
Aus der Neurologische Klinik und Poliklinik Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

Die Rolle des MMP-3 bei experimenteller zerebraler Ischämie und Reperfusion im Tiermodell

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von Sebastian Schuhmacher aus
Haltern am See
2011

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof Dr. G. Hamann

Mitberichterstatter: Prof Dr. Roman Haber / Prof Dr. Christian
Behl

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dr. Dorothee Burgraf: _____

Dekan: Prof Dr. med Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2011

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
1. Schlaganfall	1
1.1. Ursachen und Folgen	1
2. Mikrogefäße	2
2.1. Blut-Hirn-Schranke	2
2.2. Basalmembran	3
2.3. Mikrovaskuläre Schädigung nach Ischämie/Reperfusion	3
3. Therapie Ansätze	4
3.1. Lysetherapie	4
3.2. TNK	6
3.3. Hypothermie	6
3.4. MMP-Inhibitoren	6
3.5. MMP	7
3.6. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)	10
3.7. EMMPRIN	10
4. Fragestellung	11
B. Material und Methoden	12
1. Material	12
1.1. Chemikalien	12
2. Tiere und Tierhaltung	12
3. Fadenmodell bei Ratten, MCAO (median cerebral artery occlusion)	12
3.1. Wahl und Beschreibung des Modells	12
3.2. Thrombolyse Therapie mit rt-PA und TNK	14
3.3. Hypothermiebehandlung	15
3.4. Therapie mit Doxycyclin und Calbiochem MMP-Inhibitor	15
4. Infarktmetrie	16
5. Biochemische Analysen	16
5.1. Gewebeextraktion; Aufarbeitung der Proben	16
5.2. SDS- Gel-Elektrophorese	17
5.3. Western Blots	17
5.4. Zymographien/ Reverse Zymographien	18
5.5. Coomassie Färbung	18
6. Auswertung	18
6.1. Proteinbestimmung	18
6.2. Die Auswertung der biochemischen Daten	18
7. Statistik	18
8. Tiergruppen	19
C. Ergebnisse	20
1. Etablierung des MMP-3 Westernblots	20
1.1. Lysepuffer	20
1.2. Antikörper	20
1.3. Versuch mit verschiedenen Blockierlösungen	21
2. MMP-3 nach Ischämie und Reperfusion (I3R24)	22
2.1. Ratte	22
2.2. Maus	22

3.	Verschiedene Ischämie und Reperfusionzeiten	23
3.1.	Verschiedene Ischämiezeiten bei der Ratte	23
3.2.	Verschiedene Ischämiezeiten bei der Maus	24
3.3.	Verschiedene Reperfusionzeiten Maus	24
4.	MMP-3 Aktivität bei Thrombolyse	25
4.1.	rt-PA in verschiedenen Konzentrationen	25
4.2.	Unterschiede in der Wirkung auf MMP-3 von rt-PA und Tenekteplase (TNK) ...	29
5.	MMP-3 Aktivität unter Hypothermie und kombinierter Hypothermie / rt-PA Therapie	30
6.	Einfluss von MMP-Inhibitoren auf MMP-3	30
7.	Auswirkung von Gendeletionen des MMP Systems (TIMP-1 und MMP—9) auf MMP-3	31
D.	Diskussion	32
1.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit	32
2.	Rolle der MMP-3	33
2.1.	Ischämie/Reperfusion	33
2.2.	Zeitverlauf	34
2.3.	Thrombolyse	34
2.4.	Hypothermie und Kombination mit der Thrombolyse mit rt-PA	35
2.5.	MMP-Inhibitoren	36
2.6.	Einfluss von MMP-9 und TIMP-1 Gendeletion auf MMP-3.....	37
3.	Ausblick	38
E.	Literatur	41
F.	Anhang	51
G.	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
H.	Danksagung	52

A. Einleitung

1. Schlaganfall

Der Schlaganfall (ischämischer Hirninfarkt) stellt eine der häufigsten Erkrankungen dar und steht nach Herzerkrankungen und Krebs an Platz drei der Todesursachen in Deutschland. Nach einem Jahr beträgt die Mortalität 25%; etwa 50% der Patienten mit einem ischämischen Hirninfarkt sind älter als 70 Jahre und Männer sind in fast allen Altersgruppen mehr betroffen. Die funktionellen Folgeschäden des Schlaganfalls sorgen für die höchste Rate an dauerhaften Behinderungen, außerdem verursacht er von allen Krankheiten die höchsten Behandlungs- und Rehabilitationskosten. Dies legt nahe, dass der Forschung sowohl hinsichtlich der Ursachen, als auch bezüglich der Verhinderung von Krankheitsfolgen, eine besondere Bedeutung zukommt.

1.1. Ursachen und Folgen

Die zerebrale Ischämie definiert sich als eine Unterbrechung der Blutversorgung, bzw. Minderperfusion des Gehirns sei es durch eine Ischämie, oder eine Unterbrechung der Blutversorgung durch eine zerebrale Blutung. Der Großteil der Hirninfarkte ist ischämischen Ursprungs. Es lassen sich zwei Arten der Ischämie unterscheiden. Die globale Ischämie ist definiert als eine, das ganze Hirn betreffende, Durchblutungsstörung wie sie zum Beispiel beim Herzkreislaufstillstand auftritt. Etwa 85% aller Schlaganfälle beruhen auf einer fokalen Ischämie, die überwiegend durch Gefäßverschlüsse ausgelöst wird. Die fokale Ischämie manifestiert sich gegenüber der globalen Ischämie in einer durch Kollateralisierung modifizierten Morphologie und Dynamik. Der Verschluss einer Arterie bewirkt einen Abfall des regionalen zerebralen Blutflusses. Da das betroffene Versorgungsgebiet über ein Kollateralsystem mit angrenzenden Gebieten verknüpft ist, ist das Ausmaß der Durchblutungsstörung am stärksten im Zentrum des Infarktes, dem sog. „Core“, ausgeprägt. In der Randzone bleibt durch die Kollateralisierung ein Blutfluss von 10-20% erhalten (Astrup et al., 1981). In Abhängigkeit von der Art des Verschlusses, bzw. seiner Dauer kommt es durch die Minderversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff zu Veränderungen im Gleichgewicht des Hirnstoffwechsels und in Folge zu komplexen Schädigungsvorgängen. Faktoren, die dabei eine erhebliche Rolle spielen, sind unter anderem die Periinfarkt-Depolarisation, Störungen der Gefäßregulation und Blut-Endothel-Interaktionen (Astrup et al., 1981). Außerdem wird das Maß der ischämischen Schädigung durch sekundäre Mechanismen beeinflusst welche die mikrovaskuläre Integrität negativ beeinflussen. Dazu zählen unter anderen die nichtzellulären proteolytischen Schädigungsprozesse des Plasminogen-Plasmin- und des Matrix-Metalloproteinase-Systems.

Im Verlauf des Schlaganfalls kann es auch ohne Therapie innerhalb von Stunden bis Tagen zur spontanen Rekanalisation kommen. Diese endogene Thrombolyse ist von vielerlei

Faktoren abhängig, wie zum Beispiel von Größe, Zusammensetzung und Lokalisation des Thrombus.

Bei der Therapie der akuten zerebralen Ischämie steht das Ziel der Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes im Vordergrund, um primär eine Versorgung des hinter dem Verschluss befindlichen Gewebes mit Sauerstoff und Glucose zu erreichen (Molina et al., 2005). Neben diesem positiven Effekt werden dabei aber auch Prozesse aktiviert, die schädigende Auswirkungen haben. Diese Phänomene werden unter dem Begriff „Reperfusionsschaden“ zusammengefasst. Als ein wichtiger Faktor für das Ausmaß des Schadens gilt die Zeitspanne vom Anfang der Ischämie bis zum Wiedereinsetzen des physiologischen Blutflusses.

2. Mikrogefäße

Die zerebralen Mikrogefäße sind durch ihren Durchmesser definiert und beinhalten ausschließlich präkapilläre Arteriolen, Kapillaren und postkapilläre Venolen (Gefäße $\leq 100 \mu\text{m}$ = Mikrogefäße) (del Zoppo 1994; Hamann et al., 2003). Die folgenden drei Eigenschaften sind für die zerebralen Mikrogefäße charakteristisch (siehe Abbildung 1):

1. Zerebrale Endothelzellen sind durch sog. „tight junctions“ untereinander verbunden. Diese sind die wichtigsten Bestandteile der sog. Blut- Hirn-Schranke.
2. Die zerebralen Mikrogefäße besitzen eine besonders dicke und dichte Basalmembran.
3. Angrenzend an die Basalmembran befinden sich die Astrozyten-Endfortsätze. Diese sind wichtig für interzelluläres Signaling und stellen den wechselseitigen Einfluss der Astrozyten und der zerebralen Mikrogefäße sicher.

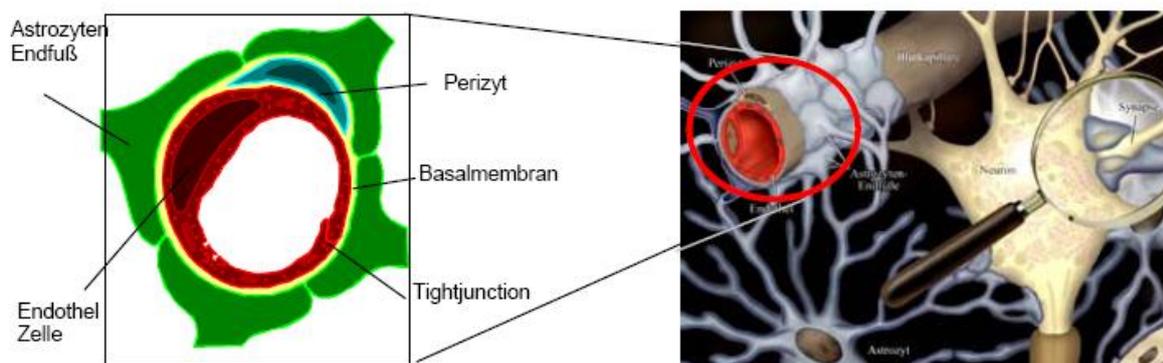


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines zerebralen Mikrogefäßes (linkes Bild: Goldstein & Betz, 1986; rechtes Bild Univ. Bochum)

2.1. Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (englisch „blood-brain-barrier“, BBB) besteht aus den interendothelialen tight-junctions der Endothelzellen. Die BBB ist eine physiologische Barriere zwischen dem Zentralnervensystem und dem Blutkreislauf. Sie dient der Aufrechterhaltung der Milieubedingungen (Homöostase) im Gehirn und verhindert den Eintritt von

neurotoxischen Substanzen aus dem Blutkreislauf in das Gehirngewebe. Weder Blutzellen, noch lösliche Bestandteile des Blutes über 20 kDa können die BBB frei passieren.

Dies dient dem Schutz des Gehirns vor schwankenden Bedingungen sowie vor Toxinen und Erregern. Die tight junctions der zerebralen Endothelzellen sind die wichtigsten Bestandteile der BBB und limitieren den trans-endothelialen Transport (Pardridge WM, 1998). Zusätzlich besitzt das zerebrale Endothel viele spezielle proliferative und funktionelle Eigenschaften (Thorin E, 1999).

2.2. Basalmembran

Die zerebralen Mikrogefäße besitzen eine besonders dichte Basalmembran (siehe Abbildung 2). Diese Basalmembran wird durch zwei Schichten der extrazellulären Matrix gebildet, die durch Entaktin verbunden sind. Eine Schicht wird durch Laminin, die andere durch Kollagen Typ IV gebildet. Andere Glucosaminoglykane und Proteoglykane, z. B. Fibronectin oder Vitronectin, sind auch Bestandteil dieser netzartigen Struktur, die sich direkt unter den Endothelzellen befindet. Perizyten sind in die Basalmembran eingebettet (Hamann et al., 1995). Die Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke und der Basalmembran-Komponenten ist stark abhängig von dem Wechselspiel zwischen Endothelzellen und Astrozyten. Die Integrität und die Verbindung zwischen Endothelzellen, extrazellulärer Matrix und umgebenden Astrozyten wird über sog. Integrine gewährleistet

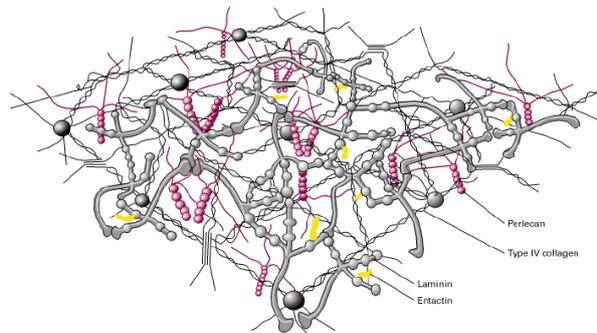


Abbildung 2: schematische Darstellung der Hauptbestandteile der Basalmembran der zerebralen Mikrogefäße (Yurchenco PD, Schittny JC, 1990).

2.3. Mikrovaskuläre Schädigung nach Ischämie/Reperfusion

Eine Mangel durchblutung des Gehirns (zerebrale Ischämie) führt je nach Dauer und Ausprägung zu unterschiedlichen Gewebsschädigungen. So kommt es zum Funktionsverlust der BBB und Zerstörung der Basalmembran (Danton & Dietrich 2003; Rosenberg 1998 & 2002). Die letzte Barriere zwischen Blut und Hirnparenchym stellen nach dem Untergang der BBB und der Zerstörung der Basalmembran die Peri- und Astrozyten dar. Proteolytisch wirksame Enzyme zersetzen die Strukturproteine der Basalmembran, wie beispielsweise Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin. Die Degradation der Basalmembran führt zur Extravasation von Blutbestandteilen ins umliegende Gewebe, zur Ödembildung und zur Destabilisierung des mikrovaskulären Systems (Hamann et al., 1995 & 1996).

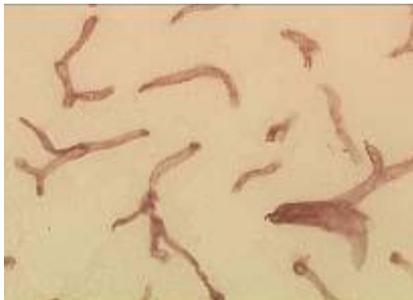
Insgesamt gibt es fünf wesentliche pathophysiologische Veränderungen nach zerebraler Ischämie und Reperfusion:

1. Die Zerstörung der Blut-Hirn-Schrankenstörung mit nachfolgender Ödembildung

2. Die Veränderungen der Durchgängigkeit der Mikrogefäße mit sekundären Veränderungen des lokalen zerebralen Blutflusses
3. Die Expression von endothelialen Adhäsionsrezeptoren für zelluläre Blutbestandteile, z.B. Leukozyten
4. Der Abbau der Basalmembran und der extrazellulären Matrixmoleküle mit nachfolgenden hämorrhagischen Transformationen
5. Eine Störung der Zell-Matrix-Adhäsion der Mikrogefäße.

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte im Tiermodell (Ratten und Mäuse) gezeigt werden, dass Bestandteile der Basalmembran wie Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin nach 3-stündiger zerebraler Ischämie mit nachfolgender 24-stündiger Reperfusion abgebaut, bzw. verdaut werden und es zu einer Reduktion der zerebralen Gefäße kommt (Hamann et al., 1995; Vosko et al., 2006) (siehe Abbildung 3).

A



B



Abbildung 3A/B: Mikroskopbilder der Basalganglien der Ratte (Vergrößerung 400fach)
A: nicht-ischämische Hemisphäre: Man sieht mehrere Mikrogefäße, die mit einer Peroxidasemarkierung für Kollagen Typ IV gefärbt wurden.
B: Nach 3h Ischämie und 24h Reperfusion: Deutliche Gefäßrarefizierung der Kollagenmarkierungen (Hamann et al., 2002).

Die Mechanismen, die zu dieser Degradation der Basalmembran führen, sind nur in Ansätzen verstanden (del Zoppo et al., 1998; Hamann et al., 1999; Petty & Wettstein, 2001). Zumindest drei bekannte Mechanismen können zur Zerstörung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix beitragen. Diese drei Mechanismen sind die Aktivierung von Plasmin durch das Plasminogen-Plasmin System, die Freisetzung von Matrix-Metallo-Proteinasen vorwiegend aus Astrozyten und Endothelzellen und die Freisetzung von Granula mit proteolytisch wirksamen Enzymen aus polymorphkernigen Leukozyten (PMN-Leukozyten).

3. Therapie Ansätze

3.1. Lysetherapie

Das Ziel der Lysetherapie besteht darin, die Durchblutung in dem betroffenen ischämischen Areal durch Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes zu steigern. Bei der medikamentösen Lyse, wird das Medikament über einen Katheter eingebracht oder im Sinne

einer systemischen Lyse arteriell oder venös injiziert. Durch die frühzeitige Wiederherstellung der Blutzirkulation soll der ischämische Schaden möglichst klein gehalten werden, um so die neurologischen Defizite verhindern zu können. Zurzeit ist als einziges Lysemedikament rt-PA (rekombinater tissue (Gewebs) - Plasminogenaktivator; Alteplase) beim ischämischen Hirninfarkt zugelassen. Die Wirksamkeit der rt-PA Therapie wurde 1995 in der NINDS-Studie gezeigt. Diese Therapie ist allerdings auf einen relativ kurzen Zeitabschnitt (3h) nach dem ischämischen Ereignis beschränkt. Weitere Kontraindikationen dieser Standardtherapie des Schlaganfalls sind:

- Hämorrhagischer Schlaganfall in der Anamnese
- Ischämischer Schlaganfall innerhalb der letzten 6 Monate
- Hirntumor oder ZNS-Schaden
- Trauma, Operation oder Kopfverletzung innerhalb der letzten 3 Wochen
- Bekannte Blutungsneigung (hämorrhagische Diathese)
- bekannte Aortendissektion

Neuere Studien (Hacke W & Kaste, 2008) zeigen, dass unter bestimmten Voraussetzungen (hauptsächlich Ausschluss einer Hirnblutung), eine Ausdehnung des Zeitfensters auf bis zu 4,5 h möglich ist. Allerdings zeigte sich im klinischen Alltag, dass nur ca. 2% der Schlaganfall Patienten in Deutschland lysiert werden können (Busse et al. 2003). Die Therapie mit rt-PA hat allerdings auch gravierende Nebenwirkungen wie z. B. einen klinisch stummen hämorrhagischen Infarkt, eine parenchymale Hämorrhagie oder auch ein intrathekales Hämatom (bis zu 16% der Fälle) (NINDS 1995). Die Auswirkungen einer Hämorrhagie können für den Patienten sehr viel gravierender sein, als der Schlaganfall alleine. Der Mechanismus, wie es zu einer Ruptur der Mikrogefäße, bzw. dem Verlust der Integrität der Basalmembran kommt, ist im Einzelnen noch ungeklärt. Es konnte jedoch in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass ein Verlust der Integrität der Basalmembran zu einer hämorrhagischen Transformation führt (Hamann et al., 1995; Hamann et al., 1996). Andere Medikamente, die zum Beispiel in der Behandlung des Herzinfarkts Anwendung finden, wie z.B. Urokinase und Streptokinase, werden in der Behandlung des Schlaganfalls nur in besonderen Situationen eingesetzt. Studien hatten gezeigt, dass sie häufiger zu schweren Nebenwirkungen (Hirnblutungen; Ödembildung) führen als rt-PA (MAST-I 1995; MAST-E 1996; ASK 1996).

Rt-PA wirkt über eine direkte Aktivierung des Plasmins (Rijken, 1995). Plasmin ist eine breitwirksame unspezifische Serinprotease, die als inaktive Proform sezerniert wird. Nach Aktivierung ist Plasmin fähig, eine Großzahl von Proteinen, wie die Proteine der Basalmembran (Kollagen Typ IV, Fibrin, Fibronectin und Laminin) zu hydrolysieren, bzw. zu spalten. Burggraf et al. konnten 2003 im Rattenmodell zeigen, dass bei Behandlung mit niedrig bis moderat dosiertem rt-PA (0,9-9 mg/kg KG) der Abbau von Kollagen Typ IV der Basalmembran vermindert wird. Eine höhere Dosierung von rt-PA (18mg/kg KG) verstärkte jedoch den mikrovaskulären Schaden. Dieser Effekt könnte durch die gleichzeitig beobachtete

größere Aktivität, bzw. Koaktivierung von Proteasen verursacht worden sein (Burggraf et al., 2003).

3.2. TNK

Tenekteplase (TNK) ist ein gentechnisch modifizierter Gewebsplasminogenaktivator, der eine wesentlich größere Spezifität für Fibrin als t-PA aufweist. TNK wird ca. 80 mal weniger stark von PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) inhibiert als rt-PA. Zudem wird es viel langsamer eliminiert und hat somit eine wesentlich höhere Plasmahalbwertszeit. TNK wird in der Notfallmedizin als Thrombolytikum bei Herzinfarkt und Lungenembolie eingesetzt, der Nutzen beim ischämischen Schlaganfall ist bisher nicht einwandfrei belegt (Chapman et al., 2001; Haley et al., 2005).

3.3. Hypothermie

Der positive Effekt einer Hypothermie auf die Ischämietoleranz wird schon seit langer Zeit zum Beispiel bei Organ-Transplantationen routinemäßig eingesetzt (Ginsberg et al., 1992). Von Ginsberg empfiehlt schon seit 2003 die Hypothermie zur Neuroprotektion bei zerebraler Ischämie. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen niedriger Körpertemperatur eines Schlaganfall-Patienten und dem neurologischen Ergebnis (Reith et al., 1996; Glöbus et al., 1995). In tierexperimentellen Untersuchungen in fokalen und globalen Ischämie-Modellen wurde unter milder und moderater Hypothermie (29 -32°C) die Infarktgröße signifikant reduziert (Kollmar et al., 2002; Hamann et al., 2004). Allerdings ist kritisch anzumerken, dass in klinischen Studien bisher kein signifikant positiver Effekt gezeigt werden konnte (NINDS, 2007). Der Einfluss der postischämischen Hypothermie auf die Basalmembran und auf die Integrität der Mikrogefäße wurde bisher nur unzureichend untersucht. In klinischen Studien erhöhte sich die Expression einiger Matrixmetalloproteinasen (MMP) (z.B. MMP-9 und MMP-3) mit der Dauer des Schlaganfalls und konnte durch eine hypotherme Therapie deutlich gesenkt werden (Horstmann et al., 2003). In Arbeiten meiner Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass Hypothermie die Aktivitäten von MMP-9, MMP-2, uPA und tPA im Rattenmodell der Ischämie/Reperfusion reduzierte (Hamann et al., 2004; Burk et al., 2008). Die Hypothermie Behandlung führte zu einer Stabilisierung der Basalmembran und zur Reduktion der Hämoglobin Extravasation.

3.4. MMP-Inhibitoren

Seitdem die essentielle Rolle der MMPs in physiologischen und vor allem in pathologischen Prozessen erkannt wurde, versucht man durch Anwendung verschiedener Inhibitoren dieser Proteasen einen positiven Einfluss auf die entsprechenden Prozesse zuzunehmen (Rosenberg et al., 1998; Rosenberg et al., 1992). Neben den TIMPs wurden bereits auch synthetische hergestellte MMP-Inhibitoren entwickelt. Zu diesen zählen zum Beispiel die MMP-Inhibitoren Marimastat, der sich in der klinischen Phase III befand (Kähäri et al., 1999) und Batimastat, ein Breitspektrum-MMP-Inhibitor. Der Einsatz dieser Inhibitoren in klinischen Studien war allerdings bisher nicht von Erfolg gekrönt. Eines der Probleme in frühen Studien

war die Tatsache, dass die eingesetzten Inhibitoren sehr unspezifisch waren und somit die gesamte Klasse der MMPs inhibiert wurde. Zum Teil wurden auch verwandte Enzymklassen, die damals noch nicht einmal bekannt waren, wie die Adamalysine inhibiert (Cunningham et al., 2005; Sood et al., 2008). Da inzwischen die physiologische Rolle der MMPs besser untersucht ist, wird das Augenmerk verstärkt auf den Einsatz selektiv inhibierender Wirkstoffe gelegt. Allerdings haben auch diese Studien bis zum heutigen Tage zu keinem Medikament mit rein MMP-inhibierender Wirkung geführt.

Synthetischer MMP- Inhibitor

Synthetische MMP Inhibitoren wie BB-94 wurden bereits in einigen experimentellen Untersuchungen hinsichtlich positiver Auswirkungen auf zerebrale ischämische Schädigungen eingesetzt (Grossetete & Rosenberg, 2008; Pfefferkorn et al., 2003). Ein Inhibitor der spezifisch auf die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 wirkt, ist No. 444241 von Calbiochem®.

Doxycyclin

Doxycyclin ist ein Mitglied der Antibiotika-Familie der Tetracycline. Es kann auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften die Blut-Hirn-Schranke mühelos passieren (Jantzie et al., 2005). Abgesehen von seiner antibiotischen Wirkung verfügt es über anti-inflammatorische Eigenschaften. Yrjanheikki konnte für Doxycyclin und andere Mitglieder der Familie der Tetracycline einen neuroprotektiven Effekt bei globaler und fokaler Ischämie im Tiermodell nachweisen (Yrjanheikki et al., 1998, 1999). Ebenso wurde eine Reduktion der Infarktgröße im MCAO gezeigt (Roach et al., 2002; Clark et al., 1997). Diesen Effekt führt man einerseits auf eine Hemmung verschiedener MMPs zurück (Golub et al., 1998), andererseits auch auf eine Inhibition verschiedenster Proteasen wie beispielsweise caspase-1, caspase-3 (Chen et al., 2000). In unserer Arbeitsgruppe konnte weiterhin gezeigt werden, dass neben der MMP-Inhibition auch die Inhibition der Serinprotease uPA durch Doxycyclin ursächlich für den beobachteten protektiven mikrovaskulären Effekt sein könnte (Burggraf et al., 2007).

3.5. MMP

Die Matrixmetalloproteinasen (MMP), eine Familie Zink-abhängiger Endopeptidasen, wurden erstmalig 1964 durch Gross und Lapier beschrieben (Gross & Lapier, 1964). Zurzeit sind ca. 28 verschiedene MMPs bekannt. Sie spielen eine wichtige Rolle sowohl in der Embryogenese wie auch in der Angiogenese. Ihre physiologische Aufgabe nehmen sie überall dort wahr, wo der Ab- und Umbau der Extrazellulärmatrix nötig ist. Jede der Proteasen, zeigt eine Affinität zu bestimmten Proteinen in der ECM, wie zum Beispiel zu Kollagen, Glykoproteine wie Lamin und Fibronectin, Proteoglykane und Glukosamine.

Sie sind aufgrund ihrer Substratspezifität und Struktur-, bzw. Sequenzhomologie in Subklassen eingeteilt. So bilden drei der MMPs die Kollagenasen (MMP-1, MMP-8 und MMP-13), fünf die Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-7 und MMP-26), zwei

die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) und sechs die membrangebundenen MMPs (MT1-MMP bis MT6-MMP). Die Übrigen bilden aufgrund struktureller Unterschiede eigene Subklassen (Nagase & Fields, 2000; Vu & Werb, 2000; Rao, 2005).

3.5.1. Allgemeiner Aufbau

Charakteristisch für sämtliche MMPs ist das konservierte Zinkbindungsmotiv im aktiven Zentrum. Zusätzlich bestehen diese aus einem Pro-Peptid, einer katalytischen Domäne und einer Hämopexin ähnlichen C-terminalen Domäne, die über eine flexible hinge-Region mit der katalytischen Domäne verbunden ist (z.B. Aufbau MMP-3 siehe Abbildung 4).

Das Propeptid sorgt für eine zeitgerechte Aktivierung des Enzyms, indem es erst am Zielort, bzw. zur richtigen Zeit, abgespalten wird und somit das katalytische Zentrum freigegeben wird. Diese Abspaltung erfolgt durch andere Proteasen, wie zum Beispiel Plasmin oder auch durch anderer MMPs (z.B. MMP-3) (Lijnen 2001). Innerhalb des katalytischen Zentrums besitzen die MMPs eine hoch konservierte Region mit einem Cystein und einem Zink-Atom, welches über Histidin Moleküle in das Protein eingebunden ist. Zudem ist dies die Stelle an der die TIMPs ihre Wirkung entfalten (Butler et al., 2004).

3.5.2. Die Regulation der MMPs

Die Regulation der Aktivität der MMPs wird über verschiedene Wege sichergestellt. Zum Beispiel werden die synthetisierten MMPs erst durch Abspalten des Propetids mittels anderer Proteasen aktiviert (Nagase und Fields, 2000; Yana und Weiss, 2000). Auch findet eine Inhibition der aktiven Formen und auch der Proformen durch endogenen Inhibitoren, den TIMPs (Tissue inhibitor of MMPs), statt.

3.5.3. MMP-3

MMP-3 wird im gesamten Körper von verschiedenen Zellen wie z.B. Fibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen sezerniert; im Gehirn von Neuronen, Mikrogliazellen und Perizyten (Rosenberg et al. 2001). MMP-3 befähigt Astrozytomzellen zu invasivem Wachstum und spielt eine Rolle im Abbau von Marklagern der Neuronen bei Demenz. Zudem wird es vor dem Beginn von demyelisierenden Erkrankungen verstärkt exprimiert (Solé et al. 2004). McQuibban beschreibt einen antiinflammatorischen Effekt von MMP-3 durch die Spaltung aller Monozyten anlockender Chemokine (McQuibban et al 2002). Die Aktivierung des als Proform sezernierten Enzyms findet durch Plasmin und aber auch Trypsin, Chymase, Elastase oder Kallikrein statt. MMP-3 ist zur Verdauung fast aller Bestandteile der Extrazellulärmatrix fähig, insbesondere Kollagen IV, aber auch Vibronektin, Laminin und andere Kollagene, sowie vernetztes Fibrin (Bini et al. 1999). Eine weitere wichtige Rolle von MMP-3 ist die Aktivierung weiterer Mitglieder der MMP-Familie wie, MMP-9, MMP-1, MMP -7 und MMP-8 (Gurney et al., 2006). MMP-3 kann ebenfalls als sogenannte Sheddase tätig werden, es spaltet den FAS-Liganden von der Zelloberfläche ab und nimmt so Einfluss auf die FAS vermittelte Apoptose (Mitsiades et al. 1999; Borland et al. 1999).

Die Kontrolle der verschiedenen Aktivitäten von MMP-3 wird unter anderem über eine Hemmung durch TIMP erreicht, insbesondere TIMP-1 und TIMP-3. Bestimmte

Komponenten können durch MMP-3 gespalten werden, wie beispielsweise Fibrinogen (Bini et al. 1996), Plasminogen (Lijnen et al. 1998) oder Urokinase-ähnliche Plasminogenaktivatoren (Ugwu et al. 1998). Weiterhin ist MMP-3 in der Lage PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) zu inaktivieren und so stimulierend auf den Gehalt von Plasmin in dessen Umgebung zu wirken (Lijnen 2001).

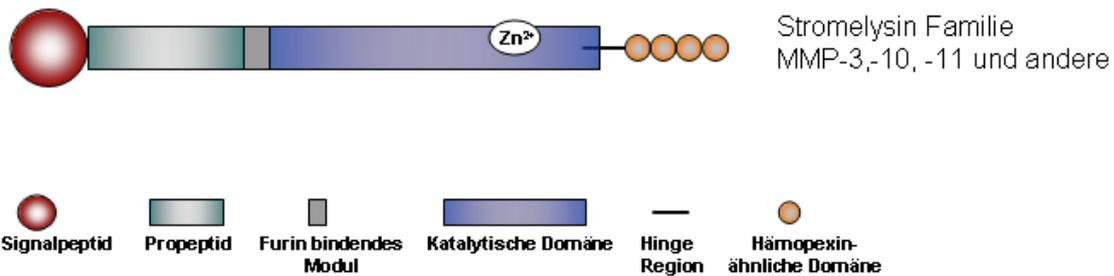


Abbildung 4: Aufbau der MMP-3 und anderer Mitglieder der Stromelysin Familie

MMP-3 war in den letzten Jahren Gegenstand von starkem Forschungsinteresse vor allem hinsichtlich seiner Aufgabe als Regulationsprotein der MMP-Kaskade (Abbildung 5). Allerdings ist derzeit noch nicht ausreichend bekannt, wie genau MMP-3 bei fokaler zerebraler Ischämie reguliert wird, bzw. ob es selbst regulatorisch eingreifen kann. Auch wenn mittlerweile der Einfluss verschiedener Therapien auf einzelne Mitglieder des MMP-System, wie MMP-2 und -9, gut untersucht ist, bleiben dennoch viele Fragen bezüglich MMP-3 offen.

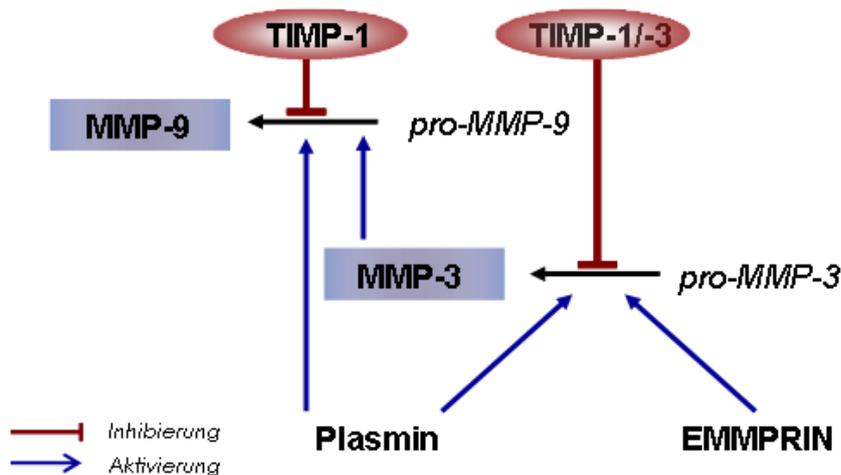


Abbildung 5: Regulation von MMP-9 durch MMP-3 im MMP- und Plasminogen-Plasmin System.

3.5.4. MMP-9

MMP-9 zeigt eine starke Strukturverwandtschaft zu MMP-2. Die Aktivierung von MMP-9 wird teilweise über das Plasminogen-Plasminsystem gesteuert. MMP-9 wird allerdings auch direkt von MMP-3 aktiviert, bzw von TIMP-1 und -3 inhibiert (Spinale et al.; 2000). Im Gegensatz zum Großteil der Proteasen der MMP-Familie ist MMP-9 nicht in der Lage andere MMPs zu aktivieren (Yong et al. 2007). Die primäre Aufgabe von MMP-9 liegt in der proteolytischen Degradation von ECM Proteinen wie Elastin, Laminin, und Kollagen Typ IV.

Ferner kann es Wachstumsfaktoren wie proTGF β und TNF α aktivieren. Die physiologische Funktion von MMP-9 liegt im Gewebeumbau z.B. in Neuronenwachstum, aber auch der Embryogenese und der Wundheilung.

3.6. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)

Die Regulierung der MMP Aktivität erfolgt unter anderem durch selektive Inhibierung mittels TIMPs. Es sind bisher sechs TIMPs bekannt (TIMP-1 – TIMP-6) (Stetler-Stevenson et al. 1989, Greene et al. 1996). Sie weisen zwar eine teilweise strukturelle und funktionelle Übereinstimmung auf, unterscheiden sich aber im Muster ihrer Expression und in ihrer Wirkweise. Wie durch zahlreiche Studien belegt wurde, binden die TIMPs MMPs in einem Verhältnis von 1:1 (Gomez et al., 1997). Alle TIMPs sind *in vitro* in der Lage alle bisher bekannten MMPs zu inhibieren (Baker et al., 2002). TIMP-1 ist ein lösliches Protein, mit ubiquitärem Vorkommen und scheint ein potenter Inhibitor von MMP-9 und MMP-3 zu sein (Lijnen, 2001 T&H).

3.7. EMMPRIN

Ein weiterer wichtiger Faktor, der MMPs stimuliert, ist EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer), ein Transmembran-Glykoprotein, welches auch unter dem Namen Basigin / CD 147 bekannt ist. Es ist außerdem involviert in die Interaktion und Aktivierung von Immunzellen, den Eintritt von Viren in Wirtszellen, die Entwicklung des Nervensystems und die Entwicklung und Erhaltung der Blut-Hirnschranke. Der Mechanismus ist bisher nicht vollständig verstanden. Als wahrscheinlicher Wirkmechanismus gilt eine Interaktion zweier EMMPRIN-Molekülen, so dass EMMPRIN gleichzeitig als Effektor und Rezeptor fungiert. Es wird angenommen, dass darüber hinaus die Glykosylierung des EMMPRIN-Moleküls für die Funktion essentiell ist (Sun et al. 2001). Die Stimulierung der MMP-Expression ist wahrscheinlich die Basis für den Einfluss von EMMPRIN auf diverse Krankheitsbilder wie Herzinfarkt (Spinale et al., 2000), Artherosklerose (Tomita et al., 2002), Lungenentzündung (Haseneen et al., 2003) und auch Schlaganfall (Burggraf et al. 2005). In jedem dieser Fälle wurde eine starke Korrelation zwischen EMMPRIN und der MMP-Expression nachgewiesen. EMMPRIN ist verbunden mit der Induktion von MMP-1,-2,-3 und auch MT1-MMP (Gabison et al., 2005). Allerdings konnte kein direkter Zusammenhang mit der Induktion von MMP-9 oder TIMPs gezeigt werden.

4. Fragestellung

Das MMP-System spielt eine wesentliche Rolle bei der zerebralen Ischämie und Reperfusion. Verschiedene MMPs werden als mögliche Ansatzpunkte für Therapieoptionen bei einer Schlaganfallbehandlung diskutiert. Allerdings ist der Einfluss aller involvierter MMP-Mitglieder nicht zur Gänze aufgeklärt. So spielt vermutlich MMP-3 eine wesentliche Rolle hinsichtlich einer Aktivierung der degradierenden Proteinase MMP-9. Nahezu keine grundlegenden Arbeiten an einem Tiermodell sind in der Literatur zu finden.

- a) Im ersten Teil dieser Arbeit sollte ein Detektionsverfahren für MMP-3 im Ratten- und Mausgehirn etabliert werden. Dieses Verfahren lies die Untersuchung der Einflüsse von verschiedenen Parametern wie Länge der Ischämie, bzw. Reperfusion zu.
- b) Im zweiten Teil der Arbeit sollte gezeigt werden, ob ein Zusammenhang mit der Gabe von rt-PA und der MMP-3 Expression hergestellt werden kann. Weiterhin waren denkbare Interaktionen des MMP-3 innerhalb des MMP-Systems (MMP-Aktivator EMMPRIN, Inhibitor TIMP-1 und MMP-9) mit und ohne exogener rt-PA Gabe zu untersuchen.
- c) Zum Vergleich sollte die Wirkung des alternativen Thrombolytikums TNK auf MMP-3 gezeigt werden.
- d) Im dritten Teil sollte die international diskutierte Therapiemöglichkeit der Hypothermiebehandlung untersucht werden. Ist dadurch eine modulierende Wirkung auf das MMP-System, vor allem das MMP-3 zu detektieren?
- e) Im vorletzten Teil sollte die Wirksamkeit zwei verschiedene MMP-Inhibitoren hinsichtlich der Wirkung auf MMP-3 untersucht werden.
- f) Zuletzt sollte an Knock-Out Mäusen, denen entweder MMP-9 oder der Inhibitor TIMP-1 fehlte, eine mögliche Wechselwirkung von MMP-3 mit dem MMP-System, vor allem mit MMP-9, bei Ischämie und Reperfusion im Gehirn nachgewiesen werden.

B. Material und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt
Brij-35	Sigma, München
BSA Rinderserumalbumin Fraktion V	Sigma, München
CAPS 3-[cyclohexylamino]-1-propane sulfonic acid	Sigma; München
Doxycycline	Sigma, München
ECL (enhanced chemiluminescence system, Western-Blot- Detektionssystem)	Amersham Bioscience, UK
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Glycerin	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
Heparin	Braun; Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
Na-Deoxycholat	Sigma, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Ponceau S (3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfo-phenylazo) phenylazo]-2,7-naphtalen-disulfonsäure	Sigma, München
PVDF Polyvinyl-difluorid	Sequi-Blot, Biorad, München
rtPA (rekombinanantes tissue Plaminogen activator	Boehringer Ingelheim
SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat)	National Diagnostics
TEMED (N, N, N', N' -tetramethylethylen-diamine)	Sigma; München
Triton X-100	Sigma, München
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Sigma, München
β -Mercaptoethanol	Sigma, München

2. Tiere und Tierhaltung

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Tieren handelte es sich um männliche Wistar Ratten (ca. 300g) (Firma Charles River, Sulzfeld, Deutschland), die in der Tierzucht unter standardisierten Bedingungen aufgezogen wurden (12-stündiger Tag/Nacht-Rhythmus, Temperatur konstant bei 18° C). Sie erhielten Futter und Wasser ad libitum und standen unter ständiger tierärztlicher Kontrolle. Sämtliche Tierversuche sind in Übereinstimmung mit der Regierung von Oberbayern (209.1 - 2531-81/01) und den Tierschutzbestimmungen. In Übereinstimmung mit diesen Standards wurde alles getan, um den Versuchstieren möglichst geringe Schmerzen vor und nach der Operation zuzufügen.

3. Fadenmodell bei Ratten, MCAO (median cerebral artery occlusion)

3.1. Wahl und Beschreibung des Modells

Ziel des Tierversuchsmodells ist es, der humanpathologischen Situation möglichst nahe zu kommen und reproduzierbare Versuchsbedingungen zu schaffen. Um eine fokale zerebrale Ischämie, bzw. den Verschluss der MCA zu erzeugen, sind verschiedene Modelle entwickelt

worden. Die wichtigsten dabei sind (a) das Fadenmodell anhand eines über einen Katheter vorgeschobenen Fadens und (b) das Embolienmodell durch die Injektion von autologem Thrombusmaterial in die A. carotis interna (nach Overgaard et al., 1992).

Das MCAO-Fadenmodell wurde erstmals von Koizumi et al. (1985) beschrieben und von Longa et al. (1989) modifiziert. Es ist das meistverwendete Modell zur Untersuchung der Pathophysiologie fokaler zerebraler Ischämien und zur Evaluation neuer Therapieverfahren und kann sowohl zur Induktion von permanenten als auch von transienten Gefäßverschlüssen (Ischämie/Reperfusion) eingesetzt werden. Bei dieser Methode wird ein Faden über einen Führungskatheter in die A. carotis communis und die A. carotis interna bis zum Abgang der A. cerebri media vorgeschoben und diese reversibel verschlossen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Operation einfach durchzuführen und gut reproduzierbar ist. Die Reperfusion ist problemlos durch das Zurückziehen des Fadens realisierbar. Komplikationen, die bei der Verwendung dieses Modells vorkommen können, liegen vor allem in der Induktion subarachnoidaler Blutungen (durch Gefäßperforationen). Das MCAO-Modell nach Overgaard et al. (1992) imitiert durch das Embolieereignis die Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls am besten, da zur Okklusion der Hirnarterie statt artifizieller Materialien autologe Thromben verwendet werden. Der Nachteil dieses Modells besteht darin, dass die resultierenden Infarktmuster eine sehr große Streubreite in Bezug auf Größe und Lokalisation des Infarktes aufweisen. Wegen der Vorteile, die das Fadenmodell gegenüber dem embolischen Modell bietet, wurde das Fadenmodell eingesetzt.

Die Operation der Versuchstiere wurde von Herrn Dr. Andreas Trinkl und Herrn Dr. Dr. Helge Martens durchgeführt. Die anschließende Gewebsaufarbeitung und die immunohisto- und biochemischen Färbungen, sowie die digitale Weiterverarbeitung wurden von dem Autor als experimenteller Teil der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Während der fokalen zerebralen Ischämie wurden die Tiere mit einer Inhalations-Narkose mit einem Isofluran-Lachgas-Sauerstoff-Gemisch (60% N₂O₂, 30% O₂ und 2% Isofluran) betäubt und beatmet. Der allgemeine Versuchsaufbau ist in Abbildung 6 skizziert. Zur Überwachung der Vital-Parameter und Applikation von Pharmaka wurden die Schwanzarterie (Blutdruck; Bestimmung der Blutgase) und die Vena jugularis externa (Pharmaka) kanüliert und die Parameter wurden protokolliert. Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich über eine rektale Temperatursonde gemessen und mit Hilfe eines regulierbaren Heizkissens in einem Bereich von 37.5 °C gehalten. Mittels eines 2 cm langen ventromedialen Hautschnittes am Hals wurde unter Schonung der aufliegenden Speicheldrüsen, diverser Muskeln und vor allem des N. vagus die A. carotis communis - auf Höhe ihrer Bifurkation in die A. carotis interna und externa - vorsichtig freigelegt (Abbildung 6). Die A. carotis communis wurde distal abgebunden und anterior kurzzeitig abgeklemmt, um einen Nylonfaden - der sich in einem kurzen Polyethylenschlauchstück befindet - anterograd in die A. carotis interna ca 19 mm, gerechnet ab der Bifurkation, vorzuschieben. Die Fadenspitze verschloss dabei den Abgang

der A. cerebri media von der A. carotis interna. Dies erzeugte eine Minderdurchblutung im Mediastromgebiet. Der regionale zerebrale Blutfluss wurde mit der Laser-Doppler-Blutfluss (LDF)-Methode bestimmt und aufgezeichnet. Der systemische arterielle Blutdruck, der endexpiratorische Kohlendioxidgehalt und der regionale zerebrale Blutfluss wurden kontinuierlich während der gesamten Dauer eines Experiments über ein PC-System mit dem Prozessdatenerfassungssystem Perisoft (Perimed-Programm, Perimed, Järfälla, Schweden) aufgezeichnet.

Zur Beendigung der Ischämie nach drei Stunden wurde der Faden zurückgezogen und somit die Reperfusion eingeleitet. Trotz ligierter linker Arteria carotis communis war die Blutversorgung des Gehirnes in der Reperfusion über den Circulus arteriosus Willisii sichergestellt. Anschließend wurde die Narkose beendet und die Tiere wurden in einen Käfig gebracht. Nach Ablauf der Reperfusionsphase wurden die Tiere durch intrakardiale Perfusion (9% NaCl, 0,5% Rinderserumalbumin und 2 IE Heparin) in einer tiefen Anästhesie getötet. Das Gehirn wurde für spätere Untersuchungen entnommen und tiefgefroren (-80°C).

In der Versuchsgruppe der schein--operierten Tiere wurde der Faden nur durchschnittlich 12mm bis kurz über die Schädelbasis vorgeschoben. Somit induzierte er keinen Verschluss der A. cerebri media und damit keine zerebrale Ischämie, da die Blutversorgung über den Circulus arteriosus sichergestellt war.

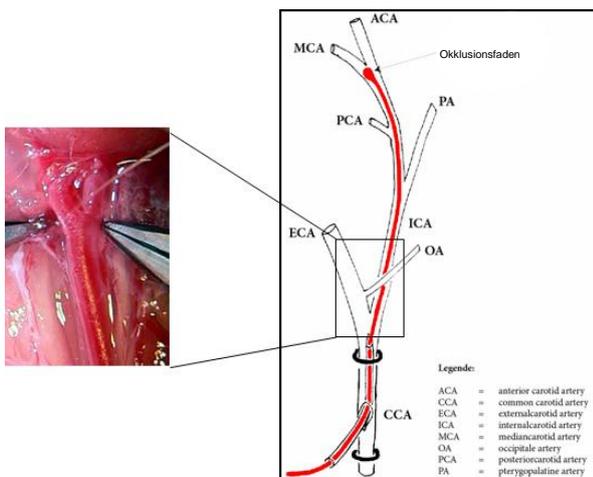


Abbildung 6: Rechts: Schematische Darstellung der Okklusion der Arteria cerebri media (MCA) mittels des Okklusionsfadens. Der Faden wurde über die ligierte Arteria carotis communis (CCA) eingebracht und in der Arteria carotis interna (ICA) bis zum Abgang der Arteria cerebri media vorgeschoben. Der standardisierte silikonummantelte Kopf des Fadens verschloss die Arteria cerebri media und führte zu einer Ischämie im Mediastromgebiet. Durch Zurückziehen des Fadens wurde die Reperfusion eingeleitet. Links: Intraoperative Photographie mit Darstellung der freipräparierten Karotis-Bifurkation. (Abbildung entnommen von Dissertation Dr. A. Trinkl)

3.2. Thrombolyse Therapie mit rt-PA und TNK

30 Minuten vor dem Beginn der Reperfusion (150 Minuten nach dem Beginn der Ischämie) wurde in aqua bidest. gelöstes rtPA (Actilyse®, Boehringer Ingelheim, Deutschland) über einen Katheter in die rechte Vena jugularis externa in den Dosierungen 0, 0,9, 9 und 18 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Dabei fungierte die Gruppe mit 0 mg/kg rtPA, bei der stattdessen isotonische Kochsalzlösung infundiert wurde, als Kontrollgruppe. Es wurde zu einer Dosis, die der menschlichen Therapiedosis äquivalent war, gewählt (Mensch: 0,9 mg/kg entspricht Ratte 9 mg/kg). Davon ausgehend wurde eine 10-fach geringere Dosis und eine doppelt so hohe Dosis eingesetzt (0,9 mg/kg und 18 mg/kg).

Entsprechend dem therapeutisch angewandten Regime wurden 10% der Gesamtkörperdosis als initialer Bolus und 90% als perfusorgesteuerte Infusion (Precidor 5003 INFORS AG, Basel, Switzerland) über 1 Stunde appliziert. Das modifizierte tPA, die Tenekteplase (TNK; Metalyse; Boehringer Ingelheim), wurde ebenfalls 30 min vor der Reperfusion als Bolus in einer Dosis von 5 mg/kg KW. Diese Prozedur wurde von der Behandlung des Myokard-Infarktes adaptiert (van de Werf et al., 1999).

3.3. Hypothermiebehandlung

Analog dem normothermen Versuchsablauf wurde während der Operation die Körpertemperatur kontinuierlich über eine Thermoelektrode im rechten M. temporalis gemessen und mit einem Heizkissen konstant gehalten. Zur Induktion der Hypothermie verwendeten wir die Methode der extrakorporalen Kühlung von Yanamoto et al. (2001). Bei dieser Methode wird eine milde bis moderate Hypothermie (hier 31 bis 34°C) bei der Ratte durch eine reduzierte Umgebungstemperatur von 4 bis 8°C induziert (Hamann et al., 2004).

Die Hirntemperatur, bzw. die Temperatur des Musculus temporalis und der Umgebungstemperatur wurden kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet (Prozessfassungssystem M 5360, Greisinger Electronics, Deutschland). Eine halbe Stunde vor Beenden der Ischämie wurde mit der externen Kühlung begonnen. Nach Erreichen der Zieltemperatur wurde die Narkose ausgeleitet. Die Tiere blieben während der gesamten Reperfuionszeit in einem Käfig bei 4 bis 8°C. Alle Versuchstiere tolerierten die erniedrigte Umgebungstemperatur sehr gut und zeigten bis auf ein gelegentliches Kältezittern, keine Zeichen von Beeinträchtigung während dieser Phase. (Versuchsaufbau siehe Abbildung 7).

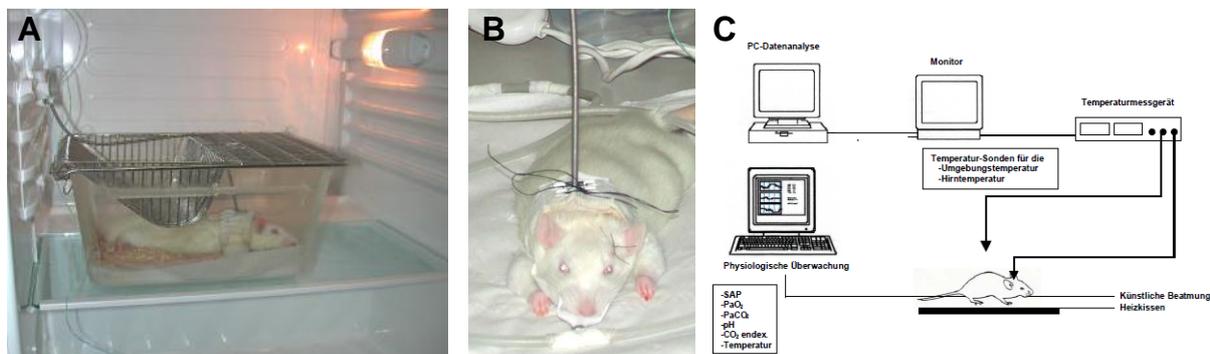


Abbildung 7: A) Ratte im Hypothermiekäfig bei 4-6°C B) Ratte mit „Jäckchen“ zu Fixierung der Temperatursonde C) Versuchsaufbau während der Reperfuionsphase.

3.4. Therapie mit Doxycyclin und Calbiochem MMP-Inhibitor

Eine Gruppe erhielt 30 mg/kg/Tag das Antibiotikum Doxycyclin. Es wurde 10 Tage lang im Trinkwasser, geschützt vor Licht, den Tieren verabreicht (Pyo et al., 2000; Burggraf et al., 2007). Der MMP-Inhibitor Calbiochem No. 444241 ((2R)-2-[(4-Biphenylsulfonyl)amino]-3-phenylpropionic Acid; MMP-2: IC₅₀ = 310 nM and MMP-9: IC₅₀ = 240 nM) wurde als single bolus in einer Konzentration von 5 mg/kg intravenös am Ende der Ischämiezeit (nach 3h) appliziert.

4. Infarktvolumetrie

Nach Beendigung der Perfusion wurden die Gehirne bei -80°C aufbewahrt. Zur Weiterverarbeitung für die histologischen und biochemischen Untersuchungen wurden



Abbildung 8 : Abbildung des polygon-markiertem Infarktareals (MAP-2 Färbung).

Semidünnschnitte von $10\mu\text{m}$ Dicke auf einem Kryostaten (Leica) bei -20°C angefertigt. Jeder 50. und 51. Schnitt, der so genannte „Volumetrieschnitt“, diente zur späteren Infarktvolumenbestimmung. Die Region Bregma $+1\text{ mm}$ bis $+2\text{ mm}$ diente zu biochemischen Untersuchungen. Hierbei fielen insgesamt 100 Schnitte an, die für die nachfolgenden Bestimmungen verwendet wurden. Die so gewonnenen Schnitte wurden auf einen Gelatine beschichteten Objektträger aufgezogen und wiederum bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Das Infarktvolumen wurde nach Kloss et al. (2002) bestimmt. Die Infarktareale, gut abgrenzbar durch die MAP-2-Färbung, wurden dazu manuell polygonisiert, um den Flächeninhalt des Infarktareals zu bestimmen (Abbildung 8).

5. Biochemische Analysen

5.1. Gewebeextraktion und Aufarbeitung der Proben

Schnitte aus dem Bereich der größten Infarktausdehnung ($\pm 1\text{mm}$ vom Bregma) wurden verwendet, um das Gehirngewebe zu gewinnen. Dazu wurde aus vier Regionen von den Objektträgern das Gewebematerial mit Hilfe eines scharfen Skalpell abgekratzt (Burggraf et al., 2003) (Abbildung 9):

- | | |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------|
| A) Kortex ischämische Hemisphäre | C) Kortex kontralaterale Hemisphäre |
| B) Basalganglien ischämische Hemisphäre | D) Basalganglien kontralaterale Hemisphäre |

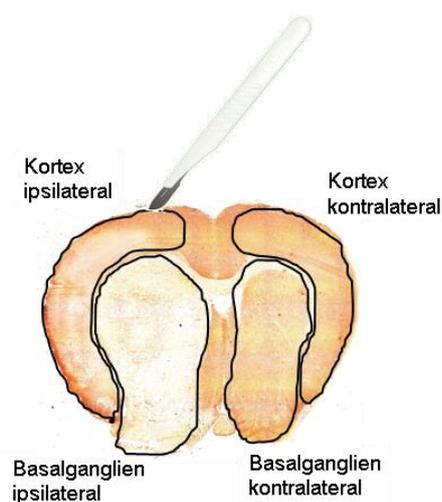


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Gewinnung des Gewebematerials für die weitere biochemische Aufarbeitung des Gehirns. Unterteilung des Gehirns in vier Regionen (nach Burggraf et al. 2005).

Das gewonnene Untersuchungsmaterial wurde mit dem Lysispuffer (RIPA: 1% Triton-X100; 1% Na-Deoxycholat; 0,1% SDS; 0,01 M Tris pH 7,2) versetzt (bei RT), anschließend gevortext und im Ultraschallbad homogenisiert. Daraufhin wurden die Proben bei 14.000 U/min für 5min zentrifugiert und die Überstände für den Western Blot abgenommen. Mit Hilfe der SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid)-Gelelektrophorese wurde das Proteingemisch getrennt.

5.2. SDS- Gel-Elektrophorese

10%ige Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-(SDS)-Gele wurden mit dem Trenngel (7,5 ml ProtoGel, 8mM EDTA, 0,4% SDS, 1,5M Tris/HCl pH 8,8, H₂O ad 15ml, TEMED 20µl, 10% APS 200µl) und dem Sammelgel (2,4 ml ProtoGel, 8mM EDTA, 0,4% SDS, 0,5M Tris/HCl pH 6,8, 6,8 ml H₂O, 10µl TEMED, 100µl 10% APS) gegossen.

Der Auftragspuffer nach Laemmli setzte sich wie folgt zusammen: 0,5M Tris, 4ml 15% SDS, 20ml H₂O, 13g 45% Glycerin, ein Spatelspitze 0,02% Bromphenolblau und 25mM β-Mercaptoethanol. Die Proben wurden mit dem Auftragspuffer versetzt und nach 5min Kochen bei 95°C in die Auftragstaschen der Gele appliziert. Nach Zugabe von Elektrophoresepuffer (1g SDS, 3g Tris, 14,4g Glycin; ad 100ml H₂O) wurde die Elektrophorese bei 80V für 2h gestartet.

5.3. Western Blots

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine mittels einer Semidry-Blot-Anlage (Biorad) unter Zugabe des Westerblot Puffer (2,23g CAPS, 180ml H₂O, 100ml Methanol) auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Transferpuffer war (10mM CAPS, pH 11.0 in 10% Methanol) und die Blotbedingungen 0.24 A ca. 50-60 min. Um das Ausmaß des Proteintransfers beurteilen zu können, wurde die Membran mit dem unspezifischen Proteinfarbstoff Ponceau S (0,5 % Ponceau S (w/v), 5% Essigsäure (v/v)) gefärbt. Es folgte das Blockieren der unspezifischen Bindungen der Trägermembran durch Milchpulver (1,5%) und BSA (3%). Das gesuchte Protein wurde dann mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert. Zunächst wurde die Membran mit einem antigenspezifischen Primärantikörper inkubiert (4h bei RT, 16h bei 4°C). Unspezifisch gebundene Primärantikörper wurden durch mehrfache Spülvorgänge mit TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 0,2 % (w/v) Tween 20) auf dem Schwenktisch von der Membran gewaschen (3 mal jeweils 10min, bei RT). Anschließend folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der sich an den Fc-Anteil des Primärantikörpers bindet (1:100 in TBS-T; 1h; RT). Nach dreimaligem Waschen (jeweils 10min bei RT) erfolgte die Visualisierung mittels ECL-Kit (Inkubation eines 1:1 Gemisches der ECL Lösungen 1 und 2 für 1 min bei RT) und Belichtung und Entwicklung eines Röntgenfilms (Healthcare Life Sciences, Germany).

Zur Detektion des MMP-3 wurde außer bei den Vorversuchen der Kaninchen polyklonale Antikörper von Abcam eingesetzt (AB38914; 1:1000); für EMMPRIN (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA; 1:1000; aus Ziege).

5.4. Zymographien und Reverse Zymographien

Für die Zymographien wurde eine nicht denaturierende Gelelektrophorese angewandt. Die Gele enthielten unterschiedliche Zusätze (Gelatinezymographie: 0,5% Gelatine; bzw. reverse Zymographie: 0,5% Gelatine und aktives MMP-2/-9 25 µl (aus Fibroblastenüberstand)). Der Auftragspuffer enthielt kein β-Mercaptoethanol und die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel nicht gekocht. Nach Auftrennung wurden die Proteine in der Gelmatrix für 1h renaturiert (2,5% Triton X-100; RT). Der zymogene Verdau fand ebenfalls im Gel statt (5mM CaCl₂, 50mM Tris/HCl (pH 7,4), 200mM NaCl, 0,2% Brij-35; 37°C; über Nacht). Anschließend fand eine Coomassie Färbung statt (Details siehe unten). In der Gelatinezymographie wurde das MMP-9 (auch MMP-2) als helle Bande demarkiert; in der reversen Zymographie waren die TIMPs als dunkle Banden sichtbar. Um das molekulare Gewicht zu kalibrieren, d.h. um die Proteine zu standardisieren, wurde erstens ein molekularer käuflicher Standard (Biorad, Deutschland) und zweitens ein käuflicher rekombinanter humaner MMP-2 und MMP-9-Standard (Sigma, Deutschland) verwendet.

5.5. Coomassie Färbung

Die Gele wurden in 10% Essigsäure und 50% Methanol für 30min fixiert. Danach erfolgte die Färbung für 90min mit 0,4% Brilliant Blau R, 35% Ethanol und 10% Essigsäure. Zuletzt wurde die Entfärbungsphase mit 35% Ethanol und 10% Essigsäure durchgeführt.

6. Auswertung

6.1. Proteinbestimmung

Für die quantitative Proteinbestimmungen wurden das Pierce-Reagenz verwendet (BCA Protein Assay Kit) und im Photometer bei 563nm quantifiziert (Ultrospec 500pro, Amersham). Zur Eichung diente eine Standardreihe aus BSA.

6.2. Die Auswertung der biochemischen Daten

Zur Quantifizierung und Auswertung wurden die Western Blots und Zymographien nach Fertigstellung mit Hilfe eines Scanners digitalisiert. Die optische Dichte wurde mit dem Programm TINA bestimmt (Version 2.08, Raytest Isotopenmeßgerät GmbH, Deutschland). Zur Eliminierung von systemischen Fehlern wurde der Quotient zwischen ischämischer und nicht-ischämischer Hemisphäre gebildet. Ergab sich ein Quotient von 1, war die Anzahl der Proteine auf beiden Hemisphären gleich.

7. Statistik

Die in den Abbildungen und Tabellen dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler (MW±SEM) angegeben. Der Signifikanzgrad wurde mit Hilfe Students´schen t-test (bei Vergleich zweier Gruppen), bzw. des Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks (bei Vergleich mehrerer Gruppen) errechnet. Sämtliche Werte wurden in Prozent der nicht-

ischämischen gesunden Hemisphäre Kontrolle (=100%) ausgedrückt. Regressionsanalysen (curve fitting) wurden mit dem Programm SPSS v14, (www.spss.com) durchgeführt.

8. Tiergruppen

Die folgenden Tiergruppen wurden in die Untersuchungen in meiner Arbeit verwendet (siehe Tabelle 1 und

Tabelle 2).

Insgesamt wurden 155 Tiere operiert, einige verstarben während des Eingriffs, zum Teil an technischen Fehlern oder an den Folgen der Ischämie. Ein signifikanter Zusammenhang mit der Behandlung konnte nicht festgestellt werden. Die verstorbenen Tiere sind ebenfalls in den Tabellen aufgelistet

Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Gruppen im Rattenmodell. Zusätzlich ist die Anzahl der Tiere die für die Tests verwendet wurden angegeben, ebenso wie die Anzahl der Tiere die während des Experiments verstarben.

<i>Tiergruppe</i>	<i>Behandlung</i>	<i>n =</i>	<i>Verstorbene Tiere</i>
schein-	--	6	--
I3R24 - Kotrollgruppe	--	6	--
I1R0	--	6	1
I2R0	--	6	--
I27R0	--	6	--
I3R24	0,9 mg rtPA	6	1
I3R24	9,0 mg rt-PA	6	--
I3R24	18 mg rt-PA	6	2
I3R24	5 mg TNK	6	--
I3R24	Hypothermie	6	--
I3R24	Hypothermie + 18 mg rt-PA	6	--
I3R24	Doxycyclin	6	--
I3R24	Calbiochem No. 444241	6	1

Tabelle 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Gruppen im Mausmodell. Zusätzlich ist sowohl die Anzahl der Tiere, die für die Tests verwendet wurden, als auch die, die während des Experiments verstarben, angegeben.

<i>Tiergruppe</i>	<i>Behandlung</i>	<i>n =</i>	<i>Verstorbene Tiere</i>
Schein-	--	6	--
I3R24 - Kotrollgruppe	--	8	2
I1R24	--	7	1
I2R24	--	6	--
I3R0	--	6	--
I3R3	--	6	1
I3R12	--	6	--
I3R24	MMP-9 ^(-/-)	5	8
I3R24	TIMP-1 ^(-/-)	9	1

C. Ergebnisse

1. Etablierung des MMP-3 Westernblots

Der erste Schritt der Arbeit war, eine geeignete Methode zu finden, mit deren Hilfe man aktives MMP-3 in geringen Mengen Rattenhirn quantifizieren konnte. Der Western-Blot mit Antikörpern erschien dabei gut einsetzbar. Diese Methode sollte hinsichtlich MMP-3 im Gehirn etabliert werden.

Ausgangspunkt war dabei der Ansatz von Burggraf et al., 2005, bei dem geringe Mengen Gehirnschubstanz von Kryoschnitten gewonnen werden konnte.

1.1. Lysepuffer

Im ersten Vorversuch wurde die Aufschlusseigenschaften verschiedener Lysepuffer untersucht (

Tabelle 3).

I	2% SDS	5 mM EDTA		
II	8 M Harnstoff	2% NP-40 (Igepal, Sigma)		
III (RIPA)	1% Triton-X100	1% Na-Deoxycholat	0,1% SDS	0,01 M TRIS pH 7,2

Tabelle 3: Aufstellung der verschiedenen getesteten Lysepuffer für den MMP-3 Western Blot.

Der Versuch sollte zeigen mit welchem Lysepuffer, die besten Ergebnisse im Bezug auf den Nachweis von MMP-3 erzielt werden konnten. Die Abbildung 10 zeigt, dass der Lysepuffer III (RIPA-Puffer) das beste Signal für aktives und degradiertes MMP-3 liefert. Die Bande ist deutlich und der Hintergrund lässt auf ein geringes Maß an unspezifischen Bindungen schließen. Mit keinem Lysepuffer konnte die inaktive pro-Form bei 59 kDa nachgewiesen werden.

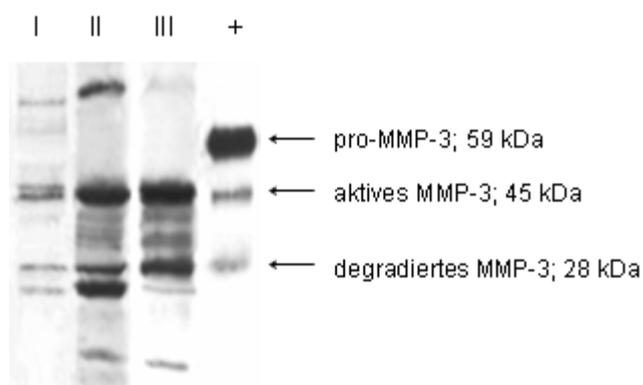


Abbildung 10: Vergleich verschiedener Lysepuffer zum Nachweis von MMP-3 im Gehirngewebe. Es wurden jeweils zwei 10µm dicke Gehirnschnitte vom Objektträger abgekratzt und mit jeweils 25 µl von dem Lysepuffer I, II oder III homogenisiert. Die anschließende Auftrennung erfolgte mit einem 10% SDS Gel und die Detektion mit dem polyklonalem Antikörper von Abcam (AB38914; 1:1000). Die positiv Kontrolle (+) war ein gereinigtes Protein aus der Zellkultur von Chemicon (CC1035) 10µl (1:20).

1.2. Antikörper

In diesem Versuch sollte ermittelt werden, welcher Antikörper das beste Detektionsvermögen für MMP-3 aufweist. Es wurden die Antikörper aus Tabelle 4 miteinander verglichen.

	Typ	Firma	Nummer	Konzentration
AK-1	monoklonal	Chemicon	MAB3306	1:1000
AK-2	polyklonal	Chemicon	AB811	1:1000
AK-3	polyklonal	Abcam	Ab38914	1:1000

Tabelle 4: Aufstellung der verschiedenen getesteten Antikörper für den MMP-3 Western Blot.

Die Ergebnisse der ersten beiden Antikörper waren zufriedenstellend. Allerdings waren nicht alle Banden in gutem Signal/Rauschverhältnis dargestellt. Das beste Ergebnis lieferte der polyklonale Antikörper von Abcam (AK-3). Er wurde auch für die weiteren Versuche in dieser Arbeit eingesetzt (siehe Abbildung 11).

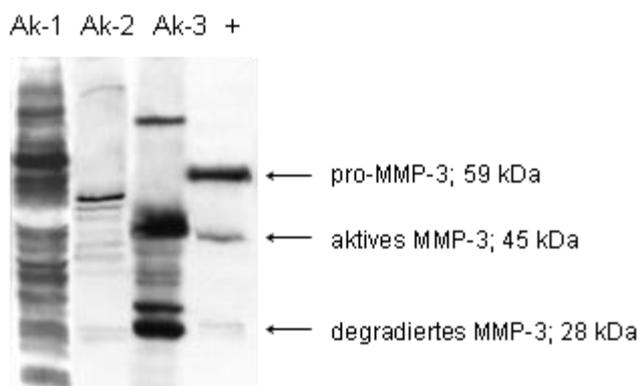


Abbildung 11: Vergleich verschiedener Antikörper zum Nachweis von MMP-3 im Gehirngewebe. Es wurden jeweils zwei 10µm dicke Gehirnschnitte vom Objektträger abgekratzt und mit jeweils 25 µl von dem Lysepuffer III homogenisiert. Die anschließende Auftrennung erfolgte mit einem 10% SDS Gel und die Detektion mit einem den Antikörper Ak-1, -2 und -3 (siehe Tabelle 4). Als positiv Kontrolle (+) dient ein gereinigtes Protein aus der Zellkultur von Chemicon (CC1035) 10µl (1:20).

1.3. Versuch mit verschiedenen Blockierlösungen

Es wurde untersucht, welche Blockierlösung das beste Ergebnis hinsichtlich der Unterdrückung unspezifischer Bindungen und Signal-Rausch Verhältnis bietet. Es wurden die Blockierlösungen der Tabelle 5 eingesetzt.

BL1	3% Magermilchpulver	
BL2	5% Magermilchpulver	
BL3	3% Magermilchpulver	5% BSA

Tabelle 5: Aufstellung der verschiedenen Blockierlösung für den MMP-3 Western Blot.

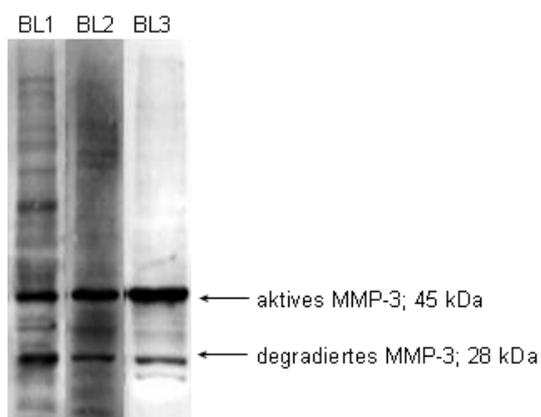


Abbildung 12: Vergleich verschiedener Blockierlösungen beim MMP-3 Western Blot des Gehirngewebes. Es wurden jeweils zwei 10µm dicke Gehirnschnitte vom Objektträger abgekratzt und mit jeweils 25 µl von dem Lysepuffer III homogenisiert. Die anschließende Auftrennung erfolgte mit einem 10% SDS Gel und die Detektion mit dem Antikörper Ak-3.

Das Ergebnis der ersten Blockierlösung zeigte zwar deutlich die gewünschten Banden des aktiven MMP-3 und des Degradationsprodukts aber auch unspezifische Bindungen. Im BL2 waren die unspezifischen Bindungen reduziert, aber das Signal/Rausch Verhältnis noch undeutlich. BL3 zeigte ein Ergebnis mit in der folgenden Arbeit weitergearbeitet wurde (siehe Tabelle 5).

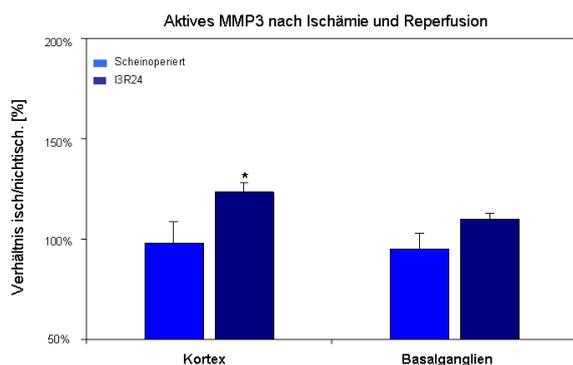
2. MMP-3 nach Ischämie und Reperfusion (I3R24)

2.1. Ratte

Es zeigte sich in der Ratte im Kortex ein Anstieg des aktiven MMP-3 von $123 \pm 11\%$ ($p = 0,037$) versus schein-operierten Tieren $98 \pm 5\%$); in den Basalganglien von $110 \pm 8\%$ (n.s versus schein $95 \pm 3\%$) gegenüber der linken Seite (siehe Abbildung 13A).

Das erste Abbauprodukt von MMP-3 (28 kDa) stieg in der Ischämie sowohl im Kortex, $118 \pm 7\%$, als auch in den Basalganglien, $132 \pm 23\%$, an (beide $p < 0,05$ gegenüber schein-operierten Tieren). Dies ist ein Zeichen für einen „Verbrauch“ des MMP-3 (siehe Abbildung 13B).

A)



B)

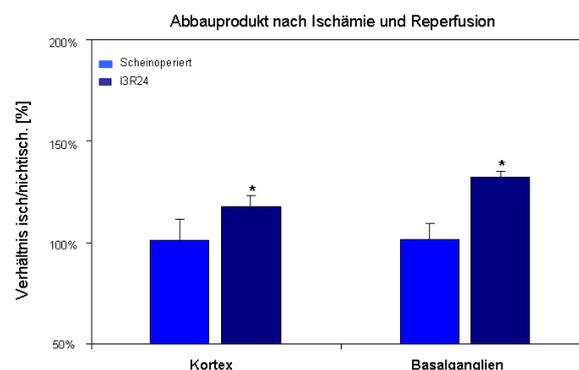


Abbildung 13: Vergleich des Gehalts an aktivem MMP-3 (45 kDa) in Kortex und Basalganglien, bei I3R24 und schein-operierten Tieren in (A) und des Degradationsprodukts (28 kDa) in (B). Das Gewebe wurde getrennt nach ischämischem und nicht-ischämischem Kortex und Basalganglien. (*: $p < 0,05$).

2.2. Maus

In der Maus konnte lediglich ein leichter Anstieg des MMP-3 Degradationsproduktes nach Ischämie/Reperfusion von $110 \pm 6\%$ ($p = 0,058$) versus schein-operierten Tieren $98 \pm 5\%$ beobachtet werden; der Gehalt des aktiven MMP-3 war in den Ischämie/Reperfusion-Mäusen nicht signifikant unterschiedlich gegenüber den schein-operierten Mäusen (siehe Abbildung 14). Auch bei den Mäusen wurde somit ein Hinweis für einen „Verbrauch“ des MMP-3 gezeigt.

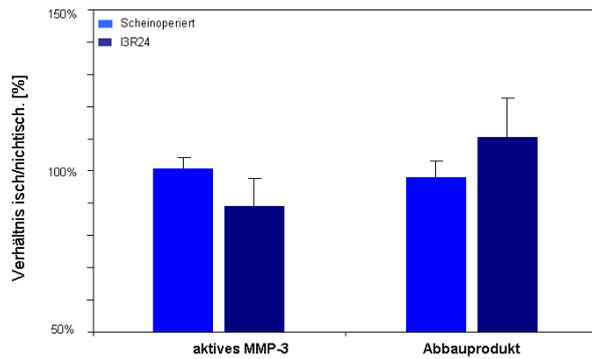


Abbildung 14: Vergleich des Gehalts an aktivem MMP-3 (45 kDA) und des Degradationsprodukts (28 kDA) bei I3R24 und scheinoperierten Tieren.

3. Verschiedene Ischämie und Reperfusionzeiten

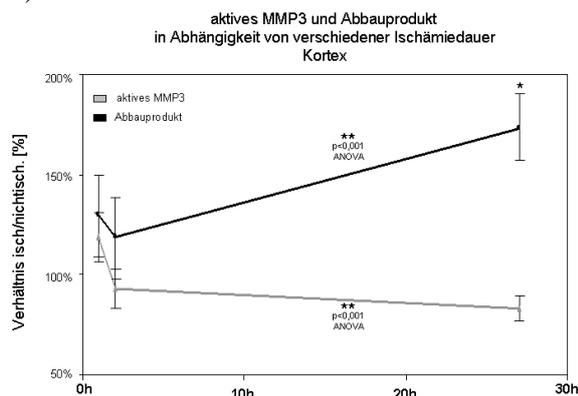
3.1. Verschiedene Ischämiezeiten bei der Ratte

Um den Einfluss der reinen Ischämie ohne Reperfusion auf den Gehalt von MMP-3 zu untersuchen, wurden drei Versuchsgruppen (jeweils n=6) gebildet, die verschiedenen langen Ischämiezeiten ausgesetzt wurden. Die Ischämiezeiten waren dabei 1h, 2h sowie 27h. Im Kortex ergab sich eine stetige Abnahme des Gehalts an *aktivem MMP-3* von 119±10% (I1R0) über 93±11% (I2R0) auf 84±7% (I27R0) (Anova: p<0,001).

Betrachtet man allerdings den Verlauf des *Abbauprodukts* im Kortex zeigt sich ein deutlicher Anstieg von 129±20% (I1R0) über 118±21% (I2R0) auf 173±17% (I27R0) (Anova: p<0,001) (siehe Abbildung 15A).

In den Basalganglien zeigte sich zuerst ein leichter Anstieg von MMP-3 auf 115±7% im ischämischen Areal gegenüber der kontralateralen Seite, der bei I2R0 auf 95±7% und weiter auf 76%±21% bei I27R0 abfiel (Anova: p<0,001). Das *Abbauprodukt* zeigte einen stetigen Anstieg von ursprünglich 91±12% bei I1R0 über 92±6% bei I2R0 auf 135±33% bei 27 h Ischämie (Anova: p<0,001) (siehe Abbildung 15B).

A)



B)

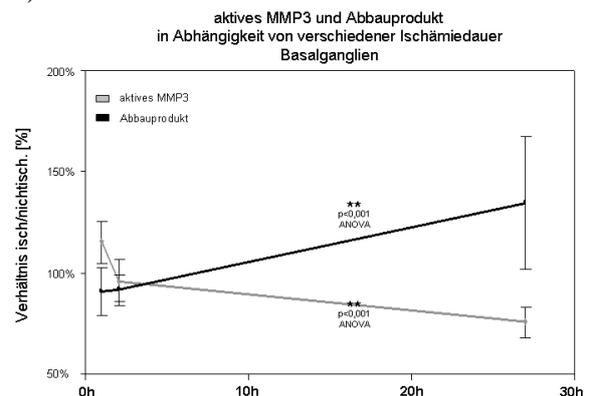


Abbildung 15: Quantifizierung der Banden des MMP-3 Western Blots, dabei sowohl des aktiven MMP-3 und des Degradationsprodukts. Aufgetragen wurde Gehirnlysate aus Ratten nach I1R0, I2R0 und I27R0. Das Gewebe wurde getrennt nach ischämischem und nicht-ischämischem Kortex (A) und Basalganglien (B) (**: p<0,001; Anova).

3.2. Verschiedene Ischämiezeiten bei der Maus

In einem weiteren Tiermodell der Maus, konnte ebenfalls aktives MMP-3 quantifiziert werden. Zusätzlich wurden verschiedene Ischämiezeiten von 1h, 2h, bzw. 3h bei gleichbleibender Reperfusion von 24h getestet. Es zeigte sich mit zunehmender Ischämiezeit ein stark linearer Abfall des *aktiven MMP-3* Gehalts ($r=0,966$). Damit wurde das Ergebnis in den Ratten bestätigt: I1R24: $109\pm 6\%$; I2R24: $94\pm 7\%$ und I3R24 $96\pm 11\%$ (Anova: $p<0,001$).

Das *Degradationsprodukt* stieg im Verlauf von I1 bis I3R24 von $68\pm 9\%$; $102\pm 27\%$ und $110\pm 13\%$ bei I3R24 ($r=0,992$; Anova: $p<0,001$) (siehe Abbildung 16).

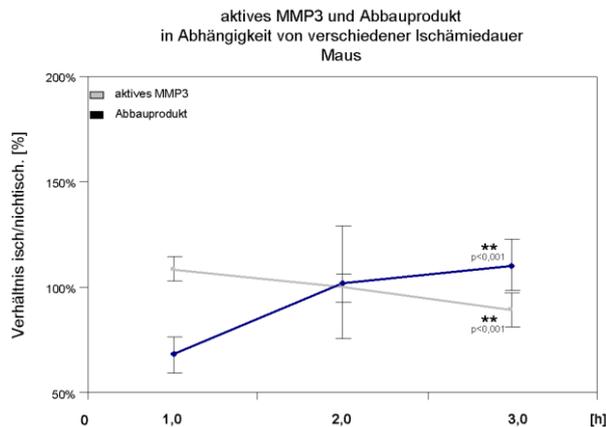


Abbildung 16: Quantifizierung des MMP-3 Western Blots der Banden des aktiven MMP-3 und des Degradationsprodukts. Aufgetragen wurden Gehirnllysate aus Mäusen nach I1R24, I2R24 und I3R24 (*: $p<0,05$).

3.3. Verschiedene Reperfuionszeiten Maus

Nachdem ich gezeigt hatte, dass bei längerer Ischämiezeit mehr MMP-3 verbraucht wird, wurden die Mäuse nach einer 3-stündigen Ischämiephase unterschiedlich langen Reperfuionszeiten von 0h, 3h, 12h und 24h unterzogen. Es zeigte sich ein stark linearer Abfall des *aktiven MMP-3* von $114\pm 3\%$ bei I3R0 auf $103\pm 3\%$ bei I3R3; $104\pm 10\%$ (I3R12) und auf $96\pm 11\%$ bei I3R24 ($r=0,998$; Anova: $p<0,001$). Gleichzeitig stieg der Gehalt des *Degradationsprodukts* stetig an: I3R0: $83\pm 13\%$; I3R3: $88\pm 8\%$; I3R12: $95\pm 9\%$; I3R24: $110\pm 13\%$ ($r=0,944$; Anova: $p<0,001$) (siehe Abbildung 17).

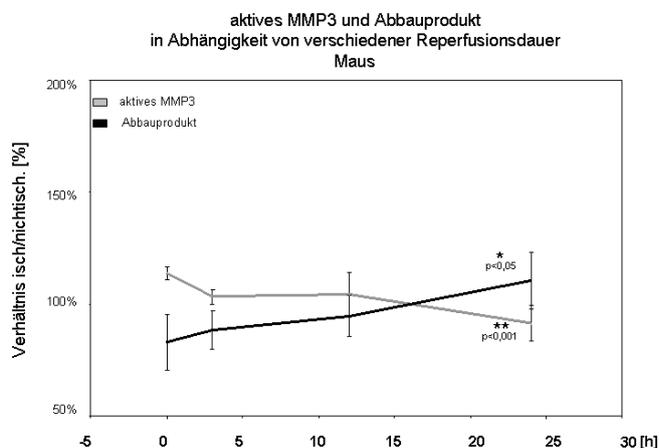


Abbildung 17: Quantifizierung des MMP-3 Western Blots der Banden des aktiven MMP-3 und des Degradationsprodukts. Aufgetragen wurden Gehirnllysate aus Mäusen nach I3R0, I3R3, I3R12 und I3R24. Die Abweichung der Mittelwerte wurde mit Hilfe des t-Test berechnet (**: $p<0,001$).

Der Einfluss der Ischämiedauer auf den Verbrauch des aktiven MMP-3 ist wesentlich stärker (ca. Faktor 10) als der Einfluss der Reperfusiondauer. Dies kann man deutlich an der signifikanten Zunahme des absoluten Wertes der Steigungskoeffizienten der Linearregression erkennen: $b=-100,4$ bei der Reperfusiondauer, versus $b=-9,45$ ($p<0,05$) bei der Ischämiedauer (siehe Abbildung 18).

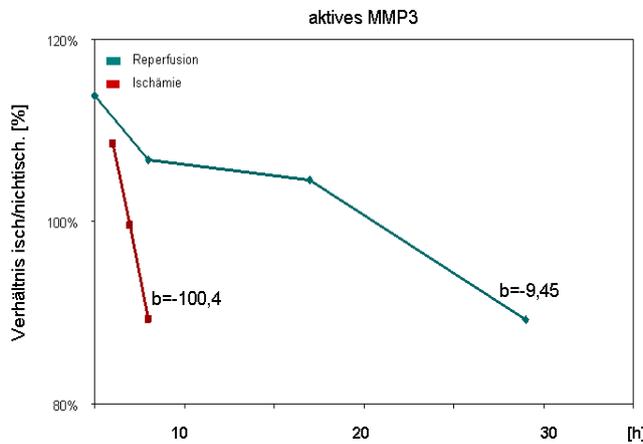


Abbildung 18: Vergleich des Einflusses der Ischämie- und der Reperfusiondauer auf den Gehalt des aktiven MMP-3. Gezeigt ist MMP-3 nach I3R0, I3R3, I3R12, I3R24 und I1R24, I2R24 und I3R24. Es wurde eine Linear-Regression berechnet. b drückt die Steigung der jeweiligen Regressionsgeraden aus. Beide sind signifikant nach Anova: $p<0,001$.

4. MMP-3 Aktivität bei Thrombolyse

4.1. rt-PA in verschiedenen Konzentrationen

In diesem Teil meiner Arbeit wurde mit Hilfe des Western Blots aktives MMP-3 und sein Degradationsprodukt unter verschiedenen Dosen von rt-PA quantifiziert (Abbildung 19). Sowohl im Kortex als auch in den Basalganglien sank der Gehalt an aktiven MMP-3 mit steigenden Dosen rt-PA und im Gegenzug stieg gleichzeitig das Abbauprodukt an (alle Anova: $p<0,001$) (siehe Abbildung 20A + B; exakte Werte siehe Anhang Tabelle 1).

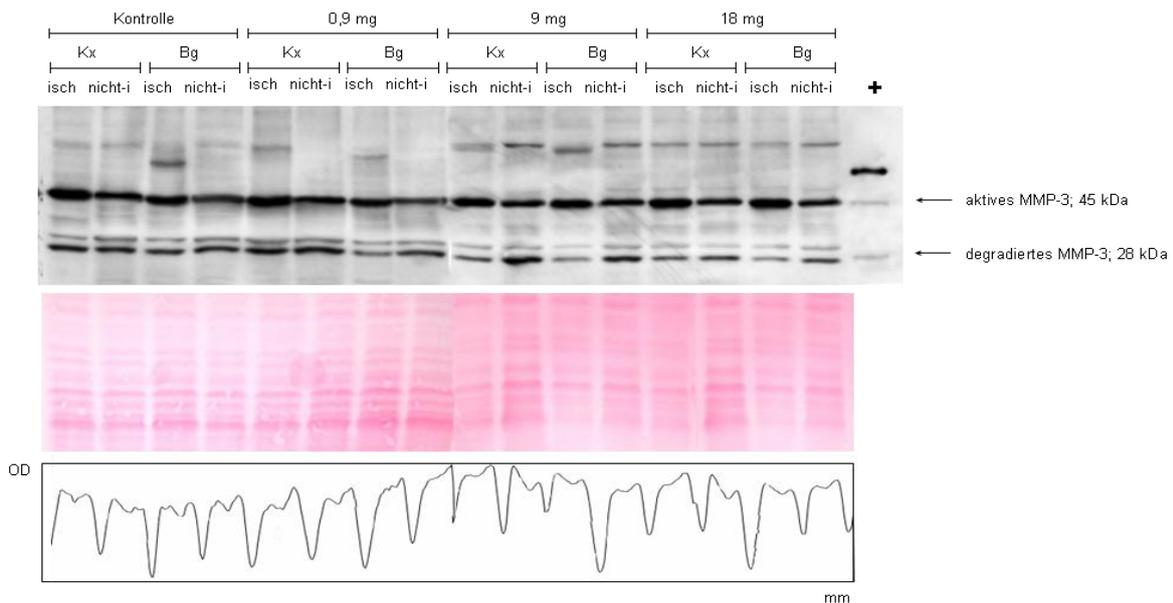
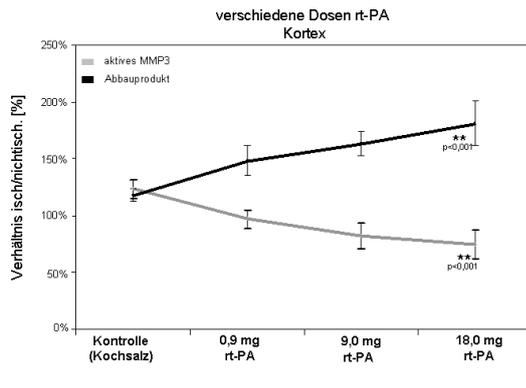


Abbildung 19: Repräsentative MMP-3 Western Blots: Als Positivkontrollen wurde gereinigtes MMP-3 aufgetragen. Es wurde jeweils Proteinextrakt aus der ischämischen und nicht-ischämischen Seite des Kortex und der Basalganglien aufgetragen. Die positiv Kontrolle (+) war ein gereinigtes Protein aus der Zellkultur von Chemicon (CC1035). Es ist die Ponceau S Färbung der auf die Blotmembran aufgetragenen Gesamtproteine und das Profil der optischen Dichte der Gesamtproteine gezeigt.

A



B

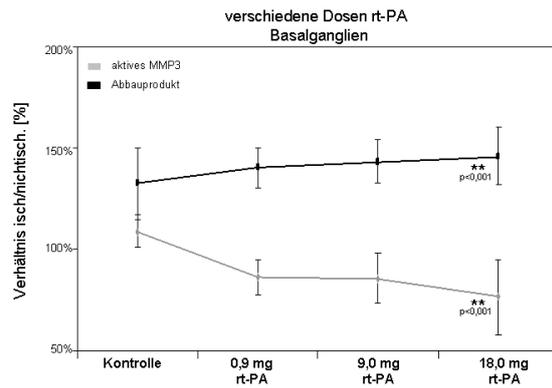


Abbildung 20: Quantifizierung des Western Blots: Banden des aktiven MMP.3 und des Degradationsprodukts aus dem Kortex (A) und den Basalganglien (B). Aufgetragen wurden Gehirnlysate aus Ratten nach I3R24. Die Ratten erhielten eine Kochsalz-Injektion oder 0,9, 9 oder 18 mg/kg KG rt-PA. Die Abweichung der Mittelwerte von der Kontrolle wurde mit Hilfe des t-Test berechnet (*: $p < 0,05$) der Verlauf mit Hilfe der Anova (**: $p < 0,001$).

4.1.1. Zusammenhang von MMP-3 mit MMP-9

Die gelatinolytische Aktivität von MMP-9 stieg kontinuierlich mit steigenden Dosen rt-PA (exakte Werte siehe Anhang Tabelle 1) an. Dies wurde durch die Quantifizierung von Gelatine Zymographien nachgewiesen. Abbildung 21 zeigt pro Gruppe ein repräsentatives Zymogramm. MMP-3 dagegen nahm mit steigender Dosis rt-PA stetig ab. Die negative Korrelation ergab eine Signifikanz im Kortex von $p = 0,026$ ($r = -0,941$) und in den Basalganglien von $p = 0,075$ ($r = -0,787$). Dies zeigte, dass der Verbrauch von MMP-3 für den Anstieg des MMP-9 mitverantwortlich ist.

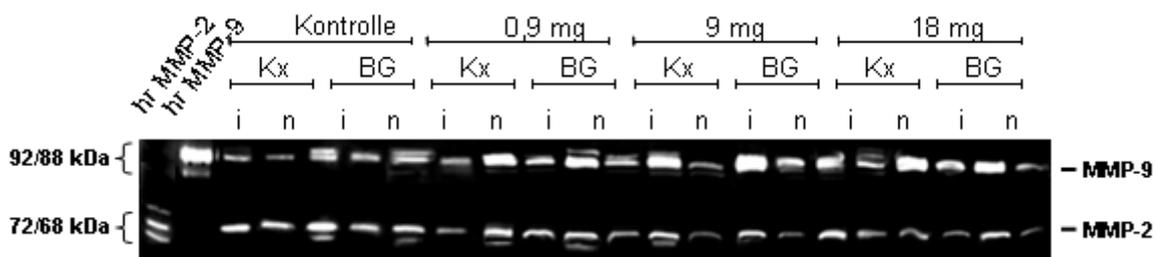


Abbildung 21: Repräsentatives Gelatine Zymogramm mit den Lysezonen der MMP-9 und -2. Als Positivkontrollen wurde rekombinantes humanes MMP-2 und MMP-9 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) aufgetragen. In den unterschiedlichen Spuren wurde jeweils Proteinextrakt aus der ischämischen und nicht-ischämischen Seite des Kortex und der Basalganglien aufgetragen.

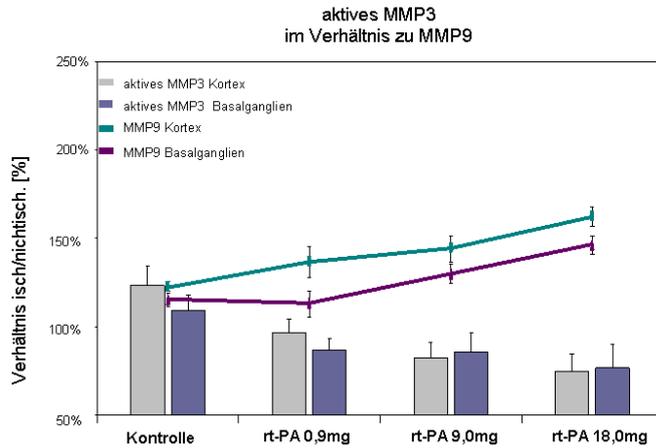


Abbildung 22: Quantifizierung der Banden des aktiven MMP-3 und -9 in Abhängigkeit von der Menge des applizierten rt-PAs.

4.1.2. Zusammenhang von MMP-3 mit dem Inducer EMMPRIN

Unter rt-PA Therapie stieg der MMP Aktivator, EMMPRIN sowohl im Kortex, als auch in den Basalganglien stetig an. Dies wurde mit Hilfe eines Western Blots von Gehirnlysaten gezeigt (siehe Abbildung 23).

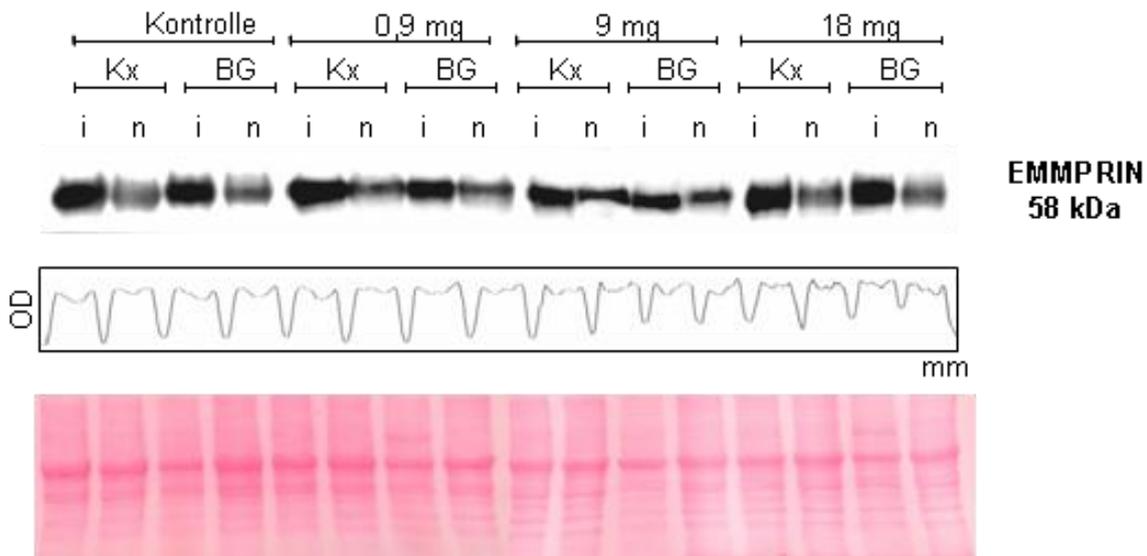


Abbildung 24: Repräsentativer EMMPRIN Western Blot bei Gehirnlysaten aus Ratten die verschiedene Dosen an rt-PA erhielten. Zusätzlich ist das Profil der optischen Dichte und die Ponceau S Färbung der Gesamtproteine dargestellt.

Da EMMPRIN auch MMP-3 aktiviert sollte hier der Zusammenhang mit dem aktiven MMP-3 untersucht werden. Eine negative Korrelation zum MMP-3 konnte nach Auswertung und Quantifizierung der Western Blots gezeigt werden (exakte Werte siehe Anhang Tabelle 2). Die Korrelation betrug im Kortex $r = -0,993$ ($p = 0,02$) und in den Basalganglien war $r = -0,951$ mit $p = 0,042$. Das Ergebnis wurde graphisch in Abbildung 25 und Abbildung 26 verdeutlicht.

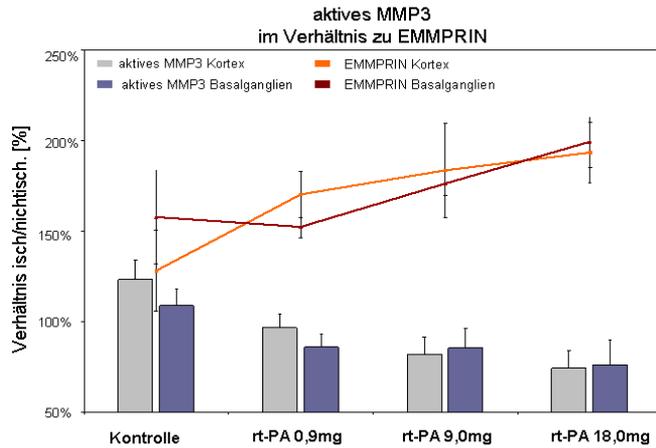


Abbildung 25: Quantifizierung des aktiven MMP-3 und von EMMPRIN in Abhängigkeit von der Konzentration des applizierten rt-PAs (getrennt Kortex, bzw. Basalganglien) Es wurde das Verhältnis ischämisch zu nicht-ischämisch berechnet.

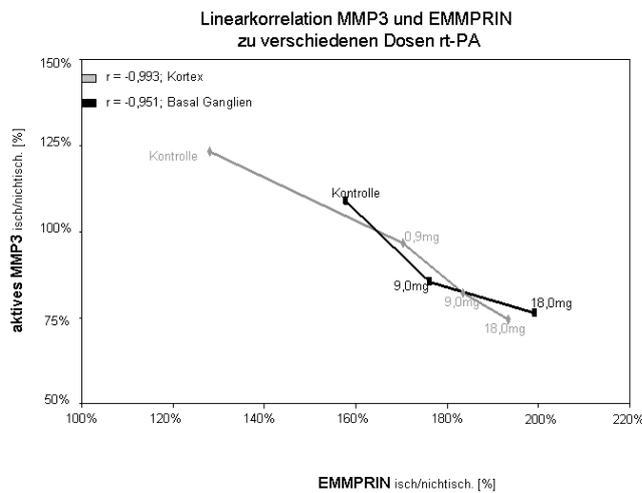


Abbildung 26: Korrelation der Werte von MMP-3 und EMMPRIN getrennt für Kortex und Basalganglien. Die Regressionsanalyse wurde mit SPSS Version 15.0 berechnet (Die Fehlerbalken wurden hier aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen).

4.1.3. Zusammenhang von MMP-3 mit dem Inhibitor TIMP-1 und dem Infarktverhalten

Die TIMP-1 Expression bei den Kontrolltieren lag im Kortex bei 114% (+/-4%) und fiel dann bei der Dosierung von 18 mg/kg rt-PA auf 86% +/-5% (Anova: p<0,05). Das Infarktvolumen zeigte schon in der gering und moderaten Dosierung von rt-PA einen deutlichen Rückgang von 103+/-16mm³, auf 101+/-17mm³ (beide p<0,05 gegenüber der Kontrollgruppe 165+/-21mm³). Bei einer Dosis von 18mg/kg war das Infarktvolumen ähnlich dem Wert der Kontrollgruppe (133+/-24; p>0,05). Die rt-PA Dosierung bei der MMP-3 und TIMP-1 ausgeglichen sind ist das Infarktvolumen am niedrigsten.

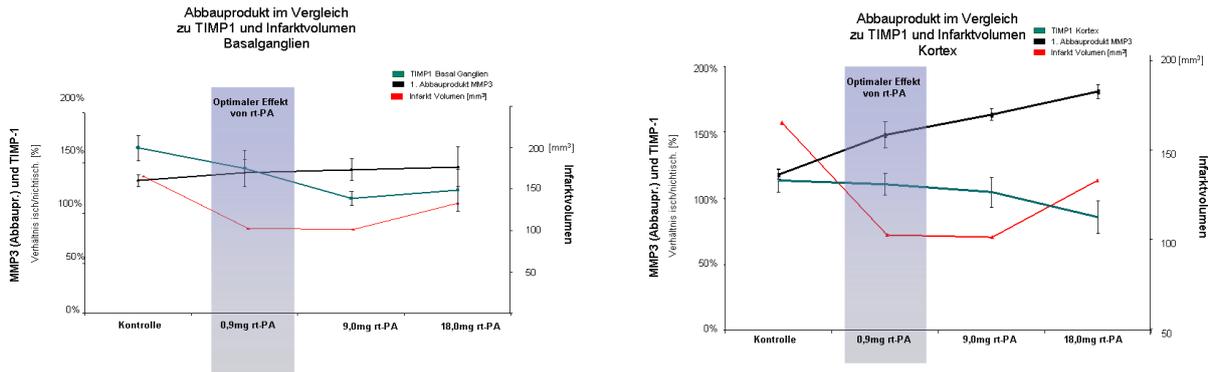


Abbildung 27: Quantifizierung des aktiven MMP-3 und des TIMP-1 in Abhängigkeit von der Konzentration des applizierten rt-PAs (getrennt Kortex bzw. Basalganglien,) sowie des Infarkt volumens. Die Fehlerbalken der Infarkt volumens Kurve wird aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

4.2. Unterschiede in der Wirkung von rt-PA und Tenekteplase (TNK) auf MMP-3

Lytisch äquivalente Dosierungen der beiden Thrombolytika TNK (5mg/kg) und rt-PA (9mg/kg) wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf MMP-3 verglichen. In der TNK-Gruppe zeigte sich ein deutlicher Abfall des MMP-3 Gehalts im Kortex auf $72 \pm 11\%$ ($p < 0,005$ versus Kontrollgruppe), das Abbauprodukt stieg gegenläufig $112 \pm 21\%$ an. Die Gruppe mit rt-PA Behandlung zeigte einen geringeren Abfall im Kortex auf $82 \pm 11\%$ ($p < 0,05$), sowie einen Anstieg des Abbauprodukts auf $163 \pm 11\%$ ($p < 0,05$). In den Basalganglien zeigte sich in der Tenekteplase Gruppe ein Abfall des MMP-3 Gehalts auf $74\% \pm 18\%$ ($p < 0,05$ versus Kontrolle), während das Abbauprodukt auf $188 \pm 18\%$ ($p < 0,05$ versus Kontrolle) stieg. In der rt-PA Gruppe fiel der MMP-3 Gehalt auf $85 \pm 13\%$ ($p < 0,280$), während das Abbauprodukt auf $143 \pm 11\%$ ($p < 0,407$) stieg (siehe Abbildung 28).

Aus diesem Ergebnis lässt sich ein stärkerer Verbrauch von MMP-3 durch TNK als durch eine äquivalente Dosis rt-PA nachweisen.

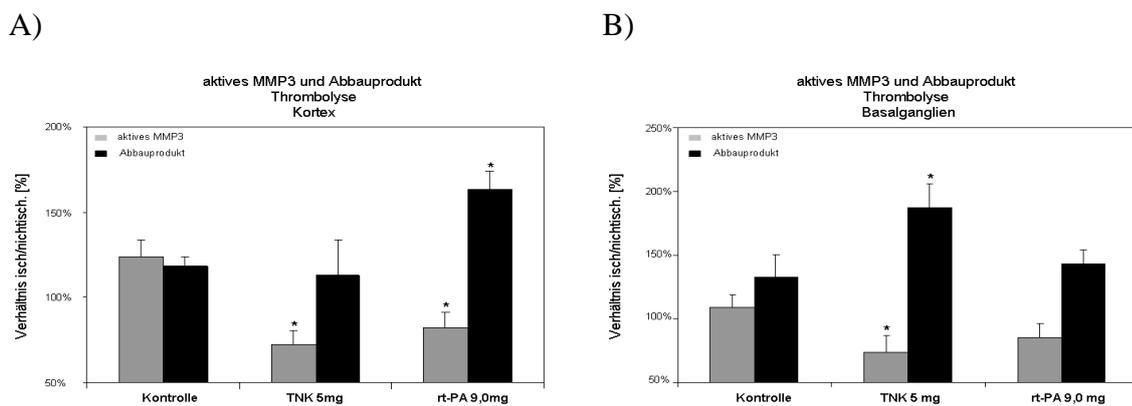
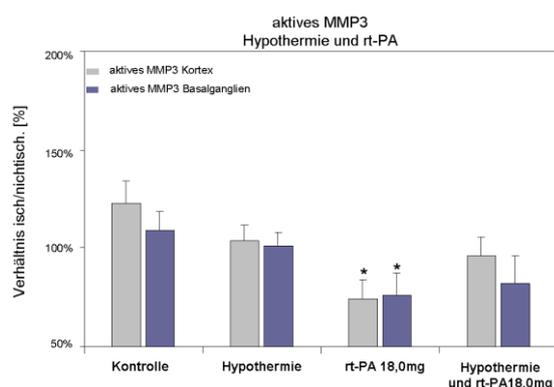


Abbildung 28: Quantifizierung des MMP-3 Western Blots der Banden des aktiven MMP-3 (A) und des Degradationsprodukts (B). Aufgetragen wurden Gehirnllysate aus Ratten nach I3R24 ohne Behandlung sowie Ratten mit einer TNK Behandlung sowie einer rt-PA Behandlung. Das Gewebe wurde getrennt nach ischämischem und nicht-ischämischem Kortex. Die Abweichung der Mittelwerte wurde mit Hilfe des t-Test berechnet (* : $p < 0,05$).

5. MMP-3 Aktivität unter Hypothermie und kombinierter Hypothermie / rt-PA Therapie

Um die Auswirkung einer Temperaturabsenkung auf den MMP-3 Gehalt zu untersuchen, wurde eine Tiergruppe einer moderaten Hypothermie für die Phase der Reperfusion ausgesetzt. Eine zweite Gruppe erhielt zusätzlich zur Hypothermie die maximale Dosis rt-PA von 18mg/kg KG. Die alleinige Hypothermie Behandlung ergab ein leichtes Absinken des *aktiven MMP-3* sowohl im Kortex $103\pm 7\%$ als auch in den Basalganglien $101\pm 9\%$ (beide n.s. versus Kontrolle). Die Kombination Hypothermie mit der thrombolytischen Behandlung ergab einen Aktivitätsabfall von MMP-3 auf $96\pm 12\%$ ($p=0,075$) im Kortex und auf $82\pm 12\%$ ($p=0,062$) in den Basalganglien (beide fast signifikant versus Kontrolle). Das *Abbauprodukt* zeigte unter alleiniger Hypothermie Behandlung ein Anstieg auf $111\pm 20\%$ (n.s.) im Kortex, sowie auf $91\pm 12\%$ in den Basalganglien ($p<0,05$ versus Kontrolle)). In der Kombination von Hypothermie und rt-PA ergibt sich ein Anstieg im Kortex auf $159\pm 15\%$ ($p=0,072$), in den Basalganglien auf $127\pm 5\%$ ($p<0,05$) (siehe Abbildung 29).

A)



B)

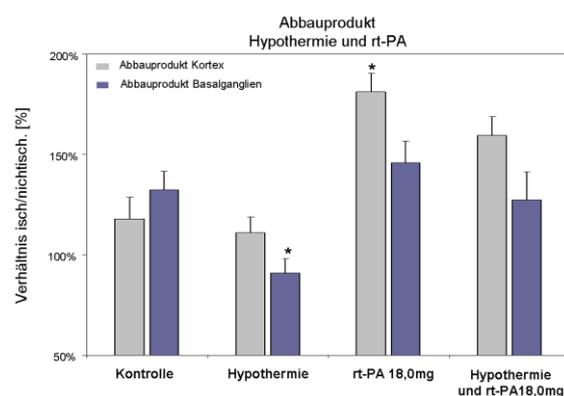


Abbildung 29: Quantifizierung des aktiven MMP-3 (A) und des Degradationsprodukts (B). Aufgetragen wurden Gehirnllysate aus Ratten nach I3R24 ohne Behandlung, mit alleiniger Hypothermie Behandlung und auch mit einer kombinierten Hypothermie und rt-PA Behandlung. Das Gewebe wurde getrennt nach ischämischem und nicht-ischämischem Kortex. Es wird der Mittelwert aus $n=6 \pm$ Standardfehler dargestellt. Die Abweichung der Mittelwerte wurde mit Hilfe des t-Test berechnet (* : $p<0,05$).

6. Einfluss von MMP-Inhibitoren auf MMP-3

In dieser Gruppe untersuchte ich den Einfluss zweier verschiedener Matrixmetalloproteinase Inhibitoren : Doxycyclin und Calbiochem-Inhibitor.

Im Kortex zeigte sowohl die Gabe von Doxycyclin, als auch die des Calbiochem-Inhibitors, eine leichte Reduktion des *aktiven MMP-3* auf $104\pm 7\%$, bzw. $97\pm 18\%$ (beide n.s. gegenüber der Kontrollgruppe). Auch das *Abbauprodukt* zeigte weder in der Doxycyclin-Gruppe ($105\pm 22\%$), noch in der Calbiochem-Inhibitor Gruppe ($99\pm 19\%$) einen signifikanten Unterschied.

In den Basalganglien zeigte sich eine signifikante Abnahme des *aktiven MMP-3* durch die Gabe von Doxycyclin ($68 \pm 17\%$; $p < 0,05$), aber nicht nach Gabe des Calbiochem Inhibitors ($90 \pm 19\%$; $p = 0,184$). Das Abbauprodukt nahm unter Doxycyclin Gabe ($105 \pm 22\%$; $p = 0,215$) ebenso ab, wie unter Gabe des Calbiochem-Inhibitor ($99 \pm 19\%$; $p = 0,157$) (siehe Abbildung 30A/B).

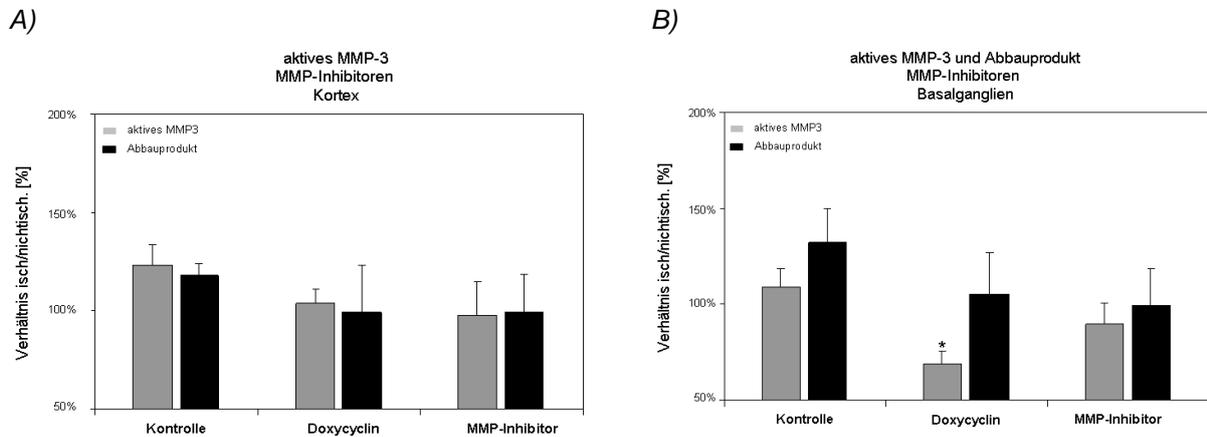


Abbildung 30: Quantifizierung des MMP-3 Western Blots der Banden des aktiven MMP-3 (A) und des Degradationsprodukts (B). Die Abweichung der Mittelwerte wurde mit Hilfe des t-Test berechnet (* : $p < 0,05$).

7. Auswirkung von Gendelektionen des MMP Systems (TIMP-1 und MMP-9) auf MMP-3

Im letzten Schritt dieser Arbeit wurden Mäuse mit deletierten Genen des MMP-Systems untersucht. Auf der eine Seite wurde eine Knock-Out (KO) Mutante des endogenen Inhibitors TIMP-1 einer 3h Ischämie und 24 Reperfusion unterzogen und auf der anderen Seite eine KO mit der Deletion im MMP-9 Gen.

Fehlte der Inhibitor TIMP-1 zeigte sich ein Anstieg des MMP-3 (nicht signifikant) gegenüber Wildtyp (WT) Kontrollen. Dies zeigte den Einfluss von TIMP-1 auf MMP-3 in Mäusen. War in Mäusen das MMP-9 Gen deletiert, so wurde ein signifikanter Abfall des MMP-3 Gehaltes gezeigt ($73 \pm 6\%$ versus $105 \pm 16\%$ in der Wildtyp Maus; $p < 0,05$). Dies wies auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen MMP-9 und MMP-3 und auf eine Rückkopplung zwischen diesen beiden MMPs hin.

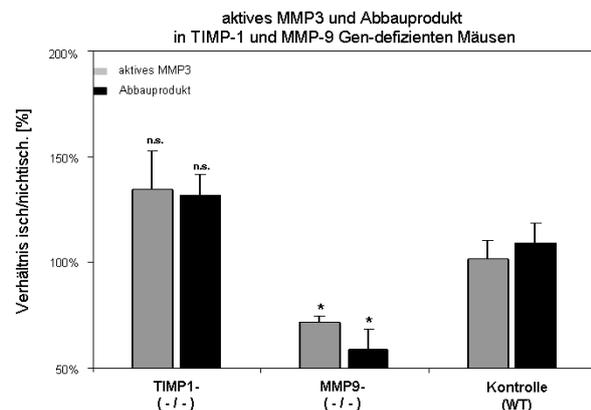


Abbildung 31: Quantifizierung des MMP-3 Western Blots der Banden des aktiven MMP-3 (A) und des Degradationsprodukts (B). Aufgetragen wurden Gehirnllysate aus TIMP-1 und MMP-9 defizienten Mäusen sowie von Wildtyp Mäusen als Kontrolle.

D. Diskussion

1.1. Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von MMP-3 bei einer transienten Ischämie im Tiermodell der Ratte und auch der Maus zu untersuchen. Es sollte gezeigt werden, dass verschiedene Therapien die MMP-3 Aktivität beeinflussen und MMP-3 somit mechanistisch in die ischämischen zerebralen Schädigungen eingreift. In einem weiteren Ansatz sollten zwei Genmutanten aus dem MMP-System untersucht werden und damit weiter der Mechanismus des MMP-3 im Kontext der Ischämie belegt werden.

Als erstes Ergebnis konnte gezeigt werden, dass unter transientscher Ischämie und Reperfusion eine scheinbare Abnahme des aktiven MMP-3 im Gehirn stattfindet. Gleichzeitig wurde allerdings ein Anstieg des Abbauprodukts nachgewiesen. Dies bedeutet, dass das aktivierte Protein sehr schnell unter den Ischämie/Reperusionsbedingungen verbraucht wird.

Mit steigender Ischämiedauer nahm auch ohne Reperfusion der Verbrauch des MMP-3 zu. Dies wurde hier in beiden Tiermodellen, sowohl in der Maus als auch in der Ratte gezeigt. Auch eine ansteigende Reperusionsdauer bewirkte einen verstärkten Verbrauch von MMP-3. Allerdings war der Einfluss der Ischämiedauer deutlich größer als die Reperusionsdauer.

Die therapeutische Lyse-Therapie nach einem akuten Schlaganfall spielt eine maßgebliche Rolle bei den unerwünschten mikrovaskulären Nebenwirkungen wie Blutungen oder Schäden der Basalmembran. Es gelang hier aufzuzeigen, dass endogenes rt-PA einen enormen und dosisabhängigen Effekt auf MMP-3 hat. Je höher die applizierte Menge rt-PA ist, desto mehr MMP-3 wird im ischämischen Gehirngewebe umgesetzt. Rt-PA in steigenden Dosen ist ebenfalls für steigende Aktivität von MMP-9 im Gehirngewebe verantwortlich. Ein linearer Zusammenhang zum Anstieg des MMP-3 Verbrauchs konnte gezeigt werden. Verantwortlich für den Anstieg des MMP-3, und damit indirekt für MMP-9, könnte der MMP-Inducer EMMPRIN sein, denn mit steigenden Dosen rt-PA stieg im gleichen Verhältnis auch der Gehalt an EMMPRIN. Im Gegenzug dazu fiel der Gehalt an TIMP-1, einem möglichen MMP-3 Inhibitor, mit steigender rt-PA Dosierung. Die Konzentrationen bei denen das Verhältnis Inhibitor (TIMP-1) zu Protease (MMP-3) ausgeglichen war, lagen bei niedrigen rt-PA Dosierungen. Dies bedeutet, eine mögliche Schädigung durch MMP-3, bzw. durch die Aktivierung des MMP-9, wird bei diesen Konzentrationen minimiert. Dies spiegelt sich auch in dem niedrigen Infarkt volumen und auch den niedrigeren mikrovaskulären Schäden bei diesen rt-PA Dosierungen wieder. Wird das alternative Thrombolytikum (TNK) eingesetzt, zeigte sich im Vergleich zur rt-PA Behandlung eine stärkere Aktivierung des MMP-3.

Die in dieser Arbeit eingesetzten MMP-Inhibitoren haben einen unterschiedlichen Einfluss auf MMP-3. Lediglich Doxycyclin, ein seit Jahren in klinischer Benutzung befindliches Antibiotikum, mit Potenzial als unspezifischer MMP-Inhibitor konnte die Aktivität von MMP-3 in den Basalganglien hemmen.

Die Ausschaltung von TIMP-1, einem endogenen Inhibitor von MMP-3 hat einen höheren Gehalt an aktivem MMP-3 zur Folge und ist auch für einen höheren Gehalt des Abbauprodukts verantwortlich. Der Verbrauch des Proteins durch Aktivierung von MMP-9 stieg dabei wohl in gleichem Maße, wie neues MMP-3 nachgebildet wurde.

Die Ausschaltung des Zielproteins von MMP-3, nämlich MMP-9, sorgte dafür, dass der Gehalt an aktivem MMP-3 stark abnahm, ursächlich hierfür ist wohl ein bisher unbekannter Rückkopplungsmechanismus.

2. Rolle der MMP-3

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen einen erheblichen Beitrag zum Verständnis der Rolle von MMP-3 bei zerebraler Ischämie bei. So wurden unter einer Vielzahl exogener Einflussgrößen denkbare Wirkweisen von MMP-3 hinsichtlich der zerebralen Mikrogefäße untersucht.

2.1. Ischämie/Reperfusion

Ein Verbrauch von MMP-3, manifestiert durch den Anstieg des Degradationsprodukts unter proteolytischen Bedingungen, wie hier im ischämischen Gehirngewebe, wurde bisher noch nicht beschrieben. In einer Vielzahl von vorhergehenden Arbeiten wurde der massive Anstieg von MMP-9 nach einer Ischämie gezeigt (McColl 2009). Eine Reihe proteolytischer Enzyme ist nach zerebraler Ischämie hochreguliert; dazu gehört das nicht-zellulären Protease System der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) (del Zoppo et al., 2007; Mun-Bryce & Rosenberg 1998).

Auch der nicht unerhebliche Anstieg von MMP-2 zu einem späteren Zeitpunkt der ischämischen Schadenskaskade wurde beschrieben (Walker & Rosenberg 2009). Während eines Gefäßverschlusses kommt es zum Funktionsverlust der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und der Zerstörung der Extrazellulärmatrix (EZM) (Danton & Dietrich 2003; Emsley & Tyrell 2002, Rosenberg 2002). Im Besonderen werden die Proteine Kollagen Typ IV und Laminin durch verschiedene Proteasen des MMP-Systems degradiert.

Die Aktivierung und Regulation der MMPs findet auf verschiedenen Ebenen statt und unterliegt z.T. komplexen Mechanismen. Ein wichtiger Schritt bevor ein MMP in die aktive proteolytisch wirksame Form übergeht, ist die Abspaltung des Pro-Peptids der inaktiven Pro-Form. Dafür sind unter anderem auch andere MMPs verantwortlich. Eine derartige Rolle, die Aktivierung von Pro-MMP-9, ist auch für MMP-3 beschrieben worden (Vempati et al., 2007).

Die aktive Form des MMP-3 konnte vermehrt nach Ischämie/Reperfusion nachgewiesen werden. Gleichzeitig fand sich auch ein Anstieg des Degradationsprodukts. So konnte gezeigt werden, dass MMP-3 ansteigt und relativ zeitnah auch verbraucht wird. Dieses Ergebnis wurde in zwei verschiedene Tierspezies bestätigt. Ein Zusammenhang mit der massiven ischämischen Degradation der Mikrogefäße liegt nahe. Allerdings ist nicht bekannt ob ein

direkter proteolytischer Einfluss des MMP-3 oder ob ein sekundärer Einfluss über die Aktivierung des MMP-9 vorliegt.

2.2. Zeitverlauf

Durch Teil-Studien dieser Arbeit konnte ein unterschiedlicher Einfluss der Ischämie und der Reperfusion auf die Aktivierung von MMP-3 nachgewiesen werden. So spielt die Ischämiedauer eine wesentlich wichtigere Rolle bei der Aktivierung von MMP-3. Es erscheint relevant, dies hinsichtlich möglicher Therapien zu kennen. So sollte eine frühest mögliche Intervention mit einem MMP-Inhibitor noch während der Ischämiephase angestrebt werden. Trotz der Relevanz dieser Information wurde in bisherigen Studien ein geringes Augenmerk auf die Differenzierung der Ischämie und Reperfusionseinflüsse gelegt. Lediglich hinsichtlich der Infarktgröße wurde in mehreren Untersuchungen die Auswirkung von Ischämie und Reperfusionzeiten untersucht; dabei spielt die Reperfusionzeit eine nicht unerhebliche Rolle bei der Infarzierung (Vosko et al., 2006; Clark et al., 2001). Auch hinsichtlich der MMPs sind einige Daten bekannt (del Zoppo et al., 2007) die eine Aggravierung der MMP-Aktivierung (vor allem MMP-2 und MMP-9) mit steigender Ischämie und Reperfusionsdauer zeigen. Für MMP-3 wurde dies in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt. 2002 publizierte Rosenberg eine Zeitschiene auf der vermutete MMP Aktivierungsschritte diskutiert wurden. Für MMP-3 wurde eine denkbare Aktivierung für ca. 4h nach Beginn der Reperfusion angenommen. Allerdings konnte ich in meiner Arbeit diese These auf die Ischämiephase vorverlegen.

2.3. Thrombolyse

Die Thrombolyse nach einem Schlaganfall ist derzeit die einzige Erfolg versprechende Methode um die mikrovaskuläre Durchgängigkeit wiederherzustellen. Allerdings ist mit massiven Blutungen und Ödembildung als Nebenwirkungen zu rechnen (NINDS rt-PA stroke trial, 1995). Die Barrierenfunktion der Mikrogefäße wird durch die Thrombolyse erheblich reduziert (Burggraf et al., 2003). So steigt die Extravasation von Blutbestandteilen in Abhängigkeit von der applizierten Menge an rt-PA (Burggraf et al., 2007). Auch die Veränderung des Infarkt volumens und die Zerstörung der Basalmembran finden in Abhängigkeit von der applizierten Menge rt-PA statt. Dabei wurde eine Protektion bei geringen Dosen des Thrombolytikums gezeigt. Auch in verschiedenen klinischen Studien wurde eine geringere Dosis des rt-PA empfohlen (Yamaguchi et al., 2006) um damit neben eines gleich bleibenden Thrombolyseerfolgs eine Reduzierung der Nebenwirkungen zu erzielen. Die Rolle der MMPs und der TIMPs bei der Thrombolyse mit rt-PA wurde in meiner Arbeitsgruppe bereits hinsichtlich des MMP-9 (Burggraf et al., 2007) veröffentlicht. In der vorliegenden Arbeit konnte ich folgende Ergebnisse erzielen: Das Degradationsprodukt und damit der Verbrauch an aktivem MMP-3 steigt signifikant mit der Dosierung von rt-PA an. Parallel dazu sank das aktive MMP-3 im Gehirngewebe.

Dies entspricht den bereits publizierten Ergebnissen bei MMP-2 und -9 (Burggraf et al., 2003). Die lineare Korrelation von MMP-9 mit dem Verbrauch von MMP-3 konnte hier nachgewiesen werden. Allerdings spielt nicht nur die reine Aktivität der MMPs eine Rolle, sondern durchaus ihre Interaktion mit den endogenen Inhibitoren. So ist das Verhältnis der TIMPs zu ihren Proteasen ein aussagekräftiger Hinweis auf eine stattfindende Proteolyse; TIMP-1 und 2 waren mit den Gelatinasen MMP-2 /-9 bei niedrig dosierten rt-PA im Gleichgewicht. Dies bestätigte sich auch als günstigste Dosis hinsichtlich der Degradationsreaktionen der BM, vor allem hinsichtlich des Kollagen Typ IV Abbaus. In meiner Arbeit habe ich nun den endogenen Inhibitor TIMP-1 zum MMP-3 in Relation gesetzt. Auch hier fand sich ein ähnliches Ergebnis. Die geringe Dosierung von rt-PA schien eine Balancierung der MMP-3 mit TIMP-1 nach sich zu ziehen. Allerdings muss beachtet werden, dass auch TIMP-3 für MMP-3 eine erhebliche Rolle spielt (Rosenberg et al., 2009), was nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden konnte (siehe Abbildung 32).

EMMPRIN ist ein jüngst entdecktes Aktivatorprotein für MMP-1,-2 und -3 (Foda et al., 2001). Ein zerebrales Vorkommen und eine Regulation durch ischämische Vorgänge konnten in meiner Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden (Burggraf et al., 2007; Zhu et al., 2008). Wird exogenes rt-PA appliziert so ist in Folge ein Anstieg des EMMPRIN und parallel dazu des degradierenden MMP-9 zu beobachten gewesen (Burggraf et al., 2007). Allerdings konnte bisher auch in der Literatur kein direkter Zusammenhang von EMMPRIN und MMP-9 nachgewiesen werden. Durch die hier gezeigten Ergebnissen steht zu vermuten, dass die MMP-9 Aktivierung durch EMMPRIN indirekt über eine MMP-3 Aktivierung stattfindet (siehe Abbildung 32).

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die MMP-3 Aktivierung nach Behandlung mit zwei verschiedenen Thrombolytika verglichen. TNK ist im Unterschied zu rt-PA eine modifizierte Form des t-PA und hat damit eine längere Halbwertszeit. Dies führt einerseits natürlich zu einer höheren Effizienz bei den Lyseeigenschaften (Lapchak et al., 2009), damit aber andererseits zu einer erheblich höheren Blutungsrate (Collen et al., 1993; Khatri et al., 2005). In dem Rattenmodell des ischämischen Schlaganfalls wurde in meiner Gruppe die gestiegenen Hämorrhagien quantifiziert (Burggraf et al., 2010). Bisher wurde nur in wenigen Studien der Einfluss dieser genetisch modifizierten Form des t-PA auf das endogene proteolytische System untersucht. So wurde in einer früheren Doktorarbeit dieser Gruppe gezeigt, dass MMP-9 um 30% gegenüber einer mit rt-PA behandelten Gruppe anstieg. Hier gelang es zu zeigen, dass MMP-3 ebenfalls um ca. 30% gegenüber der rt-PA Gruppe anstieg. Dies unterstützt die Hypothese der bereits gezeigten lineare Korrelation zwischen MMP-3 und MMP-9.

2.4. Hypothermie und Kombination mit der Thrombolyse mit rt-PA

Die Hypothermiebehandlung hat sich in klinischen Studien als wirksame neuroprotektive Maßnahme erwiesen (Schwab et al. 1998; Kollmar et al., 2007, 2009). In tierexperimentellen Untersuchungen in fokalen und globalen Ischämie-Modellen wurde unter milder und

moderater Hypothermie die Infarktgröße signifikant reduziert (Hamann et al., 2004). Es wird angenommen, dass die signifikante Reduzierung des Infarktvolumens einerseits durch einen verminderten Stoffwechsel (z.B.: Reduktion der Sauerstoffbedarfs) zustande kommt, aber andererseits auch der Einfluss auf spezifische Schädigungsmechanismen zur Protektion führt (Burk et al., 2008).

Die MMP-Proteasen, darunter auch das hier untersuchte MMP-3, tragen einen erheblichen Teil zur mikrovaskulären Schädigung bei. Ich konnte zeigen, dass unter Hypothermiebehandlung der Gehalt, bzw. Verbrauch an aktivem MMP-3 leicht abfällt. Dieser Abfall ist allerdings in den Basalganglien stärker ausgeprägt. Sie sind als „Ort des Geschehens“ vermutlich stärker betroffen und somit ist auch der Einfluss der Hypothermie dort größer.

Einige klinisch erfolgreiche Studien zur Kombinationsbehandlung Hypothermie und Thrombolyse wurden bisher durchgeführt, allerdings traten dabei auch einige unerwünschte Nebenwirkungen wie Pneumonie auf (Kollmar et al., 2004). Wenige Untersuchungen wurden bisher auf molekularer Ebene zur Funktionsweise dieser Therapieoption vorgenommen. Im experimentellen Schlaganfallmodell der Ischämie konnte folgendes gezeigt werden: Die Kombinationsbehandlung der Hypothermie und rt-PA vereint zwei Effekte: einerseits, die MMP aktivierende Wirkung des rt-PA und andererseits die aktivitätssenkende Wirkung durch die Hypothermie. Dadurch ergibt sich für MMP-3 keine signifikante Änderung gegenüber den unbehandelten Tieren. Dem erheblichen negativen Effekt der Thrombolyse hinsichtlich der proteolytischen Schädigung der Mikrogefäße durch MMP-3 konnte durch die Kombination mit der Hypothermie aber entgegengewirkt werden.

2.5. MMP-Inhibitoren

In vorausgehenden Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass unspezifische MMP-Inhibitoren einen positiven Effekt auf das Outcome und die Infarktgröße im Tiermodell haben. Ein Zusammenhang mit einer Reduzierung der Aktivität der beiden Gelatinasen MMP-2/-9 ist gezeigt worden (Nagase et al., 2006). Allerdings wurden in klinischen Studien erhebliche Nebenwirkungen dieser Inhibitoren aufgezeigt. Der Einsatz eines neuen, synthetischen und spezifischen MMP-2/-9 Inhibitors hatte zum Ziel ebenfalls die Infarktgröße nach transientser zerebraler Ischämie zu reduzieren.

Es konnte keine Reduzierung der Infarktgröße nach der Applikation des MMP-2/-9 Inhibitors erzielt werden (nicht publizierte Daten; D. Burggraf). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine weniger gute Penetration des Inhibitors durch die Blut-Hirn-Schranke sein. Denkbar wäre auch, dass die Konzentration nicht hoch genug gewählt wurde. Es konnte nach Behandlung mit dem MMP-Inhibitor in ischämischer und auch in der nicht-ischämischen Gehirnhälfte keine MMP-9 Aktivität mehr nachgewiesen werden. Allerdings war noch ein Vorhandensein von MMP-2 zu detektieren. Der Anstieg des MMP-2 (Burggraf et al., 2003)

war signifikant reduziert. Ein Einfluss auf MMP-3 war in keinster Weise festzustellen. Das Ausschalten der MMP-9 hatte keinen Einfluss auf die Regulation des MMP-3. Somit ist davon auszugehen, dass kein direkter Rückkopplungsmechanismus von MMP-9 zu MMP-3 existent ist.

Doxycyclin ist seit längerem als unspezifischer MMP-Inhibitor bekannt. Ebenfalls wurden sowohl in meiner Gruppe, als auch anderen seine positiven Auswirkungen auf das Infarktvolume und das Outcome nach einem Schlaganfall (Burggraf et al., 2007) gezeigt. Außerdem wird eine inhibitorische Wirkung auf weitere Serinproteasen wie tPA und uPA vermutet (Burggraf et al., 2007). Eine Reduktion des MMP-3 durch Doxycyclin nach Ischämie/Reperfusion konnte gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass tPA zu einer Aktivierung der MMP-3 und auch zu einer Aktivierung des MMP-3 Verbrauchs führt. Wird durch Doxycyclin der Gehalt an tPA reduziert, so trägt dies neben der MMP-inhibitorischen Wirkung zur Abnahme des aktiven MMP-3 bei (siehe Abbildung 32).

Plasmin / Plasminogen System

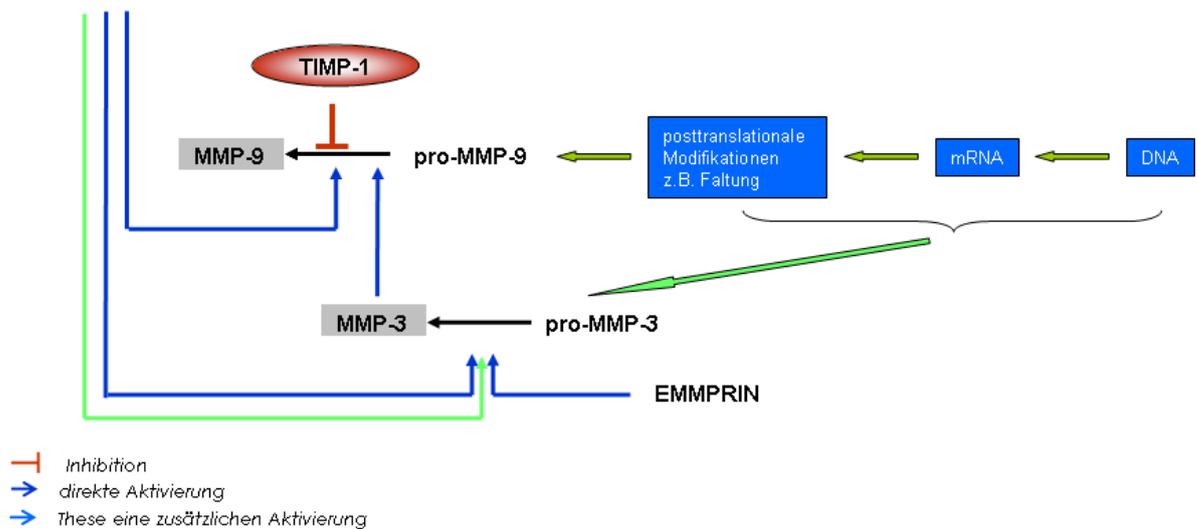


Abbildung 32: bekannte und postulierte Aktivierungswege innerhalb der MMP-3 und MMP-9 Kaskade

2.6. Einfluss von MMP-9 und TIMP-1 Gendeletion auf MMP-3

Die Untersuchung der Gen-Mutanten, bei denen TIMP-1 als endogener Inhibitor von MMP-3 ausgeschaltet wurde, zeigte dass der Gehalt an aktivem MMP-3 gegenüber schein-operierten Tieren anstieg. Allerdings konnte der ischämisch bedingte Anstieg des MMP-3 durch ein Fehlen des TIMP-1 nicht beeinflusst werden. Dies lässt sich eventuell dadurch erklären, dass die Aufgaben von TIMP-1 durch TIMP-3 übernommen werden. Dass TIMP-3 dazu fähig ist wurde durch Walker und Rosenberg (2009) erst vor kurzer Zeit aufgeklärt. In meiner Forschungsgruppe wird derzeit versucht dies zu bestätigen.

Die genetische Deletion des MMP-3 Zielproteins MMP-9 sorgte allerdings für einen starken Abfall des Gehalts an aktiven MMP-3, bzw. des dazugehörigen Abbauprodukts. Dieses Verhalten wurde erstmals von mir beobachtet. Eventuell zeigt sich hier ein bisher

unbekannter, aber indirekter Rückkopplungsmechanismus der einen hemmenden Einfluss hat, bzw. durch fehlende Induktion den Gehalt an MMP-3 niedrig hält (siehe Abbildung 32).

In einem vorhergehenden Experiment konnte ich zeigen, dass der MMP-2/-9 Inhibitor die MMP-9 Aktivitäten komplett unterbindet. Somit war keine Rückkopplung zwischen MMP-9 und MMP-3 nachzuweisen. Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so bedeutet dies, dass diese Rückkopplung nicht durch das MMP-9 Protein selbst stattfindet, sondern eventuell durch molekulare Mechanismen der Genregulation oder durch modulierte posttranslationale Modifikationen.

3. Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es die Rolle des MMP-3 im ischämischen Schlaganfall zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden einige in der Literatur bisher nicht beschriebenen Mechanismen und Aktivierungswege des proteolytischen Systems bei zerebraler Ischämie und Reperfusionsschädigungen aufgezeigt. Diese wurden durch unterschiedliche externe Trigger in verschiedenster Weise beeinflusst. Es ergibt sich ein konsistentes Bild hinsichtlich der Rolle des MMP-3 im Rahmen des MMP und des Plasminogen-Plasmin-Systems.

In Anschluss-Arbeiten sollten mit Hilfe weiterführender Untersuchungen mit rekombinanten Proteinen und in-vitro Modellen die Thesen auf diese Aktivierungskaskaden untermauert werden.

E. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war das Verhalten der Matrixmetalloproteinase 3 während einer transienten Ischämie im Tiermodell der Ratte und auch der Maus zu untersuchen.

Es sollte gezeigt werden, dass verschiedene Therapien die MMP-3 Aktivität beeinflussen und MMP-3 somit mechanistisch in die ischämischen zerebralen Schädigungen eingreift. In einem weiteren Ansatz sollten zwei Genmutanten aus dem MMP-System untersucht werden und damit weiter der Mechanismus des MMP-3 im Kontext der Ischämie belegt werden.

Das für diese Untersuchung nötige Detektionsverfahren wurde als erster Teil dieser Arbeit etabliert.

Als erstes Ergebnis konnte gezeigt werden, dass eine scheinbare Abnahme des aktiven MMP-3 unter transientscher Ischämie und Reperfusion im Gehirn ein Anstieg des Abbauprodukts nach sich zog. Dies bedeutet, dass das aktivierte Protein sehr schnell unter den Ischämie/Reperfluationsbedingungen verbraucht wird.

Mit steigender Ischämiedauer nahm auch ohne Reperfusion der Verbrauch des MMP-3 zu. Dies wurde hier in beiden Tiermodellen, sowohl in der Maus als auch in der Ratte gezeigt. Auch eine ansteigende Reperfluationsdauer bewirkte einen verstärkten Verbrauch von MMP-3. Der Einfluss der Ischämiedauer war deutlich größer als der der Reperfluationsdauer.

Die therapeutische Lyse-Therapie nach einem akuten Schlaganfall spielt eine maßgebliche Rolle bei den unerwünschten mikrovaskulären Nebenwirkungen wie Blutungen oder Schäden der Basalmembran. Es gelang hier aufzuzeigen, dass exogenes rt-PA einen enormen und dosisabhängigen Effekt auf MMP-3 hat. Je höher die applizierte Menge rt-PA ist, desto mehr MMP-3 wird im ischämischen Gehirngewebe umgesetzt. Rt-PA in steigenden Dosen ist ebenfalls für steigende Aktivität von MMP-9 im Gehirngewebe verantwortlich. Ein linearer Zusammenhang zum Anstieg des MMP-3 Verbrauchs konnte gezeigt werden. Verantwortlich für den Anstieg des MMP-3, und damit indirekt für MMP-9, könnte der MMP-Inducer EMMPRIN sein, denn mit steigenden Dosen rt-PA stieg im gleichen Verhältnis auch der Gehalt an EMMPRIN. Im Gegenzug dazu fiel der Gehalt an TIMP-1, einem möglichen MMP-3 Inhibitor, mit steigender rt-PA Dosierung. Die Konzentrationen bei denen das Verhältnis Inhibitor (TIMP-1) zu Protease (MMP-3) ausgeglichen war, lagen bei niedrigen rt-PA Dosierungen. Dies bedeutet, eine mögliche Schädigung der Basalmembran durch MMP-3, bzw. durch die Aktivierung des MMP-9, wird bei diesen Konzentrationen minimiert. Dies spiegelt sich auch in dem niedrigen Infarkt volumen und auch den niedrigeren mikrovaskulären Schäden bei diesen rt-PA Dosierungen wieder. Wird das alternative Thrombolytikum (TNK) eingesetzt, zeigte sich im Vergleich zur rt-PA Behandlung eine stärkere Aktivierung des MMP-3.

Die in dieser Arbeit eingesetzten MMP-Inhibitoren haben einen unterschiedlichen Einfluss auf MMP-3. Lediglich Doxycyclin, ein seit Jahren in klinischer Benutzung befindliches Antibiotikum, mit Potenzial als unspezifischer MMP-Inhibitor konnte die Aktivität von MMP-3 in den Basalganglien hemmen.

Die Ausschaltung von TIMP-1, einem endogenen Inhibitor von MMP-3 hat einen höheren Gehalt an aktivem MMP-3 zur Folge und ist auch für einen höheren Gehalt des Abbauprodukts verantwortlich. Der Verbrauch des Proteins durch Aktivierung von MMP-9 stieg dabei wohl in gleichem Maße, wie neues MMP-3 nachgebildet wurde.

Die Ausschaltung des Zielproteins von MMP-3, nämlich MMP-9, sorgte dafür, dass der Gehalt an aktivem MMP-3 stark abnahm, ursächlich hierfür ist wohl ein bisher unbekannter Rückkopplungsmechanismus.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte einige neue und interessante Einblicke in Prozesse gezeigt werden, die unter Ischämie bzw. Reperusionsbedingungen im Maus bzw. Rattenhirn stattfinden. Die aufgetretenen Fragen, wie zum Beispiel der kurzvorher vermutete Rückkopplungsmechanismus werden Bestandteil weiterer Forschungsbemühungen sein.

Ein direkter klinischer Nutzen aus dieser Arbeit lässt sich nicht direkt ableiten, allerdings konnten zumindest einige theoretische Ansätze zur Erklärung z.B. der Blutungskomplikationen nach Einsatz von rt-PA aufgezeigt werden. Der Einsatz von unspezifischen MMP-Inhibitoren hat sich in der Vergangenheit als ineffektiv bzw. als eher schädigend zur Prävention von Schlaganfall Folgen gezeigt. Ob der Einsatz von spezifischen Inhibitoren auf einen bisher noch nicht ganz aufgeklärten Mechanismus als Weg zur Prävention der doch erheblichen Konsequenzen von Schlaganfällen eine Lösung darstellt, muss die Zukunft zeigen.

F. Literatur

- 1) **Apte SS**, Olsen BR, Murphy G (1995)
The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J. Biol. Chem.* 270: 14313 - 14318.
- 2) **ASK** (1996)
Thrombolytic therapy with streptokinase in acute ischemic stroke. The Multicenter Acute Stroke Trial - Europe Study Group. *N. Engl. J. Med.* 335: 145 - 150.
- 3) **Astrup J**, Siesjo BK, Symon L (1981)
Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke.* 12: 723-725.
- 4) **Baker AH**, Edwards DR, Murphy G (2002)
Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* 115: 3719 - 3727.
- 5) **Baramova EN**, Bajou K, Remacle A, L'Hoir C, Krell HW, Weidle UH, Noel A, Foidart JM (1997)
Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Lett.* 405: 157 - 162.
- 6) **Bini A**, Itoh Y, Kudryk BJ, Nagase H (1996)
Degradation of cross-linked fibrin by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1): hydrolysis of the gamma Gly 404-Ala 405 peptide bond. *Biochemistry.* 35: 13056 - 13063.
- 7) **Bini EJ**, Cohen J (1999)
Impact of protease inhibitors on the outcome of human immunodeficiency virus-infected patients with chronic diarrhea. *Am J Gastroenterol.* 94: 3553 - 3559.
- 8) **Birkedal-Hansen H** (1995)
Matrix metalloproteinases. *Adv. Dent. Res.* 9 (3 Suppl): 16.
- 9) **Birkedal-Hansen H** (1995)
Proteolytic remodeling of extracellular matrix, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 728 – 735.
- 10) **Borland G**, Murphy G, Ager A (1999)
Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits shedding of L-selectin from leukocytes. *J. Biol. Chem.* 274: 2810 - 2815.
- 11) **Burggraf D**, Martens HK, Dichgans M, Hamann GF (2007)
rt-PA causes a dose-dependent increase in the extravasation of cellular and non-cellular blood elements after focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1164: 55 - 62.
- 12) **Burggraf D**, Martens HK, Jäger G, Hamann GF (2003)
Recombinant human tissue plasminogen activator protects the basal lamina in experimental focal cerebral ischemia. *Thromb. Haemost.* 89: 1072 - 1080.

- 13) **Burggraf D**, Martens HK, Liebetrau M, Vosko MR, Dichgans M, Hamann GF (2005)
A new approach to reduce the number of animals used in experimental focal cerebral ischemia models. *Neurosci. Lett.* 386: 88 - 93.
- 14) **Burggraf D**, Trinkl A, Dichgans M, Hamann GF (2007)
Doxycycline inhibits MMPs via modulation of plasminogen activators in focal cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* 25: 506 - 513.
- 15) **Burggraf D**, Vosko MR, Schubert M, Stassen JM, Hamann GF (2010)
Different therapy options protecting microvasculature after experimental cerebral ischemia and reperfusion. *Thromb Haem.* 2010 accepted
- 16) **Busse O** (2003)
Stroke units and stroke services in Germany. *Cerebrovasc. Dis.* 15 Suppl 1: 8 -10.
- 17) **Butler GS**, Tam EM, Overall CM (2004)
The canonical methionine 392 of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is not required for catalytic efficiency or structural integrity: probing the role of the methionine-turn in the metzincin metalloprotease superfamily. *J. Biol. Chem.* 279: 15615 - 15620.
- 18) **Chen M**, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM (2000)
Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* 6: 797 – 801.
- 19) **Choi EY**, Kim D, Hong BK, Kwon HM, Song YG, Byun KH, Park HY, Whang KC, Kim HS (2002)
Upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and gelatinases in human atherosclerosis infected with *Chlamydia pneumoniae*: the potential role of *Chlamydia pneumoniae* infection in the progression of atherosclerosis. *Exp. Mol. Med.* 34: 391 - 400.
- 20) **Clark WM**, Lessov N, Lauten JD, Hazel K (1997)
Doxycycline treatment reduces ischemic brain damage in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Mol. Neurosci.* 9: 103 - 108.
- 21) **Clark WM**, Rinker LG, Lessov NS, Lowery SL, Cipolla MJ (2001)
Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. *Stroke.* 32: 1000 – 1004.
- 22) **Curran S**, Murray GI (1999)
Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J. Pathol.* 189: 300 - 308.
- 23) **Danton GH**, Dietrich WD (2003)
Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62: 127 - 136.
- 24) **del Zoppo GJ**, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Berg GI, Koziol JA (2007)

- Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia. *Stroke*. 38: 646 - 651.
- 25) **del Zoppo GJ**, von Kummer R, Hamann GF (1998)
Ischaemic damage of brain microvessels: inherent risks for thrombolytic treatment in stroke. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 65: 1 - 9.
- 26) **Docherty AJ**, Lyons A, Smith BJ, Wright EM, Stephens PE, Harris TJ, Murphy G, Reynolds JJ (1985)
Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*. 318: 66 – 69.
- 27) **Emsley HC**, Tyrrell PJ (2002)
Inflammation and infection in clinical stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 22: 1399 - 13419.
- 28) **Foda HD**, Rollo EE, Drews M, Conner C, Appelt K, Shalinsky DR, Zucker S (2001)
Ventilator-induced lung injury upregulates and activates gelatinases and EMMPRIN: attenuation by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, Prinomastat (AG3340). *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 25: 717 - 724.
- 29) **Gabison EE**, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S (2005)
EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie*. 87: 361 - 368.
- 30) **Ginsberg MD**, Sternau LL, Globus MY, Dietrich WD, Busto R (1992)
Therapeutic modulation of brain temperature: relevance to ischemic brain injury. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev*. 4: 189-225.
- 31) **Globus MY**, Busto R, Lin B, Schnippering H, Ginsberg MD (1995)
Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intransischemic brain temperature modulation. *J. Neurochem*. 65: 1250 – 1256.
- 32) **Goldstein GW**, Betz AL (1986)
The blood-brain barrier. *Sci. Am*. 255: 74 - 83.
- 33) **Golub LM**, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T (1998)
Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv. Dent. Res*. 12: 12 - 26.
- 34) **Gomez DE**, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997)
Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol*. 74: 111 - 122.
- 35) **Greene J**, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. (1996)
Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase. *J. Biol. Chem*. 271: 30375-30380.
- 36) **Grenier D**, Plamondon P, Sorsa T, Lee HM, McNamara T, Ramamurthy NS, Golub LM, Teronen O, Mayrand D (2002)

- Inhibition of proteolytic, serpinolytic, and progelatinase-b activation activities of periodontopathogens by doxycyclin and the non-antimicrobial chemically modified tetracycline derivatives. *J. Periodontol.* 73: 79 - 85.
- 37) **Grossetete M**, Rosenberg GA (2008)
Matrix metalloproteinase inhibition facilitates cell death in intracerebral hemorrhage in mouse. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28: 752 – 763.
- 38) **Gurney KJ**, Estrada EY, Rosenberg GA (2006)
Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation *Neurobiol. Dis.* 23: 87 - 96.
- 39) **Hacke W**, Kaste M (2008)
Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 359: 1317 - 1329.
- 40) **Haley EC Jr**, Lyden PD, Johnston KC, Hemmen TM (2005)
A pilot dose-escalation safety study of tenecteplase in acute ischemic stroke. *Stroke.* 36: 607 - 612.
- 41) **Hamann GF**, Burggraf D, Martens HK, Liebetrau M, Jäger G, Wunderlich N, DeGeorgia M, Krieger DW (2004)
Mild to moderate hypothermia prevents microvascular basal lamina antigen loss in experimental focal cerebral ischemia. *Stroke.* 35: 764 - 769.
- 42) **Hamann GF**, del Zoppo GJ, von Kummer R (1999a)
Hemorrhagic transformation of cerebral infarction--possible mechanisms. *Thromb. Haemost.* 82: 92 - 94.
- 43) **Hamann GF**, Okada Y, del Zoppo GJ (1996)
Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16: 1373 - 1378.
- 44) **Hamann GF**, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ (1995)
Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke.* 26: 2120 - 2126.
- 45) **Hamann GF**, Schröck H, Burggraf D, Wunderlich N, Liebetrau M, Kuschinsky W (2003)
Microvascular basal lamina damage after embolic stroke in the rat: relationship to cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23: 1293 - 1297.
- 46) **Hanania NA**, Zimmerman JL (1999)
Accidental hypothermia. *Crit. Care Clin.* 15: 235 – 249.
- 47) **Haseneen, NA**, Vaday GG, Zucker S, Foda HD (2003)
Mechanical stretch induces MMP-2 release and activation in lung endothelium: role of EMMPRIN. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284: L541 -547.
- 48) **Horstmann S**, Kalb P, Koziol J, Gardner H, Wagner S (2003)

- Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. *Stroke*. 34: 2165 -2170.
- 49) **J. Frederick Woessner** and Hideaki Nagase (2000)
Matrix Metalloproteinases and TIMPs by Oxford University Press (2000) pp. 223.
- 50) **Jantzie LL**, Cheung PY, Todd KG (2005) Doxycyclin reduces cleaved caspase-3 and microglial activation in an animal model of neonatal hypoxia-ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25: 314 - 324.
- 51) **Johnston JB**, Zhang K, Silva C, Shalinsky DR, Conant K, Ni W, Corbett D, Yong VW Power C (2001)
HIV-1 Tat neurotoxicity is prevented by matrix metalloproteinase inhibitors. *Ann. Neurol.* 49: 230 – 241.
- 52) **Kähäri VM**, Saarialho-Kereu U (1999)
Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Tumor Growth and Invasion. *Annals of Medicine.* 31: 34–45.
- 53) **Kloss CU**, Thomassen N, Fesl G, Martens KH, Yousri TA, Hamann GF (2003)
Tissue-saving infarct volumetry using histochemistry validated by MRI in rat focal ischemia. *Neurol. Res.* 24: 713 - 718.
- 54) **Koizumi J**, Nakazawa T, Yoshida Y (1985)
Reperusable brain infarction model in rat (abstract). Proceedings of the 10th Meeting of the Japanese Stroke Society, Kyoto, Japan, 159.
- 55) **Kollmar R**, Frietsch T, Georgiadis D, Schäbitz WR, Waschke KF, Kuschinsky W, Schwab S (2002)
Early effects of acid-base management during hypothermia on cerebral infarct volume, edema, and cerebral blood flow in acute focal cerebral ischemia in rats. *Anesthesiology.* 97: 868 - 874.
- 56) **Kollmar R**, Henninger N, Bardutzky J, Schellinger PD, Schäbitz WR, Schwab S (2004)
Combination therapy of moderate hypothermia and thrombolysis in experimental thromboembolic stroke--an MRI study. *Exp. Neurol.* 190: 204 - 212.
- 57) **Konttinen YT**, Li TF, Mandelin J, Liljestrom M, Sorsa T, Santavirta S, Virtanen I (2000)
Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 43: 275 - 280.
- 58) **Li YY**, McTiernan CF, Feldman AM (2000)
Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc. Res.* 46: 214 - 224.
- 59) **Liang, L**, Major T, Bocan T (2002)
Characterization of the promoter of human extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN). *Gene.* 282: 75 – 86.

- 60) **Lijnen HR** (2001)
Elements of the fibrinolytic system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 936: 226 - 236.
- 61) **Lijnen HR** (2001)
Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb. Haemost.* 86: 324 – 333
- 62) **Lijnen HR**, Van Hoef B, Lupu F, Moons L, Carmeliet P, Collen D (1998)
Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 1035 - 1045.
- 63) **Longa EZ**, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989)
Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 20: 84 - 91.
- 64) **MAST-1** (1995)
Multicentre Acute Stroke Trial - Italy Group. *Lancet.* 346: 1509 – 1514.
- 65) **MAST-E** (1996)
The Multicenter Acute Stroke Trial - Europe Study Group. *N. Engl. J. Med.* 335: 145 – 150.
- 66) **McColl BW**, Rose N, Robson FH, Rothwell NJ, Lawrence CB (2009)
Increased brain microvascular MMP-9 and incidence of haemorrhagic transformation in obese mice after experimental stroke. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 2009 Oct 14.
- 67) **McQuibban GA**, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM (2002)
Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood.* 100: 1160 – 1167.
- 68) **Meixensberger J**, Renner C (2007)
Therapeutic hypothermia in the intensive care unit. *Anaesthesist.* 56: 945 – 948.
- 69) **Mitsiades N**, Poulaki V, Leone A, Tsokos M (1999)
Fas-mediated apoptosis in Ewing's sarcoma cell lines by metalloproteinase inhibitors. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 1678 - 1684.
- 70) **Molina CA**, Saver JL (2005).
Extending reperfusion therapy for acute ischemic stroke: emerging pharmacological, mechanical, and imaging strategies. *Stroke.* 36: 2311 - 2320.
- 71) **Mun-Bryce S**, Rosenberg GA (1998)
Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18: 1163 - 1172.
- 72) **Nagase H**, Visse R, Murphy G (2006)
Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69: 562 - 573.

- 73) **NINDs** (1995)
Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N. Engl. J. Med.* 333: 1581 - 1587.
- 74) **Overgaard K**, Sereghy T, Pedersen H, Boysen G (1992)
Dose-response of rt-PA and its combination with aspirin in a rat embolic stroke model. *Neuroreport.* 3: 925 - 928.
- 75) **Pardridge WM** (1998)
Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res.* 23: 635 - 644.
- 76) **Petty MA**, Wettstein JG (2001)
Elements of cerebral microvascular ischaemia. *Brain Res. Rev.* 36: 23 - 34.
- 77) **Pfefferkorn T**, Rosenberg GA (2003)
Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke.* 34: 2025 - 2030.
- 78) **Rao BG** (2005)
Recent developments in the design of specific Matrix Metalloproteinase inhibitors aided by structural and computational studies. *Curr. Pharm. Des.* 11: 295 - 322.
- 79) **Ray JM**, Stetler-Stevenson WG (1994)
The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur. Respir. J.* 7: 2062 - 2072.
- 80) **Reith J**, Jørgensen HS, Pedersen PM, Nakayama H, Raaschou HO, Jeppesen LL, Olsen TS (1996)
Body temperature in acute stroke: relation to stroke severity, infarct size, mortality, and outcome. *Lancet.* 347: 422 - 425.
- 81) **Rijken DC** (1995)
Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin. Haematol.* 8: 291 - 312.
- 82) **Roach DM**, Fitridge RA, Laws PE, Millard SH, Varelias A, Cowled PA (2002)
Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 23: 260 - 269.
- 83) **Rosenberg GA** (2002)
Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia.* 39: 279 - 291.
- 84) **Rosenberg GA**, Cunningham LA, Wallace J, Alexander S, Estrada EY, Grossetete M, Razhagi A, Miller K, Gearing A (2001)
Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res.* 893: 104 -112.

- 85) **Rosenberg GA**, Estrada EY, Dencoff JE (1998)
Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. 29: 2189 - 2195.
- 86) **Rosenberg GA**, Estrada EY, Mobashery S (2007)
Effect of synthetic matrix metalloproteinase inhibitors on lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier opening in rodents: Differences in response based on strains and solvents. *Brain Res*. 1133: 186 - 192.
- 87) **Rosenberg GA**, Kornfeld M, Estrada E, Kellev RO, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1992)
TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. *Brain Res*. 576 : 203 – 207.
- 88) **Rosenberg GA** (2002)
Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis. *Neuroscientist*. 8: 586 - 595.
- 89) **Sato H**, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, Seiki M (1996)
Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett*. 393: 101 - 104.
- 90) **Schenkel J**, Weimar C, Knoll T, Haberl RL, Busse O, Hamann GF, Koennecke HC, Diener HC (2003)
German Stroke Data Bank Collaborators. *J. Neurol*. 250: 320 - 324.
- 91) **Solé S**, Petegnief V, Gorina R, Chamorro A, Planas AM (2004)
Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischemia/reperfusion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 63: 338 - 349.
- 92) **Sorsa T**, Kontinen YT, Lindy O, Suomalainen K, Ingman T, Saari H, Halinen S, Lee HM, Golub LM, Hall J (1993)
Doxycycline protects serum alpha-1-antitrypsin from human neutrophil collagenase. *Agents Actions Suppl*. 39: 225 – 229.
- 93) **Spinale FG**, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasinghe HR, Etoh T, Goldberg AT, Zellner JL, Crumbley AJ (2000)
A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation*. 102: 1944 - 1949.
- 94) **Sternlicht MD**, Werb Z (2001)
How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 17: 463 - 516.
- 95) **Stetler-Stevenson WG**, Kruttsch HC, Liotta LA (1989) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2).
A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem*. 264: 17374 - 17378.

- 96) **Strongin AY**, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI (1995)
Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 270: 5331 - 5338.
- 97) **Sun J**, Hemler ME (2001)
Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res.* 61: 2276 - 2281.
- 98) **Thorin E**, Parent R, Ming Z, Lavallée M (1999)
Contribution of endogenous endothelin to large epicardial coronary artery tone in dogs and humans. *Am. J. Physiol.* 277: H524 - 532.
- 99) **Tomita T**, Nakase T, Kaneko M, Shi K, Takahi K, Ochi T, Yoshikawa H (2002)
Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46: 373 - 378.
- 100) **Ugwu F**, Van Hoef B, Bini A, Collen D, Lijnen HR (1998)
Proteolytic cleavage of urokinase-type plasminogen activator by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry.* 37: 7231 - 7236.
- 101) **Van de Werf F**, Cannon C.P, Luyten A, Houbracken K, McCabe CH, Berioli S, Bluhmki E, Sarelin H, Wang-Clow F, Fox NL, Braunwald E (1999)
Safety assessment of single-bolus administration of TNK tissue-plasminogen activator in acute myocardial infarction: the ASSENT-1 trial. *Am. Heart J* 137: 786 – 791.
- 102) **Vempati P**, Karagiannis ED, Popel AS (2007)
A biochemical model of matrix metalloproteinase 9 activation and inhibition. *J. Biol. Chem.* 282: 37585 – 37596.
- 103) **Vosko MR**, Burggraf D, Liebetrau M, Wunderlich N, Jäger G, Gröger M., Plesnila N, Hamann GF (2006)
Influence of the duration of ischemia and reperfusion on infarct volume and microvascular damage in mice. *Neurol. Res.* 28: 200 - 205.
- 104) **Vu TH**, Werb Z (2000)
Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 14: 2123 -2133.
- 105) **Walker DG**, Lapiere CM, Gross A (1964)
Collagenolytic factor in rat bone promoted by parathyroid extract. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15: 397 – 402.
- 106) **Walker EJ**, Rosenberg GA (2009)
Divergent role for MMP-2 in myelin breakdown and oligodendrocyte death following transient global ischemia. *J. Neurosci. Res. Epub Oct 14.*
- 107) **Wang Q**, Tang XN, Yenari MA (1995)
The inflammatory response in stroke. *J. Neuroimmunol.* 184: 53 - 68.

- 108) **Werner C** (1997)
Mild and moderate hypothermia as a new therapy concept in treatment of cerebral ischemia and craniocerebral trauma. Pathophysiologic principles *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 32: 210 - 218.
- 109) **Yamaguchi T**, Mori E, Minematsu K, Nakagawara J, Hashi K, Saito I, Shinohara Y (2006)
Alteplase at 0.6 mg/kg for acute ischemic stroke within 3 hours of onset: Japan Alteplase Clinical Trial (J-ACT). *Stroke.* 37: 1810 – 1815.
- 110) **Yana I**, Weiss SJ (2000)
Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol. Biol. Cell.* 11: 2387 - 2401.
- 111) **Yanamoto H**, Nagata I, Nijitsu Y, Zhang Z, Xue JH, Sakai N, Kikuchi H (2001)
Prolonged mild hypothermia therapy protects the brain against permanent focal ischemia. *Stroke.* 32: 232 – 239.
- 112) **Yang GY & Betz AL** (1994)
Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 25: 1658 - 1664.
- 113) **Yong VW**, Zabad RK, Agrawal S, Goncalves Dasilva A, Metz LM (2007)
Elevation of matrix metalloproteinases (MMPs) in multiple sclerosis and impact of immunomodulators. *J. Neurol. Sci.* 259: 79 - 84.
- 114) **Yrjanheikki J**, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J (1998)
Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 15769 - 15774.
- 115) **Yrjanheikki J**, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J (1999)
A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 13496 - 13500.
- 116) **Yurchenco PD**, Schittny JC (1990)
Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4: 1577 - 1590.
- 117) **Zhang ZG**, Chopp M, Zaloga C, Pollock JS, Förstermann U (1993)
Cerebral endothelial nitric oxide synthase expression after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 24: 2016 – 2021.
- 118) **Zhu W**, Khachi S, Hao Q, Shen F, Young WL, Yang GY, Chen Y (2008)
Upregulation of EMMPRIN after permanent focal cerebral ischemia. *Neurochem. Int.* 52: 1086 - 1091.

G. Anhang

1. MMP-3 bei verschiedenen Dosen rt-PA:

mg/kg KG rt-PA	Kortex (Anova $p < 0,001$)		Basalganglien (Anova $p < 0,001$)	
	MW \pm SEM	p-Wert (t-test)	MW \pm SEM	p-Wert (t-test)
0,0	128 \pm 22%		109 \pm 9%	
0,9	97 \pm 9%	0,05	86 \pm 8%	0,053
9	82 \pm 8%	0,015	85 \pm 13%	0,088
18	75 \pm 13%	0,005	76 \pm 18%	0,062

2. MMP-9 bei verschiedenen Dosen rt-PA :

mg/kg KG rt-PA	Kortex (Anova $p < 0,001$)		Basalganglien (Anova $p < 0,001$)	
	MW \pm SEM	p-Wert (t-test)	MW \pm SEM	p-Wert (t-test)
0,0	128 \pm 22%		109 \pm 9%	
0,9	137 \pm 9%	0,0	113 \pm 7%	0,0
9	144 \pm 7%	0,0	130 \pm 6%	0,0
18	162 \pm 6%	0,00	146 \pm 5%	0,0

3. EMMPRIN bei verschiedenen Dosen rt-PA :

mg/kg KG rt-PA	Kortex (Anova $p < 0,001$)		Basalganglien (Anova $p < 0,001$)	
	MW \pm SEM	p-Wert (t-test)	MW \pm SEM	p-Wert (t-test)
0,0	128 \pm 22%		109 \pm 9%	
0,9	170 \pm 13%	0,0	152 \pm 6%	0,0
9	183 \pm 26%	0,0	176 \pm 7%	0,0
18	193 \pm 17%	0,00	199 \pm 14%	0,0

4. Hypothermie und rt-PA:

mg/kg KG rt-PA	Kortex (Anova $p < 0,001$)		Basalganglien (Anova $p < 0,001$)	
	MW \pm SEM	p-Wert (t-test)	MW \pm SEM	p-Wert (t-test)
0,0	128 \pm 22%		109 \pm 9%	
HT	103 \pm 7%	0,0	101 \pm 9%	0,0
18	75 \pm 13%	0,0	76 \pm 18%	0,0
18 & HT	96 \pm 12%	0,00	82 \pm 12%	0,0

H. Danksagung

Die Erstellung dieser Arbeit wäre ohne die vielseitige professionelle Unterstützung der folgenden Personen nicht möglich gewesen. Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. G.F. Hamann für die freundliche Aufnahme in seine Forschungsgruppe danken. Die Möglichkeit Teile dieser Dissertation auf einem internationalen Kongress vorzustellen wäre ohne sein Zutun ebenfalls nicht möglich gewesen, vielen Dank auch hierfür.

Desweiteren gilt mein außerordentlicher Dank der Betreuerin meiner Arbeit, Frau Dr. Dorothe Burggraf. Sie hat mir die große Welt der experimentellen Forschung eröffnet, mich bei meine ersten Schritten begleitet meine Motivation stets hochgehalten und auch auf Durststrecken konnte ich auf ihre Hilfe und Rat stets vertrauen. In der Ausarbeitung meines sehr reizvollen Themas und auch in dessen Eingrenzung war sie mir von unschätzbarem Wert. Nicht zu vergessen ist auch ihre schier endlose Geduld in der Korrektur der Arbeit. Außerdem noch ein großes Dankeschön an alle weiteren Laborkolleginnen und –Kollegen für die vielfältigen und bereitwilligen Hilfen, das angenehme Arbeitsklima und die schöne Zeit im Labor. Insbesondere möchte ich hier die Hilfe und Unterstützung von Natalie Wunderlich und Melanie Schneider als MTAs unserer Forschungsgruppe hervorheben,

Auf privater Seite möchte ich mich bei meinen Eltern, bedanken, deren Vorbild und Erziehung mich zu dem Menschen gemacht haben der ich bin und deren vielfältige Unterstützung in allen Bereichen, ich vieles aber auch die Möglichkeit des Abschluss dieser Dissertation verdanke.

Des Weiteren möchte ich mich sehr bei Marion Schubert bedanken, die mir als Kollegin und Freundin das überstehen vieler Durstrecken ermöglicht hat.