

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

Prof. Dr. Dr. Thomas Renné

Funktionen des Blutgerinnungsfaktor XII bei experimenteller Sepsis *in vivo*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Lucie Esterl
aus München

Hamburg 2014

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 03.06.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Thomas Renné

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. B. Fleischer

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. A. Larena-Avellaneda

INHALTSVERZEICHNIS

SEITE

1	EINLEITUNG	5
1.1	Das Kontaktphasensystem	5
1.2	Genetisch veränderte Mäuse mit Defekten im Kontaktphasensystem und nachgeschalteten Signalwegen	8
1.3	Rolle des Kontaktphasensystems bei septischen Entzündungen	10
1.4	Lipopolysaccharid-induzierte Endotoxinämie, ein Modell für bakterielle Sepsis	12
1.5	Ziele dieser Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	MATERIAL	16
2.1.1	Chemikalien	16
2.1.2	Kits, Protein Marker, DNA Größenstandard	17
2.1.3	Antikörper	17
2.1.4	Versuchstiere	17
2.2	METHODEN	18
2.2.1	DNA-Isolierung aus Mausschwänzen	18
2.2.2	Photometrische Bestimmung der DNA	18
2.2.3	PCR - <i>Polymerase-Chain-Reaction</i>	18
2.2.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	24
2.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
2.2.6	<i>Western Blot</i> und Immunodetektion	26
2.2.7	Blutprobengewinnung und -analyse	27
2.2.8	Erythrozytenisolation	27
2.2.9	Lipopolysaccharid-induzierter septischer Schock	28
2.2.10	Histopathologische Analyse	28
3	ERGEBNISSE	30
3.1	GENERIERUNG UND PHÄNOTYPISIERUNG VON FXII ^{-/-} , FXI ^{-/-} , FXII ^{-/-} /FXI ^{-/-} , FXII ^{-/-} /C3 ^{-/-} UND FXII ^{-/-} /B2R ^{-/-} -MÄUSEN	30
3.1.1	Generierung von Mäusen mit doppelter Gendefizienz in Proteinen des Kontaktphasensystems und nachgeschalteten Signalwegen	30
3.1.2	Hämatologische und hämostaseologische Charakterisierung von FXII ^{-/-} ,	

	FXI ^{-/-} , FXII ^{-/-} /FXI ^{-/-} , FXII ^{-/-} /C3 ^{-/-} - und FXII ^{-/-} /B2R ^{-/-} -Mäusen.....	32
3.2	LPS-INDUZIERTES SEPSIS-MODELL BEI MÄUSEN MIT DEFEKTEM KONTAKTPHASENSYSTEM.....	33
3.2.1	Dosisfindung im LPS-Sepsis-Modell.....	33
3.2.2	Analyse von FXII ^{-/-} , FXI ^{-/-} , FXII ^{-/-} /FXI ^{-/-} , FXII ^{-/-} /B2R ^{-/-} , FXII ^{-/-} /C3 ^{-/-} -Mäusen und WT bei LPS-induzierter Endotoxinämie.....	34
3.2.3	Hämatologische und hämostaseologische Analyse im septischen Geschehen.....	36
3.2.4	Histopathologische Analyse von FXII-, FXI-, FXII/B2R-, FXII/C3- defizienten Mäusen.....	37
4	DISKUSSION.....	40
4.1	Inhibition des Kontaktphasensystems: Gendeletion, Antikörper und Inhibitoren im Vergleich.....	40
4.2	Tiermodelle als prädiktive Systeme für humane Erkrankungen.....	42
4.3	Kontaktphasenaktivierung in Sepsis - ein Schutzmechanismus?.....	43
4.4	Koagulopathie in Sepsis - unabhängig vom Kontaktphasensystem.....	45
4.5	Antikoagulante Therapie in Sepsis: Aktiviertes Protein C und Thrombomodulin.....	47
5	AUSBLICK.....	50
6	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY.....	51
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	53
8	LITERATUR.....	57
9	DANKSAGUNG.....	72
10	LEBENS LAUF (ENTFÄLLT AUS DATENSCHUTZRECHTLICHEN GRÜNDEN).....	73
11	EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG.....	75

1 EINLEITUNG

1.1 Das Kontaktphasensystem

Das Kontaktphasensystem ist eine Proteasenkaskade, die aus drei Plasmaproteinen besteht: den Zymogenen Faktor XII (FXII, Hageman-Faktor), Plasmaprokalikrein (PPK) und dem nicht-enzymatischen Kofaktor hochmolekulares Kininogen (HK). Sowohl PPK wie auch das FXII-Substrat Faktor XI (FXI) bilden nonkovalente Komplexe mit HK, die im Plasma zirkulieren und an Oberflächen wie Zellmembranen binden (Renne et al., 2012). Die Enzymkaskade wird durch eine Autoaktivierung von FXII nach Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen z.B. Kaolin, Glas, Dextransulfat, Polyphosphate, missgefaltete Proteine, Glykosaminoglykane oder Nukleinsäuren gestartet (Muller and Renne, 2008). Aktivierter FXII (FXIIa) kann vier Signalwege initiieren: (1) den intrinsischen Weg der Blutgerinnungskaskade (Davie and Ratnoff, 1964; Gailani and Renne, 2007), das fibrinolytische-, (3) das Komplement- und (4) das Kallikrein Kinin-System (KKS) (Renne et al., 2012) (Abbildung 1.). FXIIa aktiviert das intrinsische Blutgerinnungssystem, das KKS und das Komplementsystem *in vivo*, ob die Protease auch die Fibrinolyse aktivieren kann, ist nicht abschließend geklärt. Daher werden wir uns in dieser Arbeit auf die etablierten FXIIa getriebenen Kaskaden fokussieren.

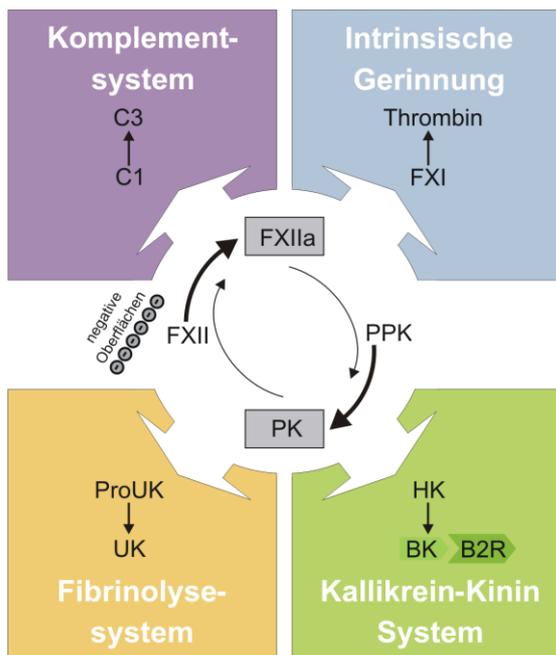


Abb. 1. Das Kontaktphasensystem.

FXII wird durch Kontakt mit negativen Oberflächen aktiviert. Aktivierter FXII (FXIIa) konvertiert dann seinerseits Plasmaprokalikrein (PPK) zu aktivem Plasmakallikrein (PK). PK aktiviert wiederum neues Zymogen FXII, wodurch ein positiver Feedback-Mechanismus entsteht.

PK spaltet HK und setzt das proinflammatorische Hormon Bradykinin (BK) frei, BK aktiviert Kinin B2-Rezeptoren (B2R). PK aktiviert das fibrinolytische System, indem es Pro-Urokinase (ProUK) zum Plasminogen Aktivator Urokinase (UK) umwandelt. FXIIa initiiert die intrinsische Gerinnungskaskade durch eine Konversion von Gerinnungsfaktor XI (FXI) zu aktiviertem FXI (FXIa). Zudem kann FXIIa das Komplementsystem starten, indem es die Komplementfaktoren C1r und C1s aktiviert. Eine kaskadenartige Initiierung mehrerer Komplementfaktoren, darunter u.a. C3, folgt.

Humaner Faktor XII ist eine Serinprotease bestehend aus einer Polypeptidkette (MW 80-90 kDa) aus 596 Aminosäuren (Fujikawa and McMullen, 1983; McMullen and Fujikawa, 1985). Das Protein zirkuliert als Zymogen in einer Konzentration von ≈ 30 $\mu\text{g/ml}$ (375 nM) in humanem Plasma und wird hauptsächlich von Hepatozyten produziert (Cool et al., 1985; Griffin and Cochrane, 1976; Revak and Cochrane, 1976). FXII wird durch limitierte Proteolyse aktiviert. Die Aktivierung von FXII erfolgt in zwei Schritten: (1.) Bindung von FXII Zymogen an negativ geladene Oberflächen und nachfolgende Konformationsänderung (Cochrane et al., 1973) und (2.) eine proteolytische Spaltung der Peptidbindung zwischen Arg³⁵³-Val³⁵⁴, wodurch α -FXIIa entsteht. Die Protease α -FXIIa besteht aus einer schweren (MW 50 kDa) und einer leichten Kette (MW 28 kDa), die durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys³⁴⁰ und Cys³⁴⁶ verbunden sind. Die schwere Kette enthält die Oberflächenbindungsregionen, die den Kontakt zu Polyanionen vermitteln (Citarella et al., 1998; Clarke et al., 1989; Pixley et al., 1987). Die leichte Kette enthält das katalytisch aktive Zentrum, bestehend aus der Serinproteasen-Triade Asp⁴⁴², His³⁹³, und Ser⁵⁵⁴ (McRae et al., 1981). Die Aktivierung von FXII zu α -FXIIa nach Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen wird als Autoaktivierung bezeichnet (Dunn et al., 1982). Die vollständige Trennung der beiden Ketten erfolgt durch aktives Plasmakallikrein (PK) mittels proteolytischer Spaltung der Peptidbindungen Arg³³⁴-Asn³³⁵, Arg³⁴³-Leu³⁴⁴ und Arg³⁵³-Val³⁵⁴. Die dabei entstandenen, enzymatisch aktiven Fragmente werden als β -FXIIa (MW 32 kDa) und β -FXIIb (*fragments*) bezeichnet (Dunn et al., 1982).

Im Kontaktphasensystem konvertiert autoaktivierter FXIIa PPK zu aktivem PK. PK aktiviert wiederum neues Zymogen FXII und amplifiziert dadurch das initiale Signal. PK startet das KKS und führt zur Bildung des vasoaktiven Nonapeptids Bradykinin (BK) aus hochmolekularem Kininogen (HK) (Nishikawa et al., 1992). Die durch PK amplifizierte FXII-Aktivierung verstärkt durch einen positiven *Feedback*-Mechanismus die Freisetzung von BK (Cochrane and Revak, 1980).

BK ist ein proinflammatorisches Peptidhormon, welches parakrin G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Im Mensch sind zwei heptahelikale Kininrezeptoren beschrieben, Kinin B1 Rezeptor 1 (B1R) und Kinin B2 Rezeptor 2 (B2R) (Leeb-Lundberg et al., 2005). Während B2R ubiquitär und konstitutiv exprimiert wird, ist B1R im gesunden Gewebe nur in geringen Mengen vorhanden. Eine Hochregulierung der B1R Expression wird durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 oder Endotoxin induziert. Dies lässt vermuten, dass B2R akute Entzündungsreaktionen vermittelt, während B1R eher in chronisch entzündlichen Prozessen involviert ist.

Neben der Initiierung des KKS, wird auch die intrinsische Gerinnungskaskade über FXIIa gestartet. Dabei aktiviert FXIIa den Gerinnungsfaktor FXI, welcher wiederum über die Aktivierung einer wasserfallartigen Enzymkaskade zur Bildung von Thrombin und Fibrin führt (Davie and Ratnoff, 1964; Ratnoff and Saito, 1979). Klinisch wird die Integrität der intrinsischen Gerinnung mittels der aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit), einem diagnostischen Blutgerinnungstest, analysiert. Während eine Defizienz der Blutgerinnungsfaktoren VIII (Hämophilie A) und IX (Hämophilie B) bzw. der extrinsischen Faktoren TF (Gewebsthrombokinase) und Faktor VII mit einem erhöhtem Blutungsrisiko einhergehen, ist ein Fehlen der Kontaktphasenproteinen FXII, PK und HK nicht mit einer gesteigerten Blutungsneigung verbunden (Kleinschnitz et al., 2006; Ratnoff and Margolius, 1955; Renne et al., 2006).

FXIIa besitzt möglicherweise auch einen antikoagulativen Effekt, da PK und FXIIa im Plasma Plasminogen spalten können und PK zudem auch Pro-Urokinase in fibrinolytisch wirksame Urokinase umwandeln kann (Loza et al., 1994). Die Bedeutung dieses Weges *in vivo* ist umstritten (Muller et al., 2009).

Weiterhin kann durch das Kontaktphasensystem das Komplementsystem initiiert werden. Das Komplementsystem ist Teil des unspezifischen humoralen Immunsystems. Es trägt zu Elimination zellulärer Antigene (z.B. Bakterien) bei und unterstützt damit die proinflammatorischen Eigenschaften des BK. Die Aktivierung des Komplementsystems kann prinzipiell über drei unterschiedliche Signalwege erfolgen: den klassischen, den Lektin- und den alternativen Signalweg (Markiewski et al., 2008). FXIIa initiiert durch eine Spaltung von C1r und C1s des Komplementfaktors C1 den klassischen Weg des Komplementsystems (Ghebrehiwet et al., 1983). Alle drei Kaskaden münden in der Bildung der C3-Konvertase, die den Komplementfaktor C3 in chemotaktisches C3a und das opsonisierende C3b spaltet. Eine C3-Aktivierung kann alternativ auch direkt über Lipopolysaccharid initiiert werden. Nachfolgend spaltet C5-Konvertase C5 in das vasoaktive Anaphylatoxin C5a und C5b und fördert damit die Formation des terminalen *membrane attack complex* (MAC), bestehend aus C5b, C6, C7, C8 und C9, der die Zellwand des Erregers schädigt (Flierl et al., 2008). PK vermag die Proteasen C3 und C5 im Plasma *ex vivo* direkt zu aktivieren (Schmaier, 2008).

Der wichtigste Regulator der Kontaktphasenproteine FXII, PK und FXI im Plasma ist der C1-Esterase Inhibitor (C1Inh) (Davis et al., 2008). C1Inh wird zur Gruppe der Serpine gezählt und inhibiert Serinproteasen irreversibel. Bei Sepsis wird C1Inh vermutlich durch die Elastase neutrophiler Granulozyten proteolytisch inaktiviert (Leid et al., 1993; Nuijens et al., 1989). Eine hereditäre C1Inh-Defizienz oder eine

Dysfunktion des Inhibitors resultieren in einer exzessiven Aktivierung des Kallikrein Kinin-Systems und einer pathologischen Bradykinin-vermittelten Ödembildung (Nussberger et al., 2002). Diese Erbkrankheiten werden als Hereditäres Angioödem Typ I und II bezeichnet (HAE I und II). Es ist jedoch bekannt, dass ein weiterer Subtyp des HAE existiert, HAE Typ III, dem weder eine C1Inh-Defizienz, noch eine Dysfunktion zu Grunde liegen (Bork et al., 2000). Klinisch zeigen die Patienten die gleichen Symptome wie HAE I und II Patienten. Eine genetische Analyse betroffener Familien identifizierte einen krankheitsassoziierten Haplotyp (Variante einer Nukleotidsequenz auf einem Chromosom) im FXII-Gen. Eine Punktmutation an der Position 1032 (C>A) im Exon 9 des FXII-Gens führt beim Protein zu einem Thr328Lys Austausch. Diese Mutation führt im Blutplasma der Patienten zu einer erhöhten Enzymaktivität des FXII (Cichon et al., 2006).

1.2 Genetisch veränderte Mäuse mit Defekten im Kontaktphasensystem und nachgeschalteten Signalwegen

Die Rolle des Kontaktphasensystems und seinen nachgeschalteten Signalwegen für Hämostase und Inflammation ist Gegenstand intensiver Grundlagenforschung. Dabei machte man sich häufig zu Nutze, dass Mäuse dem menschlichen Organismus in vielen Aspekten sehr ähnlich sind und entwickelte genetisch modifizierte Mausmodelle, in denen Gene von Kontaktphasenproteinen gezielt ausgeschaltet wurden. Pauer *et al.* klonierten erstmalig FXII-defiziente Mäuse, um die Funktion des Blutgerinnungsfaktors *in vivo* zu analysieren (Pauer et al., 2004). Bei Analyse der hämostatischen Parameter zeigte sich erwartungsgemäß eine verlängerte aPTT, wie sie bereits bei FXII-defizienten Menschen beschrieben wurde. Trotz pathologischer aPTT haben genveränderte Tiere wie auch FXII-defiziente Menschen keinerlei abnorme Blutungstendenzen. Lange Zeit dachte man daher, dass FXII für die Blutgerinnung *in vivo* bedeutungslos ist. Daten aus Thrombose-Modelle riefen jedoch in den letzten Jahren einen Paradigmenwechsel im Bereich der Hämostase hervor und schrieben FXII eine entscheidende Rolle in pathologischer Thrombusformation zu: In Mausmodellen mit experimenteller mechanischer und chemischer Thrombose erwies sich eine FXII-Defizienz als protektiv. In Abwesenheit von FXII können sich keine stabilen dreidimensionalen Thromben ausbilden (Renne et al., 2006; Renne et al., 2005). Die Bedeutung von FXII für Thrombosen zeigt sich auch im zerebralen

Ischämie-(Schlaganfall) Modell (Kleinschnitz et al., 2006). FXII-defiziente Mäuse waren vor ischämischen Insulten geschützt, ohne dass sich dabei die Inzidenz der Infarkt-assoziierten Hämorrhagien erhöhte. Antithrombotische Effekte konnten auch bei FXI-defizienten Tieren nachgewiesen werden. Entsprechend einem Mangel oder Fehlen an FXII, wiesen die FXI^{-/-}-Tiere eine verlängerte aPTT auf (Gailani et al., 1997). In Mausmodellen für arterielle Thrombose (FeCl₃- bzw. Laser-induzierter Endothelschaden der *Arteria Carotis*) konnte eine signifikant verlängerte Okklusionszeit in FXI-defizienten Tieren nachgewiesen werden (Cheng et al., 2010; Rosen et al., 2002; Wang et al., 2005). Im Vergleich zeigte sich allerdings, dass FXII-defiziente Mäuse eine etwas längere Okklusionszeit aufwiesen als FXI^{-/-}-Mäuse (Cheng et al., 2010). Weiterhin zeigten Tucker *et al.* in einem Mausmodell für peritoneale Sepsis mittels Perforation des Zäkums (CLP, *cecal ligation and puncture*), dass eine FXI-Defizienz mit einer erheblich reduzierten Mortalität in diesem Sepsis Modell verbunden ist (Tucker et al., 2008).

Des Weiteren wurde mittels gendefizienten Mäusen der prothrombotische Effekt von Kininogen und Kinin-Rezeptoren untersucht. Merkulov *et al.* zeigten die grundlegende Bedeutung von HK für die Thrombusformation im Mausmodell (Merkulov et al., 2008). Mäuse haben zwei homologe Kininogen-Gene (mKng1 und mKng2), wo hingegen der Mensch nur über ein Kininogen-Gen verfügt. Die Kininogen-Gene werden bei Mäusen Gewebe-spezifisch exprimiert, so wird mKng1 primär in der Leber synthetisiert, während mKng2 vorwiegend in der Niere exprimiert wird. Merkulov *et al.* generierten mKng1-defiziente Mäuse, die weder hochmolekulares noch die Splicevariante niedermolekulares Kininogen (Gregory et al.) produzierten. Trotz normaler Blutungszeiten, wiesen die mKng1^{-/-}-Tiere nach induziertem Karotis-Endothelschaden (Bengal Rose/ Laser) eine signifikant verlängerte Okklusionszeit und eine Protektion vor arterieller Thrombose auf (Merkulov et al., 2008). FXII-defiziente Mäuse zeigten in einem Bengal-Rose-Modell keinen Schutz vor einer zerebralen Ischämie und auch WT Tiere entwickelten in selbigem Modell trotz Depletion der Thrombozyten und Heparin-gabe zerebrale Thrombosen (Kleinschnitz et al., 2008b). Ob eine HK-Defizienz einen ähnlichen Schutz vor arterieller Thrombose im FeCl₃-Modell bietet, wie bei FXII- und FXI-defizienten Mäusen zu beobachten war, bleibt offen (Muller and Renne, 2008). Borkowski *et al.* beschrieben die erste B2R-defiziente Maus (Borkowski et al., 1995). Da BK neben proinflammatorischen (Stickstoffmonoxid (NO)- und Prostazyklin-Freisetzung) auch profibrinolytische Eigenschaften aufweist (Gewebspezifischer Plasminogenaktivator-(tPA) Freisetzung), wäre in B2R-defizienten Mäusen ein erhöhtes prothrombotisches Risiko zu erwarten.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass entgegen aller Erwartung eine B2R-Defizienz bei Mäusen nur auf dem genetischen B6;129S7-Hintergrund mit einem Schutz vor arterieller Thrombose und nicht mit einem prothrombotischen Risiko assoziiert war (Schmaier and McCrae, 2007; Shariat-Madar et al., 2006). Im Gegensatz dazu waren B2R-defiziente Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund nicht vor Thrombose geschützt. Ob eine B2R-Defizienz wirklich vor Thrombosen schützt bleibt somit unklar. Im tMCAO-(transiente Okklusion der *Arteria cerebri media*) Schlaganfallmodell war die Infarktgröße bei B2R-defizienten Tieren im Vergleich zum WT nicht reduziert und auch postischämische Entzündungsprozesse blieben unbeeinträchtigt (Austin et al., 2009; Kleinschnitz et al., 2008a). Das Kontaktphasensystem kann auch das Komplementsystem aktivieren, welches eine bedeutende Rolle in der humoralen Immunabwehr einnimmt. Um die Rolle des Komplementsystems in Endotoxinämie zu analysieren, generierten Wessels *et al.* C3-gendefiziente Mäuse (Wessels et al., 1995) und analysierten diese Tiere in einem B-Streptokokken-induzierten Endotoxinämie-Modell. Es zeigte sich, dass eine C3-Defizienz mit einer erhöhten Suszeptibilität für B-Streptokokken-induzierte Infektionen assoziiert ist. Unterstützend konnte in einem weiteren Sepsis-Mausmodell mit intraperitonealer LPS-Applikation von *Salmonella typhimurium* demonstriert werden, dass die Konzentration des C1-Inh in C3^{-/-}- und C4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum WT reduziert und ein C1-Inh Abfall mit einer gesteigerten Mortalität verbunden war (Fischer et al., 1997). Durch eine C1-Inh Substitution konnte die Letalität der C3^{-/-}- und C4^{-/-}-Mäuse in diesem Modell wieder reduziert werden.

1.3 Rolle des Kontaktphasensystems bei septischen Entzündungen

In humanem Plasma (*ex vivo*) aktiviert Endotoxin gramnegativer *Escherichia coli* (*E.coli*) Bakterien FXII und PK und stimuliert die BK Produktion (Pettinger and Young, 1970). BK ist ein wichtiger proinflammatorischer Mediator, der zu NO-vermitteltem Blutdruckabfall, erhöhter vaskulärer Permeabilität, Ödembildung, Schmerz und Fieber führt (Oehmcke and Herwald, 2010). Klinische Studien, in denen Patienten mit Sepsis und/oder septischem Schock analysiert wurden, zeigen, dass auch *in vivo* eine Kontaktphasenaktivierung stattfindet, meist einhergehend mit einer BK-Freisetzung und einem gesteigerten Verbrauch an Gerinnungsfaktoren (Herwald et al., 1998; Hoffmann et al., 2004). Um die grundlegenden Mechanismen der Kontaktphasenaktivierung in entzündlichen Erkrankungen zu analysieren,

wurden Tiermodelle entwickelt, in denen eine Sepsis entweder durch peritoneale Injektion, bzw. intravenöse Infusion bakterieller Endotoxine oder durch Perforation und Ligatur des Zäkums (CLP) provoziert wurde (Corral et al., 2005; Rittirsch et al., 2007). So konnte in einem Primatenmodell nachgewiesen werden, dass die Aktivierung des Kontaktphasensystems bei Sepsis zu einem irreversiblen Blutdruckabfall führt (Pixley et al., 1993). Im Primatenmodell zeigte sich auch, dass eine FXII-Inhibition bei experimenteller Sepsis die Aktivierung von Komplement- und Fibrinolyse-System reduziert, sowie mit einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren assoziiert ist (Jansen et al., 1996). Im Gegensatz dazu konnten Iwaki und Castellino in einem LPS-induzierten Endotoxinämie-Modell bei Mäusen demonstrieren, dass eine FXII-Defizienz zwar zu einem frühen BK-vermitteltem Blutdruckabfall führt, nicht aber die Entzündungsreaktion oder die Mortalität der Tiere beeinflusst (Iwaki et al., 2008). Im Mausmodell mit zäkaler Ligatur und Punktur waren FXI-defiziente Mäuse im Vergleich zu WT Tieren vor einer erhöhten Letalität geschützt, 24 Stunden nach Eingriff zeigten die FXI^{-/-}-Tiere eine geringere Fibrinogendeposition und eine reduzierte intraperitoneale Leukozyteninfiltration (Tucker et al., 2008). Die hier aufgeführten Mausmodelle belegen, dass das Kontaktphasensystem zu proinflammatorischen Prozessen in Sepsis beiträgt. Auch in anderen Spezies wurde die Sepsis-assoziierte Hyperkoagulabilität und der therapeutische Effekt von C1-Inh, dem Hauptregulator des Kontaktphasensystems im *E.coli*-induzierten Sepsis-Modell untersucht (Scherer et al., 1996). Die Gabe von C1-Inh im Sepsis-Modell bei Hasen zeigte protektive Effekte, was sich in einer reduzierten Fibrinablagerung in der Mikrozirkulation äußerte.

Unterstützend konnten Fischer *et al.* aufzeigen, dass in C3- und C4-defizienten Mäusen in LPS-induzierter Sepsis die Plasmaspiegel von C1s-C1-Inh-Komplexen erhöht sind und ein gesteigerter Verbrauch an C1-Inh vorliegt. Der C1-Inh Verbrauch förderte eine exzessive Kontaktphasenaktivierung mit pathologisch hohen BK Werten (Fischer et al., 1997). In einem Mausmodell mit *Streptococcus pyogenes* induzierter Sepsis konnte veranschaulicht werden, dass die Bakterienzahl in Milzen mit FXII/PK-Inhibitor behandelte Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht war (Frick et al., 2006). Diese Daten belegen, dass das Kontaktphasensystem zur Abwehr invasiver Bakterien *in vivo* beitragen und somit auch eine protektive Rolle in Sepsis einnehmen kann.

Sepsis-Modelle wurden jedoch nicht nur bei Versuchstieren, sondern auch bei Menschen durchgeführt (DeLa Cadena et al., 1993; Minnema et al., 1998; Pixley et al., 1995). Während DeLa Cadena und Pixley *et al.* eine Kontaktphasenaktivierung

im septischen Menschen fanden, demonstrierten Minnema *et al.*, dass im Rahmen einer LPS-induzierten Endotoxinämie FXI-Plasmaspiegel reduziert sind, wohingegen FXII normwertig ist. Dies deutet an, dass eine FXI-Aktivierung unabhängig von FXII und ohne Kontaktphasenaktivierung stattfindet. Eine sensitive Messung der Kontaktphasenaktivierung ist *in vivo* schwierig, sodass eine potenzielle Aktivierung des Kontaktphasensystems nicht auszuschließen ist (Minnema *et al.*, 1998). Eine weitere Studie mit Sepsis-Patienten konnte in der Frühphase der Erkrankung eine Kontaktphasenaktivierung mittels Messung von 47 kD HK (47 kD leichte Kette von hochmolekularem Kininogen) nachweisen (Asmis *et al.*, 2008). 47 kD HK-Plasmaspiegel korrelierten mit dem Schweregrad der Sepsis.

Es existieren jedoch auch Kontaktphasensystem-unabhängige Wege, die zur BK-Produktion führen: Eine Metalloprotease des Bakteriums *Serratia marcescens* besitzt PK-ähnliche Eigenschaften und kann BK proteolytisch bilden (Matsumoto *et al.*, 1984). In den letzten Jahren wurden multiple Proteinase bakterieller Spezies entdeckt, die die Fähigkeit besitzen das Kontaktphasensystem unmittelbar zu aktivieren. So beispielsweise eine alkalische Proteinase und Elastase von *Pseudomonas aeruginosa* oder eine Proteinase von *Vibrio vulnificans* (Molla *et al.*, 1989). Außerdem konnte die negativ-geladene Polysaccharid-Kette von LPS als HK-Bindungsstelle identifiziert werden und eine nachfolgende Freisetzung von BK via PK nachgewiesen werden (Perkins *et al.*, 2008).

1.4 Lipopolysaccharid-induzierte Endotoxinämie, ein Modell für bakterielle Sepsis

Lipopolysaccharide (LPS), Hauptbestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (Raetz and Whitfield, 2002), stellen den wichtigsten Initiator septischer Erkrankungen dar. Dementsprechend wurden LPS in dieser Arbeit eingesetzt, um eine bakterielle Infektion *in vivo* zu simulieren. LPS sind Endotoxine, die erst durch Zerfall der Bakterien freigesetzt werden und als Antigene im menschlichen Organismus wirken. Es handelt sich hierbei um extrem hitzestabile amphiphile Moleküle (Alexander and Rietschel, 2001), die aus drei kovalent gebundenen Komponenten bestehen: (1.) Lipid A, ein N-Acetylglucosaminphosphat mit Fettsäureresten, welches den inneren Bereich des LPS bildet und diesen in der äußeren Bakterienmembran verankert. Die Struktur von Lipid A kann je nach Bakterienart variieren. (2.) Die Kernregion, welche aus 2-Keto-3-desoxy-octonat

(KDO) sowie Heptose, Glucose, Galaktose und N-Acetylglucosamin besteht. Die Kernregion kann ebenfalls variabel sein. (3.) Das O-Polysaccharid (O-Antigen), welches den äußeren Bereich des LPS bildet und sich oftmals aus mehreren verzweigten Ketten von Hexosen, wie Rhamnose, Glucose, Galaktose und Mannose zusammensetzt (Raetz and Whitfield, 2002; Sperandeo et al., 2009). Auch diese Teilstruktur ist je nach Bakterienart und -stamm verschieden (Alexander and Rietschel, 2001) und kann zur Unterscheidung der Bakterien genutzt werden, unter anderem zur Differenzierung pathogener und nicht pathogener Arten (Abb. 2.).

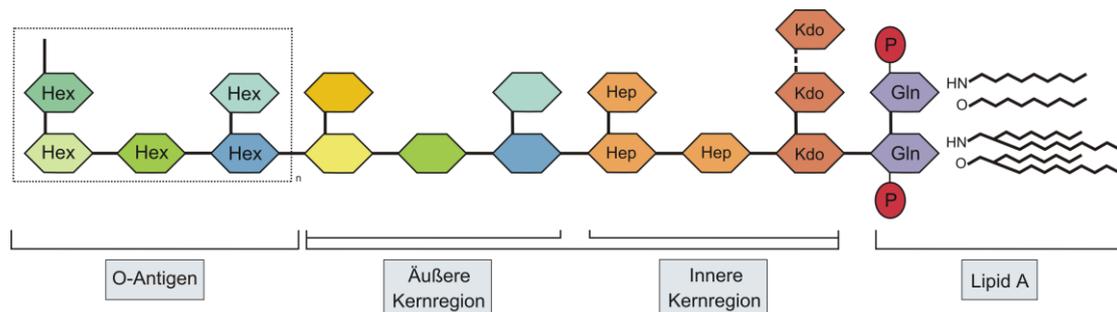


Abb. 2. Lipopolysaccharid-Struktur. LPS besteht aus drei kovalent miteinander verbundenen Teilen: Lipid A, der Kernregion und dem O-Antigen. Lipid A bildet den inneren Bereich des LPS und ist in der äußeren Bakterienmembran verankert, es besteht aus N-Acetylglucosaminphosphat (Gln) und Fettsäureestern. Der Aufbau des Lipid A ist variabel. Die Kernregion ist an Lipid A gebunden und besteht aus einer inneren und äußeren Kernregion, sie ist ebenfalls variabel. Die Struktur der Kernregion setzt sich aus 2-Keto-3-desoxy-octonat (KDO) sowie Heptose (Hep), Glucose, Galaktose und N-Acetylglucosamin zusammen. Das O-Antigen, ein Polysaccharid, bildet den dritten, äußeren Bereich des LPS. Die Kette des O-Antigens besteht aus einer oder mehreren Hexosen (Hex), wie z.Bsp. Rhamnose, Galaktose, Glucose und Mannose. Die Saccharide sind in vier- oder fünfteilige Sequenzen verbunden und oft verzweigt. Durch eine repetitive Anordnung dieser Sequenzen (n) entsteht das lange Polysaccharid ($n \approx 40$). Der Aufbau kann variieren und zur Differenzierung der Bakterienart genutzt werden. Abbildung modifiziert nach Alexander und Rietschel, 2001 (Alexander and Rietschel, 2001).

Die Zellwand Gram-negativer Bakterien wird durch zwei lipidhaltige Doppelschichten gebildet: die äußere und innere bzw. zytoplasmatische Membran. Getrennt werden die beiden Membranen durch den periplasmatischen Raum, der ein dreidimensionales Netzwerk aus Peptidoglykanen und Murein enthält. Die zytoplasmatische Membran besteht aus Phospholipiden und Lipoproteinen. Die nach außen gerichtete Schicht der äußeren Membran hingegen ist asymmetrisch und wird zu über 75 % von LPS bedeckt (Alexander and Rietschel, 2001). Die spezielle

Beschaffenheit der Bakterienmembran stellt somit eine physikalische Barriere dar und schützt das Bakterium vor antibakteriellen Substanzen (Rosenfeld et al., 2006; Rosenfeld and Shai, 2006).

LPS kann ein breites Spektrum an proinflammatorischen Effekten in eukaryotischen Zellen induzieren. Die primären Zielzellen des Endotoxins sind Phagozyten des angeborenen Immunsystems, wie periphere und gewebsständige Makrophagen und neutrophile Granulozyten (Alexander and Rietschel, 2001). All diese Phagozyten exprimieren konstitutiv die Membran-gebundene Form von CD14-Antigen (mCD14, CD, *Cluster of differentiation*), sowie *Toll-like-receptor 4* (TLR4). Der TLR4-initiierte Signalweg führt zur Biosynthese diverser Entzündungsmediatoren und fördert die Produktion kostimulierender Moleküle, die für eine adaptive Immunantwort in septischen Prozessen nötig sind.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Eine erhöhte Gerinnungsaktivität in Sepsis ist gut charakterisiert, dennoch ist die Funktion des Blutgerinnungsfaktors XII für Sepsis *in vivo* bisher nicht gänzlich geklärt.

FXII ist ein Zymogen des Kontaktphasensystems, welches durch eine Autoaktivierung von FXII durch Kontakt mit negativ-geladenen Oberflächen gestartet wird (Muller and Renne, 2008). FXIIa kann das intrinsische Gerinnungssystem, das Kallikrein Kinin- und das Komplementsystem aktivieren und somit zu Inflammation, Thrombose und Sepsis beitragen (Griffin and Cochrane, 1976).

Ziel dieser Arbeit war es, den Beitrag des Gerinnungsfaktors FXII für experimentelle Sepsis *in vivo* anhand von LPS-Sepsis-Modellen in Mäusen zu beleuchten.

Die Ziele dieser Arbeit lassen sich in folgende Unterpunkte aufteilen:

- I Generierung und Analyse von Mäusen mit kombinierter Defizienz in FXII-nachgeschalteten Signalwegen (FXII⁻/FXI⁻-, FXII⁻/C3⁻- und FXII⁻/B2R⁻-Mäuse).
- II Vergleich von Mäusen mit defektem Kontaktphasensystem bei LPS-induzierter Sepsis.
- III Analyse der Signalwege, die bei Kontaktphasenaktivierung in LPS-induzierter Sepsis aktiviert werden.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 CHEMIKALIEN

Substanz	Hersteller
TAE-Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>DNA-loading</i> (bromophenol blue und xylene cyanol FF)	MBI Fermentas, St-Leon-Roth
Ethidiumbromid	Sigma, München
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Lipopolysaccharide (<i>Escherichia coli</i> , 0111:B4) L3024, <i>purified by ion-exchange chromatography</i>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel [®] 30	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe

Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.2 KITS, PROTEIN MARKER, DNA GRÖßENSTANDART

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Fermentas (St.Leon-Roth)

GeneRuler™ DNA Ladder Mix Fermentas (St.Leon-Roth)

Taq DNA Polymerase Kit Qiagen, Hilden

2.1.3 ANTIKÖRPER

Die Antikörper wurden von folgenden Quellen zur Verfügung gestellt und in entsprechenden Konzentrationen im *Western Blot* (Towbin et al.) eingesetzt:

Antikörper	Quelle	Konzentration	Hersteller
α -FXII (human)	pAb (Kaninchen)	1 /500	Dr. Kaplan A., Charleston, SC, USA

Meerrettich-Peroxidasekonjugierte (POD) Zweitantikörper wurden von Dianova und in Verdünnungen von 1 /500, bzw.1 /5000 verwendet.

2.1.4 VERSUCHSTIERE

FXII^{+/-}-Mäuse (Pauer et al., 2004), FXI^{+/-}-Mäuse (Gailani et al., 1997), C3^{+/-}-Mäuse (Wessels et al., 1995), und B2R^{+/-}-Mäuse (Borkowski et al., 1995), rückgekreuzt über > 10 Generationen auf C57Bl/6 Hintergrund waren im Labor vorhanden. Die WT-Mäuse (C57Bl/6) stammen von Charles River (Sulzfeld).

2.2 METHODEN

2.2.1 DNA-ISOLIERUNG AUS MAUSSCHWÄNZEN

Die Isolierung von DNA erfolgte aus Mausschwanzspitzen mit Hilfe des *DNeasy Tissue Kit* von QIAGEN, Hilden. Zunächst wurden die Biopsate in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben, diese nach den Angaben des Herstellers in Buffer ATL und Proteinase K aufgenommen und über Nacht bei 56 °C verdaut. Die weitere Isolierung wurde nach Herstellerprotokoll („*Purification of total DNA from Rodent Tails*“) durchgeführt. Die DNA wurde am Ende mit H₂O eluiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.2 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER DNA

Die Konzentration von DNA wurde mit Hilfe eines Photometers durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt.

2.2.3 PCR - *POLYMERASE CHAIN REACTION*

Um die Größe der gewonnenen DNA-Konstrukte zu detektieren, werden diese zuerst mittels PCR amplifiziert und im Anschluss daran in einer Trenngel-Matrix der Proteingröße nach aufgetrennt.

Für alle PCR-Ansätze wurde ein Volumen von insgesamt 25 µl (Reaktionsansatz und DNA) verwandt.

1) Genotypisierungs-PCR für FXII^{-/-}-Mäuse

Reaktionsansatz:

2,5 µl	10x Puffer
8,5 µl	destilliertes H ₂ O
1,0 µl	10 µM FXII-wt-for
1,0 µl	10 µM FXII-wt-rev
1,0 µl	10 µM FXII-Neo-rev
5,0 µl	5x Q-Solution
0,5 µl	10 mM dNTP
0,5 µl	Taq Polymerase
20 µl Mastermix und 5 µl DNA pro PCR-Ansatz	

Für die FXII-PCR verwenden wir zwei FXII-spezifische Primer und einen apTKNeo Vektor-spezifischen Primer.

Bezeichnung	Sequenz	Beschreibung
FXII wt-for	5'-GGC CTC TTG TAT TGA CTG ATG A-3'	(Pauer et al., 2004)
FXII wt-rev	5'-AAC TGC CAT CAT AAC GTT AGC C-3'	
pTKNeo-rev	5'-GCA GAG GTT ACG GCA GTT TGT CTC TCC-3'	

Alle Primer wurden von TIB MOLBIOL (Berlin) oder OPERON (Ebersberg) bezogen. Die übrigen PCR-Substanzen sind im *Taq DNA Polymerase Kit* von Qiagen enthalten.

FXII Amplifikations-Programm:

	Dauer	Temperatur	
initiale Denaturierung	3 min	95 °C	
Denaturierung	30 sec	94 °C	} x 35
<i>Annealing</i>	30 sec	54 °C	
Elongation	1 min	72 °C	
finaler Syntheseschritt	7 min	72 °C	

Die Anzahl der Amplifikationszyklen betrug 35. Nach erfolgter PCR wurden 10 µl des Reaktionsansatzes zur gelelektrophoretischen Analyse entnommen.

2) Genotypisierungs-PCR für FXI^{-/-}-Mäuse

Reaktionsansatz:

2,5 µl	10x Puffer
8,5 µl	destilliertes H ₂ O
1,0 µl	10 µM FXI-wt-for
1,0 µl	10 µM FXI-wt-rev
1,0 µl	10 µM FXI-ko-rev
5,0 µl	5x Q-Solution
0,5 µl	10 mM dNTP
0,5 µl	Tag Polymerase
20 µl Mastermix und 5 µl DNA pro PCR-Ansatz	

Für die FXI-PCR verwenden wir zwei ebenfalls FXI-spezifische Primer und einen spezifischen Primer für die Neo-Kassette (Knockout-Allel).

Bezeichnung	Sequenz	Beschreibung
FXI wt-for	5'-TTG CAG CAA AGA TGA GTA CGT GAA C-3'	(Chan et al., 2001)
FXI wt-rev	5'-ATG GTC GAC ACT GGG AAA ATA CCC-3'	
FXI-ko-rev	5'-ATT CGC AGC GCA TCG CCT TCT ATC-3'	

Alle Primer wurden von TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen. Die übrigen PCR-Substanzen sind im *Taq DNA Polymerase Kit* von Qiagen enthalten.

FXI Amplifikations-Programm:

	Dauer	Temperatur	
Denaturierung	3 min	94 °C	
<i>Annealing</i>	40 sek	59 °C	
Elongation	1 min	72 °C	
Denaturierung	30 sek	94 °C	} x 33
<i>Annealing</i>	30 sek	59 °C	
Elongation und finaler Syntheseschritt	1 min	72 °C	

Die Anzahl der Amplifikationszyklen betrug 33. Nach erfolgter PCR wurden 10 µl des Reaktionsansatzes zur gelelektrophoretischen Analyse entnommen.

3) Genotypisierungs-PCR für C3^{-/-}-Mäuse

Reaktionsansatz:

2,5 µl	10x Puffer
7,5 µl	destilliertes H ₂ O
1,0 µl	10 µM oIMR0013
1,0 µl	10 µM oIMR0014
1,0 µl	10 µM oIMR1325
1,0 µl	10 µM oIMR1326
5,0 µl	5x Q-Solution
0,5 µl	10 mM dNTP
0,5 µl	Taq Polymerase

20 µl Mastermix und 5 µl DNA pro PCR-Ansatz

Für die C3-PCR setzten wir zwei C3-spezifische Primer und zwei spezifische Primer für das Knockout-Allel (Neo) ein.

Bezeichnung	Sequenz	Beschreibung
oIMR0013 (Neo)	5'-CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3'	<i>The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA</i> http://www.jax.org/index.html <i>>genotyping protocols database</i>
oIMR0014 (Neo)	5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC-3'	
oIMR1325	5'-ATC TTG AGT GCA CCA AGC C-3'	
oIMR1326	5'-GGT TGC AGC AGT CTA TGA AGG-3'	

Alle Primer wurden von TIB MOLBIOL (Berlin) oder OPERON (Ebersberg) bezogen. Die übrigen PCR-Substanzen sind im *Taq DNA Polymerase Kit* von Qiagen enthalten.

C3 Amplifikations-Programm:

	Dauer	Temperatur	
initiale Denaturierung	3 min	94 °C	
Denaturierung	20 sek	94 °C	} x 12
<i>Annealing</i>	30 sek	64 °C (-0,5°C per Zyklus)	
Elongation	35 sek	72 °C	
Denaturierung	20 sek	94 °C	} x 25
<i>Annealing</i>	30 sek	58 °C	
Elongation	35 sek	72 °C	
Finaler Syntheseschritt	2 min	72 °C	

Die Anzahl der Amplifikationszyklen betrug 37. Nach erfolgter PCR wurden 10 µl des Reaktionsansatzes zur gelelektrophoretischen Analyse entnommen.

4) Genotypisierungs-PCR für B2R^{-/-}-Mäuse

Reaktionsansatz:

2,5 µl	10x Puffer
7,5 µl	destilliertes H ₂ O
1,0 µl	10 µM neo_ge_pr1
1,0 µl	10 µM neo_ge_pr2
1,0 µl	10 µM Bdkrb2_pr1
1,0 µl	10 µM Bdkrb2_pr2
5,0 µl	5x Q-Solution
0,5 µl	10 mM dNTP
0,5 µl	Tag Polymerase

20 µl Mastermix und 5 µl DNA pro PCR-Ansatz

Für die B2R-PCR setzten wir zwei B2R-spezifische Primer und zwei spezifische Primer für das Knockout-Allel (Neo) ein.

Bezeichnung	Sequenz	Beschreibung
Bdkrb2_pr1	5'-TGT CCT CAG CGT GTT CTT CC-3'	<i>The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA</i> http://www.jax.org/index.html >genotyping protocols database
Bdkrb2_pr2	5'-GGT CCT GAA CAC CAA CAT GG-3'	
neo_ge_pr1 (Neo)	5'-CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3'	
neo_ge_pr2 (Neo)	5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC-3'	

Alle Primer wurden von TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen. Die übrigen PCR-Substanzen sind im *Taq DNA Polymerase Kit* von Qiagen enthalten.

B2R Amplifikations-Programm:

	Dauer	Temperatur	
initiale Denaturierung	3 min	94 °C	
Denaturierung	35 sek	94 °C	} x 12
<i>Annealing</i>	45 sek	64 °C (-0,5°C per Zyklus)	
Elongation	45 sek	72 °C	
Denaturierung	35 sek	94 °C	} x 25
<i>Annealing</i>	30 sek	58 °C	
Elongation	45 sek	72 °C	
Finaler Syntheseschritt	2 min	72 °C	

Die Anzahl der Amplifikationszyklen betrug 37. Nach erfolgter PCR wurden jeweils 10 µl des Reaktionsansatzes zur Gelelektrophoretischen Analyse entnommen.

2.2.4 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN IN AGAROSEGELN

Die PCR-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese in 1%-Agarosegel aufgetrennt. Für die Herstellung eines solchen Gels wurde Agarose mit 1x TAE (Tris Acetate-EDTA buffer; Sigma) versetzt und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht (ca. 10 min). Nach dem Abkühlen auf ungefähr 50 °C wurden 5 µl 1%-Ethidiumbromidlösung pro 100 ml Gel zugesetzt. Die PCR-Ansätze wurden mit Gel-Puffer (*DNA-loading*) vermischt und auf das Gel aufgetragen, zudem wurden zu Beginn jeder Zeile ca. 6 µl *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* (Fermentas, St.Leon-Rot) aufgetragen. Abhängig von der Größe der Gelkammer erfolgte die Elektrophorese bei 80–150 V. Die Analyse erfolgte nach Beendigung des Laufs unter UV-Licht. Die Ergebnisse wurden photographisch dokumentiert.

2.2.5 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Für den Nachweis von FXIIa wurden 8 %ige SDS-Polyacrylamid Trenngele und 5 %ige Sammelgele verwendet. Pro Geltasche wurden 10 µl Probe (= 0,5 µl Plasma) mit einer Pipette aufgetragen. Um die Größe der Proteine bestimmen zu können, wurde ein Proteinmarker (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Fermentas, St.Leon-Rot) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 35 mA Gleichstrom als limitierende Größe bis die Lauffront aus Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreichte.

Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele:

	Sammelgel	Trenngel
	5 %	8 %
H ₂ O	3.4 ml	4.6 ml
30 % Acrylamid Mix	0.83 ml	2.7 ml
1.0 M Tris pH 6.8	0.63 ml	
1.5 M Tris pH 8.8	-	2.5 ml
10 % SDS (<i>sodium-dodecyl-phosphate</i>)	0.05 ml	0.1 ml
10 % Ammonium persulfat	0.05 ml	0.1 ml
TEMED	0.005 ml	0.012 ml

Stocklösung für 10x Tris-Glycin-Laufpuffer:

Tris	250 mM pH 8.9
Glycin	2,5 M
SDS	10 % (w/v)

2.2.6 WESTERN BLOT UND IMMUNODETEKTION

Blotting-Puffer: 1x Tris-Glycin-Puffer + 20 % (v/v) Methanol

Stocklösung für 10x PBS (pH 7,4):

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	17,0 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Waschpuffer: 1x PBS + 0,05 % (v/v) Tween 20

Blockierungslösung: 4 % Trockenmilchpulver im Waschpuffer

Substratlösung:

250 µM Luminol in DMSO	100 µl
40 µM p-Cumarsäure	100 µl
H ₂ O ₂	10 µl
100 mM Tris pH	8,01 ml
H ₂ O	ad 10 ml

Zur Analyse der Proteine wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran (Sartorius AG) transferiert (Towbin et al., 1979). Der Elektrotransfer erfolgte im *Semi-Dry*-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984). Dazu wurden 6 Lagen Whatman-Filterpapier, die Membran und das Gel in *Blotting*-Puffer inkubiert und anschließend im *Sandwich*-Verfahren auf der Anodenseite der Blottingapparatur platziert. Der *Sandwich* setzte sich wie folgt zusammen: 3 Lagen Whatman-Filterpapier, gefolgt von der Nitrocellulosemembran, dem Gel und weiteren 3 Lagen Whatman-Filterpapier. Anschließend wurde der Blot mit der Kathodenplatte zugedeckt und der Proteintransfer für 90 Minuten bei 1-2 mA pro cm² Blottingmembran von der Kathode in Richtung Anode durchgeführt. Der Erfolg des Transfers wurde nach ausgiebiger Wässerung der Membran durch eine Färbung mit 1 % PonceauS-Rot für ca. 5 min überprüft. Durch Schwenken in H₂O wurde die Membran wieder entfärbt bis deutliche rote Banden erkennbar waren und fotokopiert.

Anschließend wurden die freien Bindungsstellen der Membran über Nacht in Blockierungslösung bei 4 °C blockiert. Die Immunodetektion von FXII erfolgte mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (Tabelle 3.1.3). Diese wurden in

Blockierungslösung verdünnt und die Membran in dieser für 2 h inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch viermaliges Waschen in Waschpuffer (2 x 30 s und 2 x 15 min) entfernt. Danach wurde die Membran eine weitere Stunde mit einem gegen den Fc-Teil des Erstantikörpers gerichteten Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper in Blockierungslösung inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit Hilfe der Substratlösung entwickelt. Dazu wurde die Membran 3 min in der Substratlösung geschwenkt, getrocknet und zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak) in eine Filmkassette eingelegt. Die anschließende Entwicklung erfolgte in einer PROTEC Entwicklungsmaschine.

2.2.7 BLUTPROBENGEWINNUNG UND -ANALYSE

Zur Gewinnung von Citratblut (Citratröhrchen, Sarstedt) und EDTA-Blut (EDTA-Röhrchen, Sarstedt) wurden Mäuse nach Inhalationsnarkose mit Ethylether retroorbital aus dem *Plexus venosus* geblutet. Die Blutbildanalyse des Citrat- und EDTA-Blutes wurde vom Zentrallabor des Institutes für Klinische Biochemie und Pathobiochemie - Zentrallabor Würzburg an einem Sysmex Analysegerät vorgenommen. Mittels des gewonnenen Citratblutes ließen sich die TP (Prothrombinzeit), bzw. der INR (International Normalized Ratio) und die aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit) bestimmen. Aus dem EDTA-Blut wurden die Erythrozyten-, Leukozyten-, und die Thrombozytenzahl bestimmt.

2.2.8 ERYTHROZYTENISOLATION

Die Erythrozytenisolation erfolgte entsprechend dem Isolationsprotokoll aus „*Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocytes aggregation*“ (Lominadze and Dean, 2002). Das aus LPS-behandelten Mäusen gewonnene Citratblut wurde zunächst bei 180 x g für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurden Plättchen reiches Plasma (PRP) und Überstand verworfen. Die Erythrozyten (RBC) wurden 6x, durch Zentrifugation bei 2500 x g für 3 min, in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH = 7.4, 285 mOsm) mit 5 mM Glucose gewaschen. Nach jedem Waschgang wurde der Überstand abgenommen

und verworfen. Nach dem letzten Waschgang wurden die Erythrozyten mit neun Volumen eiskaltem Lysebuffer (5 mM Natrium-Phosphat) versetzt und 15 min lang bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten bei 37000 x g und 0° C für 10 min zentrifugiert. Dann wurden die RBC so lange mit eiskaltem Lysebuffer gewaschen, bis das Hämoglobin nicht mehr sichtbar war. Die für den Western Blot eingesetzten RBC wurden mit 10 µl 4 x SDS und 30 µl PBS versetzt und weiterverarbeitet. Die nicht verwendeten RBC wurden in ca. 0.5 Volumen PBS suspendiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 ° C gelagert.

2.2.9 LIPOPOLYSACCHARID-INDUZIERTER SEPTISCHER SCHOCK

Um eine Sepsis *in vivo* provozieren zu können, wurde den Mäusen Lipopolysaccharide (LPS) intraperitoneal (i.p.) verabreicht (Kane et al., 2006; Rittirsch et al., 2007). LPS (vom Serotyp *Escherichia coli* 0111:B4) wurden in NaCl gelöst (15 µg LPS / 10 µl NaCl) und im Kühlschrank bei -20 ° C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Vor LPS-Applikation wurde das Gewicht der einzelnen Tiere bestimmt, um eine gewichtsabhängige Dosis LPS verabreichen zu können. Die Mäuse wurden mit Ether-Inhalationsnarkose anästhesiert und LPS (15 µg/g Körpergewicht in NaCl) wurde i.p. injiziert. Im Anschluss wurde den Tieren Essen und Trinken *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Mäuse wurden über einen definierten Zeitraum von 50 Stunden beobachtet, die Überlebenszahlen wurden stündlich dokumentiert. Nach 50 h wurde der Versuch beendet.

2.2.10 HISTOPATHOLOGISCHE ANALYSE

Nach Beendigung des LPS-Sepsis Versuches wurden die überlebenden Mäuse getötet und Milz, bzw. Leber rasch entnommen und bei 4 °C in 4 % gepuffertem Paraformaldehyd fixiert (pH 7.4). Das Gewebe wurde dehydriert und in Paraffin gebettet, in 8 µm breite Proben geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (Dr. Christoph Renné, Senckenbergischen Institut für Pathologie / Frankfurt).

Zur quantitativen Bestimmung der Erythrophagozytose in den Milzen erfolgte eine mikroskopische Auszählung: (1.) unter 10 -facher Vergrößerung wurde jeweils ein Milzausschnitt von je einem Tier mit dem größten Erythrophagozytose Feld ausgewählt. (2.) innerhalb dieses definierten Milzausschnittes wurden wiederum

unter 20 -facher Vergrößerung die einzelnen Erythrophagozytose Gebiete in je sechs Gesichtsfeldern gezählt.

3 ERGEBNISSE

3.1 GENERIERUNG UND PHÄNOTYPISIERUNG VON FXII^{-/-}, FXI^{-/-}, FXII^{-/-}/FXI^{-/-}, FXII^{-/-}/C3^{-/-} UND FXII^{-/-}/B2R^{-/-}-MÄUSEN

3.1.1 Generierung von Mäusen mit doppelter Gendefizienz in Proteinen des Kontaktphasensystems und nachgeschalteten Signalwegen

Um die *in vivo* Rolle des FXII-getriebenen Kontaktphasensystems bei Sepsis analysieren zu können, haben wir Mäuse auf C57Bl/6 Hintergrund mit kombinierter Defizienz in FXII und Proteinen nachfolgender Signalwege generiert. In unserem Labor sind FXII^{+/-}, FXI^{-/-}, C3^{-/-} und B2R^{-/-} Mäuse vorhanden. Diese Mäuse wurden unter einander verkreuzt, um „doppeltdefiziente“ Mauslinien zu generieren: FXII^{-/-}/FXI^{-/-}, FXII^{-/-}/C3^{-/-} und FXII^{-/-}/B2R^{-/-}-Mäuse. Dafür wurden heterozygote FXII^{+/-}-Mäuse mit FXI-, B2R- oder C3-defizienten Mäusen verpaart. Die heterozygoten Tiere wurden erneut untereinander verpaart um homozygote Nachkommen zu generieren. Die Verpaarung von FXI^{-/-}, B2R^{-/-}, und C3^{-/-} -Tieren mit FXII^{+/-}-Tieren erbrachte zu 100 % lebende Nachkommen. Zudem erfolgte eine Verpaarung von heterozygoten FXII^{+/-}-Mäusen, um FXII^{-/-}-Tiere zu generieren.

Der Genotyp der Nachkommen wurde durch PCR-Analyse ermittelt (Abb. 3).

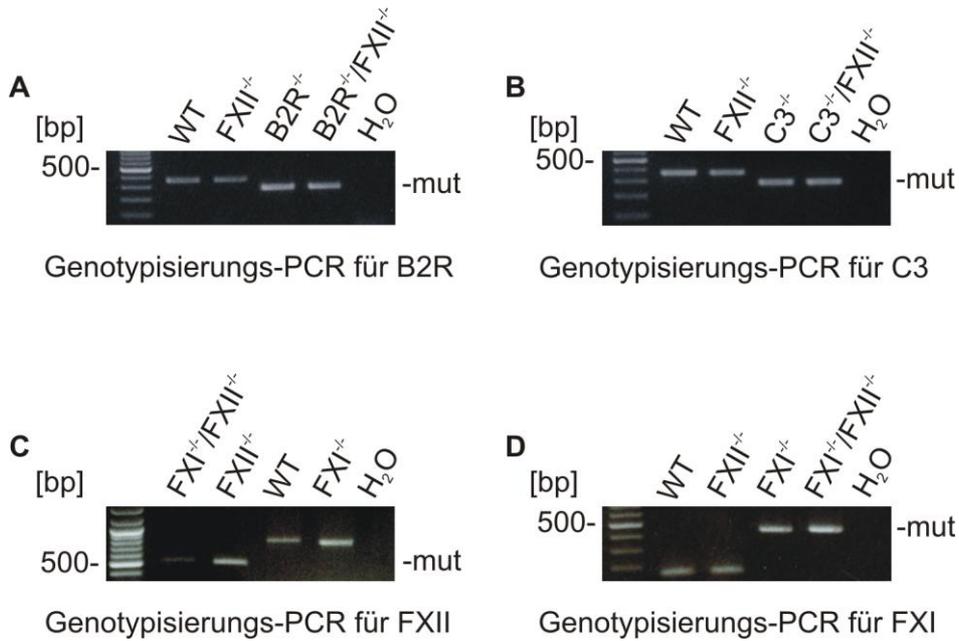


Abb. 3. PCR zur Genotyp-Analyse von FXII^{-/-}, FXI^{-/-}, FXII^{+/+}/FXI^{-/-}, FXII^{+/+}/C3^{-/-} und FXII^{+/+}/B2R^{-/-}-Mäusen.

Die PCR erfolgte mit DNA, die aus Mausschwanzspitzen isoliert wurde. Untersucht wurde auf B2R- (A), C3- (B), FXII- (C) und FXI-Defizienz (D). (A) Die Größe des amplifizierten Wildtyp-Allels (Vincent et al.) beträgt 361 Basenpaare (bp) und das Produkt des mutierten B2R-Allels (Muller et al.) ergibt eine Größe von 280 bp. (B) Das amplifizierte WT-Allel ergibt eine Größe von 350 bp und das mutierte C3-Allel (Muller et al.) ein Produkt von 280 bp. (C) Die Größe des amplifizierten WT-Allels umfasst 842 bp, während das mutierte FXII-Allel (Muller et al.) eine Größe von 492 bp umfasst. (D) Das WT-Allel beträgt eine Größe von 200 bp und die Amplifikation des mutierten FXI-Allels erbringt ein PCR-Produkt von 300 bp.

Weiterhin wurde die FXII-Defizienz auf Proteinebene im Plasma der Mäuse anhand eines *Western-Blot* bestätigt (Abb. 4).

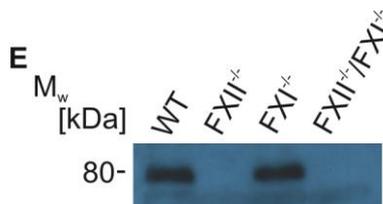


Abb. 4. FXII-Gendefizienz im Western Blot. Aus WT-, FXII^{-/-}, FXI^{-/-} und FXII^{+/+}/FXI^{-/-}-Mäusen wurde plättchenfreies Plasma gewonnen. Die Proben wurden mittels *Western Blotting* unter Verwendung eines gegen FXII-gerichteten Antikörpers analysiert. Der Antikörper detektiert eine 80 kDa Bande in WT und FXI^{-/-}-Mausplasma (Kontrollplasma), nicht aber in FXII^{-/-}- und FXII^{+/+}/FXI^{-/-}-Mäusen.

Alle Mäuse heterozygot für FXII und FXI bzw. B2R und C3 waren phänotypisch unauffällig und fertil. Und auch alle homozygoten Nachkommen waren phänotypisch unauffällig und gesund. Die Tiere überlebten einen Zeitraum von >12 Monaten. Diese Ergebnisse belegen, dass eine doppelte Defizienz in Proteinen des Kontaktphasensystems sowie nachgeschalteter Signalwege weder eine pränatale Selektion, noch eine vermehrte prä- oder postnatale Mortalität zur Folge hat. Die Wurfgrößen lag im Durchschnitt bei 5-6 Nachkommen, die Geschlechterverteilung bei ca. 2 : 1, bzw. 3 : 1 (W : M). Außerdem bleiben sowohl die Wurfgröße als auch die postnatale Entwicklung der FXII^{-/-}, FXI^{-/-}, FXII^{-/-}/FXI^{-/-}, FXII^{-/-}/C3^{-/-} und FXII^{-/-}/B2R^{-/-}-Tiere unbeeinträchtigt.

3.1.2 Hämatologische und hämostaseologische Charakterisierung von FXII^{-/-}, FXI^{-/-}, FXII^{-/-}/FXI^{-/-}, FXII^{-/-}/C3^{-/-} und FXII^{-/-}/B2R^{-/-}-Mäusen

Zur Untersuchung der hämatologischen und hämostaseologischen Blutparameter wurde den Mäusen venöses Blut entnommen. Die Tiere wurden dabei mit Ether-Inhalationsnarkose anästhesiert. In WT-Mäusen waren die Thrombozyten und Erythrozyten ähnlich hoch wie im Blut von Mäusen mit defektem Kontaktphasensystem (Tabelle 1). Jedoch waren die erniedrigten Leukozyten bei FXII^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu WT ($4,63 \pm 1,54 \times 10^3 / \mu\text{l}$), FXI^{-/-} ($6,35 \pm 1,48 \times 10^3 / \mu\text{l}$), FXII^{-/-}/FXI^{-/-} ($3,08 \pm 1,13 \times 10^3 / \mu\text{l}$), FXII^{-/-}/C3^{-/-} ($5,93 \pm 1,72 \times 10^3 / \mu\text{l}$) und FXII^{-/-}/B₂R^{-/-} ($3,9 \pm 0,14 \times 10^3 / \mu\text{l}$) reduziert (nicht signifikant).

In Übereinstimmung mit publizierten Daten konnten wir zeigen, dass Mäuse mit Defizienz in intrinsischen Gerinnungsfaktoren eine signifikant verlängerte aPTT im Vergleich zum WT aufweisen (aPTT: WT $32,9 \pm 9,99$ Sek. vs. FXII^{-/-} $81,5 \pm 17,9$ Sek. vs. FXI^{-/-} $61,9 \pm 9,9$ Sek. vs. FXII^{-/-}/FXI^{-/-} $108,5 \pm 36$ Sek. vs. FXII^{-/-}/C3^{-/-} $55,7 \pm 6,7$ Sek. vs. FXII^{-/-}/B₂R^{-/-} $44,5 \pm 11,2$ Sek.) (Cheng et al., 2010; Renne and Gailani, 2007). Trotz verlängerter aPTT ging die FXII-Defizienz jedoch nicht mit verlängerter Blutungszeit einher.

Tabelle 1. Blutbild von WT-, FXII^{-/-}-, FXI^{-/-}-, FXII^{-/-}/FXI^{-/-}-, FXII^{-/-}/C3^{-/-}-, FXII^{-/-}/B₂R^{-/-}-Mäusen

¹Mittelwert ± Standardabweichung der hämatologischen Parameter für n = 3 WT, 3 FXII^{-/-}, 2 FXI^{-/-}, 4 FXII^{-/-}/FXI^{-/-}, 3 FXII^{-/-}/C3^{-/-}, 2 FXII^{-/-}/B₂R^{-/-}. ²Mittelwert ± Standardabweichung der aPTT für n = 4 WT, 4 FXII^{-/-}, 4 FXI^{-/-}, 3 FXII^{-/-}/FXI^{-/-}, 2 FXII^{-/-}/C3^{-/-}, 2 FXII^{-/-}/B₂R^{-/-}. aPTT, *activated partial thromboplastin time* (aktivierte partielle Thromboplastinzeit).

	WT	FXII ^{-/-}	FXI ^{-/-}	FXII ^{-/-} /FXI ^{-/-}	FXII ^{-/-} /C3 ^{-/-}	FXII ^{-/-} /B ₂ R ^{-/-}
Thrombozyten ¹ [n*10 ³ /μl]	605,3 ±26,5	691,3 ± 191,5	699,5 ±7,8	735,5 ± 105,7	529,3 ± 89	640 ± 175,4
Erythrozyten ¹ [n*10 ⁶ /μl]	9,2 ±0,5	9,8 ± 0,6	9,7 ±0	9,2 ±0,5	9,4 ±0,6	9 ±0,1
Leukozyten ¹ [n*10 ³ /μl]	4,6 ±1,5	1,1 ± 0,9	6,4 ±1,5	3,1 ±1,1	5,9 ±1,7	3,9 ±0,1
aPTT (sec.) ²	32,9 ±10	81,5 ± 17,9	61,9 ±9,9	108,5 ± 36	55,7 ±6,7	44,5 ±11,2

3.2 LPS-INDUZIERTES SEPSIS-MODELL BEI MÄUSEN MIT DEFEKTEM KONTAKTPHASENSYSTEM

3.2.1 Dosisfindung im LPS-Sepsis-Modell

Zur Analyse von Funktion und Beitrag des FXII zur Sepsis *in vivo*, haben wir doppeldefiziente Mäuse (FXII^{-/-}/FXI^{-/-}-, FXII^{-/-}/C3^{-/-}- und FXII^{-/-}/B₂R^{-/-}-Mäuse), sowie FXII^{-/-}-, FXI^{-/-}- und WT als Kontrolltiere in einem LPS-induzierten Sepsis-Modell analysiert (Kane et al., 2006; Xu et al., 2006). Hierzu wurde den Tieren LPS vom Typ *E.coli* (Serotyp 0111:B4, *Sigma Aldrich*) als Bolus intraperitoneal in definierter, gewichtsabhängiger Dosis injiziert. Ziel war es eine Dosis zu finden, bei der 50 % der Tiere versterben (Abb. 5). Den Tieren wurde entweder 0.5 μg/g, 15 μg/g oder 50 μg/g Körpergewicht (KG) LPS intraabdominal appliziert. Es zeigte sich, dass eine ansteigende LPS-Menge zu einer ansteigenden Letalität der Tiere führt. Bei der geringsten LPS-Dosis (0.5 μg/g KG) überlebten 100 % (8/8) der WT-Mäuse einen

Zeitraum von 50 Stunden. Bei der mittleren Dosis (15 $\mu\text{g/g}$ KG) überlebten noch 50 % (5/10) der Tiere und die Injektion von 50 $\mu\text{g/g}$ KG überlebten nur 8 % (1/12) der Mäuse innerhalb von 50 Stunden (Abb. 5).

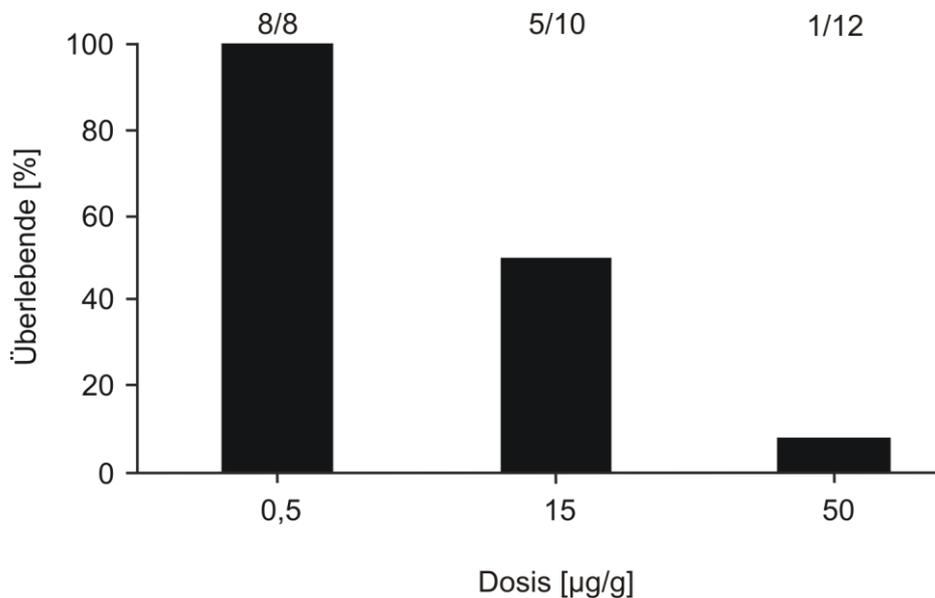


Abb. 5. Dosis-Letalitätsbeziehung von WT-Mäusen nach LPS-Injektion. WT-Mäusen wurde LPS intraperitoneal appliziert (0,5 $\mu\text{g/g}$ KG, 15 $\mu\text{g/g}$ KG und 50 $\mu\text{g/g}$ KG, gelöst in je 200 μl NaCl). LPS-infundierte Mäuse wurden über einen Zeitraum von 50 Stunden observiert, die Überlebensraten wurden stündlich dokumentiert. Für WT mit 0,5 $\mu\text{g/g}$ n = 8, 100 % (8/8) Überlebende; WT mit 15 $\mu\text{g/g}$ n = 10, 50 % (5/10) Überlebende; WT mit 50 $\mu\text{g/g}$ n = 12, 8 % (1/12) Überlebende nach 50 Stunden.

Wir entschieden uns für eine mittlere LPS-Dosis von 15 $\mu\text{g/g}$ KG, um Mäuse mit defektem Kontaktphasensystem im Vergleich zum WT zu analysieren.

3.2.2 Analyse von FXII^{-/-}, FXI^{-/-}, FXII⁻/FXI^{-/-}, FXII⁻/B2R^{-/-}, FXII⁻/C3^{-/-}-Mäusen und WT bei LPS-induzierter Endotoxinämie

Um die Überlebenszeiten unserer gendefizienten Mäuse im Vergleich zum WT bei LPS-Applikation zu analysieren, injizierten wir den C57Bl/6 Mäusen die in Vorversuchen bestimmte LPS-Dosis von 15 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht (*E. coli* 0111:B4, gelöst in 10 μl NaCl) intraperitoneal. Die Mäuse wurden dabei mit Ether-Inhalationsnarkose anästhesiert. Nach Endotoxin-Applikation wurden die Mäuse über

einen Zeitraum von 50 Stunden beobachtet und die Überlebenszeiten stündlich dokumentiert (Abb. 6).

Im Versuch überlebten 47 % (7/15) der WT mehr als 50 Stunden. Im Gegensatz dazu verstarben die FXII^{-/-}-Mäuse im Sepsismodell schneller und in höher Anzahl, nur 14 % (2/14) überlebten. Im Vergleich zu den WT Tieren überlebten auch weniger FXI^{-/-}-Mäuse (30 %; 3/10). Ebenso überlebten nur 30 % (3/10) der FXII^{-/-}/FXI^{-/-}-Mäuse den Zeitraum von 50 Stunden.

Bekannt ist, dass eine C3-Defizienz im Sepsis-Modell mit einer erhöhten Mortalität einhergeht (Wessels et al., 1995). Um nachzuweisen, dass eine Komplementaktivierung bei Sepsis über das Kontaktphasensystem stattfindet, haben wir FXII^{-/-}/C3^{-/-}-doppeltdefiziente Mäuse generiert und in unser Sepsismodell eingeschlossen. Im Vergleich zu den WT Tieren überlebten nur 30 % der FXII/C3-defizienten Mäuse (3/10) den Zeitraum von 50 Stunden. Um den Beitrag einer Kinin Produktion bei Sepsis zu analysieren, verglichen wir die Überlebenszeiten der WT Tiere mit FXII^{-/-}/B2R^{-/-}-Mäusen. Auch die Mortalität der FXII/B2R-gendeletierten Tiere war höher als die der WT, so überlebten nur 33.3 % (2/6) der FXII^{-/-}/B2R^{-/-}-Mäuse. Ein zusätzliches Ausschalten der Komplementaktivierung und des Kallikrein Kinin-Systems hatte somit keine weitere Steigerung der Mortalität zur Folge.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass FXIIa über eine Aktivierung der intrinsischen Gerinnung, des Komplementsystems und auch des Kallikrein Kinin-Systems in LPS-induzierter Sepsis vor Letalität schützt und das ein Ausschalten von FXII und FXII-abhängigen Signalwegen zu einer erhöhten Mortalität in Sepsis führt.

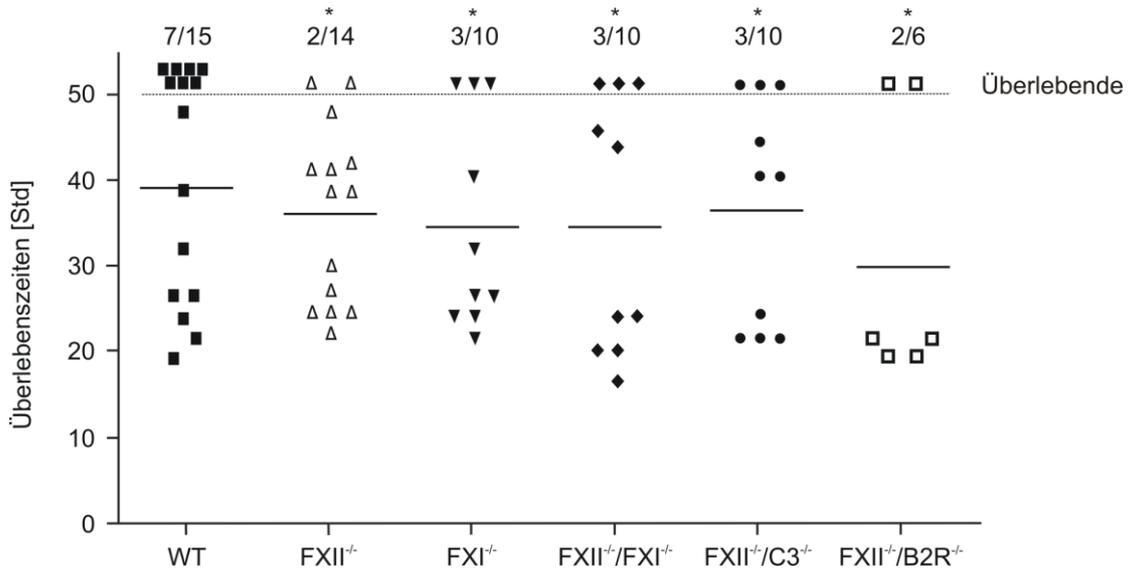


Abb. 6. Überlebenszeiten von WT-, FXII^{-/-}-, FXI^{-/-}-, FXII^{-/-}/FXI^{-/-}-, FXII^{-/-}/C3^{-/-}-, FXII^{-/-}/B2R^{-/-}-Mäusen nach LPS-Injektion

Den Mäusen wurde eine LPS-Dosis von 15 µg/g KG gelöst in 10 µl NaCl (*E.coli* 0111:B4, *Sigma Aldrich*) intraperitoneal appliziert. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 50 Stunden beobachtet, die Überlebenszeiten wurden stündlich dokumentiert. Nach 50 Stunden WT n = 15, 46.7 % (7/15) Überlebende; FXII^{-/-} n = 14, 14.3 % (2/14) Überlebende; FXI^{-/-} n = 10, 30 % (3/10) Überlebende; FXII^{-/-}/FXI^{-/-} n = 10, 30 % (3/10) Überlebende; FXII^{-/-}/C3^{-/-} n = 10, 30 % (3/10) Überlebende; FXII^{-/-}/B2R^{-/-} n = 6, 33.3 % (2/6) Überlebende. Essen und Trinken wurde *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

* = signifikant, *p*-Value <0.05, one-way ANOVA

3.2.3 Hämatologische und hämostatische Veränderungen im septischen Geschehen

Um hämatologische und hämostatische Veränderungen bei Sepsis zu untersuchen, wurde den überlebenden Mäusen 50 Stunden nach LPS-Injektion ebenfalls venöses Blut entnommen und analysiert (Tabelle 2). Hierbei zeigte sich ein Thrombozytenabfall in allen Tieren. Besonders auffällig war hierbei der Thrombozytenabfall in den WT um mehr ca. 90 % ($605,3 \pm 26,5 \times 10^3 / \mu\text{l}$ vs. $61,2 \pm 25,2 \times 10^3 / \mu\text{l}$, signifikant, *p* < 0.05 Student t test) und in den FXII^{-/-}/B₂R^{-/-}-Mäusen um mehr als 95 % ($640 \pm 175,4 \times 10^3 / \mu\text{l}$ vs. $39 \pm 16,5 \times 10^3 / \mu\text{l}$, signifikant, *p* < 0.05 Student t test). In den FXII^{-/-}/B₂R^{-/-}-Mäusen zeigte sich außerdem ein Abfall der Erythrozytenzahl ($9 \pm 0,11 \times 10^6 / \mu\text{l}$ vs. $2,7 \pm 0,5 \times 10^6 / \mu\text{l}$), weniger ausgeprägt war die Abnahme der Erythrozyten im WT ($9,2 \pm 0,5 \times 10^6 / \mu\text{l}$ vs. $8,4 \pm 0,5 \times 10^6 / \mu\text{l}$). In den übrigen gendefizienten Mäusen blieben die Erythrozyten auch nach LPS-Injektion

nahezu unverändert. Die Leukozyten sanken nach LPS-Gabe bei fast allen Mäusen. Eine verlängerte aPTT durch Verbrauch von Gerinnungsfaktoren konnte sowohl im WT (32,9 ±10 vs. 80,5 ±2,6), wie auch in FXI-defizienten (61,9 ±9,9 vs. 76 ±10,4) und FXI/FXII-doppeltdefizienten Tieren (108,5 ±36 vs. >150) verzeichnet werden.

Tabelle 2. Analyse der hämatologischen und hämostaseologischen Parameter in WT-, FXII^{-/-}, FXI^{-/-}, FXII^{-/-}/FXI^{-/-}, FXII^{-/-}/C3^{-/-}, FXII^{-/-}/B₂R^{-/-}-Mäusen nach LPS-Injektion

Den WT-, FXII^{-/-}, FXI^{-/-}, FXII^{-/-}/FXI^{-/-}, FXII^{-/-}/C3^{-/-}, FXII^{-/-}/B₂R^{-/-}-Mäuse wurde LPS (15 µg/g Körpergewicht, E.coli 0011:B4) intraperitoneal verabreicht. Nach zirka 50 Stunden wurde den Tieren retrobulbär Blut entnommen. ¹Mittelwert ± Standardabweichung der hämatologischen Werte für n (Mäuse) = 5 WT, 2 FXII^{-/-}, 2 FXI^{-/-}, 3 FXII^{-/-}/FXI^{-/-}, 3 FXII^{-/-}/C3^{-/-}, 4 FXII^{-/-}/B₂R^{-/-}. ²Mittelwert ± Standardabweichung der Hämostase-Parameter für n = 2 WT, 4 FXI^{-/-}, 3 FXII^{-/-}/FXI^{-/-}, 3 FXII^{-/-}/C3^{-/-}. --- Parameter aufgrund von Materialmangel nicht bestimmbar. aPTT, *activated partial thromboplastin time* (aktivierte partielle Thromboplastinzeit).

	WT	FXII ^{-/-}	FXI ^{-/-}	FXII ^{-/-} /FXI ^{-/-}	FXII ^{-/-} /C3 ^{-/-}	FXII ^{-/-} /B ₂ R ^{-/-}
Thrombozyten [n*10 ³ /µl]	61,2 ±25,2	103 ±4,2	125,5 ±71,4	89,7 ±26,4	169 ±56,2	39 ±16,5
Erythrozyten [n*10 ⁶ /µl]	8,4 ±0,5	9,2 ±0,9	9,3 ±0,3	10,1 ±0,8	10,1 ±1,6	2,7 ±0,5
Leukozyten [n*10 ³ /µl]	1,1 ±0,3	2,7 ±0,7	1,8 ±0,3	2,1 ±0,8	1,3 ±0,3	0,3
aPTT [sec.] ²	80,5 ±2,6	---	76 ±10,4	>150	---	---
Fibrinogen ²	2,3 ±0,1	---	2,3 ±0,3	2,1 ±0,2	1,5 ±0,6	---

3.2.4 Histopathologische Analyse von FXII-, FXI-, FXII/B2R-, FXII/C3-defizienten Mäusen

Um die grundlegenden Mechanismen der Zytopenien zu untersuchen, haben wir die überlebenden Mäusen nach Beendigung des Versuches getötet, Milz und Leber entfernt und histologische Schnitte analysiert. Die Organschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt und analysiert. Dabei zeigte sich in den Milzpräparaten der WT-Mäuse eine vermehrte Anzahl von Erythrophagozytose (Abb.

7). Erythrophagozytose beschreibt den physiologischen Abbau von Erythrozyten im Retikulohistiozytären System (RHS), einem Monozyten-Makrophagensystem, welches in der Milz und anderen lymphatischen Geweben zu finden ist (Rappaport and Crosby, 1957). Um zu ermitteln, ob Erythrophagozytose erhöht oder erniedrigt ist, wurde die Anzahl der Erythrophagozytose positiven Histologien von Milz und Leber bestimmt. In den histologischen Schnitten der WT-Milzen konnte bei 62 % (8/13) Erythrophagozytose detektiert werden, während in nur 14 % (1/7) der Milzen der FXII^{-/-}-Tiere und in 38 % (5/13) der FXI^{-/-}-Milze Erythrophagozytose sichtbar war. Erythrophagozytose wurde weder in der Milz von FXII^{-/-}/C3^{-/-}-Mäusen (0/1), noch in FXII^{-/-}/B2R^{-/-}-Mäusen (0/1) entdeckt.

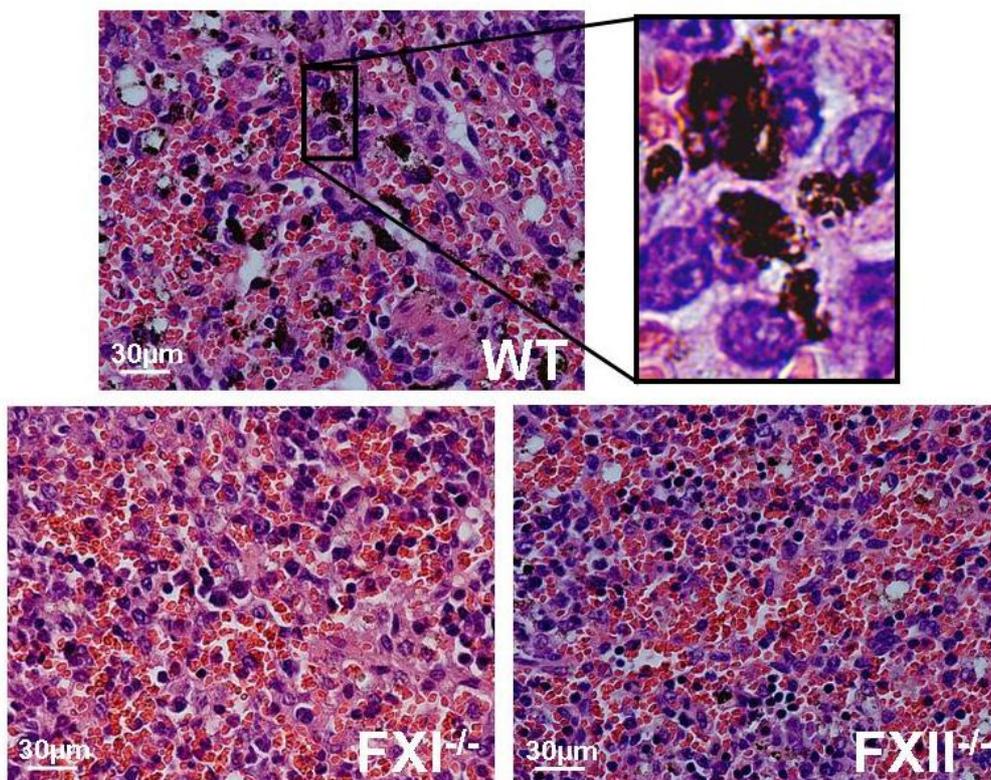


Abbildung 7. Hämatoxylin und Eosin-gefärbte Ausschnitte von Milzpräparaten mit Erythrophagozytose. Bild oben: Repräsentativer Ausschnitt des WT-Milzpräparates mit vermehrter Erythrophagozytose. Vergrößerten Aufnahme (rechts oben) mit großem Erythrophagozytose-Herd (schwarzfarbig). Bild unten links: Ausschnitt eines Milzpräparates einer FXI^{-/-}-Maus. Bild unten rechts: Milz-Ausschnitt einer FXII^{-/-}-Maus.

Die Erythrophagozytose wurde in Milzen mikroskopisch quantifiziert: (1.) unter 10-facher Vergrößerung wurde jeweils ein Milzausschnitt von je einem Tier mit dem

größten Erythrophagozytose Feld ausgewählt. (2.) innerhalb dieses definierten Milzausschnittes wurden wiederum unter 20-facher Vergrößerung die einzelnen Erythrophagozytose Gebiete in je sechs Gesichtsfeldern gezählt. In den Milzpräparaten der WT fanden sich dabei insgesamt über 150 Erythrophagozytose-Herde, während in den Milzschnitten der FXII^{-/-}-Mäuse ca. 30 Herde und in den Milzen der FXI^{-/-}-Mäuse ca. 110 Erythrophagozytose-Herde zu zählen waren (Abb. 8). Die histologischen Schnitte der Leber waren im Vergleich untereinander unauffällig.

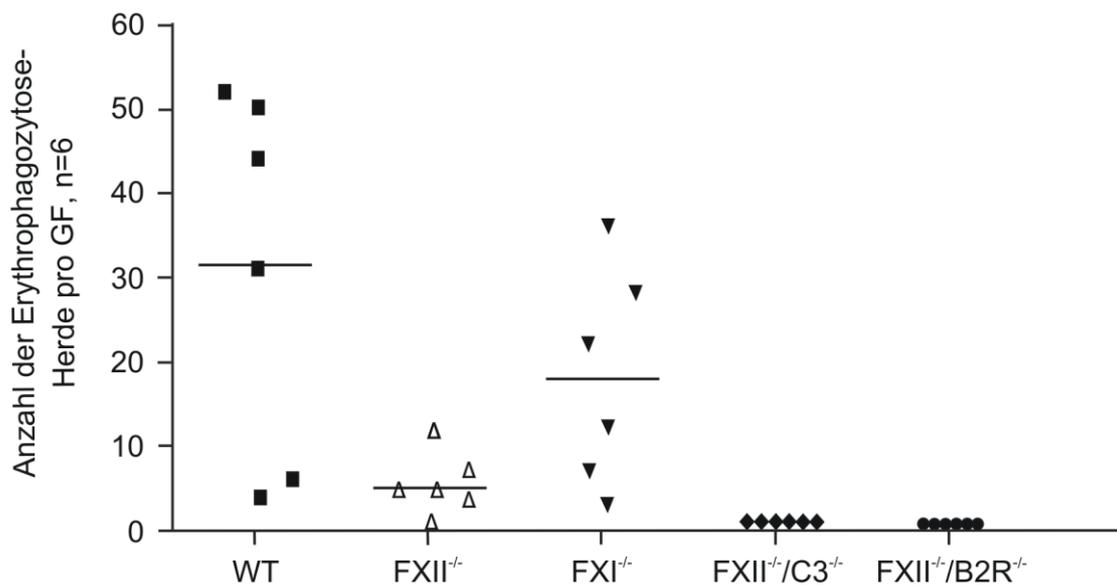


Abbildung 8. Erythrophagozytose in den Milzpräparaten der WT-, FXII^{-/-}-, FXI^{-/-}-, FXII^{-/-}/B2R^{-/-}-, FXII^{-/-}/C3^{-/-}-Mäuse

(1.) Unter 10-facher Vergrößerung wurde jeweils ein Milzausschnitt von je einem Tier mit einem Erythrophagozytose Feld ausgewählt. (2.) Innerhalb dieses definierten Milzausschnittes wurden wiederum unter 20-facher Vergrößerung die einzelnen Erythrophagozytose Gebiete pro Gesichtsfeld gezählt, n = 6. Das Ausmaß und die Inzidenz der Erythrophagozytose in FXII- und FXI-defizienten Tieren sind im Vergleich zum WT wesentlich geringer.

In unserem experimentellen LPS-Modell zeigten die WT-Mäuse ein besseres Überleben als die FXII^{-/-}-, FXI^{-/-}-, FXII^{-/-}/FXI^{-/-}-, FXII^{-/-}/B2R^{-/-}-, FXII^{-/-}/C3^{-/-}-Mäuse, was sich sowohl durch eine geringere Mortalität, als auch durch längere Überlebenszeiten äußerte. Zudem erbrachte die histologische Analyse der Milze, dass im WT ein gesteigerter Erythrozyten-Abbau stattgefunden hat, der sich ebenfalls im peripheren Blutbild anhand der Anämie widerspiegelte.

4 DISKUSSION

SIRS (Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom), Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock inklusive Sepsis-assoziiertem Multiorganversagen sind in der westlichen Welt die häufigste Todesursache bei Intensivpatienten und betreffen jährlich Millionen von Menschen weltweit (Aird, 2003; Sriskandan and Altmann, 2008; Zeerleder et al., 2005). Zur Zeit erleiden alleine in den USA ca. 1 Millionen hospitalisierte Patienten pro Jahr eine Sepsis (Martin, 2012; Mayr et al., 2014). Ca. 30-50% der Patienten erliegen den Folgen einer Sepsis und die Inzidenz septischer Erkrankungen ist weiterhin steigend (Houston and Cuthbertson, 2009; Ventetuolo and Levy, 2008). In dieser Arbeit wurde der Beitrag des FXII und nachfolgender Reaktionswege zu systemischen Entzündungsprozessen *in vivo* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit Defizienz der Kontaktphasenprotease FXII, sowie in Proteinen nachgeschalteter Signalwege eine erhöhte Sensibilität für LPS-induzierte Sepsis aufweisen.

4.1 **Inhibition des Kontaktphasensystems: Gendeletion, Antikörper und Inhibitoren im Vergleich**

Die Gerinnungsaktivierung trägt zur komplexen Pathologie innerhalb der Sepsis bei. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Gerinnung in LPS-Sepsis-Modellen vor allem durch *Tissue factor* (TF) aktiviert wird (Pawlinski et al., 2004b). Dementsprechend führt eine Inhibition der TF vermittelten Gerinnungsaktivierung bei Sepsis zu einer Gerinnungshemmung und zu einem besseren Überleben (Creasey et al., 1993; Levi et al., 1993). Erst kürzlich konnten wir die kritische Rolle von FXII für Thrombosen *in vivo* identifizieren (Renne et al., 2005; Renne et al., 2012), was für eine wichtige Funktion des Gerinnungsfaktors bei Sepsis spricht.

In unserer aktuellen Arbeit konnten wir zeigen, dass FXII^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Letalität in LPS-induzierter Sepsis aufweisen. FXI^{-/-} und FXII^{-/-}/FXI^{-/-}-Mäuse wiesen dabei ähnlich hohe Mortalitätsraten wie FXII^{-/-}-Tiere auf, was nahe legt, dass FXI primär durch FXIIa aktiviert wird. Auch Tiere mit einer kombinierten Defizienz in FXII und den FXII-nachgeschalteten Proteinen C3 oder B2R (des Komplementsystems und des Kallikrein Kinin-Systems) sind im Sepsis-Modell ähnlich ungeschützt wie FXII-defiziente Tiere, was zudem verdeutlicht, dass die FXII-Aktivierung und nicht die

Amplifikation der nachgeschalteten Signalwege die entscheidende Rolle innerhalb dieser Pathologie spielt.

Die protektive Rolle von FXII innerhalb LPS-vermittelter Endotoxinämie ist nicht nur auf Mausmodelle beschränkt. Im Primatenmodell wurde der monoklonale anti-FXII Antikörper C6B7 eingesetzt, welcher FXII nur partiell aus der Blutzirkulation entfernt, da nach E.coli Infusion eine Aktivierung des Kontaktphasensystems beobachtet werden konnte (Pixley et al., 1993). Der anti-FXII Antikörper C6B7 interferiert mit der FXII-abhängigen Aktivierung des Komplement-, des fibrinolytischen und des Kallikrein Kinin-Systems (Jansen et al., 1996). So blockiert die FXII-Inhibition die Spaltung von HK und die BK-vermittelte Hypotension, ohne jedoch die disseminierte intravasale Gerinnung bei Sepsis zu reduzieren (Pixley et al., 1993). Versuche mit FXII (human)-Rekonstitution in FXII^{-/-} Mäusen (Renne et al., 2005) und verminderter FXII-Expression durch Einsatz von Gegenstrang-Nukleotiden (Revenko et al., 2011) zeigten, dass 25 % des normalen FXII-Plasmaspiegels für eine FXII-initiierte Fibrinproduktion und Thrombusbildung *in vivo* ausreichen. Sowohl die Blutgerinnung in humanem Plasma, als auch die Thrombusbildung in FXII heterozygoten Mäusen war bei 50 % FXII-Antigenspiegel nicht vom WT zu unterscheiden (Renne et al., 2005). C6B7 Antikörper, der gegen humanen FXII gerichtet ist, blockierte im Primatenplasma nur ca. 60 % der FXII Aktivität (Pixley et al., 1993). Die übrigen 40% Proteasenaktivität erlauben eine FXII-getriggerte Koagulation und Thrombusbildung, die vergleichbar ist mit nicht-behandelten Tieren. Dies zeigt, dass effizientere pharmakologische FXII Inhibitoren oder FXII knock-out Modelle, wie in unserer Arbeit eingesetzt, für eine Analyse der FXII-Funktion bei Sepsis erforderlich sind (Iwaki et al., 2006; Pauer et al., 2004).

In Sepsis-Modellen, in denen die FXII^{-/-}-Mäuse auf C57Bl/6 genetischem Hintergrund eine kontinuierliche LPS-Infusion anstelle einer Bolusapplikation erhielten, zeigten für die FXII^{-/-}-Tiere ähnliche Überlebenszeiten wie für den WT (Iwaki et al., 2008). In dieser Studie war die LPS-Gesamtdosis ähnlich hoch wie in unserer Arbeit (500 µg/Maus vs. 300 µg/Maus), jedoch wurde sie über 94 Stunden langsam appliziert, so dass ein Vergleich der beiden Daten kaum möglich ist.

LPS induziert die Hochregulation von TF (Raetz and Whitfield, 2002) auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen, welcher wiederum die Gerinnungskaskade in septischen Mäusen aktiviert (Pawlinski et al., 2010), darüber hinaus stimuliert TF die Thrombinproduktion. Im Umkehrschluss dazu sind Mäuse mit niedriger TF-Expression vor LPS-induzierter Endotoxinämie geschützt (Pawlinski et al., 2004b).

4.2 Tiermodelle als prädiktive Systeme für humane Erkrankungen

Die Rolle des Kontaktphasensystems in Sepsis wurde in verschiedenen Tiermodellen untersucht (Pauer et al., 2004; Pixley et al., 1993). Ziel dieser Studien ist es, das Spektrum der Therapiemöglichkeiten zu erweitern und zu verbessern, um langfristig die hohen Mortalitätsraten im Rahmen septischer Erkrankungen zu senken (Oehmcke and Herwald, 2009).

Mit der Entzifferung des Maus-Genoms gelang es dem *International Mouse Genome Sequencing Consortium* 2002 das erste Mal die genomische Sequenz eines Säugetiers zu entschlüsseln (Gregory et al., 2002; Waterston et al., 2002). Nur etwa 300 Gene sind Mensch- bzw. Maus-spezifisch, 99 Prozent der Gene des Menschen sind auch in der Maus vorhanden. 90 Prozent jener Gene, die mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden, sind zwischen Mensch und Maus identisch (Waterston et al., 2002). Dementsprechend erbrachte der Einsatz von Mausmodellen zur Untersuchung des Kontaktphasensystems in dieser Arbeit einen großen Vorteil.

Der Einsatz von Tiermodellen bringt jedoch Limitationen mit sich, die eine uneingeschränkte Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen unmöglich machen: So wird bei Sepsis-Mausmodellen eine Präselektion nach Alter, Größe und Gewicht vorgenommen. Bevorzugt werden dabei junge und mittelgewichtige Tiere eingesetzt, während Sepsispatienten meist >50 Jahre alt sind und die physische Konstitution von Patient zu Patient differiert (Rittirsch et al., 2007). Vor allem jedoch unterscheiden sich die beiden Spezies in Metabolisierung, Pharmakokinetik und Verteilungsvolumen (Kompartementalisierung). Außerdem wird die Endotoxinämie innerhalb eines Modells bei allen Tieren auf die selbe Art und Weise induziert, beispielsweise durch die Injektion von LPS (zumeist von *E.coli*) oder durch eine Punktion des Zäkums (CLP) (Rittirsch et al., 2007; Rittirsch et al., 2009). Im Gegensatz dazu variieren die Ursachen von septischen Erkrankungen bei Patienten und reichen von Infektion nach chirurgischem Eingriff mit lokaler Eintrittspforte bis hin zur Infektion nach Verbrennungstrauma. Dementsprechend breit zeigt sich auch das Erregerspektrum bei Sepsispatienten (Jean-Baptiste, 2007). Sowohl Erregertypus, wie auch die zugrundeliegende Erkrankung dieser Patienten bestimmen den klinischen Verlauf der Sepsis maßgeblich. Erschwerend weisen eine Großzahl der Sepsispatienten bereits ein oder mehrere Komorbiditäten (z.B. Diabetes mellitus, Hypertonie und immunsuppressive Erkrankungen) auf, die den Verlauf der Endotoxinämie erheblich beeinflussen können. Die Versuchstiere hingegen sind meist jung und entstammen oft einer Zucht, die in pathogenfreien Bereichen gehalten wird (Rittirsch et al., 2007).

Bezüglich der Empfindlichkeit für LPS-induzierte Sepsis existiert eine große Variabilität zwischen den einzelnen Spezies, die in den Tiermodellen eingesetzt werden (Stief, 2009). So beträgt die subletale LPS Plasma-Konzentration für Primaten 1-10 µg/ml, während sich die subletale LPS Konzentration für Mäuse auf 10-100 µg/ml beläuft. Auffällig ist außerdem, dass die LPS-induzierten Sepsis-Modelle je nach Applikationsroute unterschiedliche Ergebnisse liefern obwohl gleiche Dosen von LPS verabreicht wurden. So treten systemische Reaktionen wie Hypotension, Tachypnoe und Hypo-/Hyperthermie bei intravenöser Injektion rasch (innerhalb weniger Stunden) auf, während sie nach intraperitonealer Applikation erst innerhalb von 12-24 Stunden auftreten (Rittirsch et al., 2007). Weiterhin wurden in vielen Studien zwar typische Symptome einer Sepsis, wie Hyperthermie, Tachykardie, Tachypnoe und markante Blutbildveränderungen bei infizierten Mäusen beschrieben, dennoch sind wichtige Parameter, wie die Spiegel von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, im Vergleich zwischen Tiermodell und Mensch unterschiedlich (Riedemann et al., 2003). So erreichten die Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) Plasmaspiegel bei Patienten ihr Maximum zu einem späteren Zeitpunkt und in niedrigerer Konzentration als die TNF- α Spiegel in Versuchsmäusen mit LPS-Infusion (Riedemann et al., 2003; Rittirsch et al., 2007). Im Vergleich dazu konnte in LPS-Studien an gesunden Menschen eine rasche TNF- α Freisetzung (innerhalb der ersten 120 Minuten) gezeigt werden (van Deventer et al., 1990).

4.3 Kontaktphasenaktivierung in Sepsis - ein Schutzmechanismus?

Sepsis wird definiert als eine komplexe systemische Entzündungsreaktion des Organismus auf eine Infektion (Aird, 2003). Dabei ist unerheblich ob diese Infektion bakterieller, viraler, fungaler oder parasitärer Natur ist. Prinzipiell sind alle Erreger in der Lage eine Sepsis zu induzieren (Jean-Baptiste, 2007). In den vergangenen Jahren konnte sowohl anhand von *in vitro* Versuchen, als auch in *in vivo* Studien bei Menschen und Primaten gezeigt werden, dass in septischen Prozessen eine Kontaktphasenaktivierung stattfindet (DeLa Cadena et al., 1993; Oehmcke and Herwald, 2010; Pixley et al., 1992).

Es ist bekannt, dass Zellwandkomponenten von Gram-positiven sowie Gram-negativen Bakterien eine FXII-Aktivierung initiieren können, so beispielsweise LPS (Kalter et al., 1983). Diverse bakterielle Oberflächenproteine und virulente Komponenten, wie M Proteine von *Streptococcus pyogenes* oder sogenannte *fibrous*

surface proteins (fimbriae und curli fibers) von *Salmonella* und *E. coli*, können Kontaktphasenproteine binden und assemblieren (Ben Nasr et al., 1995; Herwald et al., 1998). Nachfolgend wird HK prozessiert und BK, sowie antimikrobielle Proteine (AMPs) werden freigesetzt (Frick et al., 2007). Die Kontaktphasenzymogene FXII und/oder PPK können außerdem direkt von mikrobiellen Proteinasen aktiviert werden, u.a. durch Proteinase des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*, einem der bedeutsamsten Erreger nosokomialer Infektionen (Molla et al., 1989). Zudem verfügen Bakterien über inorganische, lineare Polymere, sogenannten Polyphosphaten (polyP). Wir konnten in transgenen Mausmodellen demonstrieren, dass polyP eine FXII getriebene Aktivierung des Kallikrein Kinin- und des intrinsischen Gerinnungssystems initiieren können (Muller et al., 2009). Man vermutet, dass polyP nach Zerfall der Bakterien freigesetzt werden und folgend die Aktivierung des Kontaktphasensystems stimulieren.

In unserem Sepsis-Mausmodell zeigten die gendefizienten Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität für Endotoxinämie und starben im Vergleich zu den WT verfrüht und in erhöhter Anzahl. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnten Frick et al. in einem Mausmodell mit Infektion durch *Staphylococcus pyogenes* demonstrieren, dass das Kontaktphasensystem einen protektiven Beitrag zur Abwehr mikrobieller Invasion leisten kann, indem es das Wachstum von Bakterien inhibiert (Frick et al., 2006). Demnach wird HK nach Kontaktphasenaktivierung in eine leichte und in eine schwere Kette gespalten. Die schwere Kette enthält die D3 Domäne, die wiederum antibakterielle Eigenschaften aufweist. Zudem konnte in Studien mit septischen Patienten gezeigt werden, dass niedrige FXII- und HK- Plasmaspiegel mit einer erhöhten Letalität korrelieren (Frick et al., 2007).

FXIIa kann im Rahmen der Immunabwehr das Komplementsystem aktivieren. Die Initiierung des klassischen Signalwegs führt zur Produktion der Komplementfaktoren C3a und C5a (Ghebrehiwet et al., 1983). In Übereinstimmung mit unseren Daten korreliert eine C3-Defizienz in Mäusen und Menschen mit einer erhöhten Suszeptibilität für Endotoxinämie (Fischer et al., 1997; Flierl et al., 2008; Ghannam et al., 2008). Im Sepsismodell verstarben C3-defiziente Mäuse dabei nach intraperitonealer Applikation von LPS (*Salmonella typhimurium*) vermehrt aufgrund abgeschwächter bakterieller Clearance. Regulierende Mechanismen, wie die Opsonisierung von Bakterien durch C3b und iC3b und eine nachfolgende Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten funktionieren dabei nicht mehr.

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass die WT-Tiere im Endotoxinämie-Modell eine geringere Letalitätsrate aufwiesen, als die FXII- und FXII-doppeltdefizienten

Tiere. Die gesteigerte Erythrophagozytose in den Milzen der WT zeigt, dass der vermehrte Abbau der Erythrozyten mit besseren Überlebenszeiten der WT korreliert. In septischen Prozessen findet eine Aktivierung von Makrophagen mit Phagozytose von Blutzellen und deren Vorstufen (Hämophagozytose) statt (Schaer et al., 2006). Erythrozyten und deren nukleären Vorstufen stellen die häufigsten Zielzellen von Makrophagen dar (Erythrophagozytose). *In vitro* Modelle zeigten, dass die Erythrophagozytose einen potenten Stimulus für die Hochregulation der Expression von Häm-Oxygenase 1 (HO-1), einem Enzym des Häm-Stoffwechsels, darstellt (Knutson et al., 2003; Schaer et al., 2006). Eine gesteigerte HO-1 Aktivität fördert die Induktion protektiver Signalwege und vermittelt antiinflammatorische, antiapoptotische, sowie antioxidative Effekte (Tsoyi et al., 2009). Dementsprechend demonstrierten Otterbein et al. in einem Ratten-Modell für LPS-induzierte Sepsis, dass HO-1 einen wirksamen Schutz vor letaler Endotoxinämie bieten kann (Otterbein et al., 1995). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen führt Erythrophagozytose über eine Hochregulierung von HO-1 zur Aktivierung protektiver Signalwege und damit zu einem verbesserten Überleben in Sepsis.

4.4 Koagulopathie in Sepsis - unabhängig vom Kontaktphasensystem

Die disseminierte intravasale Gerinnung ist eine gefürchtete Komplikation im septischen Geschehen. In Folge einer überschießenden Gerinnungsaktivierung (Hyperkoagulabilität) kommt es zur Ausbildung von Mikrothromben, welche an den Endorganen zu Ischämien und sekundär zu einem Multiorganversagen führen können (Franchini et al., 2006; Levi et al., 2003). Im Verlauf der septischen Erkrankung führt die Hyperkoagulabilität zu einem gesteigerten Verbrauch an Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren (Verbrauchskoagulopathie) (Franchini et al., 2006). Damit einher geht eine überschießende Fibrinolyse, mit der Folge, dass Blutungsstörungen (hämorrhagische Diathese) auftreten (Levi et al., 2009).

Zahlreiche Arbeiten konnten demonstrieren, dass die Gerinnungsaktivierung bei DIC primär durch TF (Raetz and Whitfield, 2002) initiiert und damit über den extrinsischen Gerinnungsweg vermittelt wird (Franco et al., 2000; Pawlinski and Mackman, 2004; Pawlinski et al., 2004a; Zeerleder et al., 2005). Die Frühphase der Sepsis ist von einer fulminanten Hyperinflammation gekennzeichnet, die durch Freisetzung proinflammatorischer und prokoagulanter Zytokine, wie TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) hervorgerufen wird (de Boer

et al., 1992; van der Poll, 2001). Die initiale Entzündungsphase kann von kurzer Dauer sein (ca. 1-3 Tage) und zu frühzeitiger Mortalität führen (Reinhart et al., 2012; van der Poll, 2001). TNF- α und IL-1 β werden in den ersten 30-90 min nach Endotoxin-Exposition freigesetzt und induzieren die Expression von TF (Raetz and Whitfield, 2002) auf immunkompetenten Zellen mit nachfolgender Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems (Aird, 2003). Weiterhin fördern die beiden Zytokine die Synthese sekundärer proinflammatorischer Mediatoren (Cohen, 2002). Dazu zählen u.a. die induzierbare NO-Synthase (Corral et al., 2005), Cyclooxygenase-2 (COX-2), endotheliale Adhäsionsmoleküle und weitere proinflammatorische Zytokine (Dinarello, 2000). Über die Hochregulation proinflammatorischer Mediatoren führt die von TNF- α und IL-1 β getriebene Kaskade zu Entzündung, Gewebedestruktion und Funktionsverlust zellulärer Bestandteile (Dinarello, 2000). Weiterhin vermögen TNF- α und IL-1 β , neben IL-6 und Interferon- γ (INF- γ), die Akute-Phase-Reaktion in der Leber zu induzieren (Srisikandan and Altmann, 2008). TNF- α , IL-1 β und IL-6, sowie weitere pro- und antiinflammatorische Mediatoren, werden von Kupffer-Zellen, den Makrophagen der Leber, sezerniert und führen zur Freisetzung direkt gerinnungsfördernder Akute-Phase-Proteine (Pixley et al., 1995), wie beispielsweise Fibrinogen und Prothrombin (Dhainaut et al., 2001). Die Akute-Phase-Proteine (APP) können über verschiedene Wirkmechanismen zum prokoagulantem Status der Sepsis beitragen (Dhainaut et al., 2001). Hierzu zählen:

1. Die APP α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin fördern die Protein C-Inhibition,
 2. das APP C4-bindendes Protein senkt den Spiegel an freiem aktivem Protein S,
 3. die hepatozytäre Synthese von Protein C und Antithrombin wird herunter reguliert,
 4. die TF-Synthese wird durch C-reaktives Protein (CRP) erhöht und
 5. die Produktion von *Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor* (TAFI) gesteigert.
- TNF- α und IL-1 β beeinträchtigen jedoch auch die Fibrinolyse (Levi et al., 2004): Einerseits stimulieren sie Endothelzellen zur Freisetzung von Plasminogen Aktivatoren, wie *tissue-type plasminogen activator* (tPA) und *urokinase-type plasminogen* (uPA), wodurch die Fibrinolyse gefördert wird. Andererseits stimulieren TNF- α und IL-1 β auch die Sekretion von Plasminogen Inhibitoren, wie *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1), welche die Fibrinolyse hemmen und somit den prokoagulantem Effekt in der Sepsis verstärken.

4.5 Antikoagulante Therapie in Sepsis: Aktiviertes Protein C und Thrombomodulin

Trotz Forschung und Einsatz Tier-experimenteller Sepsis-Modelle konnten bisher nur wenige der Ergebnisse in effiziente antikoagulante Therapien für Patienten translatiert werden. Rekombinantes aktiviertes Protein C (APC) war bisher das einzige gerinnungsmodifizierende Medikament, das in Studien nachweislich zu einer Reduktion der Sepsis-assoziierten Mortalität geführt hatte (Houston and Cuthbertson, 2009).

Protein C ist ein Vitamin-K abhängiges Zymogen, welches im Plasma zirkuliert und durch an Thrombomodulin gebundenes Thrombin aktiviert wird. APC bildet zusammen mit dem Kofaktor Protein S einen Komplex, welcher die Gerinnungsfaktoren V und VIII proteolytisch inaktiviert (Levi, 2008; Levi et al., 2004). Neben Antithrombin III stellt APC somit den wichtigsten Inhibitor des Gerinnungssystems dar.

EPCR, der endotheliale Protein C Rezeptor, fungiert nicht nur als zellständiger Rezeptor, sondern steigert auch die Konversion zu aktiviertem PC und fördert die antikoagulanten und antiinflammatorischen Effekte der Protease. Im Gegensatz dazu inhibiert löslicher EPCR die antikoagulante Aktivität von APC (Cinel and Opal, 2009). Bei Patienten mit Sepsis sind die APC-Plasmaspiegel deutlich reduziert, da die Synthese beeinträchtigt wird, der Verbrauch steigt und proteolytische Enzyme, wie neutrophile Elastase, APC abbauen. Zudem kommt es durch den Zytokinanstieg zur Herunterregulation von Thrombomodulin und folglich auch von APC (Cinel and Opal, 2009; Esmon, 2001). Zusätzlich wird der Abfall des APC-Spiegels durch eine sinkende Synthese des zellständigen EPCR und eine gesteigerte Produktion des löslichen EPCR gefördert (Cinel and Opal, 2009).

Demonstriert wurde der protektive Effekt von APC erstmals im Rahmen zweier randomisierter Studien mit Sepsis-Patienten (Levi, 2008; Levi et al., 2002). Die Patienten erhielten rekombinantes APC (rhAPC, drotrecogin alfa activated) in einer Dosis von 24 µg/kg pro Stunde i.v., wobei die optimale Konzentration des APC anhand von D-Dimer Plasmaspiegeln bestimmt wurde. Die Substitutionstherapie mit APC erbrachte eine Reduktion des relativen Mortalitätsrisikos von bis zu 40 % (Levi et al., 2010). Auf dem Hintergrund dieser positiven Ergebnisse wurden weitere Studien, wie 2001 die PROWESS- (Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis) Studie durchgeführt, die die erfolgversprechenden Resultate der rhAPC-Substitution untermauern konnten: Innerhalb der rhAPC-Gruppe (mit 24µg/kg pro Stunde APC i.v.) lag die Mortalität bei 24.7 %, während bei der Placebo-Gruppe

eine Mortalität von 30.8% verzeichnet werden konnte. Aufgrund der sich abzeichnenden Effizienz des APC wurde die Studie vorzeitig abgebrochen. 2001 wurde drotrecogin alfa activated unter dem Herstellernamen Xigris in den USA und 2002 in Europa auf Basis der PROWESS-Studie zugelassen.

Eine Reihe von Negativ-Studien brachte jedoch Kritik an dem Einsatz von APC in septischen Erkrankungen (Eichacker and Natanson, 2007), vor allem in Bezug auf das unklare Blutungsrisiko bei Patienten mit schwerwiegender Sepsis (Houston and Cuthbertson, 2009; Levi, 2008). Darüber hinaus zeigten sowohl die PROWESS-SHOCK Studie mit Patienten im septischen Schock (und leicht von PROWESS abweichenden Einschlusskriterien), wie auch die ADRESS-(Administration of Drotrecogin Alfa (Activated) in Early Stage Severe Sepsis) Studie, dass keine signifikanten Unterschiede der 28-Tagesmortalität zwischen der rhAPC-Gruppe und der Placebo-Gruppe bestanden (Opal and LaRosa, 2013; Ranieri et al., 2012; Sarangi et al., 2010). Folglich nahm der Hersteller Eli Lilly das Medikament Xigris 2011 weltweit vom Markt (Angus, 2012).

Darüber hinaus rücken aktuell weitere endogene Antikoagulanzen, wie Antithrombin, *tissue factor pathway inhibitor* und vor allem Thrombomodulin ins Zentrum der Diskussion (van der Poll, 2001). Die Plasmaspiegel aller drei Antikoagulanzen sind bei Sepsis reduziert. Der Vorteil dieser Gerinnungshemmer liegt darin, dass sie sowohl antikoagulante als auch antiinflammatorische Eigenschaften besitzen (Levi et al., 2010). Thrombomodulin bildet einen Komplex mit Thrombin, wodurch die Tertiärstruktur von Thrombin verändert wird und prokoagulante Funktionen, wie die Aktivierung von Faktor V und VIII oder die Konversion von Fibrinogen zu Fibrin, inhibiert werden (Bezeaud et al., 1985; Comp et al., 1984). In einer doppelblinden, randomisierten und Placebo-kontrollierten Phase IIB-Studie konnte bereits ein positiver Effekt des rekombinanten humanen löslichen Thrombomodulins (ART-123) in septischen Patienten nachgewiesen werden. In der ART-123 Gruppe konnte eine 28-Tagesmortalität von 17.8 % im Gegensatz zur Placebo-Gruppe mit einer Mortalität von 21.6 % verzeichnet werden (Vincent et al., 2013). ART-123 ist in Japan bereits als Therapeutikum bei DIC zugelassen. Innerhalb einer in Japan durchgeführten doppelblinden, randomisierten und Placebo-kontrollierten Phase III-Studie konnte die Überlegenheit von ART-123 zur Behandlung einer DIC bei Infektion oder malignen hämatologischen Erkrankungen im Vergleich zur niedermolekularen Heparin-Therapie nachgewiesen werden (Erholungsrate von der DIC in der ART-123 Gruppe 65.6 % vs. 45.9 % in der Heparin-Gruppe bei maligner hämatologischer Erkrankung, Erholungsrate von der DIC in der ART-123 Gruppe 66.7 % vs. 54.9 % in der Heparin-Gruppe bei Infektionen) (Saito et al., 2007). Auch

war das Blutungsrisiko innerhalb der ART-123 Gruppe im Vergleich zur Heparin-Gruppe signifikant reduziert. Die therapeutische Relevanz und Potenz der genannten Gerinnungshemmer wird derzeit noch in mehreren klinischen Studien geprüft (Iba et al., 2013).

5 AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde der Beitrag des Gerinnungsfaktors FXII und seinen nachgeschalteten Signalwegen zu septischen Erkrankungen *in vivo* untersucht. In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass FXIIa über eine Aktivierung der intrinsischen Gerinnung, des Komplementsystems und auch des Kallikrein Kinin-Systems in LPS-induzierter Sepsis vor Letalität schützt und das ein Ausschalten von FXII und FXII-abhängigen Signalwegen zu einer erhöhten Mortalität in Sepsis führt.

Zur Weiterführung dieser Arbeit sollten zunächst die im Tiermodell gefundenen Ergebnisse in weiteren Versuchsreihen genauer gesichert werden. Dabei empfiehlt es sich nach LPS-Applikation proinflammatorische Parameter wie TNF- α und wichtige Interleukine, wie Il-1 β und Il-6, zu bestimmen. Zudem ist zu klären, inwieweit und ob das Kontaktphasensystem in der Lage ist Prozesse wie Erythrophagozytose zu fördern, welche Mediatoren und Zielstrukturen involviert sind oder ob die Kontaktphasenproteasen möglicherweise auch einen direkten regulatorischen Einfluss auf Enzyme wie HO-1 haben. Weiterhin sollte eingehender überprüft werden, ob Erythrophagozytose einen FXII-abhängiger Clearance-Mechanismus bei Sepsis darstellt.

Viele Strategien, wie der Einsatz transgener Tiermodelle, klassischer Pharmakotherapie inkl. hochspezifischer Inhibitoren und molekulare Biochemie erbrachten in der Vergangenheit wertvolle Daten, die eine fundamentale Beteiligung des Kontaktphasensystems in verschiedenen pathologischen Prozessen aufzeigen. Dabei bleibt nach wie vor *en detail* zu ergründen, inwiefern das Kontaktphasensystem und seine nachgeschalteten Signalwege neben krankheitsfördernden Effekten auch Schutzmechanismen in inflammatorischen Erkrankungen entfalten können.

6 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

Das Kontaktphasensystem besteht aus dem Zymogenen Faktor XII (FXII, Hageman Faktor), Plasmaprekallikrein (PPK) und dem nicht-enzymatischen Kofaktor hochmolekulares Kininogen (HK). Das System wird durch eine Autoaktivierung von FXII durch Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen gestartet. Aktiver FXII (FXIIa) kann das intrinsische Gerinnungssystem, das Kallikrein Kinin-System, das Komplementsystem und das fibrinolytische System aktivieren und so zu Inflammation, Thrombose und Sepsis beitragen. Wir haben FXII-defiziente, FXII/ FXI (Faktor XI)-, FXII/ C3 (Komplementfaktor 3)-, sowie FXII/ B2R (Bradykinin 2 Rezeptor)-defiziente Mäuse generiert und in einem Sepsis-Endotoxämie-Modell phänotypisiert. Unsere Arbeiten zeigen, dass FXII-defiziente Mäuse und Mäuse mit Defizienz in FXII-nachgeschalteten Signalwegen im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle (Vincent et al.) eine erhöhte Letalität in Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Sepsis aufweisen. Bei den überlebenden FXII-defizienten Tieren waren die Thrombozyten-, Leukozyten und Erythrozytenzahlen im Blut 50 Stunden nach Lipopolysaccharid-Exposition signifikant höher als bei den überlebenden Wildtyp Mäusen. Histologisch zeigte sich eine gesteigerte Erythrophagozytose in den Milzen der Wildtyp Mäuse. Bei den FXII- und FXI-defizienten Tieren war die Häufigkeit und Ausprägung der Erythrophagozytose geringer. Bei Mäusen mit kombinierter FXII/B2R- bzw. FXII-/C3-Gendefizienz war die Erythrophagozytose komplett defekt. Diese Arbeit etabliert eine Funktion des Kontaktphasensystems bei experimenteller Sepsis und der Erythrophagozytose.

The contact system comprises of the zymogens factor XII (FXII), plasmaprekallikrein (PPK) and the non-enzymatic cofactor high-molecular weight kininogen (HK). Contact activation is initiated by autoactivation of FXII following contact with negatively charged surfaces. Active FXII (FXIIa) triggers four plasma cascade systems e.g. the intrinsic pathway of coagulation, the complement-, the kallikrein- and the fibrinolytic-system. Hence FXII activation contributes to inflammation, thrombosis and sepsis. Here we demonstrate, that lethality in mice deficient in FXII and proteins of FXII-triggered signalling pathways (FXI^{-/-}, FXII⁻/FXI^{-/-}, FXII⁻/C3^{-/-} und FXII⁻/B2R^{-/-}-mice) is increased in lipopolysaccharide (LPS)-induced sepsis as compared to wildtype controls (WT) (Vincent et al.). In this sepsis-model platelet, white and red blood cell counts of surviving animals 50 hours after LPS challenge were significantly higher in peripheral blood of septic FXII- FXI-, FXII/FXI-, FXII/C3-

und FXII/B2R-deficient mice as compared to injected WT mice. Histology revealed erythrophagocytosis in spleens of WT mice that was largely reduced in FXII^{-/-}- and FXI^{-/-}-mice. Erythrophagocytosis was absent in mice with FXII/C3, FXII/B2R-deficiency. These data indicate that contact system proteins might provide protection from sepsis and serve as potential candidates for therapy in inflammatory diseases.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungen	
ADRESS	Administration of Drotrecogin Alfa (Activated) in Early Stage Severe Sepsis
AMPs	Antimikrobielle Proteine
APC	Aktiviertes Protein C
APP	Akute-Phase-Proteine
APS	Ammoniumpersulfat
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
BK	Bradykinin
bp	Basenpaare
B1R	Kinin B1 Rezeptor 1
B2R	Kinin B2 Rezeptor 2
CD	Cluster of differentiation
CLP	Cecal ligature and puncture
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-reaktives Protein
C1-C4	Komplementfaktoren 1-4

C1Inh	C1-Esterase Inhibitor
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
DMSO	Dimethylsulfoxid
E.coli	Escherichia coli
EPCR	Endothelialer Protein C Rezeptor
FXI	Faktor XI
FXII	Faktor XII
FXIIa	Aktivierter FXII
Gln	N-Acetylglucosaminphosphat
HAE	Hereditäres Angioödem
HE	Hämatoxylin Eosin
Hep	Heptose
Hex	Hexosen
HK	hochmolekulares Kininogen
HO-1	Häm-Oxygenase 1
IL-6	Interleukin-6
IL-1 β	Interleukin-1 β
INR	International Normalized Ratio

KDO	2-Keto-3-desoxy-octonat
KG	Körpergewicht
KKS	Kallikrein Kinin-System
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Membrane attack complex
mKng	Kininogen-Gen
NO	Stickstoffmonoxid
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PCR	Polymerase chain reaction
PK	Plasmakallikrein
POD	Meerrettich-Peroxidasekonjugierte
polyP	Polyphosphate
PPK	Plasmaprokallikrein
ProUK	Pro-Urokinase
PROWESS	Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis
PRP	Plättchen reiches Plasma
RBC	Erythrozyten
rhAPC	Rekombinantes aktiviertes Protein C

RHS	Retikulohistiozytären System
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom
TAE	Tris Acetate-EDTA
TAFI	Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Tissue factor (Gewebsthrombokinase)
TLR4	Toll-like-receptor 4
tMCAO	Transiente Okklusion der Arteria cerebri media
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TP	Prothrombinzeit
tPA	Tissue-type plasminogen activator (Gewebspezifischer Plasminogenaktivator)
uPA	Urokinase-type plasminogen
WT	Wildtyp

8 LITERATURVERZEICHNIS

Aird, W.C. (2003). The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 101, 3765-3777.

Alexander, C., and Rietschel, E.T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 7, 167-202.

Angus, D.C. (2012). Drotrecogin alfa (activated)...a sad final fizzle to a roller-coaster party. *Crit Care* 16, 107.

Asmis, L.M., Asmis, R., Sulzer, I., Furlan, M., and Lammle, B. (2008). Contact system activation in human sepsis - 47kD HK, a marker of sepsis severity? *Swiss Med Wkly* 138, 142-149.

Austinat, M., Braeuninger, S., Pesquero, J.B., Brede, M., Bader, M., Stoll, G., Renne, T., and Kleinschnitz, C. (2009). Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema. *Stroke* 40, 285-293.

Ben Nasr, A.B., Herwald, H., Muller-Esterl, W., and Bjorck, L. (1995). Human kininogens interact with M protein, a bacterial surface protein and virulence determinant. *Biochem J* 305 (Pt 1), 173-180.

Bezeaud, A., Denninger, M.H., and Guillin, M.C. (1985). Interaction of human alpha-thrombin and gamma-thrombin with antithrombin III, protein C and thrombomodulin. *Eur J Biochem* 153, 491-496.

Bork, K., Barnstedt, S.E., Koch, P., and Traupe, H. (2000). Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. *Lancet* 356, 213-217.

Borkowski, J.A., Ransom, R.W., Seabrook, G.R., Trumbauer, M., Chen, H., Hill, R.G., Strader, C.D., and Hess, J.F. (1995). Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J Biol Chem* 270, 13706-13710.

Chan, J.C., Ganopolsky, J.G., Cornelissen, I., Suckow, M.A., Sandoval-Cooper, M.J., Brown, E.C., Noria, F., Gailani, D., Rosen, E.D., Ploplis, V.A., *et al.* (2001). The characterization of mice with a targeted combined deficiency of protein c and factor XI. *Am J Pathol* 158, 469-479.

Cheng, Q., Tucker, E.I., Pine, M.S., Sisler, I., Matafonov, A., Sun, M.F., White-Adams, T.C., Smith, S.A., Hanson, S.R., McCarty, O.J., *et al.* (2010). A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood*.

Cichon, S., Martin, L., Hennies, H.C., Muller, F., Van Driessche, K., Karpushova, A., Stevens, W., Colombo, R., Renne, T., Drouet, C., *et al.* (2006). Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet* 79, 1098-1104.

Cinel, I., and Opal, S.M. (2009). Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med* 37, 291-304.

Citarella, F., Fedele, G., Roem, D., Fantoni, A., and Hack, C.E. (1998). The second exon-encoded factor XII region is involved in the interaction of factor XII with factor XI and does not contribute to the binding site for negatively charged surfaces. *Blood* 92, 4198-4206.

Clarke, B.J., Cote, H.C., Cool, D.E., Clark-Lewis, I., Saito, H., Pixley, R.A., Colman, R.W., and MacGillivray, R.T. (1989). Mapping of a putative surface-binding site of human coagulation factor XII. *J Biol Chem* 264, 11497-11502.

Cochrane, C.G., and Revak, S.D. (1980). Dissemination of contact activation in plasma by plasma kallikrein. *J Exp Med* 152, 608-619.

Cochrane, C.G., Revak, S.D., and Wuepper, K.D. (1973). Activation of Hageman factor in solid and fluid phases. A critical role of kallikrein. *J Exp Med* 138, 1564-1583.

Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885-891.

Comp, P.C., Nixon, R.R., and Esmon, C.T. (1984). Determination of functional levels of protein C, an antithrombotic protein, using thrombin-thrombomodulin complex. *Blood* 63, 15-21.

Cool, D.E., Edgell, C.J., Louie, G.V., Zoller, M.J., Brayer, G.D., and MacGillivray, R.T. (1985). Characterization of human blood coagulation factor XII cDNA. Prediction of the primary structure of factor XII and the tertiary structure of beta-factor XIIa. *J Biol Chem* 260, 13666-13676.

Corral, J., Yelamos, J., Hernandez-Espinosa, D., Monreal, Y., Mota, R., Arcas, I., Minano, A., Parrilla, P., and Vicente, V. (2005). Role of lipopolysaccharide and cecal ligation and puncture on blood coagulation and inflammation in sensitive and resistant mice models. *Am J Pathol* 166, 1089-1098.

Creasey, A.A., Chang, A.C., Feigen, L., Wun, T.C., Taylor, F.B., Jr., and Hinshaw, L.B. (1993). Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from *Escherichia coli* septic shock. *J Clin Invest* 91, 2850-2860.

Davie, E.W., and Ratnoff, O.D. (1964). Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* 145, 1310-1312.

Davis, A.E., 3rd, Mejia, P., and Lu, F. (2008). Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol* 45, 4057-4063.

de Boer, J.P., Wolbink, G.J., Thijs, L.G., Baars, J.W., Wagstaff, J., and Hack, C.E. (1992). Interplay of complement and cytokines in the pathogenesis of septic shock. *Immunopharmacology* 24, 135-148.

DeLa Cadena, R.A., Suffredini, A.F., Page, J.D., Pixley, R.A., Kaufman, N., Parrillo, J.E., and Colman, R.W. (1993). Activation of the kallikrein-kinin system after endotoxin administration to normal human volunteers. *Blood* 81, 3313-3317.

Dhainaut, J.F., Marin, N., Mignon, A., and Vinsonneau, C. (2001). Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med* 29, S42-47.

Dinarello, C.A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest* 118, 503-508.

Dunn, J.T., Silverberg, M., and Kaplan, A.P. (1982). The cleavage and formation of activated human Hageman factor by autodigestion and by kallikrein. *J Biol Chem* 257, 1779-1784.

Eichacker, P.Q., and Natanson, C. (2007). Increasing evidence that the risks of rhAPC may outweigh its benefits. *Intensive Care Med* 33, 396-399.

Esmon, C.T. (2001). Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation. *Crit Care Med* 29, S48-51; discussion 51-42.

Fischer, M.B., Prodeus, A.P., Nicholson-Weller, A., Ma, M., Murrow, J., Reid, R.R., Warren, H.B., Lage, A.L., Moore, F.D., Jr., Rosen, F.S., *et al.* (1997). Increased susceptibility to endotoxin shock in complement C3- and C4-deficient mice is corrected by C1 inhibitor replacement. *J Immunol* 159, 976-982.

Flierl, M.A., Rittirsch, D., Nadeau, B.A., Day, D.E., Zetoune, F.S., Sarma, J.V., Huber-Lang, M.S., and Ward, P.A. (2008). Functions of the complement components C3 and C5 during sepsis. *FASEB J* 22, 3483-3490.

Franchini, M., Lippi, G., and Manzato, F. (2006). Recent acquisitions in the pathophysiology, diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation. *Thromb J* 4, 4.

Franco, R.F., de Jonge, E., Dekkers, P.E., Timmerman, J.J., Spek, C.A., van Deventer, S.J., van Deursen, P., van Kerkhoff, L., van Gemen, B., ten Cate, H., *et al.* (2000). The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. *Blood* 96, 554-559.

Frick, I.M., Akesson, P., Herwald, H., Morgelin, M., Malmsten, M., Nagler, D.K., and Bjorck, L. (2006). The contact system--a novel branch of innate immunity generating antibacterial peptides. *EMBO J* 25, 5569-5578.

Frick, I.M., Bjorck, L., and Herwald, H. (2007). The dual role of the contact system in bacterial infectious disease. *Thromb Haemost* 98, 497-502.

Fujikawa, K., and McMullen, B.A. (1983). Amino acid sequence of human beta-factor XIIa. *J Biol Chem* 258, 10924-10933.

Gailani, D., Lasky, N.M., and Broze, G.J., Jr. (1997). A murine model of factor XI deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 8, 134-144.

Gailani, D., and Renne, T. (2007). Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2507-2513.

Ghannam, A., Pernollet, M., Fauquert, J.L., Monnier, N., Ponard, D., Villiers, M.B., Peguet-Navarro, J., Tridon, A., Lunardi, J., Gerlier, D., *et al.* (2008). Human C3 deficiency associated with impairments in dendritic cell differentiation, memory B cells, and regulatory T cells. *J Immunol* 181, 5158-5166.

Ghebrehiwet, B., Randazzo, B.P., Dunn, J.T., Silverberg, M., and Kaplan, A.P. (1983). Mechanisms of activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J Clin Invest* 71, 1450-1456.

Gregory, S.G., Sekhon, M., Schein, J., Zhao, S., Osoegawa, K., Scott, C.E., Evans, R.S., Burridge, P.W., Cox, T.V., Fox, C.A., *et al.* (2002). A physical map of the mouse genome. *Nature* 418, 743-750.

Griffin, J.H., and Cochrane, C.G. (1976). Human factor XII (Hageman factor). *Methods Enzymol* 45, 56-65.

Herwald, H., Morgelin, M., Olsen, A., Rhen, M., Dahlback, B., Muller-Esterl, W., and Bjorck, L. (1998). Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces--a clue to serious complications in infectious diseases. *Nat Med* 4, 298-302.

Hoffmann, J.N., Muhlbauer, D., Jochum, M., and Inthorn, D. (2004). Effect of long-term and high-dose antithrombin supplementation on coagulation and fibrinolysis in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 32, 1851-1859.

Houston, G., and Cuthbertson, B.H. (2009). Activated protein C for the treatment of severe sepsis. *Clin Microbiol Infect* 15, 319-324.

Iba, T., Nagaoka, I., and Boulat, M. (2013). The anticoagulant therapy for sepsis-associated disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 131, 383-389.

Iwaki, T., Cruz-Topete, D., and Castellino, F.J. (2008). A complete factor XII deficiency does not affect coagulopathy, inflammatory responses, and lethality, but attenuates early hypotension in endotoxemic mice. *J Thromb Haemost* 6, 1993-1995.

Iwaki, T., Sandoval-Cooper, M.J., Brechmann, M., Ploplis, V.A., and Castellino, F.J. (2006). A fibrinogen deficiency accelerates the initiation of LDL cholesterol-driven atherosclerosis via thrombin generation and platelet activation in genetically predisposed mice. *Blood* 107, 3883-3891.

Jansen, P.M., Pixley, R.A., Brouwer, M., de Jong, I.W., Chang, A.C., Hack, C.E., Taylor, F.B., Jr., and Colman, R.W. (1996). Inhibition of factor XII in septic baboons attenuates the activation of complement and fibrinolytic systems and reduces the release of interleukin-6 and neutrophil elastase. *Blood* 87, 2337-2344.

Jean-Baptiste, E. (2007). Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med* 22, 63-72.

Kalter, E.S., van Dijk, W.C., Timmerman, A., Verhoef, J., and Bouma, B.N. (1983). Activation of purified human plasma prekallikrein triggered by cell wall fractions of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 148, 682-691.

Kane, G.C., Lam, C.F., O'Coilain, F., Hodgson, D.M., Reyes, S., Liu, X.K., Miki, T., Seino, S., Katusic, Z.S., and Terzic, A. (2006). Gene knockout of the KCNJ8-encoded Kir6.1 K(ATP) channel imparts fatal susceptibility to endotoxemia. *FASEB J* 20, 2271-2280.

Kleinschnitz, C., Austinat, M., Bader, M., Renne, T., and Stoll, G. (2008a). Deficiency of bradykinin receptor B2 is not detrimental in experimental stroke. *Hypertension* 51, e41; author reply e42-43.

Kleinschnitz, C., Braeuninger, S., Pham, M., Austinat, M., Nolte, I., Renne, T., Nieswandt, B., Bendszus, M., and Stoll, G. (2008b). Blocking of platelets or intrinsic coagulation pathway-driven thrombosis does not prevent cerebral infarctions induced by photothrombosis. *Stroke* 39, 1262-1268.

Kleinschnitz, C., Stoll, G., Bendszus, M., Schuh, K., Pauer, H.U., Burfeind, P., Renne, C., Gailani, D., Nieswandt, B., and Renne, T. (2006). Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med* 203, 513-518.

Knutson, M.D., Vafa, M.R., Haile, D.J., and Wessling-Resnick, M. (2003). Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood* 102, 4191-4197.

Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-209.

Leeb-Lundberg, L.M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D.J., and Zuraw, B.L. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57, 27-77.

Leid, R.W., Ballieux, B.E., van der Heijden, I., Kleyburg-van der Keur, C., Hagen, E.C., van Es, L.A., van der Woude, F.J., and Daha, M.R. (1993). Cleavage and inactivation of human C1 inhibitor by the human leukocyte proteinase, proteinase 3. *Eur J Immunol* 23, 2939-2944.

Levi, M. (2008). Activated protein C in sepsis: a critical review. *Curr Opin Hematol* 15, 481-486.

Levi, M., Keller, T.T., van Gorp, E., and ten Cate, H. (2003). Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res* 60, 26-39.

Levi, M., Lowenberg, E., and Meijers, J.C. (2010). Recombinant anticoagulant factors for adjunctive treatment of sepsis. *Semin Thromb Hemost* 36, 550-557.

Levi, M., ten Cate, H., and van der Poll, T. (2002). Endothelium: interface between coagulation and inflammation. *Crit Care Med* 30, S220-224.

Levi, M., ten Cate, H., van der Poll, T., and van Deventer, S.J. (1993). Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA* 270, 975-979.

Levi, M., Toh, C.H., Thachil, J., and Watson, H.G. (2009). Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 145, 24-33.

Levi, M., van der Poll, T., and Buller, H.R. (2004). Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation* 109, 2698-2704.

Lominadze, D., and Dean, W.L. (2002). Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation. *FEBS Lett* 517, 41-44.

Loza, J.P., Gurewich, V., Johnstone, M., and Pannell, R. (1994). Platelet-bound prekallikrein promotes pro-urokinase-induced clot lysis: a mechanism for targeting the factor XII dependent intrinsic pathway of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 71, 347-352.

Markiewski, M.M., DeAngelis, R.A., and Lambris, J.D. (2008). Complexity of complement activation in sepsis. *J Cell Mol Med* 12, 2245-2254.

Martin, G.S. (2012). Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10, 701-706.

Matsumoto, K., Yamamoto, T., Kamata, R., and Maeda, H. (1984). Pathogenesis of serratial infection: activation of the Hageman factor-prekallikrein cascade by serratial protease. *J Biochem* 96, 739-749.

Mayr, F.B., Yende, S., and Angus, D.C. (2014). Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 5, 4-11.

McMullen, B.A., and Fujikawa, K. (1985). Amino acid sequence of the heavy chain of human alpha-factor XIIa (activated Hageman factor). *J Biol Chem* 260, 5328-5341.

McRae, B.J., Kurachi, K., Heimark, R.L., Fujikawa, K., Davie, E.W., and Powers, J.C. (1981). Mapping the active sites of bovine thrombin, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa, plasma kallikrein, and trypsin with amino acid and peptide thioesters: development of new sensitive substrates. *Biochemistry* 20, 7196-7206.

Merkulov, S., Zhang, W.M., Komar, A.A., Schmaier, A.H., Barnes, E., Zhou, Y., Lu, X., Iwaki, T., Castellino, F.J., Luo, G., *et al.* (2008). Deletion of murine kininogen gene 1 (mKng1) causes loss of plasma kininogen and delays thrombosis. *Blood* 111, 1274-1281.

Minnema, M.C., Pajkrt, D., Wuillemin, W.A., Roem, D., Bleeker, W.K., Levi, M., van Deventer, S.J., Hack, C.E., and ten Cate, H. (1998). Activation of clotting factor XI without detectable contact activation in experimental human endotoxemia. *Blood* 92, 3294-3301.

Molla, A., Yamamoto, T., Akaike, T., Miyoshi, S., and Maeda, H. (1989). Activation of hageman factor and prekallikrein and generation of kinin by various microbial proteinases. *J Biol Chem* 264, 10589-10594.

Muller, F., Mutch, N.J., Schenk, W.A., Smith, S.A., Esterl, L., Spronk, H.M., Schmidbauer, S., Gahl, W.A., Morrissey, J.H., and Renne, T. (2009). Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 139, 1143-1156.

Muller, F., and Renne, T. (2008). Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system. *Curr Opin Hematol* 15, 516-521.

Nishikawa, K., Shibayama, Y., Kuna, P., Calcaterra, E., Kaplan, A.P., and Reddigari, S.R. (1992). Generation of vasoactive peptide bradykinin from human umbilical vein endothelium-bound high molecular weight kininogen by plasma kallikrein. *Blood* 80, 1980-1988.

Nuijens, J.H., Eerenberg-Belmer, A.J., Huijbregts, C.C., Schreuder, W.O., Felt-Bersma, R.J., Abbink, J.J., Thijs, L.G., and Hack, C.E. (1989). Proteolytic inactivation of plasma C1- inhibitor in sepsis. *J Clin Invest* 84, 443-450.

Nussberger, J., Cugno, M., and Cicardi, M. (2002). Bradykinin-mediated angioedema. *N Engl J Med* 347, 621-622.

Oehmcke, S., and Herwald, H. (2009). Contact system activation in severe infectious diseases. *J Mol Med*.

Oehmcke, S., and Herwald, H. (2010). Contact system activation in severe infectious diseases. *J Mol Med* 88, 121-126.

Opal, S.M., and LaRosa, S.P. (2013). Recombinant human activated protein C as a therapy for severe sepsis: lessons learned? *Am J Respir Crit Care Med* 187, 1041-1043.

Otterbein, L., Sylvester, S.L., and Choi, A.M. (1995). Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13, 595-601.

Pauer, H.U., Renne, T., Hemmerlein, B., Legler, T., Fritzlar, S., Adham, I., Muller-Esterl, W., Emons, G., Sancken, U., Engel, W., *et al.* (2004). Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene-a model for contact phase activation in vivo. *Thromb Haemost* 92, 503-508.

Pawlinski, R., and Mackman, N. (2004). Tissue factor, coagulation proteases, and protease-activated receptors in endotoxemia and sepsis. *Crit Care Med* 32, S293-297.

Pawlinski, R., Pedersen, B., Erlich, J., and Mackman, N. (2004a). Role of tissue factor in haemostasis, thrombosis, angiogenesis and inflammation: lessons from low tissue factor mice. *Thromb Haemost* 92, 444-450.

Pawlinski, R., Pedersen, B., Schabbauer, G., Tencati, M., Holscher, T., Boisvert, W., Andrade-Gordon, P., Frank, R.D., and Mackman, N. (2004b). Role of tissue factor and protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood* 103, 1342-1347.

Pawlinski, R., Wang, J.G., Owens, A.P., 3rd, Williams, J., Antoniak, S., Tencati, M., Luther, T., Rowley, J.W., Low, E.N., Weyrich, A.S., *et al.* (2010). Hematopoietic and non-hematopoietic cell tissue factor activates the coagulation cascade in endotoxemic mice. *Blood*.

Perkins, R., Ngo, M.D., Mahdi, F., and Shariat-Madar, Z. (2008). Identification of lipopolysaccharide binding site on high molecular weight kininogen. *Biochem Biophys Res Commun* 366, 938-943.

Pettinger, W.A., and Young, R. (1970). Endotoxin-induced kinin (bradykinin) formation: activation of Hageman factor and plasma kallikrein in human plasma. *Life Sci* 9, 313-322.

Pixley, R.A., De La Cadena, R., Page, J.D., Kaufman, N., Wyshock, E.G., Chang, A., Taylor, F.B., Jr., and Colman, R.W. (1993). The contact system contributes to hypotension but not disseminated intravascular coagulation in lethal bacteremia. In vivo use of a monoclonal anti-factor XII antibody to block contact activation in baboons. *J Clin Invest* 91, 61-68.

Pixley, R.A., DeLa Cadena, R.A., Page, J.D., Kaufman, N., Wyshock, E.G., Colman, R.W., Chang, A., and Taylor, F.B., Jr. (1992). Activation of the contact system in lethal hypotensive bacteremia in a baboon model. *Am J Pathol* 140, 897-906.

Pixley, R.A., Stumpo, L.G., Birkmeyer, K., Silver, L., and Colman, R.W. (1987). A monoclonal antibody recognizing an icosapeptide sequence in the heavy chain of human factor XII inhibits surface-catalyzed activation. *J Biol Chem* 262, 10140-10145.

Pixley, R.A., Zellis, S., Bankes, P., DeLa Cadena, R.A., Page, J.D., Scott, C.F., Kappelmayer, J., Wyshock, E.G., Kelly, J.J., and Colman, R.W. (1995). Prognostic value of assessing contact system activation and factor V in systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 23, 41-51.

Raetz, C.R., and Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71, 635-700.

Ranieri, V.M., Thompson, B.T., Barie, P.S., Dhainaut, J.F., Douglas, I.S., Finfer, S., Gardlund, B., Marshall, J.C., Rhodes, A., Artigas, A., *et al.* (2012). Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 366, 2055-2064.

Rappaport, H., and Crosby, W.H. (1957). Autoimmune hemolytic anemia. II. Morphologic observations and clinicopathologic correlations. *Am J Pathol* 33, 429-457.

Ratnoff, O.D., and Margolius, A., Jr. (1955). Hageman trait: an asymptomatic disorder of blood coagulation. *Trans Assoc Am Physicians* 68, 149-154.

Ratnoff, O.D., and Saito, H. (1979). Amidolytic properties of single-chain activated Hageman factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1461-1463.

Reinhart, K., Bauer, M., Riedemann, N.C., and Hartog, C.S. (2012). New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev* 25, 609-634.

Renne, T., and Gailani, D. (2007). Role of Factor XII in hemostasis and thrombosis: clinical implications. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 5, 733-741.

Renne, T., Nieswandt, B., and Gailani, D. (2006). The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. *Blood Cells Mol Dis* 36, 148-151.

Renne, T., Pozgajova, M., Gruner, S., Schuh, K., Pauer, H.U., Burfeind, P., Gailani, D., and Nieswandt, B. (2005). Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 202, 271-281.

Renne, T., Schmaier, A.H., Nickel, K.F., Blomback, M., and Maas, C. (2012). In vivo roles of factor XII. *Blood* 120, 4296-4303.

Revak, S.D., and Cochrane, C.G. (1976). The relationship of structure and function in human Hageman factor. The association of enzymatic and binding activities with separate regions of the molecule. *J Clin Invest* 57, 852-860.

Revenko, A.S., Gao, D., Crosby, J.R., Bhattacharjee, G., Zhao, C., May, C., Gailani, D., Monia, B.P., and MacLeod, A.R. (2011). Selective depletion of plasma prekallikrein or coagulation factor XII inhibits thrombosis in mice without increased risk of bleeding. *Blood* 118, 5302-5311.

Riedemann, N.C., Guo, R.F., and Ward, P.A. (2003). The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 112, 460-467.

Rittirsch, D., Hoesel, L.M., and Ward, P.A. (2007). The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol* 81, 137-143.

Rittirsch, D., Huber-Lang, M.S., Flierl, M.A., and Ward, P.A. (2009). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 4, 31-36.

Rosen, E.D., Gailani, D., and Castellino, F.J. (2002). FXI is essential for thrombus formation following FeCl₃-induced injury of the carotid artery in the mouse. *Thromb Haemost* 87, 774-776.

Rosenfeld, Y., Papo, N., and Shai, Y. (2006). Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J Biol Chem* 281, 1636-1643.

Rosenfeld, Y., and Shai, Y. (2006). Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochim Biophys Acta* 1758, 1513-1522.

Saito, H., Maruyama, I., Shimazaki, S., Yamamoto, Y., Aikawa, N., Ohno, R., Hirayama, A., Matsuda, T., Asakura, H., Nakashima, M., *et al.* (2007). Efficacy and safety of recombinant human soluble thrombomodulin (ART-123) in disseminated intravascular coagulation: results of a phase III, randomized, double-blind clinical trial. *J Thromb Haemost* 5, 31-41.

Sarangi, P.P., Lee, H.W., and Kim, M. (2010). Activated protein C action in inflammation. *Br J Haematol* 148, 817-833.

Schaer, D.J., Schaer, C.A., Schoedon, G., Imhof, A., and Kurrer, M.O. (2006). Hemophagocytic macrophages constitute a major compartment of heme oxygenase expression in sepsis. *Eur J Haematol* 77, 432-436.

Scherer, R.U., Giebler, R.M., Schmidt, U., Paar, D., and Kox, W.J. (1996). The influence of C1-esterase inhibitor substitution on coagulation and cardiorespiratory parameters in an endotoxin-induced rabbit model of hypercoagulability. *Semin Thromb Hemost* 22, 357-366.

Schmaier, A.H. (2008). The elusive physiologic role of Factor XII. *J Clin Invest* 118, 3006-3009.

Schmaier, A.H., and McCrae, K.R. (2007). The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation. *J Thromb Haemost* 5, 2323-2329.

Shariat-Madar, Z., Mahdi, F., Warnock, M., Homeister, J.W., Srikanth, S., Krijanovski, Y., Murphey, L.J., Jaffa, A.A., and Schmaier, A.H. (2006). Bradykinin B2 receptor knockout mice are protected from thrombosis by increased nitric oxide and prostacyclin. *Blood* 108, 192-199.

Sperandeo, P., Deho, G., and Polissi, A. (2009). The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1791, 594-602.

Sriskandan, S., and Altmann, D.M. (2008). The immunology of sepsis. *J Pathol* 214, 211-223.

Stief, T.W. (2009). Coagulation activation by lipopolysaccharides. *Clin Appl Thromb Hemost* 15, 209-219.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.

Tsoyi, K., Lee, T.Y., Lee, Y.S., Kim, H.J., Seo, H.G., Lee, J.H., and Chang, K.C. (2009). Heme-oxygenase-1 induction and carbon monoxide-releasing molecule inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced high-mobility group box 1 release in vitro and improve survival of mice in LPS- and cecal ligation and puncture-induced sepsis model in vivo. *Mol Pharmacol* 76, 173-182.

Tucker, E.I., Gailani, D., Hurst, S., Cheng, Q., Hanson, S.R., and Gruber, A. (2008). Survival advantage of coagulation factor XI-deficient mice during peritoneal sepsis. *J Infect Dis* 198, 271-274.

van der Poll, T. (2001). Immunotherapy of sepsis. *Lancet Infect Dis* 1, 165-174.

van Deventer, S.J., Buller, H.R., ten Cate, J.W., Aarden, L.A., Hack, C.E., and Sturk, A. (1990). Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* 76, 2520-2526.

Ventetuolo, C.E., and Levy, M.M. (2008). Sepsis: a clinical update. *Clin J Am Soc Nephrol* 3, 571-577.

Vincent, J.L., Ramesh, M.K., Ernest, D., LaRosa, S.P., Pahl, J., Aikawa, N., Hoste, E., Levy, H., Hirman, J., Levi, M., *et al.* (2013). A randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase 2b study to evaluate the safety and efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin, ART-123, in patients with sepsis and suspected disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* 41, 2069-2079.

Wang, X., Cheng, Q., Xu, L., Feuerstein, G.Z., Hsu, M.Y., Smith, P.L., Seiffert, D.A., Schumacher, W.A., Ogletree, M.L., and Gailani, D. (2005). Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice. *J Thromb Haemost* 3, 695-702.

Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., *et al.* (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562.

Wessels, M.R., Butko, P., Ma, M., Warren, H.B., Lage, A.L., and Carroll, M.C. (1995). Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11490-11494.

Xu, H., Ploplis, V.A., and Castellino, F.J. (2006). A coagulation factor VII deficiency protects against acute inflammatory responses in mice. *J Pathol* 210, 488-496.

Zeerleder, S., Hack, C.E., and Willemin, W.A. (2005). Disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Chest* 128, 2864-2875.

9 DANKSAGUNG

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb möchte ich mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben. An erster Stelle möchte ich Herr Professor Dr. Dr. Thomas Renné danken, der mich zu jeder Zeit mit seinem unerschöpflichen Fundus an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen stets in neue Sphären gelenkt und mich der Wissenschaft näher gebracht hat. Meinen (ehemaligen) wissenschaftlichen Kollegen am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie (Universitätsklinikum Würzburg) sowie am Institute of Clinical Chemistry and Blood Coagulation Research (Department of Molecular Medicine and Surgery, Karolinska Institutet, Stockholm, SE) danke ich für die immer zielführenden Diskussionen, die so manche thematische Wende in meine Dissertation brachten. Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Eltern, meinen Bruder, meinen Partner und meine Freunde, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben. Ihnen gilt mein besonderer Dank.

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

11 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: