

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen
Deutsches Herzzentrum München
an der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Professor Dr. Albert Schömig)

Der Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer

(EMMPRIN)

Regulation im akuten Myokardinfarkt

Sven Florian Thieme

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1.: Priv.-Doz. Dr. R. Schmidt

2.: Univ.-Prof. Dr. K.-F. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 08.10.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 23.01.2008 angenommen.

Meinen Eltern

Inhalt

Abkürzungen	7
1 Einleitung	9
1.1 Epidemiologie und Pathophysiologie der Atherosklerose.....	9
1.2 Matrix-Metalloproteinasen.....	12
1.2.1 Gemeinsame Struktur- und Funktionsmerkmale der MMPs.....	12
1.2.2 Einteilung der MMPs.....	14
1.2.3 Regulation der MMP-Aktivität.....	16
1.2.4 Beteiligung von MMPs am Gefäßwandumbau bei der Atherosklerose.....	20
1.2.5 Beitrag der MMPs zu Plaqueruptur und arterieller Thrombose.....	21
1.3 EMMPRIN (Synonyme: Basigin / CD 147).....	23
1.3.1 Struktur und Eigenschaften.....	23
1.3.2 Vorkommen von EMMPRIN.....	25
2 Zielsetzung	29
3 Material und Methoden	30
3.1 Material.....	30
3.2 Methoden.....	32
3.2.1 Probengewinnung.....	32

3.2.2 Durchflusszytometrie	33
3.2.2.1 Grundlagen.....	33
3.2.2.2 Antikörpermarkierung von Leukozyten.....	34
3.2.2.3 Durchführung der FACS-Messung.....	36
3.2.2.4 Auswertung der FACS-Daten.....	37
3.2.3 SDS-PAGE-Zymographie.....	38
3.2.3.1 Grundlagen.....	38
3.2.3.2 Durchführung.....	38
3.2.3.3 Auswertung.....	40
3.2.4 Statistische Analyse.....	41
4 Ergebnisse.....	42
4.1 Patientenbezogene Basisdaten.....	42
4.2 Erhöhte Expression von EMMPRIN auf Monozyten im AMI.....	44
4.3 Erhöhte Expression von MT1-MMP auf Monozyten im AMI.....	45
4.4 Positive Korrelation der EMMPRIN- und MT1-MMP-Erhöhung.....	46
4.5 Normalisierung der EMMPRIN- und MT1-MMP-Expression.....	47
4.6 Erhöhte Plasmaaktivität von MMP-9 im akuten Myokardinfarkt.....	48
4.7 Normalisierung der Plasmaaktivität von MMP-9	50
5 Diskussion.....	51
5.1 Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse.....	51
5.2 Weiter führende Ergebnisse.....	53

5.3 Limitationen.....	55
6 Zusammenfassung.....	57
7 Literaturverzeichnis.....	58
Danksagung.....	67
Erklärung.....	68

Abkürzungen

ACE	Angiotensin converting enzyme
AMI	Akuter Myokardinfarkt
AT	Angiotensin
C	Kohlenstoff
Ca	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CD	Cluster of differentiation
CHO	Chinese hamster ovary
CK(-MB)	Kreatin-Kinase (Muscle-Brain-Isoenzym)
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CRP	C-reaktives Protein
CSA	Chronic stable angina, chronische stabile Angina pectoris
EGF	Epidermal growth factor
EMMPRIN	Extracellular matrix metalloproteinase inducer
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter, Vorwärts-Lichtstreuung
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
kDa	Kilo-Dalton
LAD	Left anterior descending coronary artery, Ramus interventricularis anterior
LCx	Left circumflex coronary artery, Ramus circumflexus

LDL	Low density lipoprotein
MCP	Monocyte chemoattractant protein
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MT-MMP	Membrane-type MMP
MW	Molecular weight, Molekulargewicht
N	Stickstoff
O.D.	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RCA	Right coronary artery, Arteria coronaria dextra
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SSC	Side Scatter, 90°-Seitwärtsstreulicht
TCSF	tumor cell-derived, collagenase stimulatory factor
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumor necrosis factor
u-PA	Urokinase-type plasminogen activator
u-PAR	Urokinase-type plasminogen activator receptor
Zn	Zink

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Pathophysiologie der Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen für die Bevölkerung Europas, der USA und weiter Teile Asiens derzeit die häufigste Todesursache dar (Ross 1999, S. 115; Libby 1998, S. 225). Ein zunehmendes Verständnis der pathogenetischen Zusammenhänge und eine in einigen Bevölkerungsschichten zu beobachtende Änderung der Lebensgewohnheiten sowie eine beständige Weiterentwicklung der Therapiemöglichkeiten haben an dieser Tatsache bislang nichts ändern können.

Als der koronaren Herzerkrankung zugrunde liegender pathophysiologischer Prozess wird die Atherosklerose angenommen, die für ca. 50 % der Todesfälle in den Industrieländern verantwortlich gemacht wird (Lusis 2000, S. 233). Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine fokale chronische Entzündung der arteriellen Gefäßwand, bei der es zu einer Verdickung und Verhärtung der Arterien aufgrund einer subendothelialen Ansammlung von Lipiden, Blutprodukten, Bindegewebe sowie Kalziumdepots kommt (Zaman et al. 2000, S. 251-266).

Als etablierte Risikofaktoren, die die Entstehung der Atherosklerose begünstigen, gelten neben höherem Lebensalter und männlichem Geschlecht Zigarettenrauch, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen und Adipositas sowie das Vorliegen einer positiven Familienanamnese. Bei der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque mit anschließender Thrombusbildung kann sich ein kompletter Gefäßverschluss ergeben, der sich klinisch als Organinfarkt manifestiert (Lusis 2000, S. 238).

Das Spektrum der klinischen Manifestationen atherosklerotischer Prozesse und ihrer Komplikationen umfasst neben der koronaren Herzerkrankung auch das zentralnervöse Gefäßsystem mit unterschiedlicher Symptomatik, welche Schwindel, transitorische neurologische Ausfälle oder den ischämischen Insult mit irreversiblen Ausfällen umfassen kann. Weitere Manifestationen sind Infarkte innerer Organe wie der Nieren und des Magen-Darm-Traktes sowie die

periphere arterielle Verschlusskrankheit, deren Symptomatik von (zunächst belastungsabhängigen) Schmerzen bis zur Nekrose einer gesamten Extremität reichen kann.

Das Verständnis des Prozesses der Atherosklerose, seiner Entstehung und Progression sowie seiner Komplikationen hat sich in der jüngeren Vergangenheit grundlegend gewandelt.

Wurde die Atherosklerose in der Vergangenheit vor allem als Lipidspeicherkrankheit betrachtet, so hat sich in den letzten Jahren die Ansicht durchgesetzt, dass als pathologisches Korrelat ein chronisch-entzündlicher Prozess in den Gefäßwänden anzunehmen ist. Entzündliche Vorgänge spielen demnach in allen Stadien der Atherosklerose (Initiierung, Progression und Plaqueruptur mit nachfolgenden thrombotischen Komplikationen) eine zentrale Rolle.

Die einzelnen Stadien der Atherosklerose sollen in Folgenden umrissen werden.

Im Anfangsstadium der Atherosklerose kommt es zu einer Endothelzellaktivierung aufgrund einer subendothelialen Ansammlung von Lipiden (insbesondere chemisch modifiziertes LDL-Cholesterin). Als Folge kommt es zu einer vermehrten luminalen Expression von Adhäsionsrezeptoren sowie zur gesteigerten endothelialen lokalen Sekretion von Wachstumsfaktoren wie dem „*Macrophage Colony Stimulating Factor*“ (M-CSF) und von Chemokinen wie „*Monoocyte Chemoattractant Protein-1*“ (MCP-1). Dies führt zu einer verstärkten Adhäsion von Monozyten an die Gefäßwand und einer vermehrten Einwanderung in den subendothelialen Bereich. Dieser Schritt ist auf das Vorhandensein proteolytischer Enzyme angewiesen. Die resultierenden Läsionen, in der englischsprachigen Literatur als *fatty streak* bezeichnet, lassen sich in der Aorta bereits in der ersten Lebensdekade nachweisen, in Koronararterien in der zweiten Dekade. Sie besitzen noch keine klinische Relevanz, können aber als Vorläuferstadien für fortgeschrittenere Läsionen betrachtet werden (Lusis 2000, S. 233).

In einem nächsten Stadium, der *fibrofatty lesion* oder auch *intermediate lesion*, kommt es zur Ausbildung einer „fibrösen Kappe“, bestehend vor allem aus glatten Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix, die einen nekrotischen Kern umschließt, der sich in erster Linie aus Lipiden und nekrotischem Zellmaterial (Schaumzellen, T-Lymphozyten, glatte Muskelzellen) zusammensetzt (Lusis 2000, S. 233).

Das sich anschließende Stadium, die *fibrous plaque*, ist durch eine massive Zunahme extrazellulärer Lipidablagerungen und die Einwanderung glatter Muskelzellen gekennzeichnet. Hierbei fördern die von Monozyten und Makrophagen sezernierten Zytokine und Wachstumsfak-

toren die Einwanderung und Proliferation der glatten Muskelzellen, während sezernierte Proteasen deren Migration ermöglichen (Lusis 2000, S. 237-238).

Im weiteren Verlauf werden die beschriebenen Läsionen von der Zusammensetzung her immer komplexer, es kann zu Kalzifikationen kommen. Darüber hinaus können Blutungen aus kleinen Gefäßen auftreten, die von der Tunica media her in die Läsion einwachsen.

Mit Fortschreiten der Läsionen hin zu so genannten vulnerablen Plaques weisen diese einen zunehmend geringeren Gehalt an extrazellulärer Matrix auf, die als fibröse Deckschicht die arteriosklerotische Plaque stabilisiert. Zugleich findet man einen erhöhten Gehalt an eingewanderten Monozyten und Makrophagen. Die Ausdünnung der fibrösen Schutzkappe beruht einerseits auf einer verminderten Syntheseleistung extrazellulärer Matrix durch glatte Muskelzellen, andererseits auf einem aktiven Abbau durch die von Monozyten und Makrophagen sezernierten Proteasen (Lusis 2000, S. 238).

Schließlich mündet dieser Prozess entweder in eine eher seltene endotheliale Erosion oder in die häufiger auftretende physikalische Ruptur der fibrösen Schutzkappe im Randbereich der Plaque, wo eine besonders hohe Dichte von eingewandeten Monozyten und Makrophagen vorliegt. Durch die Ruptur werden subintimale thrombogene Substanzen wie „*tissue factor*“ und Phospholipide freigelegt, was zu einer lokalen Gerinnungsaktivierung mit Thrombusausbildung und evtl. zum Gefäßverschluss führt (Lusis 2000, S. 238).

1.2 Matrix-Metalloproteinasen

Im Rahmen der Atherogenese und ihrer Komplikationen kommt den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) eine bedeutende Rolle zu.

Bei den MMPs handelt es sich um eine Familie von Endopeptidasen, die die gemeinsame Fähigkeit besitzen, extrazelluläre Matrix abzubauen und auf diese Weise zur Umstrukturierung von Geweben beizutragen. Diese Umstrukturierung kann sich zum einen unter physiologischen (z.B. Organentwicklung), zum anderen unter pathologischen Bedingungen (Entzündungsvorgänge, Tumorprogression und -angiogenese) vollziehen (Galis et al. 2002, S. 252).

1.2.1 Gemeinsame Struktur- und Funktionsmerkmale der MMPs

Alle Matrix-Metalloproteinasen haben eine Reihe gemeinsamer Struktur- und Funktionsmerkmale, durch die sich ihre Klassifizierung als Familie rechtfertigt. So enthalten alle MMPs ein Zinkion (Zn^{2+}) im Bereich ihres katalytischen Zentrums (Nagase et al. 1999, S. 21492) und benötigen für ihre strukturelle Stabilität ein kalziumhaltiges Milieu. Ihr Funktionsoptimum hinsichtlich der Azidität des umliegenden Gewebes liegt im pH-neutralen Bereich (Creemers et al. 2001, S. 202; Nagase et al. 1999, S. 21491-21494).

Die sezernierten MMPs teilen darüber hinaus die Eigenschaft, als inaktive Proformen (Zymogene) in den extrazellulären Raum sezerniert zu werden und ihre Aktivität erst nach proteolytischer Spaltung (durch verschiedene Proteasen wie Plasmin, Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Kathepsin, neutrophile Elastase oder auch andere MMPs) aufnehmen zu können (Lijnen 2002, S. 163-167). Als wichtiges gemeinsames Merkmal weisen die verschiedenen MMPs zudem die Eigenschaft auf, durch spezifische Inhibitoren (*tissue inhibitors of metalloproteinases* = TIMPs) hemmbar zu sein (Creemers 2001, S. 201-210).

Es folgt eine schematische Darstellung der gemeinsamen Strukturmerkmale der MMPs, beginnend am N-terminalen Ende.

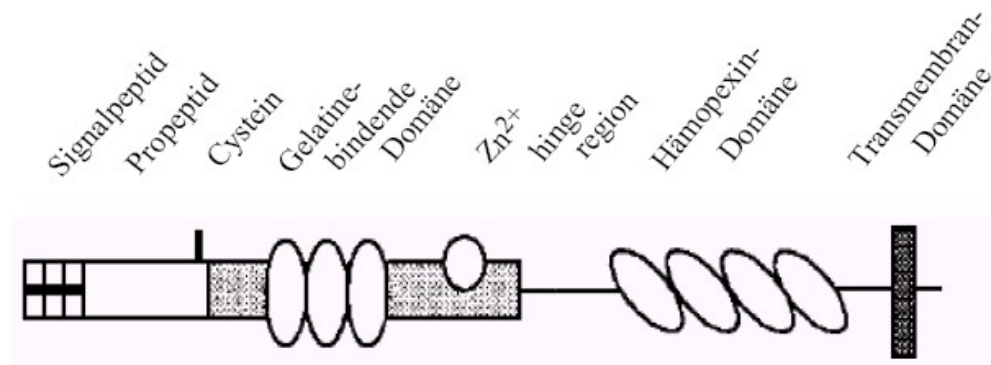


Abbildung 1: Gemeinsame Strukturmerkmale der Matrix-Metalloproteinasen (N-terminales Ende links, C-terminales Ende rechts). Erläuterungen im Text (Abb. aus: Westermarck et al. 1999, S. 782).

Als erste Domäne findet sich dort ein Signalpeptid, dessen Funktion es ist, das Protein für den Transport nach extrazellulär zu markieren. Hieran schließt sich das so genannte Propeptid an, das im Zuge der Aktivierung des Enzyms extrazellulär proteolytisch abgespalten wird. Das Zink bindende katalytische Zentrum stellt den folgenden Abschnitt dar. Diese Domäne wird durch die Abspaltung des Propeptids freigelegt, weist je nach Substrat eine unterschiedliche Struktur auf und ist für die proteolytische enzymatische Aktivität verantwortlich. Es folgt die so genannte *hinge region*, eine Prolin-reiche Kette, welche die Verbindung zu einer Hämopexin-ähnlichen Domäne darstellt. Diese wiederum spielt bei der Substratbindung und bei der Interaktion mit den spezifischen Inhibitoren (TIMPs) eine wichtige Rolle. Als letzte Domäne enthalten die membranassoziierten MMPs zusätzlich am C-terminalen Ende eine Transmembran-Domäne, die von lipophilen Aminosäuren gebildet wird und der Verankerung des Enzyms in der Zellmembran dient (Westermarck et al., 1999, S. 781).

1.2.2 Einteilung der MMPs

Die Familie der MMPs umfasst über 20 Mitglieder, die sich zum einen dadurch unterscheiden, dass ein Teil in den extrazellulären Raum sezerniert wird, wohingegen der andere Teil membrangebunden bleibt. Die sezernierten MMPs, insgesamt die Mehrzahl der MMPs, lassen sich weiter nach der jeweiligen Substratspezifität in Kollagenasen, Gelatinasen und Stromelysine unterteilen. Diese Einteilung, die im Folgenden näher ausgeführt werden soll, kann jedoch nur Anhaltspunkte hinsichtlich der funktionellen (Haupt-)Eigenschaften der einzelnen MMPs liefern. Eine strikte Trennung nach Substraten ist mit dem aktuellen Wissensstand nicht mehr aufrechtzuerhalten, da mit den Fortschritten in der Erforschung der Aktivitätsspektren diese sich ständig erweitern und auch zunehmend überschneiden (Creemers 2001, S. 202).

Innerhalb der Gruppe der Kollagenasen wurden drei verschiedene MMPs identifiziert. Es handelt sich um MMP-1 (interstitielle Kollagenase), MMP-8 (neutrophile Kollagenase) und MMP-13 (Kollagenase-3), deren gemeinsames Substrat fibrilläres Kollagen der Typen I, II und III ist (Creemers 2001, S. 202-203).

Die beim proteolytischen Abbau der genannten Kollagene entstehenden Fragmente zerfallen anschließend durch strukturelle Instabilität weiter zu Gelatinen. Diese wiederum bilden das Substrat für die so genannten Gelatinasen. Man unterscheidet hier die beiden Subtypen MMP-2 und MMP-9, die bisweilen auch als Gelatinase A und B bezeichnet werden. Diese beiden MMPs verfügen zusätzlich über die Fähigkeit, Kollagen Typ IV abzubauen zu können, welches den Hauptbestandteil von Basalmembranen darstellt (Creemers 2001, S. 203).

MMP-3, MMP-10 und MMP-11 werden schließlich als Stromelysine (-1, -2 und -3) bezeichnet. Diese teilen die Eigenschaft, ihre proteolytische Aktivität gegen eine größere Zahl unterschiedlicher extrazellulärer Strukturproteine, darunter Proteoglykane, Laminine, Fibronectin und Vitronectin, richten zu können. Zusätzlich besitzen auch die Stromelysine die Fähigkeit, bestimmte Kollagentypen abzubauen (Creemers 2001, S. 203).

Die Gruppe der membrangebundenen MMPs (*membrane type* MMPs, MT-MMPs) umfasst nach dem momentanen Wissensstand sechs Mitglieder (MT1(-6)-MMP). Zu deren Fähigkeit, extrazelluläre Matrixkomponenten abzubauen, kommt ihre wichtige Funktion der Aktivierung inaktiver MMP-Zymogene hinzu (Creemers 2001, S. 203).

Neben den MMPs, die den oben genannten Klassen zugeordnet werden, existieren einige weitere (z.B. Matrilysin, Metalloelastase), die sich in keine der aufgeführten Klassen einordnen lassen (Creemers 2001, S. 202).

Die Charakterisierung einiger wichtiger MMPs zeigt Tabelle 1.

Gruppe	Bezeichnung, Synonyme	MW des Zymogens (kD)	Substrate
Kollagenasen	MMP-1 (=Kollagenase-1, =interstitielle Kollagenase)	52	Kollagene Typ I, II, VII und X, Gelatin, Enaktin, Aggrekan
	MMP-8 (=Kollagenase-2, =neutrophile Kollagenase)	75	Kollagene Typ I, II und III, Aggrekan
	MMP-13 (=Kollagenase-3)	65	Kollagene Typ I, II und III, Gelatin, Fibronektin, Laminine, Tenascin
Gelatinasen	MMP-2 (=Gelatinase A)	72	Gelatin, Kollagene Typ I, IV, V, VII und X, Fibronektin, Laminine, Aggrekan, Tenascin-C, Vitronektin
	MMP-9 (=Gelatinase B)	92	Gelatin, Kollagene Typ IV, V und XIV, Aggrekan, Elastin, Entaktin, Vitronektin
Stromelysine	MMP-3 (=Stromelysin-1)	57	Gelatin, Fibronektin, Laminine, Kollagene Typ III, IV, IX und X, Tenascin-C, Vitronektin
	MMP-10 (=Stromelysin-2)	57	Kollagen Typ IV, Fibronektin, Aggrekan
	MMP-11 (=Stromelysin-3)	55	Fibronektin, Gelatin, Laminine, Kollagen Typ IV, Aggrekan
membran-assoziierte MMPs	MMP-14 (=MT1-MMP)	66	Kollagene Typ I, II und III, Fibronektin, Laminine, Vitronektin, Proteoglykane; Aktivierung von proMMP-2 und proMMP-13
	MMP-15 (=MT2-MMP)		Aktivierung von proMMP-2
	MMP-16 (=MT3-MMP)		Aktivierung von proMMP-2
Andere (Auswahl)	MMP-7 (=Matrilysin)	28	Gelatin, Fibronektin, Laminine, Kollagen Typ IV, Vitronektin, Tenascin-C, Elastin, Aggrekan
	MMP-12 (=Metalloelastase)	53	Elastin

Tabelle 1: Einteilung der MMPs (Creemers 2001, S. 202; Westermarck et al. 1999, S. 782)

1.2.3 Regulation der MMP-Aktivität

Die Regulation der MMP-Aktivität vollzieht sich auf drei unterschiedlichen Ebenen. So unterliegen die Transkription und Translation, die Aktivierung von Pro-Formen (Zymogenen) und schließlich die spezifische Hemmung der MMPs jeweils unterschiedlichen Einflüssen. Zur Gewährleistung eines geordneten Gewebeumbaus ist diese komplex beeinflusste Regulation notwendig, pathologische Prozesse ziehen Ungleichgewichte in den Einflussfaktoren und somit der MMP-Aktivität nach sich und haben einen ungeordneten Matrixumbau zur Folge, der dem Fortschreiten verschiedenster Erkrankungen Vorschub leisten kann.

Transkription und Translation

Auf der Ebene der Genexpression, also auf der Transkriptionsebene, findet der überwiegende Teil der Regulation statt. Es wurden ein Prostaglandin- E_2 -cAMP- und ein G-Protein-abhängiger Weg beschrieben (Corcoran et al. 1994, S. 481-488). Hierbei wird die MMP-Bildung u.a. durch proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren vermittelt. Eine MMP-induzierende Wirkung wurde so z.B. für die Interleukine -1 und -6, *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *epidermal growth factor* (EGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *basic fibroblast growth factor* und CD 40 nachgewiesen (Creemers et al. 2001, S. 203-204). Im Milieu der atherosklerotischen Plaque kommt es darüber hinaus zur MMP-Induktion aufgrund von hämodynamischen Veränderungen oder bei Veränderungen in der Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und anderen reaktiven Molekülen wie Wasserstoffperoxid (Galis et al. 2002, S. 252). Auch eine intrazelluläre Lipidanreicherung in Schaumzellen der atherosklerotischen Plaque stimuliert die MMP-Synthese (Galis et al. 2002, S. 253).

Das zellgebundene Glykoprotein EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*), das bei der Induktion vieler MMPs ebenfalls eine wichtige Rolle spielt, wird im Rahmen dieses Kapitels noch genauer besprochen.

Eine Hemmung der MMP-Expression wurde u.a. für Kortikosteroide, Retinolsäure, Heparin und IL-4 beschrieben. Darüber hinaus existieren Stimuli, die nicht bei allen MMPs eine gleichförmige Antwort auslösen. So führt z.B. *transforming growth factor- β* (TGF- β) zu einer

Stimulation der MMP-2- und MMP-9-Synthese (also letztlich einer Erhöhung der Gelatinase-Aktivität), jedoch zu einer Hemmung der MMP-3-Synthese (Creemers et al. 2001, S. 204).

Aktivierung von Pro-Formen

Die posttranslationale Aktivierung der MMP-Zymogene stellt die zweite Regulationsebene dar. Hier lassen sich prinzipiell drei verschiedene Wege unterscheiden (Nagase 1997, S. 153-156), nämlich die schrittweise erfolgende Aktivierung, die Aktivierung an der Zelloberfläche durch MT-MMPs und die intrazelluläre Aktivierung. Bei der schrittweise erfolgenden Aktivierung, durch die die meisten sezernierten proMMPs mit Ausnahme von proMMP-2 in eine biologisch wirksame Form überführt werden, erfolgt der erste Schritt durch extrazelluläre Proteasen wie Plasmin, Trypsin, Chymase, Elastase oder Kallikrein. Plasmin spielt hierbei die wichtigste Rolle. Die Aktivierung vollzieht sich durch einen proteolytischen Schritt innerhalb der Pro-Domäne der MMP, der zu einer Konformationsänderung derselben führt, und einer zweiten Proteolyse, die meist durch eine andere MMP ausgeführt wird (Creemers et al. 2001, S. 204). Die Protease Plasmin entsteht wiederum zumeist an Zelloberflächen, wo die inaktive Form Plasminogen zusammen mit dem so genannten *urokinase-type plasminogen activator* (u-PA) an dessen zellulären Rezeptor (u-PAR) gebunden und dort proteolytisch aktiviert wird (May et al. 2005, S. 710).

Die MMP-Aktivierung an Zelloberflächen spielt vor allem bei Zellmigrationen eine Rolle. Aktivatoren sind hier die bereits erwähnten membranassoziierten MMPs. Als Beispiel für diesen Weg sei die Aktivierung von proMMP-2 durch MT-MMPs angeführt (Creemers 2001, S. 202; Brew et al. 2000, S. 272).

Eine weitere Möglichkeit stellt die intrazelluläre MMP-Aktivierung mit anschließender Sekretion biologisch aktiver MMPs dar. Über die genauen Vorgänge dieses Aktivierungswegs liegen bislang noch relativ wenig Erkenntnisse vor. Intrazelluläre Aktivierungsvorgänge wurden bisher für MMP-11 sowie für MT-MMPs nachgewiesen. Diese besitzen im Gegensatz zu anderen MMPs eine Abfolge von zehn Aminosäuren zwischen Pro- und katalytischer Domäne, die ein endoproteolytisches Signal für die Protease Furin im Trans-Golgi-Netzwerk darstellen (Pei et al. 1995, 244-247; Sato et al. 1996, S. 101-104).

In Gefäßwänden wird die proteolytische Aktivierung von MMP-Zymogenen zum Teil durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aus Schaumzellen und konsekutive Erhöhung des oxidativen Stresses vermittelt. Ein hoher Anteil an Schaumzellen trägt somit sowohl auf der Ebene der Genexpression als auch auf der Ebene der Aktivierung der Proenzyme zu gesteigerter MMP-Aktivität innerhalb der atherosklerotischen Läsion und auf diese Weise erheblich zur Schwächung der extrazellulären Matrix bei. Es resultiert eine instabile Plaque mit erhöhter Rupturwahrscheinlichkeit. Eine Aktivierung insbesondere von MMP-2 wird darüber hinaus für plasmatisches Thrombin vermutet (Galis et al. 2002, S. 256).

Hemmung der MMPs

Als dritte Ebene in der Regulation der MMP-Aktivität steht schließlich deren Inhibition zur Verfügung. In diesem Zusammenhang wurde bei einer Reihe unterschiedlicher Moleküle nachgewiesen, dass sie die Fähigkeit besitzen, an MMPs zu binden und sie in ihrer Aktivität zu hemmen. So konnte im Blut eine inhibitorische Wirkung v.a. für α_2 -Makroglobulin und ähnliche Moleküle nachgewiesen werden. Innerhalb von Geweben hingegen gelang der Nachweis einer Klasse von Proteinen, die dort durch nicht-kovalente Bindung an MMPs eine hohe inhibitorische Potenz besitzen. Diese Moleküle wurden aufgrund dieser Fähigkeit als TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) bezeichnet (Brew et al. 2000, S. 268).

Innerhalb dieser Substanzklasse wurden bisher vier verschiedene TIMPs (TIMP-1 bis -4) beschrieben. Gemeinsam ist diesen Molekülen der Aufbau aus zwei Proteindomänen, Unterschiede ergeben sich aus ihrer jeweiligen MMP-Spezifität. So wurde beispielsweise für das Molekül TIMP-1 eine Hemmung der meisten MMPs mit Ausnahme von MMP-2 und membranassoziierter MMPs gezeigt. TIMP-2 wiederum hemmt die meisten MMPs außer MMP-9. Membranassozierte MMPs werden durch TIMP-2 und -3, nicht aber durch TIMP-1 gehemmt. TIMP-3 weist die Besonderheit auf, ausschließlich an extrazelluläre Matrix gebunden vorzuliegen und auf diese Weise sehr lokalisiert in der Nähe des Ortes der Synthese zu wirken. Es hemmt MMP-1, -2, -3, -9 und -13 sowie MT-MMPs. Für TIMP-4 wurde eine Hemmung von MMP-1, -3, -7 und -9 nachgewiesen (Creemers et al. 2001, S. 204).

Wie die Synthese der MMPs unterliegt auch die der TIMPs einer Regulation, die durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst wird. In vielen Fällen (z.B. bei EGF, PDGF, IL-1 und -6)

handelt es sich hier um dieselben Einflussfaktoren wie für die MMP-Expression, was zu einer oft gleichsinnigen Änderung in den Syntheseraten der beiden Molekülklassen und auf diese Weise letztlich zu einer Minderung des Einflusses dieser Faktoren auf die resultierende MMP-Aktivität führt (Creemers et al. 2001, S. 204).

TIMPs weisen jedoch auch einige funktionelle Eigenschaften auf, die über die Hemmung von MMPs hinausgehen. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass TIMP-2 für die oben beschriebene Aktivierung von proMMP-2 an der Zelloberfläche einen Kofaktor darstellt. Hierbei bildet TIMP-2 mit proMMP-2 einen Komplex, der für die folgende Aktivierung durch MT-MMPs nötig ist (Strongin et al. 1995, S. 5331). Es konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 und proMMP-9 in ähnlicher Weise Komplexe bilden können, deren Funktion jedoch noch nicht vollständig erforscht ist. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Vorgang ebenfalls um einen Schritt, der zur MMP-Aktivierung notwendig ist (Brew et al. 2000, S. 271).

Zusätzlich wurden Effekte von TIMPs nachgewiesen, die denen von Wachstumsfaktoren ähneln (Hayakawa et al. 1992, S. 29-32; Hayakawa et al. 1994, S. 2373-2379). Auch eine Hemmung der Angiogenese durch TIMPs konnte nachgewiesen werden (Thorgeirsson et al. 1996, S. 137-144).

1.2.4 Beteiligung von MMPs am Gefäßwandumbau bei der Atherosklerose

Die Plaqueprogression bei der Atherosklerose vollzieht sich durch strukturelle Veränderungen innerhalb der Intima mit erhöhter Dichte von Zellen, extrazellulärer Matrix und Lipiden (Galis et al. 2002, S. 253).

Glatte Gefäßmuskelzellen stellen hierbei eine Klasse vermehrt nachweisbarer Zellen dar. Es wird vermutet, dass es sich bei diesen um eingewanderte Zellen der Tunica muscularis handelt, deren Einwandern (also die Durchdringung der Lamina elastica interna) ebenso wie ihre Proliferation durch die proteolytische Aktivität von MMPs ermöglicht wird (Galis et al. 2002, S. 253).

Eine andere Zellklasse, die sich verstärkt in der Plaque nachweisen lässt, sind Entzündungszellen, die zum Teil aus dem Intravasalraum transmigrieren. Sie müssen hierzu, nachdem sie an Adhäsionsmoleküle des aktivierten Endothels gebunden haben, dieses sowie die zugehörige Basalmembran durchqueren. Für diesen Vorgang bildet die proteolytische Aktivität von MMPs eine wichtige Voraussetzung. So wurde beispielsweise gezeigt, dass das Vorhandensein von MT1-MMP auf der Zelloberfläche von Monozyten für deren Durchwanderung der Endothelzellschicht und ihr Vordringen in den subintimalen Bereich der Gefäßwand im Rahmen chronisch-entzündlicher Prozesse wie der Atherosklerose nötig ist (Matías-Román et al. 2005, S. 3956-3964). Die Störung der Integrität der innersten Gefäßwand ermöglicht darüber hinaus eine erhöhte Aufnahme von Plasmaproteinen, darunter auch Lipoproteine, und auf diese Weise eine verstärkte intrazelluläre Akkumulation von Lipiden, was eine gesteigerte Schaumzellbildung zur Folge hat. Schaumzellen wiederum, also lipidbeladene Makrophagen, wurden als wichtige Quelle für MMPs identifiziert (Galis et al. 1995, S. 402-406), was einen *circulus vitiosus* darstellt, der erheblichen Anteil an der Plaqueprogression hat.

Ein weiteres Beispiel für die Rolle von MMPs innerhalb der pathophysiologischen Prozesse, die im Rahmen der Atherosklerose auftreten, lieferten 1999 Rajavashisth und Mitarbeiter. Sie zeigten, dass Makrophagen und glatte Muskelzellen in der atherosklerotischen Plaque, angeregt durch proinflammatorische Moleküle wie IL-1 α , TNF- α und oxidiertes LDL (ox-LDL), verstärkt MT1-MMP exprimieren. Auf diese Weise könnten Entzündungsvorgänge über die Steigerung der MT1-MMP-Expression den Matrixumbau beschleunigen (Rajavashisth et al. 1999, S. 3103-3109).

1.2.5 Beitrag der MMPs zu Plaqueruptur und arterieller Thrombose

Akute Koronarthrombosen, die häufigsten Auslöser akuter Koronarsyndrome, sind meist Folge einer Ruptur der fibrösen Kappe einer atherosklerotischen Läsion mit Exposition Thrombozyten aktivierender extrazellulärer Matrixproteine und Aktivierung der Gerinnungskaskade. Eine solche Plaqueruptur ist nicht an jedem Ort der Plaque mit gleicher Wahrscheinlichkeit zu erwarten, sondern findet sich bevorzugt im Randbereich der Plaque. Es hat sich gezeigt, dass diese Regionen eine besonders hohe Konzentration an Schaumzellen (lipidspeichernden Makrophagen) enthalten. Diese wiederum stellen eine wichtige Quelle für MMPs dar (Galis, Sukhova et al. 1994, S. 2497-2498; Galis et al. 2002, S. 256). Die hieraus folgende erhöhte MMP-Aktivität führt zu einer lokalen Destabilisierung der Plaque mit erhöhter Rupturgefahr.

Ist die Ruptur erfolgt, wurde darüber hinaus ein sich selbst verstärkender Mechanismus einer wechselseitigen Thrombin-/MMP-2-Aktivierung mit zusätzlicher verstärkter Thrombozytenaggregation beschrieben (Galis et al. 2002, S. 257)

Brown et al. wiesen 1994 in atherosklerotischen Läsionen bei Patienten mit stabiler und instabiler Angina pectoris MMP-9 nach, bei klinisch instabilen Patienten jedoch verstärkt intrazellulär in Makrophagen, was auf eine starke Synthese zum Zeitpunkt der Probengewinnung hinweist, da Makrophagen keine MMPs speichern. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Rückschlüsse auf eine wichtige Rolle von MMP-9 bei der Initiierung der Plaqueruptur und damit dem akuten klinischen Ereignis gezogen (Brown et al. 1995, S. 2125-2131).

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, konnten Chen et al. eine Erhöhung sowohl der Expression von MMP-9 als auch der Regulationsfaktoren bei instabilen AP-Patienten nachweisen (Chen et al. 2005, S. 57-65).

Einen weiteren Anhalt für die Beteiligung von MMPs an den pathophysiologischen Vorgängen, die zur arteriellen Thrombose führen, lieferten Kai und Mitarbeiter, die im Serum bzw. Plasma von Patienten mit akuten Koronarsyndromen erhöhte Spiegel der Kollagenasen MMP-2 und MMP-9 feststellten (Kai et al. 1998, S. 368-372).

Sukhova et al. wiesen 1999 eine erhöhte Kollagenolyse in atheromatösen, rupturgefährdeten (im Gegensatz zu fibrösen) Plaques nach, in denen sich eine erhöhte Makrophagen-Expressi-

on der MMPs 1 und 13 (Kollagenase 1 und 3) fand, was den Beitrag dieser beiden MMPs hinsichtlich der Destabilisierung der Plaque und der Erhöhung der Rupturgefahr unterstreicht (Sukhova et al. 1999, S. 2503-2509).

1.3 EMMPRIN (Synonyme: Basigin / CD 147)

1.3.1 Struktur und Eigenschaften

EMMPRIN (*Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*) ist ein transmembranöses Glykoprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 31 und 65 kDa, abhängig vom Ausmaß der Glykosylierung (Tang, Chang et al. 2004, S. 4045). In den meisten Fällen beträgt das Molekulargewicht jedoch 58 kDa (Caudroy et al. 1999, S. 1576). Das Molekül ist der Familie der Immunglobuline zuzuordnen (Biswas et al. 1995, S. 434-439) und besitzt insbesondere in der hochglykosylierten Form die Eigenschaft, die Neusynthese bestimmter MMPs wie MT1-MMP, MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9 effektiv induzieren zu können (Tang et al. 2004, S. 4043).

Das für EMMPRIN codierende Gen befindet sich auf Chromosom 19 und besteht aus sieben Exons und sechs Introns mit einem Promoter 470 bp 5' upstream (-142 bis -112 bp) (Liang et al. 2002, S. 77).

EMMPRIN besteht aus zwei extrazellulären C2-ähnlichen Immunglobulindomänen, einer kurzen transmembranösen und einer zytoplasmatischen Domäne. Die hoch konservierte Aminosäuresequenz der transmembranösen Domäne mit glutamin- und leucinreichen Sequenzen weist auf die Möglichkeit einer Interaktion mit anderen transmembranösen Proteinen hin (Yan et al. 2005, S. 200).

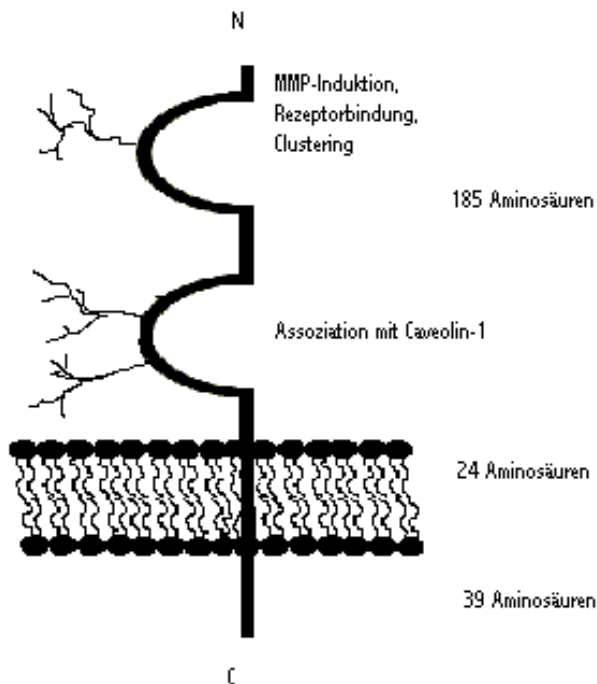


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des EMMPRIN-Moleküls mit zwei extrazellulären Immunglobulin-Domänen mit drei ASN-gekoppelten Oligosacchariden sowie einer transmembranösen und einer intrazellulären Domäne (modifiziert nach Gabison et al. 2005, S. 362).

Aktuelle Untersuchungen lassen vermuten, dass für die MMP-Stimulation die N-terminale Immunglobulin-domäne verantwortlich ist (Sun et al. 2001, S. 2277), wohingegen die C-terminale mit Caveolin-1 Komplexe ausbilden kann (Tang, Hemler 2004, S. 11112-11118). Weiterhin können EMMPRIN-Proteine *cis*-konfigurierte Homo-Oligomere miteinander bilden (Toole 2003, S. 374; Yoshida et al. 2000, S.4372-4380). Dieses so genannte „Clustering“ wiederum wird durch die Assoziation mit Caveolin-1 reduziert, ebenso wie die Glykosylierung der extrazellulären Domäne, was bei Überexpression von Caveolin-1 letztlich zu einer reduzierten Induktion von MMP-1 führt (Tang, Chang et al. 2004, S. 4043-4050).

1.3.2 Vorkommen von EMMPRIN

EMMPRIN wurde erstmals im Jahr 1989 von Ellis et al. beschrieben. Sie wiesen das Vorkommen des Proteins an der Oberfläche einer Zelllinie (LX-1) aus humanem Bronchialkarzinom nach und äußerten die Vermutung, dass umliegende Fibroblasten zur Bildung von Kollagenasen angeregt würden. Aus diesem Grund bezeichneten sie es zunächst als „*tumor cell collagenase-stimulatory factor*“ (Ellis et al. 1989, S. 3385-3391).

Zwei Jahre später erfolgte eine partielle Sequenzierung und nähere Charakterisierung des nunmehr als „*tumor cell-derived, collagenase stimulatory factor*“ (TCSF) bezeichneten Proteins (Nabeshima et al. 1991, S. 90-96). In den folgenden Jahren gelang verschiedenen Forschungsgruppen der Nachweis auf Zellen verschiedener weiterer invasiv wachsender Tumoren. So wurde TCSF 1993 von Muraoka et al. auf Zellmembranen von Urothelzellkarzinomzellen nachgewiesen und als möglicher Tumormarker für das Blasenkarzinom in der Urinzytologie in Betracht gezogen (Muraoka et al. 1993, S. 19-26). Es zeigte sich bald, dass TCSF nicht nur die Fähigkeit zur Induktion von Kollagenasen besitzt, sondern auch weitere MMPs induzieren kann. So wiesen Kataoka et al. 1993 nach, dass TCSF auf Tumorzellen bei Fibroblasten die Expression dreier MMPs, nämlich interstitieller Kollagenase (= MMP-1), 72-kDa-Gelatinase (= MMP-2) und Stromelysin-1 (= MMP-3), induziert (Kataoka et al. 1993, S. 3154-3158). Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten Guo und Mitarbeiter mit dem rekombinanten Molekül, das mittlerweile aufgrund dieser breiteren Wirkweise in *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (EMMPRIN) (Biswas et al. 1995, S. 434-439) umbenannt worden war (Guo et al. 1997, S. 24-27). In den folgenden Jahren kamen neue Erkenntnisse hinsichtlich Lokalisation und Effekten von EMMPRIN hinzu, allerdings vorläufig auf das Vorkommen bei malignen Tumoren beschränkt. Van den Oord und Mitarbeiter konnten das Molekül in frühen Stadien des malignen Melanoms auf den Tumorzellen nachweisen (van den Oord et al. 1997, S. 665-670).

Im Jahr 1999 zeigten Caudroy et al., dass EMMPRIN, welches sie auf Bronchial- und Mammakarzinomzellen nachgewiesen hatten, umliegende Stromazellen verstärkt zur MMP-2-Produktion anregt. Aus diesen Beobachtungen wurde der Schluss gezogen, dass es sich bei EMMPRIN um einen wichtigen Faktor für Tumorprogression und Neoangiogenese handle (Caudroy et al. 1999, S. 1575-1580). 2002 zeigten sie darüber hinaus, dass EMMPRIN-expri-

mierende Tumorzellen zum einen auch selbst MMP-2 bilden, zum anderen bei Endothelzellen im Tumor die Produktion diverser MMPs anregen (Caudroy et al. 2002, S. 697-702).

Lim et al. konnten 1998 einige der intrazellulären Signalmechanismen identifizieren, die bei Fibroblasten nach Kontakt mit EMMPRIN-exprimierenden Tumorzellen zur Bildung von MMP-1 führten. Als wichtiges Signalmolekül wurde hierbei die MAP-Kinase p38 identifiziert, deren Aktivierung wiederum Tyrosinkinase-abhängig ist (Lim et al. 1998, S. 88-92).

Für die MMP-2 Sekretion hingegen wurde ein Phospholipase A(2)- und 5-Lipoxygenase-katalysierter Aktivierungsweg gezeigt (Taylor et al. 2002, S. 5765-5772).

2001 wiesen Li und Mitarbeiter die funktionelle Homologität von EMMPRIN und dem in Mäusen beobachteten Basigin nach, indem sie nachwiesen, dass letzteres MMPs bei Fibroblasten induziert (Li et al. 2001, S. 371-379).

War die Erforschung von EMMPRIN anfänglich auf das Vorkommen in bösartigen Tumoren beschränkt gewesen, konnten Major et al. im Jahr 2002 zeigen, dass auch ausdifferenzierte Makrophagen EMMPRIN an ihrer Oberfläche exprimieren. Darüber hinaus wiesen sie EMMPRIN erstmals in atherosklerotischen Läsionen mit hohem Makrophagen-Anteil nach (Major et al. 2002, S. 1200-1207). Auch auf Endothel- sowie auf glatten Gefäßmuskelzellen wurde das Molekül nachgewiesen (Haug et al. 2004, S. 1823-1829). Eine funktionelle Relevanz für die Atherogenese sowie eine Regulation von EMMPRIN *in vivo* konnten bisher noch nicht gezeigt werden. Auch ist die Wirkweise bisher nur unvollständig verstanden. Beispielsweise konnte bisher nicht genau geklärt werden, an welchen Rezeptor EMMPRIN bindet. Als wahrscheinlich gilt eine Interaktion zwischen zwei EMMPRIN-Molekülen, was bedeuten würde, dass EMMPRIN gleichzeitig als Effektor und Rezeptor fungiert. Die oben erwähnte Homo-Oligomer-Ausbildung („Clustering“) scheint in diesem Zusammenhang bedeutsam zu sein. Es wird angenommen, dass für die MMP-Induktion neben der EMMPRIN-EMMPRIN-Bindung darüber hinaus die Glykosylierung des EMMPRIN-Moleküls essentiell ist (Sun et al. 2001, S. 2276).

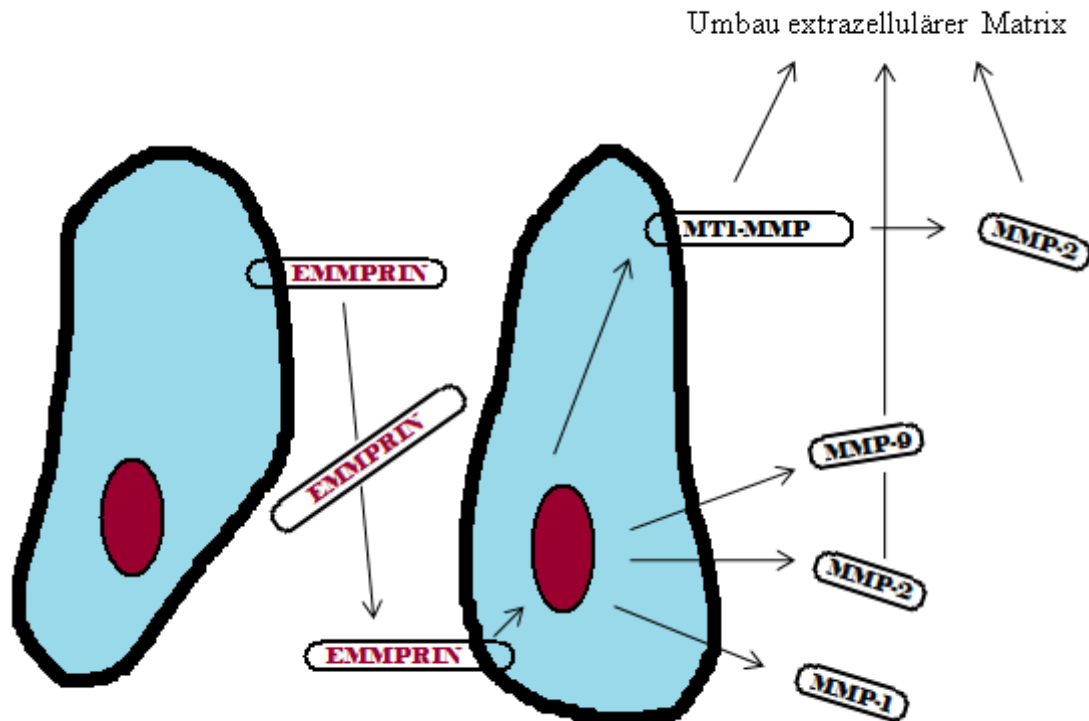


Abbildung 3: Vermuteter Weg der Induktion von MMP-1, -2 und -9 sowie von MT1-MMP über eine EMMPRIN-EMMPRIN-Interaktion.

Modifiziert nach: Sluijter, J.: Prevention and dissection of the restenosis process after balloon angioplasty and stenting. In: The Interuniversity Cardiology Institute of the Netherlands.

URL: http://www.icin.nl/read/magicine2004_2p (07.06.07)

Trotz einiger Erkenntnisse hinsichtlich der intrazellulären Signalwege, die von EMMPRIN ausgelöst werden, sind die genauen Mechanismen, die letztlich zur MMP-Regulation durch EMMPRIN führen, noch nicht bekannt.

Großenteils unverstanden ist darüber hinaus die Regulation der EMMPRIN-Expression selbst. Es ist zwar bekannt, dass unter pathophysiologischen Bedingungen wie Tumorprogression oder Atherogenese EMMPRIN verstärkt exprimiert wird, die einzelnen Einflussfaktoren sind jedoch nur zum Teil bekannt.

Studien unserer Arbeitsgruppe konnten die bestehenden Kenntnisse über die Regulation von EMMPRIN auf Monozyten insoweit erweitern, als sie den Einfluss von *Chlamydia pneumoniae* auf die Oberflächenexpression von EMMPRIN nachwiesen. So konnte gezeigt werden, dass Monozyten, die mit dem intrazellulären Bakterium infiziert worden waren, verstärkt

EMMPRIN und auch MT1-MMP exprimieren. Darüber hinaus kam es zu einer signifikant erhöhten Sekretion von MMP-9 aus den infizierten Monozyten (Schmidt, Redecke et al. 2006, S. 154). Dieses Ergebnis ist für die Forschung auf dem Gebiet der Atherosklerose insbesondere deshalb interessant, weil das Vorhandensein von *Chlamydia pneumoniae* in atherosklerotischen Plaques aus mehreren Arbeiten bekannt ist und eine chronische Infektion mit dem Erreger als atherogener Faktor diskutiert wird (Maass et al. 1998, S. 25; Muhlestein et al. 1996, S. 1555-1561).

Als weiterer Faktor, der einen Einfluss auf die Induktion der Oberflächenexpression von EMMPRIN auf Monozyten im Rahmen der Atherosklerose hat, konnte von unserer Arbeitsgruppe enzymatisch modifiziertes LDL-Cholesterin identifiziert werden (May et al. 2005, S. 710-715), von dem bekannt ist, dass es in atherosklerotischen Läsionen vom Typ *fatty streak* vermehrt intrazellulär (in Makrophagen / Schaumzellen) vorliegt (Torzewski et al. 1998, S. 2130-2136; Bhakdi et al. 1999, S. 2348-2354).

2 Zielsetzung

Als Ziel der vorliegenden Arbeit sollten die oben umrissenen bisher bestehenden Erkenntnisse durch Forschungsergebnisse zur Regulation von EMMPRIN *in vivo* an Patienten mit koronarer Herzerkrankung erweitert werden.

Bislang lag keine Beschreibung der Regulation von EMMPRIN *in vivo* auf kardiovaskulären Zellen bzw. Monozyten vor. Das Verhalten der Oberflächenexpression von EMMPRIN auf Entzündungszellen war darüber hinaus im akuten Myokardinfarkt bisher noch nicht untersucht worden.

Aus diesem Grund sollte die Regulation von EMMPRIN *in vivo* auf Monozyten zum Zeitpunkt eines akuten Myokardinfarktes untersucht werden.

Hierzu sollte das Verhalten der Oberflächenexpression von EMMPRIN bei 20 Patienten mit der Diagnose des akuten Infarktes untersucht werden. Als Vergleichskollektive sollten hierbei jeweils 20 Patienten mit der klinischen Diagnose einer stabilen Angina pectoris (chronische stabile Angina pectoris, CSA) und einer koronarangiografisch gesicherten koronaren Herzerkrankung sowie 20 gesunde Probanden dienen.

Die membrangebundene Matrix-Metalloproteinase MT1-MMP, die funktionell eine enge Verbindung zu EMMPRIN aufweist, sollte im Rahmen der Versuche in gleicher Weise untersucht werden.

Ausgehend von der bekannten Induktion der Gelatinase MMP-9 durch EMMPRIN war es darüber hinaus Ziel der vorliegenden Arbeit, die Plasmaaktivität der Gelatinase MMP-9 *in vivo* beim akuten Myokardinfarkt zu untersuchen und mit der Oberflächenexpression von EMMPRIN und MT1-MMP zu korrelieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

8,5-ml-CPDA-Monovette [®]	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Vortex-Gerät	Vortex-Genie1, Scientific Industries, Bohemia (NY), USA
FACS-Gerät	FACSCalibur, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Gel-Dry [™] Drying Solution	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Best.-Nr. LC 4025)
Coomassie-Blue	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
ImageJ	Public-Domain-Software zur Quantifizierung der optischen Dichte der Zymographie-Gels
Large Cellophane	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Best.-Nr. NC 2200)
Lyse-Reagenz	Whole Blood Lysing Reagent Kit #6602764, Beckman Coulter, Fullerton (CA), USA
Monoklonaler Antikörper Maus-Anti-EMMPRIN, Klon: 1 G6.2	Chemicon International, Temecula (CA), USA
Monoklonaler Antikörper Maus-Anti-MT1-MMP, Klon: 114-IF2	Calbiochem, San Diego (CA), USA

Fluoreszenzmarkiertes, gereinigtes F(ab') ₂ -Antikörperfragment aus Kaninchen-Antiserum	R0439 RPE, DAKO UK Ltd., Cambridge-shire, UK
Novex® Mini-Zellkammer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Novex® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x LC 2676)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Best.-Nr. LC 2676)
Novex® Zymogram (Gelatin) Gel 1.0 mm, 15 well	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Best.-Nr. EC61755BOX)
Novex® Zymogram Developing Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Best.-Nr. LC 2671)
Novex® Zymogram Renaturing Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Best.-Nr. LC 2670)
SeeBlue® Protein-Standard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Best.-Nr. LC 5925)
FACS-Puffer/-Spüllösung	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg
Fixierlösung für gefärbte Zellen (FACS)	0,5 g Paraformaldehyd in 45 ml PBS, bei 65 °C lösen und pH auf 7,4 einstellen, steril filtrieren (0,20 µm)
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Pipettierhilfen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (steril)	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Röhrchen 5 ml, 12 x 75 mm (Falcon)	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg

3.2 Methoden

3.2.1 Probengewinnung

Die Blutproben, aus denen die zu untersuchenden Monozyten und das Plasma stammten, wurden im Deutschen Herzzentrum München bei 20 Patienten mit der Diagnose eines akuten Myokardinfarktes mit Schmerzbeginn innerhalb der letzten 24 Stunden, bei 20 Patienten mit stabiler Angina pectoris sowie bei 20 gesunden Kontrollpersonen gewonnen.

1. Die Diagnosekriterien für den akuten Myokardinfarkt beinhalteten eine Anamnese für länger anhaltenden ischämischen Brustschmerz (Beginn innerhalb der letzten 24 Stunden), ST-Hebungen im EKG sowie eine Serum-Kreatinkinase von über 240 U/ml mit begleitendem signifikantem Anstieg des MB-Isoenzym. Patienten, die das erste und mindestens ein weiteres Kriterium erfüllten, wurden berücksichtigt. Nach der Killip-Klassifikation waren Patienten der Klassen I-IV eingeschlossen. Der Zeitpunkt für die Blutentnahme lag vor der Revaskularisation mittels PTCA und Stentimplantation (*Bare Metal Stent*).
2. Zur Diagnosestellung „stabile Angina pectoris“ diente die typische Klinik mit gleichförmig auftretenden provozierbaren retrosternalen Thoraxschmerzen. Darüber hinaus war eine koronare Herzerkrankung koronarangiographisch im Rahmen zumindest einer Herzkatheteruntersuchung gesichert worden.
3. Als Kontrollgruppe dienten freiwillige, anamnestisch herzgesunde Klinikmitarbeiter des Deutschen Herzzentrums München.

Ausschlusskriterien für alle drei Gruppen waren nichtkardiale Erkrankungen, die möglicherweise Einfluss auf die Ergebnisse gehabt hätten. Insbesondere sind in diesem Zusammenhang Autoimmunerkrankungen, Malignome oder Infektionen anzuführen.

Die Patientenproben wurden im Rahmen der Aufnahme und, im Falle eines akuten Infarktes, vor Beginn der Revaskularisierungstherapie gewonnen. Der Zeitraum vom Eintritt des akuten Schmerzereignisses bis zur Probengewinnung betrug im Mittel 7,7 Stunden (\pm 4,7 Stunden).

Darüber hinaus wurden im Rahmen einer routinemäßigen Wiedervorstellung der Patienten sechs Monate nach dem ersten Aufenthalt zur Re-Koronarangiografie erneute Blutproben gewonnen.

Die Blutentnahme erfolgte durch venöse Punktion und anschließendes Füllen zweier 8,5-ml-Monovetten[®], die CPDA (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin) zur Antikoagulation enthielten.

3.2.2 Durchflusszytometrie

3.2.2.1 Grundlagen

Mithilfe der Durchflusszytometrie (engl. fluorescence activated cell sorting, FACS) ist es möglich, bestimmte biochemische und physikalische Eigenschaften einer Zellpopulation in sehr kurzer Zeit zu analysieren. Hierzu passieren die zu untersuchenden Zellen, die in Einzelsuspension vorliegen, in Form von Tröpfchen einen Laserstrahl, dessen Licht sie entsprechend ihren strukturellen Eigenschaften streuen. Zusätzlich werden fluoreszierende Antikörper (Fluorescein-Isothiocyanat = FITC oder Phycoerythrin = PE), die in einem der Messung vorangehenden Färbevorgang an zu untersuchende Zellantigene (bzw. an den Fc-Teil antigenspezifischer monoklonaler Antikörper) gebunden werden können, durch einen monochromatischen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht werden von Photodetektoren gemessen.

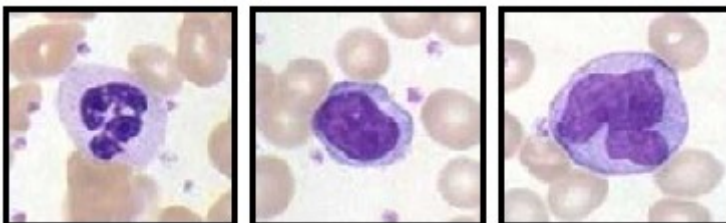


Abbildung 4: Die Abbildung zeigt einen neutrophilen Granulozyten (links, groß, Granula), einen Lymphozyten (Mitte, kleiner, kaum Granula) und eine Monozyten (rechts, groß, kaum Granula). Es lässt sich erkennen, dass die drei Zelltypen sich in Hinblick auf Größe und Granularität unterscheiden, was ihre Differenzierbarkeit in der Durchflusszytometrie ermöglicht. Quelle: Wikipedia (26.09.07). URL: <http://www.de.wikipedia.org/wiki/leukozyten> (3.10.07)

Anhand der Vorwärts-Lichtstreuung (Forward Scatter = FSC) lässt sich eine Aussage über die Zellgröße und -aggregation treffen, während die seitliche Lichtstreuung (Side Scatter = SSC), die in einem Winkel von 90° zum FSC gemessen wird, mit der Granularität und dem Kern-Plasma-Verhältnis der Zelle korreliert. Auf diese Weise lassen sich die untersuchten Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit den verschiedenen Populationen zuordnen.

Die Intensität des emittierten Lichts spiegelt die Menge der fluoreszierenden Antikörper, die an die Zelloberfläche gebunden sind, proportional wider. Durch ihre Messung lassen sich Rückschlüsse auf den Grad der Oberflächenexpression des spezifisch markierten Antigens ziehen.

Als Negativkontrolle werden im Zuge der Messung zusätzlich zu den spezifisch markierten Zellen sowohl unbehandelte Zellen (zur Messung der Eigenfluoreszenz) als auch Zellen verwendet, die mit einem unspezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert wurden.

3.2.2.2 Antikörpermarkierung von Leukozyten

Die Fluoreszenzmarkierung der Oberflächenantigene vollzieht sich in mehreren Arbeitsschritten, die im Folgenden dargestellt werden sollen. Alle unten beschriebenen Schritte werden parallel mit einer Patientenprobe und einer Kontrollprobe eines herzgesunden Probanden durchgeführt.

Zwei FACS-Röhrchen werden mit jeweils 5 µl monoklonalem unmarkiertem Maus-anti-Human-Antikörper gegen die Oberflächenantigene EMMPRIN und MT1-MMP bestückt, der (ggf. nach einer Verdünnung 1:10 mit PBS) in einer Konzentration von 100 µg/ml vorliegt. Zwei weitere Röhrchen bleiben als Negativkontrollen ohne Antikörper. Die Blutproben werden vorsichtig, aber sorgfältig gemischt. Es werden in jedes Röhrchen 95 µl CPDA-Blut zugegeben, sodass in den mit Antikörpern versehenen Röhrchen eine Antikörper-Konzentration von jetzt 5 µg/ml vorliegt. Anschließend werden die Röhrchen mit dem Vortex-Rüttler vorsichtig gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden die Röhrchen zum Waschen mit 4 ml PBS-Lösung aufgefüllt und daraufhin bei Raumtemperatur 5 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Die Überstände werden abgesaugt und die verbleibenden Zellpellets, die die nun spezifisch markierten Leukozyten enthalten, in 100 µl PBS resuspendiert.

Als nächster Arbeitsgang werden jeweils 10 µl Kaninchen-anti-Maus-Antikörper, der an den Fc-Teil von Immunglobulinen bindet, zugegeben. Dieser zweite Antikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) markiert. Eines der beiden Röhrchen, die vorher keine Antikörper erhalten haben, bleibt bei diesem Schritt ausgespart, sodass es nach wie vor nur unmarkierte Zellen enthält. In das zweite dieser Röhrchen wird der PE-markierte Antikörper zugegeben. Dieser Arbeitsschritt erfolgt wie auch alle sich anschließenden unter Lichtabschluss. Die entstandene Suspension wird nach erneutem Mischen 30 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Da die Erythrozyten, die zum jetzigen Zeitpunkt den größten Zellanteil in der Suspension ausmachen, den Messvorgang stören würden, müssen sie entfernt werden. Hierzu dient die nun durchgeführte chemische Hämolyse. Dabei wird zunächst 1 ml eines zuvor im Verhältnis 1:25 verdünnten Lyse-Reagenzes in jedes Röhrchen gegeben. Die Lyse der Erythrozyten ist nach ca. einer Minute erfolgt. Nun werden zum Schutz der verbliebenen Leukozyten 250 µl Fixativ zugegeben und die Röhrchen erneut gemischt.

Hieran schließt sich ein weiterer Waschvorgang mit 3 ml PBS pro Röhrchen nach dem oben beschriebenen Muster an. Die verbleibenden Pellets werden bei direkt anschließender Messung in 250 µl PBS resuspendiert oder alternativ mit 250 µl einprozentigem Para-Formaldehyd fixiert, ein Arbeitsschritt, der das mögliche Zeitfenster bis zur Messung auf 24 Stunden vergrößert.

3.2.2.3 Durchführung der FACS-Messung

Die FACS-Röhrchen, welche nach dem Markierungsvorgang jeweils unterschiedlich markierte Zellsuspensionen enthalten, werden nacheinander an den Ansaugmechanismus des FACS-Gerätes gehalten, woraufhin der Ansaugvorgang gestartet wird. Entsprechend den für jede Zelle gemessenen FSC- und SSC-Werten wird jeder Zelle ein Punkt in einem Scattergramm zugewiesen. Der Messvorgang wird automatisch beendet, sobald 20000 Zellen innerhalb eines voreingestellten Fensters, in dem sich nahezu ausschließlich Monozyten befinden, gezählt sind. Alle gemessenen Werte einschließlich der Fluoreszenz jeder Zelle werden gleichzeitig automatisch in der Geräte-EDV gespeichert und sind als Rohdaten jederzeit einer Auswertung zugänglich.



Abbildung 5: Dargestellt ist die verwendete FACS-Messstation FACSCalibur der Firma Becton Dickinson. Angeschlossen ist eine Rechereinheit zur Auswertung der Daten.

3.2.2.4 Auswertung der FACS-Daten

Die Scattergramme, die für jedes Röhrchen (und somit für die zu untersuchenden Oberflächenantigene sowie die beiden Negativkontrollen) vorliegen, werden in einem anschließenden Vorgang ausgewertet. Dies geschieht, indem zunächst der Bereich, der die interessierenden Zellen enthält, in jedem Scattergramm manuell grafisch eingegrenzt wird. Hierbei ist darauf zu achten, dass der gewählte Bereich so klein wie möglich gewählt wird, damit möglichst ausschließlich Zellen einer Population (im vorliegenden Fall Monozyten) in die Auswertung eingehen. Gleichzeitig muss er so groß gewählt werden, dass er ca. 20000 Zellen enthält.

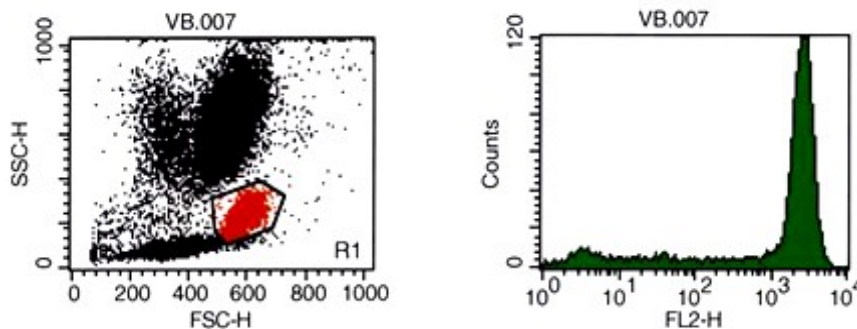


Abbildung 6: Die linke Abbildung zeigt beispielhaft ein Scattergramm nach einer FACS-Messung. Jedem Punkt entspricht eine detektierte Zelle. Die drei Zellpopulationen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten sind entsprechend ihrer Größe und Granularität in zwei Dimensionen aufgetrennt. Die Markierung schließt den manuell festgelegten Bereich ein, in dem sich die auszuwertenden Monozyten befinden. Das Diagramm rechts stellt die Verteilung der gemessenen Fluoreszenzen innerhalb des Monozytenfensters dar.

Nachdem auf diese Weise das Monozytenfenster definiert worden ist, wird der mittlere Fluoreszenzgrad der in diesem Fenster enthaltenen Zellen durch die Auswertungssoftware berechnet und als Zahlenwert ausgegeben. Man erhält auf diese Weise für jedes markierte Oberflächenantigen einen Wert, der mit dem mittleren Grad der Expression auf der Zelloberfläche der Monozyten im Patientenblut korreliert.

3.2.3 SDS-PAGE-Zymographie

3.2.3.1 Grundlagen

Die SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)-Zymographie diente im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen dazu, die enzymatische Aktivität der ins Plasma sezernierten Gelatinasen, und damit indirekt ihre Konzentration, semiquantitativ zu erfassen. Es macht sich die Eigenschaft der Gelatinasen (im vorliegenden Fall der MMP-9) zunutze, das Substrat Gelatine enzymatisch abzubauen.

3.2.3.2 Durchführung

Die Durchführung einer SDS-PAGE-Plasmazymographie vollzieht sich in mehreren Schritten. Zunächst erfolgt nach Denaturierung der Proteine eine Gel-Elektrophorese entlang einer elektrischen Spannung zur Auftrennung der in der Probe enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Es schließt sich eine Renaturierung der Enzyme mit Rückgewinnung ihrer proteolytischen Eigenschaften an, die zum Abbau der im Gel enthaltenen Gelatine führt. Die anschließende Blaufärbung der verbliebenen Gelatine führt dazu, dass die Aktivität der Gelatinasen (und dadurch ihre Konzentration in der Probe) durch die Dicke der sich nicht anfärbenden Bande visualisiert wird.

Verwendet wurde der „SDS Page Gelatin Zymography-Kit“ der Firma Invitrogen.

Das zu untersuchende Plasma wurde durch Zentrifugation (10 Minuten bei 3000 U/min) aus den CPDA-Blutproben der Patienten und der Probanden gewonnen.

10 µl Plasmaprobe werden im Verhältnis 1:1 mit 10 µl SDS-Probenpuffer verdünnt.

SDS (Natriumdodecylsulfat) dient als anionisches Detergens während der anschließenden zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur dazu, die Eigenladungen der Proteine zu überdecken. Zugleich werden die Proteasen bei diesem Vorgang reversibel denaturiert, sodass sie ihre enzymatischen Eigenschaften bis zur späteren Renaturierung einbüßen.

Nach Bestückung einer Novex-Mini-Zellkammer (s. Abb. 7) mit einem Gel auf Polyacrylamid-Basis, das zusätzlich Gelatine als Substrat enthält, wird die Kammer mit einem auf

4°C gekühlten Laufpuffer gefüllt. Anschließend werden die Gel-Taschen mit jeweils 15 µl Patientenprobe bestückt. In eine der Taschen wird ein Größenmarker pipettiert (ein Proteingemisch mit bekannten Molekülgrößen). Vorsichtiges Pipettieren ist bei diesen Arbeitsschritten besonders wichtig, da die Proben bei zu schnellem Pipettieren oder zu schnellem Herausziehen der Pipettenspitze unter Umständen aus der Tasche herauslaufen können.



Abbildung 7: Dargestellt ist die Novex-Mini-Zellkammer sowie die Bestückung mit dem Polyacrylamid-Gel. Quelle: Invitrogen. URL: <http://www.invitrogen.com/content.cfm> (07.06.07)

Eine weitere Gel-Tasche wird mit 15 µl des gefärbten Proteinstandards SeeBlue® bestückt, der später zur visuellen Kontrolle des Starts der Proteinmigration durch das Gel dient.

Die Kammer wird verschlossen, und es wird anschließend bei 4°C eine Spannung von 125 Volt entlang des Gels angelegt. Während der folgenden zwei Stunden vollzieht sich durch Migration der negativ geladenen Proteine durch das Polyacrylamid-Gel eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer jeweiligen Molekülgröße im elektrischen Feld. Proteine mit relativ kleinem Molekulargewicht legen während dieses Vorgangs die längste Strecke zurück, größere Proteine entsprechend kürzere Strecken. Nach ca. 15 Minuten sollte der Beginn dieser Migration durch den Nachweis einer gefärbten Bande in der Tasche mit SeeBlue® überprüft werden.

Nach zwei Stunden wird die angelegte Spannung entfernt und die Migration durch das Gel auf diese Weise unterbrochen, die Proteine der Probe sind nun nach elektrophoretischer Auftrennung über das Gel verteilt.

Das Gel wird vorsichtig aus seinem Plastikgehäuse herausgelöst und anschließend mit ca. 100 ml des Renaturierungspuffers (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) in einer Schale bei Raumtempe-

ratur ca. eine halbe Stunde permanent geschwenkt. Dieser Vorgang dient dazu, durch eine pH-Wert-Änderung die Proteasen in ihre ursprüngliche, enzymatisch aktive Konformation zu überführen.

Nach Abgießen des Renaturierungspuffers wird das Gel zusammen mit ca. 100 ml eines Entwicklungspuffer (ebenfalls 1:10 mit Aqua dest. verdünnt) über Nacht bei 37°C unter permanentem Schwenken inkubiert. Während dieser Zeit vollzieht sich der enzymatische Abbau der im Gel erhaltenen Gelatine durch die renaturierten Gelatinasen.

Nach Abgießen des Entwicklungspuffers am nächsten Tag wird das Gel mit der verdünnten Färbelösung Coomassie-Blue übergossen und unter weiterem Schwenken 20 bis 30 Minuten lang gefärbt. Anschließend wird die Färbelösung mit destilliertem Wasser abgewaschen und das Gel, das sich jetzt blau mit mehr oder weniger stark entfärbten Banden zeigt, im destillierten Wasser aufbewahrt. Es schließt sich optional ein Scan des Gels an. Alternativ oder anschließend kann das Gel mithilfe einer Gel-Dry-Lösung getrocknet werden und ist dann dauerhaft haltbar.

3.2.3.3 Auswertung

Eine Möglichkeit der Auswertung der Gels ist die visuelle Abschätzung des Grades der Entfärbung des Gels im Bereich der Banden. Eine alternative Methode stellt die Quantifizierung der optischen Dichte mittels der ImageJ-Software dar. Letztere Methode wurde für die vorliegende Arbeit gewählt.

3.2.4 Statistische Analyse

Ergebnisse mit normalverteilten kontinuierlichen Variablen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben und wurden einem ungepaarten t-Test oder einer Varianzanalyse und, wenn angebracht, einem Scheffé-Test unterzogen.

Für den Vergleich der EMMPRIN- und MT1-MMP-Expression sowie der MMP-9-Aktivität zum Zeitpunkt des Infarktes sowie sechs Monate danach wurde ein gepaarter t-Test verwendet.

Die Oberflächenexpressionen von MT1-MMP und EMMPRIN wurden durch einfache lineare Regressionsanalyse verglichen.

Die Ergebnisse wurden dann als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenbezogene Basisdaten

Das mittlere Alter der Patienten betrug in der Gruppe der Infarktpatienten 61,8 Jahre (Spanne 38-83 Jahre), in der Gruppe der CSA-Patienten 59,0 Jahre (36-85 Jahre). In beiden Patientengruppen überwog die Gruppe der männlichen Patienten deutlich (Geschlechterverhältnis männlich : weiblich 18:2 bei AMI und 17:3 bei CSA). Die Tabelle 2 zeigt einige der patientenbezogenen Daten auf, die anhand der Aufnahmebefunde (hier insbesondere die anamnestisch ermittelten kardiovaskulären Risikofaktoren und die Vormedikation), der Labor- und Herzkatheterbefunde sowie der Entlassungsbriefe erhoben wurden. Anhand des Aufnahmebefundes der Patienten wurden die patientenbezogenen kardiovaskulären Risikofaktoren ermittelt. Hinsichtlich der berücksichtigten Risikofaktoren Hypercholesterinämie, arterieller Hypertonus, Nikotinabusus und Diabetes mellitus ergab sich die aus Tabelle 2 ersichtliche Verteilung. Das maximale Troponin T, dessen Bestimmung eine Abschätzung der durch Ischämie bedingten myokardialen Schädigung ermöglicht, lag in der Gruppe der Infarktpatienten erwartungsgemäß signifikant höher als bei den Patienten, die an stabiler Angina pectoris litten ($p < 0,01$).

Als Marker für die systemische Inflammation wurde das routinemäßig bestimmte C-reaktive Protein (CRP) verwendet. Dieses war bei Infarktpatienten gegenüber den Patienten mit stabiler Angina pectoris signifikant erhöht ($p < 0,01$).

Hinsichtlich der kardioprotektiven Vormedikation zeigte sich, dass gegenüber den Infarktpatienten ein signifikant höherer Anteil der CSA-Patienten Präparate der Wirkstoffgruppen ACE-Inhibitoren, HMG-Reduktase-Inhibitoren, Beta-Rezeptorantagonisten und Diuretika einnahm. Die statistischen Signifikanzniveaus betragen hierbei $p < 0,01$, $p < 0,025$ und $p < 0,05$. Bei der Einnahme von Acetylsalicylsäure zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen (11 / 20 Infarktpatienten gegenüber 14 / 20 CSA-Patienten).

Merkmal	AMI-Gruppe (n=20)	CSA-Gruppe (n=20)	p
Mittleres Alter in Jahren (Spanne)	61,8 (38-83)	59 (36-85)	n.s.
Geschlecht: M/W	18:2	17:3	n.s.
Hypercholesterinämie	11	13	n.s.
Art. Hypertonie	8	9	n.s.
Nikotinabusus	9	8	n.s.
Diabetes mellitus	3	4	n.s.
Eingefäßerkrankung	4	4	n.s.
Zweigefäßerkrankung	5	6	n.s.
Dreigefäßerkrankung	11	10	n.s.
Maximale Kreatinkinase (U/l)	1323 ± 1104	-	
Max. CK-MB (U/l)	97,4 ± 85,3		
Max. Troponin T (U/l)	6,77 ± 6,37	0,099 ± 0,059	<0,01
CRP (mg/l) bei Aufnahme	105,8 ± 102,7	19,81 ± 16,1	<0,01
Zielgefäß:			
LAD	8	-	
LCx	4	-	
RCA	6	-	
Venöser Bypass zur RCA	2	-	
Aufnahmemedikamente:			
ACE-Hemmer	6	14	<0,025
AT1-Rezeptor-Antagonisten	0	0	
Nitrate	1	1	
Statine	4	9	<0,05
Acetylsalicylsäure	11	14	n.s.
Betablocker	6	12	<0,05
Diuretika	4	12	<0,01

Tabelle 2: Charakteristika der untersuchten Gruppen. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung oder als Patientenzahlen angegeben.

AMI: Akuter Myokardinfarkt; CSA: chronische stabile Angina pectoris; LAD: left anterior descending coronary artery, Ramus interventricularis anterior; LCx: left circumflex coronary artery, Ramus circumflexus; RCA: right coronary artery, Arteria coronaria dextra.

4.2 Erhöhte Expression von EMMPRIN auf Monozyten im AMI

Die durchflusszytometrische Untersuchung von jeweils ca. 20000 Monozyten aus dem Blut der insgesamt 60 Patienten / Probanden auf die Oberflächenexpression von EMMPRIN zeigte eine erhöhte EMMPRIN-Expression im Infarktzeitpunkt gegenüber der Expression auf den Monozyten, die von den CSA-Patienten und den gesunden Probanden gewonnen worden waren. Dieses Ergebnis erwies sich als hochsignifikant ($p < 0,001$).

Im Vergleich mit den gesunden Probanden lag die EMMPRIN-Expression bei den CSA-Patienten zwar geringfügig höher, der Unterschied erwies sich jedoch nicht als signifikant.

Die Abbildung 8 veranschaulicht diese durchflusszytometrisch ermittelten Ergebnisse.

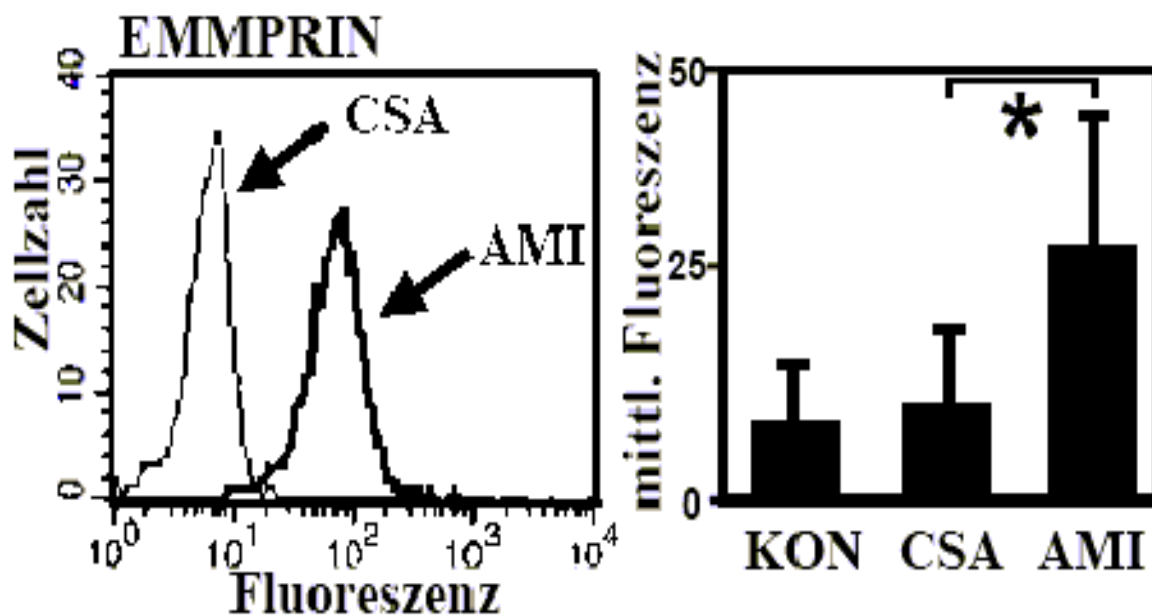


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von EMMPRIN auf Monozyten bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI) oder stabiler Angina pectoris (CSA). Links überlagerte Histogramme von jeweils einem Patienten mit AMI bzw. CSA, die parallel gemessen und analysiert wurden. Rechts die mittlere Fluoreszenz und die Standardabweichung bei gesunden Probanden (KON, n=20), CSA-Patienten (CSA, n=20) und Infarktpatienten (AMI, n=20). * $p < 0,001$

4.3 Erhöhte Expression von MT1-MMP auf Monozyten im AMI

Auf der Erkenntnis aufbauend, dass EMMPRIN eine verstärkte Expression von MT1-MMP induziert, stellte sich die Frage nach der Expression von MT1-MMP auf Monozyten beim akuten Myokardinfarkt. Analog der EMMPRIN-Oberflächenexpression wurde diese daher aus den gewonnenen Proben ermittelt. Ähnlich wie bei EMMPRIN zeigte sich eine erhöhte Expression auf den Monozyten im akuten Infarkt, verglichen mit den CSA-Patienten und den gesunden Probanden. Auch dieses Ergebnis erwies sich als hochsignifikant ($p < 0,001$).

Zwischen den CSA-Patienten und den gesunden Probanden gab es wiederum keine signifikanten Unterschiede bezüglich der MT1-MMP-Expression.

Die Abbildung 9 veranschaulicht diese durchflusszytometrisch ermittelten Ergebnisse.

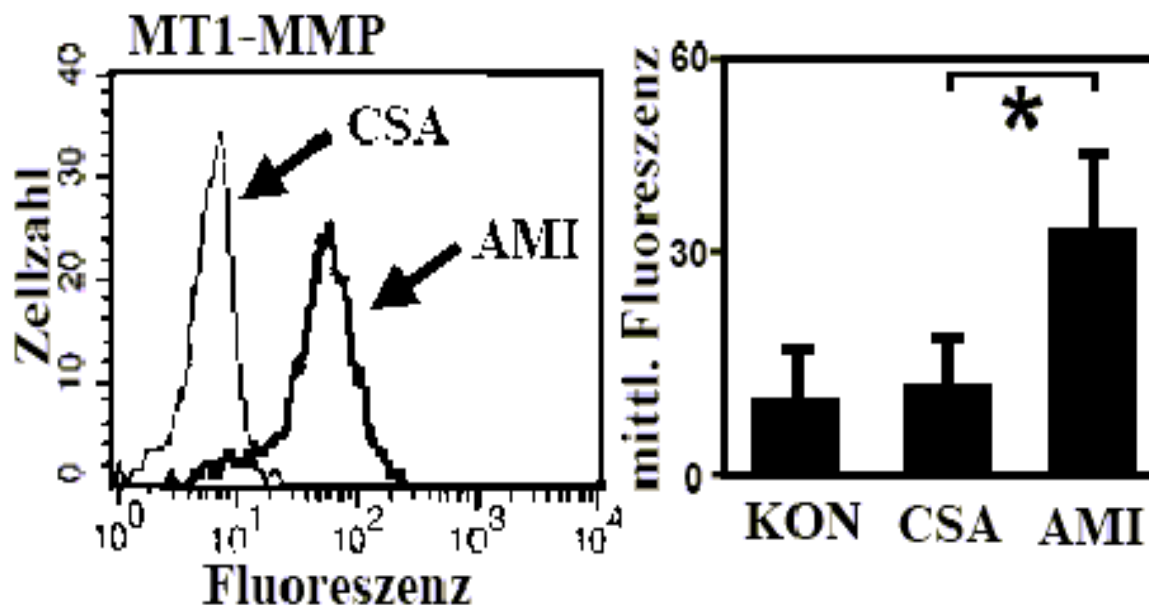


Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von MT1-MMP auf Monozyten bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI) oder stabiler Angina pectoris (CSA). Links überlagerte Histogramme von jeweils einem Patienten mit AMI bzw. CSA, die parallel gemessen und analysiert wurden. Rechts die mittlere Fluoreszenz und die Standardabweichung bei gesunden Probanden (KON, $n=20$), CSA-Patienten (CSA, $n=20$) und Infarktpatienten (AMI, $n=20$). * $p < 0,001$

4.4 Positive Korrelation der EMMPRIN- und MT1-MMP-Erhöhung

Zur Beurteilung einer möglichen Korrelation zwischen einer erhöhten EMMPRIN- und MT1-MMP-Expression im akuten Infarkt wurden die gewonnenen Daten einer Korrelations- und Regressionsanalyse unterzogen. Es zeigte sich hierbei bei einem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,545$ eine positive Korrelation. Dieser Zusammenhang erwies sich als hochsignifikant ($p < 0,001$).

Die Abbildung 10 veranschaulicht diese positive Korrelation.

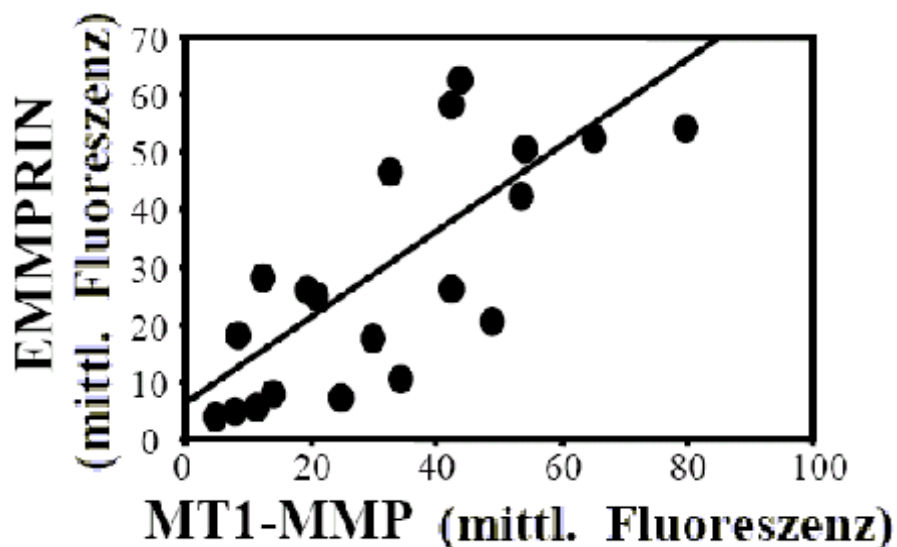


Abbildung 10: Lineare Korrelations- und Regressionsanalyse der Oberflächenexpression von EMMPRIN und MT1-MMP auf Monozyten beim akuten Myokardinfarkt. $R^2 = 0,545$, $p < 0,001$.

4.5 Normalisierung der EMMPRIN- und MT1-MMP-Expression

Im Rahmen einer Kontroll-Koronarangiografie sechs Monate nach dem akuten Myokardinfarkt konnten bei insgesamt acht der ursprünglich 20 Patienten erneut Blutproben gewonnen und diese einer weiteren durchflusszytometrischen Untersuchung zugeführt werden. Wie bereits im Zeitpunkt des Infarktes wurde die Oberflächenexpression von EMMPRIN und MT1-MMP untersucht.

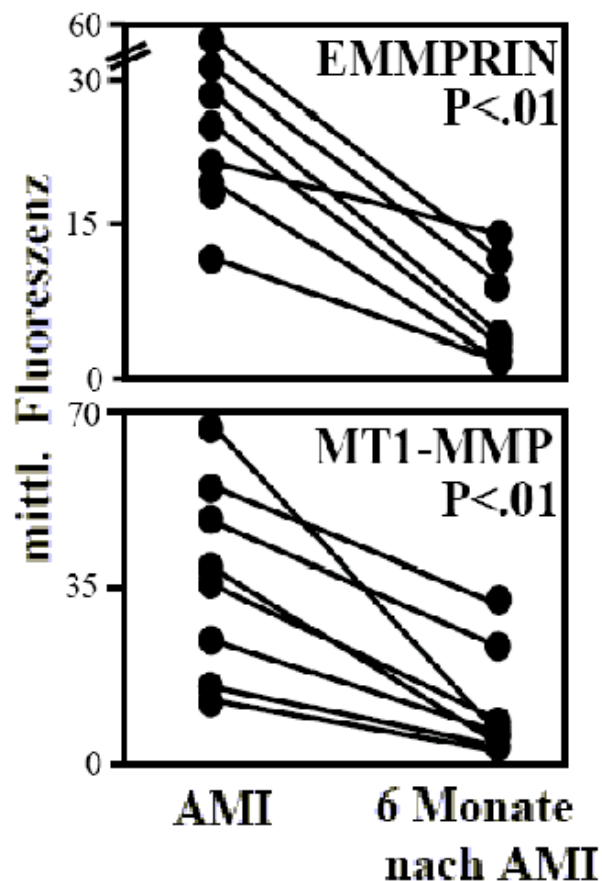


Abbildung 11: Rückgang der Oberflächenexpression von EMMPRIN (oben) und MT1-MMP (unten) auf den Monozyten der Infarktpatienten sechs Monate nach Infarkt. N=8.

Es zeigte sich ein deutlicher Rückgang der initial erhöhten Expression beider Moleküle auf Werte, die denen von gesunden Probanden entsprechen (s. Abb. 11). Dieser Rückgang erwies sich als signifikant ($p < 0,01$).

4.6 Erhöhte Plasmaaktivität von MMP-9 im akuten Myokardinfarkt

Ausgehend von der bekannten Tatsache, dass MMP-9 durch EMMPRIN induziert wird (vgl. 1.3), sollte zusätzlich zu den gewonnenen Ergebnissen der FACS-Messungen untersucht werden, ob die Gelatinase MMP-9 im akuten Infarkt eine erhöhte Plasmaaktivität aufweise. Hierzu wurde die MMP-9-Aktivität aus dem Plasma der Patienten und Probanden mit einer SDS-PAGE-Zymografie bestimmt.

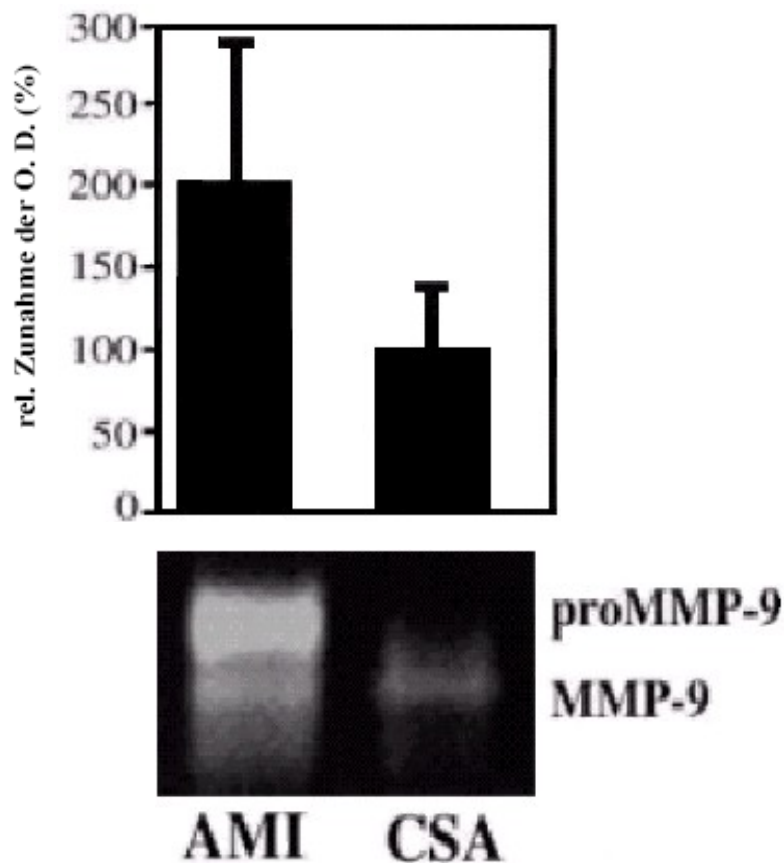


Abbildung 12: Oben: Relative Erhöhung der optischen Dichte (O. D.) der Patienten mit akutem Myokardinfarkt (links), verglichen mit Patienten mit stabiler Angina pectoris (rechts). Quantitative Analyse. $n=20$ für beide Gruppen, $p<0,01$. Unten: Eine repräsentative SDS-PAGE-Zymografie zeigt eine erhöhte Plasmaaktivität von MMP-9 bei einem Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI), verglichen mit einem Patienten mit stabiler Angina pectoris (CSA).

Als Maß für die Quantifizierung wurde der relative Anstieg der optischen Dichte verwendet.

Die Abbildung 12 zeigt beispielhaft die MMP-9-Banden jeweils eines repräsentativen AMI- und CSA-Patienten sowie den relativen Anstieg der optischen Dichten in den beiden Patientengruppen.

Es zeigt sich, dass die Plasmaaktivität der MMP-9 im akuten Infarkt höher lag als bei der CSA. Dieses Ergebnis erwies sich als signifikant ($p < 0,01$).

4.7 Normalisierung der Plasmaaktivität von MMP-9

Neben den oben erwähnten durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde bei acht AMI-Patienten zum Zeitpunkt sechs Monate nach Infarkt auch die Plasmaaktivität von MMP-9 erneut bestimmt. Analog dem Rückgang der Oberflächenexpression von EMMPRIN und MT1-MMP auf normale Werte hatte sich auch die Plasmaaktivität der MMP-9 normalisiert.

Dieser Rückgang erwies sich als signifikant ($p < 0,05$). Er wird in der Abbildung 13 veranschaulicht.

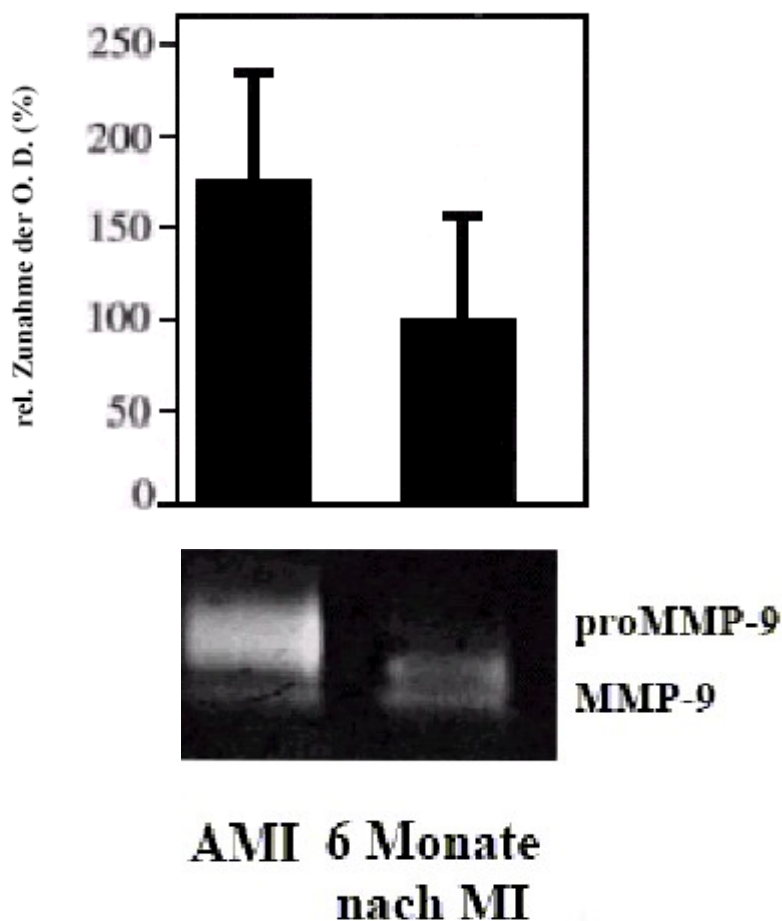


Abbildung 13: Eine repräsentative SDS-PAGE-Zymografie (unten) sowie eine quantitative Analyse von acht Patienten zeigen eine Normalisierung der Plasmaaktivität von MMP-9 sechs Monate nach erfolgreicher Revaskularisierungstherapie ($p < 0,05$).

5 Diskussion

5.1 Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt stehen klinisch keine validen diagnostischen Untersuchungsverfahren zur Verfügung, die die Detektion instabiler, rupturgefährdeter atherosklerotischer Plaques ermöglichen. Darüber hinaus existieren bisher noch keine therapeutischen Möglichkeiten, mit deren Hilfe der proteolytische Umbau extrazellulärer Matrix und die daraus resultierende klinisch bedeutsame Plaqueruptur wirksam verhindert werden könnten.

Aus diesem Grunde erscheint die Erweiterung der bestehenden Kenntnisse über die Regulation der proteolytischen Aktivität im Rahmen der Atherogenese und der Plaqueruptur mit der Folge eines akuten Koronarsyndroms sinnvoll, auch in Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapeutika, die diese Regulation beeinflussen könnten.

Die proteolytische Aktivität im Rahmen der Atherogenese und Plaqueprogression kommt zu einem großen Teil durch die Klasse der Matrix-Metalloproteinasen zustande. Insbesondere die Anwesenheit von MT1-MMP, MMP-2 und MMP-9 in der atherosklerotischen Plaque wird mit einer instabilen Erscheinungsform der Plaque mit einem daraus resultierenden erhöhten Rupturrisiko in Verbindung gebracht (Libby et al. 1997, S.136). Es zeigte sich, dass innerhalb atherosklerotischer Plaques Monozyten bzw. Makrophagen / Schaumzellen (Galis et al. 1995, S. 402-406) sowie glatte Muskelzellen (Galis, Muszynski et al. 1994, S. 181.189) die Hauptquellen für die intraläsionale MMP-Aktivität darstellen.

Im Rahmen der Regulation proteolytischer MMP-Aktivität kommt dem Glykoprotein EMMPRIN als Induktor eine wesentliche Bedeutung zu.

Die vorliegenden Daten beleuchten erstmals eine potentielle pathophysiologische Rolle von EMMPRIN bei der koronaren Herzerkrankung. Es gelang erstmals der Nachweis, dass EMMPRIN unter pathophysiologischen Bedingungen auf Monozyten *in vivo* quantitativ hochreguliert wird. So zeigte sich eine verstärkte Oberflächenexpression von EMMPRIN auf Monozyten bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina

pectoris und koronarangiographisch nachgewiesener koronarer Herzerkrankung. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt die erhöhte Oberflächenexpression von EMMPRIN *in vivo* mit einer verstärkten MT1-MMP-Expression auf Monozyten sowie einer erhöhten Plasmaaktivität der Gelatinase MMP-9 einherging.

Diese Erkenntnisse könnten das Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge auf molekularer Ebene zum Zeitpunkt des akuten Myokardinfarkts vertiefen.

5.2 Weiter führende Ergebnisse

Die Betrachtung der erzielten Ergebnisse *in vivo* führt zu der Frage, ob und inwieweit sich ein kausaler Zusammenhang der verstärkten EMMPRIN- und damit einhergehenden MT1-MMP-Expression mit der im Myokardinfarkt beobachteten erhöhten MMP-9-Plasmaaktivität feststellen lässt und welche pathophysiologische Relevanz sich daraus für die Infarktgenese ergeben könnte.

Weiter führende *In-vitro*-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe legen einen solchen Zusammenhang nahe.

So zeigten *In-vitro*-Versuche, dass nach Adhäsion von Monozyten entweder an EMMPRIN-transfizierte so genannte CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen oder aber direkt an rekombinantes EMMPRIN diese eine verstärkte MMP-9-Produktion aufnahmen. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass eine Ausschaltung des EMMPRIN-Gens die durch Lipopolysaccharid vermittelte MMP-9- und MT1-MMP-Induktion in Monozyten unterband. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass EMMPRIN einen zentralen Regulator für die MMP-Aktivität bei Monozyten darstellt (Schmidt, Bültmann et al. 2006, S. 837-839).

Auch hinsichtlich der Produktion der zweiten Gelatinase, der MMP-2, die vornehmlich in glatten Gefäßmuskelzellen erfolgt, konnte von unserer Arbeitsgruppe für EMMPRIN eine wichtige Rolle nachgewiesen werden. So führte die Adhäsion von EMMPRIN-transfizierten Monozyten an glatte Gefäßmuskelzellen bei diesen zu einer gesteigerten Sekretion von MMP-2 (Schmidt, Bültmann et al. 2006, S.838).

Aus diesen Daten lässt sich unter anderem die Schlussfolgerung ableiten, dass eine zelluläre Aufregulierung von EMMPRIN *in vivo* beim akuten Myokardinfarkt zu einer Aktivierungskaskade von MMPs führt. Aus dem beobachteten Effekt, dass die Hemmung der Translation des EMMPRIN-Gens zu einer Unterdrückung der Sekretion und Aktivität von MMP-9 führt, die durch eine Stimulation mit Lipopolysaccharid normalerweise hervorgerufen werden, lässt sich darüber hinaus ableiten, dass EMMPRIN möglicherweise nicht nur direkt zur MMP-Induktion führt, sondern darüber hinaus auch ein Schlüsselement darstellen könnte, ohne dessen Vorhandensein eine verstärkte MMP-Expression nicht stattfindet.

In einer Studie jüngerer Datums gelang einer Arbeitsgruppe um Matías-Román der Nachweis, dass MT1-MMP auf Monozyten für die Transmigration von Monozyten durch Endothelzellen erforderlich ist (Matías-Román et al. 2005, S. 3956-3964). Darüber hinaus zeigten Daten unserer Arbeitsgruppe, dass einerseits EMMPRIN bei der Regulation von MT1-MMP eine wichtige Rolle spielt und dass zum anderen MT1-MMP an der EMMPRIN-vermittelten Aktivierung der MMP-2 benachbarter glatter Muskelzellen ganz wesentlich beteiligt ist. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass EMMPRIN und MT1-MMP die Migration von Monozyten in den subintimalen Bereich ermöglichen. Dort wiederum differenzieren sich die eingewanderten Monozyten einerseits zu Makrophagen und Schaumzellen und stimulieren andererseits glatte Muskelzellen zur MMP-2-Sekretion. Die so ablaufende Kaskade aus EMMPRIN, MT1-MMP, MMP-9 und MMP-2 könnte einen wesentlichen Beitrag zur atherosklerotischen Plaqueprogression und -instabilität leisten.

Einen wichtigen Beitrag zur Erforschung der Regulation von EMMPRIN auf Makrophagen leisteten kürzlich Abe und Mitarbeiter. Sie konnten an peritonealen Makrophagen von Ratten zeigen, dass die EMMPRIN-Expression (und gleichzeitig die MMP-9-Expression) von der Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) in der Umgebung der Zellen abhängig ist. Erhöhte CRP-Spiegel führen demnach zu einer erhöhten EMMPRIN-Expression auf Makrophagen und einer erhöhten MMP-9-Aktivität in ihrer Nähe. Interessanterweise ließ sich dieser Effekt durch den HMG-CoA-Reduktasehemmer Fluvastatin hemmen (Abe et al. 2006, S. 1021-1028).

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lassen in Zusammenschau mit der oben skizzierten weiter gehenden Forschung die These zu, dass es sich bei EMMPRIN um einen möglichen Angriffspunkt für neue kardioprotektive Therapeutika handeln könnte.

5.3 Limitationen

Einschränkungen hinsichtlich der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse könnten sich unter Umständen aus der unterschiedlichen Medikation der verglichenen Patientengruppen ergeben. Patienten mit bereits bekannter koronarer Herzerkrankung nahmen signifikant häufiger ACE-Hemmer und Statine ein als die Patienten der Kontrollgruppe, was möglicherweise die Vergleichbarkeit einschränken könnte. Ein daher durchgeführter Vergleich zwischen den Myokardinfarktpatienten, die eine solche Medikation erhielten, einerseits und den Patienten ohne eine entsprechende Medikation andererseits erbrachte jedoch keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf eine differierende EMMPRIN-Expression.

Auch zwischen Patienten mit stabiler Angina pectoris und gesunden Probanden ohne Medikation fanden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der EMMPRIN- und MT1-MMP-Expression. Aufgrund dieser zusätzlich durchgeführten Analysen ist davon auszugehen, dass die gefundenen Unterschiede tatsächlich auf das Vorliegen eines akuten Myokardinfarktes und nicht auf die unterschiedliche Medikation zurückzuführen sind.

Hinsichtlich einiger Fragestellungen liefern die Ergebnisse dieser Arbeit nur unzureichende Antworten:

So lassen die vorliegenden Ergebnisse ebenso wie die weiter gehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe keinen Rückschluss auf den genauen molekularen Mechanismus des zu beobachtenden Effekts eines hochregulierten EMMPRIN auf die MMP-Aktivierung zu. Dieser ist, wie oben angeführt, nach wie vor als weitgehend unverstanden zu betrachten.

Auch in Hinblick auf die Frage, ob und inwieweit EMMPRIN an den Vorgängen, die letztlich zur Plaqueruptur und auf diese Weise zur Infarktgenese führen, tatsächlich ursächlich beteiligt ist, liefern die Ergebnisse keine eindeutigen Erkenntnisse. Die Hochregulation von MMPs, die im Rahmen der Plaqueprogression und im Zeitpunkt der Plaqueruptur zu beobachten ist, würde diesen Schluss nahelegen, liefert jedoch noch keinen endgültigen Beweis für diese Vermutung.

Eine unterschiedliche Betrachtungsweise des Phänomens der EMMPRIN-Hochregulierung im akuten Myokardinfarkt liefert einen anderen Erklärungsansatz. Von diversen Autoren wurde

beschrieben, dass das akute Ereignis des Myokardinfarktes mit einer systemischen Inflammation mit erhöhten Entzündungsparametern einhergeht (z.B. Elabbassi et al. 2006, S. 1799-1803; Wasserman et al. 2006, S. 431-439). Bekanntermaßen gehen systemische Entzündungsreaktionen mit vielfältigen und sehr komplexen biochemischen Veränderungen einher (z.B. Ceciliani et al. 2002, S. 211-223). Aus diesem Grund ließe sich durchaus auch die Hypothese aufstellen, dass eine Hochregulierung von EMMPRIN in erster Linie als Reaktion auf diese inflammatorischen Veränderungen zu betrachten sein könnte, die sich im Rahmen des Infarktgeschehens vollziehen, und weniger als deren Auslöser. Zur Klärung dieser Frage werden derzeit von unserer Arbeitsgruppe weiter führende Forschungsarbeiten durchgeführt.

6 Zusammenfassung

Matrix-Metalloproteinasen spielen im Rahmen der Umbauvorgänge, die sich bei der Atherogenese, der Plaqueprogression und schließlich der Plaqueruptur mit dem klinischen Korrelat des akuten Infarktes vollziehen, eine wesentliche Rolle. Sie sind daher seit längerer Zeit Gegenstand der kardiovaskulären Forschung. Das Protein EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*), das die Eigenschaft besitzt, MMPs induzieren zu können, war zunächst auf Tumorzellen beschrieben worden. Erst seit wenigen Jahren wird die Bedeutung von EMMPRIN in der kardiovaskulären Forschung untersucht.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten *in vitro* wichtige Beiträge zum Verständnis der Regulation von EMMPRIN leisten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Verhalten der Oberflächenexpression von EMMPRIN und der eng assoziierten MT1-MMP *in vivo* bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt zu charakterisieren. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob es zu einer Erhöhung der MMP-9 im Plasma kam. Als Vergleichsgruppe diente ein Kollektiv von Patienten mit stabiler Angina pectoris. Darüber hinaus sollte der Verlauf dieser Parameter nach sechs Monaten untersucht werden.

Als Methoden wurden die Durchflusszytometrie und die SDS-PAGE-Zymografie angewandt.

Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Oberflächenexpression sowohl von EMMPRIN als auch von MT1-MMP auf den Monozyten der Infarktpatienten. Auch die MMP-9 war im Plasma signifikant erhöht.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass EMMPRIN in seiner MMP-induzierenden Funktion eine Rolle bei der Infarktgenese spielen könnte. EMMPRIN wird dadurch zum einen als diagnostisches Target für die Detektion instabiler, rupturgefährdeter Plaques interessant, zum anderen jedoch auch als möglicher neuer therapeutischer Angriffspunkt zur Vermeidung kardiovaskulärer Komplikationen.

Weiter gehende Forschungsarbeiten sind diesbezüglich jedoch nötig.

7 Literaturverzeichnis

Abe, N., Osanai, T., Fujiwara, T., Kameda, K., Matsunaga, T., Okumura, K.
C-reactive protein-induced upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer in macrophages: inhibitory effect of fluvastatin.
Life Sci. 78 (2006) 1021-1028

Bhakdi, S., Torzewski, M., Klouche, M., Hemmes, M.
Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19 (1999) 2348-2354

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.
Cancer Res. 55 (1995) 434-439

Brew, K., Dinakarbandian, D., Nagase, H.
Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.
Biochim. Biophys. Acta 1477 (2000) 267-283

Brown, D.L., Hibbs, M.S., Kearney, M., Loushin, C., Isner, J.M.
Identification of 92-kD Gelatinase in Human Coronary Atherosclerotic Lesions.
Association of Active Enzyme Synthesis With Unstable Angina.
Circulation 91 (1995) 2125-2131

Caudroy, S., Polette, M., Nawrocki-Raby, B., Cao, J., Toole, B.P., Zucker, S., Birembaut, P.
EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells.
Clin. Exp. Metastasis 19 (2002) 697-702

Caudroy, S., Polette, M., Tournier, J.M., Burlet, H., Toole, B., Zucker, S., Birembaut, P.
Expression of the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and the matrix metalloproteinase-2 in bronchopulmonary and breast lesions.
J. Histochem. Cytochem. 47 (1999) 1575-1580

Ceciliani, F., Giordano, A. Spangolo, V.

The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins.

Protein Pept. Lett. 3 (2002) 211-223

Chen, F., Eriksson, P., Hansson, G.K., Herzfeld, I., Klein, M., Hansson, L.O., Valen, G.

Expression of matrix metalloproteinase 9 and its regulators in the unstable coronary atherosclerotic plaque.

Int. J. Mol. Med. 15 (2005) 57-65

Corcoran, M.L., Stetler-Stevenson, W.G., DeWitt, D.L., Wahl, L.M.

Effect of cholera toxin and pertussis toxin on prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinase production by human monocytes.

Arch. Biochem. Biophys. 310 (1994) 481-488

Creemers, E.E., Cleutjens, J.P., Smits, J.F., Daemen, M.J.

Matrix Metalloproteinase Inhibition After Myocardial Infarction: A New Approach to Prevent Heart Failure?

Circ. Res. 89 (2001) 201-210

Davidson, B., Goldberg, I., Berner, A., Kristensen, G.B., Reich, R.

EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serous ovarian carcinoma.

Clin. Exp. Metastasis 20 (2003) 161-169

Dollery, C.M., McEwan, J.R., Henney, A.M.

Matrix Metalloproteinases and Cardiovascular Disease.

Circ. Res. 77 (1995) 863-868

Elabbassi, E., Al-Nooryani, A.

Acute coronary syndrome. An Acute Inflammatory Syndrome.

Saudi Med. J. 27 (2006) 1799-1803

Ellis, S.M., Nabeshima, K., Biswas, C.

Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor.

Cancer Res. 49 (1989) 3385-3391

- Gabison, E.E., Hoang-Xuan, T., Mauviel, A., Menashi, S.
EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair.
Biochimie 87 (2005) 361-368
- Galis, Z.
Molecular mechanisms of plaque weakening and disruption.
In: „Cardiovascular Plaque Rupture“, Brown, D. (Ed.), Marcel Dekker, Inc, New York, 2002,
79-121
- Galis, Z.S., Khatri, J.J.
Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis: The Good, the Bad,
and the Ugly.
Circ. Res. 90 (2002) 251-262
- Galis, Z.S., Muszynski, M., Sukhova, G.K., Simon-Morrissey, E., Unemori, E.N., Lark,
M.W., Amento, E., Libby, P.
Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzy-
mes required for extracellular matrix digestion.
Circ. Res. 75 (1994) 181-189
- Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Kranzhöfer, R., Clark, S., Libby, P.
Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading
proteinases.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 402-406
- Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M.W., Libby, P.
Increased Expression of Matrix Metalloproteinases and Matrix Degrading Activity in Vulner-
able Regions of Human Atherosclerotic Plaques.
J. Clin. Invest. 94 (1994) 2493-2503
- 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 (1997) 24-27
- Haug, C., Lenz, C., Diaz, F., Bachem, M.G.
Oxidized low-density lipoproteins stimulate extracellular matrix metalloproteinase Inducer
(EMMPRIN) release by coronary smooth muscle cells.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24 (2004) 1823-1829

- Hayakawa, T., Yamashita, K., Ohuchi, E., Shinagawa, A.
Cell growth promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2).
J. Cell Sci. 107 (1994) 2373-2379
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E., Iwata, K.
Growth promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)
for a wide range of cells: a possible new growth factor in serum.
FEBS Lett. 298 (1992) 29-32
- Hoffmeister, H.M.
Atherothrombosis and Inflammation.
Z. Kardiol. 90 (2001) 379-384
- Jones, C.B., Sane, D.C., Herrington, D.M.
Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome.
Cardiovasc. Res. 59 (2003) 812-823
- Kai, H., Ikeda, H., Yasukawa, H., Kai, M., Seki, Y., Kuwahara, F., Ueno, T., Sugi, K., Imai-
zumi, T.
Peripheral Blood Levels of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 Are Elevated in Patients With
Acute Coronary Syndromes.
J. Am. Coll. Cardiol. 32 (1998) 368-72
- Kataoka, H., DeCastro, R., Zucker, S., Biswas, C.
Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial colla-
genase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase.
Cancer Res. 53 (1993) 3154-3158
- Li, R., Huang, L., Guo, H., Toole, B.P.
Basigin (Murine EMMPRIN) Stimulates Matrix Metalloproteinase Production by Fibroblasts.
J. Cell. Physiol. 186 (2001) 371-379
- Liang, L., Major, T., Bocan, T.
Characterization of the promoter of human extracellular matrix metalloproteinase inducer
(EMMPRIN).
Gene 282 (2002) 75-86
- Libby, P., Geng, Y.J., Sukhova, G.K., Simon, D.I., Lee, R.T.
Molecular determinants of atherosclerotic plaque vulnerability.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 811 (1997) 134-142

Libby, P.

The interface of atherosclerosis and thrombosis: basic mechanisms.

Vasc. Med. 3 III (1998) 225-229

Lijnen, H.R.

Non-Haemostatic Role for Blood Coagulation Proteases and Their Receptors.

Biochem. Soc. Trans. 30 (2002) 163-167

Lijnen, H.R.

Metalloproteinases in Development and Progression of Vascular Disease.

Pathophysiol. Haemost. Thromb. 33 (2003/04) 275-281

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 (1998) 88-92

Lusis, A.J.

Atherosclerosis.

Nature 407 (2000) 233-41

Maass, M., Bartels, C., Kruger, S., Krause, E., Engel, P.M., Dahlhoff, K.

Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease.

Atherosclerosis 140 (1998) 25-30

Major, T.C., Liang, L., Lu, X., Rosebury, W., Bocan, T.M.A.

Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) Is Induced Upon Monocyte Differentiation and Is Expressed in Human Atheroma.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22 (2002) 1200-1207

Matías-Román, S., Gálvez, B.G., Genís, L., Yáñez-Mó, M., de la Rosa, G., Sánchez-Mateos, P., Sánchez-Madrid, F., Arroyo, A.G.

Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium.

Blood 105 (2005) 3956-3964

May, A.E., Schmidt, R., Bülbül, B.Ö., Hölderle, M., Walther, F., Schömig, A., Gawaz, M., Klouche, M.

Plasminogen and matrix metalloproteinase activation by enzymatically modified low density lipoproteins in monocytes and smooth muscle cells.

Thromb. Haemost. 93 (2005) 710-715

Muhlestein, J.B., Hammond, E.H., Carlquist, J.F., Radicke, E., Thomson, M.J., Karagounis, L.A., Woods, M.L., Anderson, J.L.

Increased incidence of *Chlamydia* species within the coronary artery of patients with symptomatic atherosclerotic versus other form of cardiovascular disease.

J. Am. Coll. Cardiol. 27 (1996) 1555-1561

Muraoka, K., Nabeshima, K., Murayama, T., Biswas, C. Koono, M.

Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: its usefulness as a tumor marker for bladder cancers.

Int. J. Cancer 55 (1993) 19-26

Nabeshima, K., Lane, W.S., Biswas, C.

Partial sequencing and characterization of the tumor cell-derived collagenase stimulatory factor.

Arch. Biochem. Biophys. 285 (1991) 90-96

Nagase, H.

Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.

Biol. Chem. 378 (1997) 151-160

Nagase, H., Woessner, J.F.

Matrix Metalloproteinases.

J. Biol. Chem. 274 (1999) 21491-21494

Neumann, F.J., Ott, I., Gawaz, M., Richardt, G., Holzapfel, H., Jochum, M., Schömig, A.

Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction.

Circulation 92 (1995) 748-755

Pei, D., Weiss, S.J.

Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen.

Nature 375 (1995) 244-247

Rajavashisth, T.B., Xu, X.P., Jovinge, S., Meisel, S., Xu, X.O., Chai, N.N., Fishbein, M.C., Kaul, S., Cercek, B., Sharifi, B., Shah, P.K.
Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Expression in Human Atherosclerotic Plaques: Evidence for Activation by Proinflammatory Mediators.
Circulation 99 (1999) 3103-3109

Ross, R.
Atherosclerosis - An Inflammatory Disease.
N. Engl. J. Med. 340 (1999) 115-126

Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K., Seiki, M.
Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2.
FEBS Lett. 393 (1996) 101-104

Schmidt, R., Bültmann, A., Ungerer, M., Joghetaei, N., Bülbül, Ö., Thieme, S., Chavakis, T., Toole, B.P., Gawaz, M., Schömig, A., May, A.E.
Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Regulates Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiovascular Cells: Implications in Acute Myocardial Infarction.
Circulation 113 (2006) 834-841

Schmidt, R., Redecke, V., Breitfeld, Y., Wantia, N., Miethke, T., Massberg, S., Fischel, S., Neumann, F.J., Schömig, A., May, A.E.
EMMPRIN (CD 147) is a central activator of extracellular matrix degradation by *Chlamydia pneumoniae*-infected monocytes. Implications for plaque rupture.
Thromb. Haemost. 95 (2006) 151-158

Seulberger, H., Unger, C.M., Risau, W.
HT7, Neurothelin, Basigin, gp42 and OX-47--many names for one developmentally regulated immuno-globulin-like surface glycoprotein on blood-brain barrier endothelium, epithelial tissue barriers and neurons.
Neurosci Lett. 140 (1992) 93-97

Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A., Goldberg, G.I.
Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease.
J. Biol. Chem. 270 (1995) 5331-5338

Sukhova, G.K., Schönbeck, U., Rabkin, E., Schoen, F.J., Poole, A.R., Billingham, R.C., Libby, P.

Evidence for Increased Collagenolysis by Interstitial Collagenases-1 and -3 in Vulnerable Human Atheromatous Plaques.

Circulation 99 (1999) 2503-2509.

Sun, J., Hemler, M.E.

Regulation of MMP-1 and MMP-2 Production through CD147/Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Interactions.

Cancer Res. 61 (2001) 2276-2281

Tang, W., Chang, S.B., Hemler, M.E.

Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1.

Mol. Biol. Cell. 15 (2004) 4043-4050

Tang, W., Hemler, M.E.

Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering.

J. Biol. Chem. 279 (2004) 11112-11118

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 (2002) 5765-5772

Thorgeirsson, U.P., Yoshiji, H., Sinha, C.C., Gomez, D.E.

Breast cancer, tumor neovasculature and the effect of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) on angiogenesis.

In Vivo 10 (1996) 137-144

Toole, B.P.

Emmprin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function.

Curr. Top. Dev. Biol. 54 (2003) 371-389

Torzewski, M., Suriyaphol, P., Paprotka, K., Spath, L., Ochsenhirt, V., Schmitt, A., Han, S.R., Husmann, M., Gerl, V.B., Bhakdi, S., Lackner, K.J.

Enzymatic modification of low-density lipoprotein in the arterial wall: a new role for plasmin and matrix metalloproteinases in atherogenesis.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24 (2004) 2130-2136

van den Oord, J.J., Paemen, L., Opdenakker, G., de Wolf-Peeters, C.
Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN
in benign and malignant pigment cell lesions of the skin.
Am. J. Pathol. 151 (1997) 665-670

Wasserman, E.J., Shipley, N.M.
Atherothrombosis in acute coronary syndromes: mechanisms, markers, and mediators of vul-
nerability.
Mt. Sinai. J. Med. 73 (2006) 431-439

Westermarck, J., Kähäri, V.-M.
Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion.
FASEB J. 13 (1999) 781-792

Yan, L., Zucker, S., Toole, B.P.
Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression.
Thromb. Haemost. 93 (2005) 199-204

Yoshida, S., Shibata, M., Yamamoto, S., Hagihara, M., Asai, N., Takahashi, M., Mizutani, S.,
Muramatsu, T., Kadomatsu, K.
Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-ter-
minal immunoglobulin domain.
Eur. J. Biochem. 267 (2000) 4372-4380

Zaman, A.G., Helft, G., Worthley, S.G., Badimon, J.J.
The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease.
Atherosclerosis 149 (2000) 251-266

Danksagung

Beim Direktor der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen, Herrn Prof. Dr. Albert Schömmig, möchte ich mich für die Ermöglichung der Forschung am Deutschen Herzzentrum München bedanken, aus der die vorliegende Arbeit hervorgeht.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Roland Schmidt für die sorgfältige Betreuung meiner Arbeit und die wertvollen Anregungen sowie für das gute Verhältnis bedanken, das sich hieraus entwickelte.

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Andreas May für die Bereitstellung des Themas meiner Arbeit, die gewissenhafte Einführung in die Thematik, die Betreuung meiner Versuche und seine überaus freundliche Art im Umgang mit seinen Mitarbeitern.

Ohne eine sorgfältige Einführung in die Arbeitstechniken, die ich im Rahmen meiner Arbeit zu erlernen hatte, wäre diese nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank gilt daher Frau Monika Hölderle, die mich mit ihrem immer herzlichen Wesen in didaktisch hervorragender Weise an die Techniken heranführte.

Wichtige Anregungen erhielt ich während meiner Forschung von meinem Kollegen Herrn Dr. Yoshi Breitfeld. Dafür möchte ich mich hier bedanken.

Mein Dank gilt darüber hinaus den wissenschaftlichen Mitarbeitern am Deutschen Herzzentrum München, die bei Fragen immer zur Verfügung standen. Insbesondere sei hierbei den 20 Mitarbeitern gedankt, die sich als freiwillige Probanden zur Verfügung stellten.

Vielen Dank, Sabine, für die Geduld mit mir und die beständige Motivierung während des Schreibens der Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen Geschwistern bedanken, die während der gesamten Zeit der Arbeit immer ein Ohr für mich hatten und jedes Stadium der Entstehung mit großem Interesse begleiteten.

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

*Der Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)
Regulation im akuten Myokardinfarkt*

in der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen der Technischen Universität München am Deutschen Herzzentrum München unter der Anleitung und Betreuung durch

Herrn PD Dr. med. Roland Schmidt

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den 04.10.2007

Sven F. Thieme