

**Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. U. Walter**

**Pathologische Aktivierung des Gerinnungsfaktors XII –  
Heparin-Protamin-Komplikationen**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Julia Johne**

**aus Erfurt**

**Würzburg, Oktober 2008**

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. Dr. Thomas Renné

**Koreferent:** Prof. Dr. Kai Schuh

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 28.11.2008

**Die Promovendin ist Ärztin**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Das Kontaktphasensystem.....	1
1.2	Heparin-Protamin-Komplikationen.....	5
1.2.1	Biochemie.....	5
1.2.2	Anwendung und Klinik der Komplikationen .....	6
1.2.3	Pathophysiologische Erklärungsmodelle.....	7
1.3	Zielsetzung .....	10
<b>2</b>	<b>Material</b> .....	11
2.1	Geräte .....	11
2.2	Verbrauchsmaterial.....	12
2.3	Chemikalien, Medien und sonstige Substanzen .....	12
2.4	Kits .....	13
2.5	Bakterienstämme .....	14
2.6	Eukaryotische Zelllinien.....	14
2.7	Mausstämme.....	14
2.8	Defizienzplasmen .....	14
2.9	Antikörper.....	15
2.10	Medien und Medienzusätze zur Bakterienkultur.....	15
2.11	Medien und Medienzusätze zur Kultur eukaryotischer Zellen.....	16
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	17
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	17
3.1.1	DNA-Isolierung aus Mausschwänzen .....	17
3.1.2	Retransformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E.coli</i> .....	17
3.1.3	Plasmidisolation aus Bakterien (Mini- und Midipräparation).....	17
3.1.4	Bestimmung von DNA .....	18
3.1.5	PCR - „Polymerase Chain Reaction“ .....	18
3.1.6	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen .....	21
3.2	Proteinbiochemische Methoden .....	21
3.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	21

3.2.2	"Western Blot" und Immunodetektion .....	22
3.2.3	HK-Spaltungsassay.....	23
3.2.4	Aktivierung der Kontaktphase auf Endothelzellen.....	24
3.3	Zellkultur .....	25
3.3.1	Zellkultur von adhärenen Zellen .....	25
3.3.2	Auftauen und Einfrieren von Zelllinien .....	25
3.3.3	Transfektion von adhärenen Zellen.....	26
3.4	NO-Messung in Endothelzellen mit Fluoreszenzmikroskopie.....	26
3.5	Invasive Blutdruckmessung nach Protamininjektion im Mausmodell.....	27
3.5.1	Mauspräparation.....	27
3.5.2	Versuchsdurchführung .....	27
3.6	Nachweis von BK in humanem Plasma .....	28
3.6.1	Probengewinnung und -aufbereitung für die BK-Messung.....	28
3.6.2	Bestimmung von BK in humanem Plasma mittels kompetitiven EIA .....	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
4.1	Kontaktphasenaktivierung durch Heparin und Protamin in humanem Plasma..	30
4.2	Aktivierung der Kontaktphase an Endothelzelloberflächen.....	31
4.3	NO-Produktion in Endothelzellen nach Kontaktphasenaktivierung .....	34
4.4	Heparin-Protamin induzierte Kontaktphasenaktivierung in genetisch veränderten Mausmodellen.....	36
4.4.1	Blutdruckeffekt von Heparin und Protamin .....	36
4.4.2	Herzfrequenzeffekt von Heparin und Protamin.....	39
4.5	Effekt von Heparin und Protamin beim Menschen .....	41
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>43</b>
5.1	Heparinkomplikationen .....	43
5.2	Mausmodell versus Mensch .....	46
5.3	Pathophysiologie der Heparin-Protamin-Komplikationen .....	47
5.4	Ausblick.....	50
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung /Summary</b> .....	<b>51</b>
6.1	Zusammenfassung .....	51

6.2	Summary.....	52
7	<b>Literatur</b> .....	53
8	<b>Abkürzungen</b> .....	62

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Kontaktphasensystem

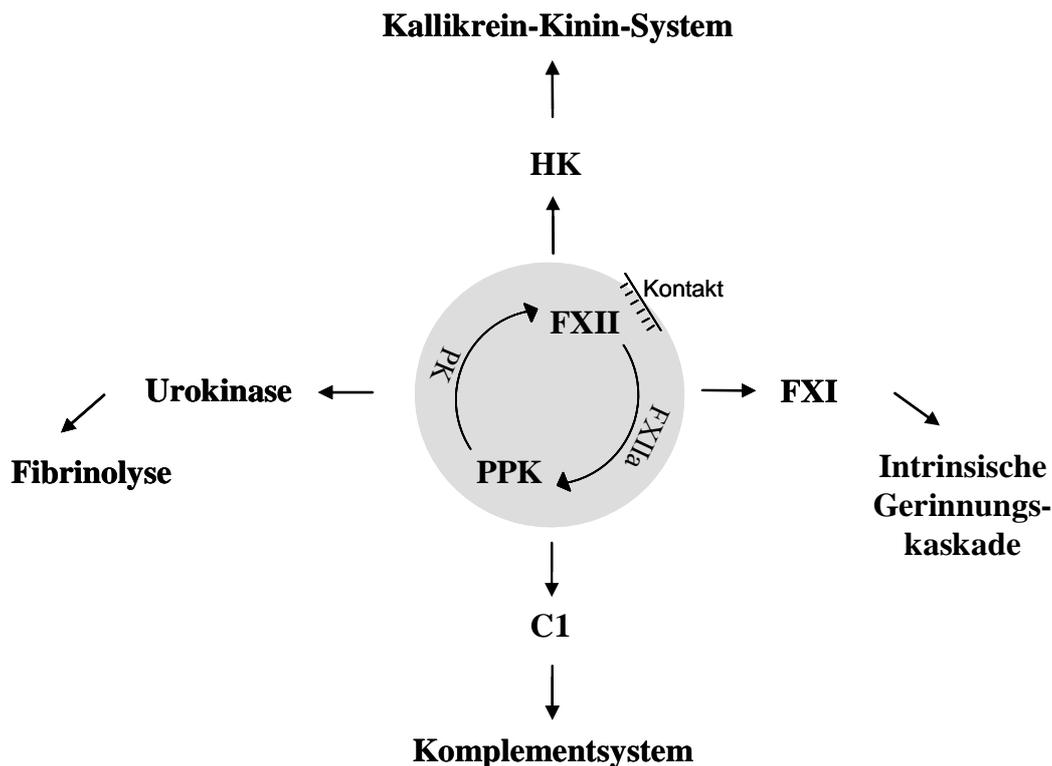
Die vier Plasmaproteine Faktor XII (FXII), Plasmakallikrein, hochmolekulares Kininogen (HK) und C1-Esterase Inhibitor (C1Inh) werden als Kontaktphasensystemproteine zusammengefasst, da sie durch Kontakt zu negativ geladenen Oberflächen (z.B. Kaolin, Glas oder Dextransulfat) aktiviert werden. Plasmaprothrombin zirkuliert im Plasma in einem nicht-kovalenten Komplex mit HK, welcher über HK an Zellen binden kann (Thompson *et al.*, 1977).

FXII ist eine Serinprotease von 80-90 kDa. Das Protein zirkuliert als Zymogenform in einer Konzentration von zirka 30 µg/ml in humanem Plasma und wird in Hepatozyten produziert (Cool *et al.*, 1985; Griffin and Cochrane, 1976; Revak and Cochrane, 1976; Saito *et al.*, 1976). Durch proteolytische Prozessierung wird FXII in eine leichte (28 kDa) und eine schwere Kette (52 kDa) gespalten, wobei die leichte Kette das katalytische Zentrum enthält. In der schweren Kette sind die Oberflächenbindungsregionen lokalisiert, die den „Kontakt“ zu negativen Polyanionen vermitteln (Clarke *et al.*, 1989; Pixley *et al.*, 1987). FXII kann einerseits direkt durch Plasmakallikrein und Plasmin durch Spaltung der Bindung Arg353-Val354 aktiviert werden. Alternativ erfährt FXII durch „Kontakt“ zu negativ geladenen Oberflächen (z.B. Glas, Kaolin und Dextransulfat) (Cochrane *et al.*, 1973; Griffin, 1978) eine Konformationsänderung. Dadurch wird das Zymogen eine aktive Protease, die sich dann proteolytisch ebenfalls an Arg353-Val354 selbst aktiviert (Dunn *et al.*, 1982; Espana and Ratnoff, 1983; Silverberg *et al.*, 1980; Tankersley and Finlayson, 1984). Dieser Mechanismus ist eine Autoaktivierung. Nach der Spaltung des Zymogens in eine leichte und eine schwere Kette bleiben diese noch über eine Disulfidbrücke (AS: Cys340, Cys346) miteinander verbunden. In dieser Form wird der aktive FXII als αFXIIa bezeichnet. Die vollständige Trennung der beiden Ketten erfolgt über zwei weitere durch Kallikrein vermittelte Proteolyseschritte (Pixley *et al.*, 1985; Samuel *et al.*, 1992). Die nach dieser Trennung entstandenen und enzymatisch aktiven Fragmente werden als βFXIIa (ehemals leichte Kette) und βFXIIb („fragments“) bezeichnet. Die

irreversible Inaktivierung von FXIIa erfolgt im Plasma zum größten Teil durch C1Inh (de Agostini *et al.*, 1984; Pixley *et al.*, 1985; Schreiber *et al.*, 1973). Des Weiteren kann FXII durch Antithrombin III und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) inaktiviert werden (Berrettini *et al.*, 1989; Pixley *et al.*, 1985). FXIIa kann verschiedene Proteine aktivieren. So wird über FXIIa die intrinsische Gerinnungskaskade gestartet (Davie and Ratnoff, 1964), wobei FXIIa den Gerinnungsfaktor XI (FXI) aktiviert (Ratnoff and Saito, 1979). Im Gegensatz zu einem Mangel an den Gerinnungsfaktoren VIII und IX (Hämophilie) führt eine Defizienz an FXII jedoch nicht zu einem erhöhten Blutungsrisiko sondern lediglich zu einer Verlängerung des Gerinnungstests aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit) (Matsuura *et al.*, 2001), weshalb die Bedeutung des FXII für die Hämostase lange Zeit umstritten war. In neueren Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass Mäuse, die einen Mangel an FXII aufwiesen, wesentlich instabilere arterielle Thromben bildeten und vor zerebralen Insulten geschützt sind (Kleinschnitz *et al.*, 2006; Renne *et al.*, 2005).

FXIIa besitzt auch einen antikoagulativen Effekt, da Kallikrein und FXIIa Plasminogen spalten können und Kallikrein zudem auch Prourokinase in fibrinolytisch wirksame Urokinase umwandeln kann (Loza *et al.*, 1994). FXIIa ist außerdem in der Lage, durch eine Spaltung von Komplementfaktor C1 den klassischen Weg des Komplementsystems zu aktivieren (Ghebrehiwet *et al.*, 1983). Das Komplementsystem ist ein Teil des unspezifischen humoralen Immunsystems, welches zur Elimination von zellulären Antigenen (z.B. Bakterien) beiträgt und damit die proinflammatorischen Eigenschaften des Bradykinins unterstützt.

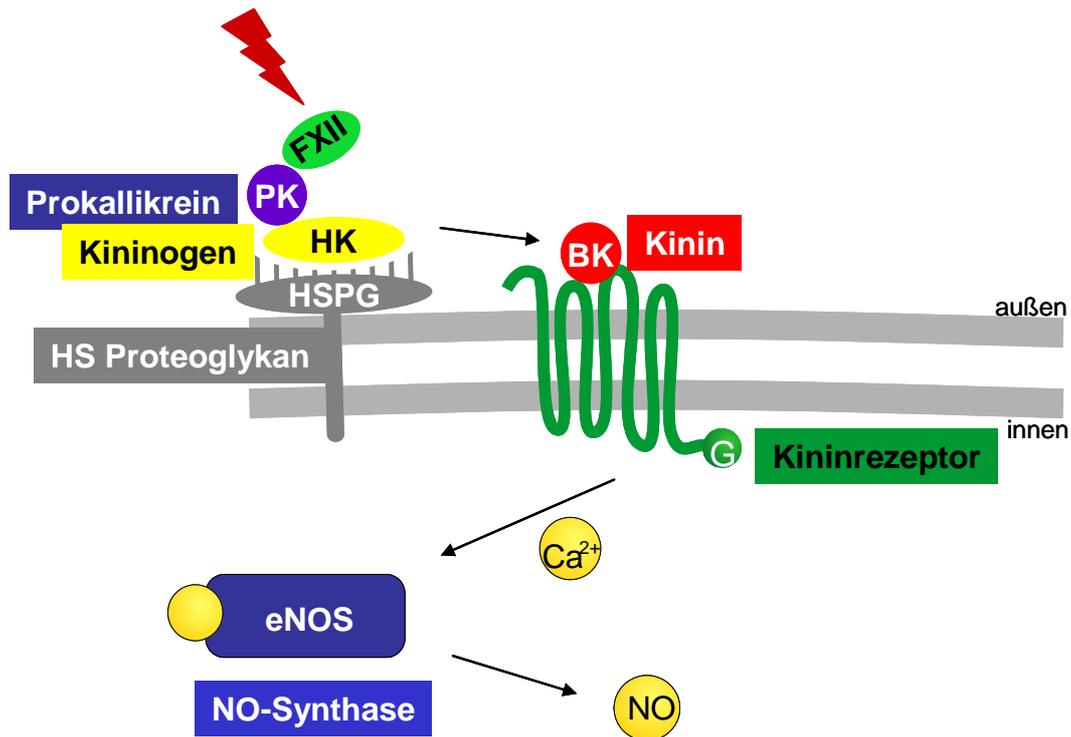
Als vierter FXIIa-aktivierter Signalweg existiert das Kallikrein-Kinin System (Kaplan *et al.*, 2002; Ratnoff and Saito, 1979). Aktives Plasmakallikrein spaltet aus hochmolekularem Kininogen (HK) das vasoaktive Nonapeptid Bradykinin (BK) heraus (Nishikawa *et al.*, 1992) und aktiviert wiederum FXII, was durch einen positiven „Feedback“-Mechanismus zu einer verstärkten Freisetzung von BK führt (Cochrane and Revak, 1980). Die vier durch FXII aktivierten Kaskadensysteme sind in Abb.1.1 dargestellt.



**Abb. 1.1: Schematische Übersicht über das Kontaktphasensystem.**

FXII wird durch Bindung an Oberflächen aktiviert (FXIIa). Aktivierter FXII setzt Plasmakallikrein (PK) zu Plasmaprocallikrein (PPK) um, das wiederum FXII aktiviert und aus hochmolekularem Kininogen Bradykinin freisetzt. Außerdem kann FXIIa die intrinsische Gerinnungskaskade, das Komplementsystem und die Fibrinolyse aktivieren.

Die Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems leitet durch die Freisetzung von Bradykinin (BK) eine Reihe zellulärer Signalwege ein (Colman and Schmaier, 1997). BK ist ein Peptidhormon mit vasodilatatorischen und proinflammatorischen Eigenschaften und vermittelt seine Wirkung über die Bindung an den B2-Rezeptor (B2R). B2R ist G-Protein gekoppelt und eine Aktivierung führt über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu einer Stimulation intrazellulärer Signalwege. So wird zum Beispiel B2R-vermittelt die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) stimuliert, woraus eine erhöhte intrazelluläre NO-Produktion resultiert (Palmer *et al.*, 1987). Stickstoffmonoxid kann über die Zellmembran diffundieren und an den subendothelialen glatten Muskelzellen der Gefäße eine Relaxation induzieren, wodurch dann der systemische Blutdruck sinkt (Michell *et al.*, 2002).



**Abb. 1.2: BK-induzierte NO-Kaskade**

Durch die Aktivierung des Kontaktphasensystems wird Bradykinin (BK) freigesetzt, dieses kann an den Kininrezeptor binden und die eNOS kalziumvermittelt aktivieren. Dies führt intrazellulär zur Freisetzung von NO.

Direkt vasodilatatorisch wirkt BK durch seine Fähigkeit die endotheliale Prostazyklinsynthese zu stimulieren, was zusätzlich auch einen plättcheninhibierenden Effekt hat. Die proinflammatorischen Eigenschaften des BK's äußern sich neben der Vasodilatation durch eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität und der Vermittlung von Schmerzreizen durch Stimulation nozizeptiver Nervenfasern (Couture *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2002). Die Plasmahalbwertszeit von BK ist mit < 30 Sekunden sehr kurz, da es rasch durch ubiquitäre Proteasen, wie das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) oder die Carboxypeptidase N, abgebaut wird (Plummer and Erdos, 1981; Stewart *et al.*, 1981; Yang and Erdos, 1967).

Die Aktivierung der Kontaktphasenkaskade hat aber nicht nur einen blutdrucksenkenden Effekt. Über eine Umsetzung von Prorenin zu Renin aktiviert Kallikrein das Renin-Angiotensin-System und bewirkt dadurch eine Gegenregulation zur hypotensiven Wirkung von BK (Schmaier, 2002).

Eine Aktivierung des FXII-getriebenen Kontaktphasensystems hat somit vielfältige Auswirkungen im kardiovaskulären System, wie die Stimulation der Komplementkaskade, der Blutgerinnung/Thrombusbildung und der Fibrinolyse. Im Vordergrund dieser Arbeit steht die BK-induzierte und NO-vermittelte Vasodilatation, also das Kallikrein-Kinin System.

## **1.2 Heparin-Protamin-Komplikationen**

### **1.2.1 Biochemie**

Heparin ist ein sulfatiertes Polysaccharid, das alternierend aus D-Glucosamin- und Uronsäureresten (D-Glucuronsäure und L-Iduronsäure) besteht (Lindahl and Kjellen, 1991) und den Hauptbestandteil in den sekretorischen Granula von Mastzellen im Bindegewebe und Peritoneum bildet (Kjellen and Lindahl, 1991; Stevens and Austen, 1989). Heparin ist essentiell für die Speicherung von spezifischen granulären Proteasen in Mastzellen (Humphries *et al.*, 1999). Heparin-defiziente Mäuse weisen eine verminderte Anzahl an Bindegewebsmastzellen auf. Diese Mastzellen sind morphologisch verändert und zeigen schwere Defekte der sekretorischen Granula (Forsberg *et al.*, 1999).

Klinische Bedeutung findet Heparin vor allem durch den Einsatz als Antikoagulant (Hirsh *et al.*, 2001). Die gerinnungshemmende Wirkung beruht auf einer Komplexbildung mit Antithrombin (AT, früher AT III), einem im Blut zirkulierenden Glykoprotein, das aktivierte Gerinnungsfaktoren hemmt (Lindahl *et al.*, 1979). AT wirkt antikoagulativ, indem es sich irreversibel an das katalytische Zentrum von Gerinnungsfaktoren, die Proteasen sind, anlagert und diese blockiert. Heparin kann durch die Komplexbildung mit AT die Geschwindigkeit der Anlagerung um mehr als das 1000-fache steigern.

Der Antagonist von Heparin ist Protamin, ein polykationisches, alkalisches Protein, das zu annähernd zwei Drittel aus der Aminosäure Arginin aufgebaut ist (Ando *et al.*, 1973).

Protamin kommt in menschlichem und tierischem Sperma sowie der Samenflüssigkeit von Lachsen vor. Letztere ist auch die kommerzielle Quelle für die Gewinnung von klinisch eingesetztem Protamin. Im späten Stadium der Spermatiden übernimmt das Protamin die Funktion von Histonproteinen, die für die Kondensation und Packungsdichte der DNA im Zellkern verantwortlich sind und deren negative Ladungen neutralisiert (Balhorn, 1982; Balhorn *et al.*, 2000). Der Austausch der Histonproteine gegen Protamin sowie eine damit verbundene Reorganisation und Kondensation der DNA in den Spermatiden, führt zu einer sehr dicht gepackten DNA mit einer erhöhten Resistenz gegenüber chemischem und mechanischem Stress (Brewer *et al.*, 2002). Seine antagonisierende Wirkung gegenüber Heparin entfaltet das positiv geladene Protamin durch die Bildung eines Salzkomplexes mit dem negativ geladenen Heparin, wodurch Heparin aus seiner Bindung mit AT verdrängt wird (Hobbhahn *et al.*, 1991a; Hobbhahn *et al.*, 1991b).

### **1.2.2 Anwendung und Klinik der Komplikationen**

Heparin wird niedrig dosiert (5000-7500 IE/12h) zur Prophylaxe von Thrombosen und Lungenembolien in der peri- und postoperativen Phase sowie bei längerer Immobilisierung eingesetzt (Hirsh *et al.*, 2001). Erforderlich ist eine prophylaktische Heparinisierung auch bei Herzkatheteruntersuchungen sowie immer dann, wenn Blut im Rahmen von extrakorporalen Kreisläufen mit Fremdoberflächen in „Kontakt“ kommt. Dies erfolgt z.B. bei Stammzellapharese, Dialyse-Behandlungen oder dem Einsatz von Herz-Lungen-Maschinen. Im Gegensatz zur prophylaktischen Heparintherapie sind die häufigsten Indikationen für eine hochdosierte therapeutische Gabe von Heparin (5000 IE Bolus, dann 10.000-12.500 IE/12h) Herzrhythmusstörungen, wie Vorhofflimmern oder -flattern. Heparin wird auch nach tiefen Beinvenenthrombosen verabreicht, um eine weitere Ausdehnung des Thrombus bzw. ein Rezidiv zu verhindern sowie nach Operationen mit Herzklappenersatz (Hirsh *et al.*, 2001).

Aus der Wirkung des Medikamentes ergibt sich mit einem erhöhten Risiko für Blutungen auch die wesentlichste Nebenwirkung (Hirsh, 1984; Juergens *et al.*, 1997), Weitere unerwünschte Wirkungen sind das Auftreten von Osteoporose (Monreal *et al.*, 1991) sowie allergische Reaktionen in Form von Urtikaria, Fieber, Rhinitis (Bircher *et*

al., 2006) und der seltenen, aber gefährlichen Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) I und II (Warkentin *et al.*, 1995).

Protamin hat pharmakologisch in Form von Protaminchlorid (z.B. Protamin ICN<sup>®</sup>) oder Protaminsulfat (z.B. Protaminsulfat Leo<sup>®</sup>) als Antagonist von Heparin Bedeutung. Es findet regelmäßige Verwendung nach kardiovaskulären Eingriffen, z.B. Herzkatheteruntersuchungen, um die antikoagulierende Wirkung von Heparin möglichst rasch zu neutralisieren und mögliche Nachblutungen zu verhindern. Allein in Deutschland müssen sich jährlich rund 600.000 Patienten einer Herzkatheteruntersuchung unterziehen und erhalten regelmäßig Protamin (Welsby *et al.*, 2005).

Als unerwünschte Nebenwirkung wird nach Protamininfusionen neben Bronchospasmen, pulmonaler Hypertension und Urtikaria insbesondere eine systemische Hypotension beschrieben. Die Inzidenz und Schwere der Komplikationen variiert von 1,6 % (Weiler *et al.*, 1990) bis 12,9% (Kimmel *et al.*, 1998) bei Erwachsenen. In ca. 2,5% der Fälle (Kimmel *et al.*, 1998) kann diese Hypotension durch massive Blutdruckabfälle bis zum lebensbedrohlichen hypotonen Schock führen, unabhängig von der Injektionsgeschwindigkeit (Backman *et al.*, 1997; Boigner *et al.*, 2001; Shapira *et al.*, 1982; Viaro *et al.*, 2002). Die Mortalität im Krankenhaus liegt in diesen Fällen bei ca. 13%, fast 5-fach höher im Vergleich zu 2,7% bei Patienten, die keine schweren Reaktionen auf Protamin zeigten (Kimmel *et al.*, 2002). Auch im Kindesalter kann die Applikation von Protamin zu einer signifikanten systemischen Hypotension führen. Seifert *et al.* beschrieben die Inzidenz für diese Ereignisse bei Kindern mit ca. 1,8% (Seifert *et al.*, 2003).

### **1.2.3 Pathophysiologische Erklärungsmodelle**

Zur Pathophysiologie der Protamin-induzierten Komplikationen existieren mehrere Hypothesen:

Zunächst deutete man die Komplikationen als eine anaphylaktische Reaktion. Weiss und Mitarbeiter zeigten, dass Patienten, die nach Protaminapplikation mit akuten Nebenwirkungen reagierten, deutlich erhöhte Konzentrationen an Antikörpern (anti-Protamin-IgG und anti-Protamin-IgE) im Plasma aufwiesen. Zusätzlich fanden sich bei Diabetikern, die täglich subkutan Protamin-Insulin injizierten und einen Blutdruckabfall

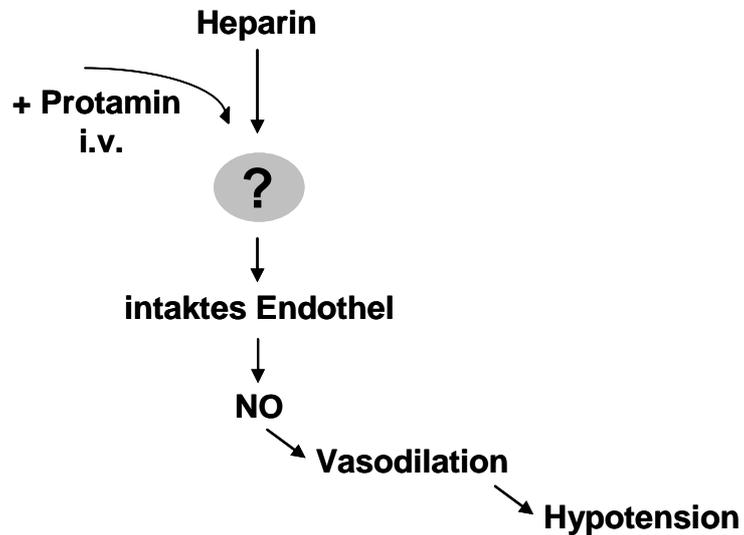
erlitten, ebenfalls erhöhte IgE-Spiegel gegen Protamin im Blut. Für Patienten mit Protamin-Insulin abhängigem Diabetes konnte also ein leicht erhöhtes Risiko für unerwünschte Nebenwirkungen postuliert werden. Allerdings zeigten auch Nicht-Diabetiker, die keine Antikörper gegen Protamin im Blut aufwiesen, Nebenwirkungen nach Protaminapplikation (Weiss *et al.*, 1989). Auch zeigten heparinisierte Versuchstiere, die zuvor keinen Kontakt zu Protamin hatten, nach der intravenösen Applikation von Protamin unerwünschte Reaktionen, z.B. Hypotension bei Hasen (Wang *et al.*, 2003) oder pulmonale Hypertension bei Hunden (Freitas *et al.*, 2004).

Einen anderen Ansatz zur Erklärung der Protaminkomplikationen lieferten Tan und Mitarbeiter. Die Gruppe konnte zeigen, dass Protamin die Carboxypeptidase N inhibiert (Tan *et al.*, 1989). Carboxypeptidase N inaktiviert Anaphylatoxine und Kinine durch Abspaltung carboxyterminaler Arginine. Durch die Inhibierung der Carboxypeptidase wird der Abbau von BK und Anaphylatoxinen verhindert. Der reduzierte Abbau der Gefäßdilatoren kann zu einem Blutdruckabfall führen (Tan *et al.*, 1989).

Andere Arbeiten postulierten eine Aktivierung des Komplementsystems durch die Interaktion von Heparin und Protamin. Die ersten Hinweise lieferten experimentelle Arbeiten mit humanem Serum (Rent *et al.*, 1975). Später folgten klinische Studien, die ebenfalls eine Aktivierung des klassischen Weges der Komplementkaskade durch Heparin/Protamin zeigten (Bruins *et al.*, 2000; Cavarocchi *et al.*, 1985; Kirklin *et al.*, 1986).

Um die Heparin-Protamin-Komplikationen zu untersuchen, wurden neben diesen Patientenstudien auch experimentelle Tiermodelle generiert. An isolierten Pulmonalarteriensegmenten von Hunden wirkte Protamin dilatierend (Evora *et al.*, 1995; Pearson *et al.*, 1992). Die Wirkung war dabei abhängig von einer intakten Endotheloberfläche der Gefäßringe und als möglichen Mechanismus postulierte man die Freisetzung des „endothelium-derived-relaxing-factor“ (EDRF, NO), da der Effekt durch die Gabe von NO-Inhibitoren (z.B. NG-monomethyl-L-arginine) inhibiert wurde (Evora *et al.*, 1995; Pearson *et al.*, 1992). Auch am Gesamttier wurde der vasodilatative Effekt mittels Protaminapplikation in heparinisierten Hunden bestätigt. Die ausgelöste Hypotonie war durch NO-Inhibitoren blockierbar (Raikar *et al.*, 1996).

Wie genau auf zellulärer und molekularer Ebene nach Protaminverabreichung in heparinisierten Individuen die NO-Freisetzung induziert wird, ist bislang weitgehend unbekannt. Der aktuelle Kenntnisstand ist in Abb. 1.3 dargestellt.



**Abb.1.3: Derzeitiges Wissen über die häufigste Nebenwirkungen bei Protaminapplikation**

Die Antagonisierung von Heparin mit Protamin führt häufig zu einer NO-vermittelten Vasodilatation, die einen Abfall des systemischen Blutdrucks bedingt. Die Induzierung der NO-Produktion auf zellulärer Ebene ist bislang noch nicht aufgeklärt.

### 1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Pathomechanismus der Heparin-Protamin-Komplikationen zu analysieren und darauf aufbauend Ansätze für Therapieoptionen zu entwickeln.

Die Grundlage für die Experimente bildet die Hypothese, dass durch Bindung von FXII an Heparin-Protamin-Komplexe die Kontaktphasenkaskade aktiviert werden kann. Dabei wird BK gebildet und löst nun über den B2R eine  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Freisetzung von NO aus. Auf Grund der sehr kurzen Lebensdauer von BK findet die Hormonfreisetzung auf dem Gefäßendothel statt. Eine vorangegangene Arbeit konnte zeigen, dass Heparin-Protamin-Komplexe an Proteoglykane auf der Oberfläche von Endothelzellen binden (Schwieder, 2004). Auf diese Ergebnisse aufbauend soll der Pathomechanismus der Heparin-Protamin-Komplikationen in mehreren Schritten systematisch analysiert werden.

Zunächst soll überprüft werden, ob Heparin-Protamin-Komplexe die Kontaktphasenkaskade in humanem Plasma und auf Endothelzellen aktivieren können.

Daraufhin sollen spezifische Inhibitoren, die die Freisetzung von Bradykinin durch Heparin-Protamin-Komplexe blockieren können, getestet werden. Anschließend soll mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und der DAF-FM DA-Methode die Produktion von Stickstoffmonoxid in Endothelzellen nach Kontaktphasenaktivierung untersucht werden. Danach sollen die Kreislaufreaktionen nach Protamingabe in einem Mausmodell analysiert werden. Zur Überprüfung der verschiedenen Komponenten des BK-Signalweges stehen Inhibitoren für FXII (PCK) und B2R (HOE140), sowie zwei Gen-defiziente Mausmodelle ( $\text{FXII}^{-/-}$  und  $\text{B2R}^{-/-}$ ), die keinen FXII oder B2R exprimieren, zur Verfügung.

Abschließend sollen die im Mausmodell gewonnenen Daten auf Humanrelevanz überprüft werden.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage SBA 31	Scaltec, Göttingen
Autoklav	Fedegari, Mailand, Italien
Blot Apparatur Fastblot B44	Biometra, Göttingen
Brutschränke Typ BE 30 Forma Scientific 3100 UWJ	Memmert, Schwabach Thermo Elektron Corporation, Erlangen
Eismaschine AF-10	Scotsman, Mailand, Italien
Elektrophoresekammern	Instituts eigene Werkstatt Biometra, Göttingen
Entwicklungsmaschine	Protec, Oberstenfeld
Heizblock DB 2A	Thermo Dux, Wertheim
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen
Mikrowelle Powerwave	Brother, Bad Vibel
Netzgeräte Power Pac 200 Power Pack P 25 EPS 200	Biometra, Göttingen Biometra, Göttingen Pharmacia, Freiburg
Mikroskope Fluoreszenzmikroskop Eclipse E 6000 Lichtmikroskop Axiovert 25	Nikon, Düsseldorf  Zeiss, Jena
Objektive Plan Fluor 10x/0,30 Fluor 60x/1,00W	Nikon, Düsseldorf
PCR-Gerät Mastercycler 5333	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter HI 991000	Hanna, Kehl
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand, Wertheim
Schüttler Inkubationsschüttler L-40 Polymax 1040 Bakterienschüttler Certomat	Hartenstein, Würzburg Heidolph, Kehlheim Braun Biotech, Melsungen
Sterilbank SterilGard Class II Type A/B3	Baker, Stanford, USA
UV-Lampe LH-M1 00C-1	Nikon, Düsseldorf
UV-Transluminator Fluo_Link	Biometra, Göttingen
Vortexer FVL-2400	Peqlab, Erlangen
Waage bp610	Sartorius, Göttingen
Wasserbad U3	Julabo, Seelbach

Vakuumpumpe MZ 2C	Vacuubrand, Wertheim
Zentrifugen Tischzentrifuge 5415 C Kühlzentrifuge 5417 R Super T21	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Sorvall, Bad Homburg

## 2.2. Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Blottingpapier 330g/m <sup>2</sup>	Whatman, Dassel
Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark, Zaventem, Belgien
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Falcontubes	Greiner, Frickenhausen
Faltenfilter	Hartenstein, Würzburg
Filtertips Tip One	Starlab, Ahrensburg
Kanülen Sterican	B/Braun, Melsungen
Nitrozellulosemembran Protran <sup>®</sup>	Schleicher & Schuell, Dassel
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Photometerküvetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe
Plastikmaterial zur Zellkultur	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme	X-Ray Retina, Berlin
Spritzen	B/Braun, Melsungen
Sterilfilter FP 13/0,2 RC-S	Schleicher & Schuell, Dassel

## 2.3 Chemikalien, Medien und sonstige Substanzen

Substanz	Hersteller
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bradykinin acetate salt	Sigma, München
Complete, EDTA free; Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Corn Trypsin Inhibitor	Enzyme Research Laboratories, South Bend, Indiana, USA
DAF-FM DA	Alexis Biochemicals, Grünberg
Dextransulfat Mol. Wt. 500.000	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
D-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim

Ethanol Rotisolv <sup>®</sup> HPLC Gradient Grade	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
GeneRuler <sup>™</sup> DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St-Leon-Rot
Glycin	Roth, Karlsruhe
H-D-Pro-Phe-Arg-CMK	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Heparin-Natriumsalz 150000U/kg	Roth, Karlsruhe
HOE 140	Sigma, München
Isopropanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Ladepuffer für DNA	MBI Fermentas, St-Leon-Rot
LB-Medium Broth (Lennox)	Roth, Karlsruhe
L-Arginin	Sigma, München
Lipofectamin <sup>™</sup> 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nichtessentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
PageRuler <sup>™</sup> Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St-Leon-Rot
Pefablock <sup>®</sup> SC	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Protamin ICN 1000IU/ml	ICN. Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt/Main
Protaminsulfat 1g Grade X	Sigma, München
Rotiphorese Gel <sup>®</sup> 30	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Trasylol (Aprotinin) 500.000KIE	Bayer AG, Leverkusen
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Sigma, München

## 2.4 Kits

Kits	Hersteller
BD Advantage <sup>™</sup> 2 PCR Enzyme System	BD Biosciences, Heidelberg
Markit M Bradykinin EIA	Dainippon, Osaka, Japan

NucleoBond <sup>®</sup> PC 100 Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid Quick Pure Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
Quick Ligation <sup>®</sup> Kit	New England Biolabs, Frankfurt
TaqDNA Polymerase Kit	QIAGEN, Hilden

## 2.5 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Herkunft
XL-10-Gold <sup>®</sup> Ultracompetent Cells	Stratagene, La Jolla, USA
CaCl <sub>2</sub> -kompetente XL-10-Gold	Institut für Klinische Biochemie, Würzburg

## 2.6 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Beschreibung
ECV304	humane Endothelzellen	Benz <i>et al.</i> , 2008

## 2.7 Mausstämme

Mauslinie	Herkunft / Beschreibung
C57/Bl 6 Wildtyp	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
FXII <sup>-/-</sup>	Pauer <i>et al.</i> , 2004
B2R <sup>-/-</sup>	Borkowski <i>et al.</i> , 1995

## 2.8 Defizienzplasmen

Faktor XII defizientes Plasma	Precision Biologic, Dartmouth, Nova Scotia, Kanada
Prekallikrein defizientes Plasma	Technoclone GmbH, Wien, Österreich

## 2.9 Antikörper

### Primäre Antikörper

Antikörperspezifität	Beschreibung
$\alpha$ -HKL12	Kaufmann <i>et al.</i> , 1993
$\alpha$ -Human FXIIserum	Kaplan, A., Charleston, SC, USA
$\alpha$ -hu FXII Nordic	Pauer <i>et al.</i> , 2004
$\alpha$ -Kallikrein 13G11	Herwald <i>et al.</i> , 1996
$\alpha$ -MBK3	Haasemann <i>et al.</i> , 1991
$\alpha$ -eNOS	Zimmermann <i>et al.</i> , 2002

### Sekundäre Antikörper

Antikörperspezifität	Wirt	Konjugat	Hersteller
Maus	Ziege	POD	Jackson Immunoresearch, USA
Ziege	Esel	POD	Jackson Immunoresearch, USA

## 2.10 Medien und Medienzusätze zur Bakterienkultur

### Medien:

LB-Medium	LB Broth (Lennox) H <sub>2</sub> O	20,0 g ad 1000 ml
SOC-Medium	Bactotrypton Hefeextrakt NaCl KCl MgCl <sub>2</sub> MgSO <sub>4</sub> Glucose H <sub>2</sub> O	2,0% (w/v) 0,5% (w/v) 10,0 mM 2,5 mM 10,0 mM 10,0 mM 20,0 mM ad 1000 ml pH 6,7-7

**Medienzusätze:**

<b>Antibiotikum</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration</b>
Ampicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml

**2.11 Medien und Medienzusätze zur Kultur eukaryotischer Zellen****Medien mit Zusätzen:**

ECV304	D-MEM	500 ml
Zellkulturmedium	FCS	10 % (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
	Natriumpyruvat	1 % (v/v)

## **3 Methoden**

### **3.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.1.1 DNA-Isolierung aus Mausschwänzen**

Die Isolierung der DNA erfolgte jeweils aus Mausschwanzspitzen mit Hilfe des Tissue Kits von QIAGEN. Zunächst wurden die Schwanzstücke in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben, diese nach den Angaben des Herstellers in Buffer ATL und Proteinase K aufgenommen und über Nacht bei 56°C verdaut. Die weitere Isolierung wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNA wurde am Ende mit H<sub>2</sub>O eluiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### **3.1.2 Retransformation von Plasmid-DNA in kompetente *E.coli*.**

Für eine Retransformation wurden CaCl<sub>2</sub> kompetente XL-10 Gold *E.coli*. auf Eis aufgetaut und mit 10 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA, in diesem Fall eNOS in pcDNA 3.1 Myc-His (Invitrogen), versetzt. Dieser Transformationsansatz wurde für 30 min im Eisbad inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die kompetenten Bakterien wurde durch einen Hitzeschock für 30 s in einem 42°C warmen Wasserbad initiiert. Danach wurden die Zellen sofort für 2-3 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien in 1ml SOC-Medium hinzugefügt und diese für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Nach der Zwischenkultivierung wurden mit einem sterilen Drigalski-Spatel 250µl der Kultur auf Selektionsagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### **3.1.3 Plasmidisolierung aus Bakterien (Mini- und Midipräparation)**

Die Durchführung von Midipräparationen erfolgte mit Hilfe des Nucleo Bond<sup>®</sup> PC 100 Kits von MACHEREY-NAGEL und Minipräparationen mit Hilfe des Nucleo Spin<sup>®</sup> Plasmid Quick Pure Kits von MACHEREY-NAGEL. Die Zusammensetzung der verwendeten Chemikalien sowie die detaillierte Vorgehensweise ist dem jeweiligen Herstellerprotokoll zu entnehmen.

### 3.1.4 Bestimmung von DNA

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

### 3.1.5 PCR - „Polymerase Chain Reaction“

1) Genotypisierungs-PCR für FXII<sup>-/-</sup> Mäuse

Reaktionsansatz:

10x QIAGEN PCR Puffer	2,5µl
dNTP-Mix (10µM)	0,5µl
5x Q-solution	5,0µl
Primer 1 (10µM)	1,0µl
Primer 2 (10µM)	1,0µl
Primer 3 (10µM)	1,0µl
Taq-Polymerase	0,5µl
DNA / H <sub>2</sub> O (Wasserkontrolle), Template s. 3.1.1	5,0µl
H <sub>2</sub> O ad 25µl	8,5µl

Primer

Bezeichnung	Sequenz	Beschreibung
FXII wt-for	5'- ggC CTC TTg TAT TgA CTg ATg A- 3'	Pauer, <i>et al.</i> , 2004
FXII wt-rev	5'- AAC TgC CAT CAT AAC gTT AgC C- 3'	
pTKNeo-rev	5'- gCA gAg gTT ACg gCA gTT TgT CTC TCC- 3'	

Alle Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen.

Folgendes Protokoll wurde zur Amplifikation verwendet:

	Dauer	Temperatur
initiale Denaturierung	3 min	95 °C
Denaturierung	30 sec	94 °C
„Annealing“	30 sec	54 °C

Elongation	1 min	72 °C
finaler Syntheseschritt	7 min	72 °C

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

## 2) Genotypisierungs-PCR für B2R<sup>-/-</sup> Mäuse

### a) Reaktionsansatz für das B2R-Gen:

10x QIAGEN PCR Puffer	5µl
dNTP-Mix (10µM)	1µl
5x Q-solution	10µl
Primer Bdkrb2-pr1 (20µM)	1,8µl
Primer Bdkrb2-pr2 (20µM)	1,8µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,25µl
DNA / H2O (Wasserkontrolle)	10µl
H2O ad 50µl	26,55µl

### Primer

Bezeichnung	Sequenz	Beschreibung
Bdkrb2_pr2	5'- ggT CCT gAA CAC CAA CAT gg- 3'	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
Bdkrb2_pr1	5'- TgT CCT CAg CgT gTT CTT CC- 3'	

Die Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen.

Folgendes Protokoll wurde zur Amplifikation verwendet:

	Dauer	Temperatur
initiale Denaturierung	3 min	94 °C
Denaturierung	35 sec	94 °C
„Annealing“	45 sec	64 °C
Hybridisierung/Elongation	45 min	72 °C
finaler Syntheseschritt	2 min	72 °C

Die Anzahl der Amplifikationszyklen betrug 30.

b) Reaktionsansatz für die Neo-Kassette („Knockout-Allel“):

10x QIAGEN PCR Puffer	5µl
dNTP-Mix (10µM)	1µl
5x Q-solution	10µl
Primer neo_ge_pr1 (20µM)	1,8µl
Primer neo_ge_pr2(20µM)	1,8µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,25µl
DNA / H2O (Wasserkontrolle)	10µl
H2O ad 50µl	26,55µl

Primer

Bezeichnung	Sequenz	Beschreibung
neo_ge_pr1	5'- CTT ggg Tgg AgA ggC TAT TC- 3'	The Jackson
neo_ge_pr2	5'- Agg TgA gAT gAC Agg AgA TC- 3'	Laboratory, Bar Harbor, USA

Die Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL Berlin, bezogen.

Folgendes Protokoll wurde zur Amplifikation verwendet:

	Dauer	Temperatur
initiale Denaturierung	3 min	94 °C
Denaturierung	35 sec	94 °C
„Annealing“	45 sec	60 °C
Hybridisierung/Elongation	45 min	72 °C
finaler Syntheseschritt	2 min	72 °C

Die DNA wurde in 30 Zyklen amplifiziert. Nach erfolgter PCR wurden jeweils 20µl des Reaktionsansatzes zur gelelektrophoretischen Analyse entnommen.

Die verwendeten Lösungen und Puffer stammten alle aus dem *Taq* Polymerase PCR Kit von QIAGEN.

### 3.1.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Die in dieser Arbeit verwendeten Gele waren ausschließlich TAE-Agarosegele. Für die Herstellung eines solchen Gels wurde die Agarose mit 1xTAE versetzt und in einer Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf ungefähr 50°C wurden 5 µl Ethidiumbromidlösung (1%ig) pro 100 ml Gel zugesetzt. Die PCR-Ansätze wurden mit Gel-Puffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Abhängig von der Größe der Gelkammer erfolgte die Elektrophorese bei 80 – 150 V. Die Analyse erfolgte nach Beendigung des Laufs unter UV-Licht. Die Ergebnisse wurden photographisch dokumentiert.

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für den Nachweis von gespaltenem HK, FXIIa oder Kallikrein wurden 12%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Pro Geltasche wurden 10 µl Probe (= 0,5 µl Plasma) mit einer Pipette aufgetragen. Um die Größe der Proteine bestimmen zu können wurde ein Proteingewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 35 mA Gleichstrom als limitierende Größe bis die Lauffront aus Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreichte.

Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele:

	<i>12%iges Trenngel</i>	<i>5%iges Sammelgel</i>
H <sub>2</sub> O	3,3 ml	3,4 ml
30% (v/v) Acrylamid-Mix	4,0 ml	830 µl
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	---
1,0M Tris (pH 6,8)	---	630 µl
10% (w/v) SDS	100 µl	50 µl
10% (w/v) APS	100 µl	50 µl
TEMED	4 µl	5 µl

Stocklösung für 10x Tris-Glycin-Laufpuffer:

Tris	250 mM
Glycin	2,5 M
SDS	10 %

### 3.2.2 „Western Blot“ und Immunodetektion

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

Stocklösung für 10x PBS (pH 7,4):

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

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

Blockierungslösung: 4% Trockenmilchpulver in Waschpuffer

Substratlösung:

250µM Luminol in DMSO	100 µl
40µM p-Cumarsäure	100 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 µl
100mM Tris pH 8,0	1 ml
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml

Zur Analyse der Proteine wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Der Elektrotransfer erfolgte im „Semi-Dry“-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984). Dazu wurden 6 Lagen Whatman-Filterpapier, die Membran und das Gel in „Blotting“-Puffer inkubiert und anschließend im „Sandwich“-Verfahren auf der Anodenseite der Blottingapparatur platziert. Der „Sandwich“ setzte sich wie folgt zusammen: 3 Lagen Whatman-Filterpapier, gefolgt von der Nitrocellulosemembran,

dem Gel und weiteren 3 Lagen Whatman-Filterpapier. Anschließend wurde der Blot mit der Kathodenplatte zugedeckt und der Proteintransfer für 90 Minuten bei 1-2 mA pro cm<sup>2</sup> Blottingmembran von der Kathode in Richtung Anode durchgeführt. Der Erfolg des Transfers wurde nach ausgiebiger Wässerung der Membran durch eine Färbung mit 1% Ponceau S – Rot für ca. 5 min überprüft. Durch Schwenken in H<sub>2</sub>O wurde die Membran wieder entfärbt bis deutliche rote Banden erkennbar waren und fotokopiert. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen der Membran über Nacht in Blockierungslösung bei 4°C blockiert. Die Immunodetektion von HK, FXII oder Kallikrein erfolgte mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (Tabelle 2.9). Diese wurden in Blockierungslösung verdünnt und die Membran in dieser für 2 h inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch viermaliges Waschen in Waschpuffer (2 x 30 s und 2 x 15 min) entfernt. Danach wurde die Membran eine weitere Stunde mit einem gegen den Fc-Teil des Erstantikörpers gerichteten Peroxidasegekoppelten sekundären Antikörper in Blockierungslösung inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit Hilfe der Substratlösung entwickelt. Dazu wurde die Membran 3 min in der Substratlösung geschwenkt, getrocknet und zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Filmkassette eingelegt. Die anschließende Entwicklung erfolgte maschinell.

### **3.2.3 HK – Spaltungsassay**

Tris-Pufferlösung: 75 mM Tris-Puffer pH 7,4

10 mM ZnCl<sub>2</sub>

Humanes Zitratplasma von gesunden Freiwilligen wurde mit verschiedenen Konzentrationen an Heparin, Protamin oder Heparin-Protamin-Komplexen in Tris-Pufferlösung für 20 min im 37°C Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Probenpuffer gestoppt. Zum Nachweis von gespaltenem BK-freiem HK wurden 0,5 µl Plasma pro Geltasche in einem 12%igen Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Immunoprintanalyse wurde der Antikörper HKL12 in einer Verdünnung von 1:4000 verwendet, welcher gegen Domäne 5 der schweren Kette von HK gerichtet ist (Kaufmann *et al.*, 1993). Bleibt HK als Einkettenprotein wird bei der Immunoprintanalyse eine Bande von 130 kDa detektiert. Nach der Spaltung von HK

verschwindet das Signal bei 130 kDa, die leichte Kette migriert mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa.

### **3.2.4 Aktivierung der Kontaktphase auf Endothelzellen**

Zur Aktivierung der Kontaktphasenkaskade an der Oberfläche von Endothelzellen wurden konfluente ECV304 Zellen mit Heparin- oder Protaminlösungen beschichtet.

**1. Einzelbeschichtung:** ECV304 Zellen in 12-well-Platten wurden gewaschen, dann die Kavitäten mit 400 µl einer Heparin- oder Protaminlösung in aufsteigender Konzentration, ausgehend von 0,1µg/ml Heparin bzw. 2 µg/ml Protamin in Tris-Pufferlösung, beschichtet und 20 min auf Eis unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS-Puffer wurden die Kavitäten mit 100 µl humanen Plasma in einer 1:1 Verdünnung mit Tris-Pufferlösung überschichtet und 10 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion mit 200 µl Probenpuffer gestoppt und die Proben für 3 min auf 95°C erhitzt.

**2. Doppelbeschichtung:** ECV304 Zellen wurden mit 400 µl einer Protaminlösung in aufsteigender Konzentration, beginnend mit 2 bzw. 10 µg/ml Protamin beschichtet und 20 min auf Eis leicht schwenkend inkubiert. In zwei Waschschritten wurde ungebundenes Protamin entfernt und die Zellen danach mit 400 µl Heparinlösung (100 µg/ml) 20 min auf Eis leicht schwenkend inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten wurden die Kavitäten mit 100 µl humanen Plasma, das mit gleichem Volumen Tris-Pufferlösung verdünnt wurde, für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion mit 200 µl Probenpuffer gestoppt und die Proben für 3 min auf 95°C erhitzt.

Inhibitoren und Funktions-interferierende Antikörper wurden getestet, ob sie die Heparin-Protamin-induzierte Kontaktphasenaktivierung blockieren können. Dafür wählte man Antikörper gegen humanen FXII ( $\alpha$ FXII, 1:5), gegen die Apple 4 Domäne von Plasmakallikrein ( $\alpha$ 13G11, 1:20) sowie gegen BK-Sequenz in HK ( $\alpha$ MBK3, 1:10). Die Beschichtung der Zellen erfolgte mit Protaminlösungen in ansteigender Konzentration (0 – 300 µg/ml) und einer konstanten Heparinlösung (100 µg/ml). Bei den Inhibitoren wurden Aprotinin und Corn Trypsin Inhibitor getestet. Aprotinin wurde in einer Konzentration von 4000 KIE/ml eingesetzt. Corn Trypsin Inhibitor wurde dem Plasma in einer Endkonzentration von 5 µM zugefügt.

Die Analyse der Kontaktphasenaktivierung bzw. Spaltung von HK erfolgte mittels „Western Blot“ und Immunodetektion wie in 3.2.2 beschrieben.

### **3.3 Zellkultur**

#### **3.3.1 Zellkultur von adhärenenten Zellen**

Humane Endothelzellen ECV 304 wurden in „Dulbecco's modified Eagle's medium“ (DMEM) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1% (v/v) nicht essentiellen Aminosäuren, 1% (v/v) Vitaminen und 1% (v/v) Natrium-Pyruvat in 60 mm Zellkulturschalen kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte in siebentägigen Abstand im Verhältnis 1:5. Dazu wurde aus der jeweiligen Zellkulturschale zunächst das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 5 ml 1x PBS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die proteolytische Ablösung (Trypsinierung) der Zellen vom Gefäßboden durch Behandlung mit 1 ml Trypsin /EDTA. Um den Ablösevorgang zu beschleunigen, wurden die Zellen für 5 min im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden nun in 4 ml frischem DMEM mit den entsprechenden Zusätzen resuspendiert und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Für das Ansetzen einer Folgekultur wurden jeweils 1 ml der Zellsuspension in 4 ml frisches Medium gegeben und in einer neuen 60mm Schale ausgesät.

#### **3.3.2 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien**

Trypsinierte ECV304 Zellen wurden zuerst abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min, Raumtemperatur) und in eiskaltem Einfriermedium so resuspendiert, dass eine Zelldichte von  $1-2 \times 10^6$  Zellen / 1 ml vorlag. Die gekühlte Zellsuspension wurde dann in Kryoröhrchen (je 1 ml) aliquotiert und diese mit einer Einfrierbox zunächst bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellsuspensionen im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und sofort in 20 ml vorgewärmten Medium aufgenommen und kultiviert.

Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Mediums und die Zellen wurden weiter kultiviert.  
Einfriermedium: Kulturmedium mit 10% DMSO

### **3.3.3 Transfektion von adhärennten Zellen**

Die in dieser Arbeit verwendeten ECV304 Zellen wurden mit Hilfe von Lipofectamin<sup>®</sup> 2000 transfiziert. 24 h vor der Transfektion wurden die Zellen 1:6 auf 60 mm Schalen gesplittet und weiter kultiviert, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 90% konfluent waren. 4 µg Plasmid-DNA und 10 µl Lipofectamin pro Transfektionsansatz wurden in je 500 µl Opti-MEM I-Medium aufgenommen und die Mischungen für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die DNA und Lipofectamin<sup>®</sup> vereinigt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die am Vortag gesplitteten Zellen vorsichtig zwei Mal mit je 3 ml 1x PBS-Puffer gewaschen und in jeweils 2 ml Opti-MEM I-Medium für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die DNA-Lipofectamin-Komplexe (insgesamt 1 ml) tropfenweise zu den Zellen gegeben und diese für 5<sup>1</sup>/<sub>2</sub> h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium abgesaugt, die Zellen einmal gewaschen und in 5 ml Kulturmedium ohne Penicillin/Streptomycin weiter inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein erneuter Mediumwechsel und am dritten Tag nach Transfektion wurde die Proteinexpression mittels Western Blot oder Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

### **3.4 NO-Messung in Endothelzellen mit Fluoreszenzmikroskopie**

Die Produktion von NO in ECV304 Zellen wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM DA (Diaminfluoreszein-FM Diacetat) visualisiert. Der Farbstoff ist zellpermeabel und nach Aufnahme in die Zellen wird hydrolytisch durch zytosolische Esterasen das Diaminfluoreszein-FM freigesetzt, welches bei physiologischem pH nicht fluoresziert. In Gegenwart von NO oder O<sub>2</sub> wird das DAF-FM in das fluoreszierende Triazolderivat DAF-FM T umgewandelt. Dieses fluoresziert bei Anregung mit  $\lambda = 500$  nm. Für die Detektion der NO-Freisetzung durch BK wurde zunächst eine 60 mm Zellkulturschale zweimal mit 1xPBS-Puffer gewaschen und dann mit 3 ml frischem Kulturmedium, welches DAF-FM DA (Endkonzentration 10 µM) und L-Arginin (Endkonzentration

1 mM) enthält, beladen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS-Puffer wurden die Zellen wie zuvor beschrieben nacheinander mit Protamin (50 µg/ml) und Heparin (100 µg/ml) beschichtet, gewaschen, mit 3 ml PBS-Puffer bedeckt und auf den Objektisch überführt.

Zur Aktivierung der eNOS durch Kontaktphasenaktivierung wurden 200 µl humanen Plasmas in einer 1:1 Verdünnung mit 75mM Tris-HCl pH 7,4 plus 10 mM ZnCl<sub>2</sub> mit einer Pipette direkt unter dem Objektiv auf die Protamin-Heparin-beschichteten Zellen gegeben. Zur Kontrolle wurden 30 µl einer 1 mM BK-Lösung (Endkonzentration = 10 µM) auf die Zellen pipettiert. Die Fluoreszenzänderung wurde über 20 min durch eine Aufnahmeserie mit 2 Bildern pro Minute erfasst. Die Auswertung erfolgte mittels Image J<sup>®</sup> und Excel<sup>®</sup> Software am PC.

### **3.5 Invasive Blutdruckmessung nach Protamininjektion im Mausmodell**

#### **3.5.1 Mauspräparation**

Die Messung der Kreislaufparameter bei Wildtyp, FXII<sup>-/-</sup> und B2R<sup>-/-</sup> Mäusen unter dem Einfluss von Heparin und Protamin erfolgte in Kooperation mit Dr. Kai Hu, Medizinische Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg.

Die Tiere wurden zunächst mit Isofluran narkotisiert, danach intubiert, mit einem Maus-Respirator verbunden und mit Sauerstoff plus 2% Isofluran beatmet. Für die Blutdruckmessung wurde dann in der rechten *Arteria carotis* ein 14F Millar<sup>®</sup> Conductance Katheter platziert.

#### **3.5.2 Versuchsdurchführung**

Die Applikation der Testsubstanzen erfolgte über einen Kochsalz gefüllten PE 50 Katheter, welcher in der rechten Jugularvene zu liegen kam. Es wurden nun nacheinander 1000 IE/kg Heparin (Fragmin<sup>®</sup>), 0,9% NaCl und 1000 IE/kg Protamin injiziert und die Änderung der hämodynamischen Daten mit dem 14F Millar<sup>®</sup> Conductance Katheter und dem Powerlab<sup>®</sup> System erfasst. Alle Substanzen wurden in 0,9%iger Natriumchloridlösung verdünnt. Die Daten wurden mit den Programmen Chart 5.0 für Windows<sup>®</sup> und Microsoft Excel<sup>®</sup> analysiert. Zur Erfassung der Werte

wurde in den aufgezeichneten Blutdruck- und Herzfrequenzkurven jeweils ein Bereich von 10 Sekunden Dauer vor Protamingabe und ein Bereich von 3,5 Sekunden für das Minimum nach Protamingabe ausgewählt. Vom Programm Chart 5.0<sup>®</sup> wurde dann aus dieser Auswahl der zugehörige Mittelwert von Blutdruck und Herzfrequenz errechnet. Für die Auswertung wurde primär die erste Protamingabe pro Versuchstier einbezogen. Die Auswertung erfolgte in Kooperation mit Dr. K. Hu.

### **3.6 Nachweis von BK in humanem Plasma**

#### **3.6.1 Probengewinnung und -aufbereitung für die BK-Messung**

Die Entnahme von Blutproben für die Messung von BK in humanem Plasma nach Protamininjektion erfolgte im Rahmen geplanter Herzkatheteruntersuchungen bei kardiologischen Patienten in Zusammenarbeit mit PD Dr. Oliver Ritter, Medizinische Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg. Es wurden insgesamt Proben von 25 Patienten entnommen.

Vor der Probenentnahme wurden pro Patient zwei 50 ml Röhrchen mit 20 ml 80%igen Ethanol gefüllt sowie für spätere Western Blot Analysen je zwei 2 ml Reaktionsgefäße mit 10 µl 100x Pefablock<sup>®</sup> und 40 µl 25x Inhibitor-Cocktail (Roche) vorbereitet. Diese wurden bis zur Entnahme bei -20°C gelagert. Am Entnahmetag wurden die vorbereiteten Röhrchen und Reaktionsgefäße auf Eis gelagert. Die Blutentnahme erfolgte über den Katheterzugang in der *Arteria femoralis* kurz vor der Protamininjektion sowie 5 min danach. Die Proben wurden anonymisiert. 5 ml des Blutes wurden in die Röhrchen mit eisgekühltem Ethanol gegeben und vorsichtig geschüttelt. Je 1 ml des Blutes wurde für „Western Blot“-Analysen in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben. Während der Protamininjektion wurden die Kreislaufparameter über Monitor überwacht.

Die Proben wurden sofort 30 min bei 4°C und 2800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in eine neues Röhrchen überführt. Das Pellet wurde mit 5 ml 80%igen Ethanol resuspendiert und erneut zentrifugiert (2800 rpm, 4°C, 30 min). Der Überstand wurde mit dem vorherigen vereinigt und die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Im nächsten Schritt wurden die Proben für die Bradykininmessung mittels eines Vakuum-Rotationsverdampfer bei der AG Bringmann im Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg bei 40°C und 130 mbar eingedampft. Die zurückbleibende Menge der Probe (2 ml) wurde über Nacht in einer „Speed Vac“ Vakuumpumpe getrocknet. Der Rückstand wurde mit 1 ml HCl, pH 2 aufgelöst und auf pH 2 – 3 eingestellt. Danach wurden die Proben in 15 ml Falcons überführt und dreimal mit je 3 ml Diethylether gewaschen um Fette herauszulösen. Nach erneuter Überführung der Proben in 2 ml Reaktionsgefäße wurden diese ein zweites Mal in der Speed Vac über Nacht getrocknet. Der neue Rückstand wurde nun in 220 µl Buffer Solution C aus dem MARKIT-M Bradykinin EIA – Kit von Dainippon Pharmaceutical & Co., Ltd aufgenommen und gelöst. Bis zur Messung wurden die Proben bei 4°C aufbewahrt.

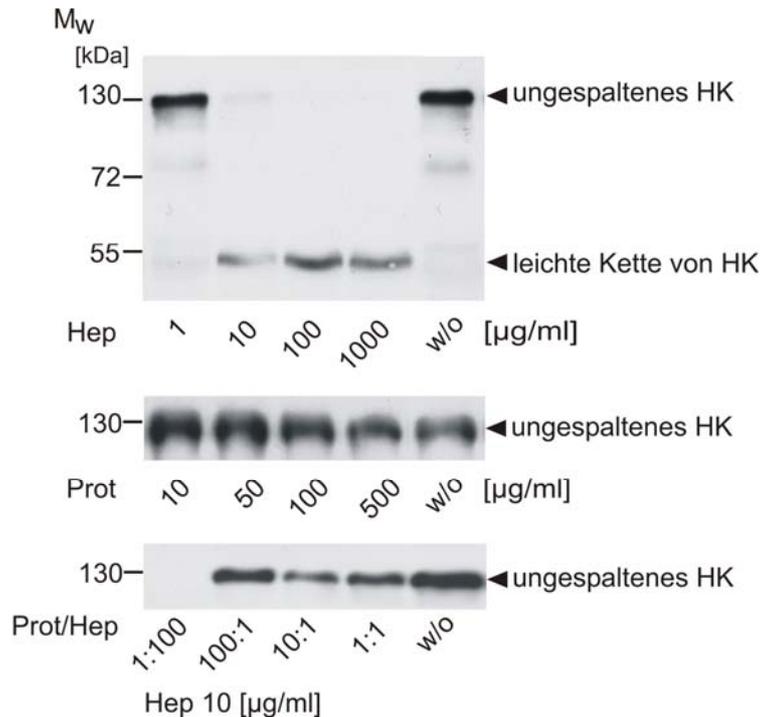
### **3.6.2 Bestimmung von BK in humanem Plasma mittels kompetitiven EIA**

Beim hier verwendeten kompetitiven EIA wird ein enzymmarkiertes Kompetitor-Antigen verwendet. Dieses konkurriert mit dem Analyt (BK) um die Bindungsplätze zu Antikörpern, so dass das resultierende Farbsignal indirekt proportional zur Konzentration des Analyten ist. Die Messung von BK in den vorbereiteten Patientenproben erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Absorption wurde an einem Microplate Reader bei 492 nm (Referenzmessung bei 620 nm) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel®.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Kontaktphasenaktivierung durch Heparin und Protamin in humanem Plasma

Zur Untersuchung des Einflusses von Heparin und Protamin auf die Generierung von BK in humanem Plasma wurde humanes plättchenfreies Zitratplasma mit aufsteigenden Konzentrationen von Heparin (0 – 1000 µg/ml), Protamin (0 – 500 µg/ml) oder definiert generierten Heparin-Protamin-Komplexen versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Proben mittels Immunoprintanalyse mit einem Antikörper gegen die leichte Kette von HK (HKL12) untersucht. In der oberen Zeile von Abb. 4.1 erkennt man, dass bereits durch 10 µg/ml Heparin eine Spaltung von HK hervorgerufen wird. HK erscheint im „Western Blot“ als Einkettenprotein bei 130 kDa. Spaltung und Freisetzung von Bradykinin führen zum Verschwinden des 130 kDa Signals und neuem Erscheinen einer Bande bei 55 kDa, die die separate leichte Kette darstellt. Die Inkubation von Plasma mit Protamin allein (mittlere Zeile) führte nicht zur HK-Spaltung. Wurde das Plasma mit Heparin-Protamin-Komplexen mit definierter molekularer Zusammensetzung inkubiert (untere Zeile) löste ein Protamin/Heparin-Verhältnis von  $\geq 1:100$  eine HK-Spaltung aus. Heparin wurde hier in einer konstanten Konzentration von 10 µg/ml zugegeben, die Protaminkonzentration wurde von 0,1 µg/ml bis 1000 µg/ml variiert.



**Abb. 4.1: Induktion der HK-Spaltung durch Heparin, Protamin oder Heparin-Protamin-Komplexe.**

Plättchenfreies Plasma wurde mit ansteigenden Konzentrationen von Heparin (obere Zeile; 0-1000 µg/ml), Protamin (mittlere Zeile; 0-500 µg/ml) oder definierten Heparin-Protamin-Komplexen (untere Zeile; Heparin jeweils 10 µg/ml, Protamin 0,1 -1000 µg/ml) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden mittels „Western Blotting“ unter Verwendung eines gegen die leichte Kette des HK gerichteten Antikörpers analysiert.

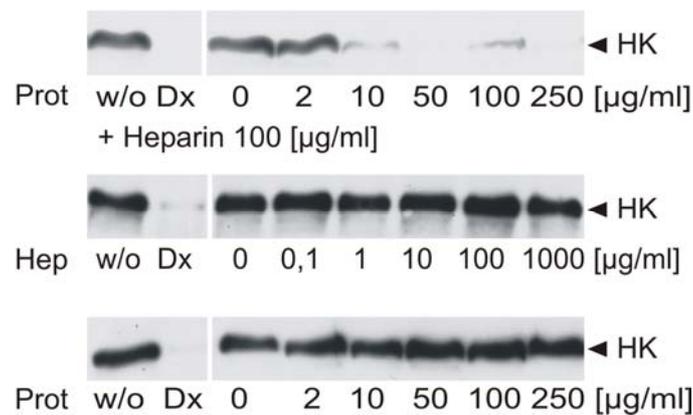
## 4.2 Aktivierung der Kontaktphase an Endothelzelloberflächen

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass Heparin-Protamin-Komplexe an Endothelzelloberflächen die Kontaktphase aktivieren können.

Messparameter für die Kontaktphasenaktivierung ist die Spaltung von HK, die mittels „Western Blotting“ analysiert wurde. Um zu kontrollieren, dass Plasma nicht schon durch Kontakt mit den Zelloberflächen aktiviert wird, inkubierten wir jeweils eine Plasmaprobe mit unbeschichteten Zellen (Abb. 4.2., erste Spalte). Als Positivkontrolle für die Kontaktaktivierbarkeit in den Plasmaproben wurden 10 µg/ml Dextransulfat zugesetzt (Abb.4.2, zweite Spalte). Dextransulfat ist ein potenter Kontaktphasenaktivator (Samuel et al., 1992).

Wurden die Zellen nacheinander zunächst mit Protamin, danach mit Heparin beschichtet und dann mit Plasma inkubiert (Abb. 4.2., obere Zeile), so zeigte sich eine

Spaltung des HK ab 10 µg/ml Protamin. Bei Beschichtung der Zellen nur mit Heparin (mittlere Zeile) oder nur mit Protamin (untere Zeile) und anschließender Inkubation mit Plasma konnte hingegen keine Kontaktphasenaktivierung initiiert werden.



**Abb. 4.2: Heparin-Protamin-, „Sandwich“ induziert die Spaltung von HK auf Endothelzellen**

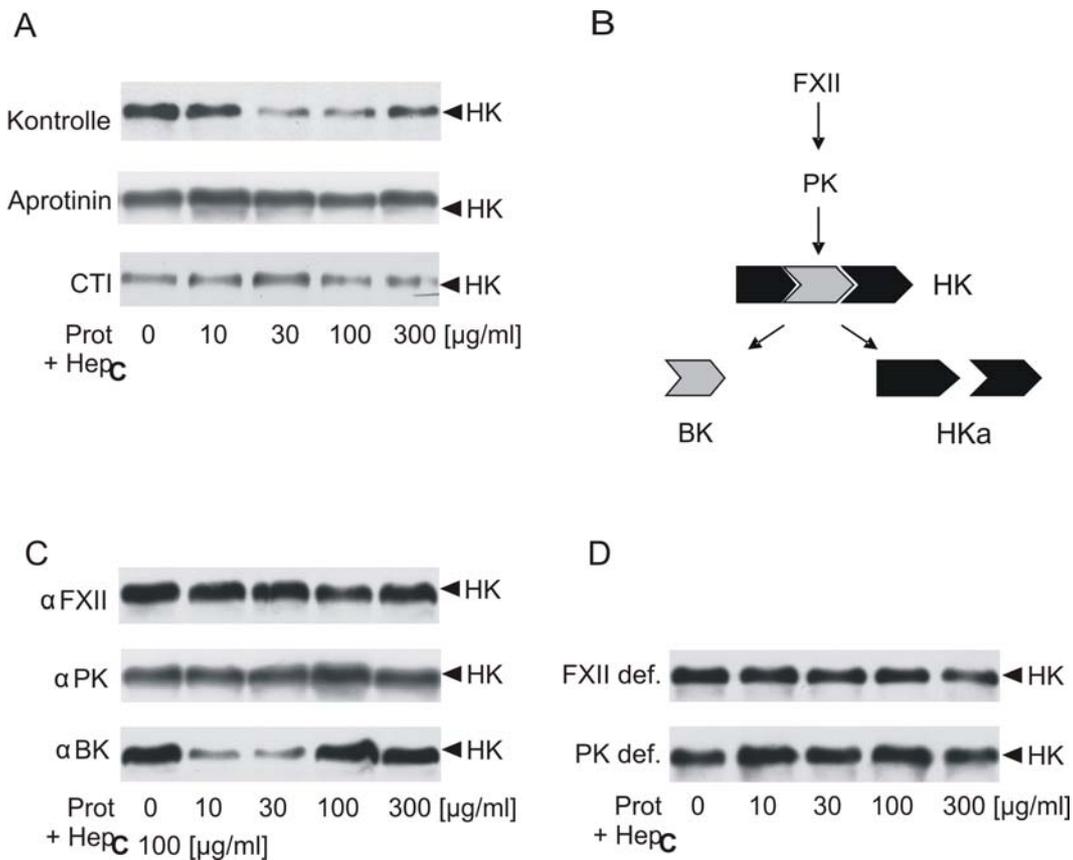
Spaltung von HK in humanem Plasma nach Inkubation von mit Heparin und Protamin beschichteten ECV304 Zellen mit Zitratplasma. Die Spaltung von HK wurde mittels „Western Blotting“ mit dem Antikörper HKL12 analysiert.

1. Zeile: Inkubation von ECV304 Zellen zunächst mit Protamin (0-250 µg/ml), dann mit Heparin (je 100 µg/ml) und dann mit Zitratplasma.
  2. Zeile: Inkubation der Endothelzellen mit Heparin (0-1000 µg/ml) und anschließend mit Zitratplasma.
  3. Zeile: Inkubation mit Protamin (0-250 µg/ml) und dann mit Zitratplasma.
- w/o = ohne Beschichtung; Dx = Dextranulfat (10 µg/ml)

Um die Heparin-Protamin-induzierte Kontaktphasenaktivierung genauer zu analysieren, wurde Zitratplasma vor der Inkubation mit Heparin-Protamin-beschichteten ECV304 Zellen mit Aprotinin (4000 KIE/ml) und Corn Trypsin Inhibitor (CTI, 5 µM) versetzt. Aprotinin blockiert primär aktives Plasmakallikrein. CTI ist ein spezifischerer Inhibitor von FXIIa. Die Beschichtung der Zellen erfolgte mit Protaminlösungen von 0 – 300 µg/ml und Heparin in konstanter Konzentration von 100 µg/ml. Der „Western Blot“ in Abb. 4.3A zeigt, dass Aprotinin und CTI die HK-Spaltung hemmen.

Zusätzlich zu den Inhibitoren sollten Antikörper getestet werden, die mit der Kontaktphasenkaskade interferieren (Renne *et al.*, 2005). Dafür wählten wir einen Antikörper gegen humanen FXII ( $\alpha$ FXII, 1:5), einen Antikörper gegen Plasmakallikrein ( $\alpha$ 13G11, 1:20) sowie einen Antikörper gegen die BK-Sequenz in HK ( $\alpha$ MBK3, 1:10). Zunächst wurden die Antikörper mit Zitratplasma präinkubiert und anschließend die Mischung zu Heparin-Protamin-beschichteten ECV304 Zellen gegeben. Eine Spaltung von HK konnte durch alle Antikörper verhindert werden (Abb. 4.3C)

Die Bestätigung der in Abb. 4.3A und 4.3C gezeigten Ergebnisse erbrachte der Versuch mit Defizienzplasmen. Hier wurden Heparin-Protamin-beschichtete ECV304 Zellen mit Plasma inkubiert, welches entweder an FXII oder Kallikrein defizient war. Die „Western Blotanalyse“ nach Inkubation zeigte, dass sowohl die Defizienz an FXII als auch an Plasmakallikrein die HK-Spaltung blockierte. Dieses Resultat zeigt, dass die HK-Spaltung auf Heparin-Protamin-beschichteten Zellen durch eine Aktivierung der Kontaktphase initiiert ist.



**Abb. 4.3: Einfluss von verschiedenen Inhibitoren auf die Heparin-Protamin induzierte HK-Spaltung**

(A) Humanes Zitratplasma wurde mit den Inhibitoren Aprotinin und Corn Trypsin Inhibitor versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde das Plasma zu den mit Heparin-Protamin-beschichteten Zellen gegeben, für 30 min bei 37°C inkubiert und die HK-Spaltung mittels Western Blot mit dem Antikörper HKL12 detektiert.

(B) Schema der Kontaktphasensystem vermittelten Spaltung von HK

(C) Die Spaltung von HK konnte durch den Einsatz verschiedener interferierender Antikörper inhibiert werden. Das Plasma wurde 30 min vor der Zugabe zu den Heparin-Protamin-beschichteten Zellen mit Antikörpern gegen FXII ( $\alpha$ FXII), PK ( $\alpha$ 13G11), und BK ( $\alpha$ MBK3) versetzt. Inkubation und Detektion wie unter (A) beschrieben.

(D) Mit Heparin und Protamin beschichtete ECV304 Zellen wurden mit humanem FXII-defizientem (FXII def.) oder Plasmakallikrein-defizientem (PK def.) Plasma inkubiert. Inkubation und Detektion wie unter (A) beschrieben.

### 4.3 NO-Produktion in Endothelzellen nach Kontaktphasenaktivierung

Die Spaltungsexperimente auf Endothelzellen haben gezeigt, dass oberflächengebundene Heparin-Protamin-Komplexe aus HK BK freisetzen können. BK aktiviert wiederum eine NO-abhängige Vasodilatation (Abb. 1.2).

Mittels Fluoreszenzanalysen wollten wir überprüfen, ob Heparin-Protamin-Komplexe auf Endothelzellen zur Freisetzung von NO führen. Da ECV304 Zellen nur noch wenig endogene eNOS exprimieren (Sowa *et al.*, 1999), wurden Zellen mit eNOS-kodierender cDNA transfiziert. Der Erfolg der Transfektion wurde mittels „Western Blot“ überprüft (Abb. 4.4).



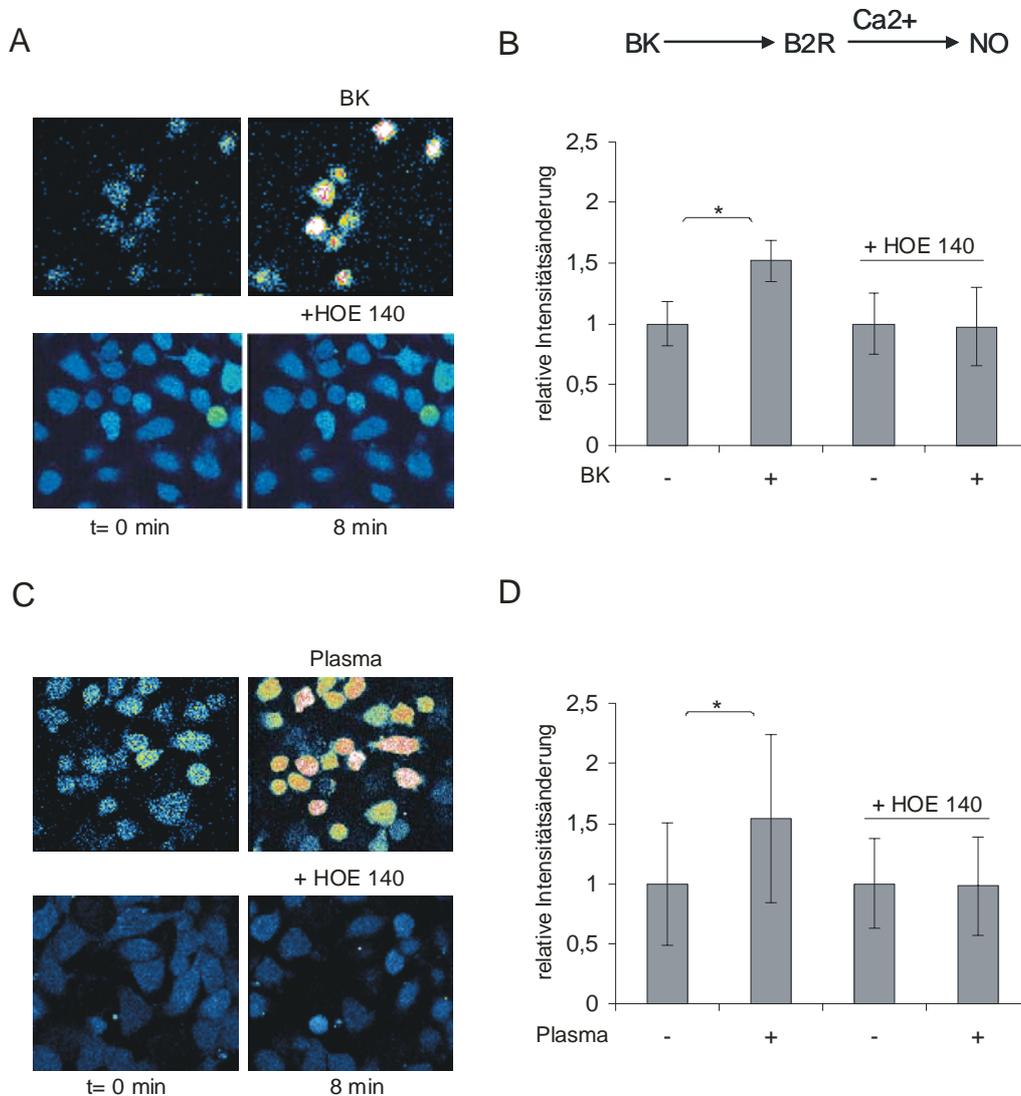
**Abb.4.4:** „Western Blot“ zur Überprüfung der Expression von eNOS in ECV304 Zellen

ECV304 Zellen wurden mit eNOS-kodierender cDNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die lysierte Zellen mittels „Western Blot“ mit dem Antikörper  $\alpha$ -eNOS (1:1000) analysiert. (+) mit eNOS transfizierte Zellen; (-) untransfizierte Zellen; (Kontr.) rekombinante eNOS.

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 Minuten mit dem NO-Chelator DAF-FM DA (Endkonzentration 10  $\mu$ M) und L-Arginin (Endkonzentration 1 mM) beladen. Nach mehreren Waschschrritten wurden die Zellen mit Protamin (50  $\mu$ g/ml) und Heparin (100  $\mu$ g/ml) beschichtet und die Fluoreszenzänderung nach Zugabe von BK (10  $\mu$ M) gemessen. In Abb. 4.5A ist die Intensitätszunahme der fluoreszierenden Zellen 8 min nach BK-Stimulation im Vergleich zum Ausgangswert ( $t = 0$  min) zu sehen. Das Fluoreszenzsignal korreliert direkt mit der Bildung von NO (Itoh *et al.*, 2000). Dass diese Fluoreszenz-basierte Methode ein sensitives und spezifisches System zur Detektion der BK/NO-Freisetzung darstellt, zeigt die zweite Reihe in Abb. 4.5A. Hier wurden die Zellen 10 min vor der Stimulation mit BK mit HOE140 (150  $\mu$ M), einem B2R-Antagonisten inkubiert. Acht Minuten nach Zugabe von BK (10  $\mu$ M) war keine Steigerung des Fluoreszenzsignals detektierbar. Abb. 4.5B zeigt die quantitative Auswertung des Fluoreszenzsignals.

Können Heparin-Protamin-Komplexe auf EC auch BK freisetzen und so NO generieren? Hierfür wurden ECV 304 Zellen mit DAF-FM DA und L-Arginin beladen, dann mit Protamin und Heparin beschichtet und mit Zitratplasma inkubiert. Nach 8min war eine deutliche Steigerung des Fluoreszenzsignals um 54% erkennbar. Der

Signalweg war BK-vermittelt und konnte durch HOE140 annähernd vollständig blockiert werden (Reihe 2 in Abb. 4.5C). Die Graphik in Abb. 4.5D zeigt die quantitative Auswertung des Fluoreszenzsignals.



**Abb. 4.5: NO-Produktion in Endothelzellen nach Bindung von Heparin und Protamin an deren Oberfläche und Inkubation mit BK und Zitratplasma**

(A) ECV304 Zellen wurden mit eNOS-kodierender cDNA transfiziert, danach mit Protamin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Heparin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beschichtet. Danach erfolgte die Stimulation der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  BK. Die NO-Produktion wurde mit Hilfe des NO-spezifischen Fluoreszenzsignals gemessen. Zur Kontrolle wurden die Zellen 20 min vor der Stimulation mit BK mit dem B2R-Antagonisten HOE140 (150  $\mu\text{M}$ ) behandelt, 2. Bildzeile.

(C) Mit der eNOS transfizierte ECV304 Zellen wurden mit Heparin und Protamin beschichtet, danach mit 100  $\mu\text{l}$  Zitratplasma inkubiert und NO-Produktion wie unter (A) beschrieben gemessen. Als Kontrolle für die Aktivierung des B2R diente der Antagonist HOE140 (150  $\mu\text{M}$ ), 2. Bildzeile.

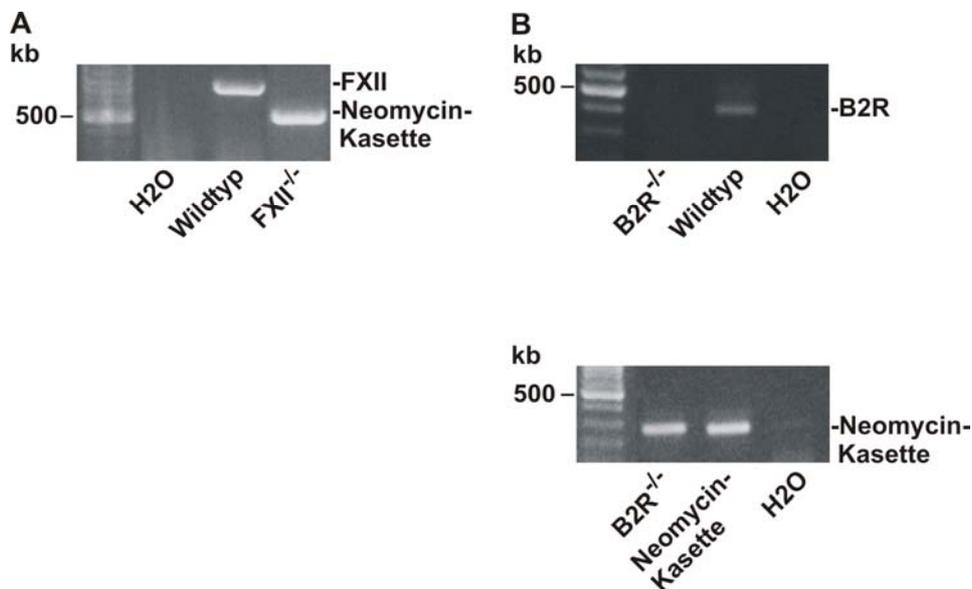
(B+D) Die Graphen zeigen die quantitative Auswertung der Fluoreszenzsignale nach Inkubation der EC mit BK oder Zitratplasma +/- Standardabweichung.  $n(\text{BK})=13$ ;  $n(\text{BK}+\text{HOE140})=13$ ;  $n(\text{Plasma})=30$ ;  $n(\text{Plasma}+\text{HOE140})=30$ ; \* = signifikant, „p-Value“  $<0,05$ , Student t-Test

## 4.4 Heparin-Protamin induzierte Kontaktphasenaktivierung in genetisch veränderten Mausmodellen

### 4.4.1 Blutdruckeffekt von Heparin und Protamin

In diesem Teil der Arbeit sollten die *in vitro* gefundenen Daten zur Kontaktphasenaktivierung durch Protamin *in vivo*, mit Hilfe eines Mausmodells, überprüft werden.

Es wurden drei verschiedene transgene Mausmodelle eingesetzt, Wildtyp (C57/Bl 6), FXII-defiziente Tiere und Mäuse, denen das Gen für den B2R fehlt. Zuerst wurden die Tiere mittels einer Genotypisierungs-PCR überprüft (Abb. 4.6).



**Abb. 4.6: Agarosegelelektrophorese der Genotypisierungs-PCR's zur Identifizierung von FXII<sup>-/-</sup> und B2R<sup>-/-</sup> Mäusen**

(A) Der Nachweis des FXII-Allels und der Neomycin-Kassette erfolgte in einer PCR. Die Größe des amplifizierten FXII-Allels beträgt ca. 800 Kilobasenpaare.

(B) Das B2R-Allel und die Neomycin-Kassette wurden in zwei getrennten PCRs amplifiziert. Die Größe des B2R-Allels beträgt ca. 400 Kilobasenpaare.

Alle Mausversuche wurden in Kooperation mit Dr. Kai Hu, Medizinische Klinik und Poliklinik I, durchgeführt. Unter kontinuierlicher Aufzeichnung von systemisch arteriellem Blutdruck und Herzfrequenz wurden die Mäuse mit Isofluran anästhesiert und bekamen über einen Katheter in der rechten *Vena jugularis* Heparin und Protamin

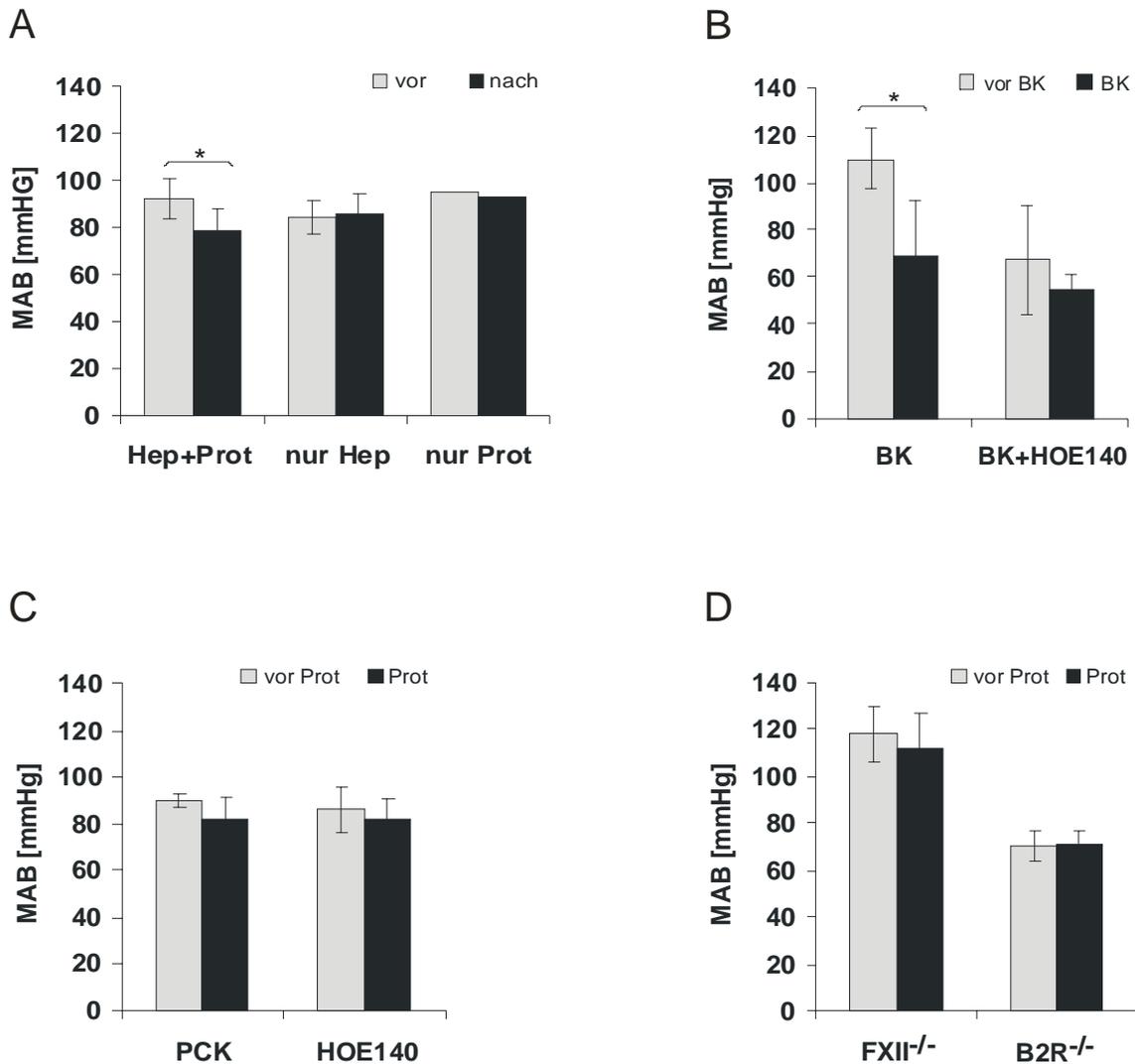
appliziert. Zunächst wurde Wildtyp-Mäusen im Wechsel mit 0,9% NaCl zuerst Heparin (1000 IE/kg KG) oder Protamin (1000 IE/kg KG) allein und danach in Kombination injiziert.

Wurde Protamin nach Heparinisierung der Mäuse verabreicht, so sank der Blutdruck im Mittel von 92 mmHg um 14 mmHg auf 78 mmHg, Abb. 4.7A. Die Applikation von Protamin oder Heparin allein verursachte keine relevanten Veränderungen des Blutdrucks. Abb. 4.7B zeigt die Positivkontrolle, Wildtyptieren wurde BK (0,02 mg/kg KG) intravenös verabreicht, worauf der Blutdruck im Mittel um > 30 mmHg von 110 mmHg auf 68 mmHg sank. Eine vorherige Injektion von HOE140 (6,25 mg/kg KG) verringerte die Bradykinin vermittelte Hypotension um ca. 50%. Der Blutdruck sank im Mittel um 14 mmHg.

Um zu validieren, dass FXII bzw. Kinine essentiell an der Heparin-Protamin-induzierten Hypotension beteiligt sind, erhielten FXII<sup>-/-</sup> und B2R<sup>-/-</sup> Mäuse nacheinander zunächst Heparin und dann Protamin. Dabei wurde der arterielle Blutdruck gemessen. Sowohl FXII<sup>-/-</sup> als B2R<sup>-/-</sup> Mäuse waren gegen die Heparin-Protamin-induzierte Hypotension annähernd vollständig geschützt, da der Blutdruck nach der Applikation von Heparin und nachfolgender Protamingabe nicht sank (FXII<sup>-/-</sup> von 118 mmHg auf 112 mmHg und B2R<sup>-/-</sup> von 71 mmHg auf 70 mmHg).

Welche Möglichkeiten gibt es für einen Therapieansatz der Heparin-Protamin-induzierten Hypotension? Hierzu wurde Wildtyptieren PCK (15 mg/kg KG) oder HOE140 (6,25 mg/kg KG) intravenös verabreicht. Danach erhielten die Tiere zunächst Heparin (1000 IE/kg KG) und dann Protamin (1000 IE/kg KG) intravenös.

Die Blutdruckmessungen in Abb. 4.7C zeigen, dass durch die pharmakologische Blockade der Kininbildung das Absinken des Blutdrucks vermindert werden konnte. Nach PCK-Gabe betrug die Differenz der systemarteriellen Blutdruckmessung im Mittel 8 mmHg und nach HOE140-Gabe 4 mmHg.



**Abb. 4.7: Änderungen des mittleren arteriellen Blutdrucks bei Mäusen nach Heparin- und Protaminapplikation**

Wildtypmäuse, FXII<sup>-/-</sup>- und B2R<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden unter kontinuierlicher Aufzeichnung der Kreislaufparameter mit Isofluran anästhesiert und mit 1000 IE/kgKG heparinisiert. Danach erfolgte die intravenöse Gabe von Protamin (1000 IE/kgKG)

(A) Mittlerer arterieller Blutdruck +/- Standardabweichungen in Wildtypmäusen (n=5) vor (□) und nach (■) Applikation der Testsubstanzen. 1. Säulenpaar: Heparin und Protamin. Als Kontrolle erhielten Wildtypmäuse entweder Heparin (n=5) oder Protamin (n=1) allein verabreicht.

(B) Änderungen des mittleren arteriellen Blutdrucks +/- Standardabweichungen in heparinisierten Wildtypmäusen vor (□) und nach (■) der Applikation von BK (0,02 mg/kg KG, n=6) bzw. HOE140 (6,25 mg/kg KG) mit nachfolgender BK-Gabe (n=4).

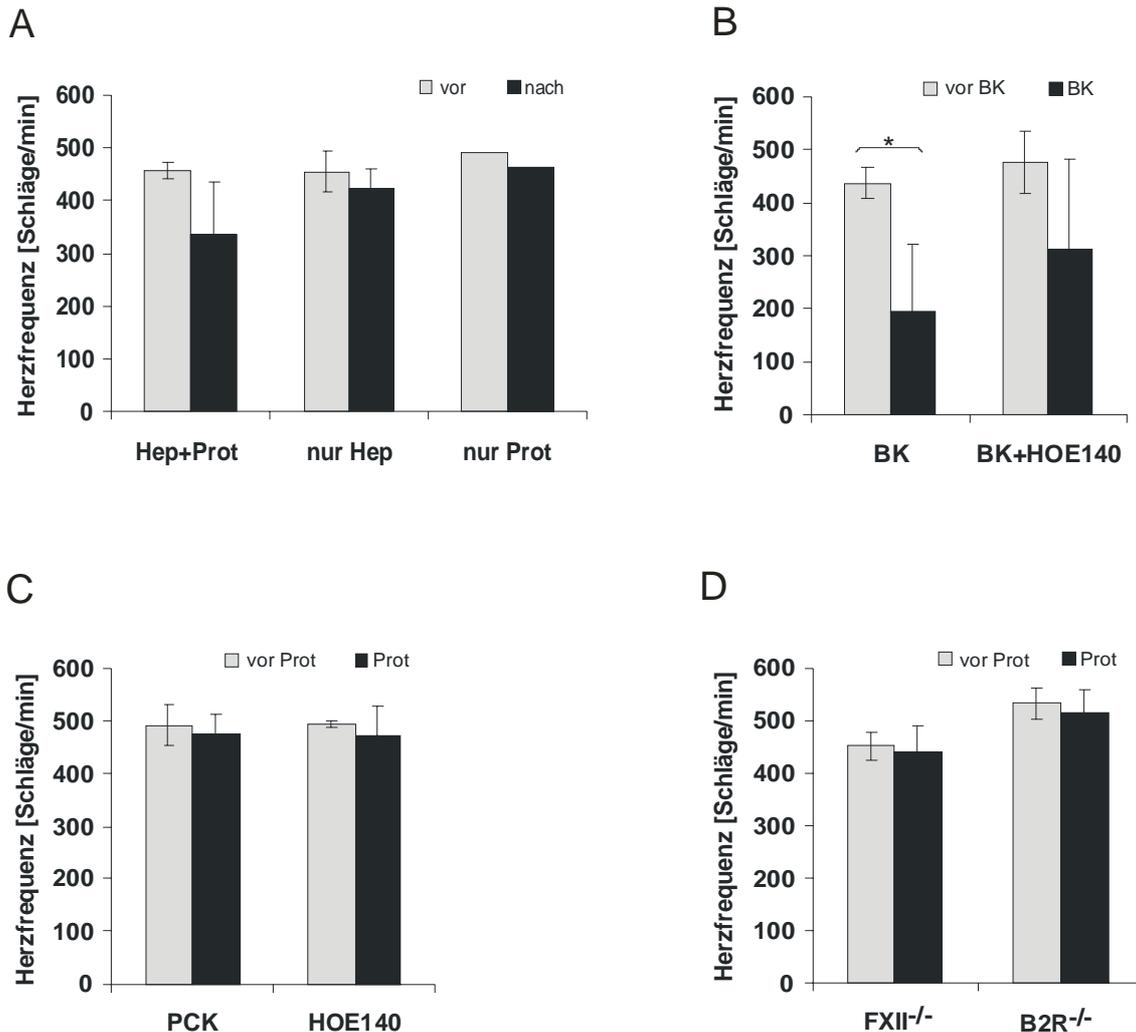
(C) Wildtypmäuse wurden heparinisiert und erhielten vor der Protaminverabreichung entweder PCK (15 mg/kg KG, n=4) oder HOE140 (6,25 mg/kg KG, n=4).

(D) Der Graph stellt die Änderungen des mittleren arteriellen Blutdrucks in heparinisierten FXII<sup>-/-</sup> (n=6) und B2R<sup>-/-</sup> (n=3) Tieren vor und nach Protaminapplikation dar.

\* = signifikant, „p-Value“ < 0,05, Student t-Test

#### 4.4.2 Herzfrequenzeffekt von Heparin und Protamin

Während der Heparin-/Protamininfusion wurde auch die Herzfrequenz der Tiere kontinuierlich aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.8 dargestellt. Zunächst bekamen Wildtyptiere erst 1000 IE/kgKG Heparin und nach 1 min 1000 IE/kgKG Protamin über den Katheter in der Jugularvene verabreicht. Die Herzfrequenz sank bei diesen Mäusen im Mittel um ca. 120 Schläge/min (Abb.4.8A). Heparin oder Protamin allein verabreicht konnten keinen Frequenzabfall provozieren. Nach BK-Gabe (0,02 mg/kg KG) fiel die Herzfrequenz passager um mehr als 50% von 436 auf 193 Schläge/min ab (Abb. 4.8B). Diese BK-Wirkung konnte auch durch den Rezeptorblocker HOE140 (6,25 mg/kg KG) nur zum Teil aufgehoben werden, Abb. 4.8B. Nach Inhibitorgabe sank die Herzfrequenz von 474 auf 311 Schläge pro Minute ab. Tiere, die vor der kombinierten Heparin-Protamingabe HOE140 (6,25 mg/kg KG) oder PCK (15 mg/kg KG) erhielten (Abb. 4.8C), waren gegen den Herzfrequenzabfall geschützt. Hier sank die Herzfrequenz im Mittel um 15 Schläge/min (PCK) beziehungsweise 21 Schläge/min (HOE140). FXII<sup>-/-</sup> und B2R<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten keine Änderung der Herzfrequenz nach Heparin- und nachfolgender Protamininjektion (Abb. 4.8D).



**Abb. 4.8: Änderungen der Herzfrequenz bei Mäusen nach intravenöser Heparin- und Protamingabe**

(A) Wildtypmäuse (n=5) erhielten nacheinander Heparin (1000 IE/kg KG) und Protamin (1000 IE/kg KG) intravenös injiziert. Zur Kontrolle erhielten Mäuse nur Heparin (n=5) bzw. nur Protamin (n=1) allein verabreicht. Dargestellt sind die Änderungen der Herzfrequenz jeweils vor (□) und nach (■) der Applikation der Substanzen +/- Standardabweichungen.

(B) Änderungen der Herzfrequenz von Wildtyptieren vor und nach der Gabe von BK (0,02 mg/kg KG, n=6) bzw. nach der Gabe von HOE140 (6,25 mg/kg KG) und anschließender Applikation von BK (n=4).

(C) Wildtyptiere erhielten vor der Heparinisierung und der Protaminverabreichung entweder PCK (15 mg/kg KG, n=4) oder HOE140 (6,25 mg/kg KG, n=4).

(D) Änderungen der Herzfrequenz in heparinisierten FXII<sup>-/-</sup> (n=6) und B2R<sup>-/-</sup> (n=3) Tieren vor und nach Protaminapplikation.

\* = signifikant, „p-Value“ < 0,05, Student t-Test

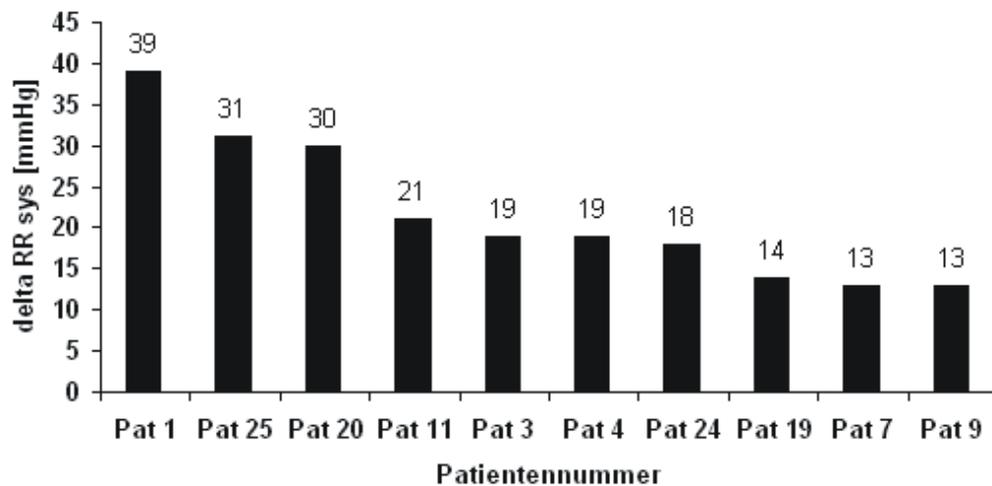
#### 4.5 Effekt von Heparin und Protamin beim Menschen

Um die im Mausmodell gefundenen Ergebnisse auf den Menschen übertragen zu können, wollten wir die Konzentration von BK in humanem Plasma nach Protamingabe bestimmen.

Die Gewinnung der Proben erfolgte in Kooperation mit PD Dr. Oliver Ritter aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg. In die Studie wurden 25 Patienten, die zu einer routinemäßigen Herzkatheteruntersuchung mit nachfolgender Protamingabe einbestellt waren, einbezogen. Das mittlere Alter der Patienten betrug 65,7 Jahre und die Geschlechterverteilung 44% Männern und 56% Frauen.

Die Entnahme der Blutproben erfolgte kurz vor der geplanten Protamingabe und 5 min danach über einen für die Herzkatheteruntersuchung gelegten Katheter in der *Arteria femoralis dexter* durch den jeweiligen untersuchenden Arzt. Die Proben wurden nach Entnahme anonymisiert, sofort in 20 ml eisgekühlten 80%igen Ethanol gegeben und danach wie im Methodenteil beschrieben für die EIA-Analyse aufbereitet. Während der kompletten Untersuchung, einschließlich der Protamingabe, wurden die Kreislaufparameter der Patienten mittels EKG und Blutdruckmessgeräten beobachtet und aufgezeichnet. Bei 22 von 25 Patienten ließ sich kurz nach der Injektion von Protamin ein Abfall des systolischen Blutdrucks beobachten. Im Mittel sank der Blutdruck signifikant um 13 mmHg von 154 mmHg auf 141 mmHg. Die größte Differenz lag bei 39 mmHg.

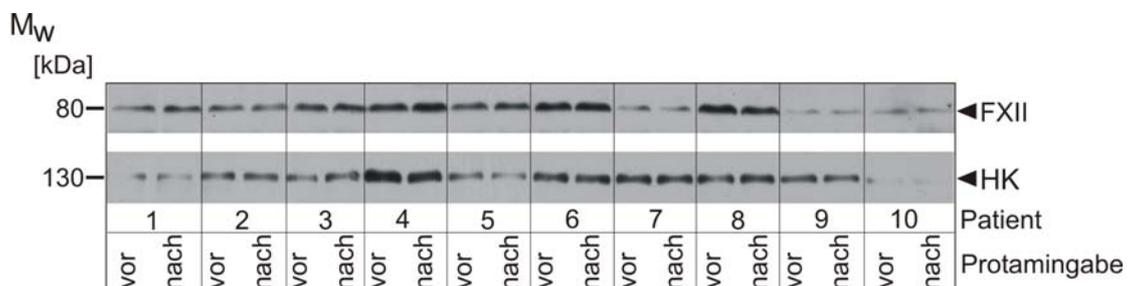
Abb. 4.9 zeigt die Differenz des systolischen Blutdrucks vor und nach Protaminapplikation bei den 10 Patienten mit dem stärksten Blutdruckabfall. Wir versuchten BK im Plasma zu bestimmen, jedoch ergab die EIA-Analyse der Patientenproben z.T. auch negative Werte für BK, wodurch sich in diesem Versuch keine eindeutige Aussage treffen lässt, ob der beobachtete Blutdruckabfall durch BK vermittelt ist.



**Abb. 4.9: Blutdruckabfall von 10 heparinisierten Patienten nach Protaminapplikation**

Differenz der systolischen Blutdruckwerte der zehn Patienten mit dem stärksten Blutdruckabfall nach Protamingabe. Die Messung erfolgte am Oberarm der Patienten nach der Methode von Riva-Rocci.

Eine Analyse von systemischen HK- und FXII-Spiegeln im „Western Blot“ zeigte keine klare Reduktion der Plasmaproteine. Abb. 4.11 gibt beispielhaft das Ergebnis der Analyse der ersten zehn Patienten wieder. Bei keinem der 25 Patienten ließ sich mit diesem „Western Blot“-Assay eine eindeutige Aktivierung von FXII oder eine Spaltung von HK und damit verbundene BK-Freisetzung detektieren. Möglicherweise ist die Sensitivität zu gering, da HK im Plasma  $10^3$ -fach höher konzentriert vorliegt als BK. Das heißt, dass eine Spaltung von 1% HK ausreicht um eine maximale BK-Wirkung hervorzurufen.



**Abb. 4.10: Western Blot Analyse von FXII und H-Kininogen vor und nach Protamingabe in humanem Plasma**

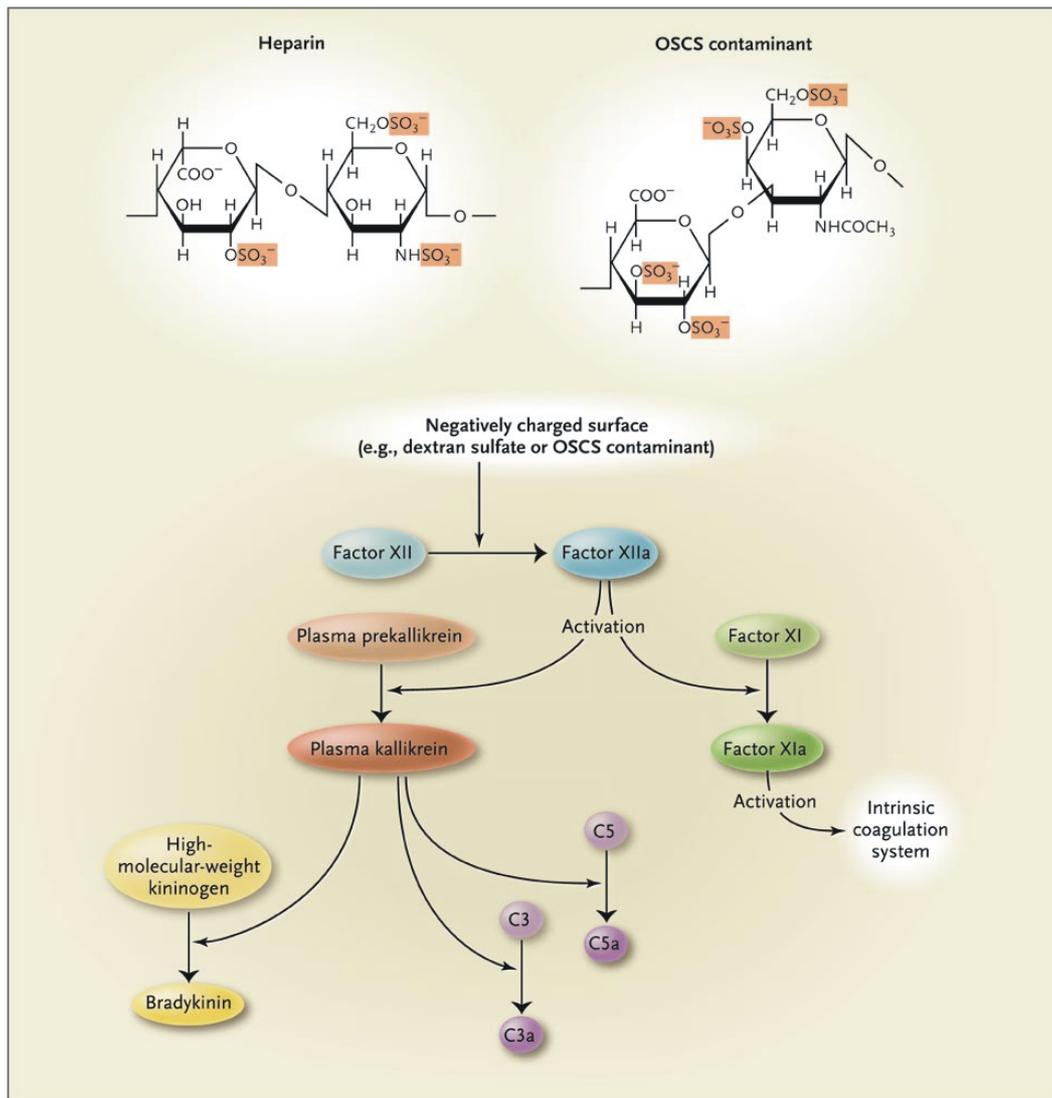
Jeweils  $0,5\mu\text{l}$  der vor und nach Protamingabe entnommen Blutproben wurde zur Analyse mittels „Western Blot“ aufgetragen und mit Antikörpern gegen FXII (1:1000) und HK (1:4000) auf die Spaltung von FXII und HK untersucht. In der oberen Zeile sind die Ergebnisse für FXII in der unteren Zeile für HK gezeigt. Die Ziffern bezeichnen die Patientennummern.

## 5 Diskussion

Blutdruckabfälle sind eine häufige Nebenwirkung nach der intravenösen Applikation von Protamin. In dieser Arbeit wurde diese unerwünschte Reaktion nach Protamingabe *in vitro* und *in vivo* genauer untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Komplexe aus Heparin und Protamin an Endothelzellen gebunden eine Aktivierung von FXII und damit der Kontaktphasenkaskade auslösen. Dies führt BK-vermittelt zu einer erhöhten Produktion von Stickstoffmonoxid in den Endothelzellen, was eine Relaxation der glatten Muskelfasern der Gefäße und somit eine Vasodilatation hervorruft. Durch diese Vasodilatation kommt es zu einem Absinken des systemischen Blutdruckes, wie sowohl die Untersuchung der Kreislaufparameter nach Protamingabe im Mausmodell als auch von Menschen ergab.

### 5.1 Heparinkomplikationen

Obwohl die meisten Patienten eine Therapie mit Heparin gut tolerieren wurde in jüngster Zeit vermehrt über schwerwiegende Nebenwirkungen nach intravenöser Heparinapplikation berichtet. Innerhalb weniger Minuten nach der Gabe von Heparin präsentierten sich die Patienten mit Hypotension, Angioödem, Larynxschwellungen oder ähnlichen Symptomen, die in einigen Fällen sogar zum Tode führten (CDC, 2008). Als Ursache für diese gehäuft auftretenden Zwischenfälle wurde im April 2008 durch Guerrini und Mitarbeiter mit Hilfe von NMR-Analysen eine Verunreinigung der verwendeten Heparinchargen mit übersulfatiertem Chondroitinsulfat beschrieben (Guerrini *et al.*, 2008). Zeitgleich zeigten Kishimoto *et al.*, dass die schweren Reaktionen auf das verunreinigte Heparin vermutlich durch eine Aktivierung des Kontaktphasensystems und einer damit verbundenen Freisetzung von BK ausgelöst werden (Kishimoto *et al.*, 2008). Analoge Daten wurden bereits in der 80er Jahren *in vitro* in Plasmaexperimenten gefunden (Hojima *et al.*, 1984; Sanchez *et al.*, 1998). Chondroitinsulfat aktiviert FXII und damit auch das Kontaktphasensystem sehr effizient (Silverberg and Diehl, 1987).



**Abb. 5.1: Aktivierung der Kontaktphasenkaskade durch polyanionische Oberflächen wie übersulfatiertes Chondroitinsulfat (OSCS), einem Heparinkontaminant.**

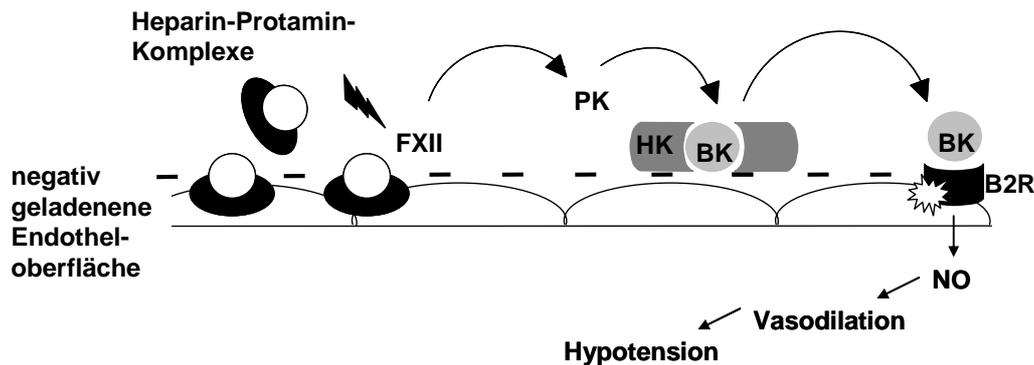
FXII wird durch negativ geladene Oberflächen aktiviert. OSCS induziert die autokatalytische Aktivierung von FXII zu FXIIa, welcher dann die Umwandlung von FXI zu FXIa und von Plasma Prokallikrein zu Kallikrein auslöst. FXIa aktiviert die intrinsische Gerinnungskaskade, während Kallikrein die Konversion von HK zu Bradykinin katalysiert. Kallikrein hat außerdem *in vitro* die Fähigkeit die Anaphylatoxine aus C3 und C5 freizusetzen. (nach (Schwartz, 2008))

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Aktivierung der Kontaktphasenkaskade durch Heparin bestätigt. Wie in Abb. 4.1 gezeigt, löst die Zugabe von Heparin als negative Oberfläche zu humanem Zitratplasma eine Spaltung von HK aus, während die Zugabe von Protamin das Kontaktphasensystem nicht aktiviert. Auch einzelne Komplexe von Heparin und Protamin mit Überschuss an Heparin initiieren das Kontaktphasensystem. Dies lässt sich damit erklären, dass Heparin-Protamin-Komplexe nicht elektroneutral sondern negativ geladen sind (Rossmann *et al.*, 1982). Analysen mit dem Elektronen-

mikroskop zeigten, dass bei der Neutralisierungsreaktion von Heparin mit Protamin kugelförmige Komplexe entstehen, die eine polyanionische Oberfläche aufweisen (Rossmann *et al.*, 1982). Somit besitzen auch die Komplexe eine negativ geladene Oberfläche, durch welche FXII aktiviert werden kann. Eine effiziente HK-Spaltung wurde jedoch nur dann initiiert, wenn Heparin stark im Überschuss vorlag. All diese Daten wurden in Plasma erhoben. Da die Halbwertszeit von Bradykinin mit  $< 30$  s sehr kurz ist und BK nur lokal wirkt, war es interessant zu prüfen wie sich Heparin-Protamin-Komplexe auf Endothelzellen verhalten. Ausgehend vom vorgeschlagenen Modell der Nucleosomenbindung an Zelloberflächen von Watson (Watson *et al.*, 1999) konnte Marco Schwieder zeigen, dass Heparin-Protamin-Komplexe sich an die Proteoglykane auf Endothelzelloberflächen binden (Schwieder, 2004). Protamin kann an die negativen Ladungen der Endothelzelloberfläche anlagern und dann nachfolgend im Sinne einer „Sandwich“-Struktur negativ geladenes Heparin an sich binden, sodass der „Sandwich“ aus Proteoglykanen (negativ), Protamin (positiv) und Heparin (negativ) aufgebaut ist.

Unsere Daten unterstützen eine Arbeit von Reddigari *et al.*, die zeigten, dass FXII an die negativ geladene Oberfläche von Endothelzellen binden und auch in gebundener Form PK aktivieren kann (Reddigari *et al.*, 1993). Nicht bestätigt werden konnten mit diesen Ergebnissen Untersuchungen von Sanchez *et al.*. Die Gruppe zeigte, dass FXII durch oberflächengebundenes Heparin *in vitro* zwar zu  $\alpha$ FXIIa aktiviert wird, dessen Aktivität aber innerhalb einer Sekunde auf der Oberfläche durch die Bildung eines Antithrombin-FXII-Komplexes gehemmt wird (Sanchez *et al.*, 1995; Sanchez *et al.*, 1998).

Die Abb. 5.2. zeigt eine schematische Darstellung zum Pathomechanismus der Heparin-Protamin-induzierten Hypotension.



**Abb. 5.2: Schematische Darstellung zum Pathomechanismus der Heparin-Protamin-induzierten Hypotension**

Die Applikation von Protamin kann in heparinisierten Patienten eine NO-vermittelte Hypotension auslösen, indem Heparin (○) und Protamin (●) an Zelloberflächen binden. Dort induzieren sie eine Aktivierung des FXII und damit der Kontaktphasenkaskade, was PK-vermittelt zu einer Freisetzung von BK aus HK führt. BK aktiviert nun den B2R und bewirkt dadurch über  $Ca^{2+}$ -vermittelte Signalwege eine Aktivierung der eNOS und die Produktion von NO.

## 5.2 Mausmodell versus Mensch

Die Wirkung von Heparin- und Protamingabe wurde in verschiedenen Tiermodellen untersucht. Dabei wurde das Absinken des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz bei Hasen (Hamada *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003) und Hunden (Freitas *et al.*, 2004) beschrieben.

Die Verwendung eines Mausmodells zur Untersuchung der Heparin-Protamin-Komplikationen bot in dieser Arbeit mehrere Vorteile. Studien mit Gen-defizienten Mäusen der verschiedenen Gerinnungsfaktoren haben dazu beigetragen die Kaskaden zu verstehen und die Bedeutung der einzelnen beteiligten Faktoren genauer zu entschlüsseln (Mackman, 2005), da durch die Unterbrechung individueller Gene für die einzelnen Signalwege die Effekte auch *in vivo* analysiert werden können. So weisen FXII-defiziente Mäuse beispielsweise ein defekte arterielle Thrombusbildung auf (Renne *et al.*, 2005) und scheinen dadurch vor intrazerebralen Insulten geschützt zu sein. Zudem können FXII<sup>-/-</sup> Mäuse mit humanem FXII rekonstituiert werden (Renne *et al.*, 2005). Es gibt aber auch Unterschiede zwischen Mensch und Maus. So konnten Merkulov und Mitarbeiter zeigen, dass Mäuse anstelle von einem Kininogen-Gen zwei homologe Kininogen-Gene besitzen, die gewebesabhängig exprimiert werden

(Merkulov *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu sind Kininrezeptoren bei Mensch und Maus sehr ähnlich und der humane Antagonist HOE140 wirkt sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit wurden der Blutdruck und die Herzfrequenz nach Heparin-Protamingabe analysiert. Die Reaktion der Tiere in unseren Versuchen ähnelte dem Herz-Kreislauf-Phänotyp beim Menschen nach Heparin-Protamingabe. Die Applikation von Protamin führte beim heparinisierten Patienten oft zu einem deutlichen Absinken des systemischen Blutdrucks und der Herzfrequenz (Carr and Silverman, 1999; Oe *et al.*, 1996; Wakefield *et al.*, 1996). Nach der Gabe von Protamin war in dieser Arbeit ein signifikantes Absinken des Blutdrucks und der Herzfrequenz in den heparinisierten Mäusen zu verzeichnen. Der Blutdruck sank im Mittel um ca. 14mmHg (Abb. 4.7A) und die Herzfrequenz im Mittel um 120 Schläge/min (Abb. 4.8A). Die Protaminapplikation nach Herzkatheteruntersuchungen am Patienten ergab im Mittel ein Absinken des systolischen Blutdruckes um 12 mmHg.

Nach der intravenösen Applikation von Inhibitoren gegen FXII oder den B2R konnte in dieser Arbeit sowohl der Abfall des Blutdrucks als auch die gleichzeitig auftretende Bradykardie nach Protamingabe in Mäusen deutlich abgeschwächt werden, Abb. 4.7C. Bestätigt wurden diese Ergebnisse mit der Verwendung FXII- und B2R-defizienter Tiere. Die Verabreichung von Heparin und Protamin führte weder zu einer Hypotension noch zu einem Absinken der Herzfrequenz der Gen-defizienten Tiere, Abb.4.7D. Die Blockade spezifischer Komponenten der Kontaktphasenkaskade bewirkt *in vivo* eine Hemmung der häufigsten Nebenwirkung von Protamin. Die Mäuse, denen FXII oder der B2R fehlen, scheinen also erheblich gegen die Heparin-Protamin-induzierte Hypotension geschützt zu sein, wodurch sich auch neue Therapieoptionen für den Menschen ergeben könnten.

### **5.3 Pathophysiologie der Heparin-Protamin-Komplikationen**

Mit dieser Arbeit konnten wir sowohl in der Zellkultur als auch im Mausmodell zeigen, dass die Aktivierung der Kontaktphasenkaskade und damit die Freisetzung von BK wesentlich zu der Heparin-Protamin-induzierten Hypotension beitragen.

Dass die Gabe von Protamin nach kardiopulmonalen Bypassuntersuchungen zu einer

Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems führt, wurde bereits in mehreren Studien beschrieben. Nach Heparin-Protamingabe zeigten sich erhöhte Spiegel der Anaphylatoxine C3a und C4a (Cavarocchi *et al.*, 1985; Kirklin *et al.*, 1986). Die Aktivierung des klassischen Komplementweges ist unter anderem über FXII möglich (Ghebrehiwet *et al.*, 1983). Somit könnte eine Aktivierung von FXII durch Heparin-Protamin-Komplexe auch eine Aktivierung des klassischen Komplementweges initiieren.

Eine andere Gruppe brachte die Vasodilatation nach Protamingabe mit der Freisetzung von NO in Verbindung, da sie den relaxierenden Effekt von Protamin an isolierten Pulmoarteriensegmenten von Hunden durch die Gabe von NO-Inhibitoren (z.B. NG-monomethyl-L-arginine) blockieren konnten. Die Voraussetzung für die Protamin-induzierte Gefäßrelaxation bildet eine intakte Endothelzelloberfläche (Evora *et al.*, 1995; Pearson *et al.*, 1992). Eine erhöhte Konzentration an NO im Zentralen Nervensystem von Hasen wurde von Hamada und Mitarbeitern postuliert, nachdem sich eine nach Protamingabe aufgetretene Hypotension und Bradykardie durch die Verabreichung des NO-Inhibitors L-NAME beheben ließ (Hamada *et al.*, 2005). In einer weiteren Tierstudie wurde die hypotensive Wirkung von Protamin in heparinisierten Hunden untersucht. Auch hier zeigte sich, dass die nach Protamingabe auftretende Hypotension durch die Verabreichung von NG-monomethyl-L-arginine (2 mg/kg) und Methylene Blue (2 mg/kg), einem Inhibitor der cGMP-Synthese, blockierbar war (Raikar *et al.*, 1996). Unsere Ergebnisse der Fluoreszenzmessung zeigen, dass durch Heparin-Protamin-Komplexe an Endothelzellen die Kontaktphasenkaskade aktiviert und über die Freisetzung von BK NO gebildet werden kann (Abb. 4.5). Zusammen demonstrieren diese Daten, dass cGMP/NO-Signalwege wichtig für die Heparin-Protamin-vermittelten Effekte sind.

Für die Entstehung von BK nach Protaminapplikation spricht neben den Resultaten im Tiermodell auch, dass 6 der 10 Patienten mit dem höchsten Blutdruckabfall (> 12 mmHg) zum Zeitpunkt der Herzkatheteruntersuchung einen ACE-Hemmer einnahmen (nicht gezeigt). Da diese Medikamente durch die Hemmung des Angiotensin-konvertierenden Enzyms auch den Abbau von BK verlangsamen (Davie *et al.*, 1999; Linz and Scholkens, 1992), könnte neu gebildetes BK entsprechend länger wirken und dadurch die Hypotension verstärken. Konsistent sind die Ergebnisse dieser Arbeit auch

mit dem Erklärungsansatz für die Protaminkomplikationen von Tan *et al.*, der eine Inhibition der Carboxypeptidase N, einem Enzym, das ebenfalls für den Abbau von Kininen und somit auch von BK verantwortlich ist, als Ursache für die Heparin-Protamin-Komplikationen beschreibt (Tan *et al.*, 1989). Würde die Peptidase zusätzlich zur BK-Generierung durch Protamin gehemmt, könnte das vermehrt entstehende BK ähnlich wie bei der Einnahme von ACE-Hemmern nicht so rasch abgebaut werden, was dessen hypotensive Wirkung wiederum verstärken würde.

Die Messung der BK-Konzentration in humanem Plasma mittels EIA sollte die zuvor gefundenen Resultate unterstützen. Mit den gemessenen Daten lässt sich allerdings keine Aussage über die Höhe der BK-Konzentration im Plasma vor und nach Protamingabe treffen.

Es ist denkbar, dass ein Grund für die unerwartete Verteilung der EIA-Ergebnisse die Aufreinigungsmethode der Blutproben für den EIA ist. Neben sehr vielen verschiedenen Aufreinigungsschritten erfolgte die Trocknung der Proben zum Teil mit Hilfe eines Rotationsverdampfers. Dabei wurden die Proben auf 40°C erwärmt, was eventuell die BK-Stabilität gefährdete. Daten von Nussberger *et al.* zeigen, dass die Bestimmung von BK in humanem Plasma sehr schwierig ist und einen besonderen Umgang mit den Proben erfordert (Nussberger *et al.*, 1998).

Eine andere mögliche Erklärung wäre die Tatsache, dass BK im Körper lokal an den Gefäßwänden entsteht und sehr schnell innerhalb weniger Sekunden (< 30 s) in der Lunge durch das Angiotensin-konvertierenden Enzym abgebaut wird (Sheikh and Kaplan, 1989; Yang and Erdos, 1967). Dadurch war es zum Zeitpunkt der Probenentnahme eventuell nicht mehr in einer für die Messung ausreichenden Konzentration im Blut vorhanden.

Unabhängig von unserer Arbeit konnte 2005 in einer kleineren Studie eine Erhöhung des BK-Wertes nach Protaminapplikation mittels EIA in humanem Plasma nachgewiesen werden. In dieser Studie wurde, ähnlich dieser Arbeit, von 16 männlichen Patienten die Konzentration von BK vor und nach Protaminapplikation im Blut gemessen. Bei allen 16 Patienten fand sich eine Erhöhung des BK-Wertes nach der Protamingabe. Die Hälfte der Patienten erhielt außerdem vor der Protamingabe 100 µg/kg des B2R-Antagonisten HOE140. In dieser Gruppe konnte der Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks deutlich vermindert werden (Pretorius *et al.*, 2005). Zu

beachten ist allerdings, dass alle an der Studie teilnehmenden Patienten präoperativ einen ACE-Hemmer einnahmen, wodurch eventuell schon vor der Protamingabe erhöhte Level an BK in Plasma vorherrschten und BK dadurch auch leichter detektierbar war (Pretorius *et al.*, 2004). Des Weiteren lag die minimale Detektionsgrenze für BK in dem für die Studie verwendeten Kit mit 0,02-0,04 ng/ml bzw. 1-2 pg/well wesentlich niedriger als die Detektionsgrenze des von uns eingesetzten EIA Kits (0,173 ng/ml bzw. 7,2 pg/well).

#### **5.4 Ausblick**

In Zusammenschau mit den zuvor zitierten Studien bieten die Resultate dieser Arbeit eine mögliche Erklärung dafür, wie es auf zellulärer und molekularer Ebene nach Protamininjektion zur Freisetzung von NO kommt. Zur Weiterführung dieser Arbeit sollten zunächst die im Tiermodell gefundenen Ergebnisse in weiteren Versuchsreihen genauer gesichert werden. Eventuell würde es sich anbieten erneut in humanem Plasma die BK-Konzentrationen vor und nach Protaminapplikation zu bestimmen. Es wäre dann allerdings ein sensitiverer Assay zu empfehlen, der zudem mit weniger Aufbereitungsschritten der Proben auskommt, um die Stabilität des Peptidhormons nicht zu gefährden. In einer weiteren Kooperation mit den Kardiologen der Universitätsklinik wäre auch eine erneute und größer angelegte Patientenstudie zur Bestimmung von BK sinnvoll. Im Anschluss daran sollte in einem ähnlichen Ansatz wie in der oben erwähnten Arbeit von Pretorius *et al.*, eine humane Studie über die Wirkung des B2R-Antagonisten HOE140 im Zusammenhang mit den Protaminkomplikationen begonnen werden. Mit einem kurzzeitigen Einsatz von z.B. HOE140 vor der Applikation von Protamin, könnten sich neue, vorbeugende Maßnahmen zu den schweren Komplikationen nach Protamingabe ergeben. Damit könnte auch Patienten die momentan kein Protamin erhalten, da sie einen oder mehrere der zuvor beschriebenen Risikofaktoren aufweisen, neue Therapieoptionen eröffnet und ein breiterer Einsatz von Heparin und Protamin ermöglicht werden.

## **6 Zusammenfassung / Summary**

### **6.1 Zusammenfassung**

Protamin antagonisiert die antikoagulierende Wirkung von Heparin. Nach intravenöser Protaminapplikation treten als häufige unerwünschte Wirkungen ein systemischer Blutdruckabfall, Herzfrequenzabfall sowie eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Widerstandes auf. Die Protamin-assoziierten Nebenwirkungen sind zum Teil lebensbedrohlich. Der ihnen zugrunde liegende Mechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit auf Zellkultur- und Gesamttierebene analysiert sowie mögliche Therapieoptionen aufgezeigt.

Heparin-Protamin-Komplexe aktivieren auf Endothelzellen den Blutgerinnungsfaktor XII. Aktiver Faktor XII startet über sein Substrat Plasmakallikrein die Freisetzung des Peptidhormons Bradykinin aus hochmolekularem Kininogen. Funktions-inhibierende Antikörper oder pharmakologische Inhibitoren von Plasmakallikrein oder Faktor XII blockierten die Heparin-Protamin induzierte Bradykininbildung auf Zellen. Stickstoffmonoxid-spezifische Fluorophore zeigten, dass Bradykinin-Bindung an Kinin B2 Rezeptoren die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase aktiviert. B2 Rezeptorantagonisten blockierten die Heparin-Protamin induzierte Stickstoffmonoxidbildung. Die intravenöse Infusion von Protamin in heparinisierte Wildtypmäuse senkte den systemischen Blutdruck und die Herzfrequenz. Im Gegensatz dazu waren Faktor XII und B2 Rezeptor Gen-defiziente Mäuse oder Tiere, die Faktor XII Inhibitoren oder B2 Rezeptorantagonisten infundiert bekamen, vor Heparin-Protamin-Effekten geschützt.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Heparin-Protamin-Komplikationen durch eine Faktor XII-getriebene Bradykininbildung verursacht werden. Eine Blockade der Bradykininbildung oder -wirkung eröffnet eventuell eine Möglichkeit, die Heparin-Protamin-Nebenwirkungen auch beim Patienten zu therapieren.

## 6.2 Summary

Protamine is the antidote for anticoagulant effects of heparin. Intravenous application of protamine may cause systemic hypotension, heart rate decrease and increase in pulmonary pressure. Adverse effects associated with protamine are common and potentially life-threatening. This work characterizes the pathomechanism of heparin-protamine-effects in cell culture and in transgenic mice and suggests therapeutic options to block the adverse effects.

Heparin-protamine-complexes activate blood coagulation factor XII on endothelial cells. Active factor XII initiates the generation of the vasoactive peptide hormone bradykinin from high molecular weight kininogen by plasmakallikrein action. Antibodies or low molecular weight inhibitors that interfere with factor XII or plasmakallikrein activity blocked heparin-protamine-induced bradykinin effects on cells. Nitric oxide-specific dyes revealed that bradykinin-binding to kinin B2 receptors activates the endothelial nitric oxide synthase. B2 receptor antagonists interfered with heparin/protamine-driven nitric oxide generation. Intravenous application of protamine into heparinized wildtype mice reduced systemic blood pressure and heart rate. Factor XII or B2 receptor deficient mice were protected from heparin-protamine-effects. Consistently, pharmacological targeting of B2 receptors or factor XII inhibited protamine associated cardiovascular effects in heparinized wildtype mice.

Together, this work demonstrates that heparin-protamine-adverse effects are due to factor XII activation that culminates in the generation of bradykinin. Inhibition of bradykinin formation or signaling may offer novel strategies to block adverse heparin-protamin-effects in patients.

## 7 Literatur

- Ando, T., Yamasaki, M. and Suzuki, K. (1973) Protamines. Isolation, characterization, structure and function. *Mol Biol Biochem Biophys*, **12**, 1-114.
- Backman, S.B., Gilron, I. and Robbins, R. (1997) Protamine-induced hypotension and bradycardia in a cardiac transplant patient. *Can J Anaesth*, **44**, 520-524.
- Balhorn, R. (1982) A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol*, **93**, 298-305.
- Balhorn, R., Brewer, L. and Corzett, M. (2000) DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol Reprod Dev*, **56**, 230-234.
- Berrettini, M., Schleef, R.R., Espana, F., Loskutoff, D.J. and Griffin, J.H. (1989) Interaction of type 1 plasminogen activator inhibitor with the enzymes of the contact activation system. *J Biol Chem*, **264**, 11738-11743.
- Bircher, A.J., Harr, T., Hohenstein, L. and Tsakiris, D.A. (2006) Hypersensitivity reactions to anticoagulant drugs: diagnosis and management options. *Allergy*, **61**, 1432-1440.
- Boigner, H., Lechner, E., Brock, H., Golej, J. and Trittenwein, G. (2001) Life threatening cardiopulmonary failure in an infant following protamine reversal of heparin after cardiopulmonary bypass. *Paediatr Anaesth*, **11**, 729-732.
- Brewer, L., Corzett, M. and Balhorn, R. (2002) Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J Biol Chem*, **277**, 38895-38900.
- Bruins, P., te Velthuis, H., Eerenberg-Belmer, A.J., Yazdanbakhsh, A.P., de Beaumont, E.M., Eijssman, L., Trouwborst, A. and Hack, C.E. (2000) Heparin-protamine complexes and C-reactive protein induce activation of the classical complement pathway: studies in patients undergoing cardiac surgery and in vitro. *Thromb Haemost*, **84**, 237-243.
- Carr, J.A. and Silverman, N. (1999) The heparin-protamine interaction. A review. *J Cardiovasc Surg*, **40**, 659-666.
- Cavarocchi, N.C., Schaff, H.V., Orszulak, T.A., Homburger, H.A., Schnell, W.A., Jr. and Pluth, J.R. (1985) Evidence for complement activation by protamine-heparin interaction after cardiopulmonary bypass. *Surgery*, **98**, 525-531.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2008) Acute allergic-type reactions among patients undergoing hemodialysis - multiple states, 2007-2008. *Morb Mortal Wkly Rep*, **57**, 124-125.

- Clarke, B.J., Cote, H.C., Cool, D.E., Clark-Lewis, I., Saito, H., Pixley, R.A., Colman, R.W. and MacGillivray, R.T. (1989) Mapping of a putative surface-binding site of human coagulation factor XII. *J Biol Chem*, **264**, 11497-11502.
- Cochrane, C.G. and Revak, S.D. (1980) Dissemination of contact activation in plasma by plasma kallikrein. *J Exp Med*, **152**, 608-619.
- Cochrane, C.G., Revak, S.D. and Wuepper, K.D. (1973) Activation of Hageman factor in solid and fluid phases. A critical role of kallikrein. *J Exp Med*, **138**, 1564-1583.
- Colman, R.W. and Schmaier, A.H. (1997) Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood*, **90**, 3819-3843.
- Cool, D.E., Edgell, C.J., Louie, G.V., Zoller, M.J., Brayer, G.D. and MacGillivray, R.T. (1985) Characterization of human blood coagulation factor XII cDNA. Prediction of the primary structure of factor XII and the tertiary structure of beta-factor XIIa. *J Biol Chem*, **260**, 13666-13676.
- Couture, R., Harrisson, M., Vianna, R.M. and Cloutier, F. (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*, **429**, 161-176.
- Davie, A.P., Dargie, H.J. and McMurray, J.J. (1999) Role of bradykinin in the vasodilator effects of losartan and enalapril in patients with heart failure. *Circulation*, **100**, 268-273.
- Davie, E.W. and Ratnoff, O.D. (1964) Waterfall Sequence For Intrinsic Blood Clotting. *Science*, **145**, 1310-1312.
- de Agostini, A., Lijnen, H.R., Pixley, R.A., Colman, R.W. and Schapira, M. (1984) Inactivation of factor XII active fragment in normal plasma. Predominant role of C-1-inhibitor. *J Clin Invest*, **73**, 1542-1549.
- Dunn, J.T., Silverberg, M. and Kaplan, A.P. (1982) The cleavage and formation of activated human Hageman factor by autodigestion and by kallikrein. *J Biol Chem*, **257**, 1779-1784.
- Espana, F. and Ratnoff, O.D. (1983) Activation of Hageman factor (factor XII) by sulfatides and other agents in the absence of plasma proteases. *J Lab Clin Med*, **102**, 31-45.
- Evora, P.R., Pearson, P.J. and Schaff, H.V. (1995) Protamine induces endothelium-dependent vasodilatation of the pulmonary artery. *Ann Thorac Surg*, **60**, 405-410.
- Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L. and Kjellen, L. (1999) Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature*, **400**, 773-776.

- Freitas, C.F., Faro, R., Dragosavac, D., Clozel, M., De Nucci, G. and Antunes, E. (2004) Role of endothelin-1 and thromboxane A2 in the pulmonary hypertension induced by heparin-protamine interaction in anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*, **43**, 106-112.
- Ghebrehiwet, B., Randazzo, B.P., Dunn, J.T., Silverberg, M. and Kaplan, A.P. (1983) Mechanisms of activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J Clin Invest*, **71**, 1450-1456.
- Griffin, J.H. (1978) Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XII). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 1998-2002.
- Griffin, J.H. and Cochrane, C.G. (1976) Human factor XII (Hageman factor). *Methods Enzymol*, **45**, 56-65.
- Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., Naggi, A., Viswanathan, K., Bisio, A., Capila, I., Lansing, J.C., Guglieri, S., Fraser, B., Al-Hakim, A., Gunay, N.S., Zhang, Z., Robinson, L., Buhse, L., Nasr, M., Woodcock, J., Langer, R., Venkataraman, G., Linhardt, R.J., Casu, B., Torri, G. and Sasisekharan, R. (2008) Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nat Biotechnol*, **26**, 669-675.
- Hamada, Y., Kameyama, Y., Narita, H., Benson, K.T. and Goto, H. (2005) Protamine after heparin produces hypotension resulting from decreased sympathetic outflow secondary to increased nitric oxide in the central nervous system. *Anesth Analg*, **100**, 33-37.
- Han, E.D., MacFarlane, R.C., Mulligan, A.N., Scafidi, J. and Davis, A.E., 3rd. (2002) Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest*, **109**, 1057-1063.
- Hirsh, J. (1984) Heparin induced bleeding. *Nouv Rev Fr Hematol*, **26**, 261-266.
- Hirsh, J., Warkentin, T.E., Shaughnessy, S.G., Anand, S.S., Halperin, J.L., Raschke, R., Granger, C., Ohman, E.M. and Dalen, J.E. (2001) Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest*, **119**, 64S-94S.
- Hobbahn, J., Habazettl, H., Conzen, P. and Peter, K. (1991) [Complications caused by protamine. 1: Pharmacology and pathophysiology]. *Anaesthesist*, **40**, 365-374.
- Hobbahn, J., Habazettl, H., Conzen, P. and Peter, K. (1991) [Complications caused by protamine. 2. Therapy and prevention]. *Anaesthesist*, **40**, 421-428.
- Hojima, Y., Cochrane, C.G., Wiggins, R.C., Austen, K.F. and Stevens, R.L. (1984) In vitro activation of the contact (Hageman factor) system of plasma by heparin and chondroitin sulfate E. *Blood*, **63**, 1453-1459.

- Humphries, D.E., Wong, G.W., Friend, D.S., Gurish, M.F., Qiu, W.T., Huang, C., Sharpe, A.H. and Stevens, R.L. (1999) Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature*, **400**, 769-772.
- Itoh, Y., Ma, F.H., Hoshi, H., Oka, M., Noda, K., Ukai, Y., Kojima, H., Nagano, T. and Toda, N. (2000) Determination and bioimaging method for nitric oxide in biological specimens by diaminofluorescein fluorometry. *Anal Biochem*, **287**, 203-209.
- Juergens, C.P., Semsarian, C., Keech, A.C., Beller, E.M. and Harris, P.J. (1997) Hemorrhagic complications of intravenous heparin use. *Am J Cardiol*, **80**, 150-154.
- Kaplan, A.P., Joseph, K. and Silverberg, M. (2002) Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol*, **109**, 195-209.
- Kaufmann, J., Haasemann, M., Modrow, S. and Muller-Esterl, W. (1993) Structural dissection of the multidomain kininogens. Fine mapping of the target epitopes of antibodies interfering with their functional properties. *J Biol Chem*, **268**, 9079-9091.
- Kimmel, S.E., Sekeres, M., Berlin, J.A. and Ellison, N. (2002) Mortality and adverse events after protamine administration in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg*, **94**, 1402-1408.
- Kimmel, S.E., Sekeres, M.A., Berlin, J.A., Goldberg, L.R. and Strom, B.L. (1998) Adverse events after protamine administration in patients undergoing cardiopulmonary bypass: risks and predictors of under-reporting. *J Clin Epidemiol*, **51**, 1-10.
- Kirklin, J.K., Chenoweth, D.E., Naftel, D.C., Blackstone, E.H., Kirklin, J.W., Bitran, D.D., Curd, J.G., Reves, J.G. and Samuelson, P.N. (1986) Effects of protamine administration after cardiopulmonary bypass on complement, blood elements, and the hemodynamic state. *Ann Thorac Surg*, **41**, 193-199.
- Kishimoto, T.K., Viswanathan, K., Ganguly, T., Elankumaran, S., Smith, S., Pelzer, K., Lansing, J.C., Sriranganathan, N., Zhao, G., Galcheva-Gargova, Z., Al-Hakim, A., Bailey, G.S., Fraser, B., Roy, S., Rogers-Cotrone, T., Buhse, L., Whary, M., Fox, J., Nasr, M., Dal Pan, G.J., Shriver, Z., Langer, R.S., Venkataraman, G., Austen, K.F., Woodcock, J. and Sasisekharan, R. (2008) Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *N Engl J Med*, **358**, 2457-2467.
- Kjellen, L. and Lindahl, U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem*, **60**, 443-475.
- Kleinschnitz, C., Stoll, G., Bendszus, M., Schuh, K., Pauer, H.U., Burfeind, P., Renne, C., Gailani, D., Nieswandt, B. and Renne, T. (2006) Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia

- without interfering with hemostasis. *J Exp Med*, **203**, 513-518.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, **10**, 203-209.
- Leeb-Lundberg, L.M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D.J. and Zuraw, B.L. (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*, **57**, 27-77.
- Lindahl, U., Backstrom, G., Hook, M., Thunberg, L., Fransson, L.A. and Linker, A. (1979) Structure of the antithrombin-binding site in heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 3198-3202.
- Lindahl, U. and Kjellen, L. (1991) Heparin or heparan sulfate--what is the difference? *Thromb Haemost*, **66**, 44-48.
- Linz, W. and Scholkens, B.A. (1992) Role of bradykinin in the cardiac effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol*, **20**, 83-90.
- Loza, J.P., Gurewich, V., Johnstone, M. and Pannell, R. (1994) Platelet-bound prekallikrein promotes pro-urokinase-induced clot lysis: a mechanism for targeting the factor XII dependent intrinsic pathway of fibrinolysis. *Thromb Haemost*, **71**, 347-352.
- Mackman, N. (2005) Tissue-specific hemostasis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 2273-2281.
- Matsuura, T., Kobayashi, T., Asahina, T., Kanayama, N. and Terao, T. (2001) Is factor XII deficiency related to recurrent miscarriage? *Semin Thromb Hemost*, **27**, 115-120.
- Merkulov, S., Zhang, W.M., Komar, A.A., Schmaier, A.H., Barnes, E., Zhou, Y., Lu, X., Iwaki, T., Castellino, F.J., Luo, G. and McCrae, K.R. (2008) Deletion of murine kininogen gene 1 (mKng1) causes loss of plasma kininogen and delays thrombosis. *Blood*, **111**, 1274-1281.
- Michell, B.J., Harris, M.B., Chen, Z.P., Ju, H., Venema, V.J., Blackstone, M.A., Huang, W., Venema, R.C. and Kemp, B.E. (2002) Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *J Biol Chem*, **277**, 42344-42351.
- Monreal, M., Olive, A., Lafoz, E. and del Rio, L. (1991) Heparins, coumarin, and bone density. *Lancet*, **338**, 706.
- Nishikawa, K., Shibayama, Y., Kuna, P., Calcaterra, E., Kaplan, A.P. and Reddigari, S.R. (1992) Generation of vasoactive peptide bradykinin from human umbilical vein endothelium-bound high molecular weight kininogen by plasma kallikrein. *Blood*, **80**, 1980-1988.

- Nussberger, J., Cugno, M., Amstutz, C., Cicardi, M., Pellacani, A. and Agostoni, A. (1998) Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet*, **351**, 1693-1697.
- Oe, M., Asou, T., Morita, S., Yasui, H. and Tokunaga, K. (1996) Protamine-induced hypotension in heart operations: application of the concept of ventricular-arterial coupling. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **112**, 462-471.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G. and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524-526.
- Pearson, P.J., Evora, P.R., Ayrancioglu, K. and Schaff, H.V. (1992) Protamine releases endothelium-derived relaxing factor from systemic arteries. A possible mechanism of hypotension during heparin neutralization. *Circulation*, **86**, 289-294.
- Pixley, R.A., Schapira, M. and Colman, R.W. (1985) Effect of heparin on the inactivation rate of human activated factor XII by antithrombin III. *Blood*, **66**, 198-203.
- Pixley, R.A., Schapira, M. and Colman, R.W. (1985) The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitors. *J Biol Chem*, **260**, 1723-1729.
- Pixley, R.A., Stumpo, L.G., Birkmeyer, K., Silver, L. and Colman, R.W. (1987) A monoclonal antibody recognizing an icosapeptide sequence in the heavy chain of human factor XII inhibits surface-catalyzed activation. *J Biol Chem*, **262**, 10140-10145.
- Plummer, T.H., Jr. and Erdos, E.G. (1981) Human plasma carboxypeptidase N. *Methods Enzymol*, **80**, 442-449.
- Pretorius, M., McFarlane, J.A., Vaughan, D.E., Brown, N.J. and Murphey, L.J. (2004) Angiotensin-converting enzyme inhibition and smoking potentiate the kinin response to cardiopulmonary bypass. *Clin Pharmacol Ther*, **76**, 379-387.
- Pretorius, M., Scholl, F.G., McFarlane, J.A., Murphey, L.J. and Brown, N.J. (2005) A pilot study indicating that bradykinin B2 receptor antagonism attenuates protamine-related hypotension after cardiopulmonary bypass. *Clin Pharmacol Ther*, **78**, 477-485.
- Raikar, G.V., Hisamochi, K., Raikar, B.L. and Schaff, H.V. (1996) Nitric oxide inhibition attenuates systemic hypotension produced by protamine. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **111**, 1240-1247.
- Ratnoff, O.D. and Saito, H. (1979) Interactions among Hageman factor, plasma prekallikrein, high molecular weight kininogen, and plasma thromboplastin antecedent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 958-961.
- Reddigari, S.R., Shibayama, Y., Brunnee, T. and Kaplan, A.P. (1993) Human Hageman factor (factor XII) and high molecular weight kininogen compete for the same

- binding site on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem*, **268**, 11982-11987.
- Renne, T., Pozgajova, M., Gruner, S., Schuh, K., Pauer, H.U., Burfeind, P., Gailani, D. and Nieswandt, B. (2005) Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med*, **202**, 271-281.
- Renne, T., Schuh, K. and Muller-Esterl, W. (2005) Local bradykinin formation is controlled by glycosaminoglycans. *J Immunol*, **175**, 3377-3385.
- Rent, R., Ertel, N., Eisenstein, R. and Gewurz, H. (1975) Complement activation by interaction of polyanions and polycations. I. Heparin-protamine induced consumption of complement. *J Immunol*, **114**, 120-124.
- Revak, S.D. and Cochrane, C.G. (1976) The relationship of structure and function in human Hageman factor. The association of enzymatic and binding activities with separate regions of the molecule. *J Clin Invest*, **57**, 852-860.
- Rossmann, P., Matousovic, K. and Horacek, V. (1982) Protamine-heparin aggregates. Their fine structure, histochemistry, and renal deposition. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, **40**, 81-98.
- Saito, H., Ratnoff, O.D. and Pensky, J. (1976) Radioimmunoassay of human Hageman factor (factor XII). *J Lab Clin Med*, **88**, 506-514.
- Samuel, M., Pixley, R.A., Villanueva, M.A., Colman, R.W. and Villanueva, G.B. (1992) Human factor XII (Hageman factor) autoactivation by dextran sulfate. Circular dichroism, fluorescence, and ultraviolet difference spectroscopic studies. *J Biol Chem*, **267**, 19691-19697.
- Sanchez, J., Elgue, G., Riesenfeld, J. and Olsson, P. (1995) Control of contact activation on end-point immobilized heparin: the role of antithrombin and the specific antithrombin-binding sequence. *J Biomed Mater Res*, **29**, 655-661.
- Sanchez, J., Elgue, G., Riesenfeld, J. and Olsson, P. (1998) Studies of adsorption, activation, and inhibition of factor XII on immobilized heparin. *Thromb Res*, **89**, 41-50.
- Schmaier, A.H. (2002) The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*, **109**, 1007-1009.
- Schreiber, A.D., Kaplan, A.P. and Austen, K.F. (1973) Inhibition by C1INH of Hagemann factor fragment activation of coagulation, fibrinolysis, and kinin generation. *J Clin Invest*, **52**, 1402-1409.
- Schwartz, L.B. (2008) Heparin comes clean. *N Engl J Med*, **358**, 2505-2509.
- Schwieder, M. (2004) Aktivierungsmechanismen des Blutgerinnungsfaktors XII auf Oberflächen. *Fachbereich Chemie*. Universität Würzburg, Würzburg, Diplomarbeit.

- Seifert, H.A., Jobses, D.R., Ten Have, T., Kimmel, S.E., Montenegro, L.M., Steven, J.M., Nicolson, S.C. and Strom, B.L. (2003) Adverse events after protamine administration following cardiopulmonary bypass in infants and children. *Anesth Analg*, **97**, 383-389.
- Shapira, N., Schaff, H.V., Piehler, J.M., White, R.D., Still, J.C. and Pluth, J.R. (1982) Cardiovascular effects of protamine sulfate in man. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **84**, 505-514.
- Sheikh, I.A. and Kaplan, A.P. (1989) The mechanism of degradation of bradykinin (lysyl-bradykinin) in human serum. *Adv Exp Med Biol*, **247A**, 331-336.
- Silverberg, M. and Diehl, S.V. (1987) The autoactivation of factor XII (Hageman factor) induced by low-Mr heparin and dextran sulphate. The effect of the Mr of the activating polyanion. *Biochem J*, **248**, 715-720.
- Silverberg, M., Dunn, J.T., Garen, L. and Kaplan, A.P. (1980) Autoactivation of human Hageman factor. Demonstration utilizing a synthetic substrate. *J Biol Chem*, **255**, 7281-7286.
- Sowa, G., Liu, J., Papapetropoulos, A., Rex-Haffner, M., Hughes, T.E. and Sessa, W.C. (1999) Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells. Quantitative evidence supporting the role of palmitoylation as a kinetic trapping mechanism limiting membrane diffusion. *J Biol Chem*, **274**, 22524-22531.
- Stevens, R.L. and Austen, K.F. (1989) Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol Today*, **10**, 381-386.
- Stewart, T.A., Weare, J.A. and Erdos, E.G. (1981) Purification and characterization of human converting enzyme (kininase II). *Peptides*, **2**, 145-152.
- Tan, F., Jackman, H., Skidgel, R.A., Zsigmond, E.K. and Erdos, E.G. (1989) Protamine inhibits plasma carboxypeptidase N, the inactivator of anaphylatoxins and kinins. *Anesthesiology*, **70**, 267-275.
- Tankersley, D.L. and Finlayson, J.S. (1984) Kinetics of activation and autoactivation of human factor XII. *Biochemistry*, **23**, 273-279.
- Thompson, R.E., Mandle, R., Jr. and Kaplan, A.P. (1977) Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J Clin Invest*, **60**, 1376-1380.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Viaro, F., Dalio, M.B. and Evora, P.R. (2002) Catastrophic cardiovascular adverse reactions to protamine are nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate dependent and endothelium mediated: should methylene blue be the treatment of choice? *Chest*, **122**, 1061-1066.

- Wakefield, T.W., Hantler, C.B., Wroblewski, S.K., Crider, B.A. and Stanley, J.C. (1996) Effects of differing rates of protamine reversal of heparin anticoagulation. *Surgery*, **119**, 123-128.
- Wang, Y., Soukhova, G., Proctor, M., Walker, J. and Yu, J. (2003) Bradykinin causes hypotension by activating pulmonary sympathetic afferents in the rabbit. *J Appl Physiol*, **95**, 233-240.
- Warkentin, T.E., Levine, M.N., Hirsh, J., Horsewood, P., Roberts, R.S., Gent, M. and Kelton, J.G. (1995) Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med*, **332**, 1330-1335.
- Watson, K., Gooderham, N.J., Davies, D.S. and Edwards, R.J. (1999) Nucleosomes bind to cell surface proteoglycans. *J Biol Chem*, **274**, 21707-21713.
- Weiler, J.M., Gellhaus, M.A., Carter, J.G., Meng, R.L., Benson, P.M., Hottel, R.A., Schillig, K.B., Vegh, A.B. and Clarke, W.R. (1990) A prospective study of the risk of an immediate adverse reaction to protamine sulfate during cardiopulmonary bypass surgery. *J Allergy Clin Immunol*, **85**, 713-719.
- Weiss, M.E., Nyhan, D., Peng, Z.K., Horrow, J.C., Lowenstein, E., Hirshman, C. and Adkinson, N.F., Jr. (1989) Association of protamine IgE and IgG antibodies with life-threatening reactions to intravenous protamine. *N Engl J Med*, **320**, 886-892.
- Welsby, I.J., Newman, M.F., Phillips-Bute, B., Messier, R.H., Kakkis, E.D. and Stafford-Smith, M. (2005) Hemodynamic changes after protamine administration: association with mortality after coronary artery bypass surgery. *Anesthesiology*, **102**, 308-314.
- Yang, H.Y. and Erdos, E.G. (1967) Second kininase in human blood plasma. *Nature*, **215**, 1402-1403.
- Zimmermann, K., Opitz, N., Dedio, J., Renne, C., Muller-Esterl, W. and Oess, S. (2002) NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 17167-17172.

## 8 Abkürzungen

Abb	Abbildung
aPPT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BK	Bradykinin
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
cGMP	zyklisches Guaninmonophosphat
CPN	Carboxpeptidase N
dATP	Desoxy-adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-guanintriphosphat
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Natriumsatz
FXI	Blutgerinnungsfaktor XI
FXII	Blutgerinnungsfaktor XII
HK	H-Kininogen, Hochmolekulares Kininogen
IgG	Immunglobulin Gamma
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PK	Plasmakallikrein
POD	Peroxidase
PPK	Plasmaprokallikrein
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Thomas Renné für die Aufnahme in die Nachwuchsgruppe, die Betreuung, hilfreiche Tipps und anregende Diskussionen. Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Walter, dass ich die Arbeit an seinem Institut anfertigen durfte. Prof. Dr. Kai Schuh möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie viele wertvolle und konstruktive Anregungen danken. Herrn Dr. Kai Hu und Herrn PD Dr. Oliver Ritter von der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Universität Würzburg, danke ich für die sehr gute Kooperation bei der Messung der murinen, hämodynamischen Parameter und der Gewinnung der Patientenproben. Der AG Bringmann des Instituts für Organische Chemie, Universität Würzburg, danke ich für die Bereitstellung des Vakuum-Rotationsverdampfers. Außerdem bedanke ich mich sehr bei den ehemaligen Doktoranden der Nachwuchsgruppe Constanze Blume, Melanie Ullrich und Peter Benz, die mir jederzeit mit ihrer Hilfe beiseite standen und mich mit praktischen Tipps unterstützten.

Ein besonderes Dankeschön geht außerdem an meine Familie, die mir das Studium und die Fertigstellung dieser Arbeit durch ihre Unterstützung ermöglicht hat, sowie an Christian, für die liebevolle Bestärkung und die kreativen Ideen besonders während des Zusammenschreibens.

# Lebenslauf

## **Persönliche Daten**

---

Name	Julia Johne
Geburtsdatum	05. Juni 1982
Geburtsort	Erfurt

## **Schulbildung**

---

1989 – 1991	Grundschule, Erfurt – Hochheim
1991 – 1993	Wilhelm – Busch – Grundschule, Erfurt
1993 – 2001	Johann – Wilhelm – Häßler Gymnasium, Erfurt
	Abschluss: Abitur

## **Hochschulbildung**

---

Oktober 2001	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Würzburg
August 2003	Ärztliche Vorprüfung
Februar 2007	Fortsetzung des Studiums an der Universität Heidelberg
2007/2008	<i>Praktisches Jahr</i> Pädiatrie, Klinikum Ludwigsburg Innere Medizin, Klinikum Ludwigsburg Kantonsspital Aarau, Schweiz Chirurgie, Klinikum Ludwigsburg
Mai 2008	Ärztliche Prüfung

## **Veröffentlichungen**

---

2006	Johne, J., Blume, C., Benz, P.M., Pozgajova, M., Ullrich, M., Schuh, K., Nieswandt, B., Walter, U. and Renne, T. (2006) Platelets promote coagulation factor XII-mediated proteolytic cascade systems in plasma. <i>Biol Chem</i> , <b>387</b> , 173-178.
------	---

## **Sprachkenntnisse**

---

Latein	großes Latinum
Englisch	sehr gute Kenntnisse
Schwedisch	Grundkenntnisse

## **Zusatzqualifikationen**

---

2002	Ausbildung zur Sanitätshelferin (Bayrisches Rotes Kreuz)
------	--