



**Untersuchungen zur Pathophysiologie und therapeutischer
Relevanz des Blutgerinnungsfaktors XII nach experimentellem
Schädel-Hirn-Trauma**

~~~

**Studies on the pathophysiology and therapeutic relevance of the  
coagulation factor XII following experimental traumatic brain injury**

**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades**

**der Graduate School of Life Sciences,**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Klasse Biomedizin**

**Vorgelegt von**

**Sarah Hopp-Krämer**

**aus**

**Kaiserslautern**

**Würzburg, 2016**



**Eingereicht am:** .....

**Bürostempel**

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende/r: Prof. Dr. Manfred Gessler**

**1. Betreuer: Prof. Dr. Christoph Kleinschnitz**

**2. Betreuer: Prof. Dr. Anna-Leena Sirén**

**3. Betreuer: Prof. Dr. Bernhard Nieswandt**

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunde ausgehändigt am:** .....



### **Zusammenfassung**

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) entsteht durch äußere Gewalteinwirkung auf den Kopf und verursacht mechanisch eine Schädigung des Hirngewebes. Zusätzlich tragen sekundäre Pathomechanismen, wie Entzündungsprozesse und die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (BHS), dazu bei, dass sich das initial geschädigte Läsionsareal im Laufe der Zeit vergrößert. Vor allem bei jungen Erwachsenen ist das SHT eine der häufigsten Ursachen für bleibende Behinderungen und Todesfälle. Aufgrund der schweren Auswirkungen des SHT und der bislang fehlenden Therapieoptionen ist die Identifizierung neuer Zielstrukturen für eine kausale Therapie von größter Bedeutung. Ausgehend von tierexperimentellen Studien ist das Kallikrein-Kinin-System (KKS) ein besonders erfolgversprechender Angriffspunkt zur Behandlung des SHT. Die Aktivierung des KKS über den Gerinnungsfaktor XII (FXII) und die darauf folgende Bildung von Bradykinin sind mit dem Entstehen von Hirnödemen und Entzündungsreaktionen assoziiert. Vorangegangene Studien haben weiterhin die Frage aufgeworfen, ob und in welchem Maße thrombotische Prozesse einen Einfluss auf die Pathophysiologie und die sekundären Hirnschädigungen nach SHT haben. Da FXII sowohl das KKS als auch die intrinsische plasmatische Gerinnungskaskade initiiert und somit zur Fibrinbildung beiträgt, stand FXII im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Dissertation. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Fragen, (I) inwiefern FXII eine Rolle bei der sekundären Hirnschädigung nach Trauma spielt und (II) ob thrombotische Prozesse ein pathophysiologisches Merkmal nach Trauma darstellen. In zwei unterschiedlichen Trauma-Modellen wurden FXII-defiziente Tiere und mit einem spezifischen Inhibitor des aktivierten FXII (FXIIa) behandelte Tiere gegen Kontrolltiere nach SHT verglichen. Die Analyse der funktionellen Ausfallerscheinungen und des Ausmaßes an neuronaler Degeneration zeigte, dass FXII-Defizienz und FXIIa-Inhibition vor den Auswirkungen eines SHT schützen. Als zugrundeliegende Mechanismen wurden die Reduktion von thrombotisch verschlossenen Gefäßen in der Mikrovaskulatur des Gehirns sowie der Schutz vor BHS-Störungen und verringerte inflammatorische Prozesse identifiziert. Weiterhin wurde festgestellt, dass eine Blockade der intrinsischen Gerinnungskaskade über FXII keine intrazerebralen Blutungen auslöst. In Gewebeproben von Patienten mit SHT wurde gezeigt, dass Thrombozytenaggregate auch im klinischen Verlauf auftreten und sich somit die tierexperimentellen Befunde auf die humane Situation übertragen lassen. Insgesamt tragen die Ergebnisse dazu bei, die komplexen und vielfältigen Pathomechanismen nach SHT besser zu verstehen und vor allem die Relevanz thrombo-inflammatorischer Prozesse nach SHT aufzuzeigen. Die gezielte Blockade des FXII(a) könnte als therapeutisches Prinzip zur Abschwächung der Sekundärschaden nach SHT geeignet sein.

### Summary

Traumatic brain injury (TBI) is the result of an outside force causing mechanical disruption of the brain tissue. In addition, delayed pathogenic events, like inflammatory processes and blood-brain barrier damage occur, which collectively exacerbate the injury. In young adults, TBI is one of the main reasons for permanent disability and death. Because of its severe consequences and the lack of causal treatment, the identification of novel therapeutic options is of utmost importance. Based on animal studies, the kallikrein-kinin-system (KKS) is a very promising target to treat secondary injury processes following TBI. The activation of the KKS via coagulation factor XII (FXII) and the subsequent formation of bradykinin are tightly associated with the development of brain edema and inflammation. Recent studies have raised the question to what extent thrombotic processes might influence the pathophysiology and secondary injury processes following TBI. As FXII is not only the starting point of the KKS, but also the initiator of the intrinsic coagulation cascade which leads to fibrin formation, FXII was the center of interest for this dissertation. The work presented here deals with the issue, (I) whether FXII plays a role in the development and aggravation of secondary injury processes after trauma and (II) if thrombotic processes display a pathophysiological feature in TBI. In two different models of brain trauma, FXII-deficient mice and mice treated with a specific inhibitor of activated FXII (FXIIa) were compared to their respective control groups after trauma induction. The analyses of the functional outcome and the amount of neurodegenerative processes showed a distinct amelioration in favor of the genetically modified and treated animals. As underlying mechanisms, the reduction of thrombotic vessels in the brain microvasculature and additionally, protection from blood-brain barrier damages and less inflammation were identified. Moreover, it was observed that interference with the intrinsic coagulation cascade via FXII does not lead to the formation of intracerebral bleedings. The evaluation of human brain tissue surgically obtained following TBI demonstrated that platelet aggregates occur regularly in the course of brain trauma and that they seem to contribute to the secondary injury processes and the ischemia-like injury pattern. Taken together, the results contribute to the understanding of the highly complex and heterogeneous pathomechanisms following TBI, especially concerning thrombo-inflammatory processes. The targeted pharmacological blocking of FXII(a) could be a useful therapeutic principle in the treatment of TBI-associated pathologic processes.

**Inhaltsverzeichnis**

|         |                                                           |    |
|---------|-----------------------------------------------------------|----|
| 1       | Einleitung.....                                           | 1  |
| 1.1     | Schädel-Hirn-Trauma .....                                 | 1  |
| 1.1.1   | Epidemiologie.....                                        | 1  |
| 1.1.2   | Pathophysiologie.....                                     | 2  |
| 1.1.2.1 | Blut-Hirn-Schrankenstörung und Hirnödembildung.....       | 5  |
| 1.1.2.2 | Inflammatorische Prozesse .....                           | 6  |
| 1.1.2.3 | Thrombotische Prozesse.....                               | 7  |
| 1.1.3   | Therapieoptionen und Translation .....                    | 8  |
| 1.2     | Physiologie und Funktionen des Gerinnungsfaktor XII ..... | 8  |
| 1.2.1   | Intrinsische Gerinnungskaskade .....                      | 9  |
| 1.2.2   | Kallikrein-Kinin-System .....                             | 10 |
| 2       | Zielsetzung .....                                         | 13 |
| 3       | Material und Methoden .....                               | 14 |
| 3.1     | Materialien .....                                         | 14 |
| 3.1.1   | Chemikalien .....                                         | 14 |
| 3.1.2   | Puffer-, Fixier- und Färbelösungen .....                  | 17 |
| 3.1.3   | Primer .....                                              | 19 |
| 3.1.4   | Geräte und Software .....                                 | 19 |
| 3.2     | Tiere.....                                                | 20 |
| 3.3     | Methoden .....                                            | 21 |
| 3.3.1   | Modelle des experimentellen Schädel-Hirn-Traumas .....    | 21 |
| 3.3.1.1 | Kortikales Kälteläsionsmodell.....                        | 21 |
| 3.3.1.2 | <i>Weight-drop</i> -Modell.....                           | 22 |
| 3.3.2   | Pharmakologische Inhibition von FXIIa .....               | 23 |
| 3.3.3   | Zeitpunkte der Datenerhebung.....                         | 23 |
| 3.3.4   | Bestimmung der Läsionsgröße.....                          | 23 |
| 3.3.4.1 | Färbung mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid.....        | 23 |

|          |                                                                                       |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.4.2  | Magnetresonanztomographie.....                                                        | 24 |
| 3.3.5    | Verhaltenstestung .....                                                               | 24 |
| 3.3.5.1  | <i>Neurological Severity Score</i> .....                                              | 24 |
| 3.3.6    | Untersuchung der Blut-Hirn-Schranken-Integrität und der Hirnödembildung ...           | 25 |
| 3.3.6.1  | Evans Blue Extravasation .....                                                        | 25 |
| 3.3.6.2  | Nass-/Trockengewichtsbestimmung zur Ermittlung des vasogenen Hirnödems .....          | 25 |
| 3.3.7    | Genexpressionsanalysen .....                                                          | 26 |
| 3.3.8    | Untersuchungen des Gerinnungssystems .....                                            | 26 |
| 3.3.8.1  | Hämoglobin-Assay .....                                                                | 26 |
| 3.3.9    | Histologie und Immunhistochemie.....                                                  | 27 |
| 3.3.9.1  | NeuN/TUNEL .....                                                                      | 27 |
| 3.3.9.2  | Histologische Darstellung des zellulär entzündlichen Infiltrates .....                | 27 |
| 3.3.9.3  | Histologische Darstellung der verschlossenen Gefäße.....                              | 28 |
| 3.3.9.4  | Immunhistochemische Darstellung der Thrombozyten-Akkumulation.....                    | 28 |
| 3.3.9.5  | Histologische Darstellung von Blutungsereignissen .....                               | 28 |
| 3.3.9.6  | Humanes Hirngewebe.....                                                               | 28 |
| 3.3.10   | Western Blot Analyse .....                                                            | 29 |
| 3.3.11   | ELISA.....                                                                            | 29 |
| 3.3.11.1 | Bestimmung der Bradykinin-Konzentration.....                                          | 29 |
| 3.3.11.2 | Bestimmung der sICAM-1-Konzentration .....                                            | 30 |
| 3.3.11.3 | Bestimmung der IL-1 $\beta$ - und CCL2-Konzentration .....                            | 30 |
| 3.4      | Statistik .....                                                                       | 30 |
| 4        | Ergebnisse .....                                                                      | 31 |
| 4.1      | Funktionelles Outcome.....                                                            | 31 |
| 4.1.1    | Untersuchungen zur FXII-Defizienz im kortikalen Kälteläsionsmodell.....               | 31 |
| 4.1.2    | Pharmakologische Hemmung des FXIIa im kortikalen Kälteläsionsmodell .....             | 32 |
| 4.1.3    | Untersuchungen zur FXI-Defizienz im kortikalen Kälteläsionsmodell.....                | 34 |
| 4.1.4    | Untersuchungen zur FXII(a)-Defizienz und Inhibition im <i>weight-drop</i> -Modell ... | 34 |

|         |                                                                                       |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2     | Thrombotische Prozesse als pathophysiologisches Merkmal nach SHT .....                | 36 |
| 4.2.1   | Untersuchungen zur FXII-Defizienz im kortikalen Kälteläsionsmodell.....               | 36 |
| 4.2.2   | Pharmakologische Hemmung des FXIIa im kortikalen Kälteläsionsmodell .....             | 39 |
| 4.2.3   | Untersuchungen zur FXI-Defizienz im kortikalen Kälteläsionsmodell.....                | 41 |
| 4.2.4   | Untersuchungen zur FXII(a)-Defizienz und Inhibition im <i>weight-drop</i> -Modell ... | 41 |
| 4.2.5   | Thrombotische Prozesse als Pathomechanismus bei SHT-Patienten .....                   | 43 |
| 4.3     | Untersuchungen zur intrazerebralen Blutungsneigung .....                              | 44 |
| 4.3.1   | Auftreten von intrazerebralen Blutungen im kortikalen Kälteläsionsmodell .....        | 44 |
| 4.3.2   | Auftreten von intrazerebralen Blutungen im <i>weight-drop</i> -Modell.....            | 45 |
| 4.4     | Untersuchungen zur Blut-Hirn-Schrankenstörung und Inflammation .....                  | 47 |
| 4.4.1   | Untersuchungen zur FXII-Defizienz im kortikalen Kälteläsionsmodell.....               | 47 |
| 4.4.1.1 | Blut-Hirn-Schranke und Hirnödem.....                                                  | 47 |
| 4.4.1.2 | Inflammation .....                                                                    | 49 |
| 4.4.2   | Pharmakologische Hemmung des FXIIa im kortikalen Kälteläsionsmodell .....             | 52 |
| 4.4.2.1 | Blut-Hirn-Schranke und Hirnödem.....                                                  | 52 |
| 4.4.2.2 | Inflammation .....                                                                    | 55 |
| 4.4.3   | Untersuchungen zur FXI-Defizienz im kortikalen Kälteläsionsmodell.....                | 58 |
| 5       | Diskussion .....                                                                      | 59 |
| 5.1     | Die Rolle des FXII für den sekundären Hirnschaden nach SHT .....                      | 59 |
| 5.2     | Untersuchungen zur FXI-Defizienz nach SHT .....                                       | 62 |
| 5.3     | Limitierungen der vorliegenden Studie .....                                           | 63 |
| 5.3.1   | SHT-Modelle .....                                                                     | 63 |
| 5.3.2   | Infestin .....                                                                        | 63 |
| 5.3.3   | Langzeitschäden nach SHT .....                                                        | 65 |
| 5.4     | Zusammenfassung und Ausblick.....                                                     | 66 |
| 6       | Literaturverzeichnis.....                                                             | 68 |
| 7       | Anhang .....                                                                          | 84 |

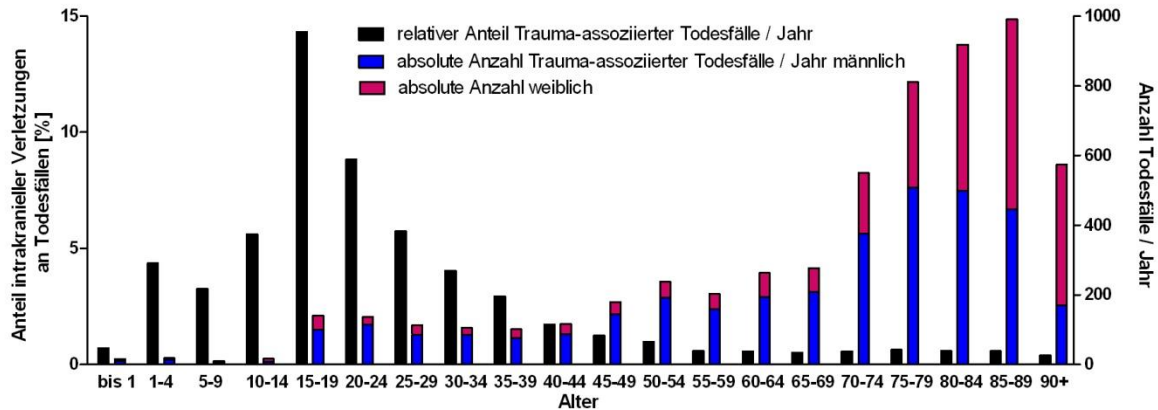


## 1 Einleitung

### 1.1 Schädel-Hirn-Trauma

#### 1.1.1 Epidemiologie

Das Krankheitsbild des Schädel-Hirn-Traumas (SHT) ist heterogen und umfasst eine Vielzahl von Verletzungsarten, Schweregraden und Pathomechanismen. Gemäß ICD-10 S06 werden unter „Intrakraniellen Verletzungen“ sowohl Gehirnerschütterungen als auch Kontusionen und Hirnblutungen zusammengefasst. In Deutschland wird die Inzidenz des SHT mit notfallmäßiger Einweisung in ein Krankenhaus auf 332 / 100.000 Einwohner geschätzt<sup>1</sup>. Diese Zahl stimmt in etwa auch mit der Inzidenz des SHT in der Europäischen Union überein, die mit 235 / 100.000 Einwohnern angegeben wird<sup>2</sup>. Laut Todesfallstatistik des Statistischen Bundesamtes von 2013 beträgt die absolute Zahl der SHT-assoziierten Todesfälle 5785. Bei der Unterteilung der Todesfälle in Altersgruppen wird deutlich, dass das SHT eine der häufigsten Todesursachen bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen ist<sup>3</sup> (Abb.1-1). Darüber hinaus ist das SHT auch eine häufige Ursache für dauerhafte Behinderungen und eine Reihe von chronisch neurologischen Sekundärerkrankungen, wie etwa demenzielle Erkrankungen oder Krankheiten des epileptischen Formenkreises<sup>4</sup>. Eine der häufigsten Ursachen für SHT sind Verkehrsunfälle<sup>5</sup>, weiterhin resultiert das SHT häufig aus Verletzungen beim Sport und bei Freizeitaktivitäten, sodass überproportional viele junge Männer betroffen sind. Im Alter stellen Stürze eine der vorrangigsten Verletzungsursachen dar<sup>1,5</sup>.



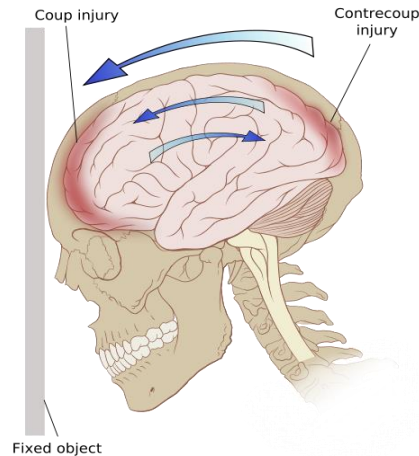
**Abbildung 1-1.** Absolute Anzahl der Trauma-assoziierten Todesfälle pro Jahr nach Alter und Geschlecht (blau/rot) sowie relativer Anteil der Trauma-assoziierten Todesfälle in Bezug auf die Anzahl der gesamten Todesfälle in den entsprechenden Altersgruppen (schwarz). Trauma-assoziiert ist hierbei definiert durch die Verschlüsselung nach ICD-10 Chiffre S06. Daten für die Bundesrepublik Deutschland für das Jahr 2013 (Statistisches Bundesamt).

Unter gesundheitsökonomischen Gesichtspunkten ist das SHT ebenfalls von großer Bedeutung. Ältere Daten aus Deutschland zeigen, dass die Kosten alleine für die Krankenhausbehandlung im Jahr 1996 bei 912 Mio. DM lagen ohne Einbeziehung der Kosten für Rehabilitationsmaßnahmen oder indirekter Krankheitskosten<sup>6</sup>. Neue Daten aus den Vereinigten Staaten nehmen jährliche direkte Krankheitskosten des SHT von etwa 9,2 Mrd. US\$ an, die indirekten Krankheitskosten werden auf zusätzliche 51,2 Mrd. US\$ geschätzt<sup>7</sup>.

### 1.1.2 Pathophysiologie

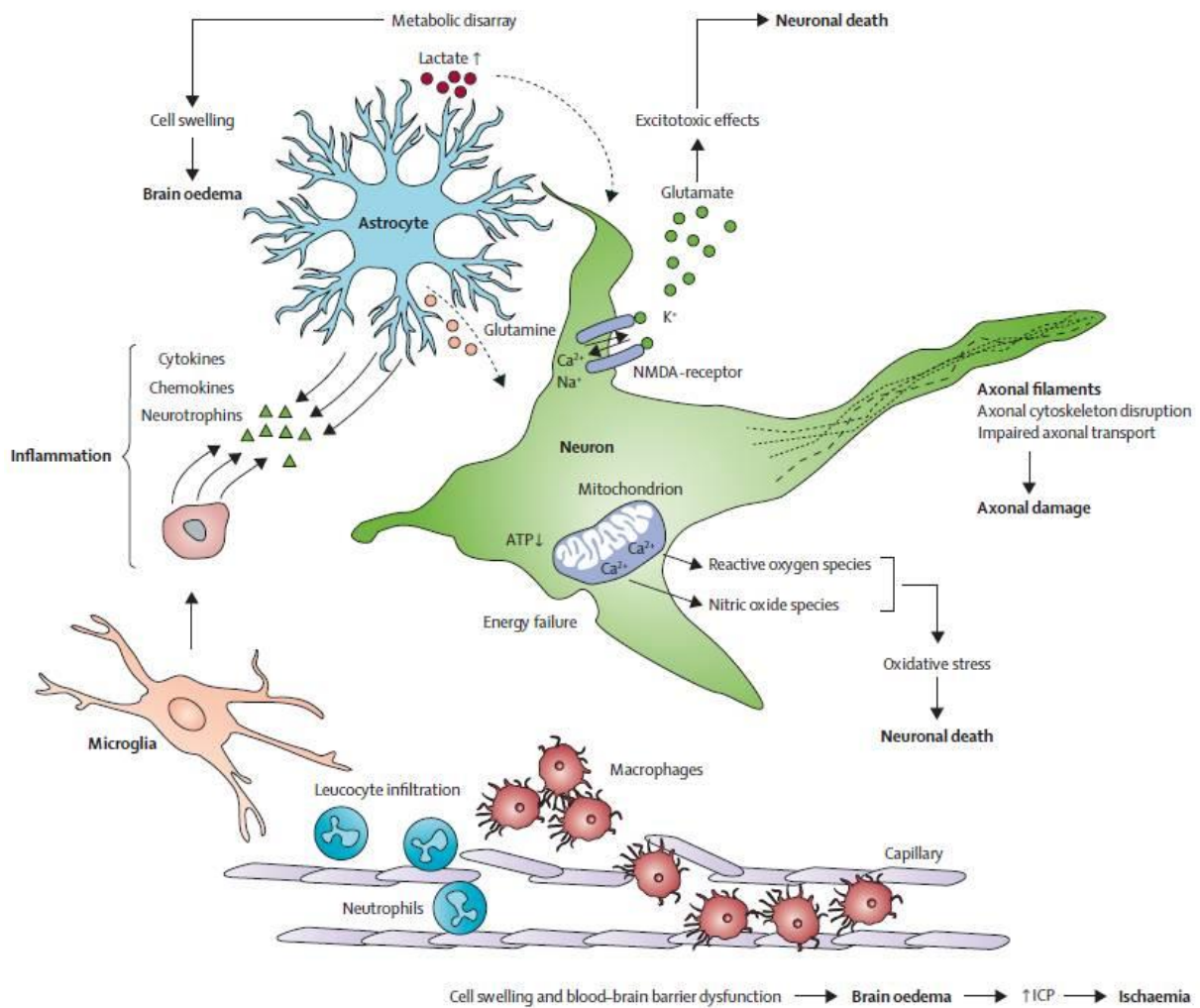
Je nach biomechanischer Ursache des SHT werden stumpfe, geschlossene und penetrierende Traumata unterschieden. Das penetrierende Trauma entsteht durch Durchstoßung der Hirnhäute und Eindringen von Objekten in die Schädelhöhle<sup>8</sup>. Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschließlich mit den stumpfen Traumata und deren Pathomechanismen. Stumpfe Traumata entstehen entweder durch Schläge oder Stöße auf den Kopf (fokales Trauma) oder durch Beschleunigungs- bzw. Abbremsbewegungen sowie als Sonderfall durch Druckwellen bei Explosionen (diffuses Trauma)<sup>8-10</sup>. Fokale Hirnverletzungen gehen meist mit Kontusionen und intrakraniellen Blutungen einher, während beim Aufprall des Kopfes auf Oberflächen ein diffus axonales Trauma entsteht, bei dem in der Folge eine zerebrale Minderversorgung mit Blut (Ischämie) und ein Hirnödem beobachtet werden<sup>9, 11</sup>. Die diffus axonale Schädigung entsteht durch den sogenannten Coup-Contrecoup-Mechanismus. Dabei trifft das Gehirn auf der Seite des Schädels auf, an der auch extern der Aufprall erfolgte. Das Gehirn wird durch die Trägheit der Masse weiter in

die entgegengesetzte Richtung bewegt und trifft dann auf dieser Seite ebenfalls auf den Schädel auf, woraus insgesamt zwei Aufprallpunkte resultieren<sup>12</sup> (Abb. 1-2).



**Abbildung 1-2.** Coup-Contrecoup-Mechanismus der primären Hirnschädigung (Patrick J. Lynch, medical illustrator; C. Carl Jaffe, MD, cardiologist. Unter: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Contrecoup.svg>)

Die Verletzungen, die durch die direkte Krafteinwirkung auf das Gehirn entstehen, werden als primäre Hirnschädigung bezeichnet. Die sekundäre Hirnschädigung dagegen entsteht durch nachfolgende pathophysiologische Mechanismen, die je nach Ursache des primären Schadens unterschiedlich ausgeprägt sein können<sup>13</sup>. Dazu gehören Änderungen im zerebralen Blutfluss und zerebrale metabolische Dysfunktion, Exzitotoxizität und oxidativer Stress, das Auftreten eines Hirnödems, inflammatorische Prozesse und Gewebeuntergang durch nekrotische und apoptotische Vorgänge. Durch die verzögerte Entwicklung ist die sekundäre Schädigung im Gegensatz zur primären Schädigung therapeutisch potentiell zugänglich<sup>9,13</sup> (Abb. 1-3).



**Abbildung 1-3.** Pathomechanismen nach Schädel-Hirn-Trauma, Erläuterungen siehe Text (entnommen aus: Rosenfeld *et al.*, *Lancet*, 2012).

Innerhalb der ersten Stunde nach SHT werden exzitatorische Neurotransmitter (v.a. Glutamat) ausgeschüttet, die postsynaptische NMDA-Rezeptoren aktivieren. Als Folge davon kommt es zu einem  $K^+$ -Ausstrom und einem Einstrom an  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$ . Durch dieses gestörte intrazelluläre Verhältnis an Kationen wird die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase gesteigert und damit ein schneller Energieverbrauch in den Zellen angeregt<sup>10</sup>. Durch den  $Ca^{2+}$ -Einstrom kommt es zusätzlich zu einer Akkumulation von  $Ca^{2+}$  in den Mitochondrien, was zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und mitochondrialen Fehlfunktionen führt<sup>14</sup>. Beide Mechanismen tragen entscheidend zum neuronalen Zelluntergang bei und induzieren ihrerseits inflammatorische Prozesse<sup>9</sup>.

### 1.1.2.1 Blut-Hirn-Schrankenstörung und Hirnödembildung

Der Übertritt von Substanzen aus der Blutbahn in das zerebrale Gewebe ist physiologischerweise eingeschränkt durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Charakteristisch für die Struktur der BHS sind die *tight junction*-Proteine, die die Endothelzellen dicht miteinander verbinden und so eine Diffusionsbarriere zwischen den Mikrogefäßen des Gehirns und dem Hirngewebe aufbauen. Zu den *tight junction*-Proteinen gehören die Transmembranproteine Occludin und Claudine sowie die intrazellulären Proteine ZO-1, -2 und -3, die interagieren und dadurch die Durchlässigkeit der BHS regulieren<sup>15, 16</sup>. Die enge Interaktion zwischen Astrozyten, Mikrogliazellen und Endothel (*gliovascular unit*) ist ebenfalls für die Integrität der BHS von großer Bedeutung<sup>17</sup>. Als direkte Auswirkung des SHT kann durch das Einwirken von Scherkräften auf die Blutgefäße das Gefäßendothel zerstört werden, was zu Ansammlungen von Proteinen und Einblutungen in das Hirnparenchym führt<sup>18</sup>. Durch weitere sekundäre Schadensprozesse, wie metabolische Dysfunktionen und Inflammation, entsteht eine Gewebshypoxie, die zu einem Abbau der *tight junction*-Proteine führt<sup>19</sup>.

Das Hirnödem ist charakterisiert durch eine Zunahme des Hirnvolumens<sup>19</sup>. Hirnödeme sind eine Hauptkomplikation nach SHT und haben einen erheblichen Einfluss auf die Mortalität und weitere sekundäre Hirnschädigungen, v.a. durch die nachgelagerte Erhöhung des intrakraniellen Drucks und die daraus folgende Kompression intakten Gewebes<sup>20</sup>. Klassischerweise werden nach SHT zwei verschiedene Formen des Hirnödems beschrieben: das vasogene und das zytotoxische Ödem<sup>21</sup>. Das vasogene Hirnödem entsteht durch den Zusammenbruch der BHS-Integrität, sowohl durch direkte mechanische Verletzungen wie oben beschrieben als auch durch endogene proinflammatorische Mediatoren (z.B. Bradykinin, Substanz P). Durch die erhöhte Permeabilität der Kapillarendothelzellen kommt es zu einer Ansammlung von proteinreichem Exsudat im zerebralen Interstitium<sup>22, 23</sup>. Im Gegensatz zum vasogenen Hirnödem ist das zytotoxische Hirnödem durch intrazelluläre Flüssigkeitsansammlungen gekennzeichnet und wird durch das Versagen der Natrium-Kalium-ATPase infolge Sauerstoff- und Energiemangels ausgelöst<sup>20, 22</sup>. Beide Formen des Hirnödems sind relevant für die Entwicklung eines gesteigerten Hirndrucks, treten aber zeitlich versetzt und in unterschiedlichem Maße, je nach Art und Ausmaß des primären Schadens, auf. Beim fokalen Trauma ist vorrangig die BHS-Störung verantwortlich für das Auftreten eines vasogenen Ödems, während bei diffusen Traumata zunächst das zytotoxische Ödem überwiegt<sup>20, 24</sup>.

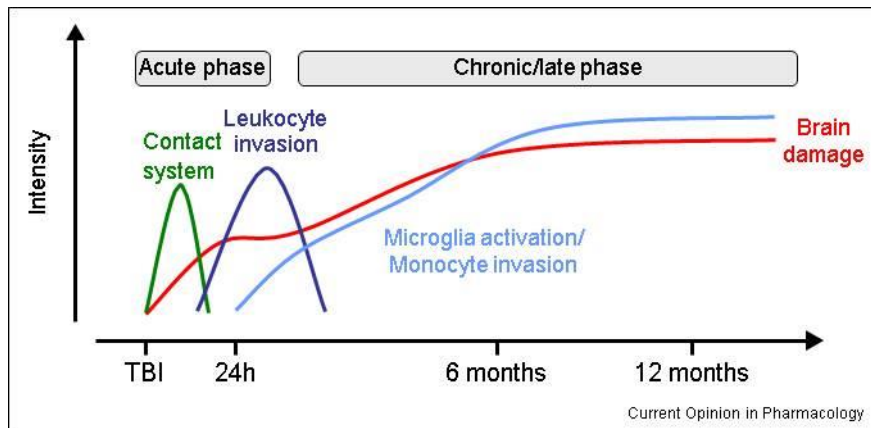
### 1.1.2.2 Inflammatorische Prozesse

Zahlreiche Studien in den vergangenen Jahren konnten zeigen, dass inflammatorische Prozesse entscheidend an den sekundären Gewebeschäden nach SHT beteiligt sind<sup>11, 25, 26</sup>. Durch die primäre traumatische Verletzung des Gehirns und den resultierenden Zelltod wird über sogenannte *DAMPs* (*damage-associated molecular pattern molecules*) bereits in den ersten Minuten nach Trauma die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia vermittelt<sup>27, 28</sup>. Diese endogenen Zellpopulationen sezernieren proinflammatorische Zytokine (Tumornekrosefaktor  $\alpha$  [TNF $\alpha$ ], Interleukin-1 $\beta$  [IL-1 $\beta$ ]) und Chemokine (*monocyte chemoattractant protein-1* [MCP-1, im Folgenden CCL2 genannt]), die sowohl ihrerseits Mikroglia aktivieren, aber auch die Rekrutierung von Immunzellen über die BHS durch Adhäsionsmoleküle (v.a. *intracellular adhesion molecule-1* [ICAM-1]) verstärken<sup>29, 30</sup>. Durch den Zusammenbruch der BHS gelangen zunächst neutrophile Granulozyten<sup>31</sup> und zu späteren Zeitpunkten auch Monozyten/Makrophagen<sup>32</sup> in das verletzte Hirngewebe und verstärken die inflammatorischen Prozesse<sup>18, 26</sup>. Beide Immunzell-Populationen produzieren nach ihrer Infiltration eine Vielzahl von Molekülen, die weiter zum Gewebeuntergang beitragen, darunter ROS und RNS (*reactive nitrogen species*), aber auch Zytokine und Chemokine<sup>33</sup>. Diese Substanzen tragen ihrerseits dazu bei, dass die BHS weiter geschädigt wird<sup>19, 34</sup>.

Die anhaltende und überschießende Immunantwort ist eine bedeutende Ursache für die Spätfolgen des SHT. Andererseits kann eine kontrollierte Immunantwort auch protektiv wirken<sup>35-37</sup>. Vor allem bestimmte Zytokine können durch ihre vielfältigen Signalkaskaden sowohl zur Neuroprotektion als auch zur Neurodegeneration beitragen<sup>38</sup>. TNF $\alpha$  wurde z.B. lange eine zentrale Rolle in der Neurotoxizität nach SHT zugesprochen<sup>39</sup>. Die derzeitige Studienlage legt jedoch nahe, dass in der frühen Phase nach SHT die neurotoxischen Effekte überwiegen, in der Erholungsphase nach SHT TNF $\alpha$  dagegen Aufgaben als neurotropher Faktor wahrnimmt<sup>38</sup>. Im Falle von IL-1 $\beta$  sind die berichteten Effekte eindeutiger und weisen auf eine Verstärkung der neuronalen Degeneration hin<sup>40</sup>. Die Expression von CCL2 erfolgt in einer sehr frühen Phase nach SHT. Dies lässt eine Beteiligung von Astrozyten und Mikroglia vermuten, die im geschädigten Gewebe aktiviert wurden. Zusätzlich zur Rekrutierung von Makrophagen hat CCL2 auch einen direkten Einfluss auf die Entzündungsprozesse<sup>38, 41</sup>.

Nach der frühen Aktivierung der Mikroglia bleiben diese noch längere Zeit in einem Zustand der „Hyper-Reaktivität“<sup>42, 43</sup>. Die daraus resultierende *White Matter Degeneration* kann noch Jahre nach einem SHT bestehen und den Hirnschaden weiter vorantreiben. Diese

Erkenntnisse bestätigen, dass das SHT auch eine persistierende neuroinflammatorische Erkrankung ist<sup>44, 45</sup> (Abb. 1-4).



**Abbildung 1-4.** Zeitlicher Verlauf der akuten und chronischen Entzündungsprozesse nach SHT (entnommen aus Plesnila, *Curr Opin Pharmacol*, 2016).

### 1.1.2.3 Thrombotische Prozesse

Die Bildung intravaskulärer Thromben im Gehirn nach SHT ist sowohl beim Menschen<sup>46, 47</sup> als auch im Tiermodell beschrieben<sup>48-50</sup>. Im Gegensatz zu anderen pathophysiologischen Prozessen nach SHT ist die Rolle der Thrombose jedoch bisher weit weniger gut untersucht<sup>47</sup>. Es ist allerdings bekannt, dass posttraumatisch auftretende Gerinnungsstörungen die Prognose der Patienten verschlechtern<sup>51, 52</sup>. In vielen Studien wird dabei eine generalisierte Gerinnungsstörung im Sinne einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) als Ursache beschrieben<sup>53, 54</sup>, die sich bei zahlreichen schweren Fällen von SHT durch Veränderungen der Gerinnungsparameter, wie z.B. einer Thrombozytopenie, der Erhöhung der D-Dimer-Konzentration und einer verlängerten partiellen Thromboplastinzeit (PTT), zeigt<sup>55</sup>. Andere Studien weisen jedoch darauf hin, dass eine lokale Bildung intravaskulärer Thromben im Gehirn auch dann auftritt, wenn keine DIC vorliegt<sup>46, 56</sup>. Dabei wird angenommen, dass der Kontakt von Thrombozyten mit subendothelialen Strukturen, die durch die mechanische Verletzung freigelegt werden, in der frühen Phase nach Trauma die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten induziert<sup>57</sup>. Es wird weiterhin vermutet, dass die Dysfunktion von Thrombozyten zu späteren Zeitpunkten nach SHT auf der Aktivierung der *tissue factor*-induzierten Gerinnung beruht<sup>48, 58</sup>.

### 1.1.3 Therapieoptionen und Translation

Die therapeutischen Optionen nach SHT sind nach wie vor limitiert und im Wesentlichen auf die symptomatische Behandlung und intensivmedizinische Maßnahmen beschränkt. Vorrangiges Ziel der Therapie ist die Aufrechterhaltung eines adäquaten zerebralen Perfusionsdruckes zur Verhinderung einer zusätzlichen zerebralen Ischämie und der Begrenzung der sekundären Hirnschädigung. Zur Senkung des intrakraniellen Drucks infolge eines Hirnödems besteht die Möglichkeit, eine Dekompressionskraniektomie durchzuführen. Inwiefern dadurch das klinische Ergebnis tatsächlich verbessert wird, ist allerdings offen<sup>59, 60</sup>. Absolute Indikationen für einen neurochirurgischen Eingriff bestehen bei raumfordernden, intrakraniellen Blutungen, bei Impressionsfrakturen und bei penetrierenden Verletzungen<sup>59, 61</sup>. Für nicht operative Behandlungsansätze erlaubt die Datenlage kaum Empfehlungen, da für die meisten medikamentösen Therapien (Osmodiuretika, Barbiturate) der Nutzen nicht eindeutig belegt ist.

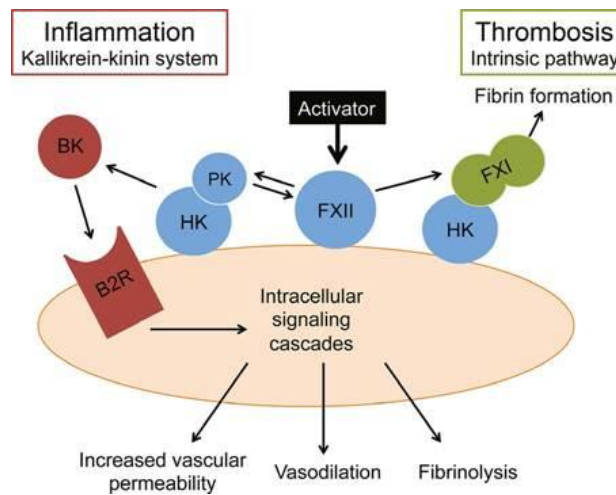
Klinische Studien der letzten Jahre zur Therapie mit Erythropoietin<sup>62, 63</sup> oder Progesteron<sup>64</sup> nach SHT verliefen trotz vorangegangener, vielversprechender präklinischer Studien<sup>65</sup> negativ. Diese mangelhafte Übertragbarkeit präklinischer Daten in die klinische Anwendung ist nicht zuletzt auf ein unzureichendes Verständnis der sekundären Prozesse der Hirnschädigung zurückzuführen<sup>66, 67</sup>.

### 1.2 Physiologie und Funktionen des Gerinnungsfaktor XII

Gerinnungsfaktor XII (FXII) wird als Zymogen in der Leber synthetisiert und durch Aktivierung in zwei Ketten gespalten, von denen die leichtere Kette Serinprotease-Aktivität besitzt und als FXIIa bezeichnet wird<sup>68</sup>. Die Aktivierung von FXII erfolgt durch Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen; *in vivo* handelt es sich hierbei vor allem um Polyphosphate, die nach der Aktivierung von Thrombozyten sezerniert werden<sup>69-71</sup>. Nach der Aktivierung von Prekallikrein zu Kallikrein durch FXIIa ist Kallikrein wiederum in der Lage, über einen positiven Feedback-Mechanismus weiteren FXII zu aktivieren<sup>72</sup> (siehe auch Kap. 1.2.1).

FXII ist als zentrales Molekül sowohl an der Bildung von Bradykinin über das Kallikrein-Kinin-System (KKS) als auch an der Bildung von Fibrin über die intrinsische Gerinnungskaskade beteiligt<sup>73</sup> (Abb. 1-5). Beide Signalkaskaden sollen im Folgenden vor allem im Hinblick auf ihre mutmaßliche Bedeutung nach SHT erläutert werden.

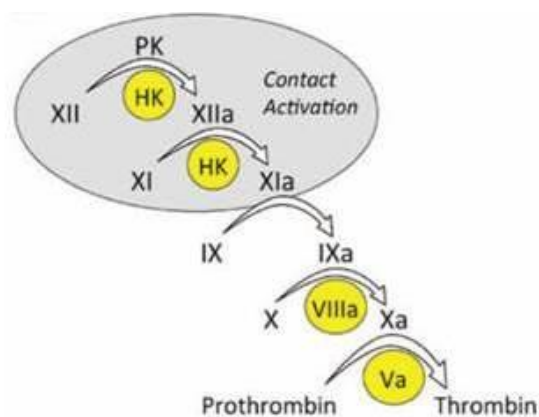




**Abbildung 1-5.** Gerinnungsfaktor XII (FXII) als Initiator der intrinsischen Gerinnung und des Kallikrein-Kinin-Systems (entnommen aus: Kenne et al., *J Intern Med*, 2015). Nach Aktivierung von FXII werden beide Signalkaskaden in Gang gesetzt.

### 1.2.1 Intrinsische Gerinnungskaskade

FXII stellt den Ausgangspunkt der intrinsischen plasmatischen Gerinnungskaskade dar. Die intrinsische Gerinnungskaskade induziert nach Aktivierung von FXII die sequentielle Konvertierung der Gerinnungsfaktoren XI, IX und X in ihre aktivierte Form, die jeweils selbst proteolytische Aktivität besitzt. Der aktivierte Faktor X spaltet Prothrombin zu Thrombin, welches daraufhin Fibrinogen aktiviert. Auf diese Weise wird eine Abfolge von Reaktionen angestoßen, die letztlich in der Bildung von Fibrin resultiert (erstmalig beschrieben von Davie, Ratnoff, 1964<sup>74</sup>, Abb. 1-6).



**Abbildung 1-6.** Modell der intrinsischen Gerinnungskaskade (entnommen aus: Gailani, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2015).

Die Polymerisierung von Fibrin-Molekülen trägt entscheidend zur Bildung eines Thrombus bei, der in der Regel neben Fibrin auch aktivierte Thrombozyten enthält und das verletzte Gewebe „abdichtet“<sup>75</sup>.

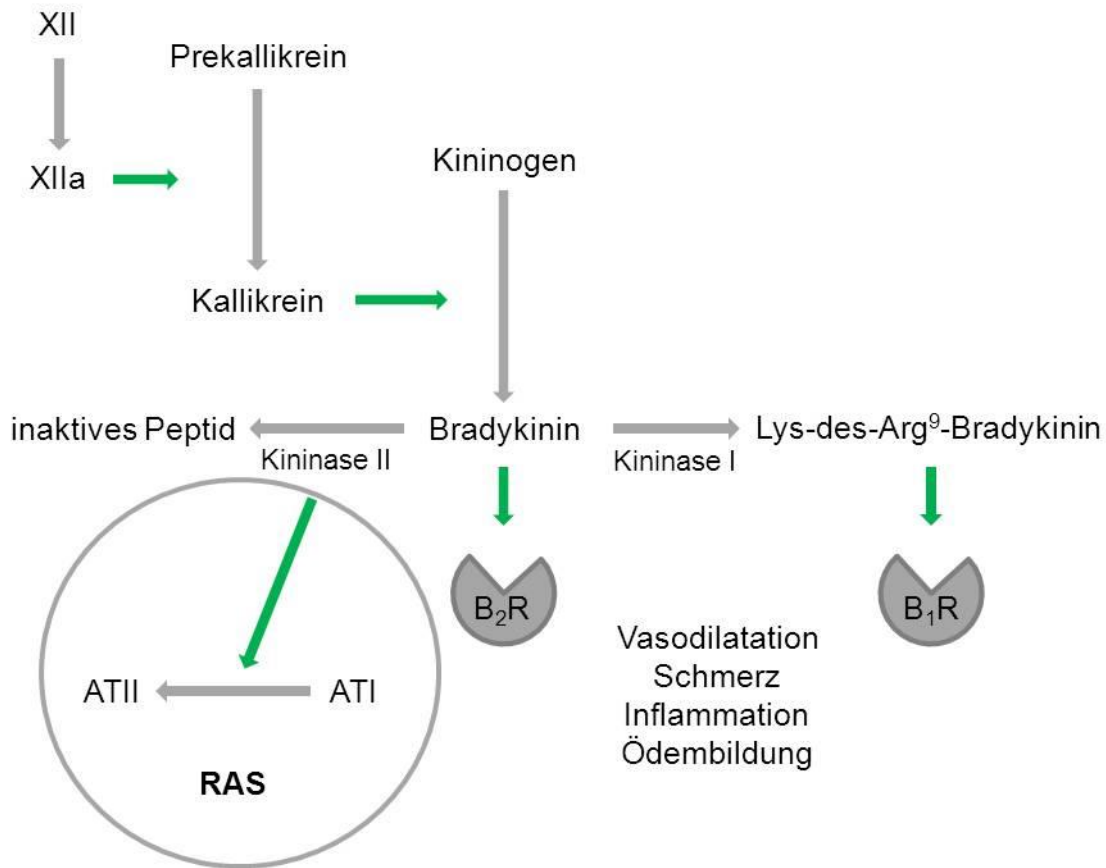
In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die klassische Gerinnungskaskade nur unzureichend die Abläufe *in vivo* erklärt<sup>76</sup>. Vor allem die Bedeutung des FXII für die Hämostase im Rahmen einer Gewebeerletzung wurde vermehrt in Zweifel gezogen, da ein gelegentlich beim Menschen auftretender genetischer FXII-Mangel nicht in Zusammenhang mit Blutungskomplikationen steht<sup>77</sup>. Stattdessen ist mittlerweile bekannt, dass die *tissue factor*-vermittelte Aktivierung der extrinsischen Gerinnung für die Hämostase die weitaus bedeutendere Signalkaskade ist<sup>78, 79</sup>. Trotz der Vermutung, dass die intrinsische Gerinnung nur eine marginale Rolle bei der Hämostase spielt, zeigten mehrere Studien in der Vergangenheit eine deutliche Reduktion des Thromboserisikos in FXII-defizienten Mäusen, sowohl in Modellen der arteriellen Thrombenbildung und Kollagen-induzierten Thromboembolie<sup>80</sup> als auch im experimentellen Schlaganfall<sup>81, 82</sup>. Das stützt die Hypothese, dass FXII eine essentielle Bedeutung für thrombotische Prozesse besitzt, vor allem in Bezug auf das Wachstum und die Stabilisierung von Thromben<sup>83, 84</sup>. Für die Entwicklung neuer Antikoagulantien zeigt sich hier ein Vorteil gegenüber gängigen Gerinnungshemmern, die bisher immer auch das Risiko einer Blutung mit sich bringen. Da FXII keine Rolle bei der Hämostase *per se* zu spielen scheint, sondern hauptsächlich in die Thrombenbildung involviert ist, stellt er ein vielversprechendes, sicheres Target für neue gerinnungshemmende Therapeutika dar<sup>85</sup>.

Der nachgeschaltete Schritt der Gerinnungskaskade ist die FXII-abhängige Aktivierung von Gerinnungsfaktor XI (FXI). Im Gegensatz zur FXII-Defizienz beim Menschen ist im Rahmen des FXI-Mangels eine moderate Blutungsneigung beschrieben, vor allem nach Verletzungen und im Rahmen von Operationen<sup>86, 87</sup>. Auch die Rolle des FXI wurde bereits in tierexperimentellen Studien in Thrombose-Modellen getestet und dessen Defizienz zeigte ebenfalls eine Reduktion der thrombotischen Ereignisse<sup>88-90</sup>. Ähnlich wie im Falle des FXII wird daher auch für FXI angenommen, dass dessen Inhibition eine Möglichkeit zur antithrombotischen Therapie darstellen könnte<sup>91</sup>.

### 1.2.2 Kallikrein-Kinin-System

Als Kallikreine bezeichnet man Serinproteasen, die aus Kininogenen Kinine freisetzen. Kinine, wie beispielsweise Bradykinin, sind Oligopeptide, die unter anderem physiologische Aufgaben im Bereich der Blutdruckregulation, der Regulation des Tonus der glatten Muskulatur und der Schmerzweiterleitung übernehmen<sup>92</sup> und mit anderen Signalkaskaden

wie dem Renin-Angiotensin-System (RAS) in Wechselwirkung stehen<sup>93</sup> (Abb. 1-7). Weiterhin sind sie maßgeblich an der Vermittlung von Immunantworten beteiligt.



**Abbildung 1-7.** Das Kallikrein-Kinin-System resultiert in der Bildung von Bradykinin und der nachfolgenden Aktivierung der Bradykinin-Rezeptoren. Über die Kininase II (*Angiotensin Converting Enzyme, ACE*), die Angiotensin I (ATI) in Angiotensin II (ATII) konvertiert, ist das Kallikrein-Kinin-System mit dem Renin-Angiotensin-System (RAS) verknüpft.

Im Plasma wird das KKS durch die Konvertierung von FXII zu FXIIa initiiert. FXIIa spaltet aus Prekallikrein Kallikrein ab, welches dann erneut FXII aktiviert<sup>92</sup>. Weiterhin setzt Kallikrein aus Kininogenen die Kinine Bradykinin (im Plasma) und Kallidin (im Gewebe) frei<sup>92, 94</sup>. Die Kinine vermitteln ihre Wirkungen über G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Der Bradykinin-2-Rezeptor (B<sub>2</sub>R) wird konstitutiv exprimiert und hat eine hohe Affinität zu Bradykinin<sup>95</sup>. Die Expression des Bradykinin-1-Rezeptors (B<sub>1</sub>R) wird als Antwort auf Zytokin- und MAP-Kinase-Freisetzung hochreguliert. Der Agonist mit der höchsten Affinität zum B<sub>1</sub>R ist ein Abbau-Produkt des Bradykinins, Lys-des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin<sup>96</sup>. Die Aktivierung der Bradykinin-Rezeptoren resultiert in der Dilatation von Gefäßen, dem Entstehen von Ödemen sowie der Bildung von Prostaglandinen<sup>97</sup>.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das KKS eine wichtige pathophysiologische Rolle nach SHT spielt<sup>98-100</sup>. Die Aktivierung des KKS zu frühen Zeitpunkten nach Trauma führt zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität und konsekutiv zu einem Hirnödem<sup>101</sup>. Daher wirkten sich in mehreren tierexperimentellen Studien vor allem die genetische Defizienz und die pharmakologische Blockade der Bradykinin-Rezeptoren vorteilhaft auf die BHS-Störung und die inflammatorischen Prozesse im Läsionsareal aus. Allerdings wird die genaue Rolle der einzelnen Rezeptoren in Bezug auf die protektiven Effekte kontrovers diskutiert<sup>98, 102, 103</sup>. Klinische Studien mit selektiven B<sub>2</sub>R-Antagonisten<sup>104, 105</sup> zeigten zwar einen möglichen neuroprotektiven Effekt, die Anwendungssicherheit ist jedoch bislang nicht eindeutig geklärt<sup>106</sup>. Dennoch weisen präklinische Studien übereinstimmend darauf hin, dass die Blockade des KKS zur Behandlung des SHT ein vielversprechender Ansatzpunkt sein könnte<sup>107</sup>.

### **2 Zielsetzung**

Das primäre Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der durch FXII-initiierten sekundären Schadensprozesse nach experimentellem SHT aufzuklären. Hierfür wurden in zwei verschiedenen Trauma-Modellen genetisch veränderte Mäuse mit FXII-Defizienz untersucht. Mechanistisch wurde hierbei besonderes Augenmerk auf die intrinsische plasmatische Gerinnung und die dadurch ausgelösten thrombotischen Prozesse gerichtet. Die klinische Relevanz der tierexperimentellen Befunde bezüglich des Auftretens thrombotischer Ereignisse wurde anhand von humanen Gewebeproben nach SHT überprüft. Des Weiteren wurde der Einfluss des KKS auf die Blut-Hirn-Schrankenphysiologie und die inflammatorischen Prozesse untersucht. Schließlich wurde auf die Frage eingegangen, inwiefern eine Hemmung von FXII-abhängigen Pathomechanismen pharmakologisch durch einen spezifischen FXIIa-Inhibitor realisiert werden kann. In diesem Zusammenhang wurde auch untersucht, ob die Beeinflussung der intrinsischen Gerinnungskaskade über FXII intrazerebrale Blutungen nach Trauma verstärkt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien

|                                         |                   |
|-----------------------------------------|-------------------|
| 0,9% NaCl-Lösung                        | Fresenius Kabi    |
| 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid       | Sigma             |
| Aceton                                  | Sigma             |
| Aluminiumkaliumsulfat                   | Merck             |
| Ammoniumperoxodisulfat                  | Merck             |
| Aqua-Poly/Mount                         | Polysciences      |
| Aquatex®                                | Merck             |
| beta-Mercaptoethanol                    | Sigma             |
| Bicinchoninsäure                        | Sigma             |
| Bovines Serum Albumin                   | Sigma             |
| Brij® 35 (30% Lösung)                   | Sigma             |
| Bromphenolblau                          | Sigma             |
| CellDeath Detection Kit, TMR red        | Roche Diagnostics |
| Chloralhydrat                           | Merck             |
| Chloroform                              | Merck             |
| Citronensäure                           | Sigma             |
| Complete Proteinase Inhibitor Tabletten | Roche Diagnostics |
| DEPC-H <sub>2</sub> O                   | Ambion            |
| Dodecylsulfat, Natriumsalz              | Merck             |
| Drabkins Reagenz                        | Sigma             |
| EDTA                                    | Sigma             |
| EGTA                                    | Sigma             |
| Eosin G                                 | Merck             |
| Essigsäure                              | Merck             |
| Ethanol, absolut                        | Sigma             |
| Evans Blue                              | Sigma             |

|                                  |                     |
|----------------------------------|---------------------|
| Faktor XII, human                | Sekisui Diagnostics |
| Faktor XII, human, modifiziert   | CSL Limited         |
| Forene® (Isofluran)              | Abbott              |
| Formamid                         | Sigma               |
| GeneAmp® 10x PCR buffer II       | Life Technologies   |
| GeneAmp® dNTPs                   | Life Technologies   |
| GeneAmp® MgCl <sub>2</sub>       | Life Technologies   |
| Glycerin, wasserfrei             | Roth                |
| Glycin                           | Sigma               |
| Hämatoxylin                      | Sigma               |
| Hämoglobin                       | Sigma               |
| Invitrogen® Random Hexamers      | Life Technologies   |
| Isopropanol                      | Sigma               |
| Kaliumhexacyanidoferrat(II)      | Merck               |
| KCl                              | Merck               |
| Kernechtrot                      | Merck               |
| Ketanest® 10% (Ketamin)          | Pfizer              |
| Kupfer(II)-sulfat-Lösung         | Sigma               |
| Methanol                         | Sigma               |
| Milchpulver, fettarm             | Roth                |
| MuIV Reverse Transcriptase       | Life Technologies   |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin | Sigma               |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Merck               |
| NaCl                             | Sigma               |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Merck               |
| NaOH                             | Merck               |
| Natriumiodat                     | Sigma               |
| Nonidet® P-40 Substitute         | Sigma               |
| Paraformaldehyd                  | Sigma               |

|                                              |                     |
|----------------------------------------------|---------------------|
| Peroxidase Substrate Kit DAB                 | Vector Laboratories |
| Precision Plus Protein® Dual Color Standards | Bio-Rad             |
| RNAlater®                                    | Quiagen             |
| Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)                 | Roth                |
| Saccharose                                   | Merck               |
| Salzsäure                                    | Sigma               |
| TaqMan® Reverse Transcription Reagents       | Life Technologies   |
| TaqMan® Universal PCR Master Mix             | Life Technologies   |
| Thrombo Plus®                                | Sarstedt            |
| Tissue-Tek®                                  | Sakura              |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan              | Merck               |
| Triton® X-100                                | Sigma               |
| TRIzol® Reagent                              | Ambion              |
| Tween® 20                                    | Sigma               |
| Vectastain® ABC Kit                          | Biozol Diagnostica  |
| VitroClud®                                   | Langenbrinck        |
| Wasserstoffperoxid                           | Merck               |
| Western Lightning® Plus ECL                  | PerkinElmer         |
| Xylavet® 2% (Xylazin)                        | cp-pharma           |
| Xylocain Gel 2 %                             | AstraZeneca         |
| Xylol                                        | Sigma               |



### 3.1.2 Puffer-, Fixier- und Färbelösungen

Alle Puffer wurden, soweit nicht anderweitig angegeben, in destilliertem Wasser frisch angesetzt.

- 4 % PFA
  - PFA 4 %
  - PBS 10 %
- Berliner Blau-Reaktionslösung
  - K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2 %
  - HCl 1%
  - zu gleichen Teilen mischen
- Blockpuffer (Western Blot)
  - fettfreies Milchpulver 5 %
  - in Waschpuffer
- Blottingpuffer
  - Glycin 1,44 %
  - Tris 0,3 %
  - Methanol 20 %
- Eosin 1%
  - Eosin G 1 %
  - in 70 % Ethanol
  - + 3 Tropfen Eisessig
- Extraktionspuffer (ELISA)
  - Tris 20 mM
  - Saccharose 0,25 M
  - EDTA 2 mM
  - EGTA 10 mM
  - Triton X-100 1 %
  - Complete Protease Inhibitor 1 Tablette auf 50 ml
- Hämalaun nach Mayer
  - Hämatoxylin 0,1 %
  - NaIO<sub>3</sub> 0,02 %
  - KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5 %
  - Chloralhydrat 5 %
  - Citronensäure 0,1 %

- Injektionsnarkotikum
  - Ketamin 10 %                      1,2 ml
  - Xylazinhydrochlorid 2 %        0,8 ml
  - 0,9 % NaCl                        8 mlInjektionsvolumen der gebrauchsfertigen Lösung: 100 µl pro 10 g KG
- Kernechtrot-Lösung
  - KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>                        5 %
  - Kernechtrot                        0,1 %
- Laufpuffer
  - SDS                                 1 %
  - Tris (pH = 6,8)                    3 %
  - Glycin                              14,4 %
- PBS, pH 7,4
  - NaCl                                137 mM (0,9 %)
  - KCl                                 2,7 mM
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>                        8 mM
  - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                        1,5 mM
- Probenpuffer, reduzierend
  - Tris (pH = 6,8)                    120 mM
  - SDS                                 10 %
  - Glycerin                            20 %
  - β-Mercaptoethanol                20 %
  - Bromphenolblau
- RIPA-Puffer
  - Tris (pH = 7,4)                    25 mM
  - NaCl                                150 mM
  - NP-40                              1 %
  - SDS                                 0,1 %
- Waschpuffer (Western Blot und Histologie)
  - Tween ® 20                        0,1 %
  - in PBS

### 3.1.3 Primer

|                               |               |     |
|-------------------------------|---------------|-----|
| <i>Ccl2</i>                   | Mm00441242_m1 | FAM |
| <i>Icam-1</i>                 | Mm00516023_m1 | FAM |
| <i>Il-1<math>\beta</math></i> | Mm00434228_m1 | FAM |
| <i>Actb</i> ( $\beta$ -Aktin) | 4352341E      | VIC |
| <i>Gapdh</i>                  | 4352339E      | VIC |

Alle Primer wurden von Applied Biosystems bezogen.

### 3.1.4 Geräte und Software

|                                            |                               |
|--------------------------------------------|-------------------------------|
| 7500 Real-Time PCR System                  | Applied Biosystems            |
| 7500 Software v2.0.6                       | Applied Biosystems            |
| Agfa Curix60 Entwicklungsmaschine          | Siemens Healthcare            |
| BioPhotometer® 6131                        | Eppendorf                     |
| Centrifuge 5415R                           | Eppendorf                     |
| Digital Sight Mikroskop-Kamera             | Nikon                         |
| Duomax 1030 Plattformschüttler             | Heidolph                      |
| Epson Perfection V500 Photo Scanner        | Epson                         |
| Fluoroskan Ascent                          | Thermo Scientific             |
| Fujifilm Super RX Röntgenfilm              | Fuji                          |
| Gefriermikrotom CM 1950                    | Leica                         |
| Halbmikrowaage BP61                        | Sartorius                     |
| Heizbarer Kleintier-OP-Tisch               | Medax                         |
| Heraeus Function Line Brutschrank          | Thermo Scientific             |
| ImageJ Open Source Software                | National Institutes of Health |
| Isofluran-Verdampfer                       | Drägerwerk AG                 |
| Magnetom Trio-Tim System 3T Ganzkörper-MRT | Siemens Healthcare            |
| MiniProtean® Tetra Elektrophorese-System   | BioRad                        |
| Multiskan EX                               | Thermo Scientific             |
| NanoPhotometer® Pearl                      | Implen                        |
| NanoPhotometer® PVC Software               | Implen                        |

|                                          |                                |
|------------------------------------------|--------------------------------|
| Nikon Eclipse 50i                        | Nikon                          |
| NIS Elements BR 4.00.05                  | Nikon                          |
| Polytron Labordispersierer PT2100        | Kinematica                     |
| PowerPac® Basic                          | BioRad                         |
| Präzisionswaage PFB                      | Kern & Sohn                    |
| Semi-dry Blottingkammer                  | Peqlab                         |
| Sonopuls HD60 Ultraschall-Homogenisierer | Bandelin                       |
| Stereotaxie-Vorrichtung                  | TSE Systems                    |
| Thermomixer® comfort                     | Eppendorf                      |
| Weight-drop Apparatur                    | Werkstatt Neurologische Klinik |

### 3.2 Tiere

Insgesamt wurden 353 Mäuse in dieser Studie eingesetzt (Tab. 3-1). Alle Arbeiten wurden im Einklang mit national geltendem Recht und Ethikrichtlinien der Europäischen Union durchgeführt und im Vorfeld von der Kommission nach §15 TierSchG der Regierung von Unterfranken genehmigt.

Die Tiere wurden artgerecht in Gruppen von 3-9 Tieren bei 12 h/12 h Hell/Dunkel-Zyklus gehalten<sup>108, 109</sup>. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser.

Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse im Alter zwischen 6 und 14 Wochen verwendet (Tab. 3-1).

Tabelle 3-1 – Tierzahlen

|                          | ♂    | ♀  |
|--------------------------|------|----|
| C57Bl/6N                 | 225  | 14 |
| - davon rHA-Infestin-4   | - 73 |    |
| - davon NaCl             | - 73 |    |
| <i>F12<sup>-/-</sup></i> | 85   | 14 |
| <i>F11<sup>-/-</sup></i> | 15   |    |
| Gesamt                   | 325  | 28 |

Als Kontrolltiere wurden C57BL/6N-Mäuse (BL/6) verwendet. Diese stammten aus der Haltung von Charles River Laboratories (Sulzfeld).

Die genetisch modifizierten Tiere stammten aus der Tierhaltungseinrichtung der Neurologischen Klinik Würzburg und der Tierhaltungseinrichtung des Zentrums für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM, Universität Würzburg).

Verwendet wurden Mäuse mit Defizienz für Gerinnungsfaktor XII (*F12<sup>-/-</sup>*) sowie Gerinnungsfaktor XI (*F11<sup>-/-</sup>*). Beide Mauslinien wurden auf BL/6-Hintergrund homozygot ingezüchtet<sup>110, 111</sup>.

Die funktionelle Rekonstitution FXII-defizienter Tiere erfolgte durch intravenöse Injektion von humanem FXII in einer Konzentration von 2 µg/g Körpergewicht (KG) unmittelbar vor Traumainduktion. Darüber hinaus wurde in gleicher Konzentration humaner FXII verabreicht, der aufgrund genetischer Modifikationen nicht aktiviert werden kann (hFXII-3xAla, zur Verwendung überlassen von CSL Limited, Australien).

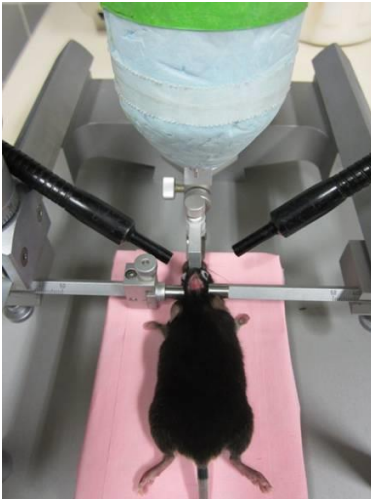
### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Modelle des experimentellen Schädel-Hirn-Traumas

##### 3.3.1.1 Kortikales Kälteläsionsmodell

Die Tiere wurden mittels Injektionsnarkose anästhesiert. Hierfür wurden 0,1 mg/g KG Ketamin und 0,005 mg/g KG Xylazin intraperitoneal verabreicht. Die ausreichende Narkosetiefe wurde durch Ausbleiben des Zwischenzehen-Reflexes sichergestellt. Zur Läsionsinduktion wurden die Mäuse mithilfe einer Stereotaxie-Vorrichtung fixiert, die Haut über dem Schädeldach wurde eröffnet und die Spitze eines Kupfer-Zylinders auf der rechten

Seite des Os parietale, 1,5 mm lateral und 1,5 mm kaudal des Bregmas, platziert (Abb. 3-1). Flüssiger Stickstoff wurde in den Zylinder eingefüllt und wirkte für die Dauer von 90 s auf die Schädeldecke ein<sup>112</sup>. Anschließend wurde die Hautwunde vernäht und mit Xylocain Gel (2 %) versorgt. Die Tiere wurden bis zum Wiedererwachen auf eine Wärmeplatte (37 °C) gelegt, um Unterkühlung zu vermeiden.



**Abbildung 3-1.** Apparatur zur Induktion der Kälteläsion. Auf die Schädeldecke der fixierten Maus wird der Kupferzylinder platziert und mit flüssigem Stickstoff befüllt (entnommen aus Raslan et al., *Exp Transl Stroke Med*, 2012).

Scheinoperierte Tiere als Kontrolle wurden der Prozedur in gleicher Weise unterzogen, jedoch fand keine Kühlung des Zylinders statt.

### 3.3.1.2 *Weight-drop*-Modell

Die erforderliche Apparatur besteht aus einem skalierten Fallrohr für ein Metallgewicht (50 g) und einer Silikonspitze (Abb. 3-2). Das Metallgewicht wurde an einem Faden in einer Höhe von 4 cm befestigt<sup>113</sup>.



**Abbildung 3-2.** Apparatur zur Induktion eines diffusen Schädel-Hirn-Traumas. Das an einem Faden fixierte Gewicht wird aus definierter Höhe auf den Schädel der Maus fallen gelassen.

Die Anästhesie der Tiere erfolgte durch das Inhalationsanästhetikum Isofluran (2 %, O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>O = 1:2). Die Kopfhaut der Tiere wurde in tiefer Narkose eröffnet, und die Spitze der *weight-drop* Apparatur wurde auf das rechte Os parietale aufgesetzt. Nach Auslösung des frei fallenden Gewichtes und Induktion des Traumas wurde die Hautwunde vernäht und mit Xylocain Gel (2 %) versorgt. Die Tiere wurden bis zum Wiedererwachen auf eine Wärmeplatte (37 °C) gelegt.

Bei scheinoperierten Tieren entfiel das Fallenlassen des Gewichtes.

Die Traumainduktion mit diesem Modell wurde durchgeführt von Dr. Christiane Albert-Weißenberger.

### 3.3.2 Pharmakologische Inhibition von FXIIa

Als pharmakologischer Inhibitor des FXIIa wurde rHA-Infestin-4 (Infestin) verwendet<sup>114</sup>. Dieses wurde durch die CSL Behring GmbH (Marburg) zur Verfügung gestellt.

Infestin wurde in allen Versuchen 1 h nach Traumainduktion intravenös in einer Konzentration von 200 mg/kg KG verabreicht. Es erfolgte keine wiederholte Injektion.

Als Kontrolle dienten BL/6-Mäuse, denen eine äquivalente Menge isotoner Kochsalzlösung appliziert wurde.

### 3.3.3 Zeitpunkte der Datenerhebung

Nach Traumainduktion wurden die Tiere 12 h, 1, 3 oder 7 Tage lang beobachtet und im Anschluss getötet (Kohlendioxidexposition, gemäß Anlage 2, TierSchVersV). Zur Analyse und Erhebung der zu untersuchenden Parameter wurde das Gehirn entnommen, in PBS gewaschen und nach entsprechenden Protokollen weiter bearbeitet.

### 3.3.4 Bestimmung der Läsionsgröße

#### 3.3.4.1 Färbung mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

Zur Ermittlung der Läsionsgröße wurde das Gehirngewebe mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) angefärbt, einem farblosen Redox-Indikator, der durch den Kontakt mit Dehydrogenasen vitaler Zellen zu einem roten Formazan reduziert wird<sup>115</sup>. Zur Messung der Läsionsgröße wurde das entnommene Gehirn mithilfe einer Schneidevorrichtung (*Mouse brain slice matrix*, Harvard Apparatus) in 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Diese Scheiben wurden in 2 % TTC-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Färbung wurden die Scheiben eingescannt und die so entstandenen Bilder wurden im Anschluss volumetrisch ausgewertet (ImageJ, OpenSource).

### 3.3.4.2 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie wurde seriell an Tag 1 und Tag 7 nach Traumainduktion durchgeführt. Die Messung erfolgte in einem 3 Tesla-Ganzkörper-Gerät (Vision, Siemens) unter Narkose mit Ketamin und Xylazin (siehe 3.3.1.1). Das Messprotokoll umfasste Frontalschnitte einer T2-gewichteten Sequenz mit einer Schichtdicke von 2 mm, einer Blut-sensitiven T2-gewichteten CISS-Sequenz (*Constructive Interference in Steady State*, Schichtdicke 1 mm) und einer SWI-Sequenz (*Susceptibility-weighted Imaging*, Schichtdicke 1 mm). Die Läsionsgrößen wurden durch Planimetrie der hyperintensiven Areale bestimmt (*Medical Image Processing, Analysis and Visualization*, MIPAV, Center for Information Technology, National Institutes of Health). Zur Analyse wurden die hochauflösenden Bilder der CISS-Sequenzen verwendet<sup>116</sup>. Darüber hinaus wurden die CISS- und die SWI-Sequenzen im Hinblick auf mögliche intrazerebrale Blutungen begutachtet. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. György Homola und Burkhard Martin (Abteilung für Neuroradiologie) durchgeführt.

### 3.3.5 Verhaltenstestung

#### 3.3.5.1 *Neurological Severity Score*

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 h, 1, 3 und 7 Tage) nach Traumainduktion mittels des *weight-drop*-Modells wurde der *Neurological Severity Score* (NSS) erhoben (Tab. 3-2). Für jedes Nichterfüllen einer Aufgabe wurde 1 Punkt vergeben, Tiere mit einem initialen Score größer 8 wurden aufgrund der zu hohen Beeinträchtigung aus der Studie ausgeschlossen<sup>113</sup>.



Tabelle 3-2 – Aufgaben NSS

| Aufgabe                                                        | Punkte (Erfolg / Misserfolg) |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Verlassen einer Plattform innerhalb von 2 min                  | 0/1                          |
| Parese der Hinterläufe<br>(bei Auftreten der Parese = 1 Punkt) | 0/1                          |
| Geradeaus laufen                                               | 0/1                          |
| Reaktion auf akustischen Reiz                                  | 0/1                          |
| Explorierendes Verhalten                                       | 0/1                          |
| Balancieren auf einer senkrechten Stange für 10 s              | 0/1                          |
| Festhalten an einer waagerechten Stange für 10 s               | 0/1                          |
| Gehen über einen Balken, Breite 3 cm                           | 0/1                          |
| Gehen über einen Balken, Breite 2 cm                           | 0/1                          |
| Gehen über einen Balken, Breite 1 cm                           | 0/1                          |
|                                                                | 0/10                         |

### 3.3.6 Untersuchung der Blut-Hirn-Schranken-Integrität und der Hirnödembildung

#### 3.3.6.1 Evans Blue Extravasation

Evans Blue-Lösung<sup>117</sup> wurde in einer Konzentration von 2 % in 0,9 % NaCl verwendet. 1 h nach Traumainduktion wurden 100 µl der Lösung intravenös verabreicht. Die Tiere wurden 24 h nach Traumainduktion getötet, das Hirn wurde entnommen und in 2 mm dicke Scheiben geschnitten. Die Hirnscheiben wurden 30 min lang bei Raumtemperatur in 4 % PFA-Lösung inkubiert und im Anschluss daran in die ipsilateralen und contralateralen Hemisphären unterteilt. Die Hemisphären wurden gewogen und zusammen mit 500 µl Formamid für 24 h bei 50 °C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde das Gewebe für 20 min zentrifugiert und jeweils 50 µl des Überstandes als Duplikate in eine 96-well Platte pipettiert. Die Proben wurden fluorimetrisch bei einer Exzitation von 620 nm und einer Emission von 680 nm gemessen (Fluoroskan Ascent). Der Gehalt an Evans Blue wurde anhand einer Kalibriergeraden bestimmt. Die Bestimmung der Evans Blue-Extravasation an Tag 3 nach Traumainduktion wurde nach dem gleichen Protokoll durchgeführt. Die Evans Blue-Lösung wurde hier 4 h vor Tötung appliziert.

#### 3.3.6.2 Nass-/Trockengewichtsbestimmung zur Ermittlung des vasogenen Hirnödems

Die Gehirne der getöteten Mäuse wurden entnommen, in 2 mm dicke Scheiben geschnitten und in die beiden Hemisphären unterteilt. Die Hemisphären wurden einzeln gewogen und

anschließend 24 h lang bei 50 °C getrocknet. Nach 24 h wurden die Hemisphären erneut gewogen. Der Wassergehalt des Gehirns wurde anhand folgender Formel errechnet:

$$\text{Wassergehalt [\%]} = ((\text{Gewicht}_{\text{nass}} - \text{Gewicht}_{\text{trocken}}) / \text{Gewicht}_{\text{nass}}) \times 100$$

### 3.3.7 Genexpressionsanalysen

Das entnommene Hirngewebe wurde zunächst für 30 min mit RNAlater® versetzt und im Anschluss bei -80 °C eingefroren. Die RNA-Isolierung erfolgte nach Standard-Protokollen<sup>118</sup> mit TRIzol®. Der RNA-Gehalt der Proben wurde spektrometrisch bestimmt und 1 µg RNA pro Probe in cDNA transkribiert (TaqMan® Reverse Transcription Reagents, Durchführung gemäß Empfehlung des Herstellers). Die relativen Genexpressionslevel des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1β (*Il-1β*), des Chemokins *monocyte chemoattractant protein-1* (*Mcp-1*, *Ccl2*) und des *intracellular adhesion molecules-1* (*Icam-1*) wurden mit der Real-Time TaqMan® PCR Technologie quantifiziert. Als Referenzgene und zur Normalisierung der Probenkonzentrationen wurden *Gapdh* und *β-Aktin* verwendet. Gleiche Mengen RNA (= 41,67 ng pro Reaktion) wurden mit TaqMan® Universal 2x PCR Master Mix, dem Assay für die Ziel-RNA und DEPC-Wasser versetzt und im 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) dem PCR-Protokoll (s. u.) unterzogen. Die Proben wurden dabei jeweils in Triplets mit einem Gesamt-Volumen von jeweils 12,5 µl auf die Platte aufgetragen. Für die relative Quantifizierung wurde die  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode angewandt<sup>119</sup>.

#### PCR-Protokoll

|       |        |             |
|-------|--------|-------------|
| 50 °C | 2 min  |             |
| 95 °C | 10 min |             |
| 95 °C | 15 s   | } 40 Zyklen |
| 60 °C | 1 min  |             |

### 3.3.8 Untersuchungen des Gerinnungssystems

#### 3.3.8.1 Hämoglobin-Assay

Die Hämoglobin-Konzentration im Hirn wurde photometrisch bestimmt<sup>120</sup>. 24 h nach Traumainduktion wurden die Tiere getötet, das Hirn wurde entnommen und in die ipsilaterale und contralaterale Hemisphäre geteilt. Die Hemisphären wurden in 1,5 ml eisgekühltem Wasser für 60 s mit Ultraschall behandelt und im Anschluss bei 4 °C für 30 min zentrifugiert. 1 ml Drabkins-Lösung wurde zu 250 µl des erhaltenen Überstandes gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte photometrisch bei 540

nm (MultiskanEX). Die Hämoglobin-Konzentration wurde anhand einer Kalibriergeraden berechnet.

### 3.3.9 Histologie und Immunhistochemie

2 mm dicke, in PBS gewaschene koronare Hirnschnitte wurden in TissueTek® eingebettet und bei -20 °C eingefroren. Die Kryoschnitte wurden – sofern nicht anderweitig beschrieben – mit 4 % PFA für 15 min fixiert, anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen für 60 min mit 5 % BSA in PBS und 0,2 % Triton-X geblockt. Die Schnitte wurden mit Primär- und Sekundärantikörpern jeweils 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Schnitte 15 min lang mit Waschpuffer gewaschen. Fluoreszenz gefärbte Schnitte wurden mit Aqua/Polymount eingedeckelt, bei Schnitten, die mit der AB-Komplex-Methode gefärbt wurden, wurde Aquatex verwendet.

Zur Quantifizierung wurden Schnitte (10 µm Dicke) ähnlicher Hirnregionen ausgesucht. Es wurden pro Tier 5 Schnitte gewählt, die jeweils 100 µm voneinander entfernt lagen.

#### 3.3.9.1 NeuN/TUNEL

Apoptotische Neurone wurden mit Immunfluoreszenz-Färbung dargestellt. Die Fixierung des Gewebes erfolgte mit Aceton bei -20 °C für 10 min. Das anschließende Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen wurde mit 5 % BSA in PBS, 1 % Ziegenerum und 0,3 % Triton-X erreicht. Als Primärantikörper zur Darstellung der Neurone wurde anti-Maus NeuN (neuronal nuclei, Millipore, MAB377, 1:1000), als Sekundärantikörper wurde DyLight 488 (abcam, ab96871, 1:100) verwendet. Apoptotische Zellen wurden mit einem CellDeath Detection Kit, basierend auf dem Prinzip der TUNEL-Methode, detektiert. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 in einer Konzentration von 2 ng/ml angefärbt.

#### 3.3.9.2 Histologische Darstellung des zellulär entzündlichen Infiltrates

Infiltrierte Immunzellen wurden immunhistochemisch angefärbt und mit der Avidin/Biotin-Komplex-Methode visualisiert. Als Primärantikörper zur Färbung der Makrophagen und aktivierter Mikroglia wurde anti-Maus CD11b (Serotec, MCA711, 1:100), zur Färbung der neutrophilen Granulozyten wurde anti-Maus Ly-6B.2 (Serotec, MCA771G, 1:100) verwendet. Im Anschluss wurden die Schnitte mit entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörpern (Kaninchen anti-Ratte IgG, Vector Laboratories, BA-4001, 1:100) inkubiert. Darauf erfolgte die Inkubation für 35 min mit einem Avidin-Biotin-Enzymkomplex (Vectastain® ABC Kit). Zuletzt wurden durch Zugabe des Chromogens Diaminobenzidin (DAB, Peroxidase Substrate Kit DAB) die Immunzellen detektiert. Als Positivkontrolle für Immunzellen wurde Milzgewebe aus der Maus verwendet.

### 3.3.9.3 Histologische Darstellung der verschlossenen Gefäße

Zur Erhebung des Thrombose-Index wurden Hämatoxylin & Eosin-Färbungen (H&E) nach einem Standard-Protokoll<sup>121</sup> von gefrorenen Hirnschnitten (Dicke 10 µm) angefertigt. Die gefärbten Schnitte wurden bei 20-facher Vergrößerung ausgewertet und die Anzahl der thrombotisch verschlossenen ( $N_{\text{occ}}$ ) und offenen ( $N_{\text{open}}$ ) Gefäße pro Hemisphäre wurde bestimmt. Aus jeweils 5 Schnitten pro Tiere wurden die Mittelwerte gebildet. Die Schnitte lagen jeweils 50 µm voneinander entfernt. Der Thrombose-Index wurde anhand folgender Formel berechnet:  $(N_{\text{occ}}/(N_{\text{open}}+N_{\text{occ}}))*100$

### 3.3.9.4 Immunhistochemische Darstellung der Thrombozyten-Akkumulation

Aggregierte Thrombozyten wurden mit einer Immunfluoreszenz-Färbung gegen Glykoprotein Ib (GPIb) dargestellt. Zur Lokalisation von GPIb-positiven Zellen wurde zusätzlich das Endothelprotein CD31 angefärbt. Als Primärantikörper wurden Ratte anti-Maus GPIb (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Nieswandt, Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg, 1:100) und Ratte anti-Maus CD31 (Bio-Rad, MCA2388GA, 1:100) verwendet. Als Sekundärantikörper wurden Cy2 Ziege anti-Ratte (Dianova, 112-225-167, 1:100) und Cy3 Esel anti-Ratte (Dianova, 712-166-153, 1:100) verwendet.

### 3.3.9.5 Histologische Darstellung von Blutungsereignissen

Um Blutungsereignisse auszuschließen, wurde 7 d nach Traumainduktion ein histologischer Nachweis auf dreiwertiges Eisen durchgeführt. Angewandt wurde die „Berliner Blau-Reaktion“<sup>122</sup>, bei der  $\text{Fe}^{3+}$  aus Hämosiderin unter Zusatz von Kaliumhexacyanidoferrat(II) ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) einen blauen Niederschlag von Berliner Blau ( $\text{K}[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ , Eisen(III)-hexacyanidoferrat(II/III)) ergibt. Die Gefrierschnitte wurden 1 h lang in der Reaktionslösung inkubiert. Nach Waschen der Schnitte in destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit Kernechtrot für 10 min<sup>121</sup>.

### 3.3.9.6 Humanes Hirngewebe

Durch Kooperationen mit dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg (Dr. Camelia Monoranu) und der Abteilung für Pathologie der Universität Uppsala (Prof. Niklas Marklund) standen für diese Arbeit humane Gewebeproben von Patienten nach SHT sowie von Kontrollpatienten (siehe Tab. 7-1 im Anhang) zur Verfügung. Um Thrombozytenakkumulationen in den Gefäßen der Patienten darzustellen, wurden die in Paraffin eingebetteten Hirnschnitte mit einem Primärantikörper gegen GPIb (bioss, bs-2347R, 1:50) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und mit der Avidin/Biotin-Komplex-Methode entwickelt. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde Hämatoxylin verwendet. Die Färbungen wurden von Dr. Michael Schuhmann und Andrea Sauer angefertigt. Die Schnitte wurden verblindet und analog zur Berechnung des Thrombose-Indexes ausgewertet.

### 3.3.10 Western Blot Analyse

Zur Herstellung der Lysate für die Western Blot-Analyse wurden die ipsilateralen Cortices der Hirne präpariert und in 100 µl RIPA-Puffer homogenisiert. Nach 30 s Ultraschall-Behandlung der Proben wurden diese bei 13000 U/min für 30 min zentrifugiert und der Überstand zur Protein-Quantifizierung mittels BCA-Assay verwendet. Die Proben wurden im Anschluss mit reduzierendem Probenpuffer versetzt, sodass eine Konzentration von 20 µg Protein pro 10 µl erreicht wurde. Vor Beladung des Gels (12 oder 15 % Acrylamid) zur Durchführung einer SDS-PAGE wurden die Proteine bei 95 °C für 5 min denaturiert. Nach der Gelelektrophorese (90 min, 20 mA je Gel) wurden die Proteine mittels Semi-dry-Blotting<sup>123</sup> auf eine PVDF-Membran übertragen (90 min, 25 V, 100 mA je Gel). Im Anschluss wurde die Membran für 30 min mit Blockpuffer behandelt, bevor sie für etwa 16 h bei 4 °C mit den Primärantikörpern inkubiert wurde. Nach Waschen mit 1x Waschpuffer wurde der entsprechende Zweitantikörper hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sichtbarmachung der Proteinbanden erfolgte durch Inkubation der Membran mit Western Lightning® Plus ECL und Belichtung eines Röntgenfilms (Fuji) sowie anschließender Entwicklung (Agfa Curix60 Entwicklungsmaschine). Zur relativen Quantifizierung wurde eine densitometrische Analyse der Proteinbanden mit der ImageJ-Software durchgeführt. Als Ladekontrolle diente β-Aktin (Sigma, A5441, 1:500000, Zweitantikörper: anti-Maus HRPO, Dianova, 715-035-150, 1:10000).

Als Primärantikörper zur Bestimmung des *tight junction*-Proteins wurde anti-Occludin (abcam, ab31721, 1:5000), als Sekundärantikörper anti-Kaninchen HRPO (Dianova, 711-035-152, 1:10000) verwendet.

Als Parameter für die Akkumulation von Thrombozyten im Hirngewebe wurde ein Primärantikörper gegen GPIb (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Nieswandt, Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg, 1:1000) eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde anti-Ratte HRPO (Dianova, 712-035-150, 1:5000) verwendet.

### 3.3.11 ELISA

#### 3.3.11.1 Bestimmung der Bradykinin-Konzentration

Zur Bestimmung der Bradykinin-Konzentration im Plasma wurde 2 h nach Traumainduktion im Kälteläsionsmodell Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte final durch Herzpunktion am narkotisierten Tier<sup>124</sup>. Das mit heparinisierten Kanülen entnommene Blut wurde unter Kühlung zentrifugiert und der Überstand bei -80 °C eingefroren. Der Assay wurde gemäß den Angaben des Herstellers (Phoenix Pharmaceuticals, Bradykinin Fluorescent EIA Kit,

FEK-009-01) durchgeführt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 355 nm (Exzitation) und 460 nm (Emission) (Fluoroskan Ascent).

#### 3.3.11.2 Bestimmung der sICAM-1-Konzentration

Zur Bestimmung der Konzentration von löslichem ICAM-1 (sICAM-1) im Plasma wurde Mäusen 3 d nach Traumainduktion Blut mit heparinisierten Kanülen entnommen<sup>124</sup>. Nach Zentrifugation für 20 min bei 4 °C wurde der Überstand bei -20 °C in Aliquots zu 50 µl eingefroren. Plasma-Proben wurden zur Durchführung des Assays in einer 50-fachen Verdünnung eingesetzt. Die weitere Durchführung des Assays erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (R&D Systems, Quantikine® ELISA mouse ICAM-1 [MIC100]). Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen (MultiskanEX).

#### 3.3.11.3 Bestimmung der IL-1β- und CCL2-Konzentration

Die Konzentrationen von IL-1β sowie CCL2 wurden im Hirngewebe 12 h und 24 h nach Traumainduktion bestimmt. Hierfür wurden die Gehirne entnommen und die verletzten Hemisphären bei -20 °C eingefroren. Nach dem Wiederauftauen wurden die Hirnhälften gewogen und mit einer entsprechenden Menge Extraktionspuffer versetzt (1 ml pro 100 mg Gewebe). Nach Ultraschall-Homogenisierung wurden die Proben bei 4 °C 2 h lang geschüttelt und im Anschluss bei ebenfalls 4 °C für 20 min zentrifugiert. Die Überstände wurden aliquotiert und bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert. Die Durchführung der Assays erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (R&D Systems, Quantikine® ELISA mouse CCL2 [MJE00] und IL-1β [MLB00C]). Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen (MultiskanEX).

### 3.4 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM (*standard error of the mean*, Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Ausnahme hiervon sind die Ergebnisse des NSS, die als Scatter Plots abgebildet sind. Zur statistischen Auswertung wurde PrismGraph 5.0 (GraphPad Software, Inc.) verwendet. Die Daten wurden auf Normalverteilung mit dem D'Agostino-Pearson-Test geprüft und im Anschluss mit Zweistichproben-t-Test oder einfaktorieller, bzw. zweifaktorieller ANOVA (*analysis of variance*, Varianzanalyse), gefolgt von dem Bonferroni Post-hoc-Test, analysiert. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet.

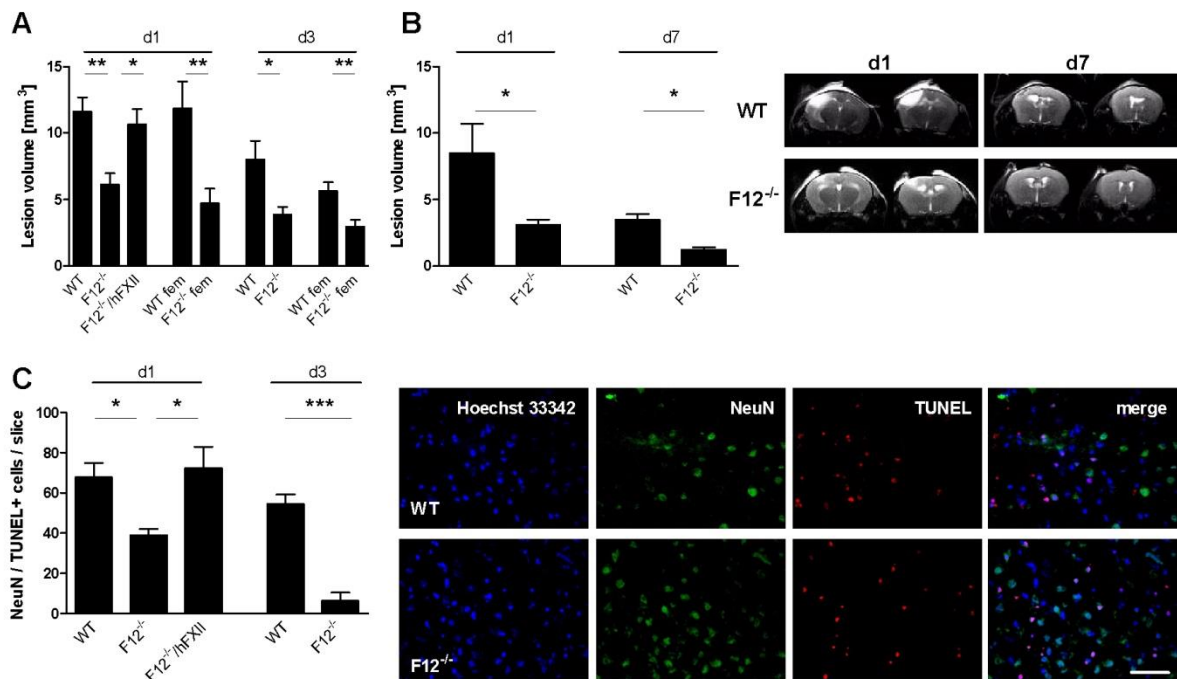
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Funktionelles Outcome

#### 4.1.1 Untersuchungen zur FXII-Defizienz im kortikalen Kälteläsionsmodell

Mit dem Kälteläsionsmodell können mit sehr hoher Reproduzierbarkeit fokale kortikale Läsionen erzeugt werden. Diese sind durch einen sofortigen Zusammenbruch der BHS und eine massive Infiltration von Immunzellen gekennzeichnet<sup>112</sup>. Diese sekundären Schadensprozesse, die auch im klinischen SHT auftreten, lassen sich sowohl im Zentrum der Läsion als auch im umgebenden Gewebe feststellen<sup>125</sup>.

Zunächst wurde an Tag 1 und 3 nach kortikaler Kälteläsion der Einfluss der FXII-Defizienz auf die Läsionsgröße und neurodegenerative Prozesse bestimmt. Männliche Mäuse mit genetisch bedingter FXII-Defizienz ( $F12^{-/-}$ ) zeigten nach Färbung mit TTC signifikant kleinere Läsionsvolumina im Vergleich mit Wildtyp-Tieren (WT) und  $F12^{-/-}$ -Tieren, denen humanes FXII intravenös zur funktionellen Rekonstitution vor Traumainduktion injiziert wurde ( $F12^{-/-}/hFXII$ ) (Läsionsvolumina in  $\text{mm}^3$ :  $11,6 \pm 1,1$  in WT und  $10,7 \pm 1,1$  in  $F12^{-/-}/hFXII$  gegenüber  $6,1 \pm 0,9$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren,  $P < 0,01$  und  $P < 0,05$ , Abb. 4-1A). Die Auswertung an Tag 3 nach Trauma zeigte ebenfalls kleinere Läsionen in männlichen  $F12^{-/-}$ -Tieren (in  $\text{mm}^3$ :  $8,0 \pm 1,4$  in WT gegenüber  $3,9 \pm 1,4$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren,  $P < 0,05$ , Abb. 4-1A). Die Läsionsgröße wurde darüber hinaus auch in weiblichen WT-Tieren und  $F12^{-/-}$ -Mäusen nach 1 und 3 Tagen volumetrisch bestimmt, um mögliche geschlechtsspezifische Effekte erkennen zu können. Auch hier fand sich ein protektiver Effekt zugunsten der FXII-Defizienz (in  $\text{mm}^3$ , Tag 1:  $11,9 \pm 2,0$  in WT gegenüber  $4,7 \pm 1,1$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren,  $P < 0,01$ ; Tag 3:  $5,6 \pm 0,6$  in WT gegenüber  $3,0 \pm 0,5$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren,  $P < 0,01$ , Abb. 4-1A). Die volumetrische Auswertung der koronaren T2-gewichteten MRT-Aufnahmen nach 1 und 7 Tagen bestätigte die Reduktion der Läsionsvolumina in  $F12^{-/-}$ -Tieren (Läsionsvolumina an Tag 7 in  $\text{mm}^3$ :  $3,5 \pm 0,4$  in WT gegenüber  $1,3 \pm 0,2$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren;  $P < 0,05$ ; Abb. 4-1B). Um Rückschlüsse auf den Grad der Neurodegeneration ziehen zu können, wurde im nächsten Schritt 1 und 3 Tage nach Traumainduktion die Anzahl der apoptotischen Neurone in der verletzten Hemisphäre erhoben.  $F12^{-/-}$ -Tiere zeigten ein geringeres Ausmaß an neuronalem Zelltod im Vergleich zu den Kontrollgruppen (apoptotische Neurone pro Hemisphäre, Tag 1:  $67,8 \pm 7,1$  in WT und  $72,3 \pm 10,7$  in  $F12^{-/-}/hFXII$  gegenüber  $38,9 \pm 3,1$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren,  $P < 0,01$  und  $P < 0,05$ ; Tag 3:  $54,6 \pm 4,6$  in WT gegenüber  $6,3 \pm 4,3$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren,  $P < 0,001$ ; Abb. 4-1C).



**Abbildung 4-1.** (A) Am 1. (d1) und am 3. Tag (d3) nach fokaler Traumainduktion wurden TTC-gefärbte Hirscheiben von männlichen Wildtyp-Mäusen (WT), *F12<sup>-/-</sup>*-Mäusen, mit hFXII rekonstituierten *F12<sup>-/-</sup>*-Mäusen (*F12<sup>-/-</sup>/hFXII*), weiblichen Wildtyp-Mäusen (WT fem) und weiblichen *F12<sup>-/-</sup>*-Mäusen (*F12<sup>-/-</sup> fem*) volumetrisch ausgewertet. Männliche und weibliche *F12<sup>-/-</sup>*-Mäuse zeigen signifikant kleinere Läsionsvolumina im Vergleich mit Wildtyp-Tieren. Der protektive Effekt der FXII-Defizienz kann durch Rekonstitution mit hFXII wieder umgekehrt werden (n = 7 pro Gruppe, \*\*P<0,01, \*P<0,05). (B) Koronare T2-gewichtete MRT-Aufnahmen zeigen hyperintense Areale (Läsionsareale) an d1 und d7 nach Traumainduktion in WT- und *F12<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Die Abbildung auf der rechten Seite zeigt je zwei repräsentative Hirschnitte pro Gruppe und Zeitpunkt. Die MRT-basierte Volumetrie (links) bestätigt kleinere Läsionen in *F12<sup>-/-</sup>*-Mäusen (n = 8 bis 9 pro Gruppe, \*P<0,05). (C) Die Anzahl TUNEL-positiver Neurone pro Hirschnitt wurde in den verletzten Hemisphären an d1 und d3 bestimmt. Die Zahl der apoptotischen Neurone ist bei *F12<sup>-/-</sup>*-Mäusen signifikant reduziert im Vergleich zu WT-Tieren. Rechts: Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbung (blau = Zellkerne, Hoechst 33342, grün = NeuN, rot = TUNEL-positive Zellen, Maßstab = 50 µm; n = 4 pro Gruppe, \*\*\*P<0,001, \*P<0,05).

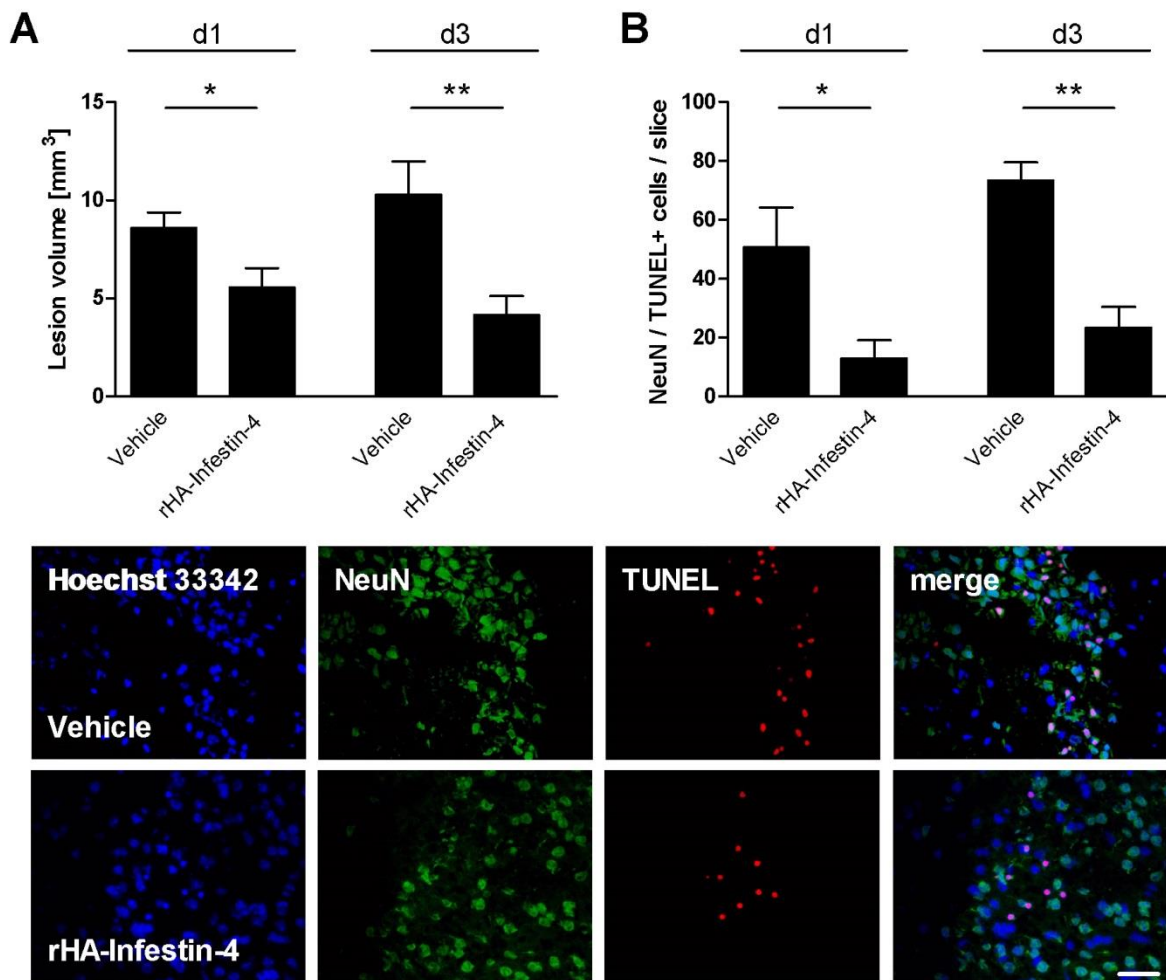
#### 4.1.2 Pharmakologische Hemmung des FXIIa im kortikalen Kälteläsionsmodell

Da sich genetische FXII-Defizienz vorteilhaft auf Mäuse nach SHT auswirkt, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, inwiefern die selektive pharmakologische Inhibition des aktivierten FXII (FXIIa) mit Infestin ähnliche Erfolge zeigt. Infestin wurde in dieser Arbeit in allen Experimenten 1 h nach Trauma-Induktion verabreicht und somit in einem therapeutisch relevanten Zeitfenster getestet.

Auch nach pharmakologischer FXIIa-Inhibition konnte in Mäusen mit SHT nach 1 und 3 Tagen eine signifikante Reduktion der Läsionsvolumina im Vergleich zur Behandlung mit Kochsalzlösung (Vehicle) festgestellt werden (Läsionsvolumina in mm<sup>3</sup>, Tag 1: 8,6 ± 0,8 in Vehicle- gegenüber 5,6 ± 0,9 in Infestin-behandelten Tieren, P<0,05; Tag 3: 10,3 ± 1,7 in Vehicle- gegenüber 4,2 ± 0,9 in Infestin-behandelten Tieren, P<0,01, Abb. 4-2A). Gleiches



gilt bei Betrachtung der neurodegenerativen Prozesse in der verletzten Hemisphäre. Hier führte die Behandlung mit Infestin zu einer Verringerung der neuronalen Schädigung im Vergleich zu Tieren, die mit Kochsalzlösung behandelt wurden (apoptotische Neurone pro Hemisphäre, Tag 1:  $50,6 \pm 13,5$  in Vehicle- gegenüber  $12,9 \pm 6,3$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,05$ ; Tag 3:  $73,3 \pm 6,3$  in Vehicle- gegenüber  $23,3 \pm 7,1$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,01$ ; Abb. 4-2B). Bei beiden Parametern zeigte sich an Tag 3 ein deutlich stärker ausgeprägter protektiver Effekt.

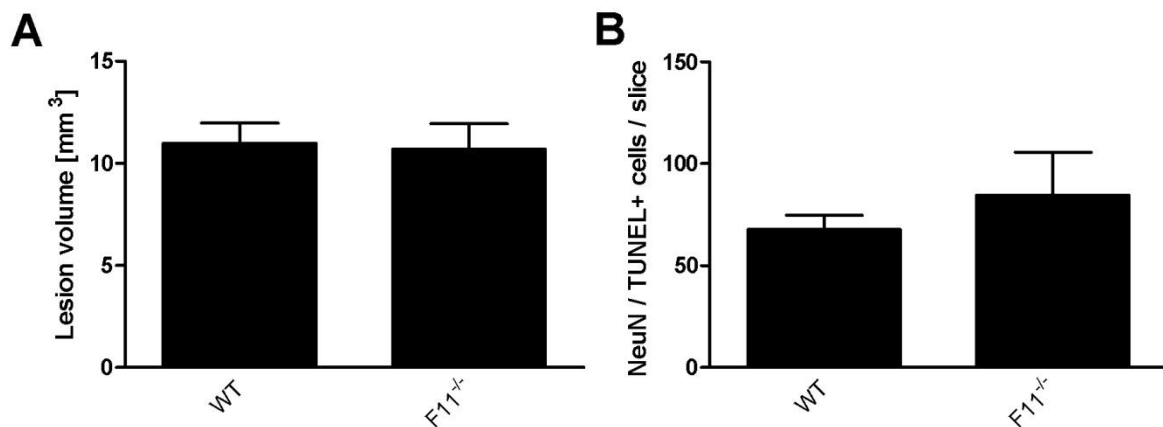


**Abbildung 4-2.** (A) Am 1. (d1) und am 3. Tag (d3) nach fokaler Traumainduktion wurden TTC-gefärbte Hirnscheiben von NaCl- (Vehicle) und rHA-Infestin-4-behandelten Mäusen volumetrisch ausgewertet. rHA-Infestin-4-behandelte Mäuse sind vor den Auswirkungen eines Traumas geschützt ( $n = 7$  pro Gruppe,  $**P < 0,01$ ,  $*P < 0,05$ ). (B) Die Anzahl der apoptotischen Neurone pro Hirnschnitt wurde in den verletzten Hemisphären an d1 und d3 bestimmt (Unten: Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbung; blau = Zellkerne, Hoechst 33342, grün = NeuN, rot = TUNEL-positive Zellen, Maßstab = 50  $\mu$ m). Es zeigen sich signifikant weniger apoptotische Neurone in rHA-Infestin-4-behandelten Tieren als in NaCl-behandelten Tieren ( $n = 4$  pro Gruppe,  $**P < 0,01$ ,  $*P < 0,05$ ).

#### 4.1.3 Untersuchungen zur FXI-Defizienz im kortikalen Kälteläsionsmodell

Da FXI das primäre Substrat von aktiviertem FXII innerhalb der intrinsischen plasmatischen Gerinnungskaskade ist, wurden auch  $F11^{-/-}$ -Mäuse in Hinblick auf die Läsionsgröße und den Grad der Neurodegeneration phänotypisiert.

Die TTC-Färbungen der entnommenen Hirne zeigten keine Unterschiede in den Läsionsgrößen zwischen den getesteten Tiergruppen (Läsionsvolumina in  $\text{mm}^3$ :  $10,9 \pm 1,0$  in WT gegenüber  $10,7 \pm 1,2$  in  $F11^{-/-}$ -Tieren, Abb. 4-3A). Statistisch signifikante Unterschiede konnten auch bezüglich des neuronalen Zelltodes nicht beobachtet werden (apoptotische Neurone pro Hemisphäre:  $67,8 \pm 7,1$  in WT gegenüber  $84,5 \pm 21,2$  in  $F11^{-/-}$ -Tieren, Abb. 4-3B).



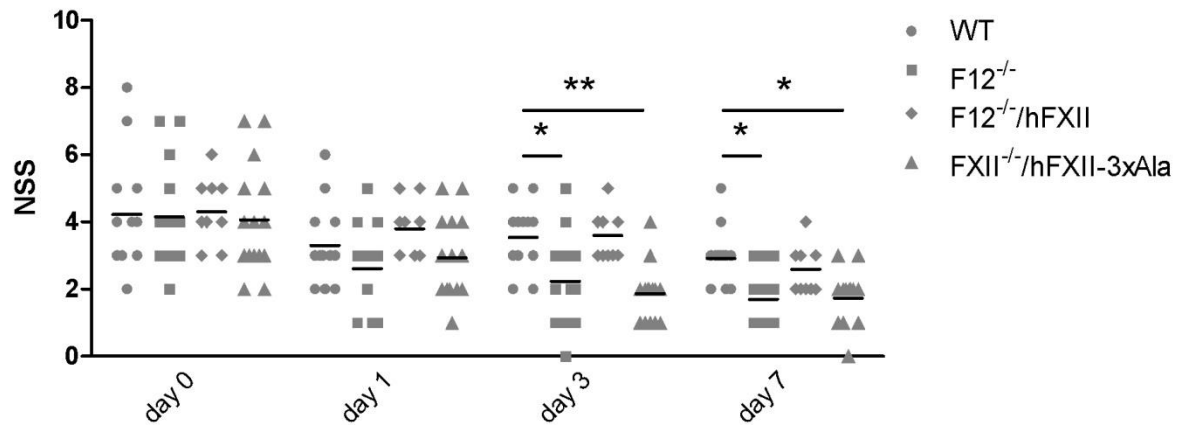
**Abbildung 4-3.** (A) Am 1. Tag nach fokaler Traumainduktion wurden TTC-gefärbte Hirschnitten von Wildtyp-Mäusen (WT) und  $F11^{-/-}$ -Mäusen volumetrisch ausgewertet ( $n = 9$  pro Gruppe). (B) Die Anzahl der apoptotischen Neurone pro Hirschnitt wurde in den verletzten Hemisphären am 1. Tag bestimmt ( $n = 4$  pro Gruppe).

#### 4.1.4 Untersuchungen zur FXII(a)-Defizienz und Inhibition im *weight-drop*-Modell

Da das kortikale Kälteläsionsmodell vor allem zur Modellierung der Blut-Hirn-Schranken-Integrität und der Immunzell-Infiltration geeignet ist und ein eher artifizielles Modell darstellt, wurde ein zweites Traumamodell verwendet. Im *weight-drop*-Modell, welches der klinischen Situation nach Trauma ähnelt, besteht die Möglichkeit, die Belastung und den Schweregrad der Verletzung durch ein Bewertungssystem (*Neurological Severity Score* [NSS]) abzuschätzen, das die motorische Funktion und das Verhalten einbezieht.

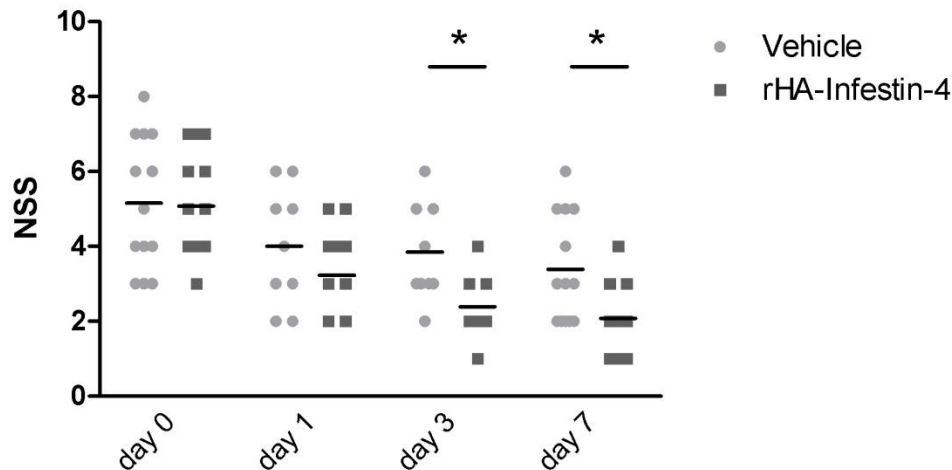
In den frühen Stadien nach SHT (1 h und 1 Tag nach Traumainduktion) zeigten alle Tiere ähnliche Schweregrade im NSS. Die Erhebung des NSS an Tag 3 und 7 ergab, dass sich die Tiere mit FXII-Defizienz signifikant besser erholten als die Tiere der Kontrollgruppen (Median

NSS [25. Perzentile, 75. Perzentile], Tag 3: 4,0 [3,0; 4,0] in WT und 3,5 [3,0; 4,0] in  $F12^{-/-}$ /hFXII gegenüber 2,0 [1,0; 3,0] in  $F12^{-/-}$ -Tieren und 2,0 [1,0; 1,0] in  $F12^{-/-}$ /hFXII-3xAla,  $P < 0,05$ ; Tag 7: 3,0 [2,0; 3,0] in WT und 2,5 [2,0; 3,0] in  $F12^{-/-}$ /hFXII gegenüber 1,0 [1,0; 2,0] in  $F12^{-/-}$ -Tieren und 2,0 [1,0; 1,0] in  $F12^{-/-}$ /hFXII-3xAla,  $P < 0,05$ , Abb. 4-4, Daten erhoben von Dr. Christiane Albert-Weißberger).



**Abbildung 4-4.**  $F12^{-/-}$ -Mäuse zeigten einen signifikant geringeren Neurological Severity Score (NSS) als Wildtyp-Mäuse (WT), FXII-rekonstituierte Mäuse ( $F12^{-/-}$ /hFXII) und Mäuse nach Rekonstitution mit modifizierten FXII ( $F12^{-/-}$ /hFXII-3xAla) nach 3 (d3) und 7 Tagen (d7) nach diffusem Trauma. Eine Stunde (d0) und einen Tag (d1) nach Trauma zeigten die Tiere ähnliche neurologische Defizite (n = 10 bis 13 pro Gruppe, \* $P < 0,05$ ).

Analog zur genetischen Defizienz führte auch die pharmakologische Hemmung des FXIIa mit Infestin zu einem verbesserten Allgemeinzustand der Tiere 3 und 7 Tage nach Trauma (Median NSS [25. Perzentile, 75. Perzentile], Tag 3: 3,0 [3,0; 3,0] in Vehicle- gegenüber 2,0 [2,0; 3,0] in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,05$ ; Tag 7: 3,0 [2,0; 5,0] in Vehicle- gegenüber 2,0 [1,5; 2,5] in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,05$ , Abb. 4-5). Ausgehend von einer gleichen Schwere des Traumas erholten sich die behandelten Tiere signifikant besser als die Kontrolltiere.



**Abbildung 4-5.** Mäuse, die mit rHA-Infestin-4 behandelt wurden zeigten einen signifikant niedrigeren Neurological Severity Score (NSS) als NaCl-behandelte Tiere (Vehicle) am 3. (d3) und am 7. Tag (d7) nach Trauma. Eine Stunde (d0) und einen Tag (d1) nach Traumainduktion zeigten die Tiere ähnliche neurologische Defizite (n = 13 pro Gruppe, \*P<0,05).

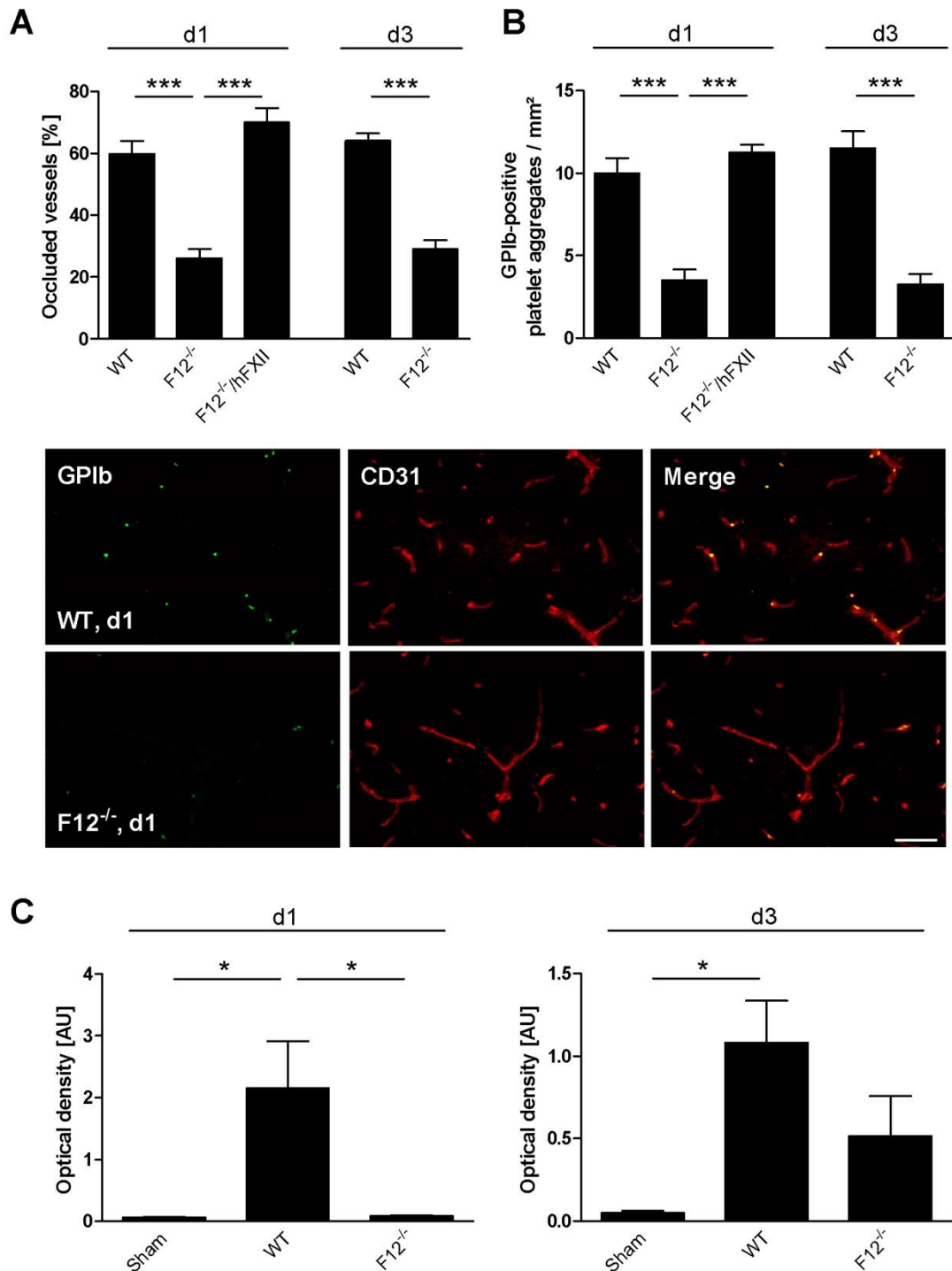
## 4.2 Thrombotische Prozesse als pathophysiologisches Merkmal nach SHT

### 4.2.1 Untersuchungen zur FXII-Defizienz im kortikalen Kälteläsionsmodell

Wie einleitend bereits ausgeführt ist FXII essentiell an der Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade beteiligt und trägt so zur Bildung und Stabilisierung von Thromben bei. Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um die Rolle des FXII und der thrombotischen Prozesse nach SHT zu untersuchen.

Die Erhebung des Thrombose-Indexes zur Bestimmung des Anteils der verschlossenen Gefäße in der verletzten Hemisphäre ergab, dass  $F12^{-/-}$ -Tiere einen signifikant verringerten Anteil an thrombotischen Gefäßen aufwiesen als die entsprechenden Kontrolltiere. Dieser Effekt wurde sowohl am 1. als auch am 3. Tag nach Trauma beobachtet (Thrombose-Index in %, Tag 1:  $59,9 \pm 4,1$  in WT und  $69,9 \pm 4,7$  in  $F12^{-/-}/hFXII$  gegenüber  $29,1 \pm 2,9$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren,  $P < 0,001$ ; Tag 3:  $64,0 \pm 2,4$  in WT gegenüber  $28,9 \pm 3,1$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren,  $P < 0,001$ ; Abb. 4-6A). Immunfluoreszenz-Färbungen gegen das thrombozytäre Oberflächenprotein Glykoprotein Ib (GPIb) und anschließende Quantifizierung der intravaskulären GPIb-positiven Thrombozytenaggregate im Läsionsareal zeigten ebenfalls eine verringerte Anzahl thrombotischer Gefäßen (GPIb-positive Thrombozytenaggregate pro  $mm^2$ , Tag 1:  $10,0 \pm 0,9$  in WT und  $11,3 \pm 0,5$  in  $F12^{-/-}/hFXII$  gegenüber  $3,5 \pm 0,7$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren,  $P < 0,001$ ; Tag 3:  $11,5 \pm 1,0$  in WT gegenüber  $3,3 \pm 0,6$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren,  $P < 0,001$ , Abb. 4-6B). Die Western Blot-Analyse der verletzten Cortices ergab darüber hinaus eine verringerte Proteinmenge an GPIb im Hirngewebe von  $F12^{-/-}$ -Tieren, die am 1. Tag nach Trauma etwa auf dem Niveau der

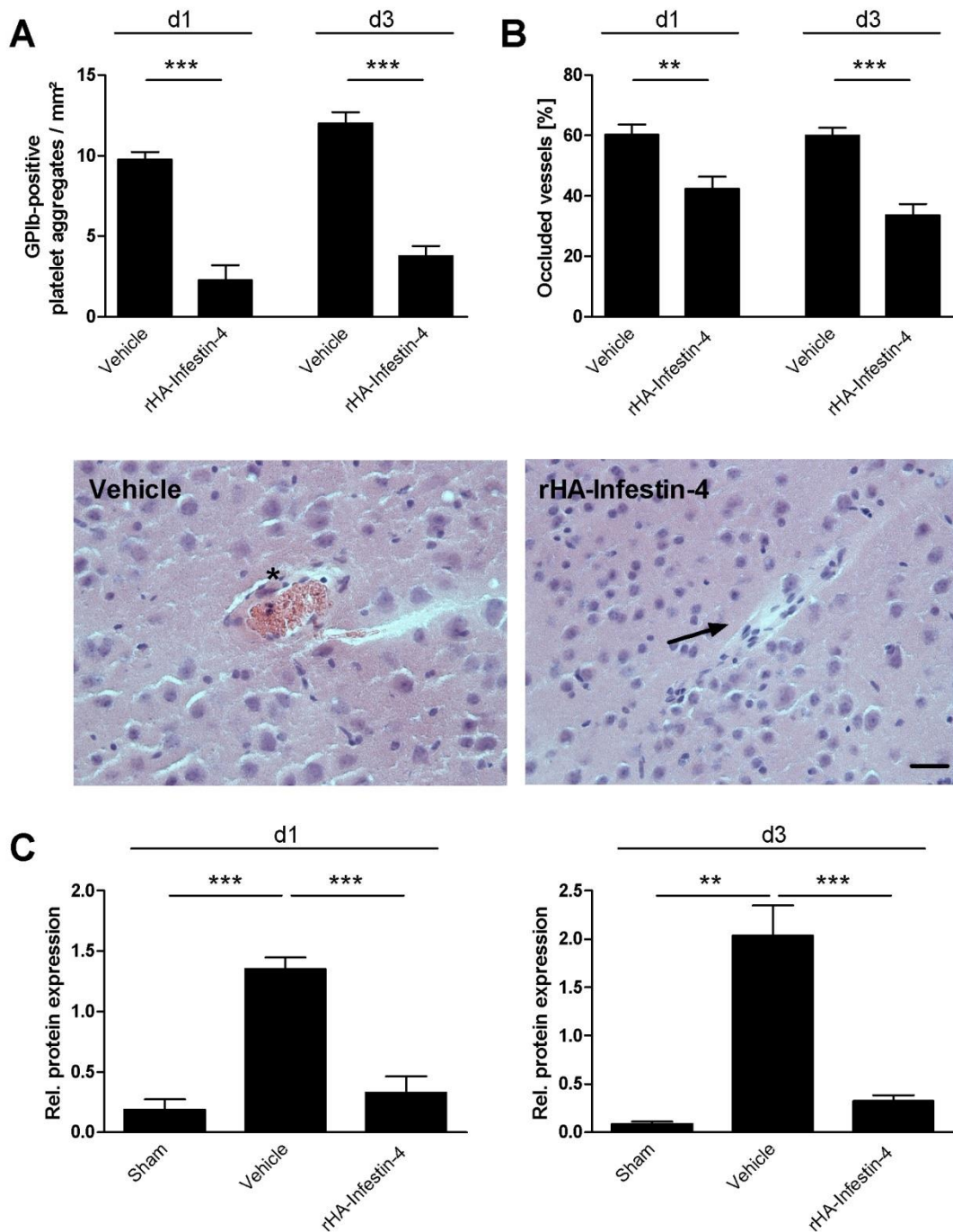
scheinoperierten Tiere lag (relative Proteinkonzentration, Tag 1:  $2,16 \pm 0,76$  in WT gegenüber  $0,08 \pm 0,02$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren und  $0,06 \pm 0,01$  in Sham,  $P < 0,05$ ; Tag 3:  $1,08 \pm 0,25$  in WT gegenüber  $0,51 \pm 0,24$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren und  $0,05 \pm 0,01$  in Sham,  $P < 0,05$ , Abb. 4-6C).



**Abbildung 4-6.** (A) Die Auswertung des Thrombose-Indexes zeigt eine verringerte Anzahl an thrombotischen Gefäßen in  $F12^{-/-}$ -Mäusen ( $n = 5$  pro Gruppe,  $***P < 0,001$ ). (B) Die Immunfluoreszenz-Färbung mit GPIb- und CD31-Antikörpern zeigt eine Reduktion der intravaskulären Thrombozytenakkumulation in  $F12^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich mit WT-Mäusen und  $F12^{-/+}$ /hFXII-Mäusen. Unten: Repräsentative Färbungen der Gruppen am 1. Tag ( $n = 4$  pro Gruppe,  $***P < 0,001$ , Maßstab =  $50 \mu\text{m}$ ). (C) Die Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen GPIb bestätigt, dass Thrombozytenakkumulationen an Tag 1 (d1) und 3 (d3) in einem geringeren Ausmaß auftreten als in WT- oder scheinoperierten Tieren (Sham). Die Banden wurden densitometrisch im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin ausgewertet (Blots siehe Abb. 7-1 und 7-2;  $n = 5$  pro Gruppe,  $*P < 0,05$ ; AU = arbitrary units).

#### 4.2.2 Pharmakologische Hemmung des FXIIa im kortikalen Kälteläsionsmodell

Die intravenöse Gabe von Infestin resultierte ebenso wie die genetische FXII-Defizienz in einer verminderten Thrombenbildung im Mikrogefäßsystem. Die Erhebung des Thrombose-Indexes ergab eine hochsignifikante Reduktion des Anteils der verschlossenen Gefäße in der verletzten Hemisphäre bei Tieren, die mit Infestin behandelt wurden. Wie bei der genetischen FXII-Defizienz konnte hier der Effekt ebenfalls nach 1 und 3 Tagen nachgewiesen werden (Thrombose-Index in %, Tag 1:  $60,3 \pm 3,4$  in Vehicle- gegenüber  $42,3 \pm 4,1$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,01$ ; Tag 3:  $59,9 \pm 2,6$  in Vehicle- gegenüber  $33,7 \pm 3,7$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,001$ , Abb. 4-7B). Die immunhistochemische Analyse der GPIIb-positiven Thrombozyten in den zerebralen Gefäßen zeigte eine Abnahme der Thrombozytenaggregate nach Hemmung der FXIIa-Aktivität (GPIIb-positive Thrombozytenaggregate pro  $\text{mm}^2$ , Tag 1:  $9,8 \pm 0,5$  in Vehicle- gegenüber  $2,3 \pm 0,9$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,001$ ; Tag 3:  $12,0 \pm 0,7$  in Vehicle- gegenüber  $3,8 \pm 0,6$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,001$ , Abb. 4-7A). Darüber hinaus führte die pharmakologische Inhibition an Tag 1 und Tag 3 nach Trauma zu einer signifikant verringerten Proteinmenge von GPIIb im verletzten Hirngewebe von Infestin-behandelten Tieren (relative Proteinkonzentration, Tag 1:  $1,35 \pm 0,09$  in Vehicle- gegenüber  $0,33 \pm 0,13$  in Infestin-behandelten Tieren und  $0,19 \pm 0,09$  in Sham,  $P < 0,001$ ; Tag 3:  $2,03 \pm 0,32$  in Vehicle- gegenüber  $0,33 \pm 0,06$  in Infestin-behandelten Tieren und  $0,09 \pm 0,06$  in Sham,  $P < 0,001$ ,  $P < 0,01$ , Abb. 4-7C).

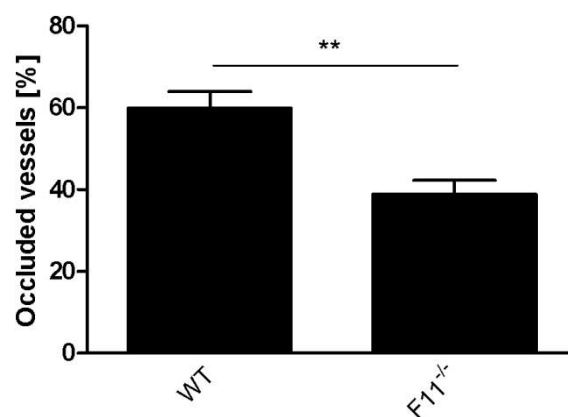


**Abbildung 4-7.** (A) Die Analyse der Immunfluoreszenz-Färbung mit GPIIb- und CD31-Antikörpern zeigt die Reduktion der intravaskulären Thrombozytenakkumulation in rHA-Infestin-4-behandelten Mäusen ( $n = 4$  pro Gruppe,  $***P < 0,001$ ). (B) Verschlussene Gefäße treten häufiger in NaCl-behandelten Tieren (Vehicle) auf als in Tieren, die mit rHA-Infestin-4 behandelt wurden, wie durch den Thrombose-Index am 1. (d1) und am 3. Tag (d3) gezeigt wird. Unten: Repräsentative H&E-Färbungen mit je einem Beispiel für ein verschlossenes (Stern) und ein offenes Gefäß (Pfeil) ( $n = 4$  pro Gruppe,  $***P < 0,001$ ,  $**P < 0,01$ , Maßstab =  $50\mu\text{m}$ ). (C) Die Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen GPIIb bestätigt, dass Thrombozytenakkumulationen in einem geringeren Ausmaß auftreten als in NaCl-behandelten oder scheinoperierten Tieren (Sham). Die Banden wurden densitometrisch im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin ausgewertet (Blots siehe Abb. 7-3 und 7-4;  $n = 5$  pro Gruppe,  $***P < 0,001$ ,  $**P < 0,01$ ; AU = arbitrary units).



#### 4.2.3 Untersuchungen zur FXI-Defizienz im kortikalen Kälteläsionsmodell

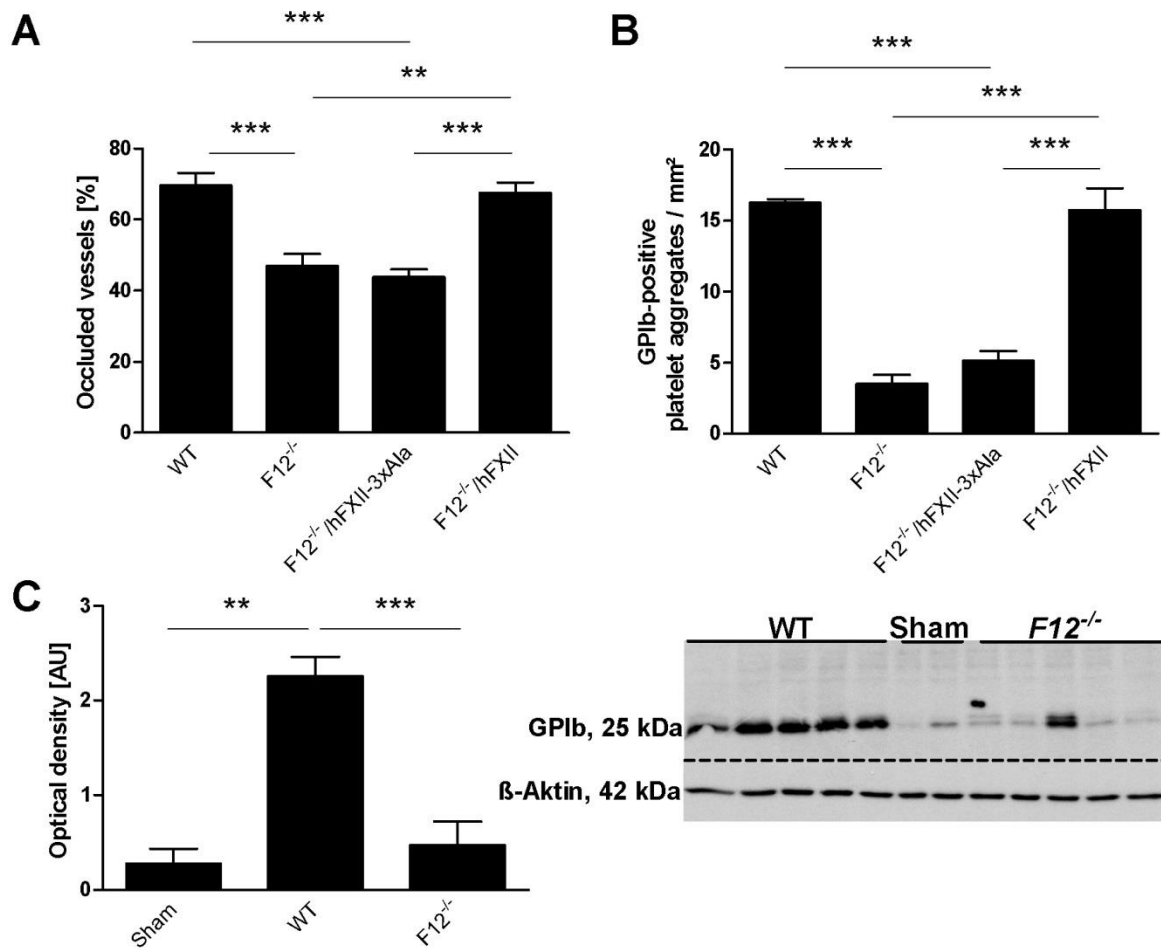
Um zu überprüfen, ob das intrinsische Gerinnungssystem und nicht andere, durch FXII aktivierte Signalkaskaden (z.B. die Komplementaktivierung), für die Thrombenbildung nach SHT verantwortlich sind, wurde der Einfluss der FXI-Defizienz auf thrombotische Ereignisse untersucht. Tatsächlich führte die Defizienz von FXI im gleichen Maße wie die Defizienz von FXII zu einer Reduktion thrombotischer Ereignisse in den zerebralen Kapillargefäßen (Thrombose-Index in %:  $59,9 \pm 4,1$  in WT gegenüber  $38,9 \pm 3,4$  in  $F11^{-/-}$ -Tieren,  $P < 0,01$ , Abb. 4-8).



**Abbildung 4-8.** Die Berechnung des Thrombose-Indexes erfolgte anhand von H&E-gefärbten Hirnschnitten von Wildtyp-Mäusen (WT) und  $F11^{-/-}$ -Mäusen. Die Anzahl der thrombotischen Gefäße ist in  $F11^{-/-}$ -Mäusen am 1. Tag signifikant verringert ( $n = 5$  pro Gruppe,  $**P < 0,01$ ).

#### 4.2.4 Untersuchungen zur FXII(a)-Defizienz und Inhibition im weight-drop-Modell

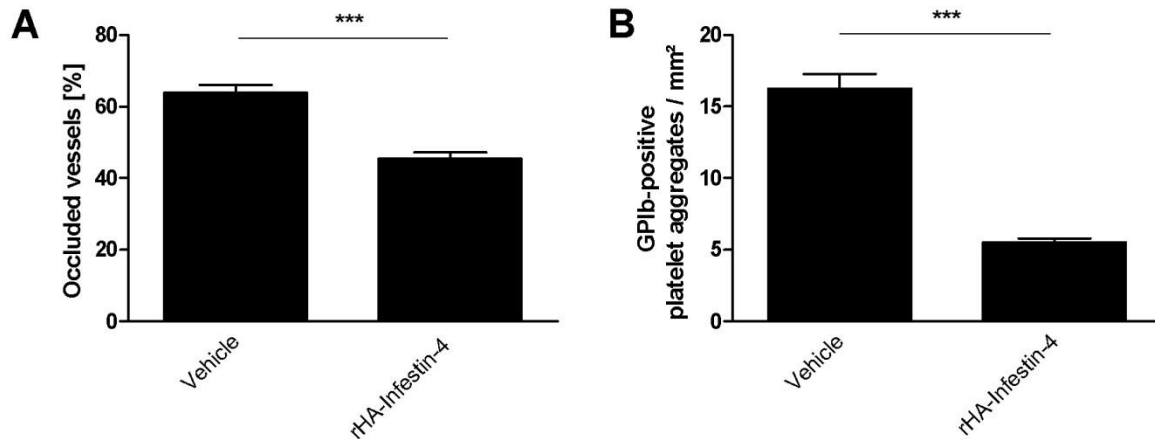
Das unter 4.1.4 gezeigte verbesserte Outcome an Tag 7 korrelierte mit einem verminderten Auftreten thrombotischer Ereignisse in den Gefäßen des Gehirns, wie durch die Erhebung des Thrombose-Indexes (Thrombose-Index in %:  $69,7 \pm 3,5$  in WT und  $67,6 \pm 2,8$  in  $F12^{-/-}/hFXII$  gegenüber  $47,0 \pm 3,3$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren und  $43,8 \pm 2,1$  in  $F12^{-/-}/hFXII-3xAla$ ,  $P < 0,001$ ,  $P < 0,01$ , Abb. 4-9A), der immunhistochemischen Auswertung der Thrombozytenakkumulationen in den Gefäßen (GPIIb-positive Thrombozytenaggregate pro  $mm^2$ :  $16,3 \pm 0,3$  in WT und  $15,8 \pm 1,5$  in  $F12^{-/-}/hFXII$  gegenüber  $3,5 \pm 0,6$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren und  $5,1 \pm 0,7$  in  $F12^{-/-}/hFXII-3xAla$ ,  $P < 0,001$ , Abb. 4-9B) sowie der Western Blot-Analyse des Gewebes (relative Proteinkonzentration GPIIb:  $2,26 \pm 0,20$  in WT gegenüber  $0,48 \pm 0,25$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren und  $0,28 \pm 0,15$  in Sham,  $P < 0,001$ ,  $P < 0,01$ , Abb. 4-9C) gezeigt werden konnte.



**Abbildung 4-9.** (A) Die Berechnung des Thrombose-Indexes erfolgte anhand von H&E-gefärbten Hirnschnitten von WT-Mäusen, F12<sup>-/-</sup>-Mäusen, F12<sup>-/-</sup>/hFXII-Mäusen und F12<sup>-/-</sup>/hFXII-3xAla-Mäusen (n = 5 pro Gruppe, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01). (B) Die Analyse der Immunfluoreszenz-Färbung mit GPIb- und CD31-Antikörpern zeigt die Reduktion der intravaskulären Thrombozytenakkumulation an d7 nach Trauma-induktion in F12<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich mit WT-, F12<sup>-/-</sup>/hFXII- und F12<sup>-/-</sup>/hFXII-3xAla-Mäusen (n = 4 pro Gruppe, \*\*\*P<0,001). (C) Die Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen GPIb bestätigt, dass Thrombozytenakkumulationen in einem geringeren Ausmaß auftreten als in WT oder scheinoperierten Tieren (Sham). Die Banden wurden densitometrisch im Verhältnis zu β-Aktin ausgewertet. Rechts: Repräsentativer Immunblot (n = 5 pro Gruppe, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01; AU = arbitrary units).

In den Infestin-behandelten Tieren konnte, verglichen mit den Kontroll-Tieren, nach 7 Tagen eine signifikant reduzierte Anzahl an verschlossenen Gefäßen in der verletzten Hemisphäre festgestellt werden (Thrombose-Index in %: 63,9 ± 2,2 in Vehicle- gegenüber 45,5 ± 1,8 in Infestin-behandelten Tieren, P<0,001, Abb. 4-10A). Zusätzlich dazu zeigte die immunhistochemische Färbung der GPIb-positiven Thrombozyten ein verringertes Ausmaß an Thrombozytenaggregaten in den Hirngefäßen (GPIb-positive Thrombozytenaggregate pro

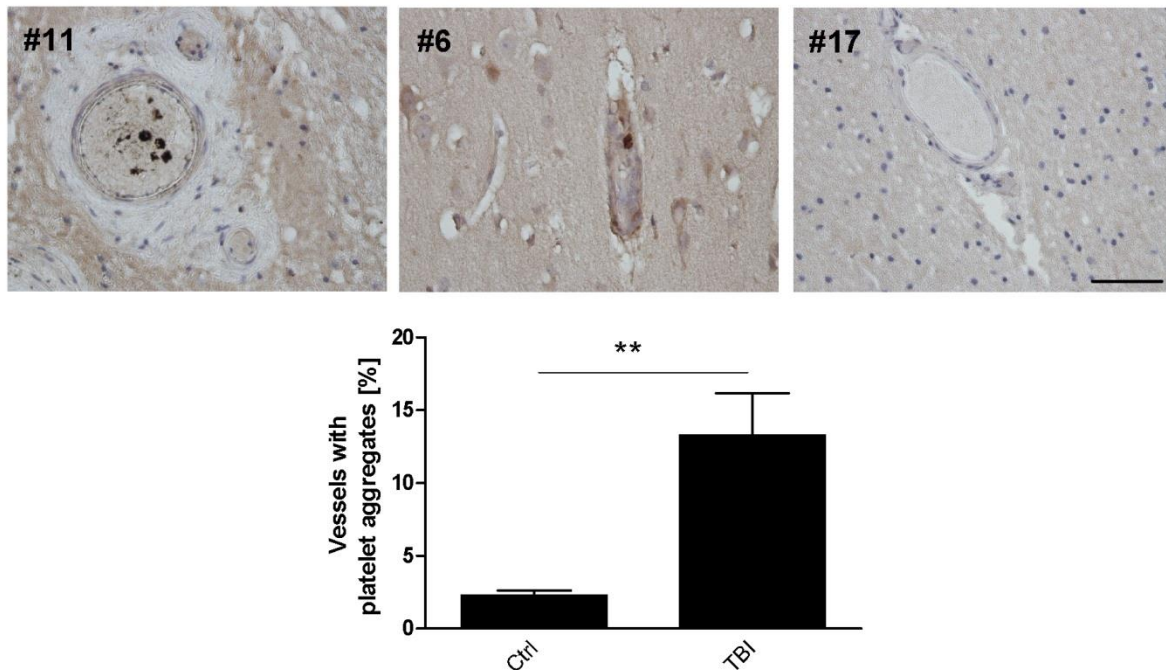
mm<sup>2</sup>:  $16,3 \pm 1,0$  in Vehicle- gegenüber  $5,5 \pm 0,3$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,001$ , Abb. 4-10B).



**Abbildung 4-10.** (A) Verschlussene Gefäße treten häufiger in NaCl-behandelten Tieren auf als in Tieren, die mit rHA-Infestin-4 behandelt wurden, wie durch den Thrombose-Index an d7 gezeigt wird. ( $n = 5$  pro Gruppe,  $***P < 0,001$ ). (B) Die Analyse der Immunfluoreszenz-Färbung mit GPIIb- und CD31-Antikörpern zeigt die Reduktion der intravaskulären Thrombozytenakkumulation an d7 nach Traumainduktion bei rHA-Infestin-4-behandelten Mäusen ( $n = 4$  pro Gruppe,  $***P < 0,001$ ).

#### 4.2.5 Thrombotische Prozesse als Pathomechanismus bei SHT-Patienten

Um zu verifizieren, ob die im Mausmodell gewonnenen Daten zur Entstehung thrombotischer Prozesse auch auf die klinische Situation übertragbar sind, wurden humane Gewebeproben untersucht. Insgesamt wurden von Kooperationspartnern der Arbeitsgruppen Kleinschnitz und Sirén (siehe 3.3.9.6) Hirnschnitte von 11 SHT-Patienten und 9 Kontrollpatienten zur Verfügung gestellt. Die quantitative Analyse der Färbungen gegen das thrombozytäre Oberflächenprotein GPIIb ergab in SHT-Patienten einen signifikanten Anstieg der Anzahl der Gefäße, in denen GPIIb-positive Thrombozytenablagerungen gefunden wurden gegenüber den Kontrollpatienten (Thrombose-Index in %:  $13,3 \pm 2,9$  in SHT-Patienten gegenüber  $2,3 \pm 0,4$  in Kontrollpatienten,  $P < 0,01$ , Abb. 4-11).

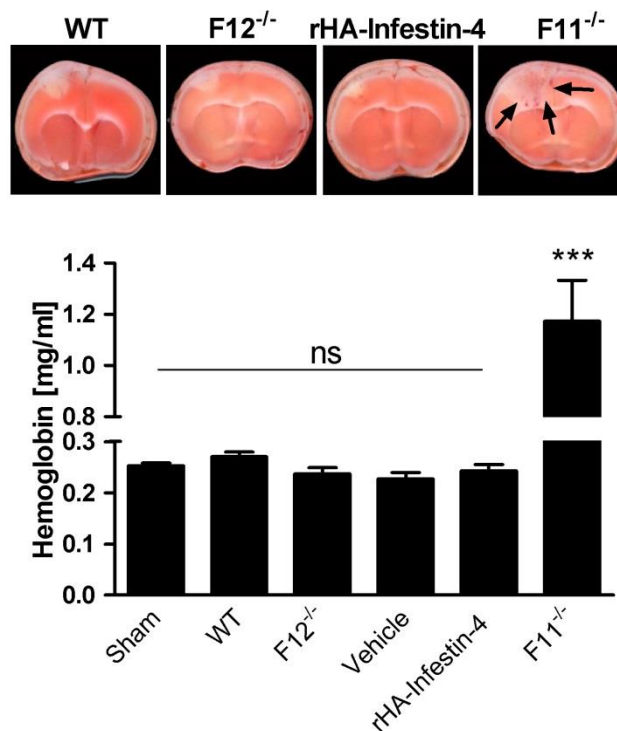


**Abbildung 4-11.** Oben: Repräsentative immunhistochemische Färbungen gegen GPIb im humanen Hirngewebe nach SHT (SHT-Fälle: #11 und #6, Kontrolle: #17, Maßstab = 100  $\mu$ m). Unten: Die quantitative Analyse zeigt eine signifikante Zunahme der Thrombozytenaggregate in den Gefäßen von Patienten mit SHT (n = 11) im Vergleich zu Kontrollpatienten (n = 9, \*\*P<0,01).

### 4.3 Untersuchungen zur intrazerebralen Blutungsneigung

#### 4.3.1 Auftreten von intrazerebralen Blutungen im kortikalen Kälteläsionsmodell

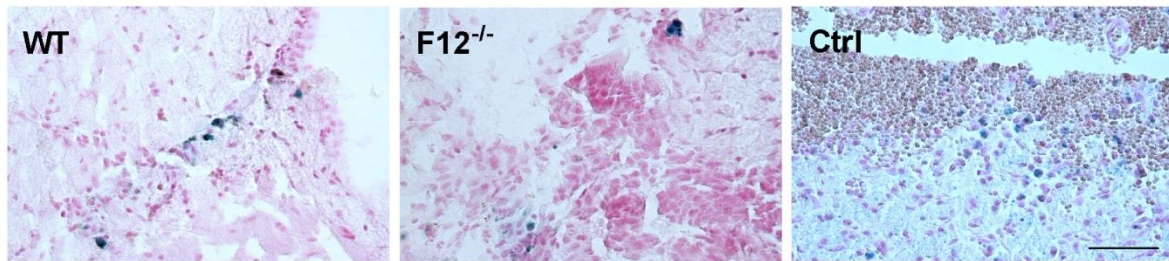
Um die Sicherheit der FXII-Inhibition im Hinblick auf intrazerebrale Blutungen zu überprüfen, wurde das Ausmaß der Blutungen mithilfe eines Hämoglobin-Assays bestimmt. Die Hämoglobin-Konzentration im Gewebe wurde hierbei gleichgesetzt mit der Blutmenge im Hirnparenchym. Der Vergleich zwischen *F12*<sup>-/-</sup>-Tieren, Infestin-behandelten Tieren und deren jeweiligen Kontrollgruppen ergab keinen Hinweis auf vermehrte intrazerebrale Blutungen nach Blockade von FXII. Im Gegensatz dazu war die Hämoglobin-Konzentration als Ausdruck einer vermehrten Blutungsneigung in den Gehirnen der FXI-defizienten Tiere nach Trauma deutlich erhöht (Hämoglobin-Konzentration in mg/ml: 0,25  $\pm$  0,01 in scheinoperierten Tieren, 0,27  $\pm$  0,01 in WT, 0,24  $\pm$  0,01 in *F12*<sup>-/-</sup>-Tieren, 0,23  $\pm$  0,01 in Vehicle- und 0,24  $\pm$  0,01 in Infestin-behandelten Mäusen gegenüber 1,17  $\pm$  0,16 in *F11*<sup>-/-</sup>-Tieren, P<0,001, Abb. 4-12). Diese erhöhte Blutungsneigung in *F11*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte auch nach makroskopischer Auswertung der mit TTC angefärbten Hirnscheiben bestätigt werden.



**Abbildung 4-12.** Oben: Repräsentative, mit TTC-gefärbte Hirnschnitte von Wildtyp-Mäusen (WT),  $F12^{-/-}$ -Mäusen, rHA-Infestin-4-behandelten Mäusen und  $F11^{-/-}$ -Mäusen am 1. Tag nach Trauma (Pfeile: intrazerebrale Blutung). Unten: Hämoglobin-Konzentration in den verletzten Hemisphären von scheinoperierten Mäusen (Sham), WT-Mäusen,  $F12^{-/-}$ -Mäusen, NaCl-behandelten Mäusen (Vehicle), rHA-Infestin-4-behandelten Mäusen und  $F11^{-/-}$ -Mäusen. Die Hämoglobin-Konzentrationen der Tiere mit FXII-Defizienz und -Inhibition bleiben auf dem gleichen Niveau wie die der scheinoperierten Tiere.  $F11^{-/-}$ -Mäuse zeigen signifikant erhöhte Hämoglobin-Werte ( $n = 4$  bis  $5$  pro Gruppe, ns = nicht signifikant,  $***P < 0,001$ ).

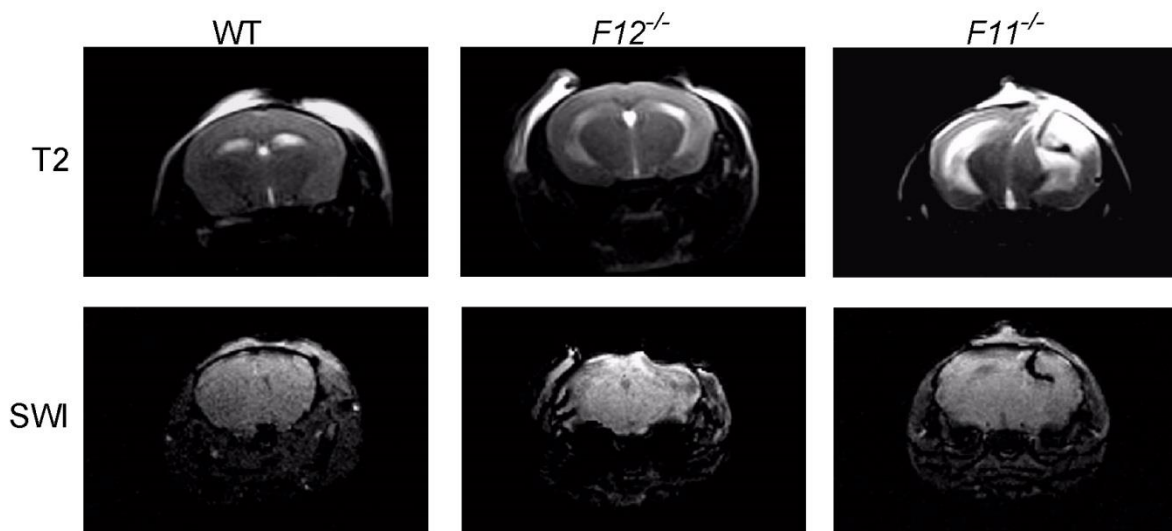
#### 4.3.2 Auftreten von intrazerebralen Blutungen im *weight-drop*-Modell

Um eine mögliche erhöhte intrazerebrale Blutungsneigung auch im *weight-drop*-Modell zu untersuchen, wurden Hirnschnitte von WT und  $F12^{-/-}$ -Tieren 7 Tage nach Trauma histologisch untersucht. Die „Berliner Blau-Reaktion“ ergab, dass sowohl in der WT-Gruppe als auch in FXII-defizienten Tieren jeweils bei einem Tier geringfügige intrazerebrale Blutungsherde vorhanden waren. Die Blutungshäufigkeit nach SHT war somit in FXII-defizienten Tieren in Vergleich zu Kontrolltieren nicht erhöht (Siderophagen pro Hemisphäre: 24 in WT gegenüber 28 in  $F12^{-/-}$ , Abb. 4-13). Als Positivkontrolle diente ein Gewebeschnitt eines Tieres, das nach experimentellem Schlaganfall eine massive Einblutung in das Gehirngewebe aufwies (Gewebe freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Melanie Dittmeier). Hier zeigten sich in den Randbereichen der Blutung zahlreiche Siderophagen am 7. Tag nach Schlaganfall.



**Abbildung 4-13.** Am 7. Tag nach Trauma-induktion finden sich in je einem WT und einem  $F12^{-/-}$ -Tier  $Fe^{3+}$ -beladene Siderophagen (Ctrl: Einblutung in das Gehirngewebe nach experimentellem Schlaganfall; n = 5, Maßstab = 20  $\mu$ m).

Anders stellte sich die Situation in FXI-defizienten Tieren nach Trauma-induktion dar. 48 % aller verwendeten  $F11^{-/-}$ -Tiere zeigten bei makroskopischer Analyse der TTC-gefärbten Hirnscheiben Blutungen unterschiedlichen Ausmaßes. Sowohl in WT-Kontrollen als auch in Tieren nach FXII-Inhibition variierte der prozentuale Anteil der Tiere mit Einblutungen in das Hirnparenchym zwischen 21 und 25 %. Zusätzlich zur makroskopischen Analyse zeigten MRT-Aufnahmen von 3  $F11^{-/-}$ -Tieren, dass bei 2 Tieren massive Blutungen auftraten. Im Gegensatz dazu wurden bei  $F12^{-/-}$ -Tieren und Wildtyp-Tieren keinerlei Blutungen gefunden (Abb. 4-14).



**Abbildung 4-14.** MRT-Aufnahmen 1 Tag nach Trauma-induktion (*weight-drop*-Modell). Oben: T2-gewichtete Sequenzen, unten: blutungssensitive SWI-Sequenzen der gleichen Tiere. In den SWI-Sequenzen werden akute Blutungen hypointens angezeigt. Während in den WT und  $F12^{-/-}$ -Tieren keine Blutungen gefunden wurden, kam es bei 2 von 3  $F11^{-/-}$ -Tieren zu massiven Einblutungen in das Hirngewebe.

4.4 Untersuchungen zur Blut-Hirn-Schrankenstörung und Inflammation

4.4.1 Untersuchungen zur FXII-Defizienz im kortikalen Kälteläsionsmodell

4.4.1.1 Blut-Hirn-Schranke und Hirnödem

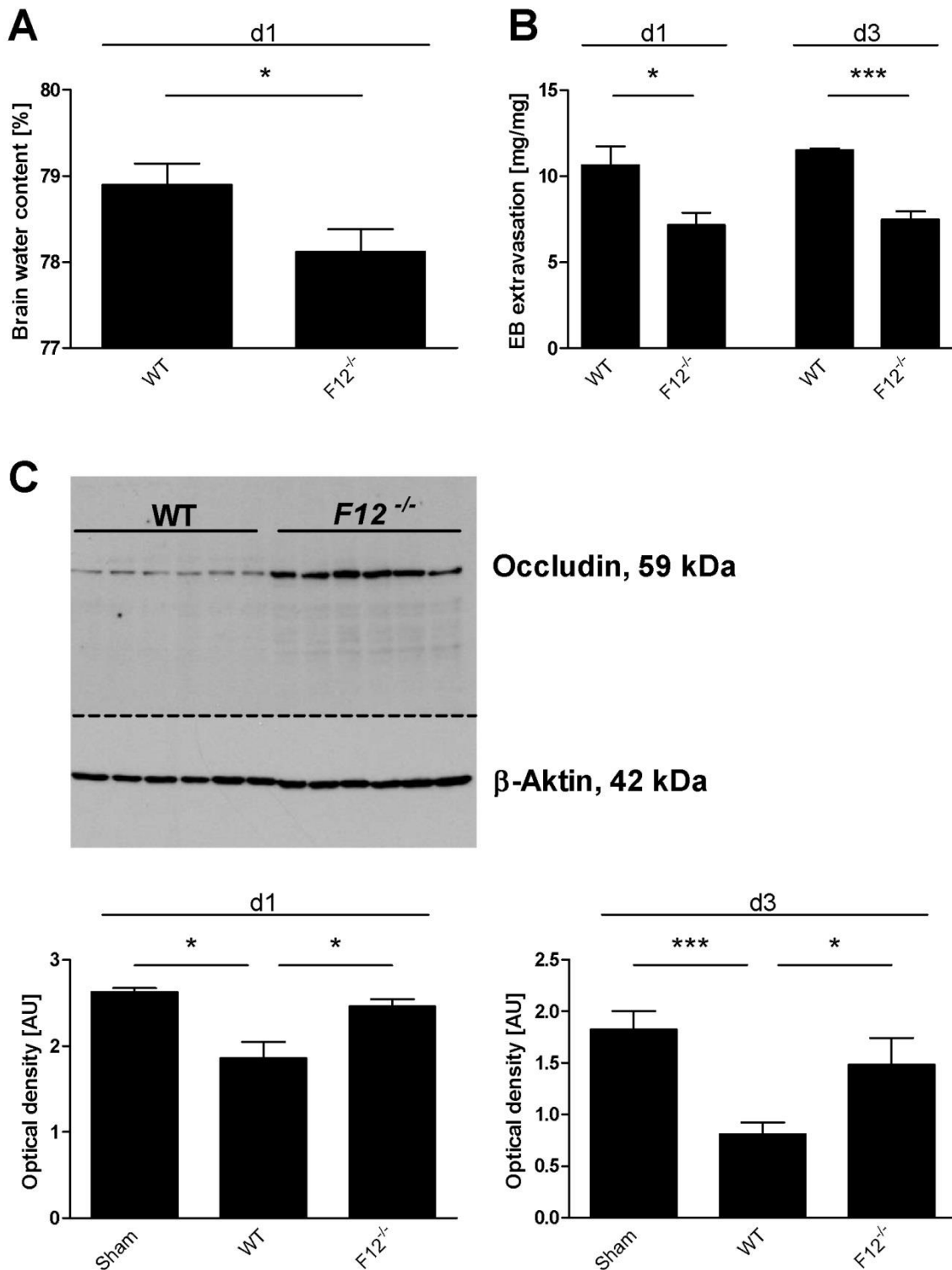
Kinine, wie beispielsweise Bradykinin, tragen erheblich zur Entwicklung von Ödemen nach Gewebsverletzungen bei. Über die Aktivierung des KKS induziert FXII die Generierung von Bradykinin. Daher wurde 2 h nach SHT die Bradykinin-Konzentration mittels ELISA im Plasma von scheinoperierten Tieren (Sham), WT-Mäusen und FXII-defizienten Mäusen gemessen. Die Messung ergab einen signifikanten Anstieg in WT-Mäusen im Vergleich zu  $F12^{-/-}$ -Tieren nach Trauma und zu scheinoperierten Tieren (Tab. 4-1)

Tabelle 4-1 – Plasma-Konzentration von Bradykinin

|                                    | Sham<br>n = 5 | WT<br>n = 5   | $F12^{-/-}$<br>n = 5 |
|------------------------------------|---------------|---------------|----------------------|
| Bradykininkonzentration<br>[pg/ml] | 2099 ± 273    | 6591 ± 1324 * | 1756 ± 766 #         |

\*P<0,05 Sham vs. WT; #P<0,05 WT vs.  $F12^{-/-}$

Weiterhin wurde der Wassergehalt im Gehirn als Parameter für die Hirnödem-Bildung untersucht. Hierbei ergab sich ein geringer, jedoch signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und FXII-defizienten Tieren (Wasseranteil im Gehirn in %: 78,9 ± 0,3 in WT gegenüber 78,1 ± 0,3 in  $F12^{-/-}$ -Tieren, P<0,05, Abb. 4-15A). Dieses Ergebnis wurde durch die Analyse der Blut-Hirn-Schranken Permeabilität mithilfe des Tracers Evans Blue bestätigt. Während intravenös injiziertes Evans Blue im gesunden Gewebe nicht die Blut-Hirn-Schranke überwindet, war eine deutlich erhöhte Evans Blue-Konzentration im Hirnparenchym von WT-Tieren nach Trauma zu finden, die wiederum in FXII-defizienten Mäusen verringert war (Evans Blue Extravasation in mg/mg Gewebe, Tag 1: 10,66 ± 1,07 in WT gegenüber 7,17 ± 0,72 in  $F12^{-/-}$ -Tieren, P<0,05; Tag 3: 11,52 ± 0,10 in WT gegenüber 7,48 ± 0,48 in  $F12^{-/-}$ -Tieren, P<0,001, Abb. 4-15B). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das *tight junction*-Protein Occludin in den geschädigten Cortices von WT-Tieren in deutlich verminderter Konzentration vorhanden war als bei scheinoperierten und FXII-defizienten Tieren, was für eine Degradation des Proteins im Gehirn nach Trauma spricht (relative Proteinkonzentration, Tag 1: 1,86 ± 0,19 in WT gegenüber 2,63 ± 0,05 in Sham und 2,46 ± 0,08 in  $F12^{-/-}$ -Tieren, P<0,05; Tag 3: 0,81 ± 0,11 in WT gegenüber 1,82 ± 0,18 in Sham und 1,49 ± 0,26 in  $F12^{-/-}$ -Tieren, P<0,001, P<0,05, Abb. 4-15C).

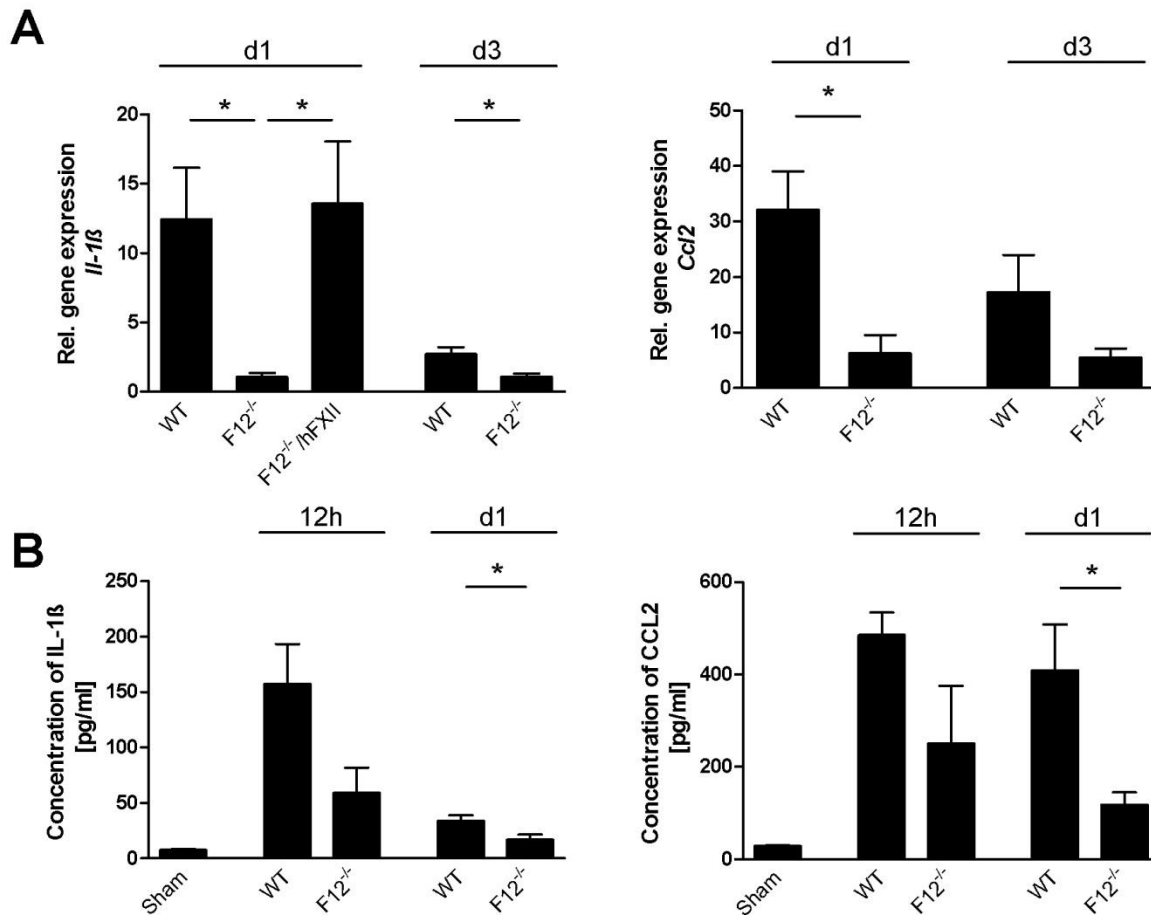


**Abbildung 4-15.** (A) Bestimmung des Wassergehalts am 1. Tag (d1) in der verletzten Hirnhemisphäre (n = 8 bis 9 pro Gruppe, \*P<0,05). (B) Die fluorimetrische Messung der Evans Blue-Extravasation in das Hirnparenchym am 1. (d1) und am 3. Tag (d3) zeigt eine reduzierte Schädigung der Blut-Hirn-Schranke in F12<sup>+/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren (n = 5 pro Gruppe, \*\*\*P<0,001, \*P < 0,05). (C) Quantifizierung des *tight junction*-Proteins Occludin durch Western Blot-Analyse am d1 und d3. Oben: Repräsentativer Immunblot am d1 (Blot von d3 siehe Abb. 7-5; n = 5 pro Gruppe, \*\*\*P<0,001, \*P<0,05, AU = arbitrary units).



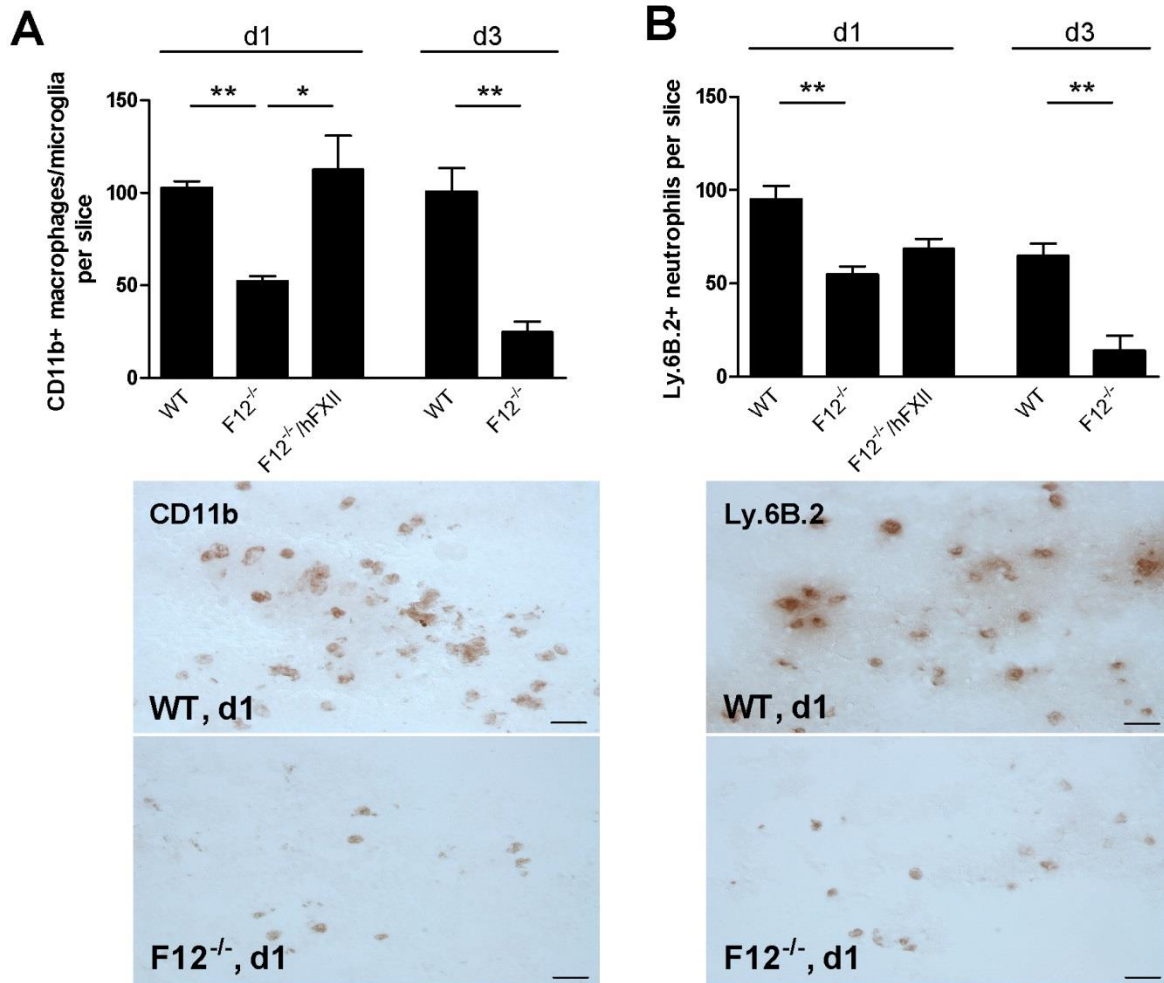
#### 4.4.1.2 Inflammation

Die Aktivierung der Bradykinin-Rezeptoren bewirkt die Freisetzung von Zytokinen, die an der Immunantwort beteiligt sind. Die Analyse der mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine *Il-1 $\beta$*  und *Ccl2* in den verletzten Cortices ergab eine deutliche Hochregulation in WT-Tieren und FXII-defizienten Tieren nach FXII-Substitution gegenüber den FXII-defizienten Tieren (relative Genexpression *Il-1 $\beta$* , Tag 1:  $12,4 \pm 3,7$  in WT und  $13,6 \pm 4,5$  in *F12<sup>-/-</sup>/hFXII* gegenüber  $1,0 \pm 0,3$  in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren,  $P < 0,05$ ; Tag 3:  $2,7 \pm 0,5$  in WT gegenüber  $1,1 \pm 0,2$  in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren,  $P < 0,05$ ; relative Genexpression *Ccl2*, Tag 1:  $32,1 \pm 7,0$  in WT gegenüber  $6,3 \pm 3,3$  in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren,  $P < 0,05$ ; Tag 3:  $17,2 \pm 6,8$  in WT gegenüber  $5,4 \pm 1,7$  in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren,  $P < 0,05$ ; Abb. 4-16A). Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration der genannten proinflammatorischen Zytokine im Hirngewebe mittels ELISA in scheinoperierten Tieren, WT-Tieren und *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren 12 und 24 h nach Trauma bestimmt. 24 h nach Trauma wurden im verletzten Hirngewebe FXII-defizienter Mäuse signifikant geringere Konzentrationen an IL-1 $\beta$  und CCL2 gemessen (Proteinkonzentration IL-1 $\beta$  in pg/ml, 12 h:  $157,2 \pm 36,1$  in WT gegenüber  $7,7 \pm 0,6$  in scheinoperierten Tieren (Sham) und  $59,2 \pm 22,6$  in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren, nicht signifikant; Tag 1:  $33,9 \pm 4,9$  in WT gegenüber  $16,9 \pm 4,3$  in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren,  $P < 0,05$ ; Proteinkonzentration CCL2 in pg/ml, 12 h:  $485,6 \pm 48,4$  in WT gegenüber  $28,0 \pm 1,5$  in scheinoperierten Tieren und  $250,1 \pm 124,6$  in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren, nicht signifikant; Tag 1:  $408,6 \pm 99,6$  in WT gegenüber  $117,0 \pm 28,0$  in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren,  $P < 0,05$ , Abb. 4-16B).



**Abbildung 4-16.** (A) Genexpression der proinflammatorischen Zytokine *Il-1β* (links) und *Ccl2* (rechts) in den verletzten Cortices von Wildtyp-Tieren (WT), *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren und mit hFXII rekonstituierten *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren (*F12<sup>-/-</sup>*/hFXII) am 1. (d1) und am 3. Tag (d3) nach Trauma-induktion (n = 5 pro Gruppe, \*P<0,05). (B) Proteinkonzentrationen 12 und 24 h nach Trauma im Hirngewebe von scheinoperierten Tieren (Sham), WT-Tieren und *F12<sup>-/-</sup>*-Mäusen (n = 5 pro Gruppe, \*P<0,05).

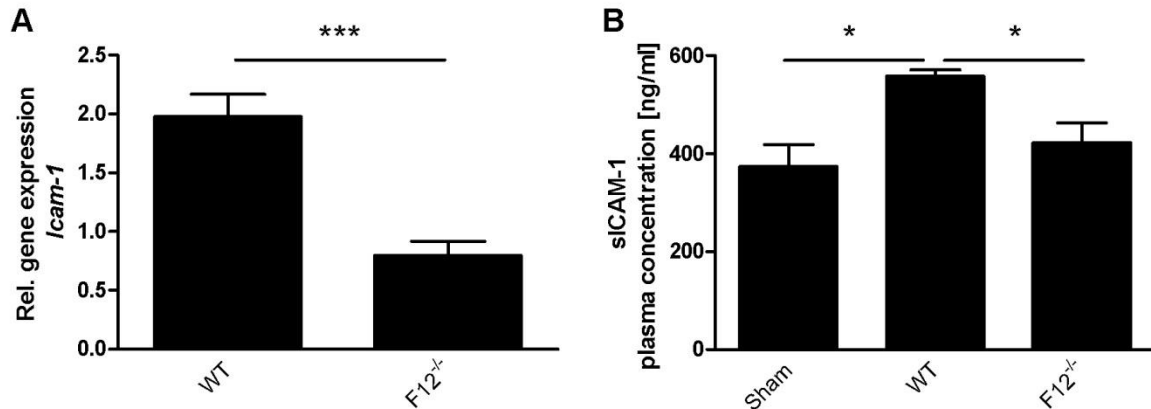
Immunhistochemisch fand sich eine signifikant höhere Anzahl an Immunzellen (Makrophagen / Mikroglia und neutrophile Granulozyten) im traumatisierten Gehirngewebe von WT-Tieren und rekonstituierten *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren im Gegensatz zu *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren ohne Rekonstitution (CD11b-positive Makrophagen / Mikroglia pro Hemisphäre, Tag 1:  $102,8 \pm 3,5$  in WT und  $112,5 \pm 18,3$  in *F12<sup>-/-</sup>*/hFXII gegenüber  $52,2 \pm 2,8$  in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren,  $P<0,01$ ,  $P<0,05$ ; Tag 3:  $100,9 \pm 12,6$  in WT gegenüber  $24,8 \pm 5,6$  in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren,  $P<0,01$ , Abb. 4-17A; Ly.6B.2-positive neutrophile Granulozyten pro Hemisphäre, Tag 1:  $95,2 \pm 7,1$  in WT und  $68,5 \pm 5,4$  in *F12<sup>-/-</sup>*/hFXII gegenüber  $54,8 \pm 4,4$  in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren,  $P<0,01$ ; Tag 3:  $64,8 \pm 6,6$  in WT gegenüber  $13,9 \pm 8,1$  in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren,  $P<0,01$ , Abb. 4-17B).



**Abbildung 4-17.** (A) Die Infiltration von CD11b-positiven Makrophagen und Mikroglia in die verletzten Hemisphären am 1. (d1) und am 3. Tag (d3) ist in *F12<sup>-/-</sup>*-Mäusen reduziert. Unten: Repräsentative immunhistochemische Färbungen an d1 (n = 4 pro Gruppe, \*\*P<0,01, \*P<0,05, Maßstab = 20µm). (B) Reduzierte Infiltration von Ly.6B.2-positiven neutrophilen Granulozyten an d1 und d3 in das Läsionsgewebe von *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren. Unten: Repräsentative immunhistochemische Färbungen an d1 (n = 4 pro Gruppe, \*\*P<0,01, Maßstab = 20µm).

Da durch die Bindung zwischen ICAM-1 und Oberflächenproteinen von Immunzellen die Migration von neutrophilen Granulozyten in das Hirngewebe ermöglicht wird, wurden sowohl die Expression von *Icam-1* im Hirngewebe als auch die Plasma-Konzentration von löslichem ICAM-1 (sICAM-1) nach Trauma bestimmt. Aus der Literatur geht hervor, dass es erst am dritten Tag nach SHT zu einer deutlichen Hochregulation von ICAM-1 kommt<sup>126</sup>. Daher wurden die vorliegenden Versuche an Tag 3 nach Trauma durchgeführt. *F12<sup>-/-</sup>*-Tiere zeigten sowohl auf Genexpressionsebene als auch auf Proteinebene eine verringerte Hochregulation an (s)ICAM-1 im Gegensatz zu WT-Mäusen (relative Genexpression, Tag 3:  $1,9 \pm 0,2$  in WT gegenüber  $0,8 \pm 0,1$  in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren, P<0,001, Abb. 4-18A; Plasma-Konzentration in ng/ml,

Tag 3:  $558,1 \pm 13,2$  in WT gegenüber  $422,3 \pm 40,5$  in  $F12^{-/-}$ -Tieren und  $373,8 \pm 44,7$  in scheinoperierten Tieren,  $P < 0,05$ , Abb. 4-18B).



**Abbildung 4-18.** (A) Genexpression von *Icam-1* in den verletzten Cortices von WT-Mäusen und  $F12^{-/-}$ -Mäusen am 3. Tag (d3) nach Trauma-induktion ( $n = 5$  pro Gruppe,  $**P < 0,001$ ). (B) Proteinkonzentrationen 3d nach Trauma im Plasma von scheinoperierten Tieren (Sham) und WT, bzw.  $F12^{-/-}$ -Tieren ( $n = 4$  pro Gruppe,  $*P < 0,05$ ).

#### 4.4.2 Pharmakologische Hemmung des FXIIa im kortikalen Kälteläsionsmodell

##### 4.4.2.1 Blut-Hirn-Schranke und Hirnödem

Zunächst wurde erneut eine Messung der Plasma-Konzentration von Bradykinin vorgenommen. Diese ergab eine signifikant erhöhte Konzentration von Bradykinin in den mit Kochsalzlösung behandelten Tieren im Vergleich zu Mäusen, die mit Infestin behandelt wurden (Tab. 4-2).

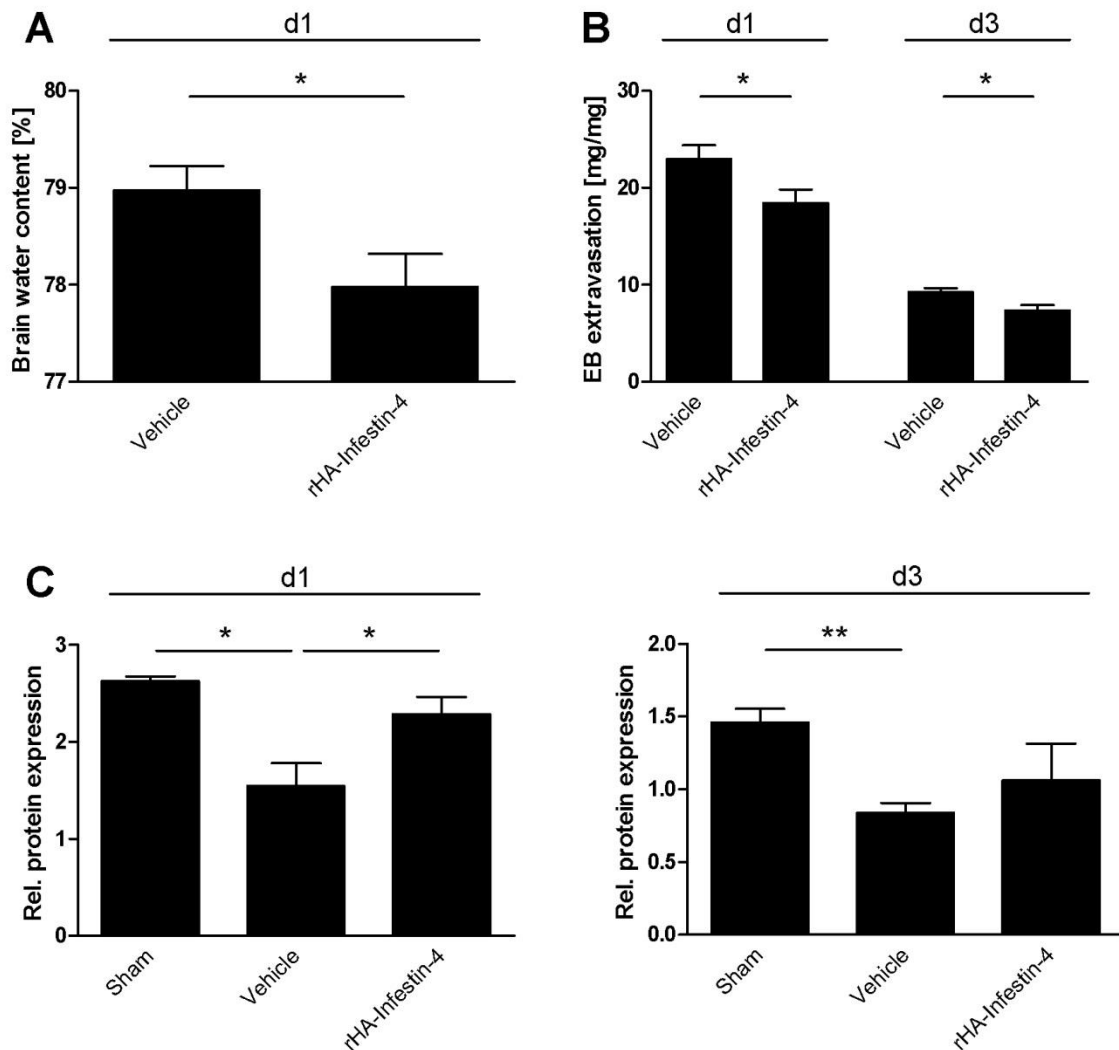
Tabelle 4-2 – Plasma-Konzentration von Bradykinin

|                                    | Sham<br>$n = 5$ | Vehicle<br>$n = 5$ | Infestin<br>$n = 5$ |
|------------------------------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| Bradykininkonzentration<br>[pg/ml] | $2099 \pm 273$  | $3294 \pm 683$ *   | $1405 \pm 266$ #    |

\* $P < 0,05$  Sham vs. Vehicle; # $P < 0,05$  Vehicle vs. Infestin

Die Analyse des Wassergehaltes des Gehirns als Parameter für die Hirnödembildung wurde am Tag 1 nach Trauma durchgeführt. Hierbei ergab sich, dass durch die Gabe von Infestin die Hirnödembildung leicht reduziert werden konnte (Wasseranteil im Gehirn in %:  $78,9 \pm 0,2$  in Vehicle- gegenüber  $77,9 \pm 0,3$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,05$ , Abb. 4-19A).

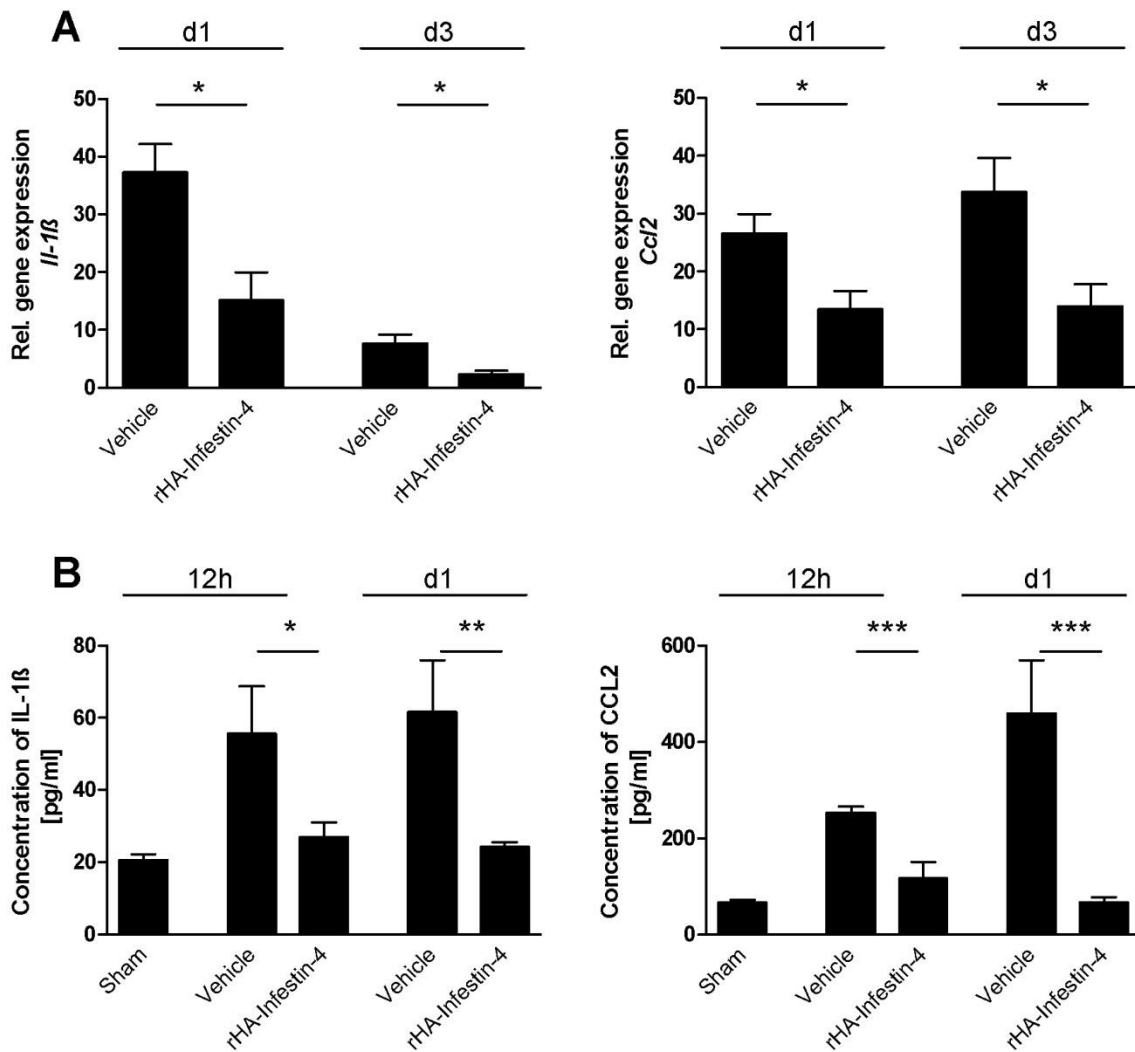
Weiterhin zeigte die Injektion von Evans Blue, dass die Integrität der BHS nach SHT deutlich und nachhaltig beeinträchtigt war. Diese gesteigerte BHS-Permeabilität konnte durch die therapeutische Gabe von Infestin signifikant verringert werden (Evans Blue Extravasation in mg/mg Gewebe, Tag 1:  $11,50 \pm 0,69$  in Vehicle- gegenüber  $9,22 \pm 0,69$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,05$ ; Tag 3:  $9,26 \pm 0,41$  in Vehicle- gegenüber  $7,35 \pm 0,57$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,05$ , Abb. 4-19B). Auch die Konzentration des *tight junction*-Proteins Occludin war nach Traumainduktion in den verletzten Cortices der Kontrolltiere gegenüber scheinoperierten Tieren deutlich verringert. Durch die pharmakologische Inhibition mit Infestin konnte die Degradation des Proteins nach SHT verhindert werden (relative Proteinkonzentration, Tag 1:  $1,55 \pm 0,23$  in Vehicle- gegenüber  $2,66 \pm 0,07$  in Sham und  $2,29 \pm 0,18$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,05$ ; Tag 3:  $0,84 \pm 0,07$  in Vehicle- gegenüber  $1,46 \pm 0,09$  in Sham und  $1,06 \pm 0,25$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,01$ , Abb. 4-19C).



**Abbildung 4-19.** (A) Die Bestimmung des Wassergehalts am 1. Tag (d1) zeigt den antiödematösen Effekt nach FXII-Inhibition in der verletzten Hirnhemisphäre (n = 8 bis 9 pro Gruppe, \*P<0,05). (B) Die fluorimetrische Messung der Evans Blue-Extravasation in das Hirnparenchym am 1. (d1) und am 3. Tag (d3) zeigt eine reduzierte Schädigung der Blut-Hirn-Schranke in rHA-Infestin-4-behandelten Mäusen im Vergleich zu NaCl-behandelten Tieren (Vehicle) (n = 5 pro Gruppe, \*P<0,05). (C) Quantifizierung des *tight junction*-Proteins Occludin durch Western Blot-Analyse am d1 und d3 in scheinoperierten Tieren (Sham), NaCl-behandelten Mäusen und rHA-Infestin-4-behandelten Mäusen (Blots siehe Abb. 7-6 und 7-7; n = 5 pro Gruppe, \*\*P<0,01, \*P<0,05, AU = arbitrary units).

### 4.4.2.2 Inflammation

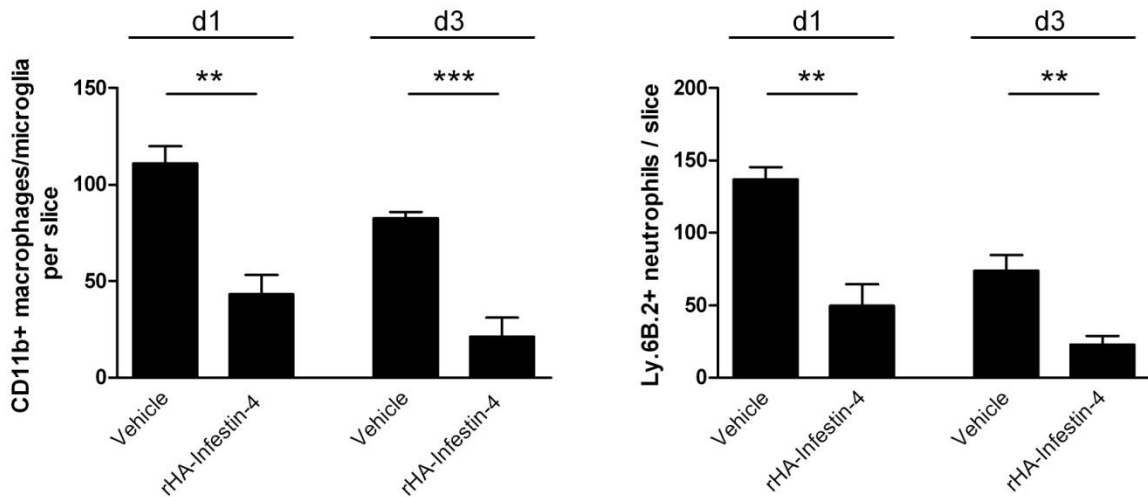
Die Ergebnisse der RT-PCR ergaben, dass im verletzten Hirngewebe der Kontrolltiere eine Hochregulierung proinflammatorischer Zytokine erfolgte. Die mit Infestin behandelten Tiere hingegen zeigten eine weniger starke Hochregulierung zu beiden Zeitpunkten nach Trauma (relative Genexpression *Il-1 $\beta$* , Tag 1:  $37,3 \pm 4,9$  in Vehicle- gegenüber  $15,2 \pm 4,8$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,05$ ; Tag 3:  $7,7 \pm 1,5$  in Vehicle- gegenüber  $2,3 \pm 0,7$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,05$ ; relative Genexpression *Ccl2*, Tag 1:  $26,6 \pm 3,4$  in Vehicle- gegenüber  $13,5 \pm 3,1$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,05$ ; Tag 3:  $33,8 \pm 5,9$  in Vehicle- gegenüber  $14,0 \pm 3,8$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,05$ , Abb. 4-20A). Die Genexpressionsdaten konnten durch Bestimmung der Proteinkonzentration der proinflammatorischen Zytokine im Hirngewebe mittels ELISA bestätigt werden. 12 und 24 h nach Trauma wurden hochsignifikant geringere Konzentrationen an IL-1 $\beta$  und CCL2 im verletzten Hirngewebe von behandelten Tieren gemessen (Proteinkonzentration IL-1 $\beta$  in pg/ml, 12 h:  $55,6 \pm 13,2$  in Vehicle- gegenüber  $20,6 \pm 1,6$  in scheinoperierten Tieren (Sham) und  $27,0 \pm 3,9$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,05$ ; Tag 1:  $61,6 \pm 14,3$  in Vehicle- gegenüber  $20,9 \pm 1,2$  in scheinoperierten Tieren und  $24,2 \pm 1,4$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,001$ ,  $P < 0,01$ ; Proteinkonzentration CCL2 in pg/ml, 12 h:  $253,6 \pm 12,6$  in Vehicle- gegenüber  $67,8 \pm 4,0$  in scheinoperierten Tieren und  $117,1 \pm 34,8$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,001$ ; Tag 1:  $459,1 \pm 110,5$  in Vehicle- gegenüber  $29,7 \pm 2,5$  in scheinoperierten Tieren und  $67,8 \pm 10,4$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P < 0,001$ , Abb. 4-20B).



**Abbildung 4-20.** (A) Genexpression der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (*Il-1 $\beta$* , links) und *Ccl2* (rechts) in den verletzten Cortices von Mäusen behandelt mit NaCl (Vehicle) und mit rHA-Infestin-4 am 1. (d1) und am 3. Tag (d3) nach Trauma-induktion (n = 5 pro Gruppe, \*P<0,05). (B) Proteinkonzentrationen 12 h und 1 Tag nach Trauma im Hirngewebe von scheinoperierten Tieren (Sham) und Tieren, die mit NaCl (Vehicle) oder rHA-Infestin-4 behandelt wurden (n = 5 pro Gruppe, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01, \*P<0,05).

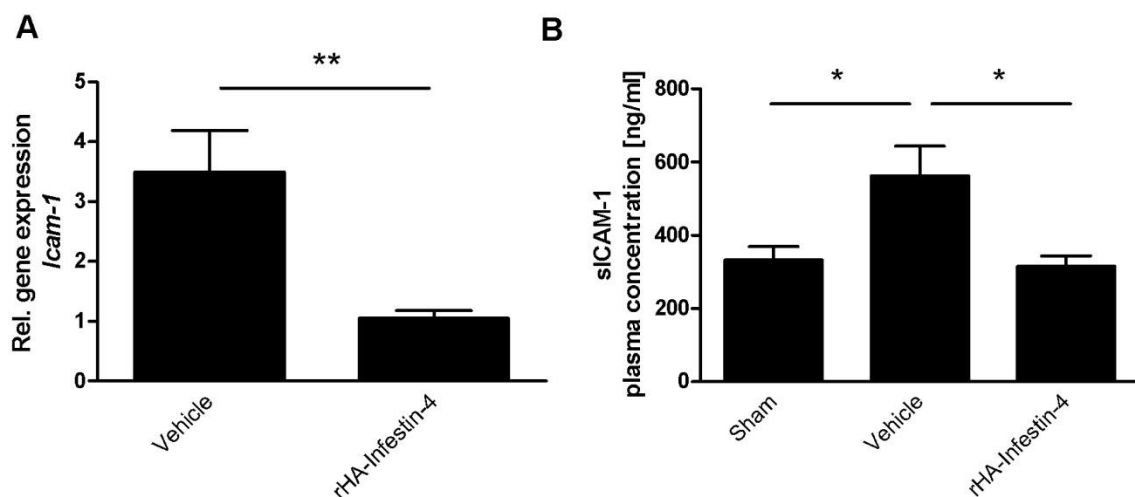
Weiterhin wurde durch die Gabe von Infestin eine Reduktion der infiltrierenden Immunzellen (Makrophagen / Mikroglia und neutrophile Granulozyten) in das Läsionsareal erreicht (CD11b-positive Zellen pro Hemisphäre, Tag 1: 110,9  $\pm$  8,9 in Vehicle- gegenüber 43,2  $\pm$  10,1 in Infestin-behandelten Tieren, P<0,01; Tag 3: 82,6  $\pm$  3,2 in Vehicle- gegenüber 21,3  $\pm$  9,8 in Infestin-behandelten Tieren, P<0,001; Ly.6B.2-positive Zellen pro Hemisphäre, Tag 1: 137,1  $\pm$  8,3 in Vehicle- gegenüber 49,9  $\pm$  14,7 in Infestin-behandelten Tieren, P<0,01; Tag 3: 73,9  $\pm$  10,8 in Vehicle- gegenüber 22,9  $\pm$  5,9 in Infestin-behandelten Tieren, P<0,01, Abb. 4-21).





**Abbildung 4-21.** Reduzierte Infiltration von CD11b-positiven Makrophagen und Mikroglia (links) und Ly.6B.2-positiven neutrophilen Granulozyten (rechts) am 1. (d1) und am 3. Tag (d3) in das Gehirngewebe von Mäusen nach SHT, die mit rHA-Infestin-4 behandelt wurden (n=4, \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01).

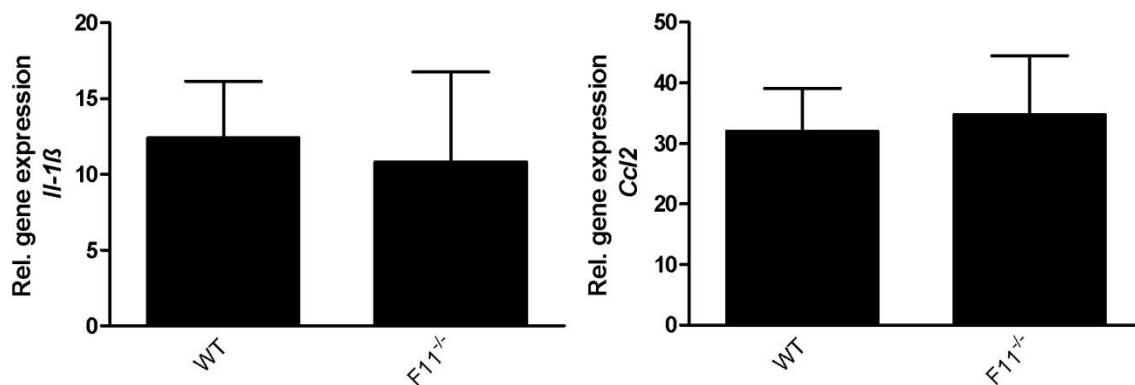
Analog zur Analyse in *F12<sup>-/-</sup>*-Tieren wurden auch hier die relative Genexpression und die Plasmakonzentration an (s)ICAM-1 an Tag 3 nach Trauma gemessen (relative Genexpression, Tag 3:  $3,5 \pm 0,7$  in Vehicle- gegenüber  $1,1 \pm 0,1$  in Infestin-behandelten Tieren,  $P<0,01$ , Abb. 4-22A; Proteinkonzentration im Plasma in ng/ml, Tag 3:  $562,5 \pm 81,1$  in Vehicle- gegenüber  $314,9 \pm 29,4$  in Infestin-behandelten Tieren und  $332,3 \pm 37,2$  in scheinoperierten Tieren,  $P<0,05$ ; Abb. 4-22B).



**Abbildung 4-22.** (A) Genexpression von *Icam-1* in den verletzten Cortices von Mäusen behandelt mit NaCl (Vehicle) und mit rHA-Infestin-4 am 3. Tag (d3) nach Trauma-induktion (n = 5 pro Gruppe, \*\*P<0,01). (B) Proteinkonzentrationen 3d nach Trauma im Plasma von scheinoperierten Tieren (Sham) und Tieren, die mit NaCl (Vehicle) oder rHA-Infestin-4 behandelt wurden (n = 4 pro Gruppe, \*P<0,05).

#### 4.4.3 Untersuchungen zur FXI-Defizienz im kortikalen Kälteläsionsmodell

Die inflammatorischen Prozesse im Gehirngewebe von  $F11^{-/-}$ -Mäusen wurden durch Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR überprüft. Bezüglich der Expression von  $Il-1\beta$  und  $Ccl2$  zeigte sich keine verringerte Hochregulation dieser proinflammatorischen Zytokine in den verletzten Cortices der FXI-defizienten Tiere nach Trauma im Vergleich zu WT-Tieren (relative Genexpression  $Il-1\beta$ :  $12,4 \pm 3,7$  in WT gegenüber  $10,9 \pm 5,9$  in  $F11^{-/-}$ -Tieren; relative Genexpression  $Ccl2$ :  $32,1 \pm 7,0$  in WT gegenüber  $34,7 \pm 9,7$  in  $F11^{-/-}$ -Tieren, Abb. 4-23).



**Abbildung 4-23.** Genexpression von  $Il-1\beta$  (links) und  $Ccl2$  (rechts) in den verletzten Cortices von WT-Tieren und  $F11^{-/-}$ -Tieren am 1. Tag nach Traumainduktion (n = 5 pro Gruppe).

## 5 Diskussion

### 5.1 Die Rolle des FXII für den sekundären Hirnschaden nach SHT

Experimentelle Studien aus der Arbeitsgruppe von Prof. Kleinschnitz konnten in der Vergangenheit belegen, dass die Defizienz des FXII sowie dessen pharmakologische Blockade im Mausmodell vor den Schäden des ischämischen Schlaganfalles schützen<sup>81, 114</sup>. Der ischämische Schlaganfall und das SHT teilen zentrale pathophysiologische Mechanismen, wie beispielsweise das Auftreten des Hirnödems und der Inflammation sowie neurodegenerative Prozesse<sup>100</sup>. Daher wurde von mir die Relevanz des FXII in zwei Mausmodellen des SHT im Detail analysiert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch beim SHT, unabhängig von der Art der Primärverletzung, wichtige Pathomechanismen durch die Aktivierung des FXII ausgelöst werden. FXII-defiziente Mäuse entwickelten kleinere Läsionsvolumina und eine verringerte Neurodegeneration nach fokaler kortikaler Kälteläsion. Nach diffusem Trauma verbesserte sich der funktionelle Status der FXII-defizienten Tiere im Vergleich zu WT-Tieren. Durch die pharmakologische Inhibition von FXIIa mittels Infestin konnte eine vergleichbare Protektion erreicht werden. Aus translationaler Sicht war die Beobachtung von besonderer Relevanz, dass die Inhibition des FXII nach SHT nicht mit einem erhöhten intrazerebralen Blutungsrisiko einherging. Interessanterweise konnte in Gewebeproben humaner Gehirne nach SHT eine vermehrte lokale Thrombose in den geschädigten Hirnarealen nachgewiesen werden. Meine Untersuchungen zu den zugrunde liegenden Mechanismen ergaben, dass die Defizienz und die Inhibition von FXII(a) zu einer Reduktion thrombo-inflammatorischer Prozesse führen. Diese Mechanismen werden im Folgenden analysiert.

#### Mechanismen der Thrombo-Inflammation

Bereits früher wurde angenommen, dass intrazerebrale Thromben nach SHT den zerebralen Blutfluss beeinträchtigen und dadurch ischämische Zustände im Gehirn auslösen, wodurch sich wiederum der Krankheitsverlauf und die Prognose verschlechtern<sup>46, 47, 54-56</sup>. Durch Kooperationen mit den Pathologischen Instituten der Universitäten Uppsala und Würzburg standen für diese Arbeit humane Gewebeproben von 11 Patienten nach SHT sowie von 9 Kontrollpatienten für diese Arbeit zur Verfügung. Bei der Auswertung wurden in den Gehirnen der SHT-Patienten signifikant häufiger Thrombozytenaggregate in den zerebralen Gefäßen gefunden. Diese Beobachtung passte zu den tierexperimentell erhobenen Daten aus zwei verschiedenen Traumamodellen. Die intrazerebrale Thrombenbildung könnte somit eine wichtige Ursache für das Fortschreiten der sekundären Hirnschäden nach Trauma sein. Nach wie vor ist allerdings unklar, welche konkreten mechanistischen Abläufe für die

Thrombenbildung infolge eines SHT verantwortlich sind<sup>127</sup>. Da es infolge eines SHT zu einer massiven Freisetzung von *tissue factor* kommt<sup>51</sup>, ist es wahrscheinlich, dass dadurch die extrinsische Gerinnungskaskade und somit die *tissue factor*-vermittelte Thrombenbildung initiiert wird. Die Ergebnisse meiner Studie deuten darauf hin, dass die Stabilisierung von bereits gebildeten Thromben und deren Wachstum über die intrinsische Gerinnung und FXII vermittelt werden. In den zerebralen Gefäßen von FXII-defizienten Mäusen ließen sich deutlich weniger Thrombozytenaggregate als in Kontrollmäusen oder mit humanem FXII rekonstituierten FXII-defizienten Mäusen nachweisen. Ähnlich wie die FXII-Defizienz resultiert auch die Inhibition von FXIIa in deutlich weniger intravaskulären Thrombozytenaggregaten. In diesem Zusammenhang ist die Tatsache interessant, dass Menschen selbst bei einem vollständigen Fehlen des FXII keine erhöhte Blutungsneigung aufweisen<sup>77</sup>. Dies steht in Gegensatz zum Mangel an anderen Gerinnungsfaktoren. Genau wie FXII-defiziente Menschen zeigen FXII-defiziente Mäuse keine vermehrte Blutungsneigung. Dies trifft auch nach experimentellem SHT zu, wie die vorliegende Arbeit zeigen konnte. Trotz der unzweifelhaften Bedeutung von FXII für die Fibrinbildung *in vitro* geht man heute davon aus, dass FXII *in vivo* mitverantwortlich für die pathologische Thrombenbildung und Stabilisierung ist, jedoch keine essentielle Rolle im Rahmen der Hämostase einnimmt<sup>83, 84, 128</sup>.

Thrombotische und inflammatorische Prozesse sind auf vielen Ebenen eng miteinander verknüpft. Das Konzept der Thrombo-Inflammation ist durch zahlreiche Interaktionen belegt. Beispielsweise interagieren sowohl Immunzellen und Thrombozyten miteinander als auch deren biochemische Signaltransduktionskaskaden. Für den experimentellen Schlaganfall wurde bewiesen, dass FXII und andere Komponenten des KKS entscheidend an der Ausprägung der Erkrankung beziehungsweise an der Ausweitung des Hirnschadens beteiligt sind<sup>118, 129, 130</sup> (zusammengefasst in:<sup>131, 132</sup>). Auch im experimentellen SHT wurde gezeigt, dass das KKS inflammatorische und thrombotische Prozesse gleichermaßen auslöst<sup>98, 99, 103</sup>. Die Ergebnisse meiner Studie verdeutlichen, dass FXII nach SHT eine zentrale Rolle für die thrombo-inflammatorischen Pathomechanismen spielt. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass auch weitere Verknüpfungen zwischen inflammatorischen und thrombotischen Prozessen nach SHT vorhanden sind. Von Zytokinen ist bekannt, dass sie prokoagulante und proinflammatorische Kaskaden initiieren und verstärken können. Gut beschrieben ist dies vor allem für IL-1 und TNF $\alpha$  (zusammengefasst in:<sup>133</sup>), die bei SHT-Patienten stark hochreguliert werden<sup>134, 135</sup>. Beide Zytokine interagieren mit plättchenaktivierendem Faktor (PAF) und wirken auf diese Weise prokoagulant. Umgekehrt induziert auch PAF die Synthese von TNF $\alpha$  und ist an der Extravasation von neutrophilen Granulozyten beteiligt<sup>133</sup>. Auch Thrombozyten sind, neben ihrer Funktion bei der Hämostase

und der Entstehung von Thrombose, an inflammatorischen Prozessen beteiligt. Als Folge ihrer Aktivierung sezernieren Thrombozyten proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und 1 $\alpha$ <sup>136-138</sup>. Die nachfolgende Adhäsion der Thrombozyten resultiert in einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B und führt im Anschluss zu einer Freisetzung von CCL2 und ICAM-1<sup>139</sup>. In Übereinstimmung mit der Literatur bestätigen meine Ergebnisse, dass nach experimentellem SHT vermehrt IL-1 $\beta$ , ICAM-1 und CCL2 im geschädigten Hirngewebe sezerniert werden<sup>26</sup>. Die Freisetzung dieser Mediatoren war in meinen Experimenten abhängig von der Fähigkeit zur FXII(a)-Bildung; gleiches galt für die Immunezellinfiltration in das traumatische Hirngewebe. Eine definitive Differenzierung, welche Schäden durch Inflammation und welche durch Thrombose entstehen, ist derzeit nicht möglich, da diese Mechanismen sich gegenseitig bedingen und verstärken. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, Therapiekonzepte nicht einseitig auf antiinflammatorische Wirkstoffe zu beschränken, sondern auch der Antithrombose im Rahmen eines SHT einen größeren Stellenwert einzuräumen.

### Hirnödem und inflammatorische Prozesse

Dem Auftreten eines Hirnödems wird im Zusammenhang mit SHT eine große Bedeutung beigemessen, da es mit einer Verschlechterung der Prognose verbunden ist und zu einer verminderten zerebralen Perfusion und damit zu einer reduzierten Sauerstoffversorgung des Gehirns beiträgt<sup>20, 22, 140</sup>. Mittlerweile ergaben auch klinische Studien, dass erhöhte Bradykinin-Konzentrationen im *Liquor cerebrospinalis* von SHT-Patienten mit dem Auftreten eines Hirnödems korrelieren<sup>101</sup>. Die Ergebnisse zahlreicher Studien an Mäusen belegen ebenfalls, dass die Aktivierung des KKS mit darauf folgender Bradykinin-Freisetzung nach traumatischer Hirnverletzung zur BHS-Störung beiträgt und Hirnödem induziert<sup>98, 102, 141</sup>. Die Ergebnisse meiner Studie aus dem kortikalen Kälteläsionsmodell bestätigen diese Befunde. Die Defizienz des FXII und die Inhibition des FXIIa führten in diesem Modell zu einer deutlich verringerten Bradykinin-Konzentration im Plasma. Von dieser reduzierten Bradykinin-Konzentration ausgehend, hatten sowohl FXII-Defizienz als auch FXIIa-Inhibition einen antiödematösen Effekt sowie eine stabilisierende Wirkung auf die BHS.

Zwischen der Schädigung der BHS und Entzündungsprozessen, die auf das SHT folgen, besteht eine enge Beziehung. Es ist bekannt, dass Bradykinin die Entzündungsreaktion nach ZNS-Verletzungen vorantreibt<sup>142</sup>. In früheren Studien wurde gezeigt, dass die Blockade der Bradykinin-Bildung mit einem C1-Esterase-Inhibitor und die direkte Blockade der Bradykinin-Rezeptoren die Immunezellinfiltration und die Genexpression proinflammatorischer Zytokine in dem durch das SHT geschädigten Hirngewebe reduzieren<sup>98, 99</sup>. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diesen Zusammenhang im Hinblick auf eine Inhibition des FXIIa. Die einmalige

Gabe von Infestin zu einem frühen Zeitpunkt nach Traumainduktion war zudem in der Lage, die inflammatorischen Prozesse bis zu 3 Tagen nach SHT zu verringern und somit auch in der subakuten Phase zu einer Verbesserung des Outcomes zu führen. Wie unter 1.1.2.2 erläutert, ist die Bewertung der Zytokine als Biomarker für die Prognose nach SHT nicht eindeutig<sup>143</sup>. Trotz dieser möglicherweise begrenzten Aussagekraft der Zytokin- und Chemokin-Expression, lassen die Reduktion der Immunzellen und der (s)ICAM-1-Expression den Schluss zu, dass sich eine Hemmung der Bradykinin-Bildung über die Blockade des FXII vorteilhaft auf die Pathophysiologie des SHT auswirkt.

## 5.2 Untersuchungen zur FXI-Defizienz nach SHT

Um differenzieren zu können, ob FXII selbst eine protektive Wirkung nach Trauma ausübt oder ob dieser Effekt generell der selektiven Hemmung der intrinsischen Gerinnung zugeschrieben werden kann, wurde eine Gruppe von FXI-defizienten Mäusen der Traumainduktion mittels Kälteläsionsmodell unterzogen. Die Auswertung der Parameter Läsionsvolumen, neuronaler Zelltod und Entzündung zeigte eine Tendenz zur Verschlechterung des Zustandes in den FXI-defizienten Tieren. Dieser deutlich verschlechterte Allgemeinzustand gegenüber WT-Tieren ist durch die teilweise massiven Einblutungen in das Hirngewebe zu erklären. Trotz einer Reduktion der thrombotisch verschlossenen Gefäße bei FXI-defizienten Tieren wurde durch die sehr stark angestiegene Blutungsrate und die damit verbundenen Schäden des neuronalen Gewebes kein vorteilhafter Effekt auf die Inflammation und Neurodegeneration gefunden. Es ist davon auszugehen, dass der vermutete protektive Effekt in den FXI-defizienten Tieren von einer stark erhöhten intrazerebralen Blutungsrate maskiert wurde.

Ausgehend von der ursprünglichen Theorie, dass FXI ausschließlich durch FXIIa aktiviert wird<sup>144</sup>, muss die Frage gestellt werden, wieso eine FXII-Defizienz nicht ebenfalls das Blutungsrisiko erhöht. Diesbezüglich wurde gezeigt, dass FXI über einen Feedback-Mechanismus auch durch Thrombin aktiviert werden kann, wenn auch in geringerem Ausmaß als durch FXIIa<sup>145, 146</sup>. Dadurch kann erklärt werden, dass bei FXII-Defizienz durch die Feedback-Aktivierung über Thrombin die intrinsische Gerinnungskaskade immer noch aufrechterhalten wird. Weiterhin wurde durch Puy und Kollegen<sup>147</sup> gezeigt, dass FXI auch in der Lage ist, *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) zu inaktivieren und über diesen Mechanismus selbst prokoagulant wirkt. Bei FXI-Defizienz fehlt also die Inaktivierung des TFPI, wodurch auch die physiologische Hämostase beeinträchtigt wird und Blutungen länger anhalten. Unter Berücksichtigung dieser Punkte ist die direkte FXI-Inhibition im Rahmen eines traumatischen Geschehens keine geeignete therapeutische Maßnahme, da anscheinend das Blutungsrisiko erhöht wird.

### 5.3 Limitierungen der vorliegenden Studie

#### 5.3.1 SHT-Modelle

Um die Pathomechanismen nach SHT im Tierversuch zu simulieren, steht eine Vielzahl von Modellen zur Verfügung (für eine umfassende Übersicht, siehe<sup>148, 149</sup>). Im Tierversuch kann jedoch die Komplexität der sekundären Hirnschäden mit einem Krankheitsmodell alleine nur unzureichend abgebildet werden<sup>150</sup>. Hier bietet es sich an, auf mehrere der etablierten Modelle zurückzugreifen, um ein möglichst breites Spektrum der ablaufenden Schadensereignisse zu untersuchen. Generell sind die Modelle des geschlossenen SHT vorteilhaft, um die Auswirkungen auf Hirnödembildung und inflammatorische Prozesse darzustellen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit das fokale kortikale Kälteläsionsmodell und das diffuse *weight-drop*-Modell verwendet.

Die etablierten Traumamodelle sind üblicherweise auf den Einsatz von Nagetieren ausgelegt. Nur wenige Studien älteren Datums wurden an größeren Tieren<sup>151-153</sup> oder Primaten<sup>154</sup> durchgeführt. Bezüglich der Übertragbarkeit auf den Menschen erscheint es absolut notwendig, Studien mit möglichen Pharmaka auch an Tieren mit gyrenzephaler Gehirnstruktur durchzuführen<sup>155</sup>. Neben der mangelnden Praktikabilität und dem deutlich höheren (auch finanziellen) Aufwand spielen hierbei jedoch auch ethische Bedenken berechtigterweise eine große Rolle.

Da zunehmend ältere Menschen durch Stürze ein SHT erleiden und Komorbiditäten die Mortalität deutlich erhöhen können<sup>156, 157</sup>, sollten verstärkt auch ältere Tiere mit definiertem Krankheitsphänotyp in tierexperimentelle Studien einbezogen werden. Weiterhin wurde bislang vermutet, dass das weibliche Geschlecht in manchen neurologischen Krankheitsbildern, so auch im SHT, eher geschützt sein könnte als das männliche<sup>156, 158</sup>, was auch die Testung in weiblichen Tieren unerlässlich macht. Der untersuchte Parameter „Läsionsgröße“ zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen WT- oder FXII-defizienten Tieren, weder am ersten, noch am dritten Tag nach Trauma. Weibliche Tiere waren also durch FXII-Defizienz in gleichem Maße geschützt wie männliche Tiere. In Bezug auf FXII gibt es allerdings Hinweise darauf, dass Estrogene die *F12*-Genexpression hochregulieren und somit zu höheren FXII-Plasmakonzentrationen führen<sup>159, 160</sup>. Inwiefern dies das pathophysiologische Geschehen nach SHT beeinflusst, wurde bisher nicht untersucht.

#### 5.3.2 Infestin

Als häufig letale Folge einer entgleisenden Gerinnung treten nach SHT venöse Thromboembolien auf<sup>161</sup>. Die Behandlung der Thromboembolien nach SHT wird seit einigen

Jahren kontrovers diskutiert<sup>162-164</sup>. Einerseits kann das Risiko einer intrazerebralen Blutung erhöht werden<sup>165, 166</sup>, andererseits zeigten manche Studien eine Verbesserung des Outcomes nach Einsatz von Heparinen<sup>167, 168</sup>. Das primäre Ziel einer medikamentösen Antikoagulation nach Trauma muss es also sein, die Blutungsneigung nicht zu erhöhen. Dieser Aspekt wurde in dieser Arbeit durch verschiedene Methoden überprüft. Vielversprechend ist die Tatsache, dass die vorliegenden Ergebnisse keinerlei Hinweise auf einen Anstieg der Blutungsereignisse nach FXII-Inhibition geben. Diesbezüglich stellt die Blockade des FXII ein Novum dar, da der bei Menschen auftretende Mangel anderer Gerinnungsfaktoren fast unweigerlich mit einem moderaten bis starken Anstieg des Blutungsrisikos einhergeht (eine Übersicht hierzu, siehe<sup>169</sup>).

Infestin agiert als kompetitiver und reversibler selektiver Inhibitor von FXIIa. Das isolierte Peptid Infestin-4 liegt als intravenös zu applizierende Darreichungsform an humanes Albumin gebunden vor, um eine Verlängerung der Halbwertszeit zu erreichen. Bei Mäusen beträgt diese 4,6 h nach intravenöser Gabe<sup>114</sup>. Die Molekülmasse der Verbindung beträgt etwa 73 kDa, Infestin-4 selbst hat eine Masse von 7 kDa<sup>114, 170</sup>.

Üblicherweise ist die BHS lediglich für sehr kleine lipophile Moleküle mit einer Masse von bis zu 600 Da penetrierbar<sup>171</sup>. Für bestimmte Molekülgruppen existieren Rezeptoren und Transporter, die einen Influx in das Hirngewebe ermöglichen, um Stoffwechselforgänge des Gewebes aufrecht zu erhalten<sup>172</sup>. Pharmaka sind jedoch nur in Ausnahmefällen in der Lage, die BHS zu überwinden<sup>173</sup>. Für Infestin als relativ großes, an Albumin gebundenes Protein scheint es daher kaum möglich zu sein, eine direkte neuroprotektive Wirkung unmittelbar im Hirngewebe zu entfalten. Für das SHT wurde jedoch beschrieben, dass im Zuge der BHS-Schädigung unmittelbar nach Trauma ein Zeitfenster von etwa 4 h entsteht, in dem auch große Moleküle (> 10 kDa) die beschädigte BHS passieren können. Im Anschluss an dieses Zeitfenster regeneriert sich die BHS und nur noch kleinere Moleküle können bis zu 4 Tage nach Trauma das Hirngewebe erreichen<sup>174</sup>. Eigene Untersuchungen zeigten, dass der zur Bestimmung der BHS-Integrität verwendete Tracer Evans Blue nach Traumainduktion in der Lage war die BHS zu überwinden (vgl. 4.4.1.1). Evans Blue (961 Da) bindet an Albumin (66 kDa) und ist als Komplex bei intakter BHS nicht in der Lage, ins Hirnparenchym zu gelangen. Nach intravenöser Injektion von 4 mg Evans Blue in Lösung unmittelbar nach Trauma konnten 2 h nach der Injektion noch ungefähr 2,2 mg im Hirngewebe wieder gefunden werden (eigene, unveröffentlichte Daten). Infestin mit einer Größe von etwa 73 kDa könnte somit in der Lage sein, nach intravenöser Gabe 1 h nach Trauma therapeutisch relevante Konzentrationen im Hirnparenchym zu erreichen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass Infestin seine Wirkung ausschließlich auf plasmatischem Weg entfaltet. Sowohl die FXII-vermittelte



Aktivierung der intrinsischen Gerinnung als auch die Entstehung von Bradykinin finden im Plasma statt und können durch FXII-Inhibition auch dort gehemmt werden.

Nicht nachteilig ausgewirkt hat sich die relativ kurze Halbwertszeit von Infestin, da der Schwerpunkt dieser Studie auf der akuten Phase nach Trauma lag. Die kurzfristige Hemmung der Schadensprozesse direkt nach Traumainduktion besitzt ausreichend lange einen Einfluss auf die hier untersuchten Endpunkte. In anderen experimentellen Studien zum SHT wurde gezeigt, dass bereits 6 h nach Trauma akute axonale Verletzungen und eine ausgeprägte Aktivierung der Mikroglia nachweisbar sind<sup>175</sup>. Beim Menschen tritt die Mikroglia-Aktivierung etwa 72 h nach SHT auf und persistiert auch noch Monate nach der Primärverletzung<sup>176</sup>. Ausgehend davon, dass durch die frühe, einmalige Gabe von Infestin die Schadensprozesse der akuten Phase eingedämmt werden, welche die zu späteren Zeitpunkten in der Literatur beschriebene Mikroglia-Aktivierung bewirken, könnte die hier getestete Gabe von Infestin auch in Langzeit-Studien das Outcome verbessern.

Einer der wichtigsten Aspekte, der in translationalen Ansätzen berücksichtigt werden muss, ist das therapeutische Zeitfenster. Das Ziel sollte es sein, klinisch relevante und praktikable Zeitpunkte zu evaluieren, zu denen eine Verabreichung von Substanzen möglich ist. In dieser Studie wurde Infestin 1 h nach Traumainduktion intravenös verabreicht. Rickels und Kollegen<sup>1</sup> konnten in ihrer Untersuchung zur Behandlung des SHT in Deutschland zeigen, dass 63 % der Patienten das Krankenhaus in weniger als 60 min erreichen und auch vorher schon rettungsdienstlich versorgt werden können. Leitliniengerecht wird jedoch nach der Einlieferung in ein Krankenhaus eine kraniale CT zum Ausschluss von raumfordernden Hämatomen und Kontusionen durchgeführt und eine Therapie erst im Anschluss daran begonnen. Sollte das Nebenwirkungsprofil von Infestin beim Menschen so günstige Eigenschaften bezüglich des Blutungsrisikos zeigen, wie es in Anbetracht der Ergebnisse meiner Studie vermutet werden kann, könnte jedoch diese zeitliche Verzögerung unter Umständen entfallen. Somit ist das in dieser Studie gewählte Zeitfenster von 1 h möglicherweise übertragbar auf die klinische Situation.

### 5.3.3 Langzeitschäden nach SHT

Neben den akuten, oft lebensbedrohlichen Folgen eines SHT gewannen in den letzten Jahren die chronischen Schäden nach SHT in der wissenschaftlichen Wahrnehmung an Bedeutung. Vermehrt wird berichtet, dass das repetitive Auftreten von leichtem SHT mit Demenz und chronischer traumatischer Enzephalopathie (CTE) verbunden ist<sup>177</sup>. Als besonders gefährdet für wiederholtes, leichtes SHT gelten insbesondere professionelle Sportler bestimmter Kontaktsportarten (Boxen, American Football, Fußball, Eishockey)<sup>178, 179</sup>. Die neuropathologischen Veränderungen, die bei Sportlern noch Jahrzehnte nach ihrer

aktiven Karriere zu finden sind, umfassen Atrophien von hippocampalen Strukturen<sup>180</sup> sowie eine dauerhafte Erhöhung der Mikroglia-Aktivität, die als wichtigster Pathomechanismus der CTE angesehen wird<sup>181-183</sup>. Die daraus resultierende chronische Neuroinflammation begünstigt das Risiko der Entstehung von neurodegenerativen Krankheiten, wie z.B. M. Parkinson, M. Alzheimer, Motoneuronerkrankungen sowie psychiatrischen Störungen<sup>184, 185</sup>.

In der vorliegenden Studie wurden primär die akuten neurologischen Ausfallerscheinungen und Schadensprozesse nach Trauma beleuchtet. Da die Wichtigkeit und Bedeutung der chronischen Schäden immer mehr in den Vordergrund rückt, müssen potentiell wirksame Substanzen wie das hier verwendete Infestin auch in einem langfristig ausgelegten Versuchsaufbau getestet werden. Das Ziel muss es hierbei vor allem sein, die frühen pathologischen Abläufe dergestalt einzudämmen, dass die Schäden des neuronalen Zelltodes und der resultierenden CTE möglichst gering ausfallen.

#### 5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Seit längerem wird vermutet, dass das KKS eine wichtige pathophysiologische Rolle im Rahmen des SHT spielt. In dieser Arbeit wurde nun erstmals gezeigt, dass der FXII mit seinen vielfältigen physiologischen Aufgaben eine zentrale Bedeutung für die Initiierung sekundärer Schadensprozesse nach SHT besitzt. Mit dem Mechanismus der Thrombenbildung in der Mikrovaskulatur des Gehirns nach SHT wurde ein neuer, bislang wenig beachteter Aspekt der pathophysiologischen Abläufe beleuchtet und durch die systematische Auswertung von humanen Hirnschnitten in einen klinischen Kontext gebracht. In diesem Zusammenhang stellte sich FXII als vielversprechender Ausgangspunkt dar, um sowohl die KKS-vermittelten inflammatorischen Prozesse als auch die Bildung von Thromben in zerebralen Gefäßen zu reduzieren. Durch die Anwendung eines selektiven FXIIa-Inhibitors wurde weiterhin gezeigt, dass sich FXII als Zielstruktur für die pharmakologische Beeinflussung des KKS eignet.

Wie bereits dargelegt sind weiterführende Studien notwendig, um das translationale Potential einer FXIIa-Inhibition abschließend zu beurteilen. In unserer Arbeitsgruppe sind vor allem Langzeitstudien geplant, die Aufschluss darüber geben sollen, inwiefern die frühe Inhibition des FXII(a) die chronische Neuroinflammation mit langanhaltender Mikroglia-Aktivierung und Astrogliose modulieren kann, und ob es sich bei der oben beschriebenen CTE ebenfalls um einen durch FXII beeinflussbaren Pathomechanismus handelt. Neben der simultanen Hemmung des KKS und der intrinsischen Gerinnung könnte auch eine Blockade bestimmter thrombozytärer Oberflächenproteine, wie beispielsweise GPIb, zur gleichzeitigen Eindämmung thrombotischer und inflammatorischer Prozesse erwogen werden. Erste Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe mit einem Antikörper gegen GPIb zeigen, dass

eine Reduktion der Schadensprozesse nach SHT möglicherweise auch auf diese Weise erreicht werden kann. Insgesamt implizieren die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass mit der synergistischen Blockade thrombo-inflammatorischer Prozesse vielversprechende Wege zur Therapie der Hirnschäden nach SHT zur Verfügung stehen könnten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Rickels E, von Wild K, Wenzlaff P. [Treatment of traumatic brain injury in Germany]. *Unfallchirurg*. 2011 May;114(5):417-23.
2. Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)*. 2006 Mar;148(3):255-68; discussion 68.
3. Statistisches Bundesamt; Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland; 2013.
4. Daneshvar DH, Goldstein LE, Kiernan PT, Stein TD, McKee AC. Post-traumatic neurodegeneration and chronic traumatic encephalopathy. *Mol Cell Neurosci*. 2015 May;66(Pt B):81-90.
5. Roozenbeek B, Maas AI, Menon DK. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2013 Apr;9(4):231-6.
6. Firsching R, Woischneck D. Present Status of Neurosurgical Trauma in Germany. *World J Surg*. 2001;25(9):1221-3.
7. Ma VY, Chan L, Carruthers KJ. Incidence, prevalence, costs, and impact on disability of common conditions requiring rehabilitation in the United States: stroke, spinal cord injury, traumatic brain injury, multiple sclerosis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, limb loss, and back pain. *Arch Phys Med Rehabil*. 2014 May;95(5):986-95.
8. Bauer D, Tung ML, Tsao JW. Mechanisms of traumatic brain injury. *Semin Neurol*. 2015 Feb;35(1):e14-22.
9. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*. 2007 Jul;99(1):4-9.
10. Prins M, Greco T, Alexander D, Giza CC. The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance. *Dis Model Mech*. 2013 Nov;6(6):1307-15.
11. Gaetz M. The neurophysiology of brain injury. *Clin Neurophysiol*. 2004;115(1):4-18.
12. Dawson SL, Hirsch CS, Lucas FV, Sebek BA. The contrecoup phenomenon. Reappraisal of a classic problem. *Hum Pathol*. 1980;11(2):155-66.

13. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol.* 2008;7(8):728-41.
14. Xiong Y, Gu Q, Peterson PL, Muizelaar JP, Lee CP. Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 1997;14(1):23-34.
15. Kiesel U, Wolburg H. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol.* 2000;20(1):57-76.
16. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003 Jan;81(1):1-44.
17. Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* 2009 Jan;335(1):75-96.
18. Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Transl Stroke Res.* 2011 Dec;2(4):492-516.
19. Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol.* 2010 Jul;6(7):393-403.
20. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience.* 2004;129(4):1021-9.
21. Klatzo I. Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol.* 1987;72(3):236-9.
22. Donkin JJ, Vink R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Curr Opin Neurol.* 2010 Jun;23(3):293-9.
23. Schwarzmaier SM, Gallozzi M, Plesnila N. Identification of the Vascular Source of Vasogenic Brain Edema following Traumatic Brain Injury Using In Vivo 2-Photon Microscopy in Mice. *J Neurotrauma.* 2015 Jul;32(13):990-1000.
24. Baskaya MK, Muralikrishna RA, Dogan A, Donaldson D, Dempsey RJ. The biphasic opening of the blood-brain-barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett.* 1997;226:33-6.
25. Otto VI, Stahel PF, Rancan M, et al. Regulation of chemokines and chemokine receptors after experimental closed head injury. *Neuroreport.* 2001;12(3):2059-64.

26. Morganti-Kossmann MC, Satgunaseelan L, Bye N, Kossmann T. Modulation of immune response by head injury. *Injury*. 2007 Dec;38(12):1392-400.
27. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neurosci*. 2005 Jun;8(6):752-8.
28. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Experimental Neurol*. 2016 Jan;275 Pt 3:316-27.
29. Dietrich JB. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol*. 2002 Jul;128(1-2):58-68.
30. Langer HF, Chavakis T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med*. 2009 Jul;13(7):1211-20.
31. Clark RS, Schiding JK, Kaczorowski SL, Marion DW, Kochanek PM. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *J Neurotrauma*. 1994 Oct;11(5):499-506.
32. Holmin S, Söderlund J, Biberfeld P, Mathiesen T. Intracerebral inflammation after human brain contusion. *Neurosurgery*. 1998 Feb;42(2):291-8; discussion 8-9.
33. Hellewell SC, Morganti-Kossmann MC. Guilty molecules, guilty minds? The conflicting roles of the innate immune response to traumatic brain injury. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:356494.
34. Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, et al. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor  $\alpha$  and interferon  $\gamma$ . *J Cell Sci*. 2000 Jun;113 ( Pt 11):2085-90.
35. Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T. The role of the complement system in traumatic brain injury. *Brain Res Rev*. 1998;27:243-56.
36. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care*. 2002;8:101-5.
37. Correale J, Villa A. The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol*. 2004 Nov;251(11):1304-16.
38. Ziebell JM, Morganti-Kossmann C. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010;7(1):22-30.

39. Shohami E, Gallily R, Mechoulam R, Bass R, Ben-Hur T. Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant. *J Neuroimmunol.* 1997 Feb;72(2):169-77.
40. Relton JK, Rothwell NJ. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res Bull.* 1992 Aug;29(2):243-6.
41. Semple BD, Bye N, Rancan M, Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Role of CCL2 (MCP-1) in traumatic brain injury (TBI): evidence from severe TBI patients and CCL2-/- mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010 Apr;30(4):769-82.
42. Loane DJ, Kumar A, Stoica BA, Cabatbat R, Faden AI. Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014 Jan;73(1):14-29.
43. Witcher KG, Eiferman DS, Godbout JP. Priming the inflammatory pump of the CNS after traumatic brain injury. *Trends Neurosci.* 2015 Oct;38(10):609-20.
44. Johnson VE, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, Stewart W. Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain.* 2013 Jan;136(Pt 1):28-42.
45. Smith C, Gentleman SM, Leclercq PD, et al. The neuroinflammatory response in humans after traumatic brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013 Oct;39(6):654-66.
46. Huber A, Dorn A, Witzmann A, Cervós-Navarro J. Microthrombi formation after severe head trauma. *Int J Leg Med.* 1993;106(3):152-5.
47. Stein SC, Chen XH, Sinson GP, Smith DH. Intravascular coagulation: a major secondary insult in nonfatal traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2002;97:1373-7.
48. Lu D, Mahmood A, Goussev A, Qu C, Zhang ZG, Chopp M. Delayed thrombosis after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2004;21(12):1756-66.
49. Sillesen M, Rasmussen LS, Jin G, et al. Assessment of coagulopathy, endothelial injury, and inflammation after traumatic brain injury and hemorrhage in a porcine model. *J Trauma Acute Care Surg.* 2014 Jan;76(1):12-9; discussion 9-20.
50. Hekmatpanah J, Hekmatpanah CR. Microvascular alterations following cerebral contusion in rats. Light, scanning, and electron microscope study. *J Neurosurg.* 1985 Jun;62(6):888-97.

51. Maegele M. Coagulopathy after traumatic brain injury: incidence, pathogenesis, and treatment options. *Transfusion*. 2013 Jan;53 Suppl 1:28S-37S.
52. Laroche M, Kutcher ME, Huang MC, Cohen MJ, Manley GT. Coagulopathy after traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 2012 Jun;70(6):1334-45.
53. Keimowitz RM, Annis BL. Disseminated intravascular coagulation associated with massive brain injury. *J Neurosurg*. 1973;39:178-80.
54. Stein SC, Graham DI, Chen XH, Smith DH. Association between intravascular microthrombosis and cerebral ischemia in traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 2004 Mar;54(3):687-91; discussion 91.
55. Harhangi BS, Kompanje EJ, Leebeek FW, Maas AI. Coagulation disorders after traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien)*. 2008 Feb;150(2):165-75; discussion 75.
56. Lafuente JV, Cervós-Navarro J. Craniocerebral trauma induces hemorheological disturbances. *J Neurotrauma*. 1999 May;16(5):425-30.
57. Schwarzmaier SM, Kim SW, Trabold R, Plesnila N. Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma*. 2010;27(1):121-30.
58. Ploplis VA, Donahue DL, Sandoval-Cooper MJ, et al. Systemic platelet dysfunction is the result of local dysregulated coagulation and platelet activation in the brain in a rat model of isolated traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2014 Oct;31(19):1672-5.
59. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. S2e Leitlinie: Schädelhirntrauma im Erwachsenenalter. [Stand 02.12.2015, unter: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/008-001l\\_S2e\\_Schaedelhirntrauma\\_SHT\\_Erwachsene\\_2015-12.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/008-001l_S2e_Schaedelhirntrauma_SHT_Erwachsene_2015-12.pdf)].
60. Cooper DJ, Rosenfeld JV, Murray L, et al. Decompressive craniectomy in diffuse traumatic brain injury. *N Engl J Med*. 2011 Apr;364(16):1493-502.
61. Moskopp D, Wassmann H. Neurochirurgie: Handbuch für die Weiterbildung und interdisziplinäres Nachschlagewerk. 2. Auflage. Schattauer Verlag; 2014.
62. Robertson CS, Hannay HJ, Yamal JM, et al. Effect of erythropoietin administration and transfusion threshold on neurological recovery after traumatic brain injury: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2014 Jul;312(1):36-47.



63. Nichol A, French C, Little L, et al. Erythropoietin in traumatic brain injury (EPO-TBI): a double-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 2015 Dec;386(10012):2499-506.
64. Skolnick BE, Maas AI, Narayan RK, et al. A clinical trial of progesterone for severe traumatic brain injury. *N Engl J Med*. 2014 Dec;371(26):2467-76.
65. Sirén AL, Fasshauer T, Bartels C, Ehrenreich H. Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics*. 2009 Jan;6(1):108-27.
66. Kabadi SV, Faden AI. Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: improving clinical translation. *Int J Mol Sci*. 2014;15(1):1216-36.
67. Menon DK, Maas AI. Traumatic brain injury in 2014. Progress, failures and new approaches for TBI research. *Nat Rev Neurol*. 2015 Feb;11(2):71-2.
68. Schmaier AH. The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities. *J Thromb Haemost*. 2016 Jan;14(1):28-39.
69. Johne J, Blume C, Benz PM, et al. Platelets promote coagulation factor XII-mediated proteolytic cascade systems in plasma. *Biol Chem*. 2006 Feb;387(2):173-8.
70. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell*. 2009 Dec;139(6):1143-56.
71. Mackman N, Gruber A. Platelet polyphosphate: an endogenous activator of coagulation factor XII. *J Thromb Haemost*. 2010 May;8(5):865-7.
72. Silverberg M, Dunn JT, Garen L, Kaplan AP. Autoactivation of human Hageman Factor. *J Biol Chem*. 1980;255(15):7281-6.
73. Kenne E, Nickel KF, Long AT, et al. Factor XII: a novel target for safe prevention of thrombosis and inflammation. *J Intern Med*. 2015 Dec;278(6):571-85.
74. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*. 1964;145(1310-1312).
75. Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell*. 1988;53:505-18.
76. Vine AK. Recent advances in haemostasis and thrombosis. *Retina*. 2009 Jan;29(1):1-7.

77. Ratnoff OD, Colopy JE. A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J Clin Invest.* 1955;34(4):602-13.
78. Stavrou E, Schmaier AH. Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thromb Res.* 2010 Mar;125(3):210-5.
79. Björkqvist J, Nickel KF, Stavrou E, Renne T. In vivo activation and functions of the protease factor XII. *Thromb Haemost.* 2014 Nov;112(5):868-75.
80. Renne T, Pozgajova M, Gruner S, et al. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med.* 2005 Jul;202(2):271-81.
81. Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, et al. Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med.* 2006 Mar;203(3):513-8.
82. Pham M, Kleinschnitz C, Helluy X, et al. Enhanced cortical reperfusion protects coagulation factor XII-deficient mice from ischemic stroke as revealed by high-field MRI. *NeuroImage.* 2010 Feb;49(4):2907-14.
83. Renne T, Nieswandt B, Gailani D. The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. *Blood Cells Mol Dis.* 2006 Mar-Apr;36(2):148-51.
84. Renne T, Schmaier AH, Nickel KF, Blombäck M, Maas C. In vivo roles of factor XII. *Blood.* 2012;120(22):4296-303.
85. Müller F, Gailani D, Renne T. Factor XI and XII as antithrombotic targets. *Curr Opin Hematol.* 2011 Sep;18(5):349-55.
86. Rosenthal RL, Dreskin OH, Rosenthal N. New hemophilia-like disease caused by deficiency of a third plasma thromboplastin factor. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953 Jan;82(1):171-4.
87. Asakai R, Chung DW, Davie EW, Seligsohn U. Factor XI deficiency in Ashkenazi Jews in Israel. *N Engl J Med.* 1991 Jul;325(3):153-8.
88. Rosen ED, Gailani D, Castellino FJ. FXI is essential for thrombus formation following FeCl<sub>3</sub>-induced injury of the carotid artery in the mouse. *Thromb Haemost.* 2002;87:774-6.
89. Wang X, Cheng Q, Xu L, et al. Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice. *J Thromb Haemost.* 2005;3:695-702.

90. Wang X, Smith PL, Hsu MY, et al. Effects of factor XI deficiency on ferric chloride-induced vena cava thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2006;4:1982-8.
91. Gailani D, Bane CE, Gruber A. Factor XI and contact activation as targets for antithrombotic therapy. *J Thromb Haemost.* 2015 Aug;13(8):1383-95.
92. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of Kinins: Kallikrein, Kininogens and Kininases. *Pharmacol Rev.* 1992;44(1):1-80.
93. Su JB. Different cross-talk sites between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2014 Dec;15(4):319-28.
94. Maas C, Renne T. Regulatory mechanisms of the plasma contact system. *Thromb Res.* 2012 May;129 Suppl 2:S73-6.
95. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev.* 2005 Mar;57(1):27-77.
96. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 Receptor for kinins. *Pharmacol Rev.* 1998;50(3):357-86.
97. Vink R, van den Heuvel C. Substance P antagonists as a therapeutic approach to improving outcome following traumatic brain injury. *Neurotherapeutics.* 2010;7(1):74-80.
98. Raslan F, Schwarz T, Meuth SG, et al. Inhibition of bradykinin receptor B1 protects mice from focal brain injury by reducing blood-brain barrier leakage and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010 Aug;30(8):1477-86.
99. Albert-Weissenberger C, Mencl S, Schuhmann MK, et al. C1-Inhibitor protects from focal brain trauma in a cortical cryolesion mice model by reducing thrombo-inflammation. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:269.
100. Albert-Weissenberger C, Sirén AL, Kleinschnitz C. Ischemic stroke and traumatic brain injury: the role of the kallikrein-kinin system. *Prog Neurobiol.* 2013 Feb-Mar;101-102:65-82.
101. Kunz M, Nussberger J, Holtmannspötter M, Bitterling H, Plesnila N, Zausinger S. Bradykinin in blood and cerebrospinal fluid after acute cerebral lesions: correlations with cerebral edema and intracranial pressure. *J Neurotrauma.* 2013 Oct;30(19):1638-44.

102. Trabold R, Erös C, Zweckberger K, et al. The role of bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010 Jan;30(1):130-9.
103. Albert-Weissenberger C, Stetter C, Meuth SG, et al. Blocking of bradykinin receptor B1 protects from focal closed head injury in mice by reducing axonal damage and astroglia activation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Sep;32(9):1747-56.
104. Shakur H, Andrews P, Asser T, et al. The BRAIN TRIAL: a randomised, placebo controlled trial of a Bradykinin B2 receptor antagonist (Anatibant) in patients with traumatic brain injury. *Trials.* 2009;10:109.
105. Marmarou A, Nichols J, Burgess J, et al. Effects of the bradykinin antagonist Bradycor (deltibant, CP-1027) in severe traumatic brain injury: results of a multi-center, randomized, placebo-controlled trial. American Brain Injury Consortium Study Group. *J Neurotrauma.* 1999 Jun;16(6):431-44.
106. Ker K, Blackhall K. Bradykinin beta-2 receptor antagonists for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(1).
107. Thornton E, Ziebell JM, Leonard AV, Vink R. Kinin receptor antagonists as potential neuroprotective agents in central nervous system injury. *Molecules.* 2010 Sep;15(9):6598-618.
108. Bundesgesetzblatt Jahrgang 2007 Teil II Nr 37. Verordnung zu der Annahmeerklärung vom 15. Juni 2006 über die Änderung von Anhang A des Europäischen Übereinkommens zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere. 26.11.2007.
109. GV-SOLAS. Tiergerechte Haltung von Labormäusen. 20.03.2007 [abgerufen am 27.03.2015, unter: [http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/hal\\_maushaltung.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/hal_maushaltung.pdf)].
110. Pauer HU, Renne T, Hemmerlein B, et al. Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene - a model for contact phase activation in vivo. *Thromb Haemost.* 2004;92:503-8.
111. Gailani D, Lasky NM, Broze GJ. A murine model of factor XI deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1997;8(2):134-44.

112. Raslan F, Albert-Weissenberger C, Ernestus RI, Kleinschnitz C, Sirén AL. Focal brain trauma in the cryogenic lesion model in mice. *Exp Transl Stroke Med.* 2012;4:6.
113. Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat Protoc.* 2009;4(9):1328-37.
114. Hagedorn I, Schmidbauer S, Pleines I, et al. Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. *Circulation.* 2010 Apr;121(13):1510-7.
115. Mattson AM, Jensen CO, Dutcher RA. Triphenyltetrazolium chloride as a dye for vital tissues. *Science.* 1947;106:294-5.
116. Stoffel M, Blau C, Reinl H, et al. Identification of brain tissue necrosis by MRI: Validation by histomorphometry. *J Neurotrauma.* 2004;21(6):733-40.
117. Rössner W, Tempel K. Quantitative Bestimmung der Permeabilität der sogenannten Blut-Hirnschranke für Evans-Blau (T1824). *Med Pharmacol Exp.* 1966;14(2):169-82.
118. Langhauser F, Göb E, Kraft P, et al. Kininogen deficiency protects from ischemic neurodegeneration in mice by reducing thrombosis, blood-brain barrier damage, and inflammation. *Blood.* 2012 Nov;120(19):4082-92.
119. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
120. Choudhri TF, Hoh BL, Solomon RA, Connolly ES, Pinsky DJ. Use of a Spectrophotometric Hemoglobin Assay to Objectively Quantify Intracerebral Hemorrhage in Mice. *Stroke.* 1997 Nov, 1997;28(11):2296-302.
121. Mulisch M, Welsch U. Romeis - Mikroskopische Technik. 18. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
122. Perls M. Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmenten. *Archiv Pathol Anat.* 1867;39(1):42-8.
123. Burnette WN. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112:195-203.

124. GV-SOLAS. Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. Mai 2009 [abgerufen am 26.03.2015, unter: [http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/tie\\_blutentnahme09.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/tie_blutentnahme09.pdf)].
125. Sirén AL, Radyushkin K, Boretius S, et al. Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain*. 2006 Feb;129(Pt 2):480-9.
126. Rancan M, Otto VI, Hans VHJ, et al. Upregulation of ICAM-1 and MCP-1 but not of MIP-2 and sensorimotor deficit in response to traumatic axonal injury in rats. *J Neurosci Res*. 2001;63:438-46.
127. Maegele M, Schöchl H, Cohen MJ. An update on the coagulopathy of trauma. *Shock*. 2014 May;41 Suppl 1:21-5.
128. Kuijpers MJE, van der Meijden PEJ, Feijge MAH, et al. Factor XII regulates the pathological process of thrombus formation on ruptured plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:1674-80.
129. Heydenreich N, Nolte MW, Göb E, et al. C1-Inhibitor protects from brain ischemia-reperfusion injury by combined antiinflammatory and antithrombotic mechanisms. *Stroke*. 2012;43:2457-67.
130. Göb E, Reymann S, Langhauser F, et al. Blocking of plasma kallikrein ameliorates stroke by reducing thromboinflammation. *Ann Neurol*. 2015 May;77(5):784-803.
131. Nieswandt B, Kleinschnitz C, Stoll G. Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease? *J Physiol*. 2011 Sep 1;589(Pt 17):4115-23.
132. De Meyer SF, Denorme F, Langhauser F, Geuss E, Fluri F, Kleinschnitz C. Thromboinflammation in Stroke Brain Damage. *Stroke*. 2016 Apr;47(4):1165-72.
133. Joseph L, Fink LM, Hauer-Jensen M. Cytokines in coagulation and thrombosis: a preclinical and clinical review. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002;13(2):105-16.
134. Ross SA, Halliday MI, Campbell GC, Byrnes DP, Rowlands BJ. The presence of tumour necrosis factor in CSF and plasma after severe head injury. *Brit J Neurosurg*. 1994;8(4):419-25.
135. Winter CD, Iannotti F, Pringle AK, Trikkas C, Clough GF, Church MK. A microdialysis method for the recovery of IL-1beta, IL-6 and nerve growth factor from human brain in vivo. *J Neurosci Methods*. 2002 Sep;119(1):45-50.

136. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 $\beta$  synthesis. *J Cell Biol.* 2001 Aug;154(3):485-90.
137. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Dec;23(12):2131-7.
138. Thornton P, McColl BW, Greenhalgh A, Denes A, Allan SM, Rothwell NJ. Platelet interleukin-1 $\alpha$  drives cerebrovascular inflammation. *Blood.* 2010 Apr;115(17):3632-9.
139. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation.* 1998;98:1164-71.
140. Rhine T, Wade SL, Makoroff KL, Cassedy A, Michaud LJ. Clinical predictors of outcome following inflicted traumatic brain injury in children. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012 Oct;73(4 Suppl 3):S248-53.
141. Zweckberger K, Stoffel M, Baethmann A, Plesnila N. Effect of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J Neurotrauma.* 2003;20(12):1307-14.
142. Negraes PD, Trujillo CA, Pillat MM, Teng YD, Ulrich H. Roles of kinins in the nervous system. *Cell Transplant.* 2015;24(4):613-23.
143. Woodcock T, Morganti-Kossmann MC. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Front Neurol.* 2013;4:18.
144. Brunnée T, La Porta C, Reddigari SR, Salerno VM, Kaplan AP, Silverberg M. Activation of factor XI in plasma is dependent on factor XII. *Blood.* 1993;81(3):580-6.
145. Naito K, Fujikawa K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. *J Biol Chem.* 1991;266(12):7353-8.
146. Gailani D, Broze GJ. Factor XII-independent activation of factor XI in plasma: effects of sulfatides on tissue factor-induced coagulation. *Blood.* 1993;82(3):813-9.
147. Puy C, Tucker EI, Matafonov A, et al. Activated factor XI increases the procoagulant activity of the extrinsic pathway by inactivating tissue factor pathway inhibitor. *Blood.* 2015 Feb;125(9):1488-96.
148. Albert-Weissenberger C, Sirén AL. Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med.* 2010;2(1):16.

149. Morganti-Kossmann MC, Yan E, Bye N. Animal models of traumatic brain injury: is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory? *Injury*. 2010 Jul;41 Suppl 1:S10-3.
150. O'Connor WT, Smyth A, Gilchrist MD. Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation. *Pharmacol Ther*. 2011 May;130(2):106-13.
151. Hayes RL, Pechura CM, Katayama Y, Povlishock JT, Giebel ML, Becker DP. Activation of pontine cholinergic sites implicated in unconsciousness following cerebral concussion in the cat. *Science*. 1984;223:301-3.
152. Pomeranz S, Safar P, Radovsky A, Tisherman SA, Alexander H, Stezoski W. The effect of resuscitative moderate hypothermia following epidural brain compression on cerebral damage in a canine outcome model. *J Neurosurg*. 1993;79:241-51.
153. Glass TF, Fabian MJ, Schweitzer JB, Weinberg JA, Proctor KG. The impact of hypercarbia on the evolution of brain injury in a porcine model of traumatic brain injury and systemic hemorrhage. *J Neurotrauma*. 2001;18(1):57-71.
154. Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, Graham DI, Thompson CJ, Marcincin RP. Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. *Ann Neurol*. 1982;12:564-74.
155. Statler KD, Jenkins LW, Dixon CE, Clark RS, Marion DW, Kochanek PM. The simple model versus the super model: translating experimental traumatic brain injury research to the bedside. *J Neurotrauma*. 2001 Nov;18(11):1195-206.
156. Haring RS, Narang K, Canner JK, et al. Traumatic brain injury in the elderly: morbidity and mortality trends and risk factors. *J Surg Res*. 2015 May;195(1):1-9.
157. Fu TS, Jing R, McFaul SR, Cusimano MD. Recent trends in hospitalization and in-hospital mortality associated with traumatic brain injury in Canada: A nationwide, population-based study. *J Trauma Acute Care Surg*. 2015;79(3):449-55.
158. Wright DW, Espinoza TR, Merck LH, Ratcliff JJ, Backster A, Stein DG. Gender differences in neurological emergencies part II: a consensus summary and research agenda on traumatic brain injury. *Acad Emerg Med*. 2014 Dec;21(12):1414-20.
159. Gordon EM, Douglas JG, Ratnoff OD, Arafah BM. The influence of estrogen and prolactin on Hageman factor (factor XII) titer in ovariectomized and hypophysectomized rats. *Blood*. 1985 Sep;66(3):602-5.



160. Farsetti A, Misiti S, Citarella F, et al. Molecular basis of estrogen regulation of Hageman factor XII gene expression. *Endocrinology*. 1995 Nov;136(11):5076-83.
161. Geerts WH, Code KI, Jay RM, Chen E, Szalai JP. A prospective study of venous thromboembolism after major trauma. *N Engl J Med*. 1994;331(24):1601-6.
162. Chelladurai Y, Stevens KA, Haut ER, et al. Venous thromboembolism prophylaxis in patients with traumatic brain injury: a systematic review. *F1000Research*. 2013;2:132.
163. Dudley RR, Aziz I, Bonnici A, et al. Early venous thromboembolic event prophylaxis in traumatic brain injury with low-molecular-weight heparin: risks and benefits. *J Neurotrauma*. 2010 Dec;27(12):2165-72.
164. Shen X, Dutcher SK, Palmer J, et al. A Systematic Review of the Benefits and Risks of Anticoagulation Following Traumatic Brain Injury. *J Head Trauma Rehabil*. 2015 Jul-Aug;30(4):E29-37.
165. Peck KA, Calvo RY, Schechter MS, et al. The impact of preinjury anticoagulants and prescription antiplatelet agents on outcomes in older patients with traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014 Feb;76(2):431-6.
166. Albrecht JS, Liu X, Baumgarten M, et al. Benefits and risks of anticoagulation resumption following traumatic brain injury. *JAMA Intern Med*. 2014 Aug;174(8):1244-51.
167. Kim L, Schuster J, Holena DN, Sims CA, Levine J, Pascual JL. Early initiation of prophylactic heparin in severe traumatic brain injury is associated with accelerated improvement on brain imaging. *J Emerg Trauma Shock*. 2014;7(3):141-8.
168. Stutzmann JM, Mary V, Wahl F, Grosjean-Piot O, Uzan A, Pratt J. Neuroprotective profile of enoxaparin, a low molecular weight heparin, in in vivo models of cerebral ischemia or traumatic brain injury in rats: a review. *CNS Drug Rev*. 2002;8(1):1-30.
169. Bolton-Maggs PH. The rare inherited coagulation disorders. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60 Suppl 1:S37-40.
170. Xu Y, Cai TQ, Castriota G, et al. Factor XIIa inhibition by Infestin-4: in vitro mode of action and in vivo antithrombotic benefit. *Thromb Haemost*. 2014 Apr;111(4):694-704.
171. Scherrmann JM. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vasc Pharmacol*. 2002;38:349-54.

172. de Boer AG, van der Sandt IC, Gaillard PJ. The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:629-56.
173. Pardridge WM. The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in brain drug development. *Neurotherapeutics.* 2005;2:3-14.
174. Habgood MD, Bye N, Dziegielewska KM, et al. Changes in blood-brain barrier permeability to large and small molecules following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci.* 2007 Jan;25(1):231-8.
175. Lafrenaye AD, Todani M, Walker SA, Povlishock JT. Microglia processes associate with diffusely injured axons following mild traumatic brain injury in the micro pig. *J Neuroinflammation.* 2015;12:186.
176. Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics.* 2010 Oct;7(4):366-77.
177. Gardner RC, Yaffe K. Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease. *Mol Cell Neurosci.* 2015 May;66(Pt B):75-80.
178. McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, et al. Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy following repetitive head injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009 Jul;68(7):709-35.
179. McKee AC, Daneshvar DH, Alvarez VE, Stein TD. The neuropathology of sport. *Acta Neuropathol.* 2014 Jan;127(1):29-51.
180. Coughlin JM, Wang Y, Munro CA, et al. Neuroinflammation and brain atrophy in former NFL players: An in vivo multimodal imaging pilot study. *Neurobiol Dis.* 2015 Feb;74:58-65.
181. Gentleman SM, Leclercq PD, Moyes L, et al. Long-term intracerebral inflammatory response after traumatic brain injury. *F.* 2004 Dec 16;146(2-3):97-104.
182. Kumar A, Loane DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun.* 2012 Nov;26(8):1191-201.
183. Breunig JJ, Guillot-Sestier MV, Town T. Brain injury, neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2013;5:26.
184. Jordan BD. The clinical spectrum of sport-related traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol.* 2013 Apr;9(4):222-30.

185. Walker KR, Tesco G. Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury. *Front Aging Neurosci.* 2013;5:29.

## 7 Anhang

Tabelle 7-1 – Patientendaten

|     | Alter<br>[Jahre] | Geschlecht | Krankheiten<br>oder<br>Verletzungen | Todesursache (bei<br>Obduktion) | Herkunft des<br>Gehirngewebes |
|-----|------------------|------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| #1  | 65               | M          | SHT                                 | -                               | Kraniektomie                  |
| #2  | 50               | M          | SHT                                 | -                               | Kraniektomie                  |
| #3  | 58               | M          | SHT                                 | -                               | Kraniektomie                  |
| #4  | 52               | M          | SHT                                 | -                               | Kraniektomie                  |
| #5  | 25               | M          | SHT                                 | -                               | Kraniektomie                  |
| #6  | 51               | M          | SHT                                 | -                               | Kraniektomie                  |
| #7  | 48               | M          | SHT                                 | -                               | Kraniektomie                  |
| #8  | 68               | M          | SHT                                 | -                               | Kraniektomie                  |
| #9  | 52               | M          | SHT                                 | -                               | Kraniektomie                  |
| #10 | 25               | M          | SHT                                 | -                               | Kraniektomie                  |
| #11 | 43               | F          | SHT                                 | SHT                             | Obduktion                     |
| #12 | 63               | M          | Akute<br>myeloische<br>Leukämie     | Sepsis                          | Obduktion                     |
| #13 | 62               | F          | Herzinsuffizienz                    | Multiorganversagen              | Obduktion                     |
| #14 | 50               | M          | -                                   | Pulmonale<br>Dysfunktion        | Obduktion                     |
| #15 | 43               | M          | -                                   | Pankreatitis                    | Obduktion                     |
| #16 | 69               | M          | -                                   | N/A                             | Obduktion                     |
| #17 | 52               | M          | -                                   | Vorderwandinfarkt               | Obduktion                     |
| #18 | 56               | M          | -                                   | Epilepsie?                      | Obduktion                     |
| #19 | 22               | M          | -                                   | N/A                             | Obduktion                     |
| #20 | 45               | F          | -                                   | N/A                             | Obduktion                     |

F = weiblich; M = männlich; N/A = keine Angabe

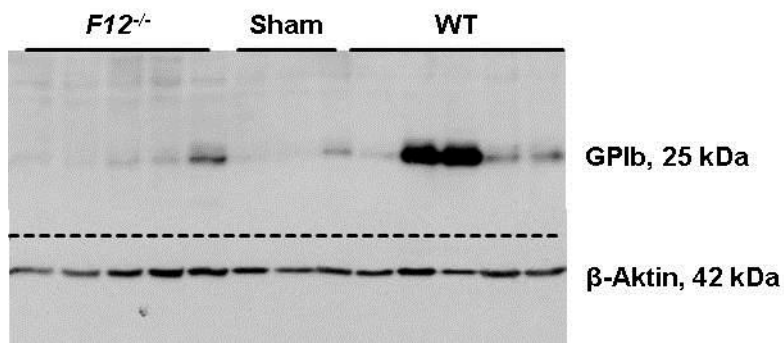


Abbildung 7-1. Western Blot zu Abb. 4-6C, Tag 1 nach SHT.

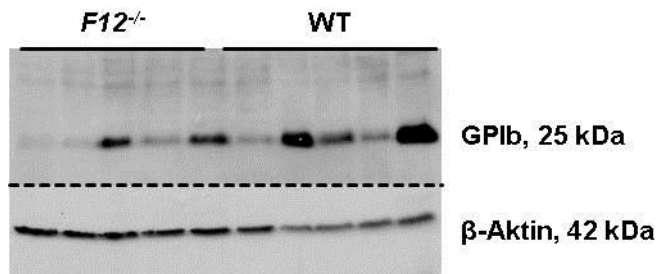


Abbildung 7-2. Western Blot zu Abb. 4-6C, Tag 3 nach SHT.

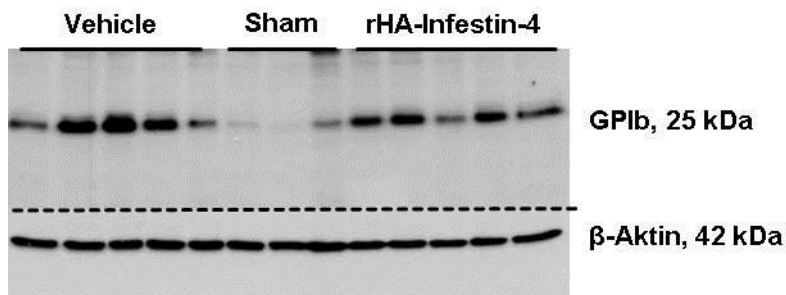


Abbildung 7-3. Western Blot zu Abb. 4-7C, Tag 1 nach SHT.

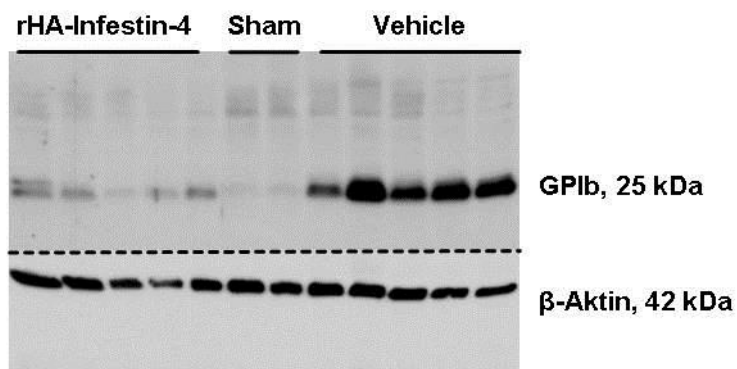


Abbildung 7-4. Western Blot zu Abb. 4-7C, Tag 3 nach SHT.

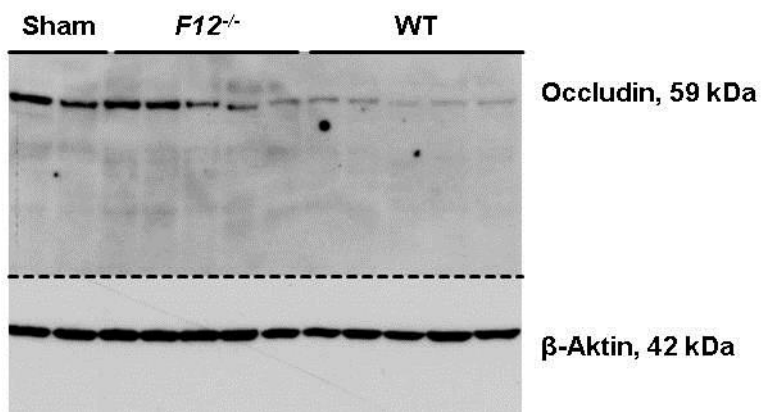


Abbildung 7-5. Western Blot zu Abb. 4-15C, Tag 3 nach SHT.

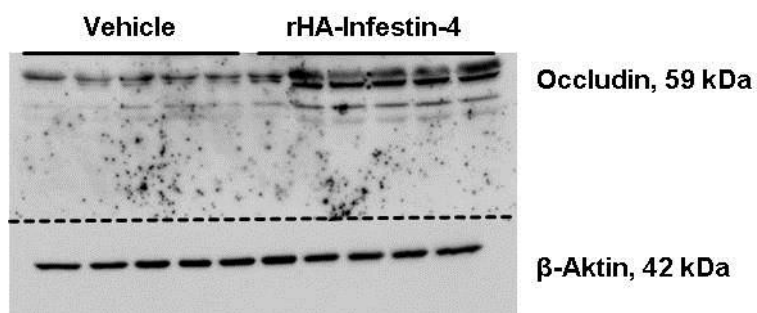


Abbildung 7-6. Western Blot zu Abb. 4-19C, Tag 1 nach SHT.

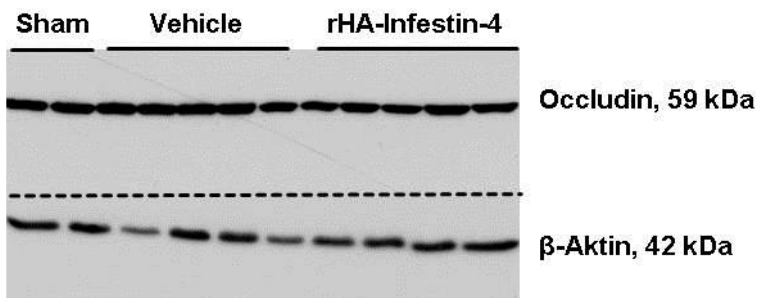


Abbildung 7-7. Western Blot zu Abb. 4-19C, Tag 3 nach SHT.

### Abkürzungen

|                  |                                           |
|------------------|-------------------------------------------|
| ANOVA            | Varianzanalyse                            |
| B <sub>1</sub> R | Bradykinin-1-Rezeptor                     |
| B <sub>2</sub> R | Bradykinin-2-Rezeptor                     |
| BCA              | Bicinchoninsäure                          |
| BHS              | Blut-Hirn-Schranke                        |
| BL/6             | C57BL/6N-Mäuse                            |
| BSA              | bovines Serumalbumin                      |
| CCL2             | CC-Chemokinligand 2                       |
| CISS             | Constructive Interference in Steady State |
| DAB              | 3,3'-Diaminobenzidin                      |
| DIC              | disseminierte intravasale Koagulopathie   |
| ELISA            | Enzyme Linked Immunosorbent Assay         |
| FXI              | Gerinnungsfaktor XI                       |
| FXII(a)          | (aktivierter) Gerinnungsfaktor XII        |
| GAPDH            | Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase  |
| GPIb             | Glykoprotein Ib                           |
| hFXII            | humaner Gerinnungsfaktor XII              |
| HRPO             | Meerrettichperoxidase                     |
| ICAM-1           | Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1        |
| IL-1 $\beta$     | Interleukin-1 $\beta$                     |
| Infestin         | rHA-Infestin-4                            |
| KG               | Körpergewicht                             |
| KKS              | Kallikrein-Kinin-System                   |
| MRT              | Magnetresonanztomographie                 |
| NeuN             | neuronal nuclei                           |

|              |                                                                                                            |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NSS          | Neurological Severity Score                                                                                |
| PBS          | phosphatgepufferte Salzlösung                                                                              |
| PFA          | Paraformaldehyd                                                                                            |
| PTT          | partielle Thromboplastinzeit                                                                               |
| PVDF         | Polyvinylidenfluorid                                                                                       |
| RAS          | Renin-Angiotensin-System                                                                                   |
| RNS          | Reaktive Stickstoffspezies                                                                                 |
| ROS          | Reaktive Sauerstoffspezies                                                                                 |
| RT-PCR       | Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion                                                                         |
| SDS-PAGE     | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese                                                        |
| SEM          | Standardfehler                                                                                             |
| SHT          | Schädel-Hirn-Trauma                                                                                        |
| SWI          | Susceptibility-weighted imaging                                                                            |
| TierSchG     | Tierschutzgesetz                                                                                           |
| TierSchVersV | Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren |
| TNF $\alpha$ | Tumornekrosefaktor $\alpha$                                                                                |
| TTC          | 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid                                                                          |
| TUNEL        | TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling                                                                 |
| WT           | Wildtyp                                                                                                    |



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Christoph Kleinschnitz angefertigt.

Während der Dauer meines Promotionsprojekts (September 2013 bis August 2016) haben mich viele Menschen unterstützt. Daher gilt mein Dank vor allem:

- Prof. Christoph Kleinschnitz, der es mir ermöglicht hat, diese Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Für die vielen wertvollen Erfahrungen, die ich in dieser Zeit sammeln konnte, möchte ich mich herzlich bedanken.
- Prof. Anna-Leena Sirén, für die wissenschaftlich exzellente Betreuung dieser Arbeit.
- Prof. Bernhard Nieswandt, für seine sehr hilfreichen Anregungen und Kommentare und die Begutachtung meiner Arbeit.
- Dr. Christiane Albert-Weißberger, für ihre fachliche und menschliche Unterstützung, für die vielen anregenden Diskussionen, für das sorgsame Korrekturlesen dieser Dissertation und die ausgezeichnete Zusammenarbeit.
- Meinen Kollegen, im Besonderen Melanie Dittmeier, Dr. Michael Bieber und Dr. Stine Mencl, für ihre Unterstützung bei der Einweisung in die Laborarbeit, ihre Geduld und den ganz außergewöhnlich guten und freundschaftlichen Zusammenhalt in unserer Gruppe.
- Meiner Familie, für ihre immerwährende Unterstützung in jeder Hinsicht. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

## Publikationen

**Hopp S**, Nolte MW, Kleinschnitz C, Sirén AL, Albert-Weissenberger C (2016). *Alleviation of secondary brain injury, posttraumatic inflammation and brain edema formation by inhibition of Factor XIIIa*, Journal of Neuroinflammation, Status: unter Begutachtung

**Hopp S\***, Albert-Weissenberger C\*, Mencl S, Bieber M, Schuhmann MK, Stetter C, Nieswandt B, Schmidt PM, Monoranu CM, Alafuzoff I, Marklund N, Nolte MW, Sirén AL, Kleinschnitz C (2016). *Targeting Coagulation Factor XII as a Novel Therapeutic Option in Brain Trauma*, Annals of Neurology, 79(6) 970-982

\* Die Autoren haben zu gleichen Teilen zur Veröffentlichung beigetragen.

**Hopp S**, Albert-Weissenberger C (2015). *The kallikrein-kinin system: a promising target for traumatic brain injury*, Neural Regeneration Research 10(6) 885-886

Albert-Weissenberger C, Mencl S, **Hopp S**, Kleinschnitz C, Sirén AL (2014) *Role of the kallikrein-kinin system in traumatic brain injury*. Frontiers in Cellular Neuroscience 8:345

Albert-Weissenberger C, Mencl S, Schuhmann MK, Salur I, Göb E, Langhauser F, **Hopp S**, Hennig N, Meuth SG, Nolte MW, Sirén AL and Kleinschnitz C (2014). *C1-Inhibitor protects from focal brain trauma in a cortical cryolesion mice model by reducing thromboinflammation*. Frontiers in Cellular Neuroscience 8:269.

Mencl S, Hennig N, **Hopp S**, Schuhmann MK, Albert-Weissenberger C, Sirén AL, Kleinschnitz C (2014). *FTY720 does not protect from traumatic brain injury in mice despite reducing posttraumatic inflammation*, Journal of Neuroimmunology 274, 125-131

## Vorträge

FXII inhibition protects from experimental brain trauma by reducing thrombus formation. XXVII<sup>th</sup> International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, Juni 2015, Vancouver (Kanada).

FXII inhibition protects mice from traumatic brain injury by reducing thrombus formation and inflammation. 87. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, September 2014, München (Deutschland).

### **Posterpräsentationen**

Deficiency of Factor XII protects mice from traumatic brain injury by enhancing blood-brain-barrier stability and reduction of inflammation. 9<sup>th</sup> International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair, April 2016, Leipzig (Deutschland).

Selective Inhibition Of Factor XIIa Enhances Blood-Brain-Barrier Stability And Reduces Inflammatory Responses In Experimental Traumatic Brain Injury. 11<sup>th</sup> World Congress on Brain Injury, März 2016, Den Haag (Niederlande).

Deficiency of Factor XII enhances blood-brain-barrier stability and reduces inflammatory responses in experimental traumatic brain injury. 88. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, September 2015, Düsseldorf (Deutschland).

C1-Inhibitor protects from traumatic brain injury by reducing blood-brain-barrier leakage and thrombus formation in mice. 8<sup>th</sup> International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair, April 2014, Magdeburg (Deutschland).

### **Patentanmeldung**

WO 2015/193457 A1, *Therapy using a FXII inhibitor in a neurotraumatic disorder*, M.W. Nolte, C. Kleinschnitz, A.-L. Sirén, C. Albert-Weißberger, S. Hopp

---

### Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „*Studies on the pathophysiology and therapeutic relevance of the coagulation factor XII following experimental traumatic brain injury*“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, .....

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „*Untersuchungen zur Pathophysiologie und therapeutischer Relevanz des Blutgerinnungsfaktors XII nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma*“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, .....