

---

# **Therapie nach transienter zerebraler Ischämie und Reperfusion**

-

## **Was sind die protektiven Mechanismen der Hypothermie?**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften an der Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians Universität München

vorgelegt von

Jan-Philipp Burk aus Marburg  
München, 21.12.2010

---

---

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Grothe

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Boyan

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2011

---

---

Ehrenwörtliche Versicherung:

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

---

München, den 21.12.2010

---

---

Diese Arbeit widme ich Hans Immel.

---

---

**AUF DIE FRAGE, WARUM ER OHNE BEZAHLUNG SO VIEL ZEIT INVESTIERT, ANTWORTET KLEMPERT MIT EINEM ZITAT DES FRANZÖSISCHEN ENZYKLOPÄDISTEN DIDEROT: "DAMIT DIE ARBEIT DER VERGANGENEN JAHRHUNDERTE NICHT NUTZLOS FÜR DIE KOMMENDEN JAHRHUNDERTE GEWESEN SEI, DAMIT UNSERE ENKEL NICHT NUR GEBILDETER, SONDERN GLEICHZEITIG AUCH TUGENDHAFTER UND GLÜCKLICHER WERDEN, UND DAMIT WIR NICHT STERBEN, OHNE UNS UM DIE MENSCHHEIT VERDIENT GEMACHT ZU HABEN."**

---

---

---

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Allgemein	1
1.2 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie	1
1.3 Therapie des Schlaganfalls	4
1.4 Die Blut-Hirn-Schranke (BHS)	5
1.4.1 Zerebrale Blutkapillaren — Endothelzellen	6
1.4.2 Basalmembran	6
1.4.3 Perizyten	7
1.4.4 Astrozyten	8
1.5 Mikrovaskuläre Schädigung der BHS und der Mikrogefäße nach transientser zerebraler Ischämie	8
1.6 Das Plasminogen-Plasmin System und deren Komponenten	9
1.6.1 Plasminogen / Plasmin	9
1.6.2 Tissue Plasminogen Activator (tPA)	10
1.6.3 Urokinase Plasminogen Activator (uPA)	10
1.6.4 Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)	10
1.7 Das Matrixmetalloproteinase System und deren Komponenten	11
1.7.1 Gelatinasen - MMP-9 & MMP-2	12
1.7.2 Stromelysin-1 - MMP-3	13
1.7.3 Inhibitoren - TIMP-1 & TIMP-2	14
1.8 EMMPRIN (Extracelluar Matrixmetalloproteinase Inducer)	14
1.9 Schädigung der Mikrogefäße durch die nicht-zellulären proteolytischen Systeme: Plasminogen-Plasmin- und MMP System	15
1.10 Hypothermie und mikrovaskuläre Schädigung	17
<b>2 Fragestellung</b>	<b>19</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1 tMCAO (transient middle cerebral artery occlusion) Fadenmodell bei der Maus	21
3.2 Laser-Doppler-Blutflussmethode (LDF)	26
3.3 Verhaltenstest - Neuroscore	27
3.4 Versuchsprotokolle der Tierversuche	28
3.5 Histologie	29
3.5.1 Gewebeschnitte	29
3.5.2 Nissl-Färbung	29
3.5.3 Infarkt volumen (Volumetrie)	30
3.6 Biochemie	31
3.6.1 Western Blot - Nachweis Hämoglobin	32
3.6.2 Western Blot - Nachweis von PAI-1	33
3.6.3 Western Blot - Nachweis von MMP-3 (Stromelysin-1)	34
3.6.4 Western Blot - Nachweis von EMMPRIN (CD147)	34
3.6.5 Plasminogen-Kasein Zymographie - Nachweis von tPA und uPA	35
3.6.6 Gelatine Zymographie - Nachweis von MMP-9 und MMP-2	36
3.6.7 Reverse Gelatine-Zymographie - Nachweis von TIMP-1 und TIMP-2	37
3.7 Statistik	38

---

<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
4.1 Hirntemperatur unter hypothermer Behandlung .....	39
4.2 Einfluss der Hypothermie auf die Folgen einer fokalen zerebralen Ischämie mit Reperfusion .....	39
4.2.1 Neurologische und mikrovaskuläre Parameter .....	39
4.2.2 Einfluß der Hypothermie auf das Plasminogen-Plasmin System .....	40
4.2.3 Einfluss der Hypothermie auf das MMP-System .....	41
4.3 Einfluss von Knock-Out Defekten im Plasminogen-Plasmin-System .....	42
4.3.1 Neurologische und mikrovaskuläre Auswirkungen der Gendeletion .....	43
4.3.2 Neurologische und mikrovaskuläre Auswirkungen der Hypothermiebehandlung nach Gendeletion im PPS .....	44
4.3.3 Auswirkungen der Gendeletion auf weitere Enzyme des PPS .....	45
4.3.4 Auswirkung der Hypothermiebehandlung nach Gendeletion im PPS auf weitere Enzyme des Plasminogen-Plasmin Systems .....	46
4.3.5 Auswirkungen der Gendeletion im PPS auf Enzyme des MMP-Systems ..	48
4.3.6 Auswirkung der Hypothermiebehandlung nach Gendeletion im PPS auf Enzyme des MMP-Systems .....	49
4.4 Übersichtstabelle der wichtigsten Ergebnisse .....	51
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>53</b>
5.1 Einfluss postischämischer Hypothermie auf die Integrität der mikrovaskulären Basalmembran .....	53
5.2 Einfluss postischämischer Hypothermie auf das Plasminogen-Plasmin und das Matrix Metalloproteinasen System in ausgesuchten Knock-Out Mutanten .....	55
5.2.1 Vergleich der Knock-Out Mutanten mit den Kontrollen .....	55
5.3 Validität und Grenzen des Ischämie- und Hypothermiemodells .....	61
<b>6 Ausblick</b> .....	<b>65</b>
<b>7 Zusammenfassung</b> .....	<b>67</b>
<b>8 Anhang (Material &amp; Methoden)</b> .....	<b>69</b>
8.1 Neuroscore (neurological score) .....	69
8.2 Objektträgerbeschichtung .....	71
8.3 Nissl-Färbung .....	71
8.4 Biochemie (Kurzübersicht) .....	72
8.5 Homogenisierungspuffer .....	73
8.6 Probenauftragungspuffer .....	73
8.6.1 Western Blot .....	73
8.6.2 Zymographie .....	74
8.7 Rezepte für die Gele .....	74
8.7.1 Lösungen für Gele .....	74
8.7.2 Lösungen für Elektrophorese & Zymographie .....	74
8.7.3 Lösungen für Blots .....	75
8.7.4 Western Blots - Hämoglobin WB .....	76
8.7.5 Plasminogen Zymographie .....	76
8.7.6 MMP Zymographie .....	77
8.7.7 Reverse Zymographie .....	78
8.8 Färben & Entfärben bei der Zymographie .....	79

---

<b>9 Anhang (Ergebnisse)</b> .....	<b>80</b>
9.1 Tabelle sämtlicher Einzelergebnisse .....	80
9.2 Plasminogen Knock-Out Mutante .....	83
9.2.1 MMP Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 .....	83
9.3 tPA KO .....	83
9.3.1 Die MMP Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 .....	83
9.4 uPA KO .....	84
9.5 PAI-1-/- Mutanten .....	84
9.5.1 MMP-9 und MMP-2 .....	84
9.5.2 MMP Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 .....	84
<b>10 Referenzen</b> .....	<b>85</b>
<b>11 Danksagung</b> .....	<b>99</b>
<b>12 Curriculum Vitae</b> .....	<b>103</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemein

Nach Herz-Kreislaufkrankungen und Krebserkrankungen sind Schlaganfallerkrankungen in der westlichen Welt die dritthäufigste Todesursache. Allein in Deutschland erleiden nach Schätzung der Stiftung Deutsche Schlaganfall-Hilfe jährlich etwa 250.000 Menschen einen Schlaganfall. Schlaganfälle stellen die häufigste Ursache von erworbenen Behinderungen im Erwachsenenalter dar. Sie übertreffen die Herzinfarktraten in den industriellen Ländern. Somit werden sie zur bedeutendsten vaskulären Erkrankung (Rothwell *et al.*, 2005). Dies zeigt, wie wichtig es ist, die genauen Ursachen eines Schlaganfalls zu erforschen um eine effektivere Behandlung zu ermöglichen.

Der Schlaganfall oder auch Apoplex (*Apoplexia cerebri*) bezeichnet einen neurologischen Zustand, bei dem es aus unterschiedlichen Gründen zu einem plötzlichen Funktionsverlust von Teilen oder des gesamten Gehirns kommt. Der Begriff schließt eine Ischämie verschiedener Genese, aber auch intrazerebrale Blutungen und Subarachnoidalblutungen (SAB), Sinusthrombosen und andere Krankheitsbilder ein. Das Krankheitsbild wird durch eine plötzlich auftretende neurologische Symptomatik mit z.B. motorischer Lähmung, Aphasie oder Neglekt gekennzeichnet.

Die zerebrale Ischämie (Hirnfarkt) macht laut Untersuchungen von Brown *et al.* (1996) ca. 85% aller Schlaganfälle aus. Ausgangspunkt jeder Ischämie ist der verminderte Blutfluss durch eine Stenose oder der Verschluss eines oder mehrerer Gefäße. Diese Unterbrechung kann vollständig oder teilweise erfolgen. Die wichtigsten pathogenetischen Ursachen sind die Embolie, die in-situ-Thrombose, die Mikroangiopathie und die hämodynamisch bedingte Ischämie. Der Verschluss eines oder mehrerer Hirngefäße führt zur Nekrose des Gehirngewebes (Caplan, 1991 & 1993). Je nach Ausprägung der zerebralen Ischämie kann zwischen einer fokalen und einer globalen Form unterschieden werden. Bei fokaler Ischämie tritt die Unterversorgung nur in einem abgegrenzten Bereich des Gehirns auf, während bei der globalen Form das gesamte Gehirn, z.B. bei Herz-Kreislaufstillstand, betroffen ist.

## 1.2 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Das ischämische Gehirnareal kann in zwei Zonen eingeteilt werden, die fließend ineinander übergehen. Im Zentrum befindet sich ein als Kern („Core“) bezeichnetes Infarktgebiet. Im

Kern tritt schon innerhalb weniger Minuten nach Beginn der Ischämie eine dauerhafte Depolarisation der Zellen ein. Infarziertes Gewebe lässt sich schon in der ersten Stunde histologisch nachweisen (Touho *et al.*, 1996) (siehe Abbildung [1]). Um diesen ischämischen Kern entsteht die Penumbra (Astrup *et al.*, 1981; griech.: Halbschatten). Nach Definition ist dies ein Areal in dem der Funktionsstoffwechsel des Gewebes eingeschränkt oder eingestellt ist, aber dessen Grund- bzw. Erhaltungsstoffwechsel weiterhin funktioniert. Das Gewebe in der Penumbra kann für eine kurze Zeit überleben und seine normale neurologische Funktion bei wieder eintretendem Blutfluss erneut aufnehmen (Touho *et al.*, 1996).

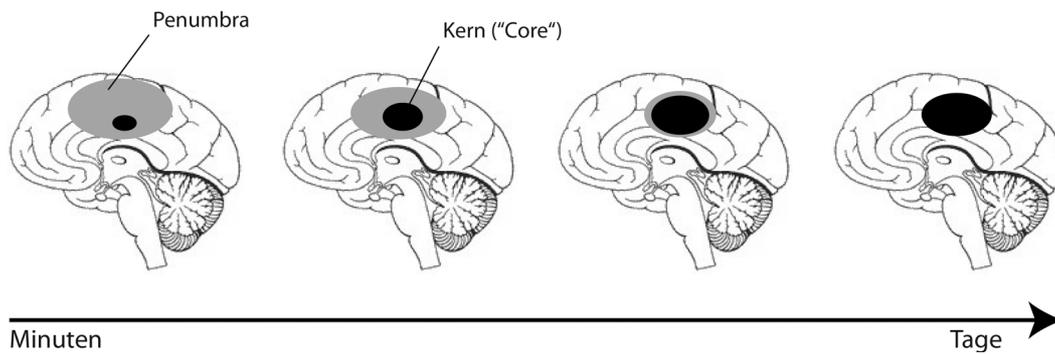


Abbildung 1: Schemata der Entwicklung eines Infarktareals (Mensch): Der Infarktkern (Kern) ist durch die Ischämie irreversibel geschädigt, während die Penumbra noch eine Stoffwechselaktivität zeigt. Bei Ausbleiben des Blutflusses dehnt sich der Infarktkern weiter aus.

Nach einer zerebralen Ischämie finden vier zeitlich aufeinander folgende Prozesse statt, die zum neuronalen Zelltod führen: 1. die Exzitotoxizität, 2. die Peri-Infarkt-Depolarisation, 3. die Inflammation und 4. die Apoptose (siehe Abbildung [2]).

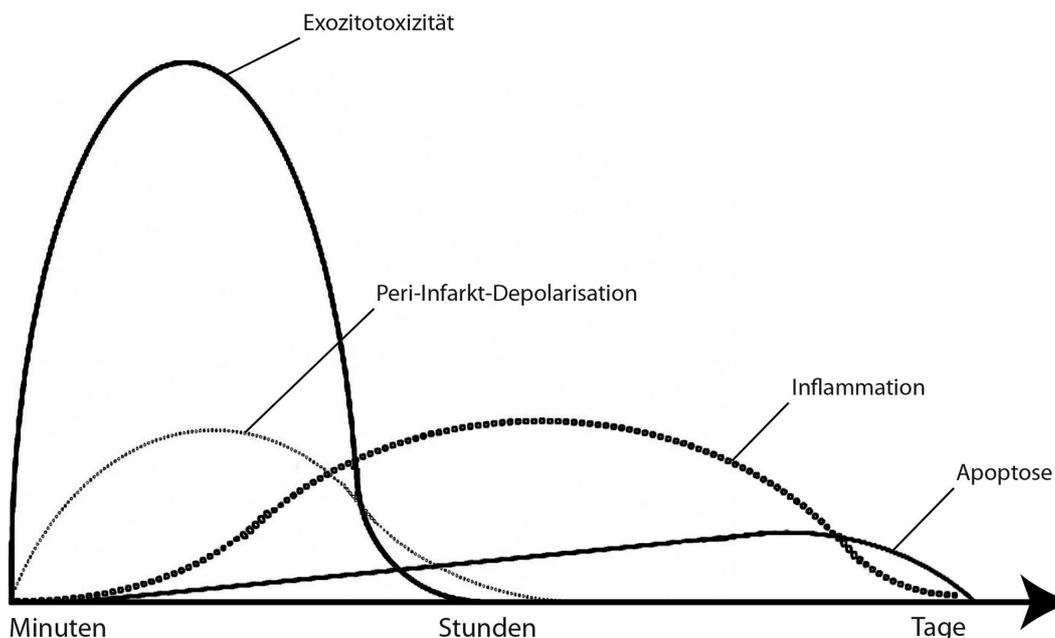


Abbildung 2: Schematische Darstellung der vier Stadien in zeitlicher Abhängigkeit. Bei einem ischämischen Insult kommt es innerhalb von Minuten im betroffenen Areal zu Zellschäden, verursacht

---

*durch die Exzitotoxizität. Die Peri-Infarkt-Depolarisation und die später einsetzende Inflammation führt letztlich zur Apoptose des Gewebes (Dirnagl et al., 1999).*

Die erste Phase ist gekennzeichnet durch die **Exzitotoxizität**. Auf Grund des Insultes kommt es zu einer reduzierten Zufuhr und Produktion an ATP, sowie zu einem Leistungsabfall der Energie-abhängigen Ionenpumpen ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase). Dabei tritt eine zelluläre Akkumulation von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  ein und eine Zunahme der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration. Dies führt zur Depolarisation der Nervenzellen und gleichzeitig kommt es zu einem zytotoxischen, intrazellulären Ödem (Silbernagl & Despopoulos, 1979). Bricht das Ruhemembranpotential der Zellen zusammen oder werden Neurone unter diesen Bedingungen durch eine glutaminerge Erregung depolarisiert, kommt es zu einem kompletten Zusammenbruch des Repolarisationsprozesses. Diese glutaminerge Erregung, entstanden durch eine extrazelluläre Akkumulation von Glutamat, nennt sich Exzitotoxizität (Lipton *et al.*, 1994; Fryer *et al.*, 1999).

Die zweite Phase ist die **Peri-Infarkt-Depolarisation**. Im Kern führt der Energiemangel zu anoxischen Depolarisationen ohne Repolarisation. Dieser Zustand ist auf Grund der Energieversorgung sehr labil, so dass weitere Depolarisationen erfolgen. Diese sogenannten Peri-Infarkt-Depolarisationen treten oszillierend auf und können sich über mehrere Stunden nach dem ischämischen Insult wiederholen (Hossmann, 1996).

Die Phase der **Inflammation** wird durch die Schädigung der Zelle durch Radikale, Exzitotoxizität und Hypoxie induziert. Die Inflammation tritt bereits wenige Minuten nach Beginn des ischämischen Insults ein und kann über mehrere Tage anhalten. In der Frühphase werden Entzündungsmediatoren ( $\text{IFN-}\alpha$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ ) freigesetzt, die zur Aktivierung der Mikroglia und zur Leukozyteninfiltration in das geschädigte Gehirngewebe führen. Das Einwandern der Leukozyten bewirkt unter anderem eine weitere Störung der zerebralen Mikrozirkulation im Infarktgebiet. Zudem werden durch Granulozyten toxische Zwischenprodukte freigesetzt (Ames *et al.*, 1968). Diese tragen zusätzlich zur Schädigung der Zellstruktur bei (Dirnagl *et al.*, 1999).

Die letzte Phase bildet die **Apoptose**. Der durch die Ischämie verursachte ATP-Mangel stört das  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschsystem (Philipson *et al.*, 2000), welches normalerweise  $\text{K}^+$  aus der Zelle entfernt. Die so erhöhte intrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration setzt über eine Calpain-Aktivierung eine Reihe zytoplasmatische und nukleäre Prozesse in Gang, was zur Apoptose der betroffenen Zelle führt.

---

### **1.3 Therapie des Schlaganfalls**

Prinzipiell gibt es mehrere Möglichkeiten einer Schadensbegrenzung beim ischämischen Schlaganfall. Den wichtigsten Therapieansatz stellt die Thrombolyse da. Als Thrombolytikum kommt „recombinant tissue plasminogen activator“ (rt-PA, Acitlyse®) zur Anwendung – sowohl systemisch als auch lokal. rt-PA bewirkt eine frühzeitige Rekanalisierung des arteriellen Gefäßes. Die Gabe von rt-PA ist die derzeit einzige evidenz-basierte medikamentöse Therapie (Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie, Thieme 2008). Eine Behandlung mit rt-PA kann nur bei Ausschluss einer Hämorrhagie und innerhalb eines zeitlich sehr begrenzten Fensters erfolgen (innerhalb der ersten 3 Stunden nach Ischämie; nach Hacke *et al.* (ECASS III Studie, 2008) auch innerhalb der ersten 4,5 Stunden möglich). Eine spätere Anwendung führt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von Hämorrhagien (NINDS, 1995; del Zoppo *et al.*, 1998). Die Schädigung durch eine Hämorrhagie kann für den Patienten sehr viel gravierender sein als der Schlaganfall alleine. Der Mechanismus, wie es zu einer Ruptur der Mikrogefäße kommt, ist noch ungeklärt. Weitere Thrombolytika, die bei Behandlung eines Herzinfarktes eingesetzt werden (Urokinase, Streptokinase), werden in der Behandlung des Schlaganfalls nicht eingesetzt. Studien haben gezeigt, dass sie häufiger zu schweren Nebenwirkungen (Hämorrhagie, Ödembildung) führen als rt-PA (MAST-I, 1995; MAST-E, 1996).

Erfolgreiche Strategien zur Neuroprotektion im klinischen Umfeld fehlen immer noch bzw. befinden sich am Anfang ihrer Entwicklung. Experimente mit einem Radikalfänger (NXY-059), sowohl in Tieruntersuchungen, als auch in einer späteren Phase-III-Studie, zeigten, dass sich die Symptome nach einem Schlaganfall verbesserten und der Zerstörung von Nervenzellen nach der Ischämie entgegenwirkten (Less *et al.*, 2006). In der größeren klinischen Anschlussstudie stellte sich allerdings heraus, dass der Einsatz von NXY-059 beim Menschen nach einem Schlaganfall wirkungslos ist (Shuaib *et al.*, 2007). Therapieansätze, wie beispielsweise die Gabe von NMDA-Antagonisten (Dyker AG, 1999; Lees *et al.*, 2001), Glutamat-Inhibitoren (Muir *et al.*, 2000) und antithrombolytische Medikamente (IST, 1997) werden zurzeit in verschiedenen Studien analysiert (Smith, 2004). Ein Teil der bisherigen Misserfolge der Neuroprotektiva in der klinischen Anwendung könnte dadurch erklärt werden, dass sie nur einen sehr begrenzten Einfluss auf die Prozesse des Schlaganfalls haben (Small *et al.*, 1999; STAIR, 1999; Gladstone *et al.*, 2002; Smith, 2004). Dabei stellt die Blut-Hirn-Schranke (BHS) einen stark begrenzenden Faktor

bei der pharmakologischen Therapie des Zentralen-Nerven-Systems (ZNS) nach einem Schlaganfall dar. Die BHS ist entscheidend dafür, dass keine Substanzen aus dem Blutstrom ungewollt ins Nervengewebe gelangen. Daher kommt ihrer Integrität bei einer Ischämie eine erhebliche Bedeutung zu.

### 1.4 Die Blut-Hirn-Schranke (BHS)

Die BHS stellt eine physiologische Barriere zwischen dem ZNS und dem Blutgefäßsystem dar (Abbildung [3]). Sie ist essentiell zur Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS (Bradbury, 1993), die die Konzentration von Hormonen, Ionen und Transmittern in sehr engen Grenzen hält (Haseloff *et al.*, 2005). Des Weiteren dient die BHS zur funktionellen Abgrenzung der Blutbestandteile und zum Schutz neurotoxischer Komponenten (Abott, 1992).

Die funktionelle Barriere der BHS sind die Endothelzellen mit den „tight junctions“ (TJ), die maßgeblich die Aufrechterhaltung der Homöostase, sowie den Stofftransport, regeln (Gregoire, 1989) (Details siehe [1.4.1]). Eine zusätzliche strukturelle Barriere bildet die Basalmembran, die an den Endothelzellen anliegt (Details siehe [1.4.2]). Die Basalmembran kann die Extravasation von zellulären Blutkomponenten verhindern und bildet zusätzlich durch die Ladungen der Proteinbestandteile eine Diffusionsbarriere (Hamann *et al.*, 1995). Eine unterstützende Funktion kommt den Perizyten (Details siehe [1.4.3]) und den Astrozytenendfüßchen zu (Details siehe [1.4.4]) (Risau *et al.*, 1986). Eine Verknüpfung der Endothelzellen, der Basalmembran und der Astrozytenendfüßchen erfolgt über Integrine (Zellmatrix-Adhäsions-Moleküle), die den Zusammenhalt gewähren (Hamann *et al.*, 1999).

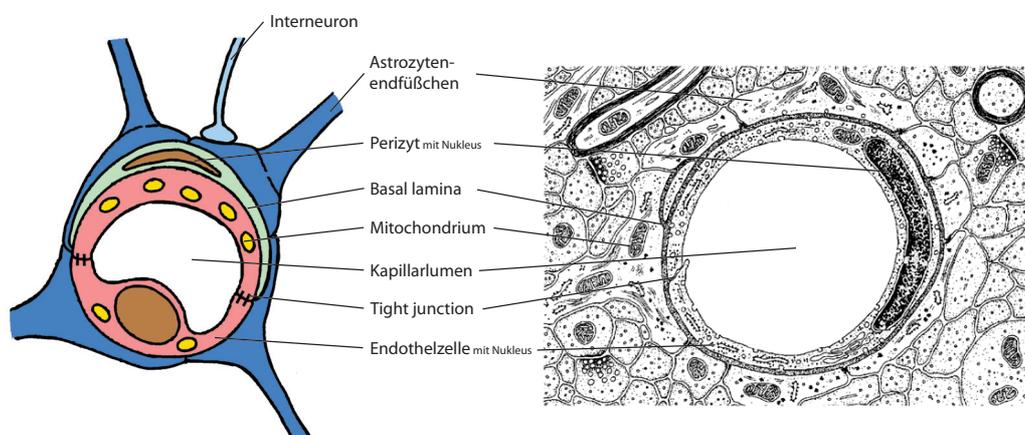


Abbildung 3: Links: Schemata der Komponenten der Blut-Hirn-Schranke mit angebenem Interneuron; Rechts: Detaillierte Skizze einer Hirnkapillare mit angrenzendem Gewebe im Querschnitt (Krstic, 1988).

### 1.4.1 Zerebrale Blutkapillaren — Endothelzellen

Als Mikrogefäße werden Gefäße wie Kapillaren, Ateriolen und Venolen bezeichnet, deren Durchmesser kleiner als 100µm sind. Die zerebralen Mikrogefäße dienen der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung und dem Abtransport von Giftstoffen der Zellen. Die Besonderheit der zerebralen Mikrogefäße ist nicht ihr besonders kleiner Durchmesser, sondern ihre Struktur und Funktion, die sie von den Blutgefäßen in anderen Organen unterscheidet.

Zerebrale Kapillaren besitzen einen Lumendurchmesser von ca. 6-12µm. Die Gefäßwand besteht aus einem einschichtigen Epithel, den Endothelzellen, und aus einem Geflecht von retikulären Fasern und Mikrofibrillenbündeln. Die Endothelzellen stellen die *anatomische* Grundlage der BHS dar. Zwischen benachbarten Endothelzellen bildet sich im ZNS der sogenannte „junctional complex“ aus, der das Interstitium abdichtet. Diese Abdichtung, sowie die verringerte Transzytoseaktivität, verhindert einen unkontrollierten Austausch von Bestandteilen aus dem Blutkompartiment in das Gehirngewebe und stellt die *funktionelle* Grundlage der BHS dar (Dermietzel, 1975; Brightman, 1989; Kniesel & Wolburg, 2000). Der „junctional complex“ (Farquahar & Palade, 1963) kann in drei Komponenten unterteilt werden: Apikal liegen die „tight junctions“ (TJ) (Zonulae occludens), darunterliegend die „adherens junction“ (Zonulae adherens) und basal die macula adherens, die aus einer Reihe von Desmosomen besteht. Die TJs sind die Schlüsselkomponente der BHS (Tani et al., 1977a & 1977b; Haseloff et al., 2005), da sie die parazelluläre Diffusion von Ionen, Peptiden und Immunzellen aus dem Blut ins Gehirngewebe verhindern (Anderson & van Itallie, 1995; Tsukita & Furuse, 1998).

### 1.4.2 Basalmembran

Auf der abluminalen Seite der Endothelzellen liegt die Basalmembran. Die Basalmembran (*Membrana basalis*) besteht aus der *Lamina fibro-reticularis*, die dem Bindegewebe zugekehrt ist und aus der *Lamina basalis*, die dem benachbarten Gewebe zugewandt ist. Die Basalmembran grenzt den Bindegewebsraum gegenüber den anderen Geweben ab. An den Muskel- und Endothelzellen sowie an den Nervenfasern und Nierenglomerula tritt die *Lamina basalis* (Basal Lamina) allein als Grenzmembran auf. Die Grenzmembran beeinflusst die Geschwindigkeit des molekularen Stoffaustausches, bildet aber keine Diffusionsbarriere für niedermolekulare Substanzen.

Die Dicke der Basalmembran beträgt 50 bis 150nm. Die *Lamina fibro-reticularis* wird von Fibroblasten gebildet und besteht aus Kollagenfasern vom Typ III (Retikulinfasern) und aus Grundsubstanz (Glycin, Glycin+AS, Hydroxyprolin, Hydroxylysin). Die nur 50 bis 100nm dicke *Lamina basalis* wird als Produkt derjenigen Zellen beschrieben, denen sie unmittelbar anliegt. Sie besteht unter anderem aus einem Geflecht aus amorphen Kollagen Typ IV und polymeren Lamininfasern, die über das Protein Entaktin zu einem stabilen Netzwerk verknüpft ist (Martinez-Hernandez & Amento, 1983; Bruijn *et al.* 1988) (Abbildung [4]). Bei Zerstörung der Endothelzellen stellt die Basalmembran die letzte Barriere gegen Blutbestandteile dar (Mainardi *et al.*, 1980; Heck *et al.*, 1990; Granger *et al.*, 1995).

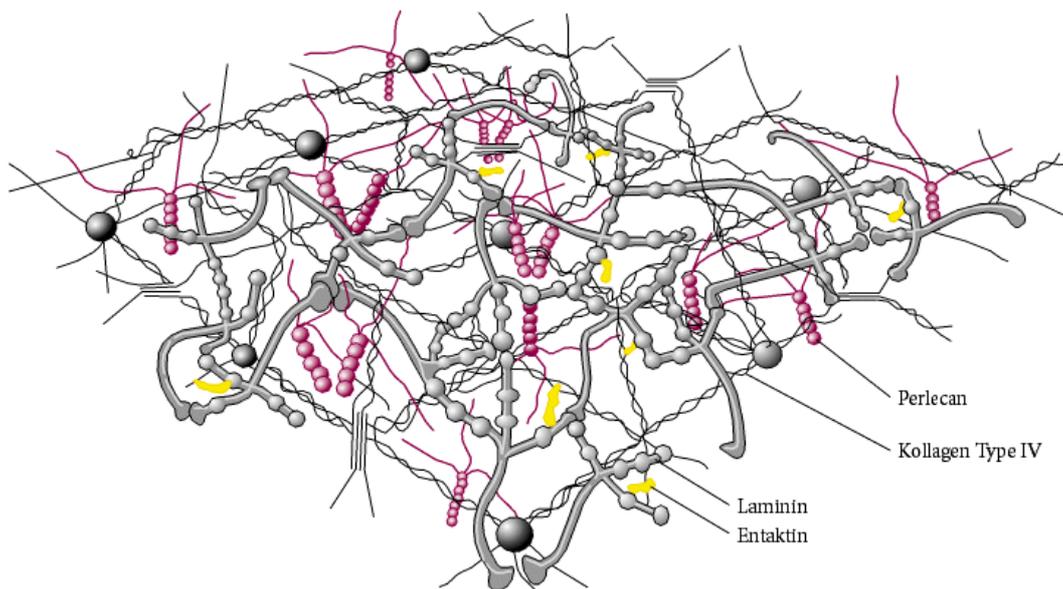


Abbildung 4: Molekulare Struktur der Basalmembran (aus „Molecular Biology of the Cell“).

### 1.4.3 Perizyten

Perizyten sind perivaskuläre Zellen mesenchymaler Herkunft. Sie liegen abluminal den Endothelzellen und den Venolen an (Diaz-Flores *et al.*, 1991; Rucker *et al.*, 2000; Allt & Lawrenson, 2001). Die höchste Dichte an Perizyten findet sich in den zerebralen Kapillaren der BHS (Haseloff *et al.*, 2005). Die zerebralen Perizyten besitzen Phagozytoseeigenschaften, wodurch sie ein wichtiger Faktor in der Immunabwehr sind (Rucker *et al.*, 2000; Allt & Lawrenson, 2001; Haseloff *et al.*, 2005). Auch produzieren und sezernieren sie den „transforming growth factor“ (TGF- $\beta$ ), der entscheidend für das endotheliale Wachstum ist, den „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), welcher wichtig für die Gefäßpermeabilität ist, sowie den „basic fibroblast growth factor“ (bFGF),

der wesentlich für die Ausdifferenzierung der Fibroblasten ist (Ramsauer *et al.*, 2002; Drenckhahn, 2004; Dohgu *et al.*, 2004 & 2005).

#### **1.4.4 Astrozyten**

Die Astrozyten gehören zu der großen Familie der Gliazellen, die bei den Säugetieren ca. 10-fach häufiger zu finden sind als Nervenzellen. Astrozyten sind sternenförmige Zellen, besitzen einen runden Nukleus, einen gut entwickelten Golgi Apparat und große Mitochondrien, die in den zahlreichen Fortsätzen liegen können (Bradbury, 1979). Neben der wichtigen Stützfunktion sind die Astrozyten essentiell für die Aufrechterhaltung des ionischen und chemischen Milieus des Extrazellulärraums im ZNS. Die Ausläufer mit ihren Astrozytenendfüßchen bilden eine Grenzfläche zwischen den Kapillaren und dem Gehirngewebe. Zudem sind Astrozyten bei der Entsorgung der Transmitter GABA und Glutamat beteiligt, als auch bei der Versorgung der Nervenzellen mit Nährstoffen (Schilling *et al.*, 2004).

### **1.5 Mikrovaskuläre Schädigung der BHS und der Mikrogefäße nach transienter zerebraler Ischämie**

Die ersten Untersuchungen an Mikrogefäßen nach transienter Ischämie wurden von J.S. Meyer (1958a & 1958b) an Primaten durchgeführt und zeigten erstmals pathologische Veränderungen an den Mikrogefäßwänden. Studien aus neuerer Zeit haben ebenfalls ähnliche Schädigungen der mikrovaskulären Gefäße bei unterschiedlichen Spezies, wie Primaten, Ratten und Mäusen aufgezeigt (Chiamulera *et al.*, 1992 & 1993; Hamann *et al.*, 1995 & 2002; Vosko *et al.*, 2003). Zu Beginn der Schlaganfallforschung lag der Fokus auf der Untersuchung und dem Verständnis der zellulären neuronalen Prozesse (Hossmann & Olsson, 1970; Hossmann & Sato, 1970). Erst in den letzten 10 bis 15 Jahren stieg das Interesse am mikrovaskulären System an.

Durch einen Gefäßverschluss kommt es zum Funktionsverlust der BHS mit gesteigerter vaskulärer Permeabilität (Gartshore *et al.*, 1997; Rosenberg *et al.*, 1998 & 2002). Eine anhaltende Okklusion führt zum funktionellen Versagen der BHS, zur Schädigung der Mikrogefäße und zur Degradation der Basalmembran (Schittny & Yurchenco, 1989; Yepes *et al.*, 2000; Mohr *et al.*, 2003). Dabei zersetzen Proteasen aus den nicht-zellulären proteolytischen Systemen, v.a. dem Plasminogen-Plasmin System (PPS) und dem Matrixmetalloproteinase System (MMP), die Strukturproteine der Basalmembran (Hamann *et al.*, 1995 & 1996; Rosenberg *et al.*, 1998 & 2002; Pfefferkorn & Rosenberg, 2003).

---

Untersuchungen an Primaten und Ratten zeigten eine massive proteolytische Degradation der Basalmembran, die schließlich zur Extravasation von Blutbestandteilen ins umliegende Gewebe, zur Ödembildung und zur Destabilisierung des mikrovaskulären Systems führt (Hamann *et al.*, 1995, 1996 & 2002). Bis heute sind die der Degradation zu Grunde liegenden Mechanismen nicht vollständig geklärt (del Zoppo *et al.*, 1998b; Hamann *et al.*, 1999; Petty & Wettstein, 2001; Wang & Shuaib, 2007). Auf das PPS und MMP System soll in den nachfolgenden Kapiteln näher eingegangen werden.

## **1.6 Das Plasminogen-Plasmin System und deren Komponenten**

Die klassischen Aufgaben des Plasminogen-Plasmin Systems (PPS) sind die Modellierung der extrazellulären Matrix (EZM), Funktionen bei der Zellmigration, der Zellinvasion, der Zelladhäsion, der Wundheilung und der Aktivierung von Signaltransduktionsketten. Außerdem spielt das PPS eine entscheidende Rolle in der Homöostase des ZNS (Brew *et al.*, 2000). Im Wesentlichen setzt es sich aus folgenden Faktoren zusammen: Dem Plasminogen, welches zum proteolytisch aktiven Enzym Plasmin umgewandelt wird, den beiden Plasminogenaktivatoren tPA (tissue plasminogen activator) und uPA (urokinase plasminogen activator), dem uPAR (membranständiger Rezeptor für die Aktivierung von uPA),  $\alpha$ 2-Antiplasmin (Inhibitor von Plasmin) und den beiden Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 (plasminogen activator inhibitor) von tPA und uPA.

### **1.6.1 Plasminogen / Plasmin**

Plasminogen (90 kDa) ist das Proenzym der fibrinolytischen Serinprotease Plasmin. Plasminogen wird in der Leber synthetisiert und hat eine biologische Halbwertszeit von 2,2 Tagen (Raum *et al.*, 1980). Aus dem proteolytisch inaktiven Plasminogen wird das proteolytisch aktive Plasmin (68 kDa) gebildet. Die Aktivierung zu Plasmin erfolgt durch die beiden Plasminogenaktivatoren (PA) tPA und uPA (Rijken, 1995). Freies, aktives Plasmin ist im Blut nur in geringsten Mengen vorhanden, da es von seinem physiologischen Inhibitor  $\alpha$ 2-Antiplasmin sofort komplexiert wird. Plasmin und  $\alpha$ 2-Antiplasmin bilden einen irreversiblen 1:1 Komplex (Collen *et al.*, 1980).

Plasmin kann zur Schädigung der Basalmembran beitragen. Ein Substrat von Plasmin ist Laminin, welches eine wesentliche Komponente der Basalmembran ist (Hamann *et al.*, 1995). Der Abbau von Laminin in der Basalmembran nach zerebraler Ischämie führt zum Verlust der Integrität der Basalmembran (Hamann *et al.*, 1995, 1996 & 2002). Des Weiteren fördert Plasmin über eine Rückkoppelungsreaktion die Aktivierung von pro-uPA zu uPA

---

(Barthels & Depka, 2003). Plasmin kann aber ebenso über die Aktivierung des MMP-Systems (Details siehe [1.7]) zum Abbau von Proteinen der Basalmembran führen und so indirekt zur verstärkten mikrovaskulären Basalmembrandegradation beitragen (Lijnen *et al.*, 1998).

### **1.6.2 Tissue Plasminogen Activator (tPA)**

Der gewebespezifische Plasminogenaktivator tPA ist eine 64 kDa schwere Serinprotease und wird als aktive Protease aus den Endothelzellen der Gefäßwand sezerniert. Die Halbwertszeit von tPA beträgt in etwa 4-5 Minuten. tPA wird durch eine hohe Konzentration an PAI-1, dem Inhibitor von tPA, auf niedrigem Niveau gehalten (Verstraete *et al.*, 1986). Die katalytische Domäne von tPA wandelt das inaktive Plasminogen in das aktive Plasmin um. Zudem besitzt tPA eine zusätzliche unspezifische proteolytische Aktivität (Nienaber *et al.*, 1992).

### **1.6.3 Urokinase Plasminogen Activator (uPA)**

uPA ist ebenfalls ein Enzym aus der Gruppe der Serin-Endopeptidasen. Die inaktive Vorstufe pro-uPA wird von Endothelzellen und Monozyten als Proenzym sezerniert. Die Aktivierung von pro-uPA zum proteolytischen uPA (46 kDa) erfolgt u.a. durch Plasmin und Trypsin. Aktiviertes uPA kann Plasminogen zu Plasmin aktivieren (Kobayashi *et al.*, 1991; Andreasen *et al.*, 1997). Die Inhibierung von uPA geschieht durch PAI-1 und PAI-2. Die Halbwertszeit von uPA im Blut beträgt in etwa 5-10 Minuten. Zudem interagiert uPA mit dem Rezeptor uPAR („urokinase plasminogen activator receptor“), der vermehrt auf Endothelzellen und Monozyten zu finden ist (Roldan *et al.*, 1990). Die Bindung von uPA an uPAR bewirkt eine Konzentrierung der enzymatischen Aktivität auf der Zelloberfläche. uPA vermittelt die Aktivierung von Plasminogen in aktives Plasmin (Magdolen *et al.*, 2001). Die Interaktion von uPAR und uPA bewirkt eine Amplifikation der Plasminogenaktivierung. Dabei wirkt aktives Plasmin reziprok aktivierend auf inaktives uPA. Diese sogenannte reziproke Zymogenaktivierung bewirkt eine deutlich schnellere Generierung von Plasmin (Plesner *et al.*, 1997).

### **1.6.4 Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)**

Die Inhibierung von tPA und uPA erfolgt hauptsächlich über das Serpin (Serinproteasen Inhibitoren) PAI-1 (48 kDa). Es wird als aktives Protein von Endothelzellen und Blutplättchen exprimiert (Erickson *et al.*, 1985). PAI-1 interagiert in einer 1:1 Stöchiometrie mit dem aktiven Zentrum der Serinproteasen. Es nimmt eine zentrale, regulatorische

Funktion in der Ausbildung stabiler Thromben ein und wird im Plasma durch Bindung an Vitronektin und Heparin in seiner aktiven Konformation stabilisiert (Ehrlich *et al.*, 1991). Zudem kommt PAI-1 im Vergleich zur tPA- und uPA-Konzentration im Überschuss vor.

### **1.7 Das Matrixmetalloproteinase System und deren Komponenten**

Die Matrixmetalloproteinasen (MMPs oder Matrixine) gehören zur Familie der Zink-abhängigen Endopeptidasen. Die meisten Proteine der EZM können durch MMPs hydrolysiert werden. MMPs sind in vielen physiologischen Prozessen (Angiogenese, Morphogenese in der Schwangerschaft, Arteriosklerose u.a.) für die Gewebedegradation essentiell und sind ebenso in pathologischen Prozessen involviert (Tumorstadium, Multiple Sklerose, Inflammation u.a.) (Ortega *et al.*, 2003; Nagase *et al.*, 2006). Charakteristisch für sämtliche MMPs ist das konservierte Zinkbindungsmotiv im aktiven Zentrum. MMPs werden als inaktive pro-Form sezerniert und dann extrazellulär durch proteolytische Spaltung und Konformationsänderung aktiviert. Die Expression und Aktivierung der MMPs unterliegt einer strengen physiologischen Regulierung (Geisler *et al.*, 1997). Dabei wird eine überschießende Proteolyse durch gewebespezifischen Inhibitoren, den sogenannten TIMPs (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases), verhindert (Nagase, 1997). Bisher sind 22 verschiedene MMPs im humanen Gewebe bekannt (insgesamt derzeit 28 MMPs), die sich auf Grund ihrer Substratspezifität in 6 Gruppen unterteilen lassen (siehe Beispiele in Tabelle [1]).

<b>Gruppe</b>	<b>Enzym</b>	<b>MMP-Nomenklatur</b>	<b>Substrate</b>
Kollagenasen	Interstitielle Kollagenase	MMP-1	Typ I-, II-, III-, VII-, VIII-, X-, XI-Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Tenascin, Laminin, Fibronektin, Entactin, Vitronektin
	Kollagenase-3	MMP-13	Typ I-, II-, III-,VI-, IX-, X-, XIV-Kollagen, Fibronektin, Aggrecan, Gelatine
Gelatinasen	Gelatinase A	MMP-2	Typ I-,II-, III-, IV-, V-, VII-, X-, XI-Kollagen, Gelatine, Elastin, Laminin, Fibronektin, Proteoglykane, Tenascin, Vitronektin
	Gelatinase B	MMP-9	Typ IV-, V-, XI-, XIV- Kollagen, Gelatine, Elastin, Proteoglykane
Stromelysine	Stromelysin-1	MMP-3	Typ I-, III-, IV-, V-, VIII-, IX-Kollagen, Proteoglykane, Laminin, Gelatine, Elastin, Fibronektin, Tenascin

	Stromelysin-2	MMP-10	Typ I-, III-, IV-, V-, VII-, IX-, X-, XI Kollagen, Gelatine, Proteoglykane, Elastin, Laminin, Fibronectin
Membranständige MMPs	MT1-MMP	MMP-14	Typ I-, II-, III- Kollagen, Proteoglykane, Laminin, Fibronectin, Gelatine
	MT3-MMP	MMP-16	Fibronectin
Matrilysin	Matrilysin	MMP-7	Typ I- Kollagen, Gelatine, Fibronectin, Elastin, Proteoglykan, Laminin
nicht klassifizierbare MMPs	Metalloelastase	MMP-12	Typ I-, IV- Kollagen, Gelatine, Elastin, Laminin, Fibronectin
	Enamelysin	MMP-20	Amelogenin

Tabelle 1: Übersicht einiger Matrixmetalloproteinasen: Nomenklatur und Substrate (Geisler *et al.*, 1997).

### 1.7.1 Gelatinasen - MMP-9 & MMP-2

MMP-9 (Gelatinase B) und MMP-2 (Gelatinase A) werden von Bindegewebszellen als latente pro-Form sezerniert – MMP-9 u.a. von Leukozyten, Makrophagen und Monozyten und MMP-2 vor allem von Endothelzellen und Fibroblasten. Beide degradieren Kollagen Typ IV (Hamann *et al.*, 1996; Lauer-Fields *et al.*, 2003) sowie Laminin, Elastin und Fibronectin (Murphy *et al.*, 1991).

Das inaktive pro-MMP-9 (92 kDa) wird durch Proteasen wie Plasmin, Stromelysin, Kathepsin G, Kallikreine und Trypsin zum aktiven MMP-9 (86 kDa) umgewandelt (Nagase *et al.*, 1991; Tschesche *et al.*, 1992). Ebenfalls können MMP-7, MMP-3 und MMP-2 zur Aktivierung beitragen (Ogata *et al.*, 1992a; Imai *et al.*, 1995). Eine Inhibierung erfolgt vor allem über TIMP-1 (siehe [1.7.3]), welches sich ans aktive Zentrum von MMP-9 bindet. Zusätzlich ist TIMP-1 in der Lage sich an pro-MMP-9 anzulagern und so die Aktivierung zum aktiven MMP-9 zu unterbinden (Goldberg *et al.*, 1992).

Eine Aktivierung von MMP-2 (62 kDa) aus pro-MMP-2 (72 kDa) findet nicht direkt über die Proteasen (Plasmin oder Kallikrein) statt (Okada *et al.*, 1990). MMP-2 bildet hierbei eine Ausnahme, da es häufig konstitutiv exprimiert wird und über das Zusammenwirken von pro-MMP-2, MT1-MMP und TIMP-2 aktiviert wird. Aktiviert wird MMP-2 vor allem durch das membranständige MT1-MMP (Sato *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1998). MT1-MMP wird extrazellulär durch Plasmin oder intrazellulär durch Furin aktiviert. Siehe Abbildung [5].

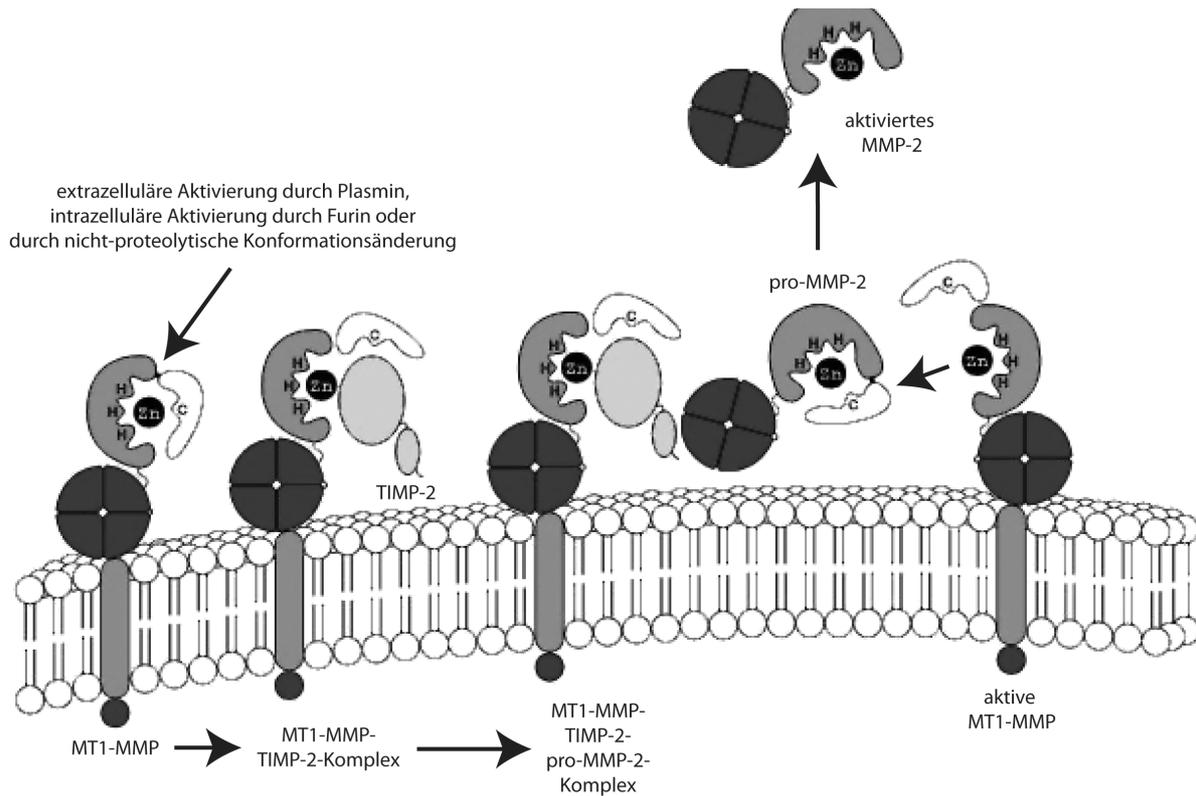


Abbildung 5: Aktivierungskaskade von MMP-2: Membranständiges MT1-MMP bildet in der Zellmembran Dimere und wird extrazellulär durch Plasmin oder intrazellulär durch Furin aktiviert. TIMP-2 bindet extrazellulär an die aktive katalytische Domäne eines der MT1-MMP-Monomers und inaktiviert dieses. An diesen MT1-MMP/TIMP-2-Komplex bindet pro-MMP-2. Der MT1-MMP/TIMP-2-Komplex stellt somit ein „membranständigen pro-MMP-2-Rezeptor“ dar. Damit wird pro-MMP-2 nahe an das zweite, nicht inhibierte aktive MT1-MMP des MT1-MMP Dimers gebracht und ein Teil des Propeptids von pro-MMP-2 abgespalten. Die Aktivierung des membranassoziierten MMP-2 wird durch ein zweites aktives MMP-2 vervollständigt, sodass im Anschluß zwei komplett aktive MMP-2-Enzyme in den Extrazellularraum freigesetzt werden (Deryugina et al., 2001). Aktiviertes MMP-2 kann ebenfalls membranassoziiert bleiben und/oder im 1:1-Komplex mit TIMP-2 inaktiviert vorliegen (Sternlicht & Werb, 2001).

Sämtliche entdeckten MT-MMPs weisen die Fähigkeit zur Aktivierung von MMP-2 auf (Kolkenbrock et al., 1997; Ravanti & Kähäri, 2000; Morrison et al., 2002). Eine Inhibierung von MMP-2 erfolgt vor allem über TIMP-2 (siehe [1.7.3]). Ein zusätzlicher wichtiger Hauptunterschied der beiden Gelatinasen MMP-9 und MMP-2 zeigt sich anhand ihres Expressionsmusters (Huhtala et al., 1991). MMP-2 wird dabei nur gering durch Wachstumsfaktoren etc. beeinflusst, während MMP-9 stark durch Wachstumsfaktoren, Chemokine etc. induzierbar ist (Hipps et al., 1991; Birkedal-Hansen et al., 1993).

### 1.7.2 Stromelysin-1 - MMP-3

Die Protease MMP-3 (Stromelysin-1; 45 kDa) dient der Expression und Aktivierung von MMP-9 und MMP-2 (Ogata et al., 1992a & 1992b). Die latente pro-Form wird durch Gliazellen, Monocyten und Fibroblasten sezerniert. Eine Aktivierung kann durch

---

Serinproteasen wie Plasmin, Elastase und Kathepsin G direkt erfolgen (Nagase *et al.*, 1990). Die Regulation der MMP-3 Expression erfolgt auf der Stufe der Transkription und reagiert auf Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone. MMP-3 verdaut ein breites Spektrum an Substraten wie Laminin, Kollagen Typ IX und Gelatine (Okada *et al.*, 1986 & 1989a; del Mar Barbacid *et al.*, 1998) und ist damit für den „turnover“ extrazellulärer Matrixproteine sehr wichtig.

### 1.7.3 Inhibitoren - TIMP-1 & TIMP-2

Bisher konnten vier verschiedene TIMPs (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) identifiziert werden, die eine Molmasse von 21-28,5 kDa aufweisen (Gomez *et al.*, 1997). TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 werden in löslicher Form sezerniert und TIMP-3 ist mit der EZM assoziiert (Gomez *et al.*, 1997). Sämtliche TIMPs inhibieren MMPs in einer reversiblen 1:1 Stöchiometrie. Das extrazelluläre Protein TIMP-1 bindet mit hoher Affinität an MMP-9, während TIMP-2 eine erhöhte Affinität gegenüber MMP-2 aufweist (O'Connell *et al.*, 1994; Murphy & Knäuper, 1997). Des Weiteren inhibiert TIMP-1 die Aktivität von MT1-MMP (Windsor *et al.*, 1997). Zur Inhibition von MMP-9 interagiert TIMP-1 mit dem katalytischen  $Zn^{2+}$ -Ion der MMP-9. Ein ähnlicher Prozess spielt sich bei der Inhibition von MMP-2 durch TIMP-2 ab (Tuuttila *et al.*, 1998). Zudem sind beide TIMPs in der Lage die latente pro-Form von MMP-9 bzw. von MMP-2 zu inhibieren (Goldberg *et al.*, 1992; Bernhard *et al.*, 1994). Neben der Inhibition spielt TIMP-2 eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von MMP-2. (siehe Abbildung [5]).

## 1.8 EMMPRIN (Extracellulär Matrixmetalloproteinase Inducer)

Das zur Familie der Immunglobuline gehörende EMMPRIN (CD147) ist ein N-glykosiliertes Zelloberflächenprotein (58 kDa). Exprimiert wird EMMPRIN unter anderem von aktivierten T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Keratinozyten u.a. (Kasinrerk *et al.*, 1992; DeCastro *et al.*, 1996; Noguchi *et al.*, 2003). Es ist verantwortlich für die Induktion der MMPs (Biswas *et al.*, 1995; Schuster *et al.*, 1996). Die Expression von EMMPRIN zeigt keine Wirkung auf die Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2, sondern verschiebt das Gleichgewicht zu Gunsten der MMPs in Richtung vermehrter Produktion und Aktivierung (Ellis *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 2002). In Fibroblasten induziert EMMPRIN die Expression von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 (Guo *et al.*, 1997). Zudem kann die MMP-9 Expression in Monozyten und die MMP-2 Expression in glatten Muskelzellen durch EMMPRIN stimuliert werden (Schmidt *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2008).

### 1.9 Schädigung der Mikrogefäße durch die nicht-zellulären proteolytischen Systeme: Plasminogen-Plasmin- und MMP System

Mit anhaltender Okklusion durch eine Ischämie kommt es zur Degradation der Mikrogefäße und zur Zerstörung der Basalmembran (Schittny & Yurchenco, 1989). Im Mausmodell zeigte sich eine zeitliche Abhängigkeit von der Dauer der Ischämie und der Reperfusion im Mausmodell (Vosko *et al.*, 2006). In den Prozess der Zerstörung der Mikrogefäße sind die beiden nicht-zellulären proteolytischen Systeme, das Plasminogen-Plasmin-System und MMP System, stark involviert (siehe Abbildung [6]).

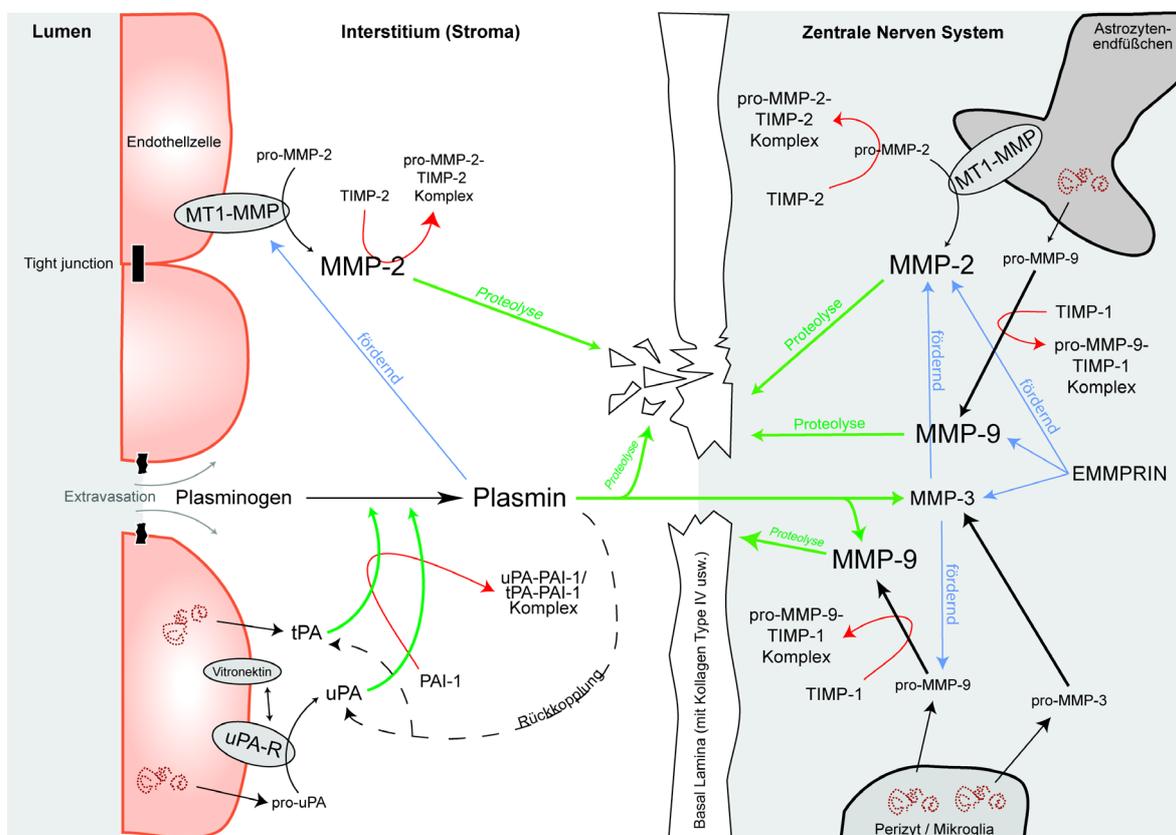


Abbildung 6: Schematische Darstellung der zuvor beschriebenen Aktivierungskaskaden des PPS und des MMP Systems, sowohl im Interstitium (ausgehend von den Endothelzellen) als auch im ZNS, die zur Degradation der Basalmembran führen. Die proteolytisch entscheidenden Proteasen für den Abbau der Basalmembran sind Plasmin, MMP-9 und MMP-2, wobei uPA und tPA ebenfalls wichtige proteolytische Eigenschaften besitzen. (grün: Aktivierung bzw. Proteolyse; rot: Inhibition; blau: Förderung der Expression bzw. der Sezernierung).

In Vorarbeiten fand sich eine erhöhte Expression der Plasminogenaktivatoren im Bereich der ischämischen Schädigung in der Ratte (Pfefferkorn *et al.*, 2000), die histologisch mit den neuronalen und mikrovaskulären Infarktaren übereinstimmten. Dessen Hauptaufgabe ist die Umwandlung des inaktiven Plasminogens in das proteolytisch aktive Plasmin (Rijcken *et al.*, 1995). Die proteolytische Eigenschaft von Plasmin führt zur

---

Zerstörung der Mikrogefäße (Hamann *et al.*, 1999) und zudem wirkt Plasmin schon in geringen Mengen neurotoxisch (Wang *et al.*, 1998). Am Primaten- und Rattenmodell konnte vor allem ein Anstieg des uPA Levels nach Ischämie festgestellt werden, während tPA auf niedrigem Niveau stagnierte (Hosomi *et al.*, 2001; Rosenberg *et al.*, 1996; Ahn *et al.*, 1999; Burggraf *et al.*, 2004). In der Literatur wird seit längerem die Hypothese avisiert, dass die lokale Erhöhung der Synthese und Sezernierung von Plasminogenaktivatoren im Zusammenspiel mit Plasmin einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der mikrovaskulären Schädigung haben könnte (Schreiber *et al.*, 1998; Rosenberg, 1999; Hamann *et al.*, 1999 & 2002). Weiter zeigte sich ein starker Einfluss des Inhibitors PAI-1 auf das mikrovaskulären Systems. Die Konzentration des Inhibitors stieg schon wenige Stunden nach Ischämie signifikant in Ratten und Mäusen an (Zhang *et al.*, 1998; Hosomi *et al.*, 2001). Hosomi *et al.* (2001) zeigten, dass die PAI-1 Konzentration sowohl im Gewebe als auch im Blut anstieg. Dessen Untersuchungen deuten daraufhin, dass Endothelzellen maßgeblich für die Produktion von PAI-1 verantwortlich sind und für eine schnelle und direkte Protektion der Mikrogefäße nach einer Ischämie sorgen.

Ein weiterer möglicher Schädigungsfaktor für die massive Degradation der Basalmembran bei einer zerebralen Ischämie sind die MMPs. In Tiermodellen wurde die Beteiligung von MMP-9 und MMP-2 an der Störung der BHS nachgewiesen (Rosenberg *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2007). Das Auftreten von MMP-9 und MMP-2 lassen sich zeitlich voneinander trennen (Rosenberg *et al.*, 1997 & 2001).

Die frühe erste Phase der temporären und reversiblen Öffnung der BHS ist mit MMP-2 assoziiert, während aktives MMP-9 erst bei einer sekundären Öffnung hochreguliert wird (Rosenberg *et al.*, 1998; Heo *et al.*, 1999). Rosenberg *et al.* (1996) und Romanic *et al.* (1998) zeigten eine signifikante pro-MMP-9 Steigerung 24 Stunden nach Ischämie. Durch die intravenöse Gabe eines MMP-9-Antikörpers vor Beginn der Ischämie konnte das Infarktvolume um 30% reduziert werden (Romanic *et al.*, 1998). Ein ähnliches Ergebnis erbrachte die Untersuchung von Fujimura *et al.* (1999) an Mäusen mit fokaler zerebraler Ischämie. Die zweite Öffnung der BHS tritt nach etwa 24-48 Stunden ein und ist abhängig von der Okklusionsdauer (Rosenberg *et al.*, 1998). Diese Phase ist gekennzeichnet durch einen starken Anstieg von aktiviertem MMP-9, was zu einer erhöhten Zerstörung der Mikrogefäße führt. Insbesondere MMP-9 fördert sekundäre Komplikationen, wie Ödeme und Hämorrhagien (Gasche *et al.*, 2001). Heo *et al.* (1999) zeigten in Experimenten an

Primaten und Burggraf *et al.* (2007) an Ratten eine Assoziation der erhöhten Expression von pro-MMP-9 mit hämorrhagischen Transformationen. Kolokalisationsstudien der Arbeitsgruppe ergaben eine Korrelation der gesteigerten Aktivität der beiden Proteasen mit dem Infarktarealen (Loy *et al.*, 2002).

Die proteolytische Aktivität von MMP-9 und MMP-2 wird u.a. durch die beiden endogenen Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 bestimmt. Vor der Ischämie herrscht dabei ein Gleichgewicht zwischen den Proteasen und den Inhibitoren (Nagase *et al.*, 1997). Bei eintretender Ischämie verschiebt sich das Gleichgewicht zu Gunsten der Proteasen und es kommt zum proteolytischen Abbau der Basalmembran (Burggraf *et al.*, 2003). Im späteren Verlauf der Ischämie steigt dann die Konzentration von TIMP-1 und TIMP-2 wieder an (Wang *et al.*, 1998b; Burggraf *et al.*, 2005a), was auf einen protektiven Mechanismus deutet.

Die Expression von EMMPRIN ist im Mausmodell der permanenten fokalen zerebralen Ischämie signifikant erhöht (Zhu *et al.*, 2008). Zudem korrelierte die EMMPRIN Expression zeitlich mit dem Anstieg von MMP-9, was die Vermutung einer induzierenden Wirkung von EMMPRIN auf MMP-9 nahe legt. In eigenen Untersuchungen zeigte sich im Ratenmodell der fokalen zerebralen Ischämie ebenfalls eine signifikante Steigerung von EMMPRIN bei gleichzeitiger Erhöhung von MMP-9 und MMP-2 (Burggraf *et al.*, 2005b). EMMPRIN induziert die Expression von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 (Guo *et al.*, 1997) und kann die MMP-9/-2 Expression stimulieren (Schmidt *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2008). Die gesteigerte Aktivität von EMMPRIN könnte somit zu einer erhöhten Degradation der Basalmembran führen.

### **1.10 Hypothermie und mikrovaskuläre Schädigung**

Beim gesunden Menschen liegt die Körpertemperatur zwischen 36,3°C und 37,4°C (Normothermie); liegt die Temperatur unter diesen Werten so spricht man von Hypothermie. Von einer milden Hypothermie spricht man in der Medizin bei einer Unterkühlung des menschlichen Körpers auf 32°C bis 34°C und von einer moderaten Hypothermie zwischen 29°C und 32°C (Werner, 1997; Meixensberger & Renner, 2007). Eine weitere Absenkung der Temperatur unterhalb von 29°C bezeichnet man als tiefe Hypothermie (Krieger *et al.*, 2001; Meixensberger & Renner, 2007).

Die positiven Effekte einer hypothermen Behandlung nach Ischämie sind schon lange in der Medizin bekannt (Ginsberg *et al.*, 1992). In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass

eine Hypothermie das Infarktvolumen nach fokaler zerebraler Ischämie signifikant reduziert (Maier *et al.*, 1998; Yanamoto *et al.*, 2001; Hamann *et al.*, 2004). Klinische Studien zeigten ebenfalls einen günstigen Effekt von milder und moderater Hypothermie bei Ischämie und bei Schädel-Hirn-Trauma (Shiozaki *et al.*, 1993; Azzimondi *et al.*, 1995; HACA Studie, 2002; Bernard *et al.*, 2002; Krieger *et al.*, 2001). In einer vierjährigen Studie konnte der neuroprotektive Effekt der Hypothermie bei der Behandlung von schweren Schädel-Hirn-Verletzungen nachgewiesen werden. Das Resultat war eine signifikant reduzierte Mortalität und eine deutliche Verbesserungen des Outcomes (Zhi *et al.*, 2003). Ginsberg (2003) postuliert die Hypothermie bei Ischämie als die beste Form der Neuroprotektion.

Der Einfluss der postischämischen Hypothermie auf die Basalmembran und auf die Integrität der Mikrogefäße wurde bisher nur unzureichend untersucht. In tierexperimentellen Versuchen führte die physikalische Intervention durch Hypothermie insbesondere zu einer Verminderung der MMP-9 (Wagner & Hamann, 2003; Wagner *et al.*, 2003). In eigenen Arbeiten reduzierte die Hypothermie die Aktivitäten von MMP-9, MMP-2, uPA und tPA im Rattenmodell (Hamann *et al.*, 2004). Dies könnte zu der beobachteten Verminderung des Infarktvolumens, zu einer Stabilisierung der Basalmembranintegrität und zu einer Reduktion der Hämoglobinextravasation erheblich beigetragen haben. Den beiden Enzymen uPA und MMP-9 wird eine Schlüsselrolle bei der mikrovaskulären Schädigung zugesprochen (Hosomi *et al.*, 2001; Menshikov *et al.*, 2002; Hamann *et al.*, 2004). In klinischen Studien zeigte sich in Abhängigkeit von der Dauer des Schlaganfalls ein Anstieg von MMP-9 und MMP-3, die durch eine hypotherme Therapie deutlich gesenkt wurden (Horstmann *et al.*, 2003). Ein möglicher protektiver Mechanismus der postischämischen Hypothermie könnte darin begründet sein, dass die enzymatische Aktivität der Plasminogenaktivatoren und MMPs unter Hypothermie gesenkt werden. Dies würde sich deutlich positiv auf die Integrität der Mikrogefäße auswirken, sowie die Bildung von proteolytischen Plasmin aus Plasminogen reduzieren und letztendlich die Schäden des Schlaganfalls deutlich minimieren.

---

## 2 Fragestellung

Die positiven Effekte einer reduzierten Körpertemperatur nach einer zerebralen Ischämie sind seit Jahren bekannt. Vorarbeiten am Rattenmodell zeigten unter hypothermen Bedingungen eine signifikante Reduktion des Infarkt Volumens, eine Verbesserung des Outcomes und eine verminderte Blutungsrate ins Gehirngewebe (Hamann *et al.*, 2004).

Der protektive Effekt der Hypothermie auf das mikrovaskuläre System (Hamann *et al.*, 2004; Burk *et al.*, 2008) könnte durch eine generelle Reduktion sämtlicher degradierender enzymatischer Systeme zustande kommen oder aber durch spezifische Veränderungen in einzelnen Systemen/Komponenten, wie beispielsweise durch die gezielte Reduzierung der Aktivität bestimmter Proteasen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der Hypothermie auf das mikrovaskuläre System im Mausmodell der transienten zerebralen fokalen Ischämie. Dabei wurden gezielt Knock-Out Mutanten aus dem PPS (Plg-, tPA-, uPA- und PAI-1) verwendet, um die Interaktion dieser Enzyme mit der Hypothermiebehandlung zu untersuchen. An eine 3-stündige Ischämiephase wurde eine 24-stündige Reperfusionphase mit und ohne milde bis moderate Hypothermie angeschlossen.

Folgende Hypothesen sollen dabei überprüft werden:

- 1 Die hypotherme Behandlung hat einen protektiven Effekt auf die mikrovaskuläre Integrität und vermindert die Entstehung von Blutungen im Mausmodell nach transienter fokaler zerebraler Ischämie.
- 2 Die Deletion der Plasminogenaktivatoren führt zu einer Verbesserung der protektiven Effekte der Hypothermie.
- 3 Entscheidend für die mikrovaskuläre Protektion sind die jeweiligen Aktivitäten der Proteasen, die zum Integritätsverlust der Mikrogefäße führen.



---

### 3 Material und Methoden

Sämtliche Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem durch die Regierung von Oberbayern genehmigten Tierschutzantrag (209.1 - 2531-81/01) und den Tierschutzbestimmungen durchgeführt. In Übereinstimmung mit diesen Standards wurde alles getan um bei den Versuchstieren möglichst Schmerzen und Mißempfinden zu vermeiden.

Folgende Mausstämme wurde über die Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen: C57Bl/6 Maus (Stock#: 000664), tPA Knock-Out Maus (Stock#: 002508), uPA Knock-Out Maus (Stock#: 002509), PAI-1 Knock-Out Maus (Stock#: 002507). Die Plasminogen Knock-Out Mutanten, zuerst beschrieben von Ploplis *et al.* (1995), wurden von Dr. J.M. Stassen (Center for Molecular and Vascular Biology, Catholic University Leuven, Belgium) zur Verfügung gestellt. In Kooperation mit dem Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung (ZNP) in München wurde die Plasminogen Knock-Out Mäuse gezüchtet und genotypisiert. Sämtliche Versuchstiere waren männlich und hatten ein Gewicht zwischen 21g und 35g. Bis zum Zeitpunkt der Operation wurden die Tiere in einem Käfig II-long der Firma Tecniplast GmbH (Hohenpeißenberg, Deutschland; 365mm x 207mm x 140mm; 530qcm) in einem Rhythmus von 12-Stunden Helligkeit/Dunkelheit gehalten. Im Anschluss an die Operation wurden die Versuchstiere für die Reperfusion in einem Einzelkäfig gehalten. Versuchstiere mit normothermer Reperusionsphase (37°C) wurden im Anschluss an die Operation in einem Brutkasten (Babytherm 4200, Drägerwerk AG Lübeck, Deutschland) zur Stabilisierung der Körpertemperatur untergebracht. Tiere, die einer hypothermen Behandlung unterzogen wurden, wurden in einem modifiziertem Kühlschranks (Santo, AEG, Deutschland) mit regulierbarem Thermostat (Hensel D9040) bei 18-20°C für 24h gehalten. Dabei stellte sich eine Körpertemperatur von 32-34°C ein (siehe Abbildung [19]). Das Futter (Ratte-Maus Haltungsfutter; V1534) wurde von Ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland) bezogen. Allen Tieren wurde freier Zugang zu Futter und Wasser vor und nach dem Versuch gewährt.

#### **3.1 tMCAO (*transient middle cerebral artery occlusion*) Fadenmodell bei der Maus**

Vor dem Eingriff wurde das Gewicht der Tiere ermittelt, um evtl. Gewichtsverlust während des Experimentes zu dokumentieren und um die korrekte Filamentstärke zu wählen. Die

---

Narkotisierung erfolgte mit einer Inhalationsnarkose. Zur Einleitung wurde ein Gasgemisch von 5% Vol. Isofluran, 30% O<sub>2</sub> und 60% N<sub>2</sub>O verwendet (ca. 1min.) und zur Erhaltung ein Gasgemisch von 1,5% Vol. Isofluran, 30% O<sub>2</sub> und 60% N<sub>2</sub>O. Ein Vapor 19.3 der Drägerwerk AG (Lübeck, Deutschland) wurde als Isofluranverdampfer eingesetzt. Die Sauerstoffsättigung des Gasgemisches wurde mit einem Oxydig (Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland; O<sub>2</sub>-Sensor: Medical Oxygen Sensor OOM201, Envitec Wismar GmbH, Deutschland) permanent während der Operation kontrolliert.

Im Anschluss an die Anästhesie wurde eine fiberoptische Sonde (Perimed, Järfäla, Schweden) über dem „middle cerebral artery“ (MCA) Gebiet (+2mm posterior und +6mm lateral von Bregma) platziert, um den regionalen, zerebralen Blutfluss mittels der Laser-Doppler-Blutflussmethode (LDF) zu kontrollieren. Die transiente fokale zerebrale Ischämie wurde durch die intraluminale Okklusion der MCA mit dem Fadenmodell, das von Hata *et al.* (1998) und Longa *et al.* (1989) beschrieben wurde, durchgeführt. Nach Anbringung der fiberoptischen Sonde wurde das Tier in Rückenlage gebracht und fixiert. Mit Hilfe eines Operationsmikroskops (Opmi Pico, Carl Zeiss, Deutschland) wurde eine etwa 2 cm lange ventromediale Inzision am linken lateralen Halssitus gemacht.

Unter Schonung der aufliegenden Speicheldrüsen, verschiedener Muskeln (z.B. *Musculus sternocleidomastoideus* und *Musculus omohyoideus*) und des *Nervus vagus*, welcher parallel zur *Ateria carotis communis* (ACC) läuft, wurde die ACC vorsichtig freipräpariert. Im Anschluss wurde, kranial zur ACC, zuerst die Bifurkation von *Ateria carotis interna* (ACI) und *Ateria carotis externa* (ACE) freigelegt und dann entlang der ACI bis zur Bifurkation von ACI und *Arteria pterygopalatina* (PA) präpariert. Die ACC sowie die ACE wurden distal ligiert. Die ACC wurde nun mit einer Mikrogefäßklemme (Aesculap, Deutschland) verschlossen. Um den Okklusionsfaden zu fixieren wurde zusätzliche eine Ligation um die ACC gelegt. Nach Inzision distal des Ligationsfadens wurde das Okklusionsfilament eingeführt und der temporäre Clip entfernt, so dass das Filament intrakranial 18mm von der Bifurkation ACI/ACE nach kranial geschoben werden kann. So kommt es an der MCA zur völligen Okklusion (Abbildung [7]). Die erfolgreiche Okklusion wurde an Hand der regionalen zerebralen LDF-Methode (Periflux 4001, Perimed, Schweden) überprüft (siehe Abbildung [8] bzw. Kapitel [3.2]) und aufgezeichnet (PeriSoft V5.10c2, Perimed).

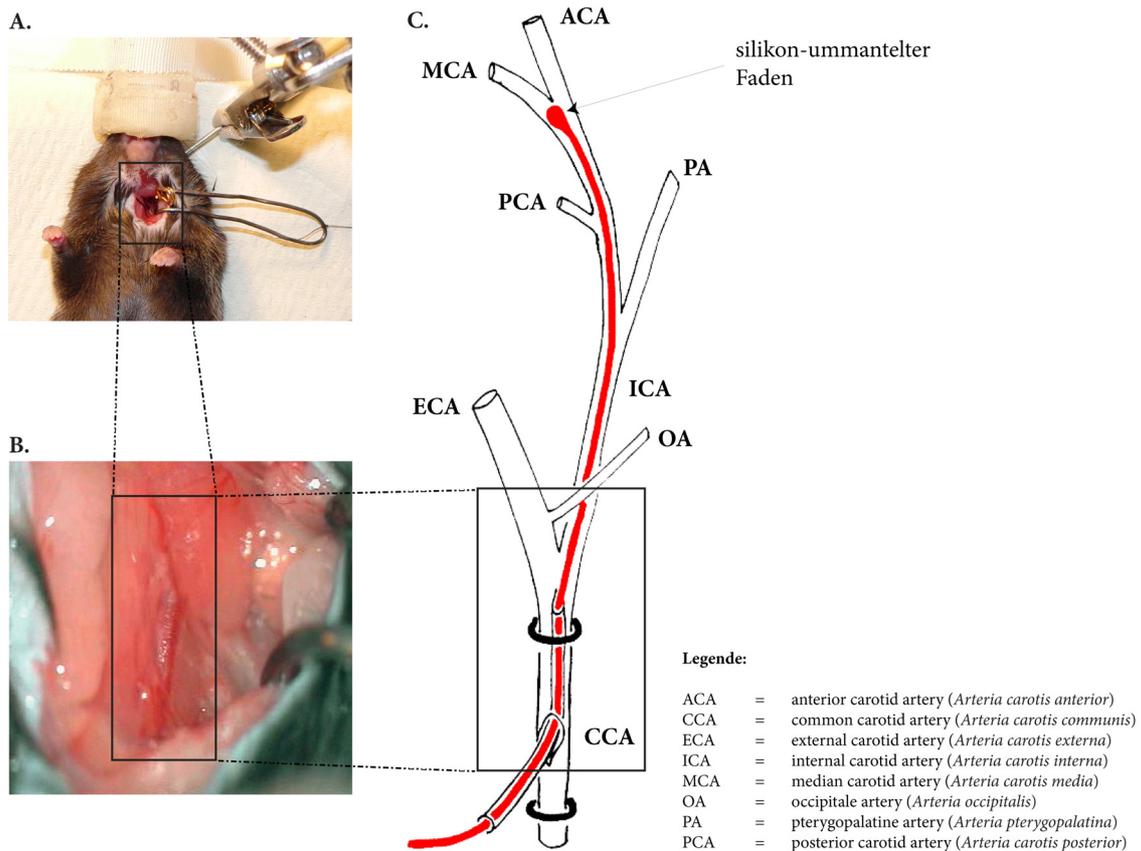


Abbildung 7: A. Operationsaufbau mit geöffnetem Halssitus und angeschlossener LDF-Sonde; B. Makroaufnahme der CCA vor dem Einschub des Okklusionsfadens; C. Schema der korrekten Okklusion der MCA



Abbildung 8: Bei Okklusion der MCA kommt es zu einem rapiden Abfall des Blutflusses, der durch die Laser-Doppler-Blutflussmethode (LDF) erfasst wird.

Die Filamentstärke wurde durch das Gewicht des Tieres bestimmt und das entsprechende Filament zur Okklusion verwendet (Tabelle [2] - nach Hata *et al.*, 1998). Das Nylon Monofilament (Nylon 8-0, Ethicon, Johnson & Johnson, Belgien) wurde mit einer Silikonschicht versehen, um die Gefahr einer Endothelabrasion und/oder einer Perforation des Gefäßes zu minimieren.

---

<b>Gewicht</b>	<b>Filamentstärke</b>
20g	150µm
21g	153µm
22g	156µm
23g	159µm
24g	162µm
25g	165µm

---

*Tabelle 2: Beziehung von Gewicht der Maus und Filamentstärke (je 1g plus 3µm).*

Die Körpertemperatur wurde während des gesamten Versuches mit Hilfe einer 75 Watt Glühbirne konstant auf  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  gehalten und über eine Rektalsonde überwacht (Digitalthermometer: GMH3230 & Temperatursonde: GES 130 Einstichfühler Typ K, beide von Greisinger electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland). Die MCA wurde in allen Versuchsgruppen für 3 Stunden okkludiert. Bei schein-operierten Tieren wurde das Filament nicht in die ACC eingeführt, ansonsten wurden die Narkose und alle operativen Eingriffe wie oben beschrieben durchgeführt.

Nach der Okkludierung wurde die Inzision am linken Halssitus mit einem monofilären Faden vernäht (Ethicon 5-0, Johnson & Johnson, Belgien) und die Tiere in den Brutkasten bis zur Entfernung des Filaments gesetzt. Drei Stunden nach Okklusion wurde das Filament, unter kurzer Narkose, wieder zurückgezogen und entfernt, um die Reperfusion über den *Circulus arteriosus willisii* zu ermöglichen. Der *Circulus arteriosus willisii* sorgt physiologisch für gleich bleibende Druckverhältnisse und kann bei Ausfall einer der zuführenden Arterien als Kollateralkreislauf die Versorgung des ischämischen Areals übernehmen (Benninghoff, 1993; Liebmann *et al.*, 1993). Diese arterielle Blutversorgung findet sich sowohl bei der Maus/Ratte als auch beim Menschen (Hafferl, 1957; Firbas *et al.*, 1973; Abbildung [9]).

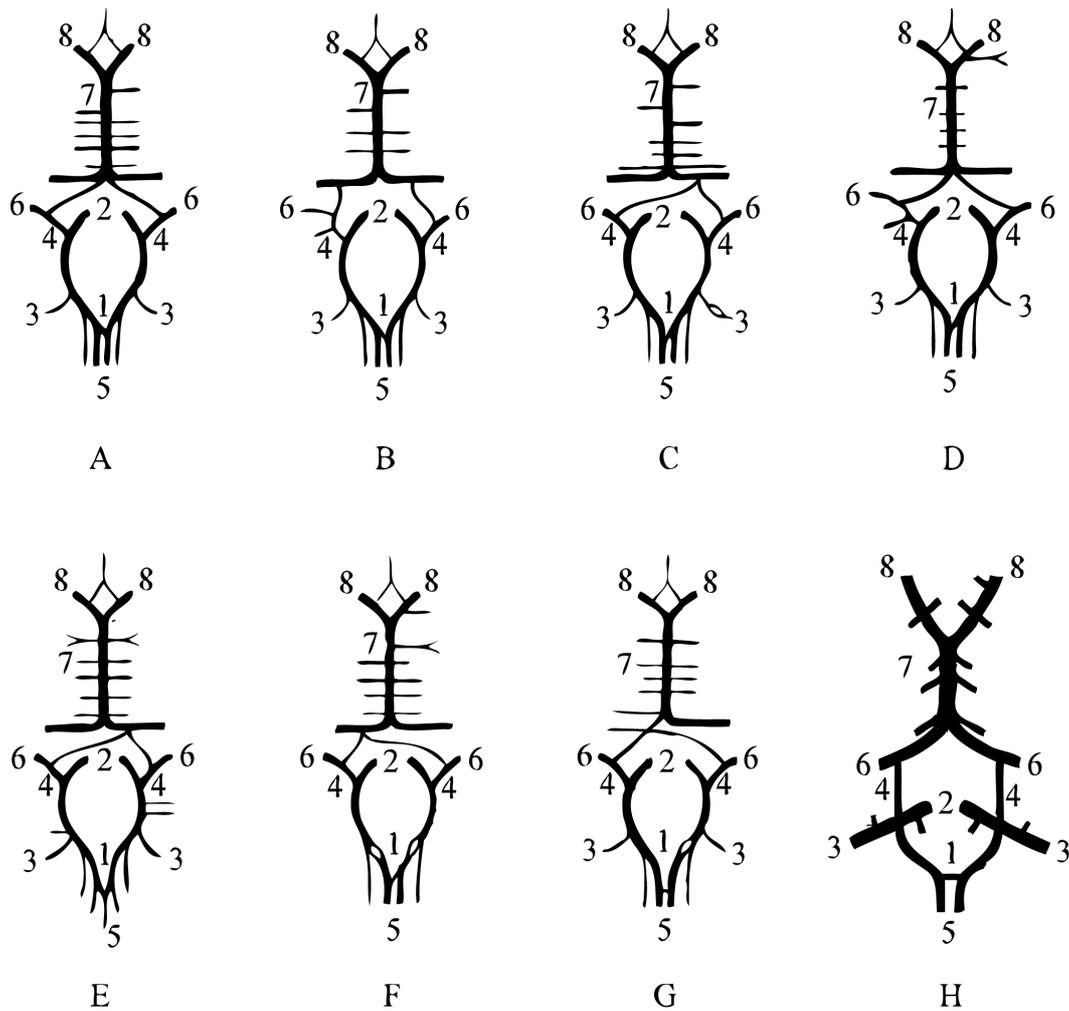


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Circulus arteriosus willisii von Ratten (A - G) und des Menschen (H) - Hafferl (1957) und Firbas et al. (1973). 1. A. communis rostralis; 2. A. carotis interna; 3. A. cerebri media; 4. A. communicans caudalis; 5. A. cerebri rostralis; 6. A. cerebri caudalis; 7. A. basilaris; 8. A. vertebralis (Hafferl, 1957; Firbas et al., 1973).

Da die Sonde kabelgebunden war, wurde diese mit Hilfe einer speziellen Vorrichtung (small-rodent-jacket, Harvard Apparatus, USA) zusätzlich befestigt um ein vorzeitiges Abreißen der Sonde zu verhindern. Durch diese Konstruktion war es dem Tier weiterhin möglich selbstständig an Futter und Wasser zu gelangen und sich im Käfig selbstständig zu bewegen. Im Anschluss wurde der Käfig zur physikalische Intervention durch Hypothermie in einen speziell temperaturregulierten Kühltank (Santo, AEG, Deutschland; mit zusätzlichem Thermostat von Hensel D9040) gestellt und die Temperaturaufzeichnung begonnen. Eine moderate bis milde Hypothermie (32-34°C) wurde durch Absenkung der Umgebungstemperatur (18-20°C) erreicht (Abbildung [10]). Die Reperfusionphase begann sobald der Käfig in den Brutschrank (Normothermiegruppe) bzw. in den präparierten Kühltank (Hypothermiegruppe) gestellt wurde. Sowohl die Hirn- als auch die Umgebungstemperatur wurde kontinuierlich

während der 24-stündigen Reperfusionphase mittels des Prozesseraufzeichnungssystems M5360 erfasst (M5360, Greisinger Electronics, Deutschland). Das verwendete Hypothermiemodell basiert, mit leichten Modifikationen (kontinuierlicher Aufzeichnung der 24-stündigen Reperfusionphase), auf der extrakorporalen Kühlung nach Yanamoto *et al.* (2001).



*Abbildung 10: Aufbau der extrakorporalen Kühlung. Die Maus wurde dazu mit samt Käfig in einen präparierten Kühltank gesetzt und über eine kabelgebundene Sonde die Temperatur der Maus aufgezeichnet.*

Nach Ablauf der Reperfusionphase (24 Stunden) wurde der neurologische Defekt der Tiere mittels Garcia-Test (Garcia *et al.*, 1995) bestimmt. Der Garcia-Test (Neuroscore) wurde bei allen normothermen Gruppen und unter Hypothermie nur bei der hypothermen Kontrollgruppe durchgeführt (siehe [3.3] für Einzelheiten). Die Perfusion der Tiere wurde unter Narkose mit einer interkardialen Infusion mit 50ml BSA-Lösung (100ml: 9% NaCl-Lösung, 0,5g Rinderalbumin (BSA von Sigma-Aldrich)) und 2 int. Einheiten Heparin (Braun) durchgeführt. Das Gehirn wurde sofort entnommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **3.2 Laser-Doppler-Blutflussmethode (LDF)**

Die Laser-Doppler-Blutflussmethode ist eine nicht-invasive Methode um die kapillare Mikrozirkulation zu messen und aufzuzeichnen. Durch ein faseroptisches Kabel wird dazu ein gepulster 5mW Dioden-Laser (780 nm - auch Absorptionsspektrum des Hämoglobins) ins Gewebe gesandt. Dieser beleuchtet ein Volumen von etwa  $1\text{ mm}^3$ . Die dabei eingestrahlenen Photonen werden von bewegten (z.B.: Erythrozyten) und stationären (z.B.: Endothelzellen) Zelltypen unterschiedlich stark gestreut. Die von den fließenden Blutkomponenten gestreuten Photonen erfahren dabei eine Frequenzänderung, die sogenannte Dopplerverschiebung, während stationäre Zelltypen keine Dopplerverschiebung aufweisen. Die Frequenzänderung ist dabei abhängig von der

---

relativen Geschwindigkeit des Objektes zur Strahlungsquelle. Die reflektierten Photonen werden von der Faseroptik aufgefangen und an einen Photodetektor geleitet. Die detektierten Photonen werden in ein elektrisches Signal umgewandelt und geben nun zu jedem Zeitintervall eine mittlere Frequenzänderung an. Diese ist der mittleren Fließgeschwindigkeit aller Blutkomponenten im Messvolumen proportional. Das Produkt, auch Flux genannt, aus Blutvolumen-assoziiertem und kalkuliertem Anteil ergibt einen Wert der zum Blutfluss der Mikrozirkulation direkt proportional ist (Dirnagl & Pulsinelli, 1990). Der Laser-Doppler-Flux berechnet sich folglich aus dem Produkt dieser beiden Parameter:

$$\text{Flux} = \text{Volumen} \times \text{Geschwindigkeit}$$

Flux liefert keine absoluten Blutflusswerte, sondern wird als Wert ohne Einheiten ausgegeben, der einer relativen, prozentualen Blutflussveränderung vom Ausgangswert entspricht (Smits *et al.*, 1986). Durch den Abfall des Flux konnte die Gefäßokklusion der MCA kontrolliert werden und eine eintretende insuffiziente Okklusion konnte im Bedarfsfall umgehend korrigiert werden. Die LDF-Methode erlaubt zudem eine kontinuierliche Aufzeichnung über einen langen Zeitraum. Des Weiteren stellt sie eine nicht-destruktive Methode dar, die obendrein über einen großen Blutfluss-Bereich validiert ist.

### **3.3 Verhaltenstest - Neuroscore**

Jeweils vor Beginn der Operation und kurz vor der Perfusion wurde ein Verhaltenstest nach Garcia *et al.* (1995) durchgeführt.

Der Garcia-Test bewertet 6 sensomotorische Parameter:

1. Spontantaktivität (Exploration): Versuchstiere wurden dafür für 3 Minuten in eine fremde, umschlossene Umgebung gesetzt um das Explorationsverhalten zu bewerten.
2. Symmetrie der Bewegung (4 Gliedmaßen): Bei Anhebung gesunder Tiere am Schwanz spreizen diese ihre Gliedmaßen symmetrisch ab. Ein einseitiger Apoplex verursacht eine eingeschränkte Bewegung der kontralateralen Seite.
3. Symmetrie der vorderen Gliedmaßen: Anhebung der Tiere am Schwanz, so dass die beiden vorderen Gliedmaßen weiterhin Bodenkontakt hielten. Überprüfung der Vorwärtsbewegung.
4. Klettern: Tiere wurden auf ein Gitter mit 175%-iger Steigung gesetzt. Überprüfung der Fähigkeit sich an diesem Gitter fest zuhalten.

5. Reaktion auf Rumpfstimulation: Mit Hilfe eines spitzen Gegenstands wurde beidseitig die Rumpfgegend stimuliert und die Reaktion beider Seiten verglichen.
6. Vibrissenstimulation: Stimulation der Vibrissen mit einem stumpfen Gegenstand. Die Reaktion beider Seiten wurde verglichen.

Sämtliche Einzeltests können eine Punktzahl zwischen 0 und 3 Punkten erzielen. Die maximale Gesamtpunktzahl beträgt 18 und wurde von jedem Tier vor Versuchsbeginn erreicht. Die Bewertung erfolgte immer im Beisein einer zweiten unabhängigen Person, die keine Kenntnis über die Gruppenzugehörigkeit des Tieres hatte. Die Gesamtpunktzahl wurde zwischen den normothermen Gruppen als Vergleich herangezogen um den neurologischen Schaden (Outcome) des Tieres zu beurteilen. Im weiteren Verlauf der hypothermen Versuche stellte sich ein grundsätzliches Problem bei der Verwendung des Neuroscores heraus. Auf Grund der verminderten Motorik durch die 24-stündige Hypothermie kann es bei den Tests des Neuroscores (siehe Kapitel [3.3]) zu Verfälschungen kommen. Ohne eine Normalisierung der Körpertemperatur sind daher die Ergebnisse nicht zu vergleichen. Es war nicht möglich den Zeitpunkt bis zur Normalisierung der Körpertemperatur abzuwarten, da sich die biologischen Prozesse in den Versuchstieren sehr schnell ändern und den Vergleich zu normotherm behandelten Tieren ebenfalls verfälschen. Die Ergebnisse des Vergleiches der beiden Kontrollen (siehe [4.2.1]) sind daher nur bedingt aussagekräftig. Weitere Einzelheiten siehe im Protokoll unter [8.1].

### **3.4 Versuchsprotokolle der Tierversuche**

Folgende Versuchsreihen wurden mit Hilfe der Wildtyp Mäuse C57Bl/6 und verschiedenen Knock-Out Mutanten aus dem Plasminogen-Plasmin System durchgeführt (Tabelle [3]). Die verschiedenen Gruppengrößen sind Ursache der unterschiedlichen Verfügbarkeiten der Knock-Out Mutanten. Da sowohl Tiere in Kooperation als auch von Züchtern bezogen wurden und zudem Teils nur schwer verfügbar waren, divergieren die Gruppengrößen.

<b>Gruppe</b>	<b>Genotype</b>	<b>Behandlung</b>	<b>ges. Anzahl der Tiere</b>	<b>verstorbene Tiere</b>
C57Bl/6	WT	NT	16	0
C57Bl/6	WT	HT	17	1
Plg	KO	NT	7	0

Plg	KO	HT	11	0
tPA	KO	NT	20	2
tPA	KO	HT	8	1
uPA	KO	NT	16	2
uPA	KO	HT	8	1
PAI-1	KO	NT	17	6
PAI-1	KO	HT	7	2

*Tabelle 3: Übersicht der Tiergruppen. Plg: Plasminogen; tPA: tissue Plasminogen Activator; uPA: urokinase Plasminogen Activator; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor 1; WT: Wildtyp; KO: Knock-Out; NT: Normothermie, HT: Hypothermie.*

Die Ischämiephase, sowie die Reperfusionphase, war bei sämtlichen Gruppen identisch und betrug: 3 Stunden Ischämie gefolgt von einer 24 stündigen Reperfusionphase (I3/R24) entweder mit einer normothermen oder hypothermen Behandlung.

### **3.5 Histologie**

#### **3.5.1 Gewebeschnitte**

Zur Weiterverarbeitung für die histologischen und biochemischen Untersuchungen wurden Semidünnschnitte von 10µm Dicke auf einem Kryostaten (Frigocut 2800, Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland) bei -20°C angefertigt. Jeder 50. und 51. Schnitt, der sogenannte Volumetrieschnitt, diente zur späteren Infarkt volumenbestimmung. Im Durchschnitt fungierten 10-15 Schnitte zur Berechnung des Infarktvolumens. Die Region Bregma +2mm bis -5,2mm diente zu biochemischen Untersuchungen. Hierbei fielen insgesamt 240 Schnitte (60 Objektträger á 4 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.

#### **3.5.2 Nissl-Färbung**

Die Nissl-Färbung ist eine histologische Färbemethode, die vor allem zur Darstellung von Nervengewebe verwendet wird. Die histologischen Schnitte werden dazu mit dem Farbstoff Kresylviolett versetzt, wodurch es zur Demarkierung in den ischämischen Arealen kommt (Abbildung [11]). Protokoll siehe [8.3]. Ein Vorteil gegenüber der verbreiteten TTC-Färbung (Tri-phenyl-tetrazolium-chlorid) ist die mögliche immunhistochemische Aufarbeitung der Nissl-gefärbten Schnitte mit zusätzlichen Antikörpern (Kloss *et al.*, 2002).

### 3.5.3 Infarktvolumen (Volumetrie)

Das Infarktvolumen wurde nach Kloss *et al.* (2002) mit Hilfe einer mathematischen Volumeninterpolation bestimmt. Die zuvor Nissl gefärbten Volumetrieschnitte wurden mit einem Epson Perfection 1240U Scanner (Japan) digitalisiert und in das Bildverarbeitungs-/Auswertesystem Optimas Imaging Software v6.5 (Media Cybernetics, L.P., USA) importiert. Die Infarktareale, gut abgrenzbar durch die Nissl-Färbung, wurden manuell polygonisiert um den Flächeninhalt des Infarktareals zu bestimmen (Abbildung [11]).

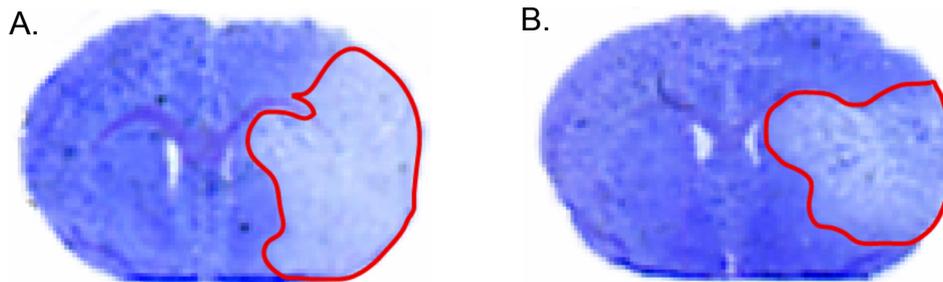


Abbildung 11: Abbildung zweier Nissl-gefärbter Gehirnschnitt mit Polygon-makiertem Infarktareal (rot). A. zeigt einen Schnitt eines mit Normothermie behandelten Kontrolltieres (C57Bl/6 WT HT) und B. eines mit Hypothermie behandelten Kontrolltieres (C57Bl/6 WT HT). Schnitte bei +0,3 Bregma.

Im Anschluss wurde die Berechnung des Partialvolumens zweier benachbarter Volumetrieschnitte näherungsweise mit nachfolgender Formel (Kegelschnitt) ermittelt:

$$\text{Partialvolumen} = \frac{\text{Distanz} \times (\text{SchnittA} + \sqrt{\text{SchnittA} \times \text{SchnittB}} + \text{SchnittB})}{3}$$

Gleichung 1: Formel zur Bestimmung des Partialvolumens. Distanz: Distanz zwischen SchnittA und SchnittB. SchnittA: Flächeninhalt des vorherigen Volumetrieschnittes. SchnittB: Flächeninhalt des nachfolgenden Volumetrieschnittes.

Da der Abstand zwischen den Volumetrieschnitten bekannt ist (jeder fünfzigste = 500µm) konnte das Gesamtinfarktvolumen durch eine einfache Summenformel ermittelt werden:

$$\text{Gesamtvolumen} = \sum_{i=1}^n (\text{Partialvolumen})$$

Gleichung 2: Berechnung des Gesamtvolumens über die Summe der einzelnen Partialvolumen.

---

### **3.6 Biochemie**

Die Aufbereitung der Hirnschnitte zur Proteinisolierung für Western Blots und Zymographien erfolgte nach Methoden von Burggraf *et al.* (2005a).

Dazu wurden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet, mit einem scharfen Skalpell in eine ipsilaterale (ischämische) und kontralaterale (nicht-ischämische) Hemisphäre unterteilt und vom Objektträger gelöst. Anders als bei Burggraf *et al.* (2005a) fand auf Grund des geringeren Gehirndurchmessers bei Mäusen keine weitere Unterteilung in Kortex- und Basalganglien-Region statt.

Identische Mengen an Gehirnmaterial wurde mit dem jeweiligen Homogenisierungspuffer (siehe Anhang [8.5]) versetzt und im Ultraschallbad (ca. 20-30 sek.) homogenisiert. Nach dem Abzentrifugieren (20 Minuten bei 14000 U/min) konnte der Überstand abpipettiert werden. Im Anschluss erfolgte die Beimischung des jeweiligen Auftragspuffers für Western Blot bzw. Zymographie (Details siehe [8.6]). Abschließend wurden die Proteine aus dem Homogenisat mittels SDS-Gel-Elektrophorese (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid) aufgetrennt.

Die Quantifizierung und Auswertung der digitalisierten Western Blots und Zymographien erfolgte mit dem Analyseprogramm Tina V2.08 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Deutschland). Tina V2.08 bestimmt die optische Dichte einzelner Banden inkl. Korrektur der Hintergrundaktivität und ermittelt so die Aktivität des Expressionsniveaus der ischämischen und nicht-ischämischen Hemisphäre. Um die Banden Blot-übergreifend zu vergleichen, wurde jeweils die kontralaterale Hemisphäre (nicht-ischämisch) als Kontrolle verwendet und der Quotient mit der ipsilateralen Hemisphäre (ischämisch) gebildet. Bei einem Quotienten von 1 ist das Expressionsniveau der ischämischen gleich der nicht-ischämischen Hemisphäre. Bei einem Quotienten  $>1$  verlagert sich das Expressionsniveau zu Gunsten der ischämischen Hemisphäre und bei einem Quotienten  $<1$  zu Gunsten der nicht-ischämischen Hemisphäre. Mit dieser Methode kann über die absolute exprimierte Proteinmenge keine Aussage getroffen werden, sondern nur ob eine Erhöhung oder Reduzierung der Proteinmenge im Vergleich zur nicht-ischämischen Hemisphäre stattfindet. Jedoch eliminiert die Quotientenbildung die Unterschiede einzelner Tiere gleicher Gruppe.

---

### 3.6.1 Western Blot - Nachweis Hämoglobin

Hämoglobin (64 kDa), integraler Bestandteil von Erythrozyten, kann bei einer unbeschädigten BHS nicht im umliegenden Nervengewebe nachgewiesen werden. Die Extravasation von Hämoglobin ins umliegende Nervengewebe, deutet auf eine Zerstörung bzw. Schwächung der Integrität des mikrovaskulären Systems hin (Hamann *et al.*, 1995 & 1996). Mit Hilfe eines Hämoglobin Western Blot kann die Extravasation von Hämoglobin schon von kleinsten intraparenchymen Blutungen nachgewiesen werden (Burggraf *et al.*, 2008).

Das Homogenisat des Gehirngewebes wurde mit Hilfe einer SDS-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde das Homogenisat im SDS-Puffer verdünnt und 5 Minuten auf 95°C denaturiert. Das Proteingemisch wurde nachfolgend mit Hilfe eines 7,5% Polyacrylamid-Gels aufgetrennt (2h: 70V bis maximal 140V). Der Transfer der Proteine auf eine mit Methanol-getränkte Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran von Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) erfolgte mit Hilfe der Semidry Blot Methode. Die dazu notwendige Transferpufferlösung bestand aus 10 mmol/l 3-(Cyclohexyl-Amino)-1-Propan-Sulfansäure (pH 11) mit 10% Methanol versetzt. Die Membran wurde mit Ponceau S gefärbt zur Sicherstellung des Transfers aller Proteine. Im Anschluss wurde die Membran in TBS gewaschen und der Blot bei Raumtemperatur 30 min. in 3% BSA/Tris-gepufferter NaCl-Lösung mit 0,2% Tween20 und 1,5% Milchpulver blockiert.

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C mit dem polyklonalen Anti-Kaninchen-Hämoglobin-Antikörper (Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:2000. Nach dreimaligen 10 minütigem Waschen in Tris-gepufferter NaCl-Lösung wurde als Sekundär-Antikörper ein Anti-Kaninchen (GE Healthcare, München, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000 aufgetragen. Nach zweimaligem 10 minütigem Waschen mit TBST und weiterem einmaligem 10 minütigem Waschen mit TBS wurde der Western Blot mit einem ECL Entwicklungskit (Amersham plc, Buckinghamshire, UK) entwickelt. Protokoll siehe Anhang [8.4]. Ein repräsentatives Beispiel eines Hämoglobin Western Blots ist unter Abbildung [12] dargestellt.

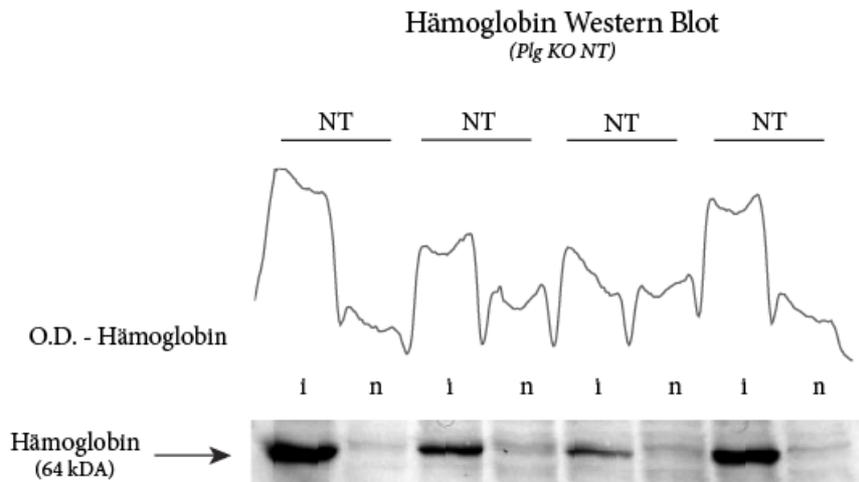


Abbildung 12: Beispiel eines Hämoglobin Western Blots inklusive graphischer Auswertung der optischen Dichte (O.D.) für die Gruppe Plg KO NT. NT: Normothermie; HT: Hypothermie; i: ischämische Hemisphäre; n: nicht-ischämische Hemisphäre.

### 3.6.2 Western Blot - Nachweis von PAI-1

PAI-1 (48 kDa) kann im Gehirngewebe mit einem PAI-1 Western Blot nachgewiesen werden. Der Western Blot ist vom Ablauf identisch wie unter [3.6.1], jedoch wurde als Primär-Antikörper Anti-PAI-1-Antikörper (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA; 1:1000) verwendet und als sekundärer Antikörper ein Anti-Kaninchen (GE Healthcare, München, Deutschland; 1:1000). Protokoll siehe im Anhang [8.4]. Ein Beispiel eines PAI-1 Western Blots ist unter Abbildung [13] dargestellt.

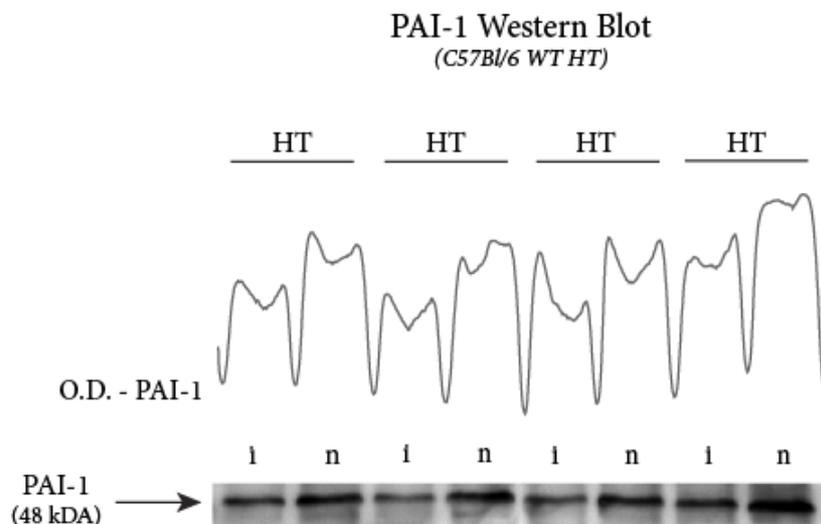


Abbildung 13: Beispiel eines PAI-1 Western Blots inklusive graphischer Auswertung der optischen Dichte (O.D.) für die Gruppe C57Bl/6 WT HT. NT: Normothermie; HT: Hypothermie; i: ischämische Hemisphäre; n: nicht-ischämische Hemisphäre.

### 3.6.3 Western Blot - Nachweis von MMP-3 (Stromelysin-1)

Mit einem MMP-3 Western Blot wurde der Nachweis für aktiviertes MMP-3 (45 kDa) gezeigt. Die Methode ist identisch zu [3.6.1]. Jedoch wurde dabei als primär Antikörper Anti-MMP-3 (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet und als Sekundär-Antikörper ein Anti-Kaninchen (GE Healthcare, München, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000. Protokoll siehe Anhang [8.4]. Ein Muster eines MMP-3 Western Blots ist unter Abbildung [14] dargestellt.

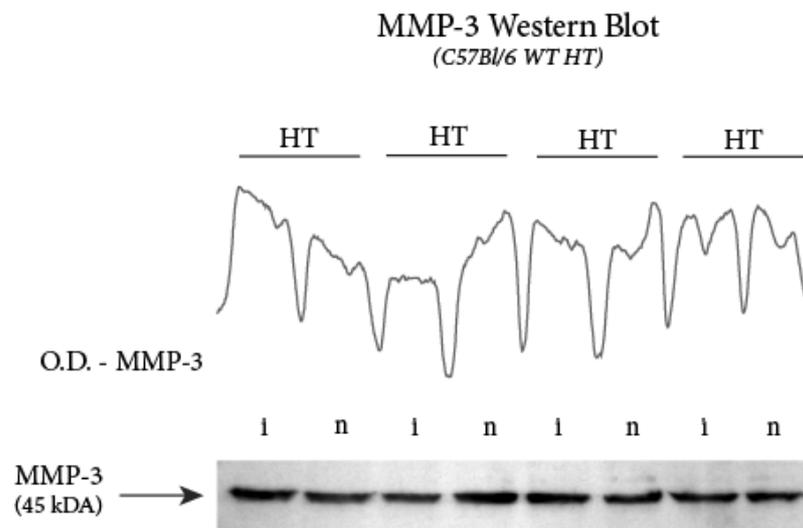


Abbildung 14: Beispiel eines MMP-3 Western Blots inklusive graphischer Auswertung der optischen Dichte (O.D.) für die Gruppe C57Bl/6 WT HT. NT: Normothermie; HT: Hypothermie; i: ischämische Hemisphäre; n: nicht-ischämische Hemisphäre.

### 3.6.4 Western Blot - Nachweis von EMMPRIN (CD147)

EMMPRIN wurde mittels eines Western Blots quantifiziert. Als Primär-Antikörper wurde ein EMMPRIN-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet und als Sekundär-Antikörper ein Anti-Ziege-Antikörper (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:1000. Im Anschluss wurde Vectastatin ABC Reagenz (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur hinzugefügt. Protokoll siehe Anhang [8.4]. Ein Muster eines MMP-3 Western Blots ist unter Abbildung [15] dargestellt.

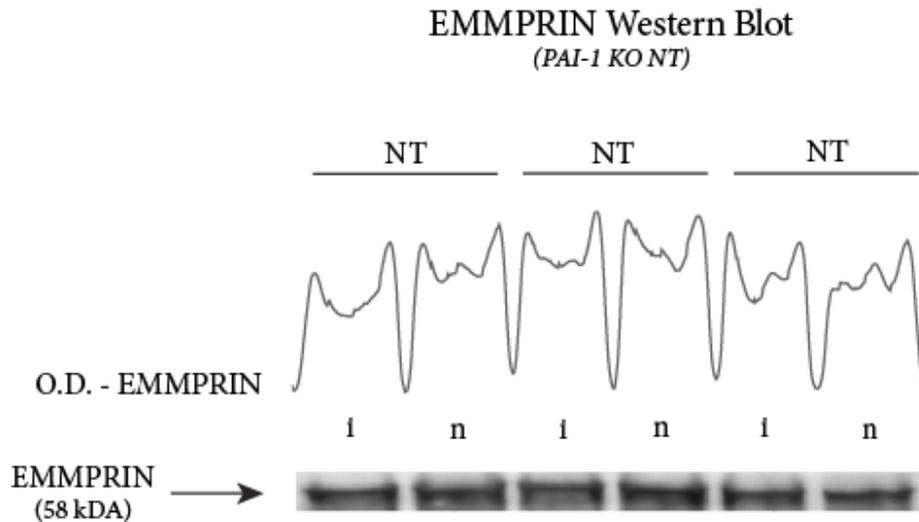


Abbildung 15: Beispiel eines EMMPRIN Western Blots inklusive graphischer Auswertung der optischen Dichte (O.D.) für die Gruppe PAI-1 KO NT. NT: Normthermie; HT: Hypothermie; i: ischämische Hemisphäre; n: nicht-ischämische Hemisphäre.

### 3.6.5 Plasminogen-Kasein Zymographie - Nachweis von tPA und uPA

Als Nachweis der Enzymaktivität von tPA (64 kDa) und uPA (46 kDa) diente die Kasein-abhängige Plasminogen Zymographie. Die beiden Serinproteasen sind gewebespezifische Plasminogenaktivatoren und wandeln Plasminogen in das proteolytisch aktive Protein Plasmin um. Die proteolytische Eigenschaft von Plasmin führt zum Abbau des Kaseins der Gelmatrix und zeichnet sich nach Färbung des gesamten Gels durch hellere Zonen ab. Diese Zonen zeigen an, an welchen Stellen tPA und uPA zur Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin führten.

Das Hirnmaterial wird in 15µl Homogenisationspuffer aus 0,1 M Tris/HCl (pH 8,1) und 0,2% Triton X-100 im Ultraschallbad gelöst und bei 14000 U/m zentrifugiert. Die Überstände wurden mit dem Autragspuffer (5% SDS, 2% Glycerin, Bromphenolblau) in die Gel-Taschen eines 7,5% SDS-Gel pipettiert. Die SDS-Gele wurden mit Kasein (5mg/l; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und Plasminogen (0,01 U/ml bzw. 0,07 Ig/ml; ebenfalls von Sigma, Taufkirchen, Deutschland) kopolymerisiert (Heussen & Dowdle, 1980). An dem Gel wurde eine Spannung von 70V angelegt. Im Anschluss wurde das Gel in 2% Triton X-100 gewaschen (1h; RT) und in einer 0,1 M Tris/HCl-Lösung inkubiert (über Nacht bei 37°C). Für die Auswertung wurden die Gele mit Coomassie eingefärbt um die Lysezone sichtbar zu machen. Die Gele wurden fixiert (10% Essigsäure; 50% Methanol; 30 Minuten), gefärbt (0,4% Brillant Blau R; 35% Ethanol; 10% Essigsäure; 1h) und abschließend entfärbt (35% Ethanol; 10% Essigsäure). Ein repräsentatives Beispiel einer Plasminogen-Kasein Zymographie ist unter Abbildung [16] dargestellt

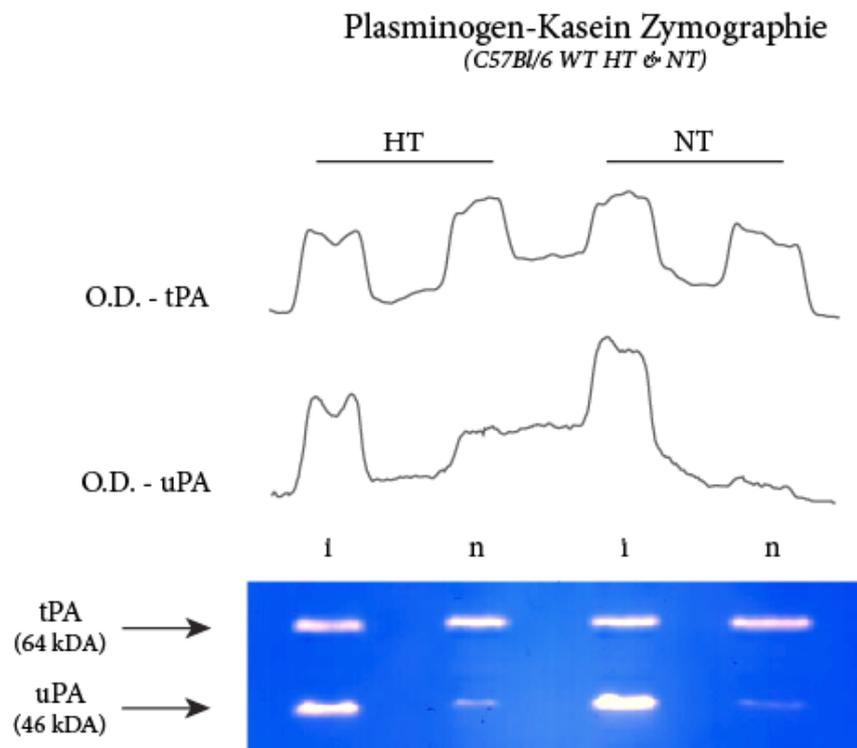


Abbildung 16: Beispiel einer Plasminogen-Kasein Zymographie inklusive graphischer Auswertung der optischen Dichte (O.D.) für die Gruppen C57Bl/6 WT HT und C57Bl/6 WT NT. NT: Normothermie; HT: Hypothermie; i: ischämische Hemisphäre; n: nicht-ischämische Hemisphäre.

### 3.6.6 Gelatine Zymographie - Nachweis von MMP-9 und MMP-2

Mit Hilfe der Gelatine-Zymographie konnte der selektive Nachweis von aktivierten MMP-9 (86 kDa) und MMP-2 (62 kDa) nach einer Ischämie erbracht werden.

Als Basis diente ein nicht-reduzierendes 7,5% SDS-Gel (ohne  $\beta$ -Mecaptoethanol) mit einem 0,5% Gelatineanteil (Sigma-Aldrich). Die Gelatine diente als Substrat für MMP-9 und MMP-2, die durch das SDS im Gel aktiviert werden und nach Färbung des gesamten Gels als Lysezonen bei aktivierten Gelatinasen sichtbar werden. Die Enzyme wurden mit 2,5% Triton X-100 für 1h bei RT renaturiert und die Verdauung anschließend bei 37°C in Brutschrank für 24h in einer Inkubationslösung (5mM  $\text{CaCl}_2$ , 50mM Tris/HCl (pH 7,4), 200mM NaCl, 0,2% Brij) inkubiert. Die Verdauung durch die Enzyme im Gel wurde mit Hilfe der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die nicht-reduzierende Gelatine-Zymographie entspricht der Methode von Burggraf *et al.* (2005b). Protokoll siehe im Anhang [8.4]. Ein Muster einer Gelatine Zymographie ist unter Abbildung [17] dargestellt.

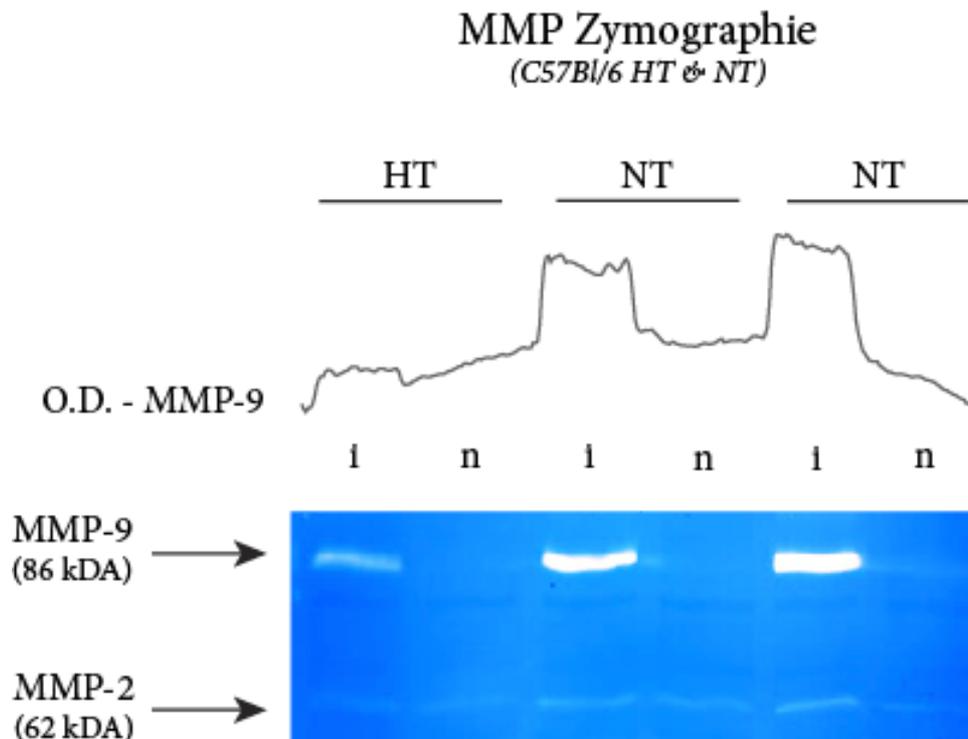


Abbildung 17: Beispiel einer Gelatine Zymographie für die Gruppen C57Bl/6 WT HT und C57Bl/6 WT NT. NT: Normothermie; HT: Hypothermie; i: ischämische Hemisphäre; n: nicht-ischämische Hemisphäre.

### 3.6.7 Reverse Gelatine-Zymographie - Nachweis von TIMP-1 und TIMP-2

Als Nachweis der endogenen MMP-Inhibitoren diente die reverse Gelatine-Zymographie. Die reverse Gelatine-Zymographie gestattet eine selektive und quantitative Bestimmung dieser beiden Inhibitoren (Heussen & Dowdle, 1980; Oliver *et al.*, 1997; Burggraf *et al.*, 2005b).

Der grundsätzliche Ablauf ist ähnlich zur Kasein-abhängigen Plasminogen Zymographie unter [3.6.5], jedoch mit einem modifizierten SDS-Gel. Das SDS-Gel wurde mit 0,5% Gelatine und mit aktivierten MMPs (aus der Fibroblasten-Zelllinie HT1080) versetzt. MMP-Inhibitoren verhindern die Proteolyse des Substrats durch die MMPs, was sich im Ausbleiben von Lysezonen im Gel darstellt. Protokoll siehe Anhang [8.4]. Ein Muster einer Gelatine Zymographie ist unter Abbildung [18] dargestellt.

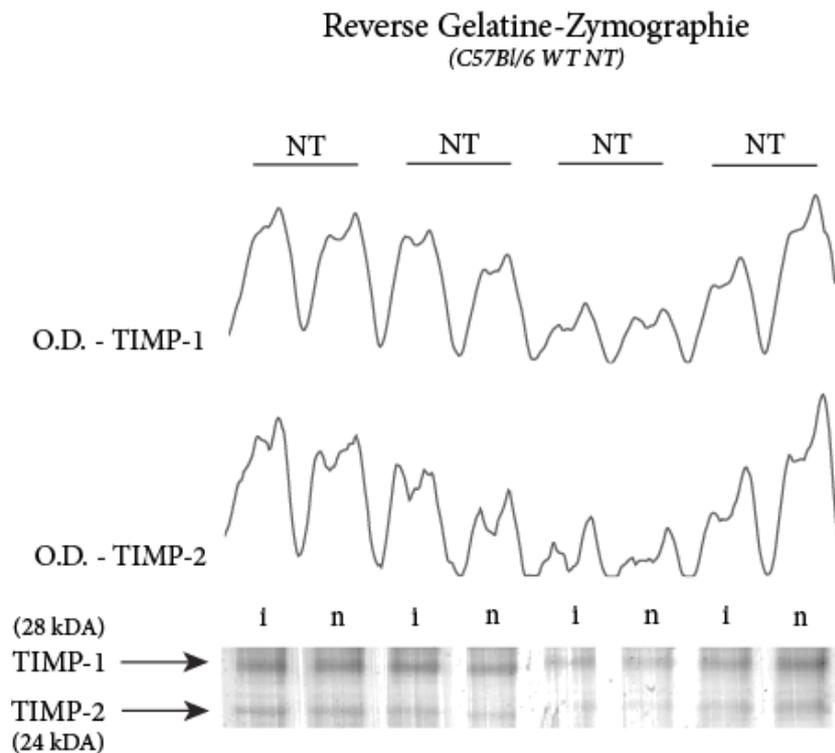


Abbildung 18: Beispiel einer reversen Gelatine-Zymographie inklusive graphischer Auswertung der optischen Dichte (O.D.) für die Gruppe C57Bl/6 WT NT. NT: Normothermie; HT: Hypothermie; i: ischämische Hemisphäre; n: nicht-ischämische Hemisphäre.

### 3.7 Statistik

Die in der Arbeit erhobenen Daten wurden zunächst einer grundlegenden deskriptiver Statistik unterzogen, um die Daten zu charakterisieren und die Voraussetzungen für die weitere Statistik zu schaffen. Sämtliche Daten entsprechen unabhängigen Stichproben. Metrische Daten, die sowohl eine Normalverteilung als auch eine Homogenität der Varianzen aufwiesen, wurden einer parametrischen Analyse unterworfen (z.B. Students t-Test oder ANOVA). Lag eine Nicht-Normalverteilung und Varianzinhomogenität oder ordinale Daten vor, so erfolgte eine nicht-parametrische Analyse (Mann-Whitney u-Test) der Daten.

Sämtliche Statistiken wurden mit SPSS v14 ([www.spss.com](http://www.spss.com)) erstellt. Aus den Quotienten einer Gruppe wurde der Mittelwert gebildet. Zusätzlich zum Mittelwert wurde der Standardfehler berechnet und als Fehlerbalken in den Diagrammen abgebildet. Als Signifikanzgrenze diente eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ , als hoch signifikant ein  $p < 0,01$  und als sehr hoch signifikant ein  $p < 0,001$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Hirntemperatur unter hypothermer Behandlung

Die Hirntemperatur (°C) der Versuchstiere unter normothermer und hypothermer Behandlung über die Versuchsdauer von 24 Stunden ist in Abbildung [19] dargestellt. Der Mittelwert sämtlicher Messungen über die 24h Reperfusionphase lag in der Normothermie bei  $36,1 \pm 0,2^\circ\text{C}$  und in der Hypothermie bei  $32,6 \pm 0,4^\circ\text{C}$ . Der rasche Temperaturabfall zu Beginn der Aufzeichnung wird durch die Nachwirkung der Operation bzw. der Narkose verursacht (Barber *et al.*, 2004). Im weiteren Verlauf pendelte sich die Hirntemperatur bei den hypotherm-behandelten Tieren konstant zwischen  $32^\circ\text{C}$  und  $34^\circ\text{C}$  ein. Die Unterschiede der Temperaturverläufe der Versuchstiere mit normothermer oder hypothermer Behandlung sind hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Die Methode zur Kühlung des Mäusegehirns funktionierte somit wirkungsvoll.

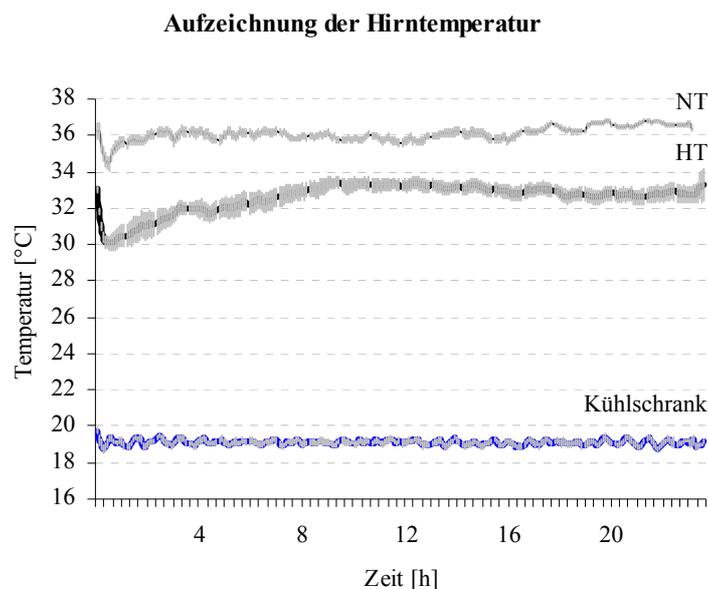


Abbildung 19: Aufzeichnung der mittleren Hirntemperatur (°C) unter normothermer (NT) und hypothermer (HT) Behandlung über 24 Stunden (ANOVA:  $p < 0,001$ ). NT:  $n = 5$ ; HT:  $n = 13$ ; Kühlschrank:  $n = 13$ ; jeweils inkl. Standardfehler (grau hinterlegt).

### 4.2 Einfluss der Hypothermie auf die Folgen einer fokalen zerebralen Ischämie mit Reperfusion

Die kompletten numerischen Ergebnisse und die vollständigen statistischen Werte sind im Anhang [9] aufgelistet.

#### 4.2.1 Neurologische und mikrovaskuläre Parameter

Durch die Hypothermiebehandlung, während der gesamten Reperfusionzeit (24h), reduzierte sich das Infarktvolume in der Maus signifikant (NT:  $59,0 \pm 3,1\text{mm}^3$  versus HT:  $43,4 \pm 3,4\text{mm}^3$ ;  $p=0,002$ ) (Abb. [20] A+B). Eng damit verbunden war ein signifikanter

Anstieg des neurologischen Outcomes, dem Garcia *et al.* Neuroscore (1995) (NT:  $13,6 \pm 0,7 \text{ mm}^3$  versus HT:  $14,8 \pm 0,4 \text{ mm}^3$ ;  $p < 0,05$ ). Dennoch lag der Neuroscore weiterhin signifikant unter dem Ausgangswert von 18 Punkten bei schein-operierten Tieren (Abb. [20] C). Durch die Ischämie/Reperfusion trat eine massive Schädigung der Mikrogefäße auf, welche sich in einer Extravasation von Hämoglobin in das Gehirngewebe manifestierte. Durch Hypothermie konnte diese Extravasation signifikant reduziert werden ( $p = 0,05$ ) (Abb. [20] D).

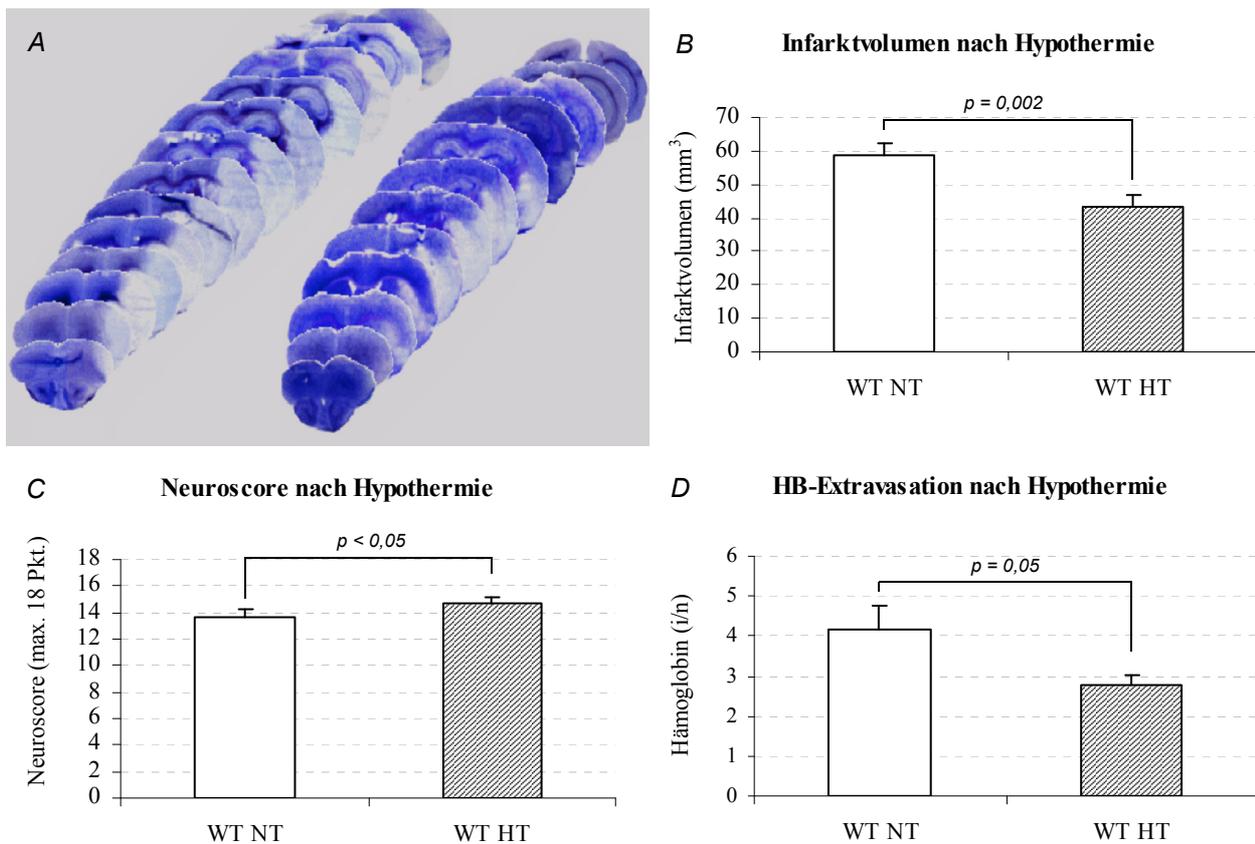


Abbildung 20: A: Darstellung einer kompletten Nissl-gefärbten Volumetrie-Serie sowohl für ein exemplarisches normotherm-behandeltes (links) als auch für ein hypotherm-behandeltes Tier (rechts). B: Infarktvolumina; C: Neuroscore; D: Quantifizierung der Hämoglobin Western Blots. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre (i/n) als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

#### 4.2.2 Einfluß der Hypothermie auf das Plasminogen-Plasmin System

Eine fokale Ischämie mit Reperfusion (I3R24) hatte keine Auswirkung auf die Konzentration von tPA im Gehirngewebe, weder unter Normothermie noch unter Hypothermie. Im Gegensatz dazu stieg durch ischämische Bedingungen die Protease uPA um das  $11,25 \pm 2,2$ -Fache an. Die hypotherme Behandlung konnte den Anstieg des uPAs um signifikante 59% senken (HT:  $4,6 \pm 1,1$ -Fache;  $p = 0,008$ ) (Abbildung [21] A). Parallel dazu sank die Konzentration des Inhibitors, der Plasminogenaktivator PAI-1, um 65% und somit auf das

Vergleichsniveau der nicht-ischämischen Hemisphäre (NT:  $1,5 \pm 0,2$ ; HT:  $0,9 \pm 0,1$ ;  $p = 0,004$ ) (Abb. [21] B).

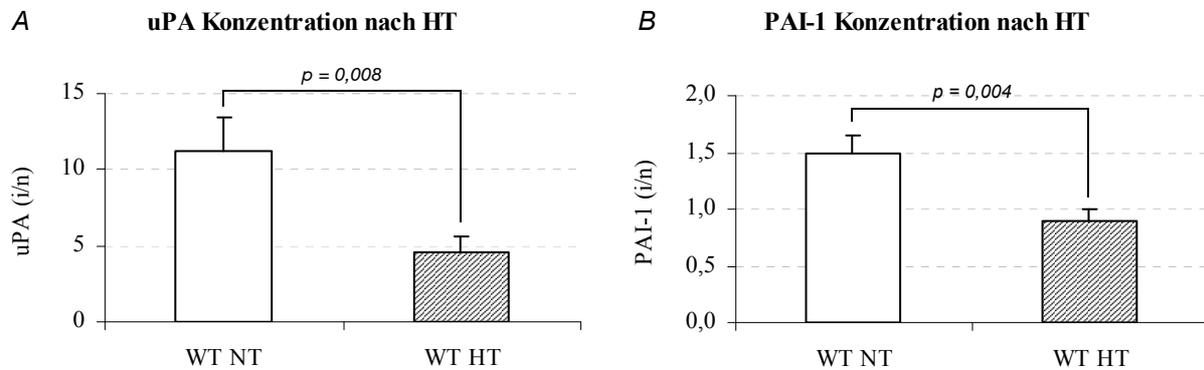


Abbildung 21: Quantifizierung der optischen Dichte der uPA- (Kasein-abhängige Plasminogen Zymographie) (A) und PAI-1-(Western Blot) (B) Banden: gemessen wurden jeweils Tiere, die unter normothermen und hypothermen Bedingungen behandelt wurden. Dargestellt ist das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre (i/n) als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

#### 4.2.3 Einfluss der Hypothermie auf das MMP-System

Nach Ischämie/Reperfusion war ein signifikanter Anstieg der EZM-degradierenden Matrixmetalloproteasen MMP-9, MMP-2 und MMP-3 in der Maus zu beobachten (MMP-9:  $12,58 \pm 4,24$ ; MMP-2:  $2,5 \pm 0,5$ -Fach; MMP-3:  $1,39 \pm 0,1$ ; alle  $p < 0,05$ ). Hypothermie hatte einen modulierenden Einfluss auf MMP-9 und MMP-2, allerdings keinen auf MMP-3. Die Konzentration beider Gelatinasen, MMP-9 und MMP-2, sank nach der 24-stündigen Hypothermiebehandlung (MMP-9:  $3,75 \pm 0,5$ -Fache;  $p=0,05$ ; MMP-2:  $1,5 \pm 0,2$ -Fache  $p=0,09$ ).

EMMPRIN wurde als Inducer von MMPs, im Besonderen von MMP-2 und MMP-3, bekannt (Biswas *et al.*, 1995; Schuster *et al.*, 1996). Die Konzentration von EMMPRIN stieg im ischämischen Mäusegehirn signifikant an ( $1,8 \pm 0,3$  versus  $1,0 \pm 0,2$  in scheinoperierten Tieren;  $p < 0,05$ ). Die Hypothermiebehandlung, während der Reperfusionsphase, bewirkte eine Reduzierung der Inducerkonzentration ( $1,25 \pm 0,1$ ;  $p = 0,049$  versus Normothermie).

Die endogenen MMP-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 wurden im Mäusegehirn nach I3/R24 erhöht nachgewiesen (TIMP-1:  $1,2 \pm 0,14$ ; TIMP-2:  $1,3 \pm 0,1$ ). Hypothermie hatte keinen signifikanten Einfluss auf diese erhöhten Konzentrationen.

Die Ergebnisse von MMP-9, -2, TIMP-1, -2 und EMMPRIN sind in Abbildung [22] dargestellt.

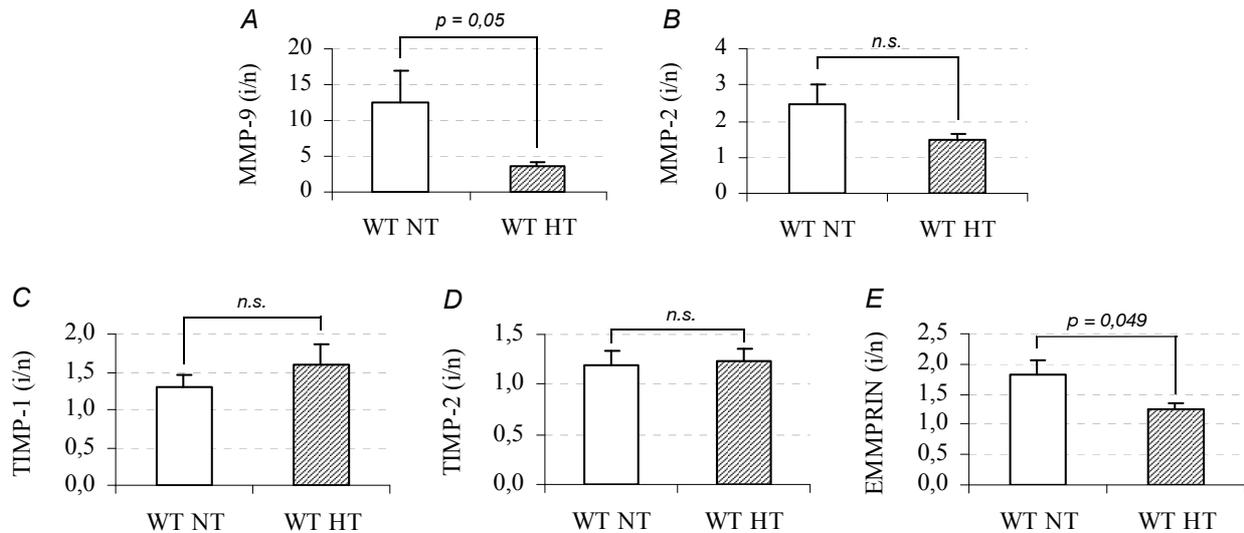


Abbildung 22: Quantifizierung der optischen Dichte der MMP-9- (A) und MMP-2- (B) Lysezonen von Gelatine-Zymographien und der TIMP-1- (C) und TIMP-2- (D) Banden von reversen Zymographien und EMMPRIN-Western Blot Banden (E). Gemessen wurden jeweils Tiere, die unter normothermen und hypothermen Bedingungen behandelt wurden. Dargestellt ist das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre (i/n) als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

### Zusammenfassung Vergleich NT gegen HT Behandlung in der Wildtypmaus

Hypothermie bewirkte eine deutliche Reduzierung des ischämischen Schadens und eine Protektion der Mikrogefäße, was sich in einem reduziertem Infarkt volumen, einem besseren neurologischem Outcome und einer stark verbesserten Extravasation von Hämoglobin zeigte. Proteasen, die für die Degradation der Mikrogefäße verantwortlich sein könnten, wie uPA, MMP-9 und MMP-2 wurden ebenfalls durch die Hypothermie in ihrer Expression reduziert. Ein geringerer Einfluss wurde auf andere Proteasen der beteiligten proteolytischen Systeme beobachtet: tPA und MMP-3.

Hypothermie wirkte ebenfalls unterschiedlich auf die Inhibitoren des Plasminogen-Plasmin- und des MMP-Systems: PAI-1 wurde in geringerer Menge nach Hypothermie nachgewiesen, während die MMP-Inhibitoren unbeeinflusst blieben.

### 4.3 Einfluss von Knock-Out Defekten im Plasminogen-Plasmin-System

Die nachfolgenden Ergebnisse zeigen die histologischen und biochemischen Veränderungen in gendefizienten Mäusen nach transienter zerebraler Ischämie unter normothermen und hypothermen Bedingungen. Es wurden Knock-Out (KO;  $^{-/-}$ ) Mäuse aus dem Plasminogen-Plasmin System untersucht (Plg-, tPA-, uPA- & PAI-1-KO). Sämtliche Einzelergebnisse finden sich im Anhang [9].

### 4.3.1 Neurologische und mikrovaskuläre Auswirkungen der Gendeletion

Das Infarktvolumen sank signifikant in den folgenden gendefizienten Mäusen: Plg<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup> und uPA<sup>-/-</sup>. Dabei handelt es sich um die beiden Proteasen tPA und uPA sowie dem Precursor der aktiven Protease Plasmin (Plasminogen). Eine signifikante Verbesserung der mikrovaskulären Extravasation (Reduzierung um 50%) von Hämoglobin war nach Gendeletion dieser drei Proteine zu beobachten. Wird der Inhibitor PAI-1 ausgeschaltet, so hatte dies eine Erhöhung des Infarktvolumens (nicht sig.) zur Folge, aber keine Auswirkung auf die mikrovaskulären Extravasation.

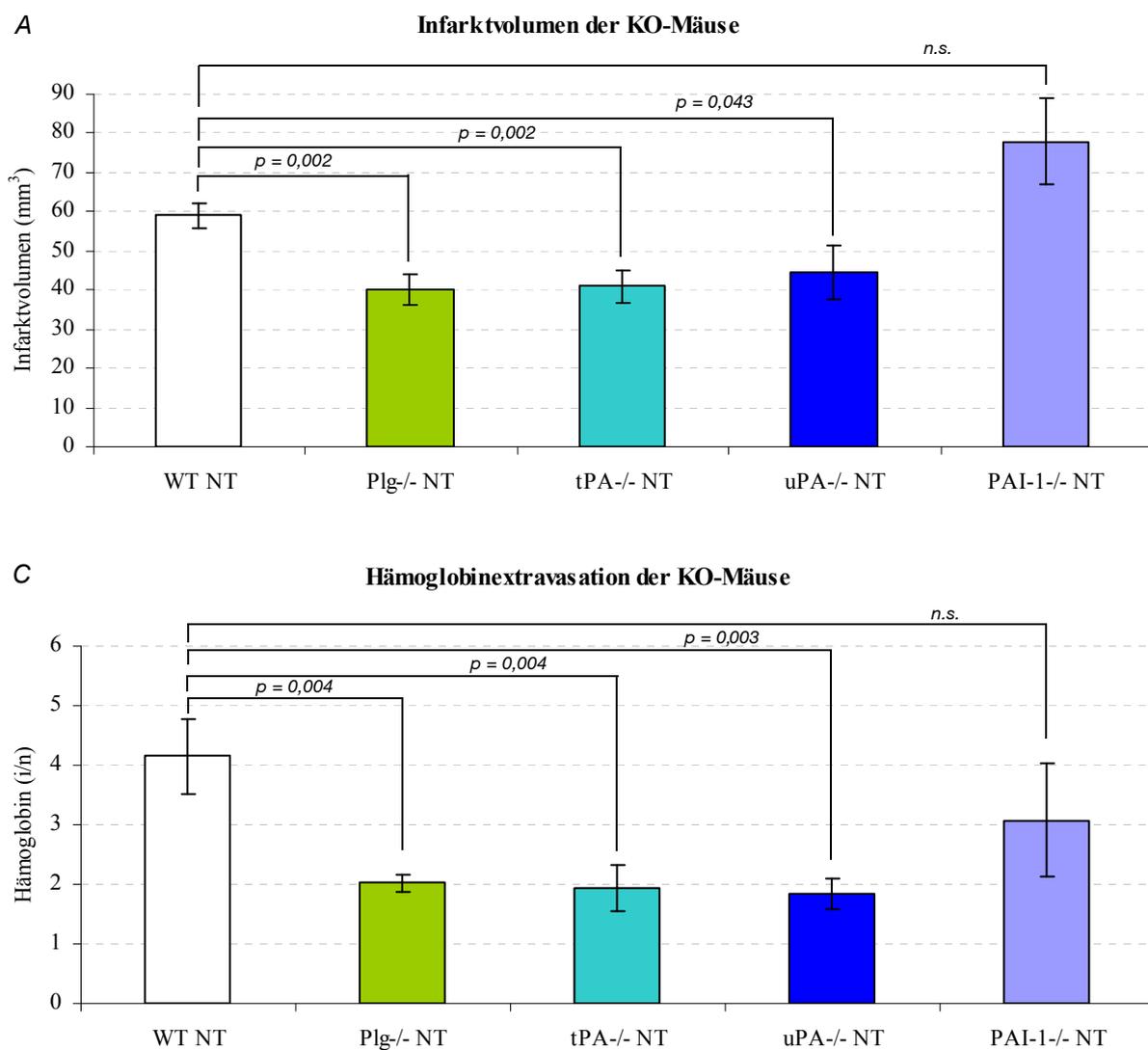


Abbildung 23: (A) Darstellung der Infarktvolumina, (B) Quantifizierung der Hämoglobin Western Blots. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre (i/n) als Mittelwert ± Standardfehler.

### 4.3.2 Neurologische und mikrovaskuläre Auswirkungen der Hypothermiebehandlung nach Gendeletion im PPS

Durch Hypothermie wird das Infarktverhalten insbesondere in den  $uPA^{-/-}$  und  $PAI-1^{-/-}$  Tieren reduziert. Signifikant tritt dieser Effekt vor allem bei der  $uPA^{-/-}$  auf (NT:  $44,4 \pm 6,9$  vs. HT:  $27,6 \pm 3,1$ ;  $p = 0,044$ ). Keinen signifikanten Effekt hat die Hypothermie auf das Infarktverhalten in den  $Plg^{-/-}$  und  $tPA^{-/-}$ .

Der protektive Effekt der Hypothermie auf das mikrovaskuläre System, resultierend in einer reduzierten Hämoglobinextravasation, konnte ebenfalls in der  $Plg^{-/-}$  und in der  $PAI-1^{-/-}$  gemessen werden. Im Gegensatz dazu hat die Hypothermie in der  $tPA^{-/-}$  eine verdoppelte Hämoglobinextravasation zur Folge (NT:  $1,94 \pm 0,4$  vs.  $4,3 \pm 0,8$ ;  $p = 0,007$ ). Eine graphische Zusammenfassung der Ergebnisse der Infarktmetrie und der Quantifizierung der Hämoglobin Western Blots ist in Abb. [24] dargestellt.

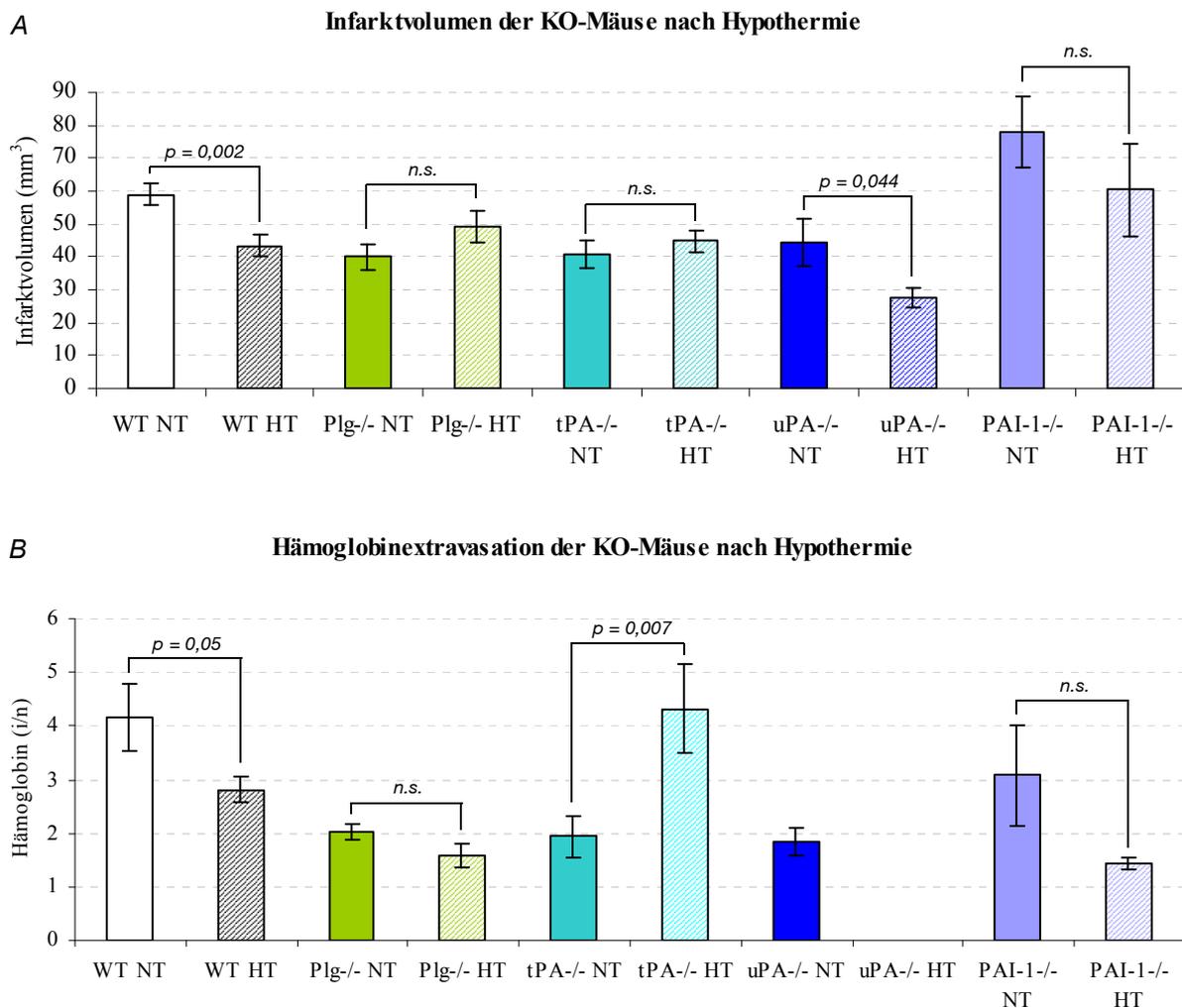


Abbildung 24: (A) Darstellung der Infarktverhaltens und (B) Quantifizierung der Hämoglobin Western Blots. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre (i/n) als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler in normotherm- und hypotherm-behandelten Tieren. Keine Daten lagen für  $uPA^{-/-}$  HT vor.

### 4.3.3 Auswirkungen der Gendeletion auf weitere Enzyme des PPS

In den gendefizienten Tieren, tPA<sup>-/-</sup> und uPA<sup>-/-</sup>, konnten unterschiedliche Auswirkungen auf den jeweils anderen Plasminaktivator festgestellt werden. Fehlte tPA so war ein Absinken des uPA auf 50% festzustellen (p = 0,08) (Abb. [25] A). Umgekehrt, bei der uPA<sup>-/-</sup>, blieb das tPA Aktivitätsniveau im ischämischen Gewebe unverändert gegenüber der nicht-ischämischen Hemisphäre (Abb. [25] B). Fehlt das Proenzym Plasminogen, so hatte dies signifikante Auswirkungen auf beide Plasminogenaktivatoren. Der enorme Anstieg des uPA nach Ischämie wurde signifikant um 50% reduziert (WT NT: 11,25 ± 2,2 vs. Plg<sup>-/-</sup> NT: 6,2 ± 0,9; p = 0,04). Ebenso bewirkte die Deletion des PAI-1 einen erheblichen Abfall des ischämischen Anstiegs der uPA Konzentration (WT NT vs. PAI-1<sup>-/-</sup>: p = 0,002) (Abb. [25] C). Ein Einfluss auf tPA war aber nicht festzustellen.

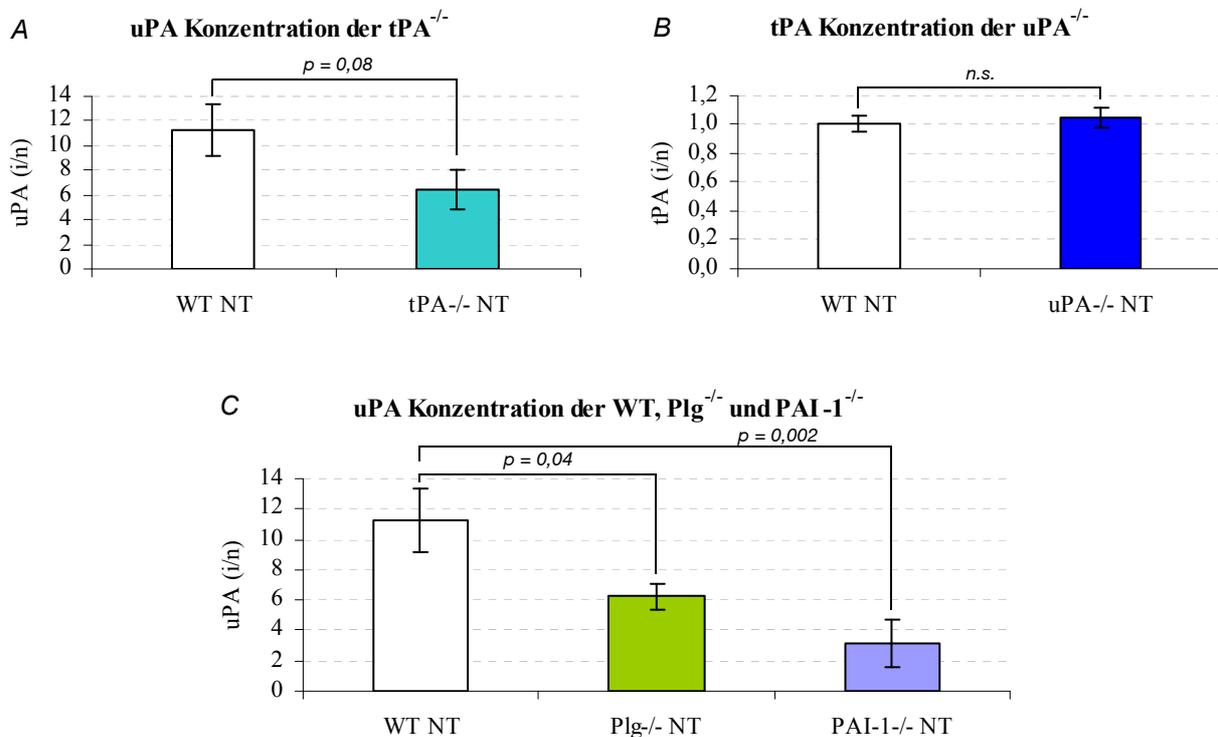


Abbildung 25: Quantifizierung der optischen Dichte der uPA-Banden in der tPA<sup>-/-</sup> (A), der tPA-Banden in der uPA<sup>-/-</sup> (B) sowie der uPA-Banden der Plg<sup>-/-</sup> und PAI-1<sup>-/-</sup> (C) von Plasminogen-Zymographien. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre (i/n) als Mittelwert ± Standardfehler.

Bei der Quantifizierung der PAI-1 Western Blots nach Gendeletion der beiden PAs, konnte festgestellt werden, dass ein Fehlen des tPAs zu einem ausgeglichenem Verhältnis der PAI-1 Konzentration in der ischämischen und nicht-ischämischen Hemisphäre führte (p = 0,07). Derselbe Effekt konnte in der Plg<sup>-/-</sup> Maus beobachtet werden. Bei uPA Deletion war

keine Änderung der PAI-1 Konzentration nach Ischämie gegenüber dem Wildtyp, also weiterhin ein Anstieg um 50% gegenüber der Kontrollhemisphäre, zu beobachten (Abbildung [26]).

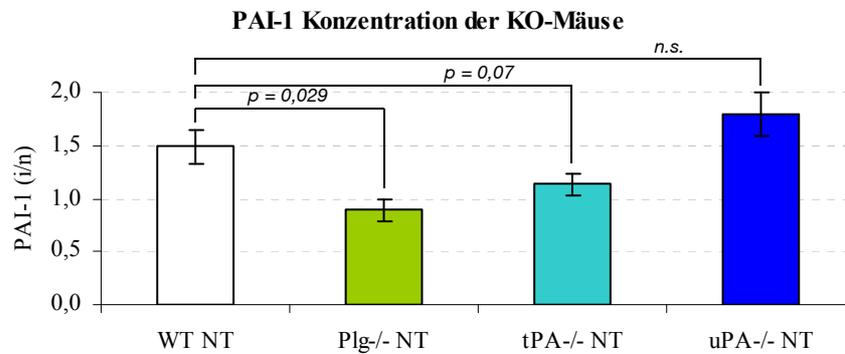
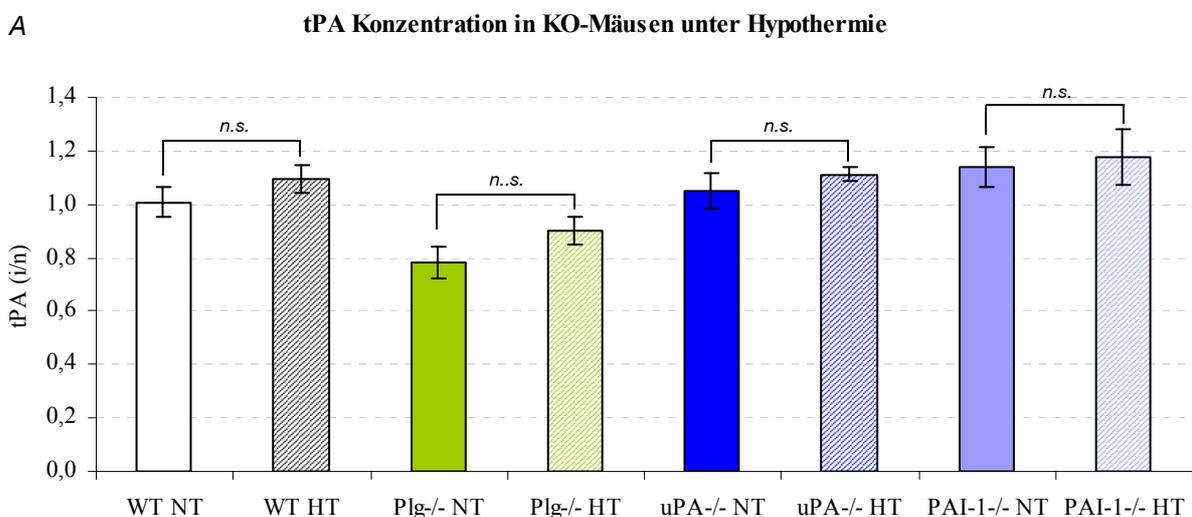


Abbildung 26: Quantifizierung der optischen Dichte der PAI-1-Banden von Western Blots der Plg<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup> und uPA<sup>-/-</sup> Tieren. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre (i/n) als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

#### 4.3.4 Auswirkung der Hypothermiebehandlung nach Gendelektion im PPS auf weitere Enzyme des Plasminogen-Plasmin Systems

Die Quantifizierung der Lysezonen der beiden PA in der Kasein-abhängigen Zymographien (tPA und uPA) ergab, dass eine Hypothermiebehandlung keinerlei Einfluss auf die tPA Konzentration in allen in dieser Arbeit verwendeten Genmutanten hatte (Abb. [27] A).

Bereits die Deletion, sowohl von Plasminogen als auch von tPA, bewirkte eine signifikante Reduzierung der uPA Protease (siehe oben). Eine weitere hypotherme Wirkung auf uPA war in diesen gendefizienten Tieren nicht mehr zu beobachten war (Abb. [27] B)



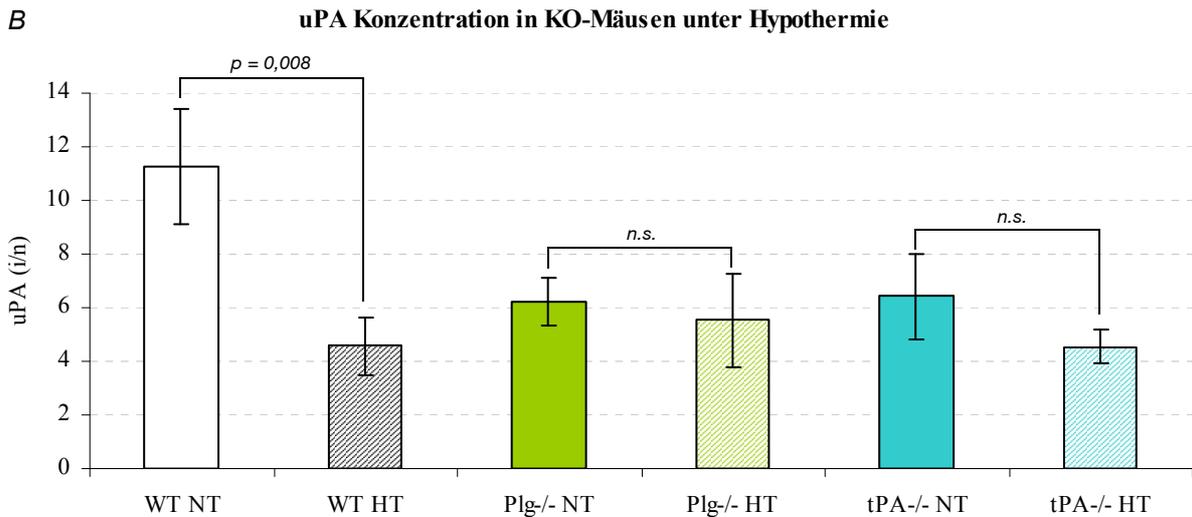


Abbildung 27: Quantifizierung der optischen Dichte der tPA- (A) und uPA- (B) Banden von Plasminogen-Zymographien. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre (i/n) als Mittelwert ± Standardfehler in normotherm- und hypotherm-behandelten Tieren.

Die hypotherme Behandlung bewirkte eine Reduktion des PAI-1 im Wildtyp. Der gleiche Effekt konnte bei Mäusen beobachtet werden, denen einer der beiden Plasminogenaktivatoren fehlte. Bei der uPA<sup>-/-</sup> war das Absinken der PAI-1 Konzentration im ischämischen Gewebe nach Hypothermie hoch signifikant (p = 0,001). In der tPA<sup>-/-</sup> handelte es sich um eine tendenzielle PAI-1 Reduktion (p = 0,076) im Vergleich zur normotherm-behandelten Knock-Out Maus. Wurde eine Maus mit einer Plg-Defizienz einer Hypothermie unterzogen, so wurde auch hier ein signifikantes Absinken (p = 0,011) der PAI-1 Konzentration beobachtet.

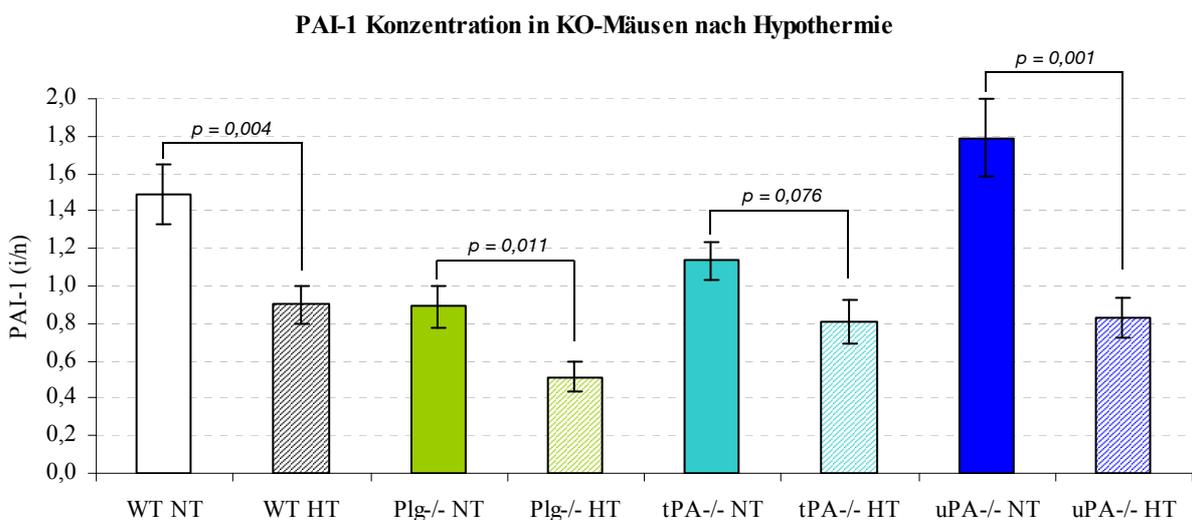


Abbildung 28: Quantifizierung der PAI-1-Banden von Western Blots. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre (i/n) als Mittelwert ± Standardfehler in normotherm- und hypotherm-behandelten Tieren.

#### 4.3.5 Auswirkungen der Gendeletion im PPS auf Enzyme des MMP-Systems

Die MMP-9 Aktivität reduzierte sich in den Tieren Plg<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup> und uPA<sup>-/-</sup> um 20% bis 30%. In der PAI-1<sup>-/-</sup> nahm die MMP-9 Aktivität um 22% zu, in allen Fällen war dies aber nicht signifikant (Abb. [29] A). In sämtliche Gendefizienten Mäusen konnte keine Änderung der MMP-2 Konzentration im Vergleich zum Wildtyp gefunden werden (siehe im Anhang [9]).

Die nach I/R gestiegene MMP-3 Konzentration ( $1,4 \pm 0,14$ ;  $p < 0,05$  versus scheinoperierten Mäusen) war in Plg und tPA gendefizienten Mäusen signifikant reduziert. Kein Unterschied der MMP-3 Konzentration konnte mehr im ischämischen und nicht-ischämischen Gewebe mit Hilfe des Western Blots gemessen werden (Plg<sup>-/-</sup>:  $1,02 \pm 0,04$ ; tPA<sup>-/-</sup>:  $1,05 \pm 0,3$ ; beide  $p < 0,05$  versus scheinoperierten Mäusen). In der PAI-1<sup>-/-</sup> Mutante fand sich keine Konzentrationsänderung von MMP-3 im Vergleich zum WT (Abb. [29] B). Es liegen mangels ausreichendem Gehirnmateriale keine Werte der MMP-3 Konzentration von den uPA<sup>-/-</sup> vor.

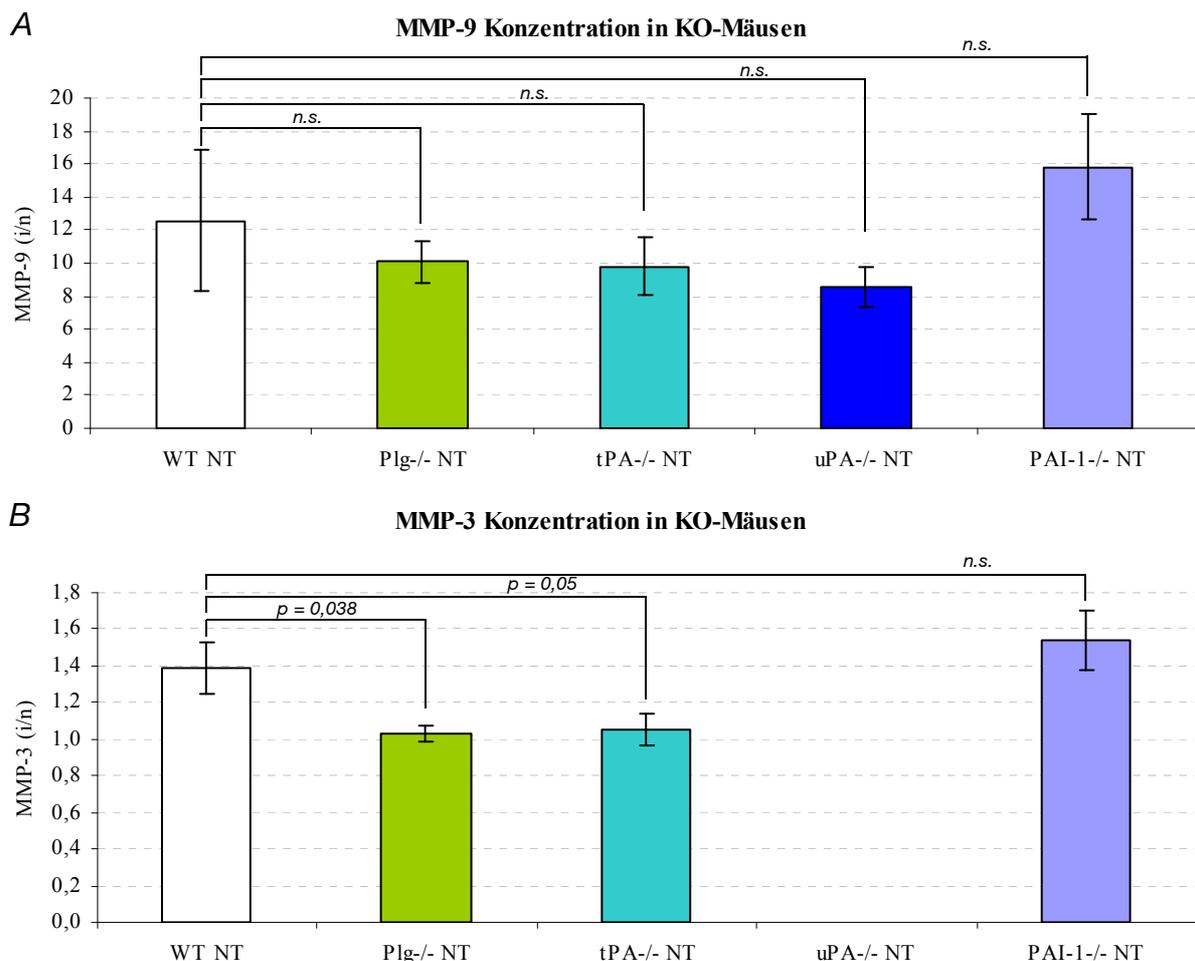


Abbildung 29: Quantifizierung der optischen Dichte der MMP-9-Lysezonen (A) von Gelatine-Zymographien und MMP-3-Banden (B) von Western Blots. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre (i/n) als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Die Wildtypmaus zeigte nach I/R unter normothermen Bedingungen eine signifikant angestiegene Konzentration des MMP-Inducers EMMPRIN ( $1,8 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$  versus schein-operierten Mäusen). In den Gruppen Plg<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, uPA<sup>-/-</sup> und PAI-1<sup>-/-</sup> sank die EMMPRIN Konzentration signifikant, sodass kein Unterschied in der ischämischen und der nicht-ischämischen Hemisphäre mehr vorlag (Plg<sup>-/-</sup>:  $1,19 \pm 0,08$ ; tPA<sup>-/-</sup>:  $1,12 \pm 0,05$ ; PAI-1<sup>-/-</sup>:  $1,03 \pm 0,07$ ; alle  $p < 0,05$  versus WT; uPA<sup>-/-</sup>:  $1,37 \pm 0,12$ ;  $p > 0,05$ ) (Abb. [30]).

Im Gegensatz dazu hatten die Gendelektionen keinerlei Auswirkung auf die beiden endogenen Inhibitoren des MMP-Systems TIMP-1 und TIMP-2 (siehe im Anhang [9]).

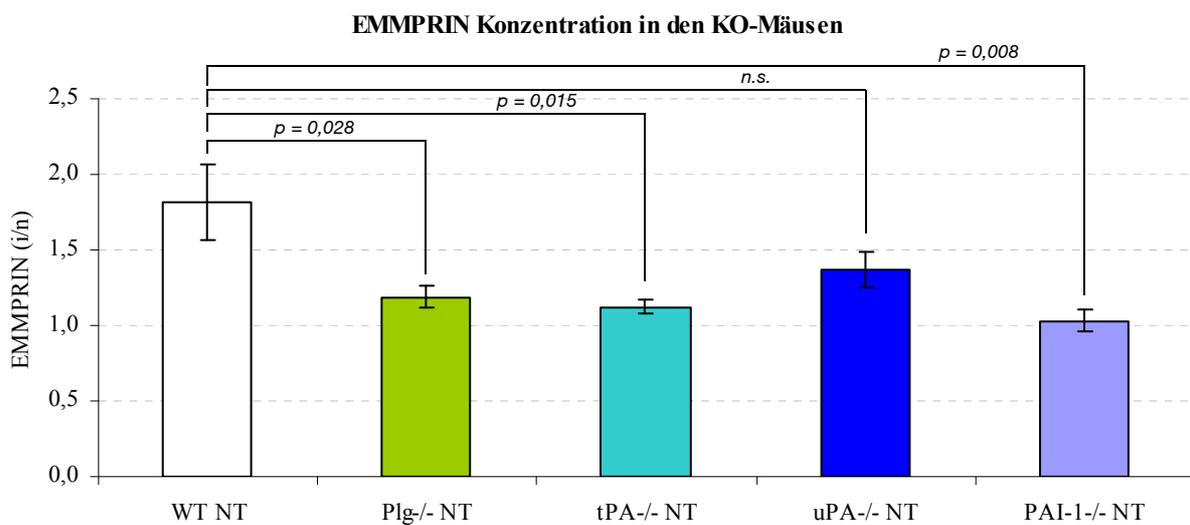


Abbildung 30: Quantifizierung der optischen Dichte der EMMPRIN-Banden von Western Blots. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre (i/n) als Mittelwert ± Standardfehler.

#### 4.3.6 Auswirkung der Hypothermiebehandlung nach Gendelektion im PPS auf Enzyme des MMP-Systems

Der Ischämie-bedingte Anstieg des zerebralen MMP-9 im Wildtyp wurde durch Hypothermiebehandlung deutlich abgemildert (siehe oben). In den gendefizienten Mäusen Plg<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup> und uPA<sup>-/-</sup> konnte durch Hypothermie keine signifikante Veränderung des MMP-9 Gehaltes erzielt werden. In allen drei Gruppen blieb die MMP-9 Konzentration signifikant erhöht gegenüber der nicht-ischämischen Hemisphäre (im Durchschnitt um das 8-Fache;  $p < 0,05$  vs. der nicht-ischämischen Hemisphäre). Im Gegensatz zu diesen drei Genvarianten bewirkte die Hypothermie in der KO-Mutante des PA-Inhibitors (PAI-1<sup>-/-</sup>) eine Verminderung der MMP-9 Konzentration um 50% ( $p = 0,08$  vs. WT NT) (Abb. [31] A).

Die MMP-2 Konzentration blieb unverändert in den gendefizienten Mäusen, unabhängig von der Behandlung: Hypothermie hatte ebenfalls keinen messbaren Einfluss (siehe im Anhang [9]).

Die Quantifizierung von Western Blots zeigte, dass Hypothermie in der WT Maus keinen modulierenden Einfluss auf die MMP-3 Konzentration hatte. Auch in den Knock-Out Tieren sank die Aktivität an MMP-3 nach der 24-stündigen Hypothermiebehandlung nicht signifikant (Abb. [31] B). Es konnte keine signifikante Veränderung des MMP-3 Gehalts in der ischämischen gegen die nicht-ischämische Seite in sämtlichen KO Tieren gemessen werden.

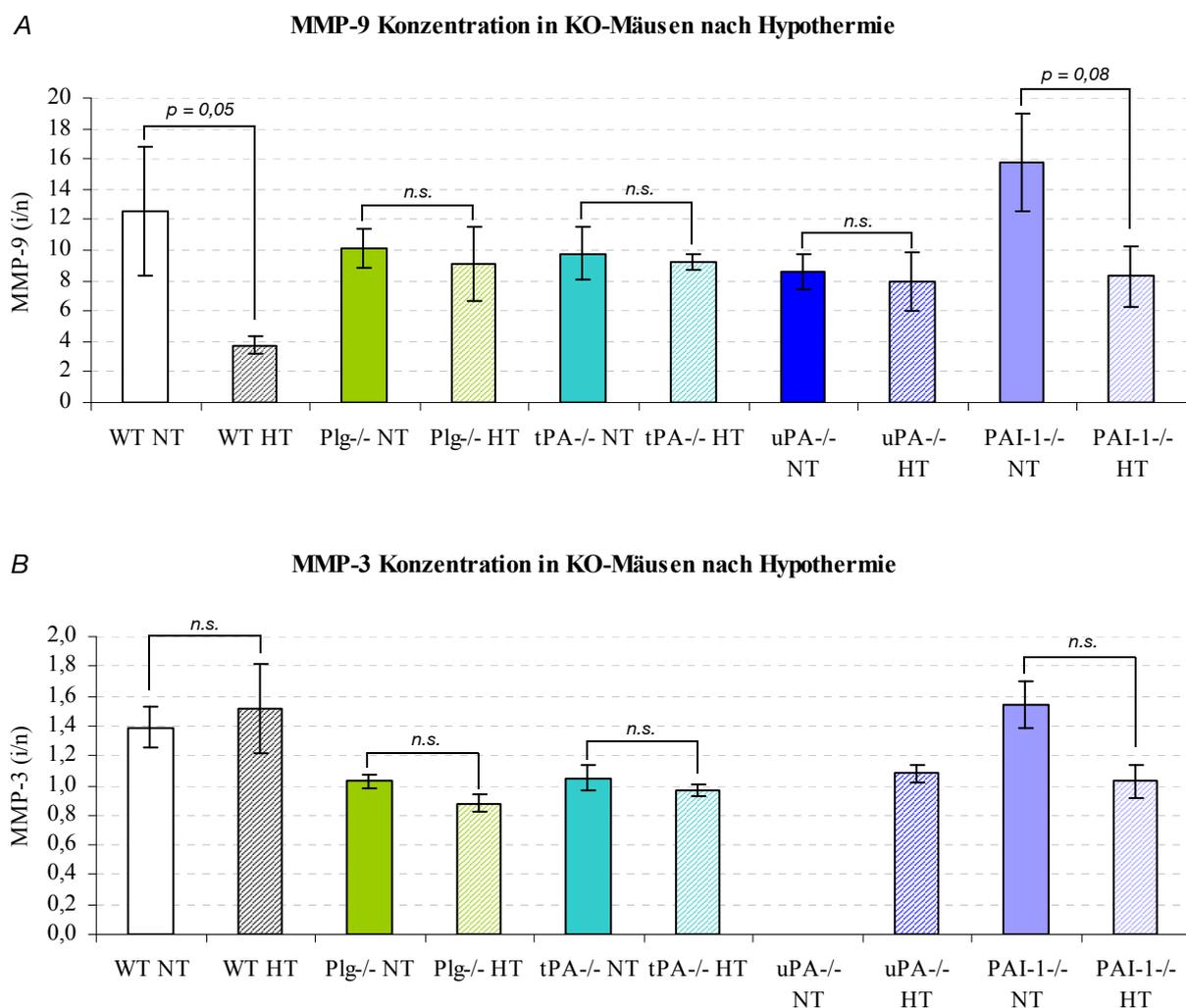


Abbildung 31: Quantifizierung der optischen Dichte der MMP-9-Lysezonen (A) von Gelatine-Zymographien und MMP-3-Banden (B) von Western Blots. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre (i/n) als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler in normotherm- und hypothermiebehandelten Tieren. Keine Ergebnisse lagen für  $uPA^{-/-}$  vor.

Der MMP-Inducer EMMPRIN, der durch I/R im ischämischen Gewebe ansteigt, fällt bei Hypothermiebehandlung wieder ab (siehe oben). Diesen Effekt der Hypothermie konnte

auch in der uPA<sup>-/-</sup> gezeigt werden ( $p < 0,05$ ). Die anderen untersuchten Mutanten des PPS wiesen keinen signifikanten Effekt der Hypothermie auf die EMMPRIN Konzentration auf (Abbildung [32]).

Die endogenen MMP-Inhibitoren, TIMP-1 und TIMP-2, wurden im Mäusegehirn nach I3/R24 erhöht nachgewiesen (siehe oben). Hypothermie konnte die Aktivität von TIMP-1 in Plg<sup>-/-</sup> tendenziell und in tPA<sup>-/-</sup> und uPA<sup>-/-</sup> signifikant im Vergleich zum Wildtyp HT reduzieren ( $p < 0,08$  bzw.  $p < 0,05$ ). Auf TIMP-2 hatte die Hypothermie keinen Einfluss (siehe im Anhang [9]).

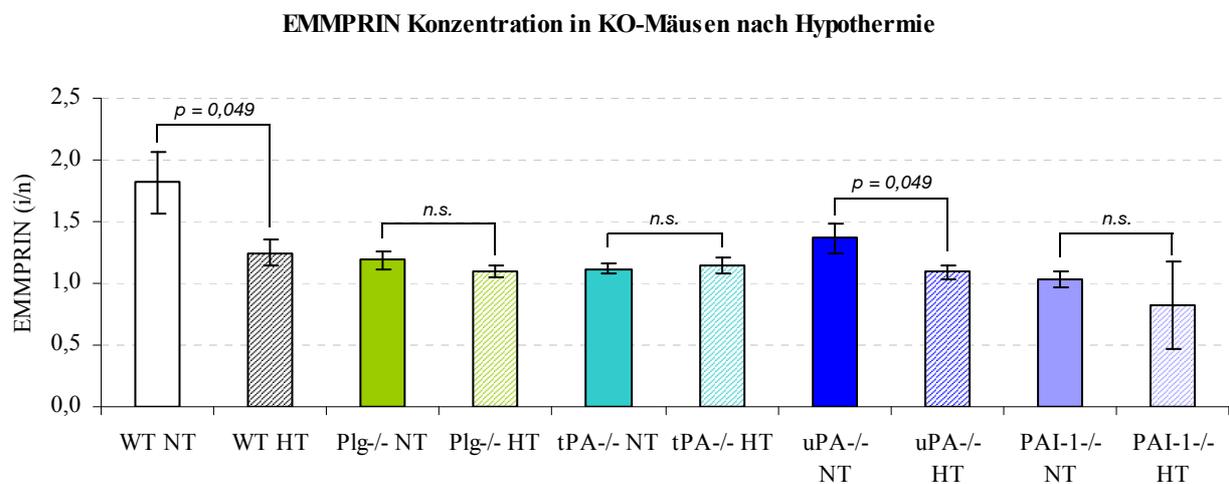


Abbildung 32: Quantifizierung der optischen Dichte der EMMPRIN-Banden von Western Blots. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre (i/n) als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler in normotherm- und hypotherm-behandelten Tieren.

#### 4.4 Übersichtstabelle der wichtigsten Ergebnisse

Tabelle [4] zeigt eine Übersicht der wichtigsten Ergebnisse. Die verschiedenen Symbole drücken eine erhöhte oder verminderte Schädigung/Aktivität aus. Aufwärts zeigende Pfeilen ( $\uparrow$ ) zeigen eine Zunahme, abwärts weisende Pfeile ( $\downarrow$ ) eine Abnahme und „=“ bedeutet keine Veränderung des jeweiligen Parameters gegenüber der Kontrolle. Die Farben signalisieren die Eigenschaft, ob die Änderung des Parameters nach der Ischämie eine Verbesserung (grün) oder Verschlechterung (rot) für das Tier bedeutet. Dies wurde vor allem an Hand des Infarktolumens und der Hämoglobinextravasation beurteilt. Bei den Knock-Out Gruppen (Plg<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, uPA<sup>-/-</sup>, PAI-1<sup>-/-</sup>) sind jeweils die beiden Behandlungen in der Tabelle zusammengefasst worden: Normothermie (NT) | Hypothermie (HT).

Angegeben ist jeweils der Vergleich WT NT gegen KO NT und KO NT gegen KO HT. Es zeigt sich, dass die hypotherme Therapie die Schädigung (Reduzierung des Infarkt Volumens, Verminderung der Blutung) nach einem Schlaganfall deutlich reduzierte. Dieser positive Effekt der Hypothermie fand sich dabei sowohl in den Wildtyptieren als auch in den gendefizienten Mäusen.

Übersicht	Wildtyp	Plg <sup>-/-</sup>		tPA <sup>-/-</sup>		uPA <sup>-/-</sup>		PAI-1 <sup>-/-</sup>	
		NT	HT	NT	HT	NT	HT	NT	HT
Infarktvolumen	↓	↓	=	↓	=	↓	↓	↑	↓
Hämoglobin	↓	↓	=	↓	↑	↓	-	=	=
tPA	=	↓	=			=	=	=	=
uPA	↓	↓	=	↓	=			↓	=
PAI-1	↓	↓	↓	↓	=	=	↓		
MMP-9	↓	↓	=	↓	=	↓	=	=	=
EMMPRIN	↓	↓	=	↓	=	=	↓	↓	=

Tabelle 4: Übersichtstabelle der wichtigsten Ergebnisse: ↑ Zunahme / ↓ Abnahme der Schädigung/Konzentration; „=“ keine Veränderung; „grün“ Verbesserung / „rot“ Verschlechterung für das Tier; Darstellung in der Tabelle: Veränderung unter normothermer Bedingung (NT) ; Veränderung unter hypothermer Bedingung (HT).

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Einfluss postischämischer Hypothermie auf die Integrität der mikrovaskulären Basalmembran

#### ***Einfluss der postischämischen Hypothermie auf das Infarktvolumen und die Mikrogefäße***

Das erste wichtige Ergebnis dieser Studie ist die Reduzierung des Infarktvolumens bei Mäusen durch die Hypothermie um 36%. Ähnliche Auswirkungen auf die Infarktgröße wurden auch von anderen Forschungsgruppen gezeigt. So berichten z.B. Kawai *et al.* von Reduzierungen um 30% durch eine hypotherme Behandlung bei Ratten (Kawai *et al.*, 2000; Yanamoto *et al.*, 2001; Hamann *et al.*, 2002). In einer großen Metaanalyse experimenteller Untersuchungen (222 Publikationen) von Van der Worp *et al.* (2007) wurde ebenfalls eine Reduktion um 30% des Infarktvolumens nach Hypothermie bei Ratten ermittelt.

Die Sicherung der Lebensqualität durch die Reduktion des neurologischen Defizits ist ein Hauptziel der klinischen Schlaganfalltherapie (STAIR, 1999). Aus dem Großteil der bisher veröffentlichten Arbeiten konnte bisher keine Verbesserung des neurologischen Outcomes bei Patienten durch Hypothermiebehandlung geschlossen werden. In dieser Studie konnte im Mausmodell eine signifikante Verbesserung des neurologischen Outcomes nach hypothermer Behandlung gezeigt werden. Allerdings wurde in dem hier gewählten experimentellen Versuchsaufbau lediglich ein Zeitrahmen von 24h Reperfusionzeit nach der Ischämie gewählt und es wurde kein Experiment mit einem anschließendem Wiederwärmen durchgeführt. Oft wurde einhergehend mit der Wiedererwärmung ein kritischer Effekt des Ansteigens des intrakraniellen Druckes beschrieben (Corbett & Thornhill, 2000; Fröhlich *et al.*, 2004). Diese unerwünschte Nebenwirkung sollte im Tiermodell weiter untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe von Western Blots nachgewiesen werden, dass durch Hypothermie, während der 24-stündigen Reperusionsphase, die Extravasation des Hämoglobins ins umliegende Nervengewebe signifikant sinkt. Dies zeigt die gesteigerte Integrität der Mikrogefäße. In der vorliegenden Studie konnte die Extravasation von Flüssigkeiten nur semi-quantitativ an Hand vergrößerter ischämischer Hemisphären beobachtet werden. In Untersuchungen von Yanamoto *et al.* (1999 & 2001) und Liebetrau *et al.* (2004) zeigte sich eine quantitative Reduktion der Ödementwicklung durch die postischämische Hypothermie.

---

Zur Erklärung der protektiven Wirkung der Hypothermie sind verschiedene Ursachen denkbar. Einerseits könnte die Verminderung des ischämischen Schadens durch die allgemeine Verminderung des Stoffwechsels erfolgen, andererseits ebenso durch Hemmung spezifischer Schädigungsmechanismen, wie ein verzögerter Ablauf des apoptotischen Zelltodes (Matz, 2003) oder die Hemmung der Lipidperoxidation und die Minimierung freier Sauerstoffradikalen (Popp *et al.*, 2005). Da die proteolytischen Systeme des PPS und MMPs erheblich an den ischämischen Schadensreaktionen beteiligt sind, war es naheliegend, einen möglichen Einfluss der Hypothermie auf diese Proteasen sowie die zugehörigen Aktivatoren und Inhibitoren zu untersuchen.

### ***Einfluss der postischämischen Hypothermie auf das Plasminogen-Plasmin- und MMP-System***

Entscheidend für die Aufrechterhaltung der mikrovaskulären Funktion ist ein gut ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen dem Gerinnungssystem und dem fibrinolytischen System (del Zoppo 1994). Bei einer zerebralen Ischämie kommt es zu einer stark erhöhten Proteasenaktivität im Gerinnungssystem und so zur Zerstörung des mikrovaskulären Systems (Rosenberg *et al.*, 1997; Lapchak *et al.*, 2000). uPA und tPA spielen eine Schlüsselrolle, da sie die wichtigsten Aktivatoren von Plasmin darstellen. Endothelzellen produzieren fortlaufend endogenes tPA und pro-uPA zur Aktivierung von Plasmin um eine lokale Thrombose an der Gefäßwand zu verhindern (Lijnen *et al.*, 1998). Nach einem ischämischen Insult findet eine starke Aktivierung von uPA statt, während tPA keine signifikante Veränderung zeigt (Rosenberg *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 1999; Hosomi *et al.*, 2001; Burggraf *et al.*, 2004). Könnte dieser massive uPA Anstieg eingedämmt werden, sollte man eine Reduktion der mikrovaskulären Schäden erwarten. Die Hypothermie bewirkte in den hier gezeigten Experimenten eine 60%ige Reduzierung des Anstiegs der uPA Aktivität. Dies passt gut zu den unlängst gezeigten Ergebnissen von Burggraf *et al.* (2004) und Martens (2006), die eine erhebliche Reduktion von uPA in den Basalganglien von Ratten nachwiesen.

Der MMP-2 Gehalt in der Maus war nach Ischämie und Reperfusion deutlich erhöht. Die hypotherme Behandlung bewirkte bei Ischämie eine deutliche Senkung der gesteigerten Aktivität von MMP-9, während die Aktivitäten von MMP-2 und TIMP-1/-2 keine signifikanten Veränderungen zeigten. Dies kann sowohl auf den Einfluss der Hypothermie direkt auf das MMP-System oder indirekt auf eine Modulierung durch uPA zurückzuführen sein.

Eine weitere Folge der Hypothermie auf die Reduzierung der proteolytischen Aktionen des MMP-Systems kann durch den Inducer EMMPRIN erfolgen. In vorangegangenen Experimenten von Burggraf *et al.* (2005b) und Zhu *et al.* (2008) wurde eine Kollokalisierung von EMMPRIN und MMP-9 in ischämischem Gewebe von Mäusen und Ratten gezeigt. Das Ergebnis der Reduktion von EMMPRIN um mehr als 30% durch die Hypothermie untermauert die Kausalität.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass eine moderate Hypothermie mit reduzierten Aktivitäten der endogenen Proteasen des PPS und des MMP-Systems, insbesondere uPA und MMP-9, assoziiert ist. Der protektive Effekt der Hypothermie erklärt sich durch die verminderte Aktivität der proteolytischen Schlüsselenzyme, während die Inhibitoren unbeeinflusst bleiben. Damit verschiebt sich das endogene proteolytische Gleichgewicht zugunsten einer stärkeren Inhibition der verbleibenden Proteasen. uPA und MMP-9 spielen demnach eine Schlüsselrolle beim ischämischen mikrovaskulären Schaden.

## **5.2 Einfluss postischämischer Hypothermie auf das Plasminogen-Plasmin und das Matrix Metalloproteinasen System in ausgesuchten Knock-Out Mutanten**

### **5.2.1 Vergleich der Knock-Out Mutanten mit den Kontrollen**

Die Hypothermie bewirkte in den Wildtyp Mäusen (HT Kontrolle) nach Ischämie eine deutliche Reduzierung des Infarkt volumens und der Hämoglobinextravasation. Zudem konnten die Proteasen uPA und MMP-9 durch die Hypothermie deutlich reduziert werden, während die Inhibitoren PAI-1 und TIMP-1 zwar ebenfalls signifikant aber deutlich geringer reduziert wurden.

### **Einfluss der Mutationen auf das Infarktvolumen, sowie auf die Integrität der Mikrogefäße**

Die gezielte Deletion der Proteasen aus dem PPS (Plg, tPA und uPA) führte zu einer deutlichen Reduzierung des Infarkt volumens, während es bei Deletion des Inhibitors PAI-1 zu einer leichten Erhöhung des Infarkt volumens kam. Die durchschnittliche Reduktion der Infarktgröße betrug in Plg<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup> und uPA<sup>-/-</sup> etwa 30% im Vergleich zur Kontrolle. Reduzierungen des Infarkt volumens bei diesen Knock-Out Mutanten konnten ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen in ähnlichen Größenordnungen gezeigt werden (Overgaard *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2004).

---

Außerdem zeigte sich eine signifikante Protektion gegenüber neuronalem Zellschaden in tPA<sup>-/-</sup> und Plg<sup>-/-</sup> Mäusen (Vassali *et al.*, 1991; Tsirka *et al.*, 1997 ).

In den PAI<sup>-/-</sup> Mutanten wiederum stieg das Infarktvolumen an. Das erhöhte Infarktvolumen auf die Mikrogefäßschäden könnte durch die gesteigerte Konzentration an PAs (und deren Folgeprodukte wie Plasmin) zurückgeführt werden.

In KO Mutanten mit deletierten Proteasen zeigte sich eine deutliche Reduzierung der Hämoglobinextravasation im ischämischen Gewebe. Dieser Befund bestätigt die Korrelation der hämorrhagischen Transformationen mit dem Verlust der Basalmembranstruktur der Mikrogefäße (Hamann *et al.*, 1996; Burggraf *et al.*, 2008).

Zusammenfassend ergibt sich ein positiver Effekt bei Deletion einer Protease aus dem PPS (Plg, tPA und uPA) auf das Infarktvolumen, auf die Extravasation von Blutbestandteilen und letztendlich auf die Integrität der Mikrogefäße. Ist ein Inhibitor deletiert, so wirkt sich dies negativ auf die mikrovaskulären und neurologischen Parameter aus.

### ***Einfluss der Ischämie auf das PPS/MMP System in Mutanten aus dem PPS***

Die Schädigung der Mikrogefäße und die neurologischen und strukturellen Konsequenzen stehen mit den Proteasen des PPS und des MMP-Systems in engem kausalem Zusammenhang. Eine Kombination der Hypothermie mit ausgewählten Gendelektionen, derjeniger Enzyme die mutmaßlich für ischämische Schäden verantwortlich sind, wurde in dieser Arbeit als Ansatzpunkt gewählt um die protektiven Mechanismen besser erklären zu können.

In der uPA<sup>-/-</sup> und in der tPA<sup>-/-</sup> Mutante konnte das Infarktvolumen unter hypothermer Behandlung gesenkt werden. Die Hämoglobinextravasation wurde durch postischämische Hypothermie vor allem in den Plg<sup>-/-</sup> und PAI-1<sup>-/-</sup> Gruppen reduziert. Nagai *et al.* (1999) zeigte in ähnlichen Versuchen mit tPA<sup>-/-</sup> Mutanten eine vergleichbare Reduzierung des Infarktvolumens nach Ischämie. Wurde uPA genetisch deletiert, stieg die Aktivität von tPA. Dies kann als endogene Kompensation oder Substitution für den Aktivitätsverlust von uPA durch den zweiten Plasminogenaktivator des PPS (tPA) in der Ischämie/Reperfusion verstanden werden.

In beiden Mutanten der PAs sanken die Konzentrationen der MMPs, vor allem des MMP-9 und MMP-3, z.T. erheblich ab: Beispielsweise sank die MMP-9 Konzentration in der tPA<sup>-/-</sup> um 22% und in der uPA<sup>-/-</sup> um 32% sowie in der Plg<sup>-/-</sup> um 20%. Die TIMP Konzentration blieb in beiden PA Knock-Out Mutanten stabil, was zusammen mit der Reduktion der MMPs zu einer stärkeren Inhibition der verbleibenden MMPs führt. Dies wiederum erklärt zusätzlich den beobachteten Schutz vor Mikrogefäßschäden und der Reduktion des Infarktolumens. Der MMP-Inducer EMMPRIN sank ebenfalls in den tPA<sup>-/-</sup>, uPA<sup>-/-</sup> und Plg<sup>-/-</sup> Mutanten. Dieser Einfluss des PPS auf den MMP-Inducer wird zum ersten Mal in dieser Arbeit beschrieben.

Wird der Inhibitor des PPS, PAI-1, deletiert, so fand sich ein Anstieg der MMPs, was durch die beschriebene Aktivierung der MMPs durch die erhöhte Aktivität von uPA zu erklären ist (Nagase *et al.*, 1991; Ogata *et al.*, 1992a & 1992b). Bleibt dabei die TIMP Aktivität unverändert, so erfolgt eine Verschiebung des proteolytischen Gleichgewichts in Richtung erhöhter Schädigung und Anstieg des Infarktolumens.

Es zeigte sich, dass die Proteasen des PPS einen wichtigen Einfluss auf den ischämischen Schaden haben. Insbesondere fällt die hohe uPA Konzentration nach Ischämie in den Plg<sup>-/-</sup> und tPA<sup>-/-</sup> deutlich ab. Dies lässt sich durch die fehlende Rückkopplung über Plasmin zum uPA erklären. Auch andere Publikationen rücken die uPA Aktivität in eine zentrale Position der ischämischen Schädigung (Yano *et al.*, 2001; Tsuji *et al.*, 2005).

### **Einfluss der postischämischen Hypothermie auf Mutanten des PPS**

In dieser Arbeit wurde durch den Vergleich der normotherm und hypotherm behandelten Wildtypiere gezeigt, dass keine reinen Temperatureffekte bei der protektiven Wirkung der Hypothermie nach Ischämie vorliegen. Durch Mutationen im PPS können folgende zwei Ergebnisse festgehalten werden:

- 1 In der uPA<sup>-/-</sup> sank durch die Hypothermie das Infarktolumen.
- 2 In der tPA<sup>-/-</sup> und Plg<sup>-/-</sup> sanken die Infarktolumina durch die hypotherme Behandlung nicht. Das Fehlen von tPA oder eine Reduktion von tPA in der Plg<sup>-/-</sup> Mutante (durch fehlende Rückkopplung im PPS) bewirkte, dass der Schutz durch die Hypothermie vermindert war.

---

Zu 1.) Der Anstieg des uPA nach Ischämie ist ein wichtiger Schadensfaktor (Yano *et al.*, 2001; Tsuji *et al.*, 2005). Unter Hypothermie fiel dieser um mehr als 50% ab. Dadurch konnte eine deutliche Infarktvolumenreduzierung erzielt werden. Ebenso reduzierte sich die uPA Konzentration in der Plg<sup>-/-</sup> und tPA<sup>-/-</sup> Mutante durch eine fehlende Rückkopplung. Mit der massiven Beeinflussung der uPA Protease durch die Hypothermie und den damit verbundenen erheblichen Verbesserungen mikrovaskulären und neurologischen Schädigungen konnte herausgearbeitet werden, dass uPA ein Schlüsselenzym bei der zerebralen Ischämie spielt.

Zu 2.) Der Temperatureffekt der Hypothermie, der modifizierend auf einige Enzymaktivitäten wirkt, z.B. der Abfall des uPA in Wildtyptieren, war nicht bei der Protease tPA zu beobachten. In der tPA<sup>-/-</sup> sank nicht, wie zu erwarten, das Infarktvolumen durch die Hypothermie ab. Somit könnte tPA ein protektiver Faktor in der Hypothermie sein. Dieser Schutz durch tPA in der Hypothermie wurde ebenso durch die Experimente mit PAI-1<sup>-/-</sup> Mutanten gezeigt. Durch das Fehlen des Inhibitors PAI-1 stieg die Aktivität von tPA an. Da jetzt in der PAI-1<sup>-/-</sup> mehr tPA ist, ist in der Hypothermie eine erhöhte Protektion zu finden. Dies wird durch einen Abfall der ischämischen Schäden manifestiert (z.B. eine Absenkung der Hämoglobinextravasation um 48%). Des Weiteren wird laut Yenari *et al.* (1995) und Shaw *et al.* (2007) die Wirksamkeit der proteolytischen Aktivität von tPA maßgeblich durch die Temperatur bestimmt. Deren Studien ergaben bei einer Reduzierung der Körpertemperatur auf <35°C eine verminderte thrombolytische Aktivität von tPA, was ebenfalls eine Reduzierung der Schäden und somit eine Protektion zur Folge haben würde.

Zusätzlich könnte tPA ein verantwortlicher Faktor für die Regulierung von EMMPRIN sein. EMMPRIN stieg durch eine Ischämie deutlich an und fiel nach Hypothermiebehandlung ab. In der tPA<sup>-/-</sup> Mutante fand sich aber unabhängig von der Temperatur keine Veränderung der EMMPRIN Konzentration. Die Herabregulation von EMMPRIN in der Hypothermie könnte damit durch tPA vermittelt sein. Diese Reduzierung von EMMPRIN ist somit ein protektiver Faktor in der Hypothermie und tPA ein Faktor für die Regulation von EMMPRIN. Dieser Zusammenhang sollte aber in weiteren Experimenten eingehender untersucht werden.

Zudem fördert die Hypothermie die Protektion in dem es den Inhibitor PAI-1 relativ zur Protease uPA stärkt: Nach Ischämie stieg PAI-1 im Wildtyp um 49% an. PAI-1 komplexiert den Plasminogenaktivator uPA und der Ischämie-bedingte Anstieg des Inhibitors kann als endogener Protektionsmechanismus interpretiert werden. Unter Hypothermie reduzierte sich die Konzentration von PAI-1, gleichzeitig aber nahm die Konzentration von uPA in einem viel stärkerem Maße ab. So verschob sich das Gleichgewicht zu Gunsten des Inhibitors. Diese stärkere Gewichtung des PAI-1 durch die hypotherme Therapie wurde in unserer Gruppe zuvor ebenfalls an Ratten gezeigt (unveröffentlichte Daten).

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass durch eine selektive Wirkweise von uPA, tPA und PAI-1 ein gezielter Schutz nach Hypothermie erreicht wird und diese Enzyme keiner allgemeinen Regulation durch die Hypothermie unterliegen. Die Hypothermie bewirkt somit keine allgemeine Reduzierung der Stoffwechselaktivität und beeinflusst nicht jeden Faktor gleichermaßen.

### ***Einfluss der Hypothermie auf das MMP System bei Mutanten aus dem PPS***

Das Verhältnis zwischen der Konzentration der Proteasen und deren Inhibitoren bestimmt unter anderem, ob eine Degradation oder ein Aufbau der EZM stattfindet (Rosenberg *et al.*, 1997; Lukes *et al.*, 1999). MMPs haben die Eigenschaft die EZM abzubauen und inflammatorische Mediatoren zu aktivieren. Dies führt wiederum zur Schädigung der BHS und zur gesteigerten Schädigung nach Ischämie (Mun-Bryce & Rosenberg, 1998; Wagner *et al.*, 2003a).

Ein Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Vermutung, dass durch sinkende PAs die Expression der MMPs, insbesondere von MMP-9, über die Aktivierung durch Plasmin beeinflusst wird. In der Hypothermie sank die uPA Aktivität erheblich ab, was die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin vermindert (Kobayashi *et al.*, 1991; Andreasen *et al.*, 1997). Gleichzeitig war mit der Senkung von uPA eine deutliche Reduktion von MMP-9 zu beobachten. tPA zeigte keine verminderte Aktivität durch die hypotherme Behandlung, was darauf hinweist, dass tPA keinen oder einen nur sehr geringen Einfluss auf die MMP-9 Aktivierung ausübt. uPA scheint ein wichtiger Faktor für die Regulation von MMP-9 in der Hypothermie zu sein. Bei genetischer Deletion von uPA, konnte wie erwartet ein Sinken der MMP-9 Aktivität auf Grund des fehlenden Einflusses von uPA gezeigt werden konnte.

---

Dieser Einfluss von uPA auf das MMP System, insbesondere auf MMP-9, wird durch die Ergebnisse der weiteren in dieser Arbeit eingesetzten KO Mutanten unterstützt:

- 1 Fallende uPA Aktivität führte in der tPA<sup>-/-</sup> zur Reduzierung der MMP-9 Konzentration.
- 2 Reduzierte tPA und uPA Aktivität in der Plg<sup>-/-</sup> NT verminderte die MMP-9 Konzentration.

Das Absinken der MMP-9 Aktivität wird als ein protektiver Faktor in der Hypothermie beschrieben.

Die MMP-2 Aktivität nach Ischämie änderte sich nur geringfügig. Ein Grund könnte das Versuchsende nach 24-stündiger Reperfusion sein. Das Maximum der MMP-2 Aktivierung liegt weit früher innerhalb der ersten 12 Stunden nach Ischämie (Rosenberg *et al.*, 1998 & 2007). Vermutlich ist deshalb zu diesem Zeitpunkt selbst unter hypothermen Bedingungen nur ein moderater Abfall an MMP-2 zu beobachten. Rosenberg *et al.* (1998) postulierte bei zerebraler Ischämie zwei Phasen. MMP-2 ist dabei besonders in der ersten Phase aktiv (Rosenberg *et al.*, 1998; Heo *et al.*, 1999). Die Folge ist eine verminderte Integrität der BHS. Nach 24-stündiger Reperfusion ist diese Phase schon beendet.

Neben dem oben beschriebenen Effekt von uPA auf MMP-9 nehmen weitere Proteasen aus dem PPS Einfluss auf das MMP System. Plasmin kann pro-MMP-3 und pro-MMP-9 direkt zu aktiviertem MMP-3 bzw. MMP-9 umsetzen (Nagase *et al.*, 1991; Lijnen *et al.*, 1998). Auf der anderen Seite aktiviert MMP-3 die latente Form von MMP-9 zur aktiven Form (Ogata *et al.*, 1992a & 1992b; Hahn-Dantona *et al.*, 1999; Liu & Rosenberg, 2005). Nach Ischämie/Reperfusion steigt die aktive Form von MMP-3 an (Suzuki *et al.*, 2007).

In dieser Studie war die MMP-3 Aktivität in den Plg<sup>-/-</sup> und tPA<sup>-/-</sup> Mutanten reduziert. Die Aktivierung der MMPs durch Plasmin entfällt durch die Deletion von Plg und tPA, dadurch fällt der Level an aktivem MMP-3 im Mittel um 25%. Diese Verminderung bewirkt wiederum eine zusätzliche Reduzierung des MMP-9. Beide Effekte zusammen tragen zu dem positiven mikrovaskulären Effekt bei (u.a. Absinken des Infarktolumens und Reduzierung der Blutung). Auch in der Arbeitsgruppe um Suzuki wurde die Regulation der MMP-3 über tPA und Plasmin gezeigt, ebenso wie der Zusammenhang mit der intrazerebralen Hämorrhagie (Suzuki *et al.*, 2007). Die Hypothermie zeigte lediglich einen Temperatureffekt auf die MMP-3 und wirkte somit selektiv regulatorisch.

Von den beiden endogenen MMP-Inhibitoren inhibiert TIMP-1 vorzugsweise MMP-9 und TIMP-2 bevorzugt MMP-2 (O'Connell *et al.*, 1994; Murphy & Knäuper, 1997). Die

---

proteolytische Aktivität ist entscheidend von dem Gleichgewicht zwischen Protease und Inhibitor abhängig. In der Hypothermie fand sich keine Veränderung der Konzentrationen von TIMP-1 und TIMP-2. Die unveränderte TIMP Konzentration bei gleichzeitiger verminderter Konzentration der MMPs, insbesondere MMP-9, verschiebt das proteolytische Gleichgewicht in der Hypothermie letztendlich zu Gunsten der MMP Inhibitoren.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Reduzierung der ischämischen Schäden unter Hypothermie keine reinen Temperatureffekte sind. Es konnten im Detail selektive Schutzmechanismen aufgezeigt werden, wie beispielsweise der Anstieg des tPAs, Reduzierung von EMMPRIN oder die Gleichgewichtsverschiebung zugunsten der Inhibitoren im MMP-System.

### **5.3 Validität und Grenzen des Ischämie- und Hypothermiemodells**

Die Versuche der transienten fokalen zerebralen Ischämie mit anschließender hypothermer Reperfusion basieren auf der Kombination zweier Modelle. Zum einem auf dem intraluminalen Fadenokklusionsmodell von Longa *et al.* (1989) und zum anderen auf der extrakorporalen milden bis moderaten Hypothermie nach Yanamoto *et al.* (2001). Beide Modelle basieren auf der Ratte als Tiermodell und wurden in dieser Arbeitsgruppe auf das Tiermodell Maus angepasst.

#### **Ischämiemodell**

Wie bereits in Kapitel [3.1] beschrieben wird die MCA mit Hilfe eines monofilären Fadens okkludiert, wodurch eine Ischämie im Mediastromgebiet induziert wird. Im Vergleich zu anderen Ischämie modellen (siehe Tamura *et al.*, 1981, Laas *et al.*, 1983 oder Koizumi *et al.*, 1985) ist das Modell nach Longa *et al.* (1989) minimal invasiv, besitzt eine geringe peri- und postoperative Mortalität und ist eine zeitsparende Operationstechnik. In Arbeiten von Longa *et al.* (1989) und Sporer *et al.* (1997) an Ratten konnte dabei der Blutfluss auf 20-30% reduziert werden. In unseren Versuchen zeigte sich bei der Kontrolle durch die LDF-Messung meist ein Abfall von 80% und mehr. Die erzeugten Infarkt volumina in Mäusen (Hara *et al.*, 1996; Nagai *et al.*, 2007; Burk *et al.*, 2008) sind im Vergleich zu Versuchen an Ratten (Longa *et al.*, 1989; Hamann *et al.*, 1999 & 2004) konstanter und mit einer geringeren Streuung.

---

Ein wichtiger Vorteil des intraluminalen Fadenmodells liegt in der schnellen und leichten Einleitung der Okklusion/Reperfusion in der MCA durch einfaches Vor-/Zurückziehen des Fadens. Durch die Kontrolle des Blutflusses mittels LDF im Mediagebiet kann eine Okkludierung, sowie eine Reperfusion, in weiten Teilen des Versuches gewährleistet werden. Nach Entnahme des Gehirns kann eine Ruptur der MCA durch Kontrolle der Schädelbasis gänzlich ausgeschlossen werden, was ansonsten die Ergebnisse stark verfälschen würde. Zudem weisen größere Säugetiere und Menschen eine vergleichbare Anatomie und Physiologie des zerebrovaskulären Systems auf (siehe Kapitel [3.1] Abb. [9]). Während häufig bei ZNS betreffenden Fragestellungen Wüstenrennmäuse als Versuchstiere dienen, sind sie für die Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der zerebralen Ischämie ungeeignet, da keine Kollateralverbindungen zwischen dem Vertebralis- und Karotissystem bestehen (Levine & Sohn, 1969).

Ferner unterscheidet sich das hier verwendete Modell der transienten Okklusion stark von der permanenten Okklusion. Die Möglichkeit der Reperfusion sorgt für eine Wiederversorgung des Gehirngewebes mit Sauerstoff, Substraten und dem Abtransport von Abfallstoffen. Daher besteht die Möglichkeit, dass O<sub>2</sub>-abhängige Reaktionen durch Enzyme aus dem PPS und MMP System eventuell gesteigert werden, was zu einem Reperfusionsschaden führen kann (del Zoppo *et al.*, 1998b). Es wurde hiermit das der Realität näherem Modell der Ischämie-Reperfusion im Unterschied zum reinen Ischämiemodell eingesetzt. Im klinischen Umfeld lässt sich ein permanenter Verschluss nur selten nachweisen. Häufiger erfolgt eine Reperfusion nach 4 bis 48 Stunden. Die transiente fokale zerebrale Ischämie kann daher gut Antworten auf relevante Fragen um das Verhalten der Mikrogefäße bzw. die Degradation der Basalmembran liefern.

### ***Hypothermiemodell***

Die extrakorporale Hypothermie in den Versuchen wurde nach Yanamoto *et al.* (2001) durchgeführt. Bei dieser Methode wird eine Absenkung der Körpertemperatur mittels einer kalten Umgebung durchgeführt. Dabei wurde die Umgebungstemperatur nicht wie bei den Ratten auf etwa 5°C abgesenkt (Hamann *et al.*, 2004), sondern auf Grund des geringen Volumens und Gewichtes der Mäuse auf nur 18-19°C abgesenkt. Dabei ergab sich eine mittlere Körpertemperatur von  $32,6 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$  bei den Mäusen unter 24-stündiger Hypothermie und in der Normothermie von  $36,1 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ .

---

Zur Initiierung einer zerebralen Hypothermie gibt es unterschiedliche experimentelle Methoden, wie beispielsweise eine lokale zerebrale Hypothermie oder Ganzkörperhypothermie (Ginsberg *et al.*, 1992; Roy & Ray, 2004). Ein wichtiger Vorteil der extrakorporalen Hypothermie liegt in ihrem einfachen Aufbau und der leichten Handhabung. Versuchstiere müssen zur Kühlung nicht über eine Kältematte positioniert werden, einen endovaskulären Kühlkatheter oder einen extrakorporalen Bypass gelegt bekommen (schwere operative Eingriffe) und nicht während der hypothermen Behandlung unter Vollnarkose stehen. All diese Prozeduren senken die Überlebensrate der Versuchstiere durch die zusätzliche Operation und durch den erhöhten Stress (Ginsberg *et al.*, 1992; Maier *et al.*, 1998; Kawei *et al.*, 2000; Krieger *et al.*, 2001; De Georgia *et al.*, 2004). Die Implementierung der Temperatursonde im *M. temporalis* kommt bei extrakorporaler Kühlung ohne eine Kraniotomie aus. Die Temperatur im *M. temporalis* entsprach in Vorversuchen denen einer direkt im Gehirn implementierten Sonde, sowie einer weiteren Sonde im Rektum (eigene unveröffentlichte Daten). Huh *et al.* (2000) bestätigten, dass die Temperatur am *M. temporalis* die Hirntemperatur sehr gut widerspiegelt.

Ernsthafte Nebenwirkungen der extrakorporalen Hypothermie wie Herzrhythmus-, Gerinnungsstörungen oder Erfrierungen der Haut konnten, bis auf ein seltenes Muskelzittern, nicht beobachtet werden. Die Hypothermie wurde von den Versuchstieren gut bis sehr gut aufgenommen und zeigte keine Anzeichen von Beeinträchtigungen ihres Wohlbefindens durch die erniedrigte Körpertemperatur. Die Schwere der Nebenwirkungen bzw. der Komplikationen durch die Hypothermie korrelieren mit dem Tiefegrad der Hypothermie. Eine milde oder moderate Hypothermie verursacht weit weniger Nebenwirkungen als eine tiefe Hypothermie (Polderman, 2004a & 2004b). Dies war ein entscheidender Grund, die Untersuchungen mit einer milden bis moderaten Hypothermie durchzuführen.



---

## 6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass eine milde bis moderate Hypothermie die mikrovaskuläre Integrität schützt, das Infarktvolume reduziert und die Extravasation von Blutbestandteilen ins umliegende Gewebe vermindert.

Die beiden extrazellulären proteolytischen Systeme, das PPS und MMP System, scheinen einen entscheidenden Anteil am ischämischen Schaden zu tragen. Besonders stark sind die Proteine uPA, EMMPRIN und MMP-9 dabei involviert. Diese treten nach Ischämie in hohen Konzentrationen auf und werden unter hypothermer Behandlung deutlich vermindert. Ein Zusammenhang mit dem mikrovaskulären Schutz der Hypothermie wurde schlüssig gezeigt.

Weiterführende Untersuchungen sollten sich auf diese Enzyme fokussieren. Insbesondere eine weitere Aufklärung der Mechanismen gegenseitiger Aktivierung sollte dabei von Interesse sein. Sind die genauen protektiven Mechanismen der Hypothermie sicher geklärt, ist ein Einsatz als Therapie nach einer Ischämie denkbar. Zielparameter einer hypothermen Behandlung wären dabei die Protektion der mikrovaskulären Integrität und Folgeschäden der Extravasation von Blutbestandteilen ins Nervengewebe. Basierend auf den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen wäre eine Kombination der Hypothermie mit einer Inhibition des Plasmins oder MMPs vielversprechend. Erste Untersuchungen dazu zeigten in unserer Arbeitsgruppe erfolgsversprechende Ergebnisse.



---

## 7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der postischämischen Hypothermie auf die Integrität der Mikrogefäße nach transienter fokaler zerebraler Ischämie mit anschließender Reperfusion zu untersuchen und mögliche protektive Mechanismen darzulegen. Der Einfluss der Hypothermie auf die Mikrogefäße soll dabei im Mausmodell an Knock-Out (KO) Mutanten des PPS unter normothermer und hypothermer Behandlung genauer untersucht werden.

Als Ischämiemodell wurde das „transient middle cerebral artery occlusion“ Modell (tMCAO) mit einer 3-stündigen Ischämie und 24-stündigen Reperfusionsphase (I3R24) gewählt. Neben Wildtyptieren, die als Kontrolle dienten, wurden KO Mutanten (Plg<sup>-/-</sup>, tPA<sup>-/-</sup>, uPA<sup>-/-</sup> und PAI-1<sup>-/-</sup> Mäuse) aus dem PPS nach tMCAO untersucht. Postischämisch wurde durch extrakorporale Kühlung eine 24-stündige, milde bis moderate Hypothermie erzeugt und überwacht. Nach Beendigung der hypothermen oder normothermen Behandlung erfolgte nach Perfusion die Entnahme des Gehirns. Im weiteren Verlauf wurden Gehirnschnitte zur volumetrischen, immunohistochemischen und biochemischen Aufarbeitung und Auswertung erstellt.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die hypotherme Therapie im Mausmodell eine wirkungsvolle physikalische Methode darstellt die Schädigungen (u.a. Reduzierung des Infarkt Volumens, Verminderung der Blutung) nach einem Schlaganfall effektiv zu mindern.

Die gewonnenen Ergebnisse aus den Hypothermiedaten belegen, dass die Reduzierung des ischämischen Schadens unter Hypothermie kein reiner Temperatureffekt ist. Dafür spricht unter anderem die starke Supprimierung der uPA Aktivität bei gleichbleibender tPA Aktivität unter hypothermer Therapie. Die stabilen Konzentrationen der Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 bei gleichzeitig sinkender MMP-9 Konzentration, sprechen ebenso für die selektive Wirkung der Hypothermie. Somit wird das proteolytische Gleichgewicht aus Proteasen (MMPs) und den zu gehörigen Inhibitoren (TIMPs) in Richtung Inhibition verschoben.

Mit Hilfe der hier verwendeten Knock-Out Mutanten im Ischämie-Reperfusionsmodell konnte bestätigt werden, dass die Proteasen des PPS entscheidend für den ischämischen Schaden sind. So wirkte sich vor allem die Deletion des Plasminogenaktivators uPA abschwächend auf den mikrovaskulären Schaden aus. Wird ein wichtiger Inhibitor des

---

PPS, PAI-1, genetisch deletiert, so stieg der ischämische Schaden, gezeigt am Infarkt volumen und den geschädigten Mikrogefäßen, an.

Die Hypothermiebehandlung an Knock-Out Tieren des PPS zeigten selektive Schutzmechanismen für die zerebralen Mikrogefäße. Der deutlichste Effekt konnte durch die Modulation des uPA erzielt werden. Hypothermie beeinflusst das schädigende uPA überproportional. tPA dagegen scheint während der Hypothermie eine protektive Wirkung auf das mikrovaskuläre System zu entfalten. So legen die Ergebnisse dieser Studie eine Wirkweise über die Regulation des MMP-Inducers EMMPRIN nahe; tPA ist möglicherweise verantwortlich für eine Reduzierung des EMMPRINs und damit für eine Reduzierung der Matrixmetalloproteasen.

In dieser Arbeit konnte mit dem gewählten experimentellen Aufbau, der Kombination einer moderaten Hypothermie mit ausgewählten Knock-Out Mutanten des PPS, im Ischämie-Reperusionsmodell eindeutig gezeigt werden, dass Hypothermie einen selektiven Schutz bei der Behandlung der zerebralen Ischämie bietet. Einige Mechanismen konnten aufgezeigt werden und bieten Ansatzpunkte für weitere, eventuell klinisch anwendbare Therapiemöglichkeiten.

## 8 Anhang (Material & Methoden)

### 8.1 Neuroscore (neurological score)

(nach Garcia *et al.*, 1995; maximale Punktzahl: 18; in englischer Abschrift)

#### 1. Spontaneous activity

Observe the animal for 5 minutes in the cage. Asses the rats activity by its ability to approach all four walls of the cage.

Score:

- 3 rat moved around, explored the environment, and approached at least three walls of the cage.
- 2 slightly affected rat moved about in the cage but did not approach all sides and hesitated to move, although it eventually reached at least one upper rim of the cage.
- 1 severely affected rat did not rise up at all and barely moved in the cage.
- 0 rat did not move all.

#### 2. Symmetry in the movement of four limbs

Rat held in the air by the tail to observe symmetry in the movment of four limbs.

Score:

- 3 all four limbs extended symmetrically.
- 2 limbs on the left side extended less or more slowly than those on the right.
- 1 limbs on the left side showed minimal movement.
- 0 forelimb on the left side did not move at all.

#### 3. Forepaw outstretching

Bringing up the rat to the edge of the table and made to walk on forelimbs while being held by tail. Observing the symmetry in the outstretching of both forelimbs while the rat reached the table and the hind-limbs were kept in the air.

Score:

- 3 both forelimbs were stretched and the rat walks symmetrically on fore-paws.
- 2 left side outstretch less than the right and forepaws walking is impaired.
- 1 left forelimb moved minimally.
- 0 left forelimb did not move.

#### **4. Climbing**

Place the rat on the wall of wire cage. Normally the rat use four limbs to climb up the wall. When the rat is removed from the cage the wire cage by pulling it off by the tail, the strength of attachment was noted.

Score:

- 3 rat climb easily and gripped tightly to the wire.
- 2 left side is impaired while climbing or did not grip as hard as the right side.
- 1 rat fails to climb or tended to circle instead of climbing.

#### **5. Body proprioception**

Touch the rat with a blunt stick on each side of the body and observe the reaction of the stimulus.

Score:

- 3 rat reacted by turning head and was equally startled by the stimulus on both sides.
- 2 rat reacted slowly to stimulus on the left side.
- 1 rat did not respond to the stimulus placed on the left side.

#### **6. Response to vibrissae touch**

Brush a blunt stick against the vibrissae on each side. Move the stick towards the whiskers from the rear of the animal to avoid the visual fields.

Score:

- 3 rat reacted by turning head or was equally startled by the stimulu on both sides.
- 2 rat reacted slowly to stimulus on the left side.
- 1 rat did not respond to stimulus on he left side.

## 8.2 Objektträgerbeschichtung

250ml Aqua dest.

1,1g Gelatine (Typ A, Sigma, G-2500, 100g, Lot 10K0267)

Aqua dest. auf 80°C erhitzen, vermischen und abkühlen lassen

0,13g „Chromalaun“ (Chromium-3-Potassium-Sulfate-Dodecahydrate, 98%, Aldrich) hinzufügen

## 8.3 Nissl-Färbung

### Acetat-Puffer:

800ml Aqua dest.

9,6ml 100% Essigsäure

5,44g Natrium-Acetat

- auf 1000ml mit Aqua dest. auffüllen

### Farblösung:

100ml Acetat-Puffer + 0,5g Cresylviolett (immer frisch ansetzen!)

### Färbeprotokoll:

- 5-7 Min. in Nissl-Farblösung
- 1-2 Min. in Acetat-Puffer
- 1 Min. in Aqua dest.
- 30 Sek. In 70% Alkohol zur Differenzierung
- in Aqua dest. ausspülen bis sich keine Farbe mehr auswäscht

## 8.4 Biochemie (Kurzübersicht)

Art	Anzahl OT a 4 Schnitte	Gel	Homogen. Puffer	Auftrag	Blo-ckie-rung	1. AK	2. AK	Std.
Hämoglobin WB	2	7,5% SDS (0,5mm)	2% SDS 20µl	10µl Probe 5µl AP	1,5% Milchp. 3% BSA	Anti-Hb (1:2000) + 0,5% Milchp.	Anti-Rabbit (1:1000)	BioRad
PAI-1 WB	2	10% SDS (0,75mm)	MMP Homop. 20µl	7µl Probe 4µl AP	1,5% Milchp. 3% BSA	Anti-PAI-1 (1:1000)	Anti-Rabbit (1:1000)	interner Std. 10µl
MMP-3 WB	2	7,5% SDS (0,5mm)	RIPA 15µl	9µl Probe 3µl AP	3% Milchp.	Anti-MMP-3 (1:1000)	Anti-Rabbit (1:1000)	MMP-3 pos. (1:10) 5µl
EMM-PRIN WB	2	10% SDS (0,5mm)	Harnstoff 15µl	12µl Probe 4µl AP	1,5% Milchp. 3% BSA	EMM-PRIN AK (1:1000)	Anti-Goat IgG (1:1000)	BioRad
Plasminogen Zymo	2	Gel + Kasein	siehe [8.5]	8µl Probe 4µl AP	nach Elpho 1h mit Renaturierungspuffer RT ink. über Nacht bei 37°C mit Inkubationspuffer (beide 1:10 Verd. mit A.d. (von NOVEX))			interner Std. 10µl
MMP Zymo	2	Gel + Gelatine	MMP-Homop. (+ PMSF) 15µl	9µl Probe 4µl AP	nach Elpho 1h mit Renaturierungspuffer RT ink. & über Nacht bei 37°C mit Inkubationspuffer (beide 1:10 Verd. mit A.d. (von NOVEX))			MMP-9 und MMP-2 Std. (1:100)
Reverse Zymo	1	Gel + aktive MMPs Gelatine	siehe [8.5]	6µl Probe 3µl AP	nach Elpho 1h mit 2% Triton X-100 RT Ink. über Nacht mit Tris/HCl bei 37°C			interner Std. 10µl

Abbildung 33: Übersicht der Biochemie Protokolle: WB: Western Blot; OT: Objektträger; AK: Antikörper; AP: Auftragspuffer; Milchp.: Milchpulver; BSA: „bovine serum albumine“; Ink.: Inkubation; Elpho: Elektrophorese

## 8.5 Homogenisierungspuffer

Western Blot	Homogenisierungspuffer
Hämoglobin WB; PAI-1 WB; MMP-3 WB	2% SDS; 8M Harnstoff; 20mM Tris (pH 7,3); 1mM EDTA;
EMMPRIN WB	8M Harnstoff + 200µl 2% NP-40 (Igepal) auf 10ml Aqua dest.
Zymographien	Homogenisierungspuffer
Plasminogen-Kasein-Zymographie	1ml 0,1M Tris/HCl (pH 8,1); 20µl Triton X-100; ges. Vol. 10ml
MMP-Zymographie	0,1M Tris/HCl (pH 8,1); 0,1% Triton X-100
Reverse Zymographie	0,1M Tris (pH 8,1); 0,2% Triton X-100; ges. Vol. 5ml

Table 5: Homogenisierungspuffer für Western Blots und Zymographien

## 8.6 Probenauftragspuffer

### 8.6.1 Western Blot

für 3x AP/WB:

Tris/HCl (0,5M pH 6,8)9ml

SDS (15%) 4g

- bei 37°C lösen

20ml Aqua dest.

Glycerin (45%)13g

Bromphenolblau (0,02%)„Spatelspitze“

- auf 30ml mit Aqua dest. auffüllen

- bei Gebrauch hinzugeben:

AP-Stock: 188µl

?-Mercapto: 12µl

## 8.6.2 Zymographie

SDS: 0,5g

Tris/HCl: 1,875ml (Stock: 0,5M; pH 7,5)

Glycerin: 1,5ml

- auf 10ml mit Aqua dest. auffüllen

## 8.7 Rezepte für die Gele

### 8.7.1 Lösungen für Gele

Sol 1: Protogel von „National Diagnostics“ (im Kühlschrank lagern)

Sol 2: 1,5g EDTA (8mM)

2g SDS

90,9g Tris/HCl (1,5M pH 8,8)

- auf 500ml mit Aqua dest. auffüllen. und pH 8,8 einstellen

Sol 3: 1,5g EDTA (8mM)

2g SDS

30,3g Tris/HCl (1,5M pH 6,8)

- auf 500ml mit Aqua dest. auffüllen und pH 6,8 einstellen

### 8.7.2 Lösungen für Elektrophorese & Zymographie

#### Puffer SDS-Page (10x)

SDS: 10g

Tris: 30g

Glycin: 144g

- mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen

- 1x SDS-Page: 100ml von 1x SDS mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen

### 8.7.3 Lösungen für Blots

#### CAPS (10x):

CAPS: 23,2g

- auf 1000ml mit Aqua dest. auffüllen und pH 11 einstellen
- daraus 1x Wester Blot Puffer: 800ml H<sub>2</sub>O + 100ml 10xCAPS + 100ml Methanol

#### TBS (10x):

Tris: 12,12g

NaCl: 87,6g

- auf 1000ml mit Aqua dest. auffüllen und pH 7,5 einstellen
- daraus 1xTBST: 100ml 10xTBS + 900ml H<sub>2</sub>O + 800µl Tween

#### Tris/HCl-Stock (0,5M; pH 6,8):

Tris: 6,5g

- auf 50ml mit Aqua dest. auffüllen und pH 6,8 einstellen

#### Tris/HCl-Stock (1M; pH 7,5):

Tris: 3,05g

- auf 50ml mit Aqua dest. auffüllen und pH 7,5 einstellen

### 8.7.4 Western Blots - Hämoglobin WB

Trenngel (ges. Vol. von 30ml):

	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>
Sol 1:	7,5ml	10ml	12ml	15ml
Sol 2:	7,5ml	7,5ml	7,5ml	7,5ml
H <sub>2</sub> O:	15ml	12,5ml	10,5ml	7,5ml

TEMED: 15-20µl

APS:  
(10%) 200µl

Sammelgel (ges. Vol. von 13,2ml):

Sol 1:	2,4ml
Sol 3:	4ml
H <sub>2</sub> O:	6,8ml

TEMED: 10µl

APS:  
(10%) 100µl

- Gele im Anschluss in feuchten Zellstoff wickeln und in Frischhaltebeutel bei +4°C lagern

### 8.7.5 Plasminogen Zymographie

Trenngel:

Sol 1:	7,5ml
Sol 2:	7,5ml
Plasminogen Stock (Belgien):	15ml

TEMED: 20µl

APS (10%): 200µl

**Sammelgel:**

Sol 1:	2,4ml
Sol 3:	4ml
H <sub>2</sub> O:	6ml
TEMED:	10µl
APS (10%):	100µl

**Homogenisierungspuffer:**

Tris/HCl (pH 8,1):	1ml
Triton X-100:	20µl
Aqua dest.:	10ml

- Gele 1h bei Raumtemperatur in 2% Triton X-100 waschen (1ml Triton X-100 + 50ml H<sub>2</sub>O) und im Anschluss kurz in Aqua dest. waschen
- über Nacht in Tris/HCl (pH 8,1) (5ml Tris/HCl + 50ml H<sub>2</sub>O) legen

**8.7.6 MMP Zymographie**

**Trenngel:**

Sol 1:	7,5ml
Sol 2:	7,5ml
Gelatinelösung:	15ml (500mg Gelatine in 50ml Aqua dest.)
TEMED:	10µl
APS (10%):	100µl

**Sammelgel:**

Sol 1:	2,4ml
Sol 3:	7,5ml
H <sub>2</sub> O:	6ml
TEMED:	10µl
APS (10%):	100µl

**Homogenisierungspuffer:**

Tris/HCl (50mM pH 7,5)	10ml (1ml 0,5mM Tris/HCl (pH 7,5) + 9ml Aqua dest.)
NaCl 5M	150µl
PMSF	100µl (erst kurz vor dem Gebrauch hinzugeben!)

**8.7.7 Reverse Zymographie****Trenngel:**

Sol 1:	5ml
Sol 2:	2,5ml
H <sub>2</sub> O:	1,03ml
Gelatinelösung:	1,67ml (15mg/ml Gelatine in Aqua dest.)
Standard:	25µl
TEMED:	5µl
APS (10%):	80µl

**Sammelgel:**

Sol 1:	2,4ml
Sol 3:	4ml
H <sub>2</sub> O:	6,8ml
TEMED:	10µl
APS (10%):	100µl

**Homogenisierungspuffer (sofort verwenden):**

Triton X-100:	10µl
Tris-HCL (pH 8,1):	500µl
Aqua dest.:	5ml

## 8.8 Färben & Entfärben bei der Zymographie

### Fixierlösung:

Essigsäure (10%)	50ml
Methanol (50%)	250ml
Aqua dest.	250ml

### Farblösung:

Coomassie (Brillantblau):	0,25g
Ethanol (70%):	25ml
Essigsäure (20%):	25ml

### Entfärbelösung:

Ethanol (70%):	250ml
Essigsäure (20%):	250ml

## 9 Anhang (Ergebnisse)

### 9.1 Tabelle sämtlicher Einzelergebnisse

	WT NT	WT HT	Plg <sup>-/-</sup> NT	Plg <sup>-/-</sup> HT	tPA <sup>-/-</sup> NT	tPA <sup>-/-</sup> HT
<b>Infarkt volumen</b>	59,00	43,40	40,01	49,23	40,95	44,74
SD	12,54	13,89	10,04	15,35	15,63	8,37
SEM	3,13	3,47	3,79	4,63	4,17	3,16
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,002		0,14		0,559	
tTest - NT vs. NT			0,00		0,002	
tTest - HT vs. HT				0,31		0,816
<b>Hämoglobin</b>	4,15	2,80	2,02	1,58	1,94	4,32
SD	2,51	0,99	0,36	0,76	1,63	2,18
SEM	0,62	0,24	0,14	0,23	0,38	0,82
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,050		0,182		0,007	
tTest - NT vs. NT			0,004		0,004	
tTest - HT vs. HT				0,002		0,123
<b>tPA</b>	1,01	1,09	0,78	0,90		
SD	0,20	0,22	0,16	0,18		
SEM	0,05	0,05	0,06	0,05		
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,510		0,171			
tTest - NT vs. NT			0,018			
tTest - HT vs. HT				0,074		
<b>uPA</b>	11,25	4,56	6,23	5,54	6,41	4,55
SD	8,05	4,38	2,28	5,73	6,29	1,63
SEM	2,15	1,10	0,86	1,73	1,57	0,62
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,008		0,768		0,455	
tTest - Kontrolle NT vs. KO NT			0,045		0,076	
tTest - Kontrolle HT vs. KO HT				0,618		0,994
<b>PAI-1</b>	1,49	0,90	0,89	0,52	1,14	0,81
	0,63	0,41	0,30	0,26	0,42	0,30
	0,16	0,10	0,11	0,08	0,10	0,12
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,004		0,011		0,076	
tTest - Kontrolle NT vs. KO NT			0,029		0,071	
tTest - Kontrolle HT vs. KO HT				0,010		0,587
<b>MMP-9</b>	12,58	3,75	10,08	9,07	9,79	9,27
SD	15,86	2,13	3,44	7,68	6,91	1,22
SEM	4,24	0,55	1,29	2,43	1,72	0,50
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,050		0,750		0,001	
tTest - Kontrolle NT vs. KO NT			0,688		0,862	
tTest - Kontrolle HT vs. KO HT				0,050		0,001
<b>MMP-2</b>	2,47	1,48	2,22	1,66	1,88	2,29
SD	2,07	0,76	1,99	1,00	1,44	0,93
SEM	0,52	0,19	0,75	0,30	0,35	0,38
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,090		0,436		0,530	
tTest - Kontrolle NT vs. KO NT			0,798		0,354	
tTest - Kontrolle HT vs. KO HT				0,592		0,050

	WT NT	WT HT	P1g <sup>-/-</sup> NT	P1g <sup>-/-</sup> HT	tPA <sup>-/-</sup> NT	tPA <sup>-/-</sup> HT
<b>MMP-3</b>	1,39	1,52	1,03	0,88	1,05	0,96
SD	0,39	0,85	0,12	0,21	0,25	0,10
SEM	0,14	0,30	0,05	0,06	0,09	0,04
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,701		0,116		0,841	
tTest - Kontrolle NT vs. KO NT			0,038		0,050	
tTest - Kontrolle HT vs. KO HT				0,073		0,192
<b>TIMP-1</b>	1,29	1,60	1,30	1,09	1,05	1,01
SD	0,68	1,06	0,31	0,26	0,19	0,32
SEM	0,17	0,26	0,12	0,08	0,06	0,12
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,330		0,128		0,778	
tTest - Kontrolle NT vs. KO NT			0,959		0,247	
tTest - Kontrolle HT vs. KO HT				0,080		0,050
<b>TIMP-2</b>	1,19	1,23	1,39	1,16	0,93	1,08
SD	0,48	0,49	0,41	0,32	0,21	0,33
SEM	0,14	0,13	0,15	0,09	0,06	0,12
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,819		0,195		0,218	
tTest - Kontrolle NT vs. KO NT			0,349		0,107	
tTest - Kontrolle HT vs. KO HT				0,685		0,470
<b>EMMPRIN</b>	1,82	1,25	1,19	1,10	1,12	1,15
SD	1,00	0,41	0,19	0,16	0,18	18,00
SEM	0,25	0,10	0,08	0,05	0,05	0,07
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,049		0,315		0,771	
tTest - Kontrolle NT vs. KO NT			0,028		0,015	
tTest - Kontrolle HT vs. KO HT				0,261		0,525

	uPA <sup>-/-</sup> NT	uPA <sup>-/-</sup> HT	PAI-1 <sup>-/-</sup> NT	PAI-1 <sup>-/-</sup> HT
<b>Infarkt volumen</b>	44,41	27,61	77,90	60,48
SD	22,96	8,14	36,11	31,44
SEM	6,92	3,08	10,88	14,06
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,044		0,370	
tTest - NT vs. NT	0,043		0,063	
tTest - HT vs. HT		0,011		0,297
<b>Hämoglobin</b>	1,84		3,08	1,45
SD	0,93		3,15	0,24
SEM	0,25		0,95	0,11
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,005		0,116	
tTest - NT vs. NT	0,003		0,336	
tTest - HT vs. HT		0,013		0,001
<b>tPA</b>	1,05	1,11	1,14	1,17
SD	0,25	0,07	0,25	0,23
SEM	0,07	0,03	0,07	0,10
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe			0,334	
tTest - NT vs. NT			0,148	
tTest - HT vs. HT				0,681

	uPA <sup>-/-</sup> NT	uPA <sup>-/-</sup> HT	PAI-1 <sup>-/-</sup> NT	PAI-1 <sup>-/-</sup> HT
<b>uPA</b>			3,13	6,06
SD			1,33	3,48
SEM			0,40	1,55
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe			0,135	
tTest -Kontrolle NT vs. KO NT			0,002	
tTest - Kontrolle HT vs.KO HT				0,495
<b>PAI-1</b>	1,79	0,83		
	0,80	0,28		
	0,21	0,11		
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,001			
tTest -Kontrolle NT vs. KO NT	0,255			
tTest - Kontrolle HT vs.KO HT		0,681		
<b>MMP-9</b>	8,56	7,92	15,83	8,29
SD	4,25	5,11	10,14	4,51
SEM	1,18	1,93	3,21	2,01
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,372		0,142	
tTest -Kontrolle NT vs. KO NT	0,223		0,576	
tTest - Kontrolle HT vs.KO HT		0,074		0,087
<b>MMP-2</b>	1,77	1,73	3,45	2,82
SD	1,64	0,64	2,19	2,58
SEM	0,45	0,24	0,66	1,15
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,952		0,622	
tTest -Kontrolle NT vs. KO NT	0,333		0,248	
tTest - Kontrolle HT vs.KO HT		0,461		0,313
<b>MMP-3</b>		1,08	1,54	1,03
SD		0,16	0,28	0,24
SEM		0,06	0,16	0,11
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe			0,037	
tTest -Kontrolle NT vs. KO NT			0,581	
tTest - Kontrolle HT vs.KO HT		0,193		0,162
<b>TIMP-1</b>	1,04	1,00	1,04	1,15
SD	0,25	0,34	0,17	0,37
SEM	0,07	0,13	0,05	0,16
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,707		0,381	
tTest -Kontrolle NT vs. KO NT	0,241		0,242	
tTest - Kontrolle HT vs.KO HT		0,050		0,375
<b>TIMP-2</b>	1,16	1,07	1,12	1,32
SD	0,50	0,32	0,39	0,64
SEM	0,14	0,12	0,12	0,29
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,671		0,454	
tTest -Kontrolle NT vs. KO NT	0,909		0,716	
tTest - Kontrolle HT vs.KO HT		0,381		0,749
<b>EMMPRIN</b>	1,37	1,09	1,03	0,82
SD	0,47	0,13	0,24	0,78
SEM	0,12	0,05	0,07	0,35
tTest - Vergleich innerhalb der Gruppe	0,049		0,600	
tTest -Kontrolle NT vs. KO NT	0,141		0,008	
tTest - Kontrolle HT vs.KO HT		0,325		0,297

## 9.2 Plasminogen Knock-Out Mutante

### 9.2.1 MMP Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2

<b>TIMP-1</b>			
C57Bl/6 WT NT	C57Bl/6 WT HT	Plg KO NT	Plg KO HT
1,29 ± 0,179	1,6 ± 0,26	1,3 ± 1,085	1,085 ± 0,079
NT vs. KO NT	HT vs. KO HT	KO NT vs. KO HT	
p = 0,959	p = 0,08	p = 0,128	

<b>TIMP-2</b>			
C57Bl/6 WT NT	C57Bl/6 WT HT	Plg KO NT	Plg KO HT
1,19 ± 0,14	1,23 ± 0,13	1,39 ± 0,13	1,16 ± 0,094
NT vs. KO NT	HT vs. KO HT	KO NT vs. KO HT	
p = 0,349	p = 0,685	p = 0,195	

Tabelle 6: Analyse der beiden MMP Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 ohne signifikante Veränderungen.

## 9.3 tPA KO

### 9.3.1 Die MMP Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2

<b>TIMP-1</b>			
C57Bl/6 WT NT	C57Bl/6 WT HT	tPA KO NT	tPA KO HT
1,29 ± 0,17	1,6 ± 0,26	1,047 ± 0,055	1,01 ± 0,12
NT vs. KO NT	HT vs. KO HT	KO NT vs. KO HT	
p = 0,247	p = 0,05	p = 0,778	

<b>TIMP-2</b>			
C57Bl/6 WT NT	C57Bl/6 WT HT	tPA KO NT	tPA KO HT
1,19 ± 0,14	1,23 ± 0,13	0,93 ± 0,057	1,08 ± 0,12
NT vs. KO NT	HT vs. KO HT	KO NT vs. KO HT	
p = 0,107	p = 0,47	p = 0,218	

Tabelle 7: Analyse der beiden MMP Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2.

## 9.4 uPA KO

## 9.5 PAI-1<sup>-/-</sup> Mutanten

### 9.5.1 MMP-9 und MMP-2

<b>MMP-9</b>			
C57Bl/6 WT NT	C57Bl/6 WT HT	PAI-1 KO NT	PAI-1 KO HT
12,58 ± 4,24	3,75 ± 0,55	15,83 ± 3,2	8,29 ± 2,01
NT vs. KO NT	HT vs. KO HT	KO NT vs. KO HT	
p = 0,576	p = 0,087	p = 0,142	

<b>MMP-2</b>			
C57Bl/6 WT NT	C57Bl/6 WT HT	PAI-1 KO NT	PAI-1 KO HT
2,47 ± 0,52	1,48 ± 0,19	3,45 ± 0,66	2,82 ± 1,15
NT vs. KO NT	HT vs. KO HT	KO NT vs. KO HT	
p = 0,248	p = 0,313	p = 0,622	

Tabelle 8: Ergebnisse der Analyse von MMP-9 und MMP-2.

### 9.5.2 MMP Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2

<b>TIMP-1</b>			
C57Bl/6 WT NT	C57Bl/6 WT HT	PAI-1 KO NT	PAI-1 KO HT
1,29 ± 0,17	1,6 ± 0,26	1,04 ± 0,05	1,15 ± 0,16
NT vs. KO NT	HT vs. KO HT	KO NT vs. KO HT	
p = 0,242	p = 0,375	p = 0,381	

<b>TIMP-2</b>			
C57Bl/6 WT NT	C57Bl/6 WT HT	PAI-1 KO NT	PAI-1 KO HT
1,19 ± 0,14	1,23 ± 0,13	1,12 ± 0,12	1,32 ± 0,286
NT vs. KO NT	HT vs. KO HT	KO NT vs. KO HT	
p = 0,716	p = 0,749	p = 0,454	

Tabelle 9: Quantifizierung von TIMP-1 und TIMP-2. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen

## 10 Referenzen

- [1] Abbott, N.J.: Comparative physiology of the blood-brain barrier. Bradbury MW (ed) Physiology and pharmacology of the bloodbrain barrier. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 371-396; 1992.
- [2] Ahn, M.Y.; Zhang, Z.G.; Tsang, W.; Chopp, M.: Endogenous plasminogen activator expression after embolic focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* 837: 169-176; 1999.
- [3] Allt, G. & Lawrenson, J.G.: Pericytes: Cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* 169: 1-11; 2001.
- [4] Ames, A. III; Wright R.L.; Kowada M.; Thurston, J.M.; Majno, G.: Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am.J.Pathol.* 52: 437-453; 1968.
- [5] Anderson, J.M. & van Itallie, C.M.: Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol* 269: 467-475; 1995.
- [6] Andreasen, P.A.; Kjäller, L.; Christensen, L.; Duffy, M.J.: The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int. J. Cancer* 72:1-22; 1997.
- [7] Astrup, J.; Siesjö, B.K.; Symon, L.: Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12: 723-5; 1981.
- [8] Azzimondi, G.; Bassein, L.; Nonino, F.: Fever in acute stroke worsens prognosis. *Stroke* 6: 2461-44; 1995.
- [9] Barber, P.A.; Hoyte, L.; Colbourne, F.; Buchan, A.M.: Temperature-Regulated Model of Focal Ischemia in the Mouse: A Study With Histopathological and Behavioral Outcomes. *Stroke* 35: 1720-1725; 2004.
- [10] Barthels, M. & von Depka, M.: *Das Gerinnungskompodium*. Georg Thieme Verlag Stuttgart; 2003.
- [11] Benninghoff, A.: „Anatomie: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen“ Band 2: Niere, Reproduktionsorgane, endokrine Drüsen, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut 15. Auflage, Verlag Urban & Schwarzenberg, München 219-627; 1993.
- [12] Bernard, S.A.; Gray, T.W.; Buist, M.D.; Jones, B.M.; Silvester, W.; Gutteridge, G.; Smith, K.: Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med* 346: 557-563; 2002.
- [13] Bernhard, E. J.; Gruber, S. B.; Muschel, R. J.: Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91: 4293-4297; 1994.
- [14] Birkedal-Hansen, H.; Moore, W.G.; Bodden, M.K.: Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197-250; 1993.
- [15] Biswas, C.; Zhang, Y.; DeCastro, R.; Guo, H.; Nakamura, T.; Kataoka, H.; Nabeshima, K: The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Caner Res* 55: 434-9; 1995.
- [16] Bradbury, M.W.: The blood-brain barrier. *Exp Physiol* 78: 453-72; 1993.
- [17] Bradbury, M.W.: The concept of a blood-brain barrier. Wiley-Interscience Publication John Wiley & Sons, Chichester, New York; 1979.
- [18] Brew, K.; Dinakarandian, D.; Nagase, H.: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477: 267-83; 2000.
- [19] Brightman, M.W.: The anatomic basis of the blood-brain barrier. In: Neuwelt MD, Edward, A. (ed) *Implications of the blood-brain barrier and its manipulation*, vol 1. Plenum Publishing Corporation, New York, 53-83; 1989.

- 
- [20] Brown, R.D.; Whisnant, J.P.; Sicks, S.D.; O'Fallon, W.M.; Wiebers, D.O.: Stroke incidence, prevalence and survival. Secular trends in Rochester, Minnesota, Through 1989. *Stroke* 27:373-80; 1996.
- [21] Burggraf, D.; Marten, H.K.; Liebtrau, M.; Vosko, M.R.; Dichgans, M.; Hamann, G.H.: A new approach to reduce the number of animals used in experimental focal cerebral ischemia models. *Neuroscience Letters* 386: 88-93. 2005a.
- [22] Burggraf, D.; Liebtrau, M.; Martens, H.K.; Wunderlich, N.; Jäger, G.; Dichgans, M.; Hamann, G.H.: Matrix metalloproteinase induction by EMMRPRIN in experimental focal cerebral ischemia. *Eur J Neurosci* 22: 273-277; 2005b.
- [23] Burggraf, D.; Martens, H.K.; Dichgans, M.; Hamann, G.F.: Matrix metalloproteinase (MMP) induction and inhibition at different doses of recombinant tissue plasminogen activator following experimental stroke. *Thromb Haemost.* 98: 963-9; 2007.
- [24] Burggraf, D.; Martens, H.K.; Jäger, G.; Hamann, G.F.: Recombinant human tissue plasminogen activator protects the basal lamina in experimental focal cerebral ischemia. *Thromb Haemost.* 89:1072-80; 2003.
- [25] Burggraf, D.; Martens, H.K.; Wunderlich, N.; Jäger, G.; Hamann, G.F.: Rt-PA causes a significant increase in endogenous u-PA during experimental focal cerebral ischemia. *Eur J Neurosci.* 20: 2903-8; 2004.
- [26] Burggraf, D.; Trinkl, A.; Burk, J.; Martens, H.K.; Dichgans, M.; Hamann, G.F.: Vascular integrin immunoreactivity is selectively lost on capillaries during rat focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.*, 1189:189-97; 2008.
- [27] Buriijn, J.A.; Hogendoorn, P.C.W.; Hoedemaeker, P.J.; Fleuren, G.J.: The extracellular matrix in pathology. *J Lab Clin Med* 111: 140-149; 1988.
- [28] Burk, J.; Burggraf, D.; Vosko, M.; Dichgans, M.; Hamann, G.F.: Protection of cerebral microvasculature after moderate hypothermia following experimental focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* 1226: 248-55; 2008.
- [29] Caplan, L.R.: Brain embolism, revisited. *Neurology* 43: 1281-1287; 1993.
- [30] Caplan, L.R.: Of birds and nests and brain emboli. *Rev. Neuro.* 147: 265-273; 1991.
- [31] Chiamulera, C.; Albertini, P.; Valerio, E.; Reggiani, A.: Activation of metabotropic receptors has a neuroprotective effect in a rodent model of focal ischaemia. *Eur J Pharmacol* 216: 335-336; 1992.
- [32] Chiamulera, C.; Terron, A.; Reggiani, A.; Cristofori, P.: Qualitative and quantitative analysis of the progressive cerebral damage after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res* 606: 251-258; 1993.
- [33] Collen D.: On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost.* 18; 43: 77-89; 1980.
- [34] Corbett, D.; Thornhill, J.: Temperature Modulation (Hypothermic and Hyperthermic Conditions) and Its Influence on Histological and Behavioral Outcomes Following Cerebral Ischemia. *Brain Pathology* 10: 145-152; 2000.
- [35] De Georgia, M.A.; Krieger, D.W.; Abou-Chebl, A.; Devlin, T.G.; Jaus, M.; Davis, S.M.; Koroshetz, W.J.; Rordorf, G.; Warach, S.: Cooling for Acute Ischemic Brain Damage (COOL AID): a feasibility trial of endovascular cooling. *Neurology* 63: 312-317; 2004
- [36] DeCastro, R.; Zhang, Y.; Guo, H.; Kataoka, H.; Gordon, M.K.; Toole, B.; Biswas, G.: Human keratinocytes express EMMRPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. *J Invest Dermatol.* 106: 1260-5; 1996.
- [37] del Mar Barbacid, M.; Fernández-Resca, P.; Buesa, J.M.; Márquez, G.; Aracil, M.; Quesadaand, A.R.; Mira, E.: Expression and purification of human stromelysin 1 and 3 from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expression and Purification* 13: 243-250; 1998.
-

- 
- [38] Del Zoppo, G.J.: Microvascular changes during cerebral ischemia and reperfusion. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 6: 47–96; 1994.
- [39] Del Zoppo, G.J.; Higashida, R.T.; Furlan, A.J.; Pessin, M.S.; Rowley, H.A.; Gent, M.: PROACT: A phase II randomized trial of recombinant pro-urokinase by direct arterial delivery in acute middle cerebral artery stroke. *PROACT Investigators. Prolyse in acute cerebral Thromboembolism.* *Stroke* 29: 4-11; 1998.
- [40] Del Zoppo, G.J.; von Kummer, R.; Hamann, G.F.: Ischaemic damage of brain microvessels: Inherent risks for thrombolytic treatment in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65: 1-9; 1998b.
- [41] Dermietzel, R.: Junctions in the central nervous system of the cat. IV. Interendothelial junctions of cerebral blood vessels from selected areas of the brain. *Cell Tissue Res* 164: 45-62; 1975.
- [42] Deryugina, E.I.; Ratnikov, B.; Monosov, E.; Postnova, T.I.; DiScipio, R.; Smith, J.W.; Strongin, A.Y.: MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin  $\alpha v \beta 3$  promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 263: 209-23; 2001.
- [43] Diaz-Flores, L.; Gutierrez, R.; Varela, H.; Rancel, N.; Valladares, F.: Microvascular pericytes: A review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol* 6: 269-286; 1991.
- [44] Dirnagl, U.; Iadecola, C.; Moskowitz, M.A.: Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22: 391-397; 1999.
- [45] Dirnagl, U.; Pulsinelli, W.: Autoregulation of cerebral blood flow in experimental focal brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 327-336; 1990.
- [46] Dohgu, S.; Takata, F.; Yamauchi, A.; Nakagawa, S.; Egawa, T.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Sawada, Y.; Niwa, M.; Kataoka, Y.: Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor- $\beta$  production. *Brain Res* 1038: 208-215; 2005.
- [47] Dohgu, S.; Yamauchi, A.; Takata, F.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Higuchi, S.; Sawada, Y.; Kataoka, Y.: Transforming growth factor- $\beta 1$  upregulates the tight junction and P-glycoprotein of brain microvascular endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 24: 491-497; 2004.
- [48] Drenckhahn, D.: Mikrozirkulation Kap. 9.4.2 in Benninghoff und Drenckhahn *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie Band 2.*, 16. Auflage 89-91, Urban & Fischer Verlag; 2004.
- [49] Ehrlich, H.J.; Keijer, J.; Preissner, K.T.; Gebbink, R.K.; Pannekoek, H.: Functional interaction of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and heparin. *Biochemistry*, 30: 1021-8; 1991.
- [50] Ellis, S.M.; Nabeshima, K.; Biswas, C.: Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. *Cancer Res* 49: 3385-91; 1989.
- [51] Erickson, L.A.; Hekman, C.M.; Loskutoff, D.H.: The primary plasminogen activator inhibitors in endothelial cells, platelets, serum and plasma are immunologically related. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8710-8714; 1985.
- [52] Farquhar, M.G. & Palade, G.E.: Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17: 375-412; 1963.
- [53] Firbas, W.; Sinzinger, H.; Schlemmer, M.: „Über den Circulus arteriosus bei Ratte, Maus und Goldhamster“. *Anat Histol Embryol* 2: 243-251; 1973.
- [54] Fröhlich, D.; Wittmann, S.; Rothe, G.; Sessler, D.I.; Vogel, P.; Taeger, K.: Mild Hyperthermia Downregulates Receptor-dependent Neutrophil Function. *Anesth Analg.* 99: 284–292; 2004.
- [55] Fryer, H.J.; Knox, R.J.; Strittmatter, S.M.; Kalb, R.G.: Excitotoxic death of a subset of embryonic rat motor neurons in vitro. *J. Neurochem.* 72: 500-513; 1999.
-

- 
- [56] Fujimura, M.; Gasche, Y.; Morita-Fujimura, Y.; Massengale, J.; Kawase, M.; Chan, P.H.: Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.* 842: 92-100; 1999.
- [57] Garcia, J.H.; Wagner, S.; Liu, K.F.; Hu, X.J.: Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. 4. *Stroke* 26: 627-634; 1995.
- [58] Gartshore, G.; Patterson, J.; Macrae, I.M.: Influence of ischemia and reperfusion on the course of brain tissue swelling and blood-brain barrier permeability in a rodent model of transient focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* 147: 353-360; 1997.
- [59] Gasche, Y.; Copin, J.C.; Sugawara, T.; Fujimura, M.; Chan, P.H.: Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 21: 1393-400; 2001.
- [60] Geisler, S.; Lichtinghagen, R.; Boker, K.H.: Differential distribution of five members of the matrix metalloproteinase family and one inhibitor (TIMP-1) in human liver and skin. *Cell Tissue Res* 289: 173-183; 1997.
- [61] Ginsberg, M.D.: Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke* 34: 214-223; 2003.
- [62] Ginsberg, M.D.; Sternau, L.L.; Globus, Y.T.: Therapeutic modulation of brain temperature: Relevance to ischemic brain injury. *Cereb Brain Metab Rev* 4: 189-225; 1992.
- [63] Gladstone, D.J.; Black, S.E.; Hakim, A.M.: Heart and stroke foundation of Ontario Centre of \*, Excellence in Stroke Recovery. Toward wisdom from failure. Lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke* 33: 2123-36; 2002.
- [64] Goldberg, G.I. et al. *J. Biol. Chem.* 267: 4583; 1992.
- [65] Gomez, D.E.; Alonso, D.F.; Yoshiji, H.: Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74: 111-22; 1997.
- [66] Granger, H.J.; Yuan, Y.; Zawieja, D.C.: Ultrastructural basis of leucocyte migration through the microvascular membran. *Physiology and Pathophysiology of Leucocyte Adhesion* (Granger, D.N. Schmid-Schönbein, G.W.; eds), New York, Oxford University Press, 187-189; 1995.
- [67] Gregoire, N.: The blood-brain barrier. *J Neuroradiol* 16: 238-250; 1989.
- [68] Guo, H.; Zucker, S.; Gordon, M.K.; Toole, B.P.; Biswas, C.: Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 272: 24-7; 1997.
- [69] HACA study - The Hypothermia after cardiac arrest study group: Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med* 346: 549-556; 2002.
- [70] Hacke, W.; Kaste, M.; Bluhmki, E.; Brozman, M.; Dávalos, A.; Guidetti, D.; Larrue, V.; Lees, K.R.; Medeghri, Z.; Machnig, T.; Schneider, D.; von Kummer, R.; Wahlgren, N.; Toni, D.: For the ECASS investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 h after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359: 1317-29; 2008.
- [71] Hafferl, A.: „Lehrbuch der topographischen Anatomie“ 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin 1-207; 1957.
- [72] Hahn-Dantona, E.; Ramos-DeSimone, N.; Siple, J.; Nagase, H.; French, D.L.; Quigley, J.P.: Activation of proMMP-9 by a plasmin/MMP-3 cascade in a tumor cell model. Regulation by tissue inhibitors of metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci.* 878: 372-87; 1999.
- [73] Hamann, G.F.; Burggraf, D.; Martens, H.K.; Liebetrau, M.; Jäger, G.; Wunderlich, N.; DeGeorgia, M.; Krieger, D.W.: Mild to Moderate Hypothermia Prevents Microvascular Basal Lamina Antigen Loss in Experimental Focal Cerebral Ischemia *Stroke* 35: 764-769; 2004.
-

- 
- [74] Hamann, G.F.; del Zoppo, G.J.; von Kummer, R.: Hemorrhagic transformation of cerebral infarction - possible mechanisms. *Thromb Haemost* 82 Suppl 1: 92-94; 1999.
- [75] Hamann, G.F.; Okada, Y.; del Zoppo, G.J.: Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 1373-1378; 1996.
- [76] Hamann, G.H.; Liebtrau, M.; Martens, H.; Burggraf, D.; Kloss, C.U.; Bultemeier, G.; Wunderlich, N.; Jager, G.; Pfefferkorn, T.: Microvascular basal lamina injury after experimental focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 526-533; 2002.
- [77] Hamann, G.H.; Okada, Y.; Fitridge, R.; del Zoppo, G.J.: Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 26: 2120-2126; 1995.
- [78] Hara, H.; Huang\*, P.L.; Panahian, N.; Fishman\*, M.C.; Moskowitz, M.A.: Reduced Brain Edema and Infarction Volume in Mice Lacking the Neuronal Isoform of Nitric Oxide Synthase After Transient MCA Occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 16: 605-611; 1996.
- [79] Haseloff, R.F.; Blasig, I.E.; Bauer, H.-C.; Bauer, H.: In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 25: 26-39; 2005.
- [80] Hata, R.; Mies, G.; Wiessner, C.: A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice: hemodynamic, biochemical, and magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 367-375; 1998.
- [81] Heck, L.W.; Blackburn, W.D.; Irwin, M.H.; Abrahamson, D.R.: Degradation of basement membrane laminin by human neutrophil elastase and cathepsin. *G Am J Pathol* 136: 1267-1274; 1990.
- [82] Heo, J.H.; Lucero, J.; Abumiya, T.; Koziol, J.A.; Copeland, B.R.; del Zoppo, G.J.: Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 624-633; 1999.
- [83] Heussen, C.; Dowdle, E.B.: Electrophoretic analysis of plasminogen-activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 102: 196-202; 1980.
- [84] Hipps, D.S.; Hembry, R.M.; Docherty, A.J.: Purification and characterization of human 72-kDa gelatinase (type IV collagenase). Use of immunolocalisation to demonstrate the non-coordinated regulation of the 72-kDa and 95-kDa gelatinases by human fibroblasts. *Biol Chem Hoppe Seyler* 372: 287-96; 1991.
- [85] Horstmann, S.; Kalb, P.; Koziol, J.; Gardner, H.; Wagner, S.: Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. *Stroke* 34: 2165-2170; 2003.
- [86] Hosomi, N.; Lucero, J.; Heo, J.H.; Koziol, J.A.; Copeland, B.R.; del Zoppo, G.J.: Rapid differential endogenous plasminogen activator expression after acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 32: 1341-1348; 2001.
- [87] Hossmann, K.A. & Sato, K.: The effect of ischemia on sensorimotor cortex of cat. Electrophysiological, biochemical and electromicroscopical observations. *Z Neurol* 198: 33-45; 1970.
- [88] Hossmann, K.A.: Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc. Brain Metab Rev.* 8: 195-208; 1996.
- [89] Hossmann, K.A.; Olsson Y.: Suppression and recovery of neuronal function in transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 22: 313-25; 1970.
- [90] Huh, P.W.; Belayev, L.; Zhao, W.; Koch, S.; Busto, R.; Ginsberg, M.D.: Comparative neuroprotective efficacy of prolonged moderate intransischemic and postischemic hypothermia in focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 92: 91-9; 2000.
-

- 
- [91] Huhtala, P.; Tuuttila, A.; Chow, L.T.: Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *J Biol Chem.* 266: 16485-90; 1991.
- [92] Imai, K.; Yokohama, Y.; Nakanishi, I.: Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J Biol Chem* 270: 6691-7; 1995.
- [93] IST (The International Stroke Trial): A randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke. *International Stroke Trial Col-Volume 15 Number 1 Part 2 Smith • S11 laborative Group. Lancet* 349: 1569–1581; 1997.
- [94] Kasinrerk, W.; Fiebiger, E.; Stefanova, I.; Baumruker, T.; Knapp, W.; Stockinger, H.: Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J Immunol.* 149: 847-54; 1992.
- [95] Kawai, N.; Okauchi, M.; Morisaki, K.; Nagao, S.: Effects of delayed intras ischemic and postischemic hypothermia on a focal model of transient cerebral ischemia in rats. *Stroke* 31: 1982-1999; 2000.
- [96] Kazes, I.; Delarue, F.; Hagege, J.; Bouzahir-Sima, L.; Rondeau, E.; Sraer, J.D.; Nguyen, G.: Soluble latent membrane-type 1 matrix metalloprotease secreted by human mesangial cells is activated by urokinase. *Kidney Int.* 54: 1976 –1984; 1998.
- [97] Kloss, C.U.; Thomassen, N.; Fesl, G.; Martens, K.H.; Yousri, T.A.; Hamann, G.H.: Tissue-saving infarct volumetry using histochemistry validated by MRI in rat focal ischemia. *Neurol Res* 24: 713-718; 2002.
- [98] Kniessel, U. and Wolburg, H.: Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 20: 57-76; 2000.
- [99] Kobayashi, H.; Schmitt, M.; Goretzki, L.; Chuchulowski, N.; Calvete, J.; Kramer, M.; Günzler, W.A.; Jänicke, F.; Graeff, H.: Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA). *J. Biol. Chem.* 266: 5147-5152; 1991.
- [100] Koizumi, J.; Nakazawa, T.; Yoshida, Y.: Reperusable brain infarction model in the rat (abstract). *Proceedings of the 10th Meeting of the Japanese Stroke Society, Kyoto, Japan, 18-19, 159; 1985.*
- [101] Kolkenbrock, H.; Hecker-Kia, A.; Orgel, D.; Ulbrich, N.; Will, H.: Activation of progelatinase A and progelatinase A/TIMP-2 complex by membrane type 2-matrix metalloproteinase, *Biol. Chem.* 378: 71-76, 1997.
- [102] Krieger, D.W.; De Georgis, M.A.; Abou-Chebl, A.: Cooling for acute ischemic brain damage (COOL AID): An open pilot study of induced hypothermia in acute ischemic stroke. *Stroke* 32: 1847-54; 2001.
- [103] Laas, R.; Igloffstein, J.; Meyerhoff: Cerebral infarction due to carotid occlusion and carbon monoxide exposure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 46: 756-773; 1983.
- [104] Lapchak, P.A.; Chapman, D.F.; Zivin, J.A.: Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke.* 31: 3034-3040; 2000.
- [105] Lauer-Fields, J.L.; Sritharan, T.; Stack, M.S.: Selective hydrolysis of triplehelical substrates by matrix metalloproteinase-2 and -9. *J Biol Chem* 278: 18140-5; 2003.
- [106] Lees, K.R.; Dyker, A.G.; Sharma, A.; Ford, G.A.; Ardron, M.E.; Grosset, D.G.: Tolerability of the low-affinity, use-dependent NMDA antagonist AR-R15896AR in stroke patients: a dose-ranging study. *Stroke* 32: 466–472; 2001.
- [107] Lees, K.R.; Zivin, J.A.; Ashwood, T.; Davalos, A.; Davis, S.M.; Diener, H.C.; Grotta, J.; Lyden, P.; Shuaib, A.; Hårdemark, H.G.; Wasiewski, W.W.: NXY-059 for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med.* 354: 588-600; 2006.
-

- 
- [108] Levine, S. and Sohn, D.: Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. Relation to incomplete circle of Willis. *Arch Pathol* 87: 315-317; 1969.
- [109] Liebetrau, M.; Burggraf, D.; Martens, H.K.; Pichler, M.; Hamann, G.F.: Delayed moderate hypothermia reduces calpain activity and breakdown of its substrate in experimental focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 26, 357: 17-20; 2004.
- [110] Liebmann, M.; Schünke, M.; Schünke, G.: Blutversorgung des Gehirns, Basiswissen Neuroanatomie Georg Thieme Verlag, Stuttgart 113-117; 1993.
- [111] Lijnen, H.R.; van Hoef, B.; Lupu, F.; Moons, L.; Carmeliet, P.; Collen, D.: Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteiniase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 18: 1035-1045; 1998.
- [112] Lim, M.; Martinez, T.; Jablons, D.; Cameron, R.; Guo, H.; Toole, B.; Li, J.D.; Basbaum, C.: Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38. *FEBS Lett* 441: 88-92; 1998.
- [113] Lipton, S.A.; Rosenberg, P.A.: Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl. J. Med.* 330: 613-622; 1994.
- [114] Liu, J.K.; Rosenberg, G.A.: Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med.* 1, 39: 71-80; 2005.
- [115] Longa, E.Z.; Weinstein, P.R.; Carlson, S.: Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84-91; 1989.
- [116] Loy, M.; Burggraf, D.; Martens, K.H.; Liebetrau, M.; Wunderlich, N.; Bultemeier, G.; Nemori, R.; Hamann, G.F.: A gelatin in situ-overlay technique localizes brain matrix metalloproteinase activity in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurosci Methods* 116: 125-133; 2002.
- [117] Lukes, A.; Mun-Bryce, S.; Lukes, M.: Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. *Mol Neurobiol.* 19: 267-284; 1999.
- [118] Magdolen, V.; Bürgle, M.; Arroyo de Prada, N.; Schmiedeberg, N.; Riemer, C.; Schroeck, F.; Kellermann, J.; Degitz, K.; Wilhelm, O.G.; Schmitt, M.; Kessler, H.: Cyclo19,31[D-Cys19]-uPA is a potent competitive antagonist of the interaction of urokinase type plasminogen activator with its receptor (CD87). *Biol. Chem.* 382: 1197-205; 2001.
- [119] Maier, C.M.; Ahern, K.B.; Cheng, M.L.; Lee, J.E.; Yenari, M.A.; Steingerg, G.K.: Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia. *Stroke* 29: 2171-2180; 1998.
- [120] Mainardi, C.L.; Dicit, S.N.; Kang, A.H.: Deegradation of type IV (bsaement membrane) collagen by a proteinase isolated from human polymorphonuclear leucocyte granules. *J Biol Chem* 255: 5435-5441; 1980.
- [121] Martens, Helge K.: Einfluß einer postischämischen Hypothermie auf die Basalmembran bei der experimentellen zerebralen Ischämie mit Reperfusion. Dissertation, LMU München, Medizinische Fakultät; 2006.
- [122] Martinez-Hernandez, A.; Amenta, P.S.: The basement membrane in pathology. *Lab Invest* 48: 656-677; 1983.
- [123] MAST-E; The Multicenter Acute Stroke Trial - Europe Study Group *N. Engl. J. Med.*, 335: 145; 1996.
- [124] MAST-I; Multicentre Acute Stroke Trial - Italy Group *Lancet* 346: 1509; 1995.
- [125] Matz, S.: Methodische Evaluierung der immunhistochemischen Detektion aktivierter Caspase-3 im Hippokampus als Apoptoseparameter nach inkompletter zerebraler Ischämie bei der Ratte. Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München; 2003.
-

- 
- [126] Meixenberger, J. & Renner, C.: Therapeutische Hypothermie auf der Intensivstation. *Anaesthesist*. 56: 945-8; 2007.
- [127] Menshikov, M.; Elizarova, E.; Plakida, K.: Urokinase upregulates matrix metalloproteinase-9 expression in THP-1 monocytes in gene transcription and protein synthesis. *Biochem J*. 10: 1042; 2002.
- [128] Meyer, J.S.: Circulatory changes following occlusion of the middle cerebral artery and their relation to function. *J Neurosurg* 15: 653-673; 1958a.
- [129] Meyer, J.S.: Localized changes in properties of the blood and effects of anticoagulant drugs in experimental cerebral infarction. *N Engl J Med* 258: 151-159; 1958b.
- [130] Mohr et al.: Chapter 38 - The cerebral microvasculature and responses to ischemia. ISBN 0-7216-443-06600-0; Galley, 2003.
- [131] Morrison C.J.; Butler, G.S.; Bigg, H.F.; Roberts, C.R.; Soloway, P.D.; Overall, C.M.: Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway, *J. Biol. Chem.* 276: 47402-47410; 2002.
- [132] Muir, K.W.; Holzapfel, L.; Lees, K.R.: Phase II clinical trial of sipatrigine (619C89) by continuous infusion in acute stroke. *Cerebrovasc Dis* 10: 431-436; 2000.
- [133] Mun-Bryce, S. and Rosenberg, G.A.: Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18: 1163-1172; 1998.
- [134] Murphy, G. and Knäuper, V.: Relating matrix metalloproteinase structure to Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol.* 15: 511-518; 1997.
- [135] Murphy, G.; Cockett, M.I.; Ward, R.V.: Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J*, 277: 277-9; 1991.
- [136] Nagai, N.; Suzuki, Y.; Van Hoef, B.; Lijnen, H.R.; Collen, D.: Effects of plasminogen activator inhibitor-1 on ischemic brain injury in permanent and thrombotic middle cerebral artery occlusion models in mice. *J Thromb Haemost.* 3: 1379-84; 2005.
- [137] Nagai, N.; Vanhoef, B.; Lijnen, H.R.: Plasminogen activator inhibitor-1 contributes to the deleterious effect of obesity on the outcome of thrombotic ischemic stroke in mice *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5: 1726-1731, 2007.
- [138] Nagai, N.; Vanlinthout, I.; Collen, D.: Comparative effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, and staphylokinase on cerebral ischemic infarction and pulmonary clot lysis in hamster models. *Circulation* 100: 2541-2546; 1999.
- [139] Nagase, H., Visse, R.; Murphy, G.: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 69: 562-73; 2006.
- [140] Nagase, H.: Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378: 151-60; 1997.
- [141] Nagase, H.; Enghild, J.J.; Suzuki, K.; Salvesen, G.: Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry* 29: 5783-5789; 1990.
- [142] Nagase, H.; Ogata, Y.; Suzuki, K.; Enghild, J.J.; Salvesen, G.: Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem. Soc. Trans.* 19: 715; 1991.
- [143] National Institute of neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Unit Group (NINDS): Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 333: 1581-1587; 1995.
- [144] Nienaber, V.L.; Young, S.L.; Birktoft, J.J.; Higgins, D.L.; Berliner, L.J.: Conformational similarities between one-chain and two-chain tissue plasminogen activator (t-PA): implications to the activation mechanism on onechain t-PA. *Biochemistry* 31: 3852-61; 1992.
-

- 
- [145] Noguchi, Y.; Sato, T.; Hirata, M.; Hara, T.; Ohama, K.; Ito, A.: Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 6063-72; 2003.
- [146] O'Connell, J. P.; Willenbrock, F.; Docherty, A. J.; Eaton, D.; Murphy, G.: Analysis of the role of the COOH-terminal domain in the activation, proteolytic activity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interactions of gelatinase B. *J Biol Chem* 269, 21: 14967-14973; 1994.
- [147] Ogata, Y.; Enghild, J.J.; Nagase, H.: Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 267: 3581, 1992a.
- [148] Ogata, Y.; Gonoji, Y.; Naka, K.; Tomita, K.; Nakanishi, I.; Iwata, K.; Yamashita, K.; Hayakawa, T.: Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J Biol Chem* 267: 21712, 1992b.
- [149] Okada, Y.; Konomi, H.; Yada, T.; Kimata, K.; Nagase, H.: Degradation of type IX collagen by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) from human rheumatoid synovial cells. *FEBS Lett* 244: 473-476; 1989a.
- [150] Okada, Y.; Morodomi, T.; Enghild, J.J.; Suzuki, K.; Yasui, A.; Nakanishi, I.; Salvesen, G.; Nagase, H.: Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts: purification and activation of the precursor and enzymic properties, *Eur. J. Biochem.* 194: 721-730; 1990.
- [151] Okada, Y.; Nagase, H.; Harris, E.D. Jr.: A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components: purification and characterization. *J Biol Chem* 261: 14245-14255; 1986.
- [152] Oliver, G.W.; Leferson, J.D.; Stetler-Stevenson, W.G.; Kleiner, D.E.: Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms, *Anal. Biochem.* 244: 161-166; 1997.
- [153] Ortega, N.; Behonick, D.; Stickens, D.: How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 995: 109-16; 2003.
- [154] Overgaard, K.; Sereghy, T.; Pedersen, H.: Effect of delayed thrombolysis with rt-tPA in a rat embolic stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 14: 472-477; 1993.
- [155] Petty, M.A. & Wettstein, J.G.: Elements of cerebral microvascular ischaemia. *Brain Res Res Rev* 36: 23-34; 2001.
- [156] Pfefferkorn, T. & Rosenberg, G.A.: Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke* 34: 2025-2030; 2003.
- [157] Pfefferkorn, T.; Stauffer, B.; Liebetrau, M.; Bültemeier, G.; Vosko, M.R.; Zimmermann, C.; Hamann, G.F.: Plasminogen activation in focal cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20: 337-42; 2000.
- [158] Philipson, K.D.; Nicoll, D.A.: Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol.* 62: 111-133; 2000
- [159] Plesner, T.; Behrendt, N.; Ploug, M.: Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem Cells.* 15: 398-408; 1997.
- [160] Ploplis, V.A.; Carmeliet, P.; Vazirzadeh, S.; Van Vlaenderen, I.; Moons, L.; Plow, E.F.; Collen, D.: Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice. *Circulation* 92: 2585-2593; 1995.
- [161] Polderman, K.H.: Application of therapeutic hypothermia in the ICU: opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 1: Indications and evidence. *Intensive Care Med.* 30: 556-75; 2004a.
-

- 
- [162] Polderman, K.H.: Application of therapeutic hypothermia in the intensive care unit. Opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 2: Practical aspects and side effects. *Intensive Care Med.* 30: 757-69; 2004b.
- [163] Popp, E.; Sterz, F.; Böttiger, B.W.: Therapeutische milde Hypothermie nach Herz-Kreislauf-Stillstand. *Anaesthesia* 54: 96-106; 2005.
- [164] Ramsauer, M.; Krause, D.; Dermietzel, R.: Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the functional of cerebral pericytes. *FASEB J* 16: 1274-76; 2002.
- [165] Raum, D.; Marcus, D.; Alper, C.A.; Levey, R.; Taylor, P.D.; Starzl, T.E.: Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 208: 1036-7; 1980.
- [166] Ravanti, L.; Kähäri, V.-M.: Matrix metalloproteinases in wound repair (review), *International Journal of molecular medicine* 6: 391-407; 2000.
- [167] Rijken, D.C.: Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin. Haematol.* 8: 291-312; 1995.
- [168] Risau, W.; Hallmann, R.; Albrecht, U.: Brain astrocytes induce the expression of an early cell surface marker for the blood-brain barrier endothelium. *EMBO J* 5: 3179-3183; 1986.
- [169] Roldan, A.L.; Cubellis, M.V.; Mascucci, M.T.; Behrendt, N.; Lund, L.R.; Danř, K.; Appella, E.; Blasi, F.: Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J.* 9: 467-474; 1990.
- [170] Romanic, A.M.; White, R.F.; Arleth, A.J.; Ohlstein, E.H.; Barone, F.C.: Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29: 1020-1030; 1998.
- [171] Rosenberg, G.A.: Ischemic brain edema. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 42: 209-216; 1999.
- [172] Rosenberg, G.A.: Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39: 279-291; 2002.
- [173] Rosenberg, G.A.; Cunningham, L.A.; Wallace, J.: 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; 2001
- [174] Rosenberg, G.A.; Estrada, E.Y.; Dencoff, J.E.: Matrix metalloproteinase and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 29: 2189-2195; 1998.
- [175] Rosenberg, G.A.; Navratil, M.; Barone, F.; Feuerstein, G.: Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16: 360-366; 1996.
- [176] Rosenberg, G.A.; Navratil, M.: Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology.* 48: 921-926; 1997.
- [177] Rothwell, P.M.; Coull, A.J.; Silver, L.E., Fairhead, J.F.; Giles, M.F.; Lovelock, C.E.; Redgrave, J.N.; Bull, L.M.; Welch, S.J.; Cuthbertson, F.C.; Binney, L.E.; Gutnikov, S.A.; Anslow, P.; Banning, A.P.; Mant, D.; Mehta, Z.: Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories. Oxford Vascular Study. *Lancet* 366: 1773-1783; 2005.
- [178] Roy, M.K.; Ray, A.: Effect of body temperature on mortality of acute stroke. *J Assoc Physicians India* 52: 959-961; 2004.
- [179] Rucker, H.K.; Wynder, H.J.; Thomas, W.E.: Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull* 51: 363-369; 2000.
- [180] Sato, H.; Takino, T.; Okada, Y.; Cao, J.; Shinagawa, A.; Yamamoto, E.; Seiki, M.: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells, *Nature* 370: 61-65; 1994.
- [181] Schilling, T.; Lehmann, F.; Ruckert, B.; Eder, C.: Physiological mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced de-ramification of murine microglia. *J Physiol* 557: 105-120; 2004.

- 
- [182] Schittny, J.C.; Yurchenco, P.D.: Basement membranes: molecular organization and function in development and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 5: 983-8; 1989.
- [183] Schmidt, R.; Bultmann, A.; Ungerer, M.; Joghetaei, N.; Bulbul, O.; Thieme, S.; Chavakis, T.; Toole, B.P.; Gawaz, M.; Schomig, A.; May, A.E.: Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction. *Circulation.* 113: 834-41; 2006.
- [184] Schreiber, S.S.; Tan, Z.; Sun, N.; Wang, L.; Zlokovic, B.V.: Immunohistochemical localisation of tissue plasminogen activator in vascular endothelium of stroke-prone regions of the rat brain. *Neurosurgery* 43: 909-913; 1998.
- [185] Schuster, V.L.; Lu, R.; Kanai, N.; Bao, Y.; Rosenberg, S.; Prie, D.; Ronco, P.; Jennings, M.L.: Cloning of the rabbit homologue of mouse 'basigin' and rat 'OX-47': kidney cell type-specific expression, and regulation in collecting duct cells. *Biochim Biophys Acta.* 1311: 13-9; 1996.
- [186] Shaw, G.J.; Dhamija, A.; Bavani, N.; Wagner, K.R.; Holland, C.K.: Arrhenius temperature dependence of in vitro tissue plasminogen activator thrombolysis. *Phy. Med. Biol.* 52: 2953-2967; 2007.
- [187] Shiozaki, T.; Sugimoto, H.; Taneda, M.; Yoshida, H.; Iwai, A.; Yoshioka, T.; Sugimoto, T.: Effect of mild hypothermia on uncontrollable intracranial hypertension after severe head injury. *J Neurosurg* 79: 363-368; 1993.
- [188] Shuaib, A.; Lees, K.R.; Lyden, P.; Grotta, J.; Davalos, A.; Davis, S.M.; Diener, H.C.; Ashwood, T.; Wasiewski, W.W.; Emeribe, U: NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 357: 2198-9; 2007.
- [189] Silbernagl, S. und Despopoulos, A.: Taschenatlas der Physiologie. Thieme Verlag. 1979.
- [190] Small, D.L.; Morley, P.; Buchan, A.M.: Biology of ischemic cerebral cell death. *Progress in Cardiovascular Diseases* 42: 185-207; 1999.
- [191] Smith, W.S.: Pathophysiology of focal cerebral ischemia: A therapeutic perspective. *J Vasc Interv Radiol* 15: S3-S12; 2004.
- [192] Smits, G.J.; Roman, R.J.; Lombard, J.H.: Evaluation of laser-Doppler flowmetry as a measure of tissue blood flow. *J Appl Physiol* 61: 666-672; 1986.
- [193] Sporer, B.; Martens, K.H.; Ködel, U.; Haberl, R.L.: L-Arginine-induced regional cerebral blood flow increase is abolished after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 1074-1080; 1997.
- [194] Sternlicht, M.D.; Werb, Z.: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516; 2001.
- [195] Stroke Therapy Academics Industry Roundtable (STAIR): Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 30: 2752-8; 1999.
- [196] Suzuki, Y.; Nagai, N.; Umemura, K.; Collen, D.; Lijnen, H.R.: Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5: 1732-1739; 2007.
- [197] Tamura, A.; Graham, D.I.; McCulloch, J.; Teasdale, G.M.: Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 53-60; 1981.
- [198] Tani, E.; Itagaki, T.; Nakano, M.: Tight junctions of oligodendrocytes. *Cell Tissue Res* 184: 139-142; 1977a.
- [199] Tani, E.; Yamagata, S. Ito, Y.: Freeze-fracture of capillary endothelium in rat brain. *Cell Tissue Res* 176: 157-165; 1977b.
-

- 
- [200] Taylor, P.M.; Woodfield, R.J.; Hodgkin, M.N.; Pettitt, T.R.; Martin, A.; Kerr, D.J.; Wakelam, M.J.: Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP2 release through a phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase catalyzed pathway. *Oncogene* 21: 5765-72; 2002.
- [201] Touho, H.; Karasawa, J.: Evaluation of time-dependent thresholds of cerebral blood flow and transit time during the acute stage of cerebral embolism: a retrospective study. *Surg Neurol.* 46: 135-45; 1996.
- [202] Triebel, S.; Bläser, J.; Reinke, H.; KnÄuper, V.; Tschesche, H.: Mercurial activation of human PMN leucocyte type IV procollagenase (gelatinase). *Febs Lett* 298: 280; 1992.
- [203] Tschesche, H. et al.: Matrix Metalloproteinases and Inhibitors (Birkedal-Hansen, Z. et al., Hgrs.) Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York Supplement 1: 245-255; 1992.
- [204] Tsirka, S.E.; Rogove, A.D.; Bugge, T.H.; Degen, J.L.; Strickland, S.: An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mice hippocampus, *J. Neurosci.* 17: 543-552; 1997.
- [205] Tsuji, K.; Aoki, T.; Tejima, E.; Arai, K.; Lee, S.R.; Atochin, D.N.; Huang, P.L.; Wang, X.; Montaner, J.; Lo, E.H.: Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 36: 1954-9; 2005.
- [206] Tsukita, S. & Furuse, M.: Overcoming barriers in the study of tight junction functions: From occludin to claudin. *Genes Cells* 3: 569-73; 1998.
- [207] Tuuttila, A.; Morgunova, E.; Bergmann, U.; Lindqvist, Y.; Maskos, K.; Fernandez-Catalan, C.; Bode, W.; Tryggvason, K.; Schneider, G.: Three-dimensional structure of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* 284: 1133-40; 1998.
- [208] Van der Worp, H.; Sena, Emily S.; Donnan, Geoffrey A.; Howells, David W.; Macleod, Malcom R.: Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: A systematic review and meta-analysis. *Brain* 130: 3063-74, 2007.
- [209] Vassalli, J.D.; Sappino, A.P.; Belin, D.: The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest.* 88: 1067-72; 1991.
- [210] Verstraete, M., Su, C.A.P.F.; Transwell, P.; Feverer, W.; Collen, D.: Pharmacokinetics and effects of fibrinolytic and coagulation parameters of two clones of recombinant tissue-type plasminogen activator in healthy volunteers. *Thromb Haemostas* 56: 1-5; 1986.
- [211] Vosko, M.R.; Burggraf, D.; Liebetrau, M.; Wunderlich, N.; Jäger, G.; Gröger, M.; Plesnila, N.; Hamann, G.F.: Influence of the duration of ischemia and reperfusion on infarct volume and microvascular damage in mice. *Neurol Res.* 28: 200-5; 2006.
- [212] Vosko, M.R.; Busch, E.; Burggraf, D.; Bultemeier, G.; Hamann, G.F.: Microvascular basal lamina damage following experimental stroke in a rat model. *Neurosci Lett* 353: 217-220; 2003.
- [213] Wagner, S.; Hamann, G.F.: Experimental microvascular and clotting changes. *Nervenarzt* 74: 123-132; 2003.
- [214] Wagner, S.; Nagel, S.; Kluge, B.; Schwab, S.; Heiland, S.; Koziol, J.; Gardner, H.; Hacke, W.: Topographically graded postischemic presence of metalloproteinases is inhibited by hypothermia. *Brain Res.* 984: 63-75; 2003a.
- [215] Wang, C.X. & Shuaib, A.: Critical role of microvascular basal lamina in ischemic brain injury. *Progress in Neurobiology* 83: 140-148; 2007.
- [216] Wang, X.; Barone, F.C.; White, R.F.; Feuerstein, G.Z.: Subtractive cloning identifies tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) increased gene expression following focal stroke. *Stroke.* 29: 516-20; 1998b.
- [217] Wang, Y.F.; Tsirka, S.E.; Strickland, S.; Stieg, P.E.; Sorano, S.G.; Lipton, S.A.: Tissue plasminogen activator (t-PA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and t-PA-deficient mice. *Nat. Med.* 4: 228-231; 1998.

- 
- [218] Werner, C.: „Milde und moderate Hypothermie in der Anästhesie und Intensivmedizin - Neuroprotektive Ansätze“. Refresher Cou 189-197; 1997.
- [219] Windsor, L.J.; Steele, D.L.; LeBlanc, S.B.; Taylor, K.B.: Catalytic domain comparisons of human fibroblast-type collagenase, stromelysin-1, and matrilysin. *Biochim Biophys Acta* 1334: 261-72; 1997.
- [220] Yanamoto, H.; Nagata, I.; Nakahara, I.; Tohnai, N.; Zhang, Z.; Kikuchi, H.: Combination of intraischemic and postischemic hypothermia provides potent and persistent neuroprotection against temporary focal ischemia in rats. *Stroke* 30: 2720-2726; 1999.
- [221] Yanamoto, H.; Nagata, I.; Nijitsu, Y.; Zhang, Z.; Xue, J.H.; Sakai, N.; Kikuchi, H.: Prolonged mild hypothermia therapy protects the brain against permanent focal ischemia. *Stroke* 32: 232-239; 2001.
- [222] Yang, D.Y.; Pan, H.C.; Chen, C.J.; Cheng, F.C.; Wang, Y.C.: Effects of tissue plasminogen activator on cerebral microvessels of rats during focal cerebral ischemia and reperfusion. *Neurol Res.* 29: 274-82; 2007.
- [223] Yano, M.; Omoto, Y.; Yamakawa, Y.; Nakashima, Y.; Kiriya, M.; Saito, Y.; Fujii, Y.: Increased matrix metalloproteinase 9 activity and mRNA expression in lung ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 20: 679-686; 2001.
- [224] Yenari, M.A.; Palmer, J.T.; Bracci, P.M.; Steinberg, G.K.: Thrombolysis with tissue plasminogen activator (tPA) is temperature dependent. *Thrombosis Research* 77 5: 475-481; 1995.
- [225] Yepes, M.; Sandkvist, M.; Wong, M.K.; Coleman, T.A.; Smith, E.; Cohan, S.L.; Lawrence, D.A.: Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis. *Blood* 96: 569-76; 2000.
- [226] Yu, A.E.; Murphy, A.N.; Stetler-Stevenson, W.G.: Gelatinase A: Structure, Activation, Regulation, and Substrate Specificity. In: Parks, W.C., Mecham, R.P. (Hrsg.). *Matrix Metalloproteinases*. San Diego. Academic Press: 85-105; 1998.
- [227] Zhang, M.; Chopp, A.; Goussev, C.: Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia, *Brain Res.* 784: 210 – 217; 1998.
- [228] Zhang, R.L.; Chopp, M.; Chen, H.; Garcia, J.H.; Zhang, Z.G.: Postischemic (1 hour) hypothermia significantly reduces ischemic cell damage in rats subjected to 2 hours of middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 24: 1235-1240; 1993.
- [229] Zhao, B.Q.; Ikeda, Y.; Ihara, H.; Urano, T.; Fan, W.; Mikawa, S.; Suzuki, Y.; Kondo, K.; Sato, K.; Nagai, N.; Umemura, K.: Essential role of endogenous tissue plasminogen activator through matrix metalloproteinase 9 induction and expression on heparin-produced cerebral hemorrhage after cerebral ischemia in mice. *Blood.* 103: 2610-6; 2004.
- [230] Zhi, D.; Zhang, S.; Lin, X.: Study on therapeutic mechanism and clinical effect of mild hypothermia in patients with severe head injury. *Surg Neurol* 59: 381-385; 2003.
- [231] Zhu, W.; Khachi, S.; Hao, Q.; Shen, F.; Young, W.L.; Yang, G.Y.; Chen, Y.: Upregulation of EMMPRIN after permanent focal cerebral ischemia. *Neurochem Int.* 52: 1086-91; 2008.



---

## 11 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. G. F. Hamann für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, sowie seinem Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. B. Grothe bedanken, der es mir ermöglichte meine Forschungstätigkeit in der neurologischen Klinik des Klinikum der Universität München abzuschließen.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der DFG, die diese Arbeit im Rahmen von FOR 440/2, TP-G, Ha 2078/10-1 förderte.

Einen ganz besonderen Dank gilt Frau Dr. D. Burggraf für ihre hilfreiche und ausdauernde Unterstützung bei der Entstehung dieses Werkes.

Für die schnelle und gründliche Hilfe von Frau M. Schneider und Frau N. Wunderlich möchte ich mich während meiner Labortätigkeit herzlich bedanken.

Einen Großteil meiner Ausdauer für diese Arbeit bezog ich durch M. Unterberger, D. Sauren, B. Wilmes, K. Hartwich, S. Utoft, M. Mitteregger, C. Pace und W. Xiang , die mich stetig in diesem Vorhaben unterstützten – vielen, vielen Dank!!!

Meinen Eltern möchte ich für Ihre Geduld und Unterstützung in allen Lebenslagen meine besondere Dankbarkeit ausdrücken, da ohne sie dieser Weg nicht möglich gewesen wäre.



**E - N - D - E**



---

## 12 Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

---

Adresse: Planeggerstraße 83a, 81241 München  
Tel.: +49 (0)176 96618208  
E-Mail: jan.burk@med.uni-muenchen.de  
Geboren: 03.03.1977 in Marburg, Deutschland

### Ausbildung

---

- 2005 - 2009 Promotion an der LMU München, Klinikum Großhadern, Abteilung Neurologie. Doktorarbeit über „*Therapie nach transienter zerebraler Ischämie und Reperfusion - Was sind die protektiven Mechanismen der Hypothermie?*“ angeleitet durch Prof. Dr. Gerhard F. Hamann (Abgabe am 21.12.2010).  
Veröffentlichung in Brain Res. 2008 Jan 16; 1189:189-97: Burk J., Burggraf D., Vosko M., Dichgans M., Hamann G.F.: Protection of cerebral microvasculature after moderate hypothermia following experimental focal cerebral ischemia in mice.
- 2003 – 2004 Studienabschluss an der Universität Tübingen am Lehrstuhl für Kognitive Neurowissenschaften. Diplomarbeit über “The visual place-memory of humans” (in englisch) angeleitet durch Prof. Dr. HP. A. Mallot (Abgabe am 31.08.2004). Diplom in Biologie (Note: 1.8)
- 2002 – 2003 Stipendium an der University of São Paulo (USP), Brasilien (gefördert durch den DAAD im Rahmen des ISAP).
- 2000 – 2002 Wechsel an die Universität Tübingen (Hauptstudium)  
Hauptfach: Tierphysiologie  
Nebenfächer: Parasitologie des Menschen,  
medizinische Virologie (experimentelle Virologie)
- 1998 – 2000 Studium der Biologie an der Universität Bielefeld (Grundstudium)
- 1997 – 1998 Zivildienst beim DRK in der häuslichen Pflege und dem mobilen sozialen Hilfsdienst.
- 1988 – 1997 Gymnasium Lahntalschule Biedenkopf (Abschluss: Allg. Hochschulreife – Abschlussnote: 2.8).

