Intraluminale Okklusion der A. cerebri med. (MCAO).....	9
2.5. Der Versuchsaufbau.....	12
2.6. Die Untersuchung von Motorik und Sensorik.....	12
2.7. Die Lösungen für die Entnahme der Gehirne und die Gewebefixierung.....	13
2.8. Die Entnahme der Gehirne und die Gewebefixierung.....	13
2.9. Die Cresylviolett-färbung.....	14
2.10. Messung und Bestimmung der Größe des Infarktareals.....	15
2.11. Die statistischen Methoden.....	16

3. Auswertung und Ergebnisse.....	18
3.1. Die Einschlusskriterien für dieses Experiment.....	18
3.2. Die Einteilung der Versuchsgruppen.....	18
3.3. Der Vergleich der Daten in den einzelnen Gruppen	19
3.3.1. Vergleich der Infarkt volumina.....	19
3.3.2. Vergleich der Neurologie.....	21
4. Diskussion.....	23
4.1. Untersuchung der Wirkung von XG-102 an der Ratte.....	23
4.2. Die Zusammenfassung der Ergebnisse.....	23
4.3. Erklärungen für ein Ausbleiben eines protektiven Effektes.....	24
5. Zusammenfassung.....	27

Abkürzungsverzeichnis

WHO	<i>World Health Organisation</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
UV	Ultraviolett
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2-protein</i>
Bcl-xl	<i>B-cell lymphoma extra large</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bid	<i>Bcl-interacting protein</i>
Bim	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
c-Jun	Transkriptionsfaktor
AP1	<i>activator-protein 1</i>
p53	Tumorsuppressorprotein 53
ATP	Adenosintriphosphat
L-JNKi	JNK-Inhibitor aus L-Aminosäuren
D-JNKi	JNK-Inhibitor aus D-Aminosäuren
XG-102	D-JNKi der Firma Xigen
Tat	<i>Trans-activaton of transcription</i>
Ti-Jip	<i>truncated inhibitor</i> auf Jip-Basis
Tat-TiJip	Komplex aus Tat und TiJip
Jip	<i>JNK-interacting-protein</i>
MCAO	<i>Middle cerebral artery occlusion</i>
CD-Ratten	Charles-River Rattenstamm
ICR-CD1-Mäuse	Charles-River Mäusestamm
ko	<i>knock out</i>
SP600125	Anthrapylozon-JNK-Inhibitor
KG	Körpergewicht
rtPA	<i>recombinant tissue plasminogen activator</i>
A. carotis comm.	Arteria carotis communis
A. carotis ext.	Arteria carotis externa
A. carotis int.	Arteria carotis interna
A. cerebri med.	Arteria cerebri media
M. sternocl.	Musculus sternocleidomastoideus

M. omohy.	Musculus omohyoideus
M. colli lon.	Musculus colli longus
V. jug. ext.	Vena jugularis externa
N. vag.	Nervus vagus
A. pterygop.	Arteria pterygopalatina
SEM	<i>standard error of mean</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ PO ₄	Natriumphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KCL	Kaliumchlorid

I. Einleitung

1.1. Der Schlaganfall

„Es ist wie ein Blitzschlag im Gehirn - ein Schlaganfall kann in jeder Sekunde 32000 Zellen zerstören: Die Folgen Lähmung, Sprachstörungen. In Deutschland sind jährlich 200000 Menschen betroffen - die Patienten werden immer jünger.“ So titelte eine große deutsche Boulevard-Zeitung in einem ihrer Artikel.

Tatsächlich ist der Schlaganfall (auch cerebraler Insult, apoplektischer Insult oder Gehirnschlag) die nach WHO-Berichten dritthäufigste Todesursache in den Industriestaaten. Ihm liegt ein plötzlicher Sauerstoff- und Substratmangel, sowie das Fehlen von Glukose zugrunde, wobei die Versorgung der Nervenzellen nicht mehr ausreichend gewährleistet ist. Es wird grob unterschieden zwischen einer plötzlich auftretenden Minderdurchblutung (ischämischer Schlaganfall), die z.B. durch einen Thrombus oder eine Hirnblutung (hämorrhagischer Infarkt) ausgelöst wird und sekundär, aufgrund des raumfordernden Prozesses, zur Ischämie in nachfolgenden Regionen führt. Die Therapiemöglichkeiten, um eine möglichst große Zahl an Nervenzellen zu retten, sind beschränkt. Neben neurochirurgischen Operationen, die intracerebrale Blutungen zu stillen vermögen, und der Katheterintervention mit lokaler Lysetherapie des durch einen Thrombus verlegten Gefäßes, steht im Akutfall noch die systematische Lysetherapie zur Verfügung. Sie stellt auch in Deutschland ein immer häufiger genutztes Therapieverfahren dar, obwohl die Blutungsgefahr stark erhöht ist und eine strikte Zeitbegrenzung von unter 4,5 Stunden bei Einsatz gilt. Trotz der Fortschritte, die mit dieser Therapie in den letzten Jahren erzielt wurden, kann diese nur bei wenigen Patienten angewendet werden. Das enge Zeitfenster und die geringe Zahl an Therapiemöglichkeiten inspiriert dazu, neue Ansätze in der Behandlung des Schlaganfalls zu finden. Gegenstand der derzeitigen Forschung ist es somit, pathophysiologische Prozesse beim Untergang der Nervenzellen aufzudecken.

1.2. JNK - ein neues therapeutisches Target

Seit ihrer Entdeckung Anfang der 1990-iger Jahre ist eine neue interessante Zielstruktur in den Vordergrund gerückt und derzeit Gegenstand vielfältiger Forschungen. Es handelt sich dabei um die sogenannten c-Jun N-terminalen-Kinasen (JNK). Diese Kinasen gehören zu den mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und sind vereinfacht gesehen für die zelluläre Weiterleitung von äußeren Reizen zuständig. Es sind 3 JNK-Gene beim Menschen bekannt. Durch alternatives Spleißen können wiederum 10 Isoformen entstehen (Kyriakis et al., 1994), welche unterschiedlich stark an der Signalübermittlung in Zellprozessen beteiligt sind, bedingt durch die unterschiedliche Affinität zu ihren jeweiligen Substraten. JNK₁ und JNK₂ werden in allen Körperzellen exprimiert, JNK₃ jedoch nur in Herz, Gehirn und Hoden. Die JNK werden durch bestimmte exogene Signale, wie z.B. UV-Strahlung und Cytokine, aktiviert und leiten diese Signale fort. Deshalb werden diese Kinasen auch Stresskinasen genannt (Hibi et al., 1993).

1.3. JNK haben sowohl physiologische als auch pathophysiologische Aufgaben

In den letzten Jahren wurde erfolgreich versucht, die Signalwege dieser Kinasen zu entschlüsseln, wobei gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung der JNK einerseits für mannigfaltige physiologische Prozesse in der Zelle benötigt wird und andererseits mit der Entstehung von Krankheiten assoziiert ist, wie beispielsweise Diabetes, Atherosklerose, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer (Wätzig/Herdegen et al., 2005).

1.4. Die Rolle der JNK bei der Degeneration im Nervensystem

JNK spielen ebenfalls bei der Degeneration der Nervenzelle eine wichtige Rolle, denn u.a. werden JNK nach cerebralen Insulten und der damit verbundenen Ischämie vermehrt aktiviert und wirken als potentielle Effektoren der Apoptose. Die genauen Regulationsmechanismen des neuronalen Todes nach Ischämie sind aufgrund ihrer Komplexität nur teilweise bekannt. Die Proteine der Bcl-2 Familie, die im Zytoplasma der Nervenzelle lokalisiert sind, scheinen aber eine entscheidende Rolle in diesem Geschehen zu spielen (Graham et al., 2000). Antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL helfen der Zelle zu überleben, indem die Integrität der Mitochondrienmembran gewährleistet wird

(Lawrence et al., 1996; Martinou et al., 1994; Zhao et al., 2003). Wiederum sind die proapoptotischen Proteine Bax, Bid und Bim für die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren zuständig, die die Zelle in den Zelltod treiben (Zao et al., 2001; Yin et al., 2002).

All diese Proteine sind in ihren inaktiven Formen im Zytoplasma der Zelle mit ihrem jeweiligen Bindungsprotein zu finden (Gua et al., 2003; Lei und Davis, 2003; Normuna et al., 2003). Die JNK haben hier eine Schlüsselrolle in der Aktivierung dieser Kaskade, denn aktivierte JNK phosphorylieren Serinreste an einer Vielzahl von zellulären Zielen. Dies trägt durch Induktion von Transkriptionsfaktoren und posttranslationale Prozessierung zur Regulation und Modifizierung der Apoptose bei (Manning und Davis, 2003).

Ziel der JNK sind vor allem Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, eine Komponente des AP1-Transkriptionsfaktors (Herdegen und Wätzig, 2001), durch den proapoptotische Proteine entstehen, was anschließend zur Apoptose der Zelle führt. JNK können auch direkt die proapoptotischen Eigenschaften von p53 beeinflussen, die antiapoptotischen Funktionen von Bcl-2 und Bcl-xL (Fan et al., 2000; Mielke und Herdegen, 2000) werden gehemmt. Außerdem wird weiterhin die Translokation von Bax und Bim induziert (Lei und Davis, 2003), indem JNK anscheinend direkt mit den Bindungsproteinen im Zytoplasma agieren und diese verdrängen. Der JNK-Signalweg wird demzufolge nach eingetretener cerebraler Ischämie aktiviert (Ferrer et al., 1997, 2003; Herdegen et al., 1998; Wu et al., 2000).

Die zentrale Rolle der JNK bei der Einleitung des neuronalen Zelltodes nach Ischämie wurde erstmalig durch Versuche an genmanipulierten Knockout-Mäusen gezeigt, die u.a. einer cerebralen Ischämie ausgesetzt wurden. Sie waren jeweils defizient für die einzelnen JNK-Gene (JNK1-ko, JNK2-ko, JNK3-ko). Es wurde nachgewiesen, dass besonders JNK3 für die Vermittlung von proapoptotischen Signalen verantwortlich ist. Denn hierbei wurde bei JNK3-ko-Mäusen nicht nur eine signifikante Verkleinerung des Infarktgebietes verzeichnet, sondern eine fast vollständige Protektion gegenüber Ischämie und anderen toxischen Einflüssen, wie die des prokonvulsiven Stoffes Kainat, der ebenfalls getestet wurde, bewiesen (Yang et al., 1997; Kuan et al., 2003). Einige Stoffe, die der Aktivierung von JNK wiederum vorbeugen, konnten somit einen protektiven Effekt auf Hirnzellen nach eingetretener Ischämie aufweisen (Bogoyevitch et al., 2004; Kuan und Burke, 2005;

Recipi und Borsello, 2006). Als Beispiel ist hier die Verwendung von SP600125 zu nennen, welcher ein ATP-kompetitiver spezifischer JNK-Inhibitor ist. Er verbessert das Zellüberleben nach globaler und fokaler, transientscher Ischämie, hier wieder gezeigt an Mäusen (Carboni et al., 2004, 2005; Gao et al., 2005; Guan et al., 2005, 2006; Okuno et al., 2004). Die Entwicklung von zellpermeablen spezifischen JNK-Peptidinhibitoren, wie D-JNKi, welche den Zugang von JNK auf c-Jun oder andere Substrate verhindern, ist eine vielversprechende neue Strategie in der Schlaganfalltherapie (Barr et al., 2002; Bonny et al., 2001).

1.5. Inhibitoren der JNK

Diese vielversprechende neue Strategie in der Schlaganfallstherapie führte bereits zur Entwicklung verschiedener JNK-Inhibitoren. Wobei selbst mit der selektiven Hemmung von JNK mögliche Nebenwirkungen aufgrund der vielseitigen physiologischen Wirkungen nicht auszuschließen sind (Wätzig und Herdegen, 2005). Im Folgenden sollen die wichtigsten Inhibitoren vorgestellt werden.

1.5.1. SP600125 - ein „small-molecule JNK-inhibitor“

Dieser Hemmstoff, entwickelt von Cellegen/Signal Pharmaceuticals, war der Erste auf dem Markt. Er ist ein Anthrapyrazolon-Inhibitor und zeichnet sich durch seine planare Struktur und geringe Wasserlöslichkeit aus. Er interagiert, im Vergleich zu anderen MAPK, mit einer hohen Affinität und somit relativ spezifisch mit der ATP-Bindungstasche am JNK-Molekül (JNK₂ und JNK₃) und verhindert somit eine Phosphorylierung des c-jun-Transkriptionsfaktors. Dieser Prozess ist allerdings ATP-kompetitiv und somit reversibel bei Erhöhung der ATP-Konzentration. Er wurde seit Einführung mehrfach in Zellen und *in vivo* getestet und scheint in zahlreichen Gewebetypen, die durch Ischämie induzierte Apoptose unterdrücken zu können, wie auch im Gehirn gezeigt werden konnte. Hier konnte der Zelltod nach globaler Ischämie durch Unterdrückung der Expression der Fas-Liganden, Translokation des Bax-Proteins in das Mitochondrium und die Freisetzung von Cytochrom C im Zytosol und Aktivierung von weiteren proapoptotischen Caspasen vermindert werden (Guan et al., 2006). Auch die frühen neuronalen Schäden nach subarachnoidaler Blutung konnten durch die zeitnahe Applikation des Inhibitors (1h vor Beginn und 6h nach Einsetzen

der Ischämie) reduziert werden (Yatsushige et al., 2007). Es entstanden zahlreiche weitere *small-molecule*-Hemmstoffe, jedoch erreichte keiner eine solche Bedeutung wie SP600125.

1.5.2. Peptidinhibitoren, die aus dem JNK-Substrat c-Jun entwickelt wurden

Die neuere Generation von zellpermeablen Inhibitoren wurde aus dem Bindungssubstrat der JNK, der δ -Domäne des JNK-Substrats c-Jun hergestellt. Die TAT-Fusion des Inhibitors mit der Domäne des Substrats stellt die Zellpermeabilität sicher und hemmt JNK. Diese Inhibitoren wurden zunächst verwendet, um die komplexen Signalwege der JNK bei der Interaktion in der Genregulation aufzuschlüsseln. Der Inhibitor reagiert direkt mit den JNK-Molekülen und konkurriert somit mit c-Jun um die Bindung. Dieser Hemmstoff wirkt, im Vergleich zu SP600125, selektiver an JNK, da die δ -Domäne JNK-spezifisch ist.

1.5.3. JNK-Peptidinhibitoren, die aus JNK-Interaktionsproteinen gewonnen wurden

JIP-1 ist das erste Interaktionsprotein in der JNK-Signalkaskade, das mit JNK interagiert und dieses hemmt. Daraus leiten sich kurze Peptidsequenzen ab, die molekularbiologisch hergestellt als Inhibitor verwendet werden. Hierzu zählen u.a. TI-JIP, TAT-TIJIP, L-JNK_i und D-JNK_i, die direkt mit der Bindungstasche am JNK-Molekül reagieren und somit hochspezifisch und nicht-ATP-abhängig in ihrer Funktion sind. Die genannten Inhibitoren wurden ebenfalls schon mehrfach an Zellen und *in vivo* getestet und führten nicht nur zu weiteren Erkenntnissen über die Wirkung der JNK, sondern auch zu Erfolgen bei der Unterbrechung von pathophysiologischen Prozessen.

1.6. Fragestellung

In dieser Arbeit sollte der selektive JNK-Inhibitor D-JNK_i (XG-102, Xigen) eingesetzt werden, um seine Effekte auf das Gehirn nach einem experimentellen Schlaganfall zu untersuchen. Es gibt mehrere *in vitro*- und *in vivo*-Experimente, in denen positive und protektive Effekte des Stoffes nach cerebraler Ischämie zu beobachten waren. Die bis jetzt vorliegenden Studien sind aber nur bedingt vergleichbar, z.B. in Bezug auf die verwendeten Tiere, Dauer der Experimente oder Dosis und Zeitpunkt der Gabe des Stoffes. Weiterhin gab es zu Beginn dieser Arbeit keine *in vivo*-Studien, wie sich dieses Peptid an adulten Ratten

verhält, es existierten lediglich Studien an Mäusen. Hier konnten eindeutig protektive Effekte gezeigt werden. Außerdem wurde in den bisher verwendeten Modellen einer möglichen Reperfusion des Infarktgebietes wenig Beachtung geschenkt. All dies entspricht jedoch keineswegs einer Testung des Peptids unter möglichst realistischen und an der Krankheitspathologie orientierten Bedingungen. Deshalb soll das Peptid in dieser Arbeit an adulten Ratten getestet werden, die einer cerebralen Ischämie mit anschließender Reperfusion ausgesetzt werden. Als Zeitpunkt für die Gabe des Stoffes soll ein Zeitfenster von 3 Stunden dienen. In diesem Zeitraum soll es bereits zu einer Reperfusion gekommen sein. Es muss demnach ein Experiment geplant werden, das den Krankheitsverlauf und die Therapie- und Behandlungsfenster beim Menschen möglichst genau und zeitnah nachahmt. Im Fokus der Untersuchung dieser Arbeit steht somit die Frage:

Welchen Einfluss hat die Gabe des nicht-ATP-kompetitiven selektiven Peptidinhibitors D-JNKi (XG-102) auf Infarktgröße, Sensorik und Motorik nach kontrollierter cerebraler Ischämie und anschließender Reperfusion an der adulten Ratte?

2. Material und Methode

2.1. Die Versuchstiere

Für den Versuch wurden adulte, männliche CD-Ratten von der Firma Charles River verwendet. Geliefert wurden die Tiere mit einem Gewicht von 130-150 g. Anschließend wurden die Ratten für 5 Tage in die Klinik eigene zentrale Tierhaltung gebracht, um sich ausreichend an die neue Umgebung zu gewöhnen und sich vom Reisetstress zu erholen. Die Tiere befanden sich jeweils zu fünft in einem Käfig. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Trockenfutter, die durchschnittliche Raumtemperatur betrug 22°C und ein 12 h Hell-Dunkel-Zyklus wurde stets eingehalten. Sobald die Tiere ein Gewicht von 190-230 g erreicht hatten, konnten sie für den Versuch verwendet werden. Dieses Gewicht entspricht dem ungefähren Alter von 6-7 Wochen. Es wurden CD-Ratten gewählt, weil diese eine gute Reproduzierbarkeit der Infarktgebiete liefern (Markgraf et.al., 1993).

2.2. Vorbereitung der Versuchstiere

Vor Beginn des Versuches wurden die Tiere aus ihren Käfigen jeweils in einen eigenen Käfig umgesetzt, gewogen und anschließend mit einer Kombination aus Chloralhydrat (400 mg/kg KG) und Tramadol (20 mg/kg KG) in Narkose versetzt.

Die Narkosetiefe wurde während des ganzen Versuches durch mechanische Reize geprüft, bei eventuellen Abwehrreaktionen oder Blutflussschwankungen wurde die Narkose individuell angepasst. Nachdem die Tiere sich in ausreichender Narkose befanden, wurde ihnen das Fell auf dem Kopf und auf der ventralen Seite im Bereich

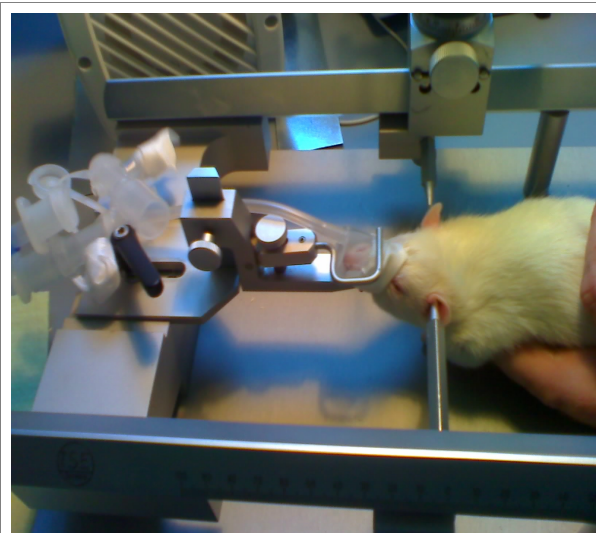


Abbildung 1: Stereotaktischer Apparat

Dargestellt ist hier der Kopf der Ratte im stereotaktischen Apparat. Er ist ein Hilfsmittel zur korrekten Positionierung der Laserdopplersonde.

der Brust und des Halses geschoren. Dies entsprach dem späteren Operationsfeld.

2.3. Überprüfung des intrakraniellen Blutflusses

Mit der Laserdoppleruntersuchung (PeriFlux 5000 von Perimed AB) wurde der intrakranielle Blutfluss während der später folgenden Operation gemessen und überprüft.

Das Tier wurde mit dem Kopf in einen stereotaktischen Apparat gespannt. Die Haut an der bereits geschorenen Schädelkalotte wurde mit einer Schere aufgeschnitten und es wurde ein kreisrunder Hautlappen entnommen. Um die restlichen Gewebstücke von dem Schädelknochen zu lösen, wurde 30%-iges Wasserstoffperoxid aufgetragen. Danach konnte das Gewebe mit einem Wattestäbchen oder andernfalls durch weitere Manipulation mit einer spitzen Schere entfernt werden, gleichzeitig kam es durch das Wasserstoffperoxid zur Blutstillung im Wundbereich. Nach dieser Präparation stellte sich der knöcherne Schädel dar. Ausgehend von der Kreuzung der beiden anterioren Schädelnähte und 5 mm rechts, lateral und 1 mm in posteriorer Richtung, wurde mittels stereotaktischem Apparat eine



Abbildung 2: Laserdoppler

Hier dargestellt ist die Ratte mit fertiger Kopfkappe und platzierter Laserdopplersonde. Im Hintergrund ist das Laserdopplergerät (PeriFlux 5000) sichtbar.

Markierung gesetzt. An dieser Markierung wurde mit einem Handbohrer ein die Schädelkalotte nicht penetrierendes Loch gebohrt, da sich an dieser Stelle das Stromgebiet der A. cerebri med. befindet. Auf der kontralateralen Seite wurde ebenfalls ein Loch gebohrt, in welches eine kleine Schraube zur Stabilitätssicherung für die später entstehende Kunststoffkappe gedreht wurde. Auf der rechten Seite wiederum wurde an dem dort entstandenen Loch ein Plastikröhrchen fixiert und anschließend der ganze kreisrunde Defekt mit Epoxidharz (Trim) ausgegossen. Nach Aushärtung dieser Kappe konnte das

Tier aus dem stereotaktischen Apparat befreit werden und in das Plastikröhrchen wurde nun eine Laserdopplersonde gesteckt, welche den Blutfluss der A. cerebri med. messen konnte.

2.4. Intraluminale Okklusion der A. cerebri med. (MCAO)

Die transitorische fokale Ischämie wurde nach einer Modifikation der Methode der intraluminalen Okklusion nach Longa et al., 1989 durchgeführt. Dafür wurde das Tier auf den Rücken gedreht und auf einer Polystyrolplatte fixiert. Zur Erleichterung der Operation und zur Erlangung einer besseren Übersicht wurde der Hals des Tieres leicht überstreckt und mittels Zellstoff etwas höher gelagert.

Während und nach der Operation erfolgte eine ständige Temperaturkontrolle- und Konstanthaltung mittels Wärmematten und Wärmeleuchten sowie rektaler Temperaturmessung. Der Schnitt zur Eröffnung des rechts-lateralen Halssitus erfolgte mit einem medianen Hautschnitt mit leicht lateraler Abweichung. Danach wurde mit einer stumpfen Schere in die Tiefe präpariert, der Thymus und die Speicheldrüsen wurden zur Seite verdrängt und mit einem Haken fixiert, wodurch sich

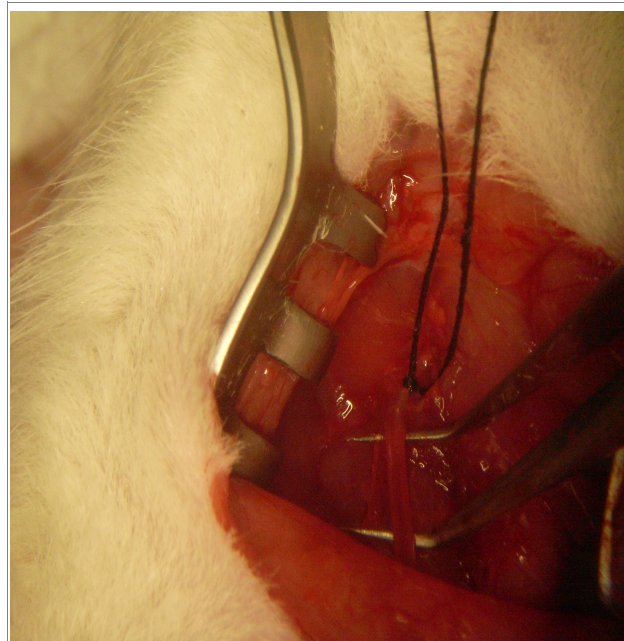


Abbildung 3: Operationssitus.

Auf der Pinzette liegend, stellt sich die A. carotis comm. dar. Mit dem Faden ligiert, kommt die A. carotis ext. zur Darstellung.

das muskuläre Halsdreieck darstellte. Im Anschluss erfolgte die Präparation der Halsschlagader. Dies wurde durch die partielle Durchtrennung des M. sternocl., des M. omohy. und des M. colli long. erreicht. Die V. jug .ext. wurde ebenfalls nach lateral abgelenkt und es folgte die Präparation und vorsichtige Darstellung der A. carotis comm. unter Schonung der abgehenden Gefäße und des N. vag.. Dieser wurde besonders vorsichtig abpräpariert, um vor allem Herzrhythmus und andere, durch Fehlen der parasymphatischen

Innervation hervorgerufenen, Komplikationen zu verhindern. Der Verlauf der Halsschlagader wurde bis zu seiner Aufzweigung in A. carotis ext. und A. carotis int. verfolgt. Um eine intraluminale Okklusion der A. cerebri med. möglich zu machen, musste jeweils die A. carotis comm. und die A. carotis ext. mit einer Ligatur abgebunden werden. Dadurch war es in diesem Zwischenstück möglich, unter relativ geringen Blutverlusten ein Loch in das Gefäß zu schneiden, um anschließend einen Faden mit einer Silikonkappe (*40 medium MCAO suture L56 PR10*, Fadendicke 4-0, Diameter 35 mm, Länge 17 mm von Docol) in das Gefäß einzuführen. Bevor dies jedoch geschah, musste die A. carotis int. in ihrem Verlauf in der Tiefe weiter dargestellt werden, um hier den Abgang der A. pterygo., die nach lateral zieht, sichtbar zu machen. So konnte der Faden dann unter Sicht in die A. cerebri med. vorgeschoben werden. Die gleichzeitige Kontrolle des Blutflussabfalls sicherte die richtige Platzierung des Fadens. Der Faden wurde mit einer Ligatur fixiert und 90 Minuten im Gefäß belassen. Der Blutfluss sollte auf jeweils unter 27,5% des Ausgangswertes des Laserdopplers fallen. Die einzelnen Blutflüsse wurden zu unterschiedlichen Zeiten während der MCAO in einem Operationsprotokoll für jedes einzelne Tier erfasst, wobei Datum der Operation, Gewicht des Tieres, Menge der verabreichten Medikamente und Zeit der MCAO ebenfalls dokumentiert wurden. Nach Erreichen der 90 Minuten wurde der Faden sehr vorsichtig zurückgezogen, um ein Zerreißen der Gefäße zu verhindern. Die Öffnung im Gefäß wurde mit einer vor der Öffnung liegenden Ligatur verschlossen. Ferner wurde die Ligatur der A. carotis ext. entfernt, um eine ausreichende Reperfusion der vorher verschlossenen Gefäßareale zu erreichen, somit auch eine Reperfusion des Infarktareals. Lag diese über 60% des Ausgangswertes des Laserdopplers, so konnte das Tier nun in die Auswertung des Versuches eingeschlossen werden. Die Wunde wurde mit einer Hautnaht verschlossen, desinfiziert und die Ratte wurde in Zellstoff gewickelt in ihren Käfig verbracht. Nach weiteren 90 Minuten bekam die Ratte eine intraperitoneale Injektion nach einem doppelblinden Verabreichungsschema (XG-102- oder Natriumchloridlösung). Im Anschluss sind die einzelnen Operationsschritte anhand von Bildern zusammenfassend beschrieben. Da unter zu Hilfenahme eines Mikroskops gearbeitet wurde, entsprechen die Bilder einer 50-fachen Vergrößerung.

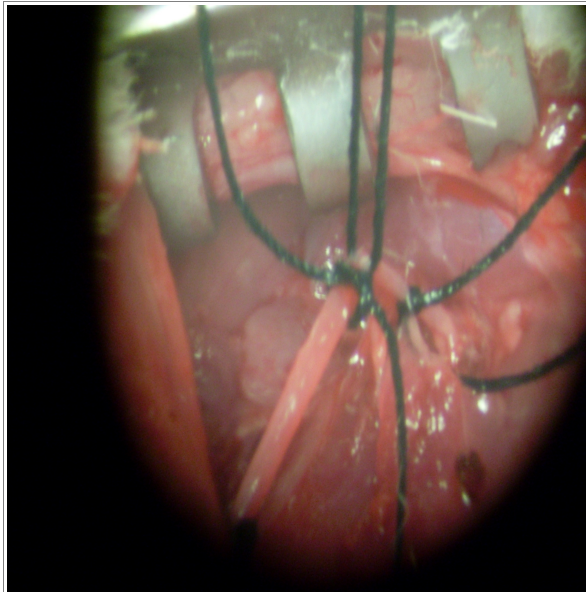


Abbildung 4: Intraoperatives Bild.

Dargestellt werden hier die A. carotis comm., die bereits proximal und distal ligiert ist. Die A. carotis ext. ist ebenfalls ligiert.

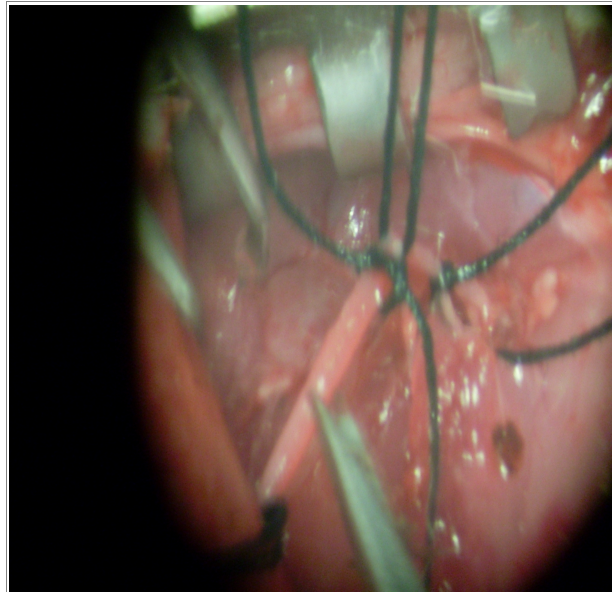


Abbildung 5: Intraoperatives Bild.

Hier wird die A. carotis comm. mit einer Schere perforiert.

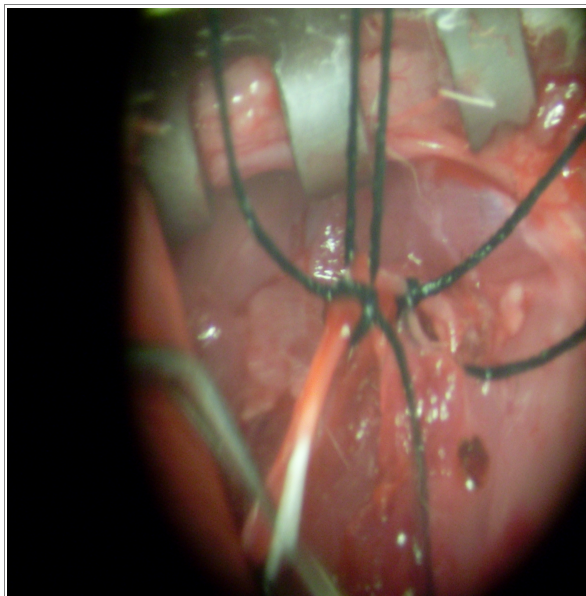


Abbildung 6: Intraoperatives Bild.

Durch die Perforationsstelle in der A. carotis comm. wird der Faden (weiße Fadenspitze) an der A. carotis ext. vorbei, in die A. carotis int., bis hin zur A. cerebri med. vorgeschoben.

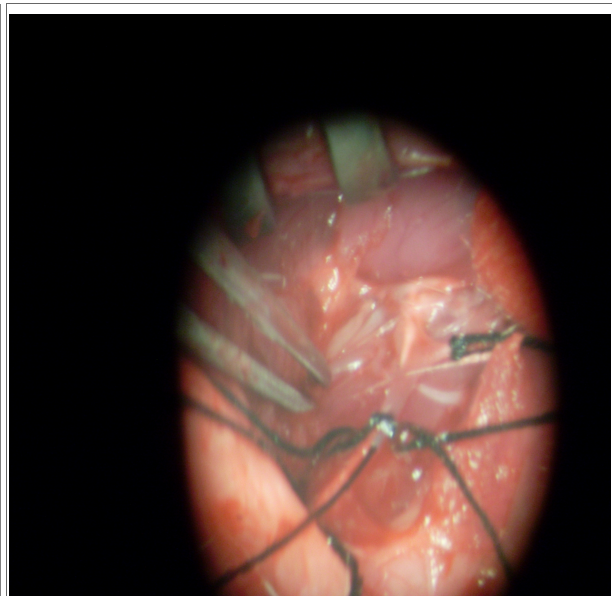


Abbildung 7: Intraoperatives Bild

Dargestellt ist die Endposition des Fadens (schwarz). Die Spitze befindet sich in der A. cerebri med., etwa 16 mm weiter distal. Die Sicherung des Fadens in der A. carotis comm. erfolgte mit einer weiteren Ligatur.

2.5. Der Versuchsaufbau

In folgender Abbildung ist der Versuchsablauf beschrieben.

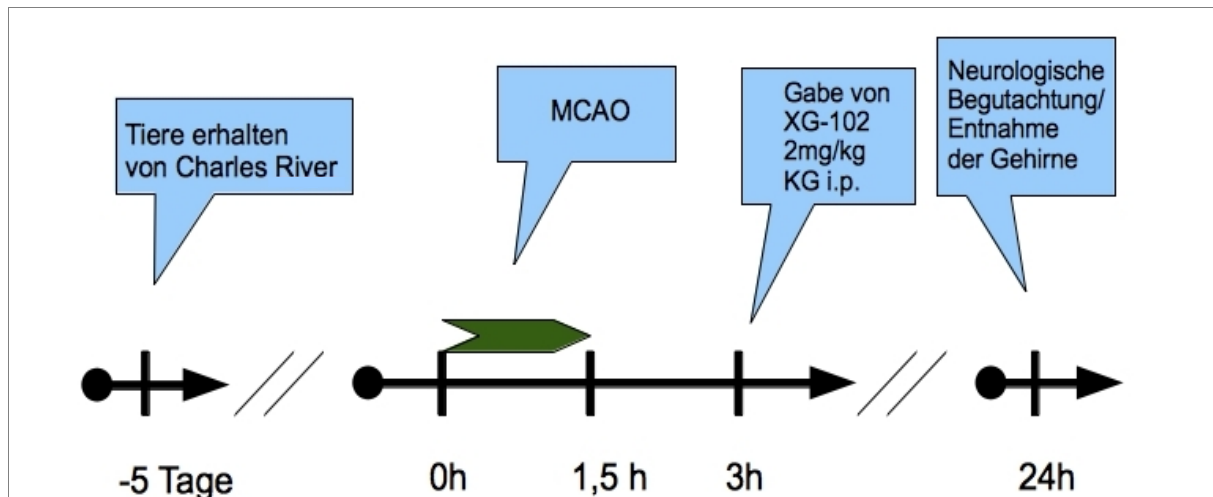


Abbildung 8: Versuchsverlauf.

Nach Erhalt der Tiere und einer 5-tägigen Ruhephase wurde der Versuch durchgeführt. Der Versuch begann mit einer 90-minütigen Ischämie und anschließender Reperfusion. 90 min nach Ende der Ischämie wurde XG-102 (2 mg/kg KG) intraperitoneal appliziert. Nach 24 h erfolgte die neurologische Begutachtung und anschließend die Dekapitierung und Entnahme der Hirne.

2.6. Die Untersuchung von Motorik und Sensorik

Wie anhand des Versuchsverlaufes bereits erklärt, wurden die behandelten Tiere 24 Stunden nach der Operation neurologisch untersucht. Die Untersuchung bezog sich hierbei auf allgemeines Verhalten, sowie auf motorische und sensorische Fähigkeiten nach erfolgtem Schlaganfall. Für Spontanaktivität, Motorik, Sensibilität (Vibration und Berührung), Laufen und Klettern gab es jeweils 3 Punkte, die zu einer Gesamtpunktzahl von 18 addiert wurden. Ab etwa einem Punktwert von 10 waren die Tiere meist stark beeinträchtigt.

2.7. Die Lösungen für die Entnahme der Gehirne und die Gewebefixierung

Zur Vorbereitung für die Entnahme der Gehirne wurden die in der Tabelle beschriebenen Lösungen angefertigt. Das Paraformaldehydpulver wurde über Nacht in leicht alkalischem und destilliertem Wasser bei 60°C gelöst. Erst nach Abkühlen wurde 1x PBS-Lösung dazugegeben, damit das Phosphat durch die Hitze nicht geschädigt wird. Dann wurde die fertige Paraformaldehydlösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 1: Herstellung der Lösungen für die Gewebepfusion und Gewebefixierung

10x PBS	NaCl 1,37 M
	Na ₂ PO ₄ 70 mM
	KH ₂ PO ₄ mM
	KCL 30 mM
1xPBS	Verdünnung 1:10 mit destilliertem Wasser
Paraformaldehydlösung 4%	40 g Paraformaldehyd pro 100 ml 1x PBS

2.8. Die Entnahme der Gehirne und die Gewebefixierung

Nach erfolgter neurologischer Untersuchung wurden die Tiere mit einer Überdosis Chloralhydrat getötet (800 mg/kg KG). Sie wurden auf dem Rücken fixiert und der Thorax wurde mit zwei jeweils großzügigen Schnitten entlang des Rippenbogens geöffnet, zurückgeklappt und mit einer Klemme fixiert. So erhielt man freie Sicht auf das Herz und die Lungen. Das rechte Herzohr wurde mit einer spitzen Schere aufgeschnitten. Außerdem wurde die Herzspitze aufgeschnitten, damit eine Butterfly-Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt werden konnte. Die Kanüle wiederum war mit einer Perfusorspritze verbunden. Unter leichtem Druck wurde über die Spritze erst mit 100ml 1x PBS und anschließend mit 100 ml Paraformaldehydlösung (4%) perfundiert. Die richtige Lage der Kanüle und somit die optimale Perfusion des Herz- und Kreislaufsystems konnte anhand der Entfärbung der Extremitäten, des Schwanzes und der inneren Organe, vor allem der Leber, erkannt werden. Nach der Perfusion wurde der Kopf abgetrennt. Von den oberen Halswirbeln aus, konnten

die dorsalen Wirbelkörper- und Schädelknochenanteile vorsichtig bis zum Os frontale mit einer Zange entfernt werden. Anschließend war es möglich mit einer feinen Pinzette das Gehirn mit Teile des Hirnstammes von der Schädelbasis zu lösen. Das entnommene Gehirn wurde über Nacht in Paraformaldehydlösung (4%) getaucht. Danach erfolgte die weitere Konservierung in 30%-iger Saccharoselösung (30g Saccharose pro 100ml 1x PBS-Lösung) für 2-3 Tage. Nach dieser Behandlung wurden die Gehirne bei -80°C schockgefroren und waren für eine weitere Verarbeitung präpariert.

2.9. Die Cresylviolett-färbung

Nach dem Schockgefrieren wurden die Gehirne im Kryostat (Leica) bei -25°C geschnitten, hierbei wurde im Abstand von 800 µm jeweils ein 40 µm dicker Schnitt durchgeführt. Alle so gewonnenen Schnitte wurden auf *SuperFrost Ultra Plus*-Objektträger (Menzel-Gläser) gezogen und nach 1-stündigem Auftauen mit Cresylviolett (Sigma) angefärbt. Diese Färbung ermöglicht die Unterscheidung zwischen infarziertem und gesundem Gewebe, denn sie färbt intaktes endoplasmatisches Retikulum an. Die Objektträgerständer mit den Objektträgern wurden nacheinander in folgende Glasgefäße mit Färbereagenzien getaucht, wobei die Färbung nach folgendem Schema ablief:

Tabelle 2: Die Cresylviolett-färbung. Färbeschema für die Hirnschnitte auf den Objektträgern.

Färbeschritt	Zeit
1. Aqua bidest	1 min
2. Ethanol, absolut	3 min
3. Xylol	15 min
4. Ethanol, absolut	3 min
5. Aqua bidest.	1 min
6. Cresylviolettlösung (0,1%)	5 min
7. Aqua bidest	1 min
8. Alkohol-Essigsäurelösung (1% Essig)	10 sec
9. Aqua bidest	1 min

Nachdem die gefärbten Objektträger getrocknet waren, wurden sie zum Schutz unter zu Hilfenahme des Schnelleindeckmittels Pertex mit Deckgläsern versehen.

2.10. Messung und Bestimmung der Größe des Infarktareals

Die histologischen Schnitte wurden mit einem Scanner eingelesen, digitalisiert und auf der Festplatte eines Computers gespeichert. Mit Image J, einer Bildanalyse-Software, konnten die gescannten Hirnschnitte vermessen werden. Hierbei erfolgte vor jeder Messung eine standardisierte Kalibrierung des Messsystems, mit Hilfe eines zu jedem Objektträger eingelesenen Millimeterpapierstückes.

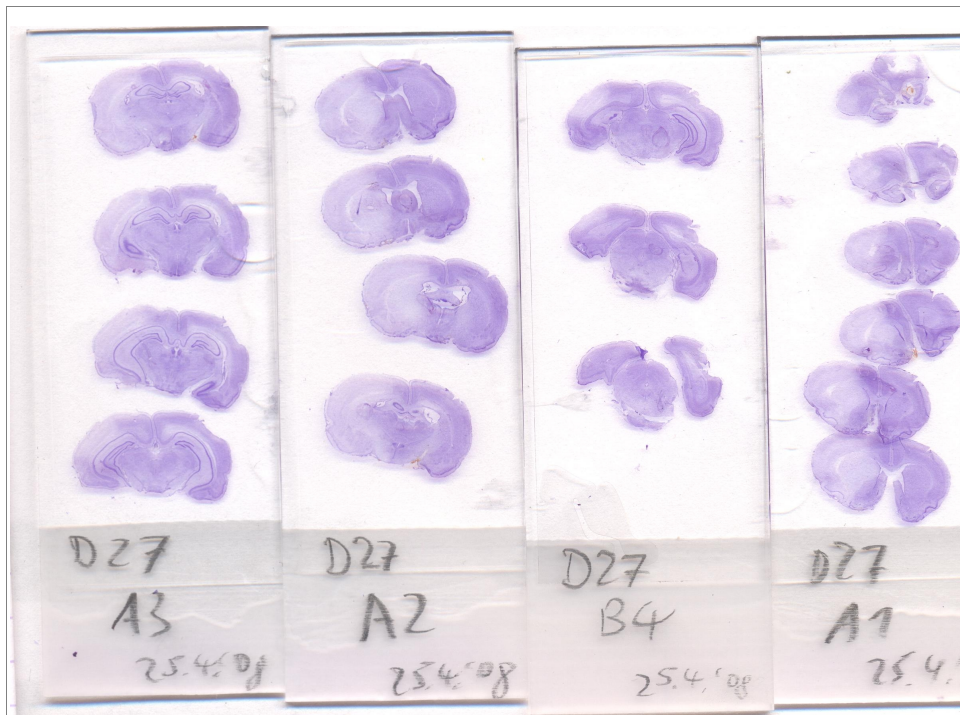


Abbildung 9: Cresylviolett-färbung.

Dargestellt ist ein Objektträger mit Hirnschnitten, die mittels Cresylviolett gefärbt wurden. Die helleren Areale sind mit dem Infarktgebiet gleichzusetzen. Diese wurden ausgemessen und die Berechnung des Infarkt volumens erfolgte mit der oben erwähnten Formel.

So konnte ein fester Maßstab zur Orientierung geschaffen werden. Durch Vergrößerung der einzelnen koronaren Hirnschnitte konnten die Infarktgrenzen besser sichtbar gemacht und somit Infarktareal von gesundem Gewebe besser abgegrenzt werden. Im durch den Infarkt

geschädigten Areal wurden nicht so starke Cresylviolettablagerungen gefunden, d.h. die Färbung war hier somit deutlich blasser. Durch anschließendes Umfahren und Markieren mit der Maus wurde das jeweilige Infarktareal gemessen und dessen Fläche automatisch berechnet. Um schlussendlich das Infarktvolumen bestimmen zu können, wurde aus den einzelnen koronaren Schichten das Volumen mit folgender Formel berechnet:

$$V[\text{mm}^3] = (\sum A[\text{mm}]) \cdot 0,8 \text{ mm}$$

Nach Berechnung der Infarktvolumina für die gewonnenen Hirnschnitte wurden diese gesammelt und dokumentiert.

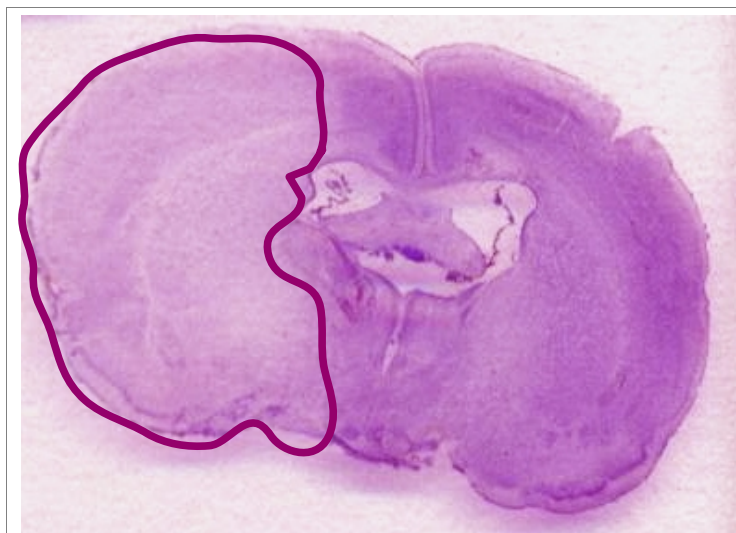


Abbildung 10: Darstellung des Infarktgebietes

Dargestellt ist ein koronarer Hirnschnitt in Cresylviolettfärbung. Eingerahmt ist das Infarktgebiet. Deutlich sichtbar ist die blässere Färbung dieser Hirnhälfte.

2.II. Die statistischen Methoden

Die gesammelten Daten wurden im Anschluss an die Versuchsreihen statistisch ausgewertet. Hierfür galt, dass die Auswertungen möglichst deskriptiv sein sollen, um so die Unterschiede

in den einzelnen Versuchsgruppen sichtbar zu machen. Deshalb wurden in dieser Arbeit für die parametrischen Daten, wie die Größe des Infarktvolumens, der T-Test verwendet, um die einzelnen Stichproben zu vergleichen. Bei den Daten der neurologischen Punktwerte handelt es sich um nicht-parametrische Daten. Daher wurden hier Rangsummen in den einzelnen Gruppen gebildet und verglichen. Wobei der Wilcoxon-U-Test zum Einsatz kam.

3. Auswertung und Ergebnisse

3.1. Die Einschlusskriterien für dieses Experiment

Vor Beginn des Experimentes wurden, ein relativer Blutflussabfall unter 27,5% vom Ausgangswert während der MCAO, außerdem ein relativer Blutflussanstieg nach Beendigung der MCAO auf über 60% des Ausgangsmesswertes und ein neurologischer Punktwert ≤ 15 als Einschlusskriterien festgelegt. Insgesamt wurden für diesen Versuch 108 CD-Ratten operiert, davon haben 65 Tiere den Versuch überlebt. Wiederum 50 Tiere konnten nach den gegebenen Kriterien in die statistische Auswertung einbezogen werden.

3.2. Die Einteilung der Versuchsgruppen

Nach Abschluss der Versuchsreihen, Aufarbeitung und Ausmessung der Hirnschnitte wurde der Versuch entblindet und die jeweiligen Tiere den einzelnen Versuchsgruppen zugeordnet, um die gesammelten Daten statistisch auszuwerten und Information über den möglichen Erfolg des Versuches zu erhalten. Es ergaben sich folgende Gruppeneinteilungen:

Tabelle 3: Einteilung der Versuchsgruppen mit dazugehörigen Daten

Gruppe 1- Verum (n=12)		Gruppe 2- Verum (n=13)		Gruppe 3- Placebo (n=14)		Gruppe 4- Placebo (n=10)	
Reperfusion über 75%		Reperfusion über 60%		Reperfusion über 75%		Reperfusion über 60%	
Infarkt volumen	Neurologie	Infarkt volumen	Neurologie	Infarkt volumen	Neurologie	Infarkt volumen	Neurologie
124,5	10	162,2	7,5	*	8,5	312,8	8,5
284,2	8	158	8	20,9	14,5	250	6
216,8	11,5	217,2	6	83,1	8	231	9,5
360	6	0	8,5	193,4	12	165,3	9,5
210	6,5	78,2	12	*	8	423,1	8,5
282	7,5	0	10,5	288,1	10	381,2	6,5
301	7	195	8	329	8,5	211,8	10,5
285,6	6,5	365,6	9	307	7,5	291,7	9,5
490,3	7,5	306,9	12	*	3	280,7	6
73,7	10	0	11,5	278	8	324,1	4
353,2	8	257,5	7,5	361,9	8		
300,8	6,5	0	12,5	383,1	11		
		416	8,5	276,1	7,5		
				399,9	8		

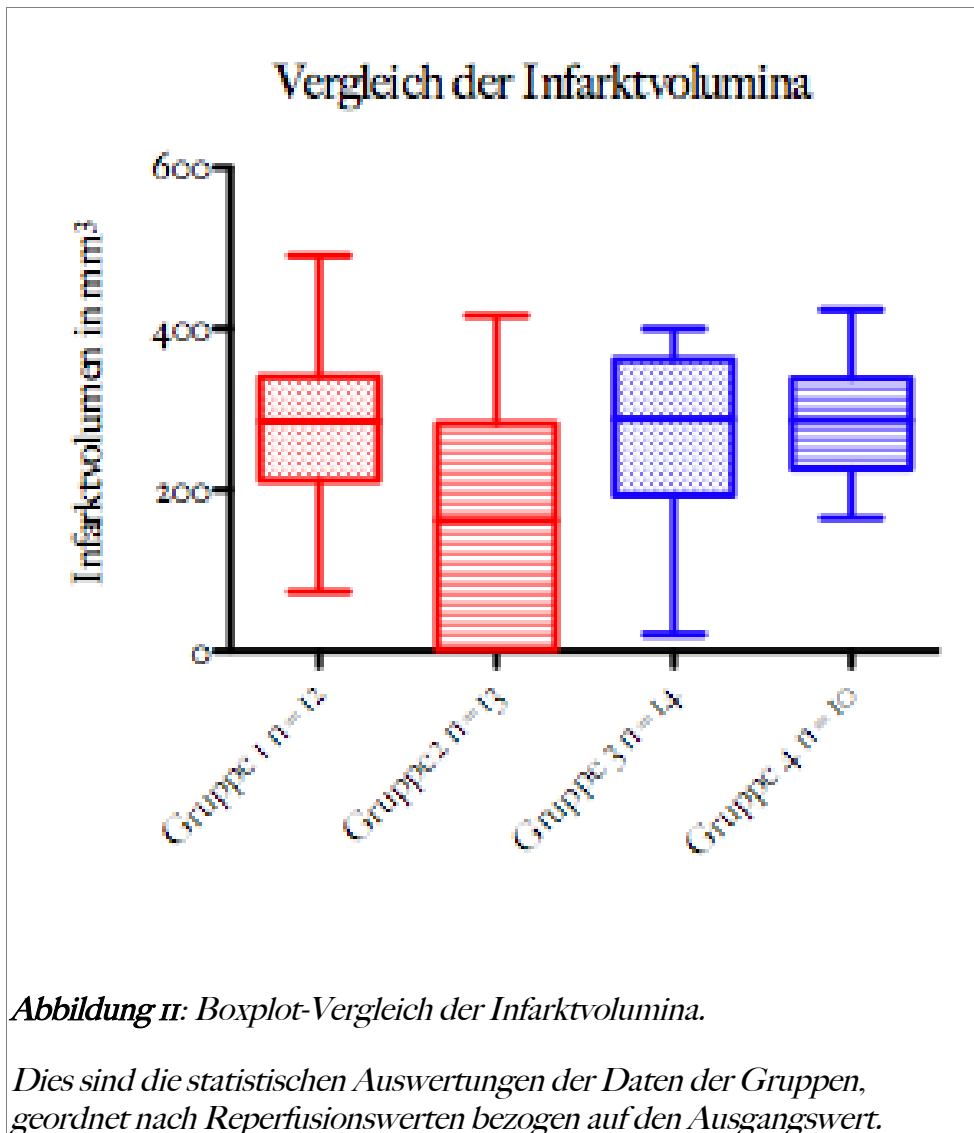
*= Objektträger mit Hirnschnitten konnte nicht angefertigt werden, neurologischer Punktwert wurde jedoch einbezogen.
Das Infarkt volumen ist in mm³ angegeben.

Es wurde eine Normalverteilung der gemessenen Daten vorausgesetzt. Als Signifikanzkriterium wurde ein p-Wert von 0,05 in einem 95%-igen Konfidenzintervall definiert.

3.3. Der Vergleich der Daten in den einzelnen Gruppen

3.3.1. Vergleich der Infarkt volumina

Hierfür wurde die Gesamtheit aller Tiere der Verumgruppe (Gruppe 1+2) und der Placebogruppe (Gruppe 3+4) unabhängig von den Reperfusionswerten mittels zweiseitigem T-Test miteinander verglichen. Die Mittelwerte bezüglich der Infarkt volumina betragen



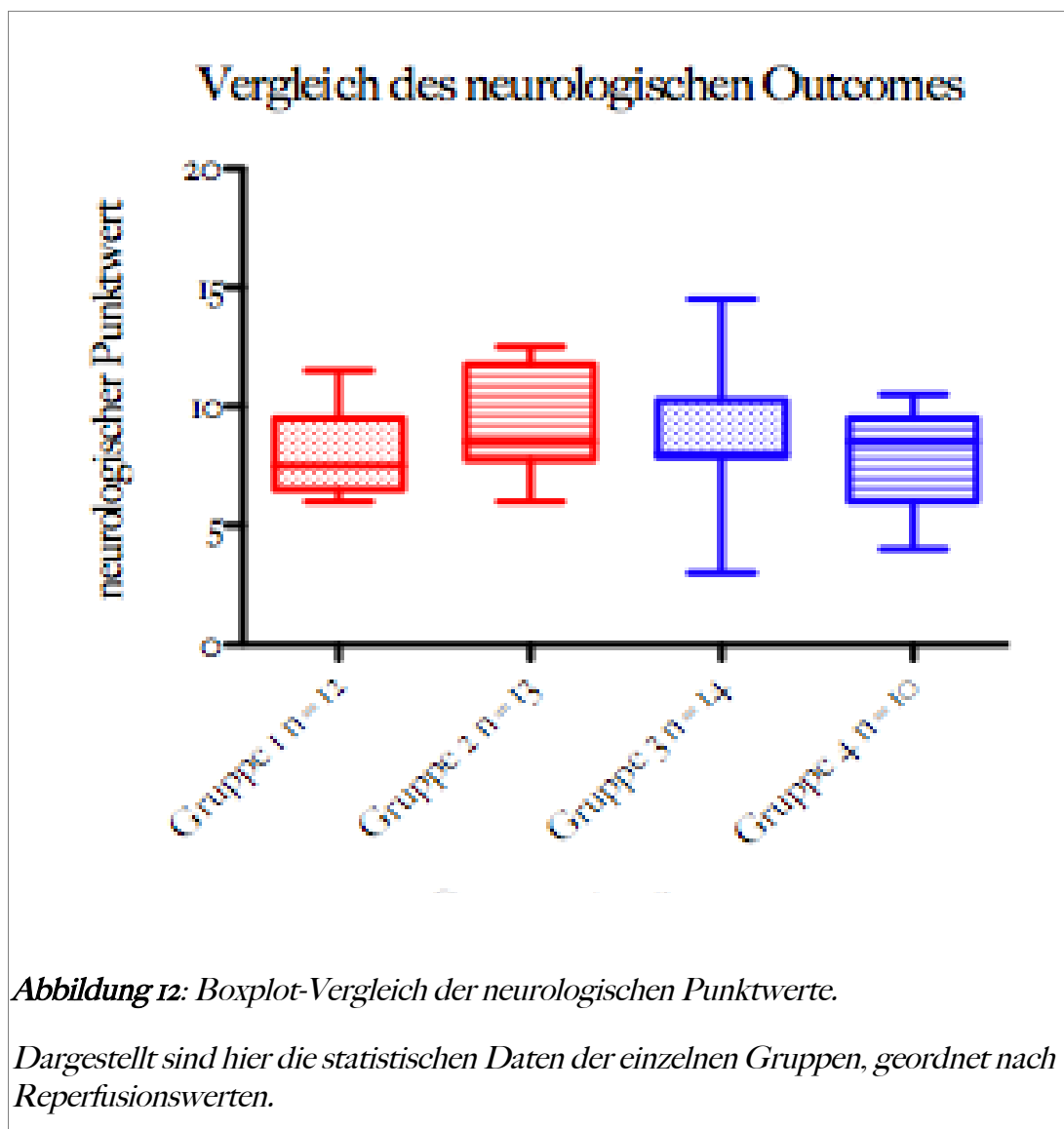
276 mm³±28 mm³ SEM vs. 217,5 mm³±22 mm³ SEM, bei einem p-Wert von 0,11. Der T-Test zeigte demnach keine signifikanten Ergebnisse und somit keinen Unterschied in der Verum- und Placebogruppe, bezogen auf die Gesamtheit aller Tiere. Für die genauere Betrachtung der einzelnen Versuchsgruppen und die bessere Differenzierung wurden ebenfalls einerseits Verum- und Placebogruppen mit Reperfusionswerten über 60%, aber unter 75% und andererseits Verum- und Placebogruppen mit Reperfusionswerten über 75% miteinander verglichen. Hier kam erneut der zweiseitige T-Test zur Anwendung. Vergleicht man nun die Gruppe 2 mit der Gruppe 4, ergibt sich ein p-Wert von 0,02. Somit unterscheiden sich die beiden Gruppen bezüglich ihrer Infarktvolumina signifikant voneinander. Die Mittelwerte unterstützen diese Aussage (Gruppe 4, Mittelwert=287 mm³±40 mm³ SEM, Gruppe 2 Mittelwert=165 mm³± 41 mm³). Hier ist das Infarktvolumen in der Verumgruppe demzufolge kleiner als in der Placebogruppe. Jedoch gab es in der Verumgruppe einige Tiere, deren Infarktvolumen 0 mm³ war. Diese wurden eingeschlossen, denn es war durchaus auffällig, dass diese Tiere nur in der Verumgruppe mit geringen Reperfusionswerten zu finden waren. Nimmt man diese jedoch Tiere aus den Berechnungen heraus, ergibt sich ein p-Wert von 0,28 (Gruppe 4, Mittelwert=287 mm³±40 mm³ SEM vs. Gruppe 2, Mittelwert=240 mm³±39 mm³), somit unterscheiden sich diese Gruppen dann nicht signifikant voneinander. Diese Testmethode wurde ebenfalls für die Gruppen 1 und 3 angewandt. Hier ergaben sich folgende Ergebnisse: Der p-Wert betrug 0,87 und der Mittelwert in Gruppe 1 274 mm³±32 mm³ SEM und in Gruppe 3 265 mm³±36 mm³ für die beiden zu vergleichenden Stichproben. Wiederum konnten hier laut Test keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Statistik. (Gruppe 2a schließt die Tiere mit Infarktvolumen 0 mm³ aus.)

	Gruppe 1/2	Gruppe 3/4	Gruppe 1	Gruppe 3	Gruppe 2/2a	Gruppe 4
Mittelwert (mm ³)	276	217,5	274	265	287/240	165
SEM (mm ³)	28	22	32	36	40/39	41
p-Wert	0,11		0,87		0,02/0,28	
Reperfusion			Reperfusion<75%		Reperfusion>75%	

3.3.2. Vergleich der Neurologie

Um nicht nur ein Ergebnis über die Größenunterschiede der Infarkt volumina in den einzelnen Gruppen zu bekommen, wurden ebenfalls auch die neurologischen Punktwerte der Tiere, welche 24 h nach Beendigung der MCAO gewonnen wurden, ausgewertet. Es wurde ähnlich vorgegangen wie bei der Auswertung der Infarkt volumina, jedoch wurde hier der Wilcoxon-U-Test für nicht-parametrische Daten angewandt.



Zunächst wurden wieder die Gruppen 1 und 2 zusammengefasst und dementsprechend mit den Gruppe 3 und 4 verglichen. Hier ergab sich laut Rangsummentest ein p-Wert von 0,95.

Die beiden Gruppen unterscheiden sich also nicht in ihren neurologischen Ergebnissen. Testete man die Gruppen 2 und 4 gegeneinander, ergab sich ein p-Wert von 0,26, bei den Gruppen 1 und 3 ein Wert von 0,16. Es gab somit weder in den Verum- und Placebogruppen mit hohen Reperfusionswerten, noch in den Gruppen mit geringen Reperfusionswerten eine signifikante Verbesserung bezüglich der Neurologie nach Gabe von XG-102 in der Verumgruppe.

4. Diskussion

4.1. Untersuchung der Wirkung von XG-102 an der Ratte

In dieser Arbeit sollte der Effekt von XG-102 (D-JNKi) auf das zentrale Nervensystem nach cerebraler Ischämie und anschließender Reperfusion untersucht werden. JNK-Inhibitoren wurden bereits mehrfach erfolgreich in *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten eingesetzt und haben signifikant zu einer Verbesserung der Protektion der Nervenzelle gegenüber äußeren pathophysiologischen Einflüssen geführt. Dies gilt sowohl für den Einfluss toxischer Stoffe, als auch für das Ereignis einer Ischämie und dem damit verbundenen Substratmangel. Beweisend hierfür waren zahlreiche Versuche am Mausmodell. In dieser Arbeit sollte der Einfluss von JNK-Inhibitoren auf das Rattenhirn untersucht werden.

4.2. Die Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei dem durchgeführten Experiment konnten keine, allenfalls geringe Effekte des Peptids auf die definierten Parameter nachgewiesen werden. Warum in dieser Studie, im Unterschied zu publizierten anderen Studien, keine protektive Wirkung von XG-102 gezeigt werden konnte, soll im Folgenden diskutiert werden. Das einzig signifikante Ergebnis bezüglich einer Verkleinerung des Infarktolumens konnte in der Gruppe 2 verglichen mit der entsprechenden Placebogruppe 4 erzielt werden. Jedoch waren hier 3 Tiere eingeschlossen, die zwar eine wahrnehmbare neurologische Beeinträchtigung aufwiesen, die dem klinischen Bild eines Schlaganfalls entsprach, allerdings kein pathologisches Korrelat bei der Messung des Infarktgebietes in den histologischen Hirnschnitten aufwiesen. Eine komplette Protektion durch das Peptid XG-102 ist jedoch nicht anzunehmen und damit unwahrscheinlich. Wenn diese Tiere aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen werden, ergibt sich im Vergleich der Infarktolumina zwischen den genannten Gruppen kein Unterschied. Der Versuch brachte also keinen eindeutig signifikanten Nachweis einer Protektion, sowohl in Bezug auf die Infarktgröße, als auch auf die Neurologie.

4.3. Erklärungen für ein Ausbleiben eines protektiven Effektes

Es sind keine methodischen Fehler bei der Durchführung des Experimentes ersichtlich geworden. Auch die Reproduzierbarkeit der Infarkte wurde durch standardisiertes Durchführen und ständiges Messen des Blutflusses während des Versuches geprüft. Man konnte also davon ausgehen, dass stets gleiche Bedingungen herrschten. Warum konnten nun aber in anderen Arbeiten protektive Effekte gezeigt werden?

Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben eines Erfolges des Versuches ist in der Applikationsart des Peptids zu sehen. Die intraperitoneale Gabe von XG-102, wie im Versuch erfolgt, ist möglicherweise nicht suffizient genug und der Wirkstoff gelangt nicht ausreichend an Ort und Stelle, um seine Wirkung zu entfalten. Hier anzuführen sind die Ergebnisse von Arbeiten, die ebenfalls an Ratten durchgeführt wurden. In der Arbeit von Guan et al., 2005 wurde der JNK-Inhibitor SP600125 intraventrikulär appliziert und eine deutliche Abnahme der Aktivität aller JNK-Typen war sowohl 30 Minuten, als auch 3 Tage nach Ischämie und Reperfusion zu verzeichnen. Hier erfolgte die Gabe des Peptids jedoch 20 Minuten vor Ischämie und die Ischämiezeit betrug lediglich 15 Minuten. Somit sind der Behandlungszeitpunkt (Prä- vs. Postkonditionierung) und die Infarktdauer (15 vs. 90 min) unterschiedlich. Die Dauer der Ischämie und die Schwere des Infarkts sind also nicht mit der in dieser Arbeit zu vergleichen. Außerdem wurde hier das Augenmerk nicht auf die Infarktgröße und Beeinträchtigung der Neurologie gerichtet, sondern auf den Nachweis der Aktivität von JNK im Gewebe mittels immunhistologischen Untersuchungen.

Eine weitere Arbeit (Esneault et al., 2008), in der die Wirkung von XG-102 (D-JNKi) an der Ratte untersucht wurde, zeigte neuroprotektive Effekte, d.h. eine deutliche Verkleinerung des Infarktvolumens und ein besseres funktionelles Erholen bzw. weniger motorische und sensorische Ausfälle nach Ischämie. Die Gabe des Wirkstoffes erfolgte intravenös und in unterschiedlichen Dosierungen, bei gleichem Schlaganfallmodell und gleichen Ischämiezeiten. Es wurde allerdings ein anderer Rattenstamm verwendet (CD-Ratte vs. Sprague-Dawley-Ratte) und die Narkose erfolgte mittels Isofluran. Weiterhin wurden sowohl die Messung des Infarktvolumens, als auch die neurologische Bewertung der Ratte

erst nach 3 Tagen durchgeführt. Die Frage inwieweit dort körpereigene physiologische Prozesse, die unabhängig von der Apoptose und JNK-Inhibition zur Schadensbegrenzung beigetragen haben (vgl. Dirnagl et al., 2004), ist zu stellen. Ein weiterer Unterschied betrifft die Einschlusskriterien bezüglich der Blutflussabfälle unter Ischämie, denn in der Arbeit von Esneault et al., 2008 wurden alle Tiere eingeschlossen, deren Blutfluss auf 25-75% vom Ausgangswert abgefallen war. In dieser Arbeit wurden nur Tiere eingeschlossen, deren Blutfluss unter 27,5% des normalen Blutflusses in der A. cerebri med. sank. Somit waren die Mittelwerte der infarzierten Gebiete größer, als in der zu vergleichenden Arbeit. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Wirkung von XG-102 von der Größe und Schwere des Infarktes abhängt. Je größer der Infarkt, desto geringer die protektive Wirkung des Peptids. Die Rolle der Reperfusion ist ebenfalls in Frage zu stellen. Welchen Einfluss hat die Reperfusion nach einer cerebralen Ischämie mit gravierendem Infarktausmaß? Die reaktive Hyperämie nach Sauerstoffmangel und die Entstehung von toxisch-reaktiven Sauerstoffmetaboliten überschattet möglicherweise die Wirkung des JNK-Inhibitors und trägt zu einer weiteren Schädigung des Gewebes bei.

XG-102 wurde in einer weiteren Studie erfolgreich eingesetzt und protektive Ergebnisse konnten verzeichnet werden. Sie wurde an ICR-CD₁ Mäusen in permanente MCAO durchgeführt. 3 Stunden nach Beginn der Ischämie wurde das Peptid intraventrikulär appliziert und führt 24 Stunden nach Ischämie zu einer signifikanten Verkleinerung des Infarktgebietes und zu einem besseren funktionellen Erholen der Maus (Hirt et al., 2004).

Ob nun bei der Maus die selben pathophysiologischen Prozesse wie in der Ratte stattfinden und ob diese zu vergleichen sind, ist fraglich. Somit sind Effekte der JNK-Inhibition im Mausmodell nicht unbedingt auf die Ratte zu übertragen.

Hier soll noch die Studie von Wiegler et al., 2008 erwähnt werden, in der XG-102 erfolgreich im Mausmodell getestet wurde und es zu einer signifikanten Abnahme des Infarktolumens nach cerebraler Ischämie kam. Es wurde hier im Unterschied die Gabe des JNK-Inhibitors mit dem rekombinanten *tissue*-Plasminogen-Aktivator (rtPA) nach Ischämie kombiniert.

Tabelle 5: Vergleich der Promotionsarbeit (Rogge) mit relevanten Studien an der Ratte.

	Rogge	Esneault et al. (2008)	Guan et al. (2005)
Inhibitor	XG-102	XG-102	SP600125
Applikationsform	intraperitoneal	intravenös	intravenös
Tierstamm	CD-Ratten	Sprague-Dawley-Ratten	Sprague-Dawley-Ratten
Schlaganfallmodell	MCAO nach Longa et al.	MCAO nach Longa et al.	Four-vessel occlusion nach Pulsinelli et al.
Schlaganfalltyp	reversibel	reversibel	reversibel
Schlaganfalldauer	90 min	90 min	15 Minuten
Prä-/Postkonditionierung	90 min nach Ende Ischämie	90 min nach Ende Ischämie	20 min vor Ischämie
Einschlusskriterien	relativer Blutflussabfall <27,5% vom Ausgangswert unter Ischämie, relativer Blutflussanstieg auf >60% des Ausgangswertes	relativer Blutflussabfall unter Ischämie zwischen 25-75% des Ausgangswertes	

5. Zusammenfassung

XG-102 ist ein neuartiger JNK-Inhibitor, der spezifisch die Interaktion von JNK-Stresskinasen mit ihren Substraten blockiert. Die neuroprotektiven Eigenschaften dieses Peptidinhibitors XG-102 und von anderen JNK-Inhibitoren konnten bereits in zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten gezeigt werden. XG-102 befindet sich bereits in Phase I- und 2a-Studien am Menschen. Dies macht ihn auch zu einem interessanten Neuroprotektivum in der Behandlung eines experimentellen Schlaganfalls. In dieser Arbeit sollte nun der neuroprotektive Effekt von XG-102 im Rattenmodell untersucht werden. Hierfür wurde an der Ratte eine fokale, transiente Ischämie der rechten A. cerebri med. für 90 min induziert. 90 min nach Ende der Ischämie wurde das Peptid intraperitoneal appliziert, eine entsprechende Placebogruppe wurde zur Kontrolle herangezogen. Nach 24 h wurden Motorik und Sensorik der Tiere untersucht. Die Gehirne wurden zur Herstellung und Färbung von Hirnschnitten entnommen und anschließend erfolgte die Ausmessung der Infarkt volumina anhand dieser Hirnschnitte. Sowohl die Größe der Infarkt volumina, als auch die neurologischen Bewertung zwischen mit XG-102 behandelten und unbehandelten Infarkttieren wurden miteinander verglichen.

XG-102 zeigte keine signifikante Wirkung. Weder für die Infarktgröße, noch für die neurologischen Ergebnisse könnten Unterschiede zwischen den behandelten Tieren und der Placebogruppe festgestellt werden. Auch eine differenziertere Betrachtung der Gruppen bezüglich der Reperfusionswerte (Reperfusion über 60% bzw. 75% vom Ausgangswertes) brachte keine signifikanten Ergebnisse. In andere Studien hingegen konnten im Mausmodell und an Ratten positive Effekte gezeigt werden. Jedoch waren die Studien unterschiedlich bezüglich des Versuchsdesigns und der Einschlusskriterien, die möglicherweise dieses Ergebnis erklären können. Als wichtigste Unterschiede sind hier die Applikationsart des Wirkstoffes (i.p. vs. i.v.), die Intensität und Dauer der induzierten Ischämie und somit die Schwere des Infarkts zu nennen. Ob nun die Wirkung von XG-102 bei zunehmender Infarktschwere abnimmt oder experimentelle Fehlerquellen für das Ausbleiben eines protektiven Effektes verantwortlich sind, muss offen bleiben und bedarf weiterer Versuche.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stereotaktischer Apparat.....	7
Abbildung 2: Laserdoppler.....	8
Abbildung 3: Operationssitus.....	9
Abbildung 4: Intraoperatives Bild.....	II
Abbildung 5: Intraoperatives Bild.....	II
Abbildung 6: Intraoperatives Bild.....	II
Abbildung 7: Intraoperatives Bild.....	II
Abbildung 8: Versuchsverlauf.....	12
Abbildung 9: Cresylviolett-färbung.....	15
Abbildung 10: Darstellung des Infarktgebietes.....	16
Abbildung 11: Boxplot-Vergleich der Infarkt volumina.....	19
Abbildung 12: Boxplot-Vergleich der neurologischen Punktwerte.....	21

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herstellung der Lösungen für die Gewebepfusion und Gewebefixierung.....	13
Tabelle 2: Die Cresylviolettfrbung. Frbeschema für die Hirnschnitte auf den Objektträgern.....	14
Tabelle 3: Einteilung der Versuchsgruppen mit dazugehörigen Daten.....	18
Tabelle 4: Zusammenfassung der Statistik. (Gruppe 2a schließt die Tiere mit Infarkt volumen 0 mm ³ aus.).....	20
Tabelle 5: Vergleich der Promotionsarbeit (Rogge) mit relevanten Studien an der Ratte.....	26

Literaturverzeichnis

- Barr RK, Kendrick TS, Bogoyevitch MA (2002) Identification of the critical features of a small peptide inhibitor of JNK activity. *J Biol Chem* 277: 10987-10997.
- Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH (1996) Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res* 79: 162-73.
- Bogoyevitch MA, Boehm I, Oakley A, Ketterman AJ, Barr (2004) Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 1697: 89-101.
- Bogoyevitch MA, Arthur PG (2008) Inhibitors of c-jun N-terminal kinases-JNK no more? *Biochimica et Biophysica Acta* 1784: 76-93.
- Bonny C, Oberson A, Negri S, Sauser C, Schorderet DF (2001) Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes* 50: 77-82.
- Carboni S, Hiver A, Szyndralewicz C, Gaillard P, Gotteland J, Vitte P (2004) AS601245: a c-Jun NH₂-terminal protein kinase inhibitor with neuroprotective properties. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 25-32.
- Carboni S, Antonsson B, Gaillard P, Gotteland J, Gillon J, Vitte P (2005) Control of death receptor and mitochondrial-dependent apoptosis by c-jun N-terminal kinase in hippocampal CA1 neurons following global transient ischemia. *J Neurochem* 92: 1054-1060.
- Dirnagl U, Simon RP, Hallerbeck JM (2003) Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends in Neurosciences* 26: 248-54.
- Esneault E, Castagne V, Moser P, Bonny C, Bernaudin M (2008) D-JNKi, a peptide inhibitor of c-jun N-terminal kinase, promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* 152: 308-320.
- Fan M, Goodwin M, Vu T, Brantley-Finley C, Gaarde WA, Chambers TC (2000) Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade. *J Biol Chem* 275: 29980-5.
- Ferrer I, Ballabriga J, Pozas E (1997) Transient forebrain ischemia in adult gerbil is associated with a complex c-Jun response. *Neuroreport* 8: 2483-7.
- Ferrer I, Friguls B, Dalfo E, Justicia C, Planas AM (2003) Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29: 472-22.
- Graham SH, Chen J, Clark RS (2001) Bcl-2 family gene products in cerebral ischemia. *J Neurotrauma* 17: 831-41.

-
- Gao Y, Signore AP, Yin W, Cao G, Yin X, Sun F, Luo Y, Graham SH, Chen J (2005) Neuroprotection against focal ischemic brain injury by inhibition of c-jun N-terminal kinase and attenuation of the mitochondrial apoptosis-signalling pathway. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 25: 694-712.
- Guan Q, Pei D, Zhang Q, Hao Z, Xu T, Zhang G (2005) The neuroprotective action of SP600125, a new inhibitor of JNK, on transient brain ischemia/reperfusion-induced neuronal death in rat hippocampal CA1 via nuclear and non-nuclear pathways. *Brain Res* 1092: 51-59.
- Guan Q, Pei D, Lix X, Wang X, Xu T, Zhang G (2006) Neuroprotection against ischemic brain injury by SP600125 via suppressing the extrinsic and intrinsic pathway of apoptosis. *Brain Res* 1092: 36-46.
- Guo B, Zhai D, Cabezas E, Welsh K, Nouraini S, Satterthwait AC, Reed JC (2003) Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* 423: 456-61.
- Herdegen T, Claret FX, Kallunki T, Martin-Villalba A, Winter C, Hunter T, Karin M (1998) Lasting N-terminal phosphorylation of c-jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neuroscience* 18: 5124-35.
- Herdegen T, Waetzig V (2001) AP-1 proteins in the adult brain: facts and fiction about effectors of neuroprotection and neurodegeneration. *Oncogene* 20: 2424-37.
- Hirt L, Badaut J, Thevenet J, Granziera C, Regli L, Maurer F, Bonny C, Bogousslavsky J (2004) D-JNK1I, a cell-penetrating c-jun-N-terminal kinase inhibitor, protects against cell death in severe cerebral ischemia. *Stroke* 35: 1738-1743.
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7: 2135-48.
- Kyriakis JM, Baberjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369: 156-60.
- Kuan CY, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ, Rakic P (2003) A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic protection. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15184-9.
- Kuan C, Burke RE (2005) Targeting the JNK signaling pathway for stroke and Parkinson's diseases therapy. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4: 63-67.
- Lawrence MS, Ho DY, Sun GH, Steinberg GK, Sapolsky RM (1996) Overexpression of Bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS neurons against neurological insults *in vitro* and *in vivo*. *J Neuroscience* 16: 486-96.
- Lei K, Davis RJ (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependant apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2432-7.

-
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. *Stroke* 20: 84-91.
- Manning AM, Davis RJ (2003) Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov* 2: 554-65.
- Markgraf CG, Green EJ, Hurwitz BE, Morikawa E, Dietrich WD, McCabe PM, Ginsberg MD, Schneiderman N (1992) Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 575: 238-246.
- Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C et al (1994) Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13: 1017-30.
- Mielke K, Herdegen T (2000) JNK and p38 stresskinases- degenerative effectors of signal-transduction-cascade in the nervous system. *Prog Neurobiol* 61: 45-60.
- Nomura M, Shimizu S, Sugiyama T, Narita M, Ito T, Matsuda H, Tsujimoto Y (2003) 14-3-3 interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J Biol Chem* 278: 2085-65.
- Okuno S, Saito A, Hayashi T, Chan PH (2004) The c-jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 24: 7879-7887.
- Recipi M, Borsello T (2006) JNK pathway as therapeutic target to prevent degeneration in the central system. *Adv Exp Med Biol* 588: 145-155.
- Waetzig V, Herdegen T (2005) Context-specific inhibitors of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci* 26: 455-461.
- Wiegler K, Bonny C, Coquoz G, Hirt L (2008) The JNK inhibitor XG-102 protects from ischemic damage with delayed intravenous administration also in the presence of recombinant tissue plasminogen activator. *Cerebrovasc Dis* 26: 360-366.
- Wu DC, Ye W, Che XM, Yang GY (2000) Activation of mitogen-activated protein kinases after permanent cerebral artery occlusion in mouse brain. *J Cerebr Blood Flow Metab* 10: 1320-30.
- Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking Jnk3 gene. *Nature* 389: 865-870.
- Yatsushige H, Ostrowski RP, Tsubokawa T, Colohan A, Zhang JH (2007) Role of c-Jun N-terminal kinase in early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosci. Res.* 85: 1436-1448.
- Yin XM, Luo Y, Cao G, Bai L, Pei W, Kuharsky DK, Chen J, (2002) Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. *J Biol Chem* 277: 42047-81.

Zhao H, Yenari MA, Cheng D, Sapolsky RM, Steinberg GK (2003) Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity. *J Neurochem.* 85:1026-36.

Herzlich danken möchte ich an dieser Stelle meinem Professor Herrn Dr. Thomas Herdegen. Einerseits für die Möglichkeit im Rahmen dieser Doktorarbeit am Pharmakologische Institut der Universität Kiel mit all den materiellen, teilweise auch kostspieligen Dingen zu arbeiten und andererseits für seine stete und gute Betreuung, sowie für die zahlreichen Hilfestellungen und Anregungen. Er hatte immer ein offenes Ohr und eine offene Tür.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. Ruwen Böhm, der mich ebenfalls wirklich zuverlässig und gut betreut hat und sich all meiner Fragen, Nöte und Sorgen annahm. Auch den Mitarbeitern aus der zentralen Tierhaltung und dem Pharmakologischen Institut möchte ich für ihre Hilfe und netten Worte danken.

Zu guter letzt gilt mein Dank noch meiner Familie und meinen Freunden. Allen voran meinen Eltern, die mich nicht nur während der Zeit dieser Doktorarbeit unterstützt haben, sondern dies immer tun. Dafür bin ich besonders dankbar und darüber sehr glücklich!