

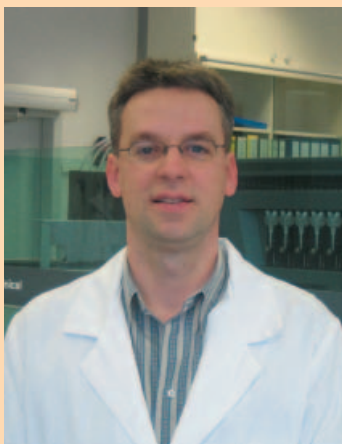


# Rationale der molekulargenetischen Diagnostik bei erblichen Störungen der Blutgerinnung

## Blutgerinnung, Thrombose, Hämophilie, genetische Tests



PD Dr. med. Johannes Oldenburg ^



Dr. Christof Geisen ^

### Korrespondierende Adresse:

PD Dr. med. Johannes Oldenburg  
Institut für Transfusionsmedizin  
und Immunhämatologie  
DRK-Blutspendedienst Baden  
Württemberg – Hessen  
Sandhofstr. 1  
60528 Frankfurt  
Tel: 0 69 / 67 82-1 77  
Fax: 0 69 / 67 82-2 04  
E-Mail: joldenburg@bsdhessen.de  
www.molecular-haemostasis.de

### Zusammenfassung

Genetische Untersuchungsmethoden wie PCR, verschiedene Mutationsscreening-techniken und Sequenzierung ermöglichen heutzutage die routinemäßige Diagnostik zahlreicher Gene der Blutgerinnung. Sowohl einzelne Polymorphismen als auch komplette Gene können in einem Zeitraum von Stunden bis wenigen Tagen analysiert werden. Während früher die meisten genetischen Tests im Zusammenhang mit einer genetischen Beratung von Familienangehörigen erfolgten, dienen sie heute vor allem der Diagnostik und medizinischen Versorgung der Patienten. In der Thrombophilie erlauben genetische Untersuchungen die Bestimmung des zugrunde liegenden erblichen Anteils des Thromboserisikos und geben so wichtige Informationen zu dem Risiko eines Thromboserezidivs bzw. zur Art, Dauer und Dosierung einer Antikoagulationstherapie. Bei hämorrhagischen Diathesen wie der Hämophilie gibt die Art der zugrunde liegenden Mutation wichtige Hinweise auf den klinischen Verlauf, insbesondere auf das Risiko der Hemmkörperentwicklung, einer schweren und häufigen Komplikation der Hämophiliebehandlung. Die Pharmakogenetik stellt einen weiteren, sich sehr rasch entwickelnden Bereich in der Blutgerinnung dar. Polymorphismen und Mutationen in verschiedenen Genen (CYP2C9, VKORC1) führen zu einer erhöhten Sensitivität oder Resistenz gegenüber in der Hämostasetherapie eingesetzten Substanzen wie z. B. Cumarin. Hier können genetische Tests dazu beitragen, Nebenwirkungen zu vermeiden und die für den Patienten am besten geeignete Therapieform und Medikamentendosis zu ermitteln. Während phänotypische Untersuchungen in der Regel eine aktuelle Situation der Blutgerinnung zeigen, stellen genetische Untersuchungen ein lebenslang bestehendes Merkmal einer Person dar, welches schwerwiegende persönliche und soziale Auswirkungen haben kann. Daher erfordert die Durchführung dieser Tests eine detaillierte Aufklärung des Patienten, klare Indikationsstellung und insbesondere eine kompetente Beratung hinsichtlich der Bedeutung der Untersuchungsergebnisse für den Patienten. Unter diesen Voraussetzungen können genetische Untersuchungen sehr wichtige und die klassischen phänotypischen Tests gut ergänzende Informationen liefern.

### Genetisch bedingte Erkrankungen der Blutgerinnung

Die Blutgerinnung (Hämostase) stellt ein hochkomplexes Netzwerk von mehr als 100 Proteinen dar,

welche einerseits die Fließfähigkeit des Blutes garantieren und zum anderen eine unmittelbar einsetzende Gerinnung des Blutes bei Gefäßverletzungen sicherstellen (**Abbildung 1**). Praktisch alle Gerinnungsfaktoren können von

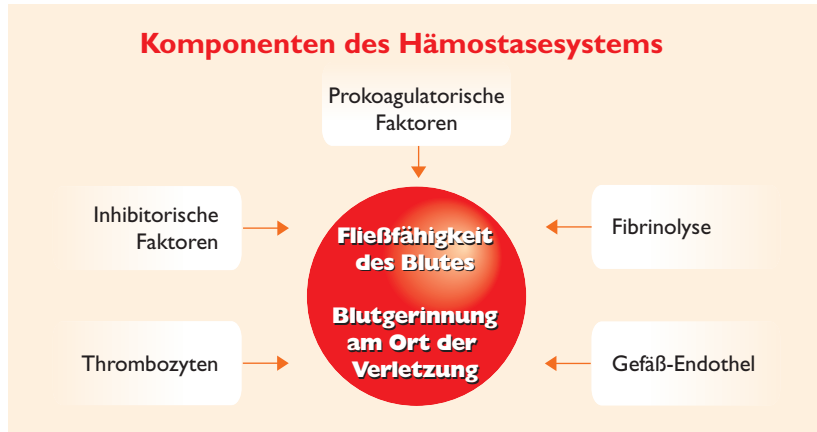


Abbildung 1

Diathese) oder der Thrombose-  
neigung (Thrombophilie) führen  
oder aber die Interaktion mit Medi-  
kamenten der Blutgerinnung be-  
treffen können (Oldenburg et al.  
2001). **Tabelle 1** zeigt eine Über-  
sicht der chromosomalen Lokali-  
sation und Struktur von Genen der  
Blutgerinnung. Nachfolgend sollen  
die genetischen und diagnostischen  
Grundlagen von einigen wichtigen  
Krankheitsbildern der Blutgerin-  
nung, unterteilt in die hämorrhagi-  
schen und die thrombophilen Dia-  
thesen, dargestellt werden.

genetischen Veränderungen  
(Mutationen) betroffen sein, die –  
je nachdem welche Funktion der

Gerinnungsfaktor hat – entweder  
zu einer erblichen Form der Blu-  
tungsneigung (Hämorrhagische

### Chromosomale Lokalisation und Struktur von Genen der Blutgerinnung

Gen	Chromosom	Exons	cDNA (bp)	Größe des Proteins Reife- bzw Vorläuferform (Aminosäureanzahl)	Molekulargewicht (kDa)
<b>Fibrinogen</b>					340
α-chain	4q23-32	5	1932	610/644	68
β-chain	4q23-32	8	1449	461/483	52
γ-chain	4q23-32	10	1311	411/437	49
<b>FII</b>	11	14	1866	579/622	72
<b>FV</b>	1q21-25	25	6672	2196/2224	330
<b>FVII</b>	13	8	1332	406/444	50
<b>FVIII</b>	Xq28	26	7053	2332/2351	265
<b>FIX</b>	Xq27	8	1381	415/461	57
<b>FX</b>	13q32	8	1446	442/482	59
<b>FXI</b>	4q35	15	1875	607/625	140-160
<b>FXII</b>	5q33	14	1845	596/615	76
<b>FXIII</b>					320
A-subunit	6p24-25	15	2193	731	75
B-subunit	1q31-32	12	1923	641	80
<b>VWF</b>	12p	52	8439	2050/2813	220-20.000
<b>Antithrombin</b>	1q22-25	7	1296	432	58
<b>Protein C</b>	2q13-14	9	1383	405/461	62
<b>Protein S</b>	3	15	2028	635/676	69

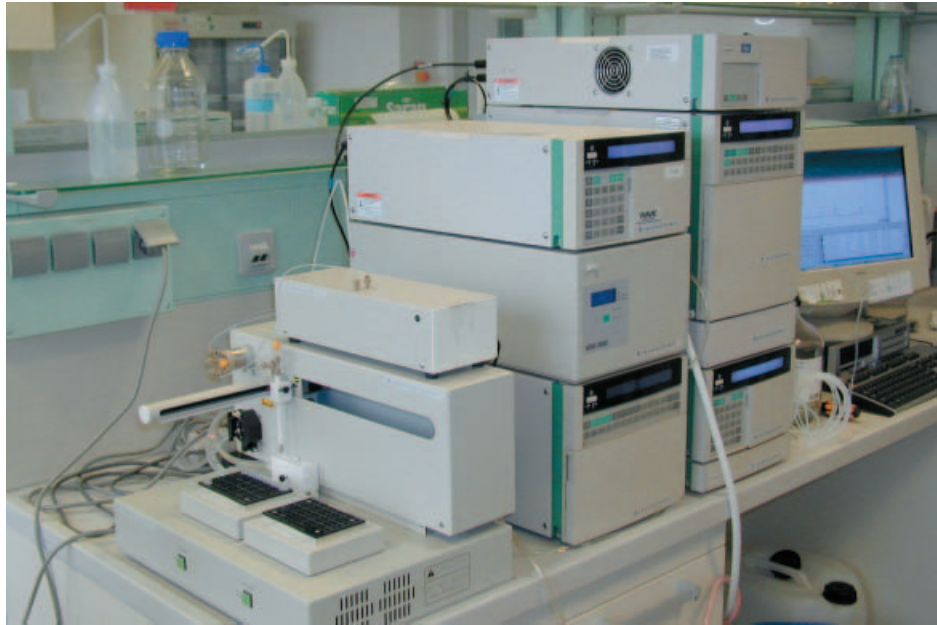


## Hämorrhagische Diathesen

Die hämorrhagischen Diathesen gliedern sich in die klassischen monogenen Formen der Hämophilie A (Faktor-VIII-Mangel), der Hämophilie B (Faktor-IX-Mangel) und der Von Willebrand Erkrankung (VWE), sowie die sehr seltenen Hämorrhagieformen, denen Mangelzustände der Gerinnungsfaktoren Fibrinogen, Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor X, Faktor XI oder Faktor XIII zugrunde liegen. Bei den hämorrhagischen Diathesen erfolgt die genetische Diagnostik wegen der relativ geringen Zahl von betroffenen Familien und der Komplexität der Genanalysen in sehr wenigen spezialisierten Labors. Indikationen für die Untersuchung sind zu jeweils etwa der Hälfte die Unterstützung der Diagnostik bei den betroffenen Patienten und die genetische Beratung von Familienmitgliedern.

### Hämophilie A

Die Hämophilie A wird X-chromosomal rezessiv vererbt und ist mit einer Inzidenz von 1:5.000 der männlichen Neugeborenen die häufigste schwere Form einer erblich bedingten Blutungsneigung. Ursächlich für die Erkrankung sind Mutati-

Abbildung Wave System 

„Wave“-System (Transgenomics): Automatisiertes System zum Mutations-Screening mittels dHPLC (= denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie).

onen im Faktor-VIII(FVIII)-Gen, die zu einer Verminderung oder völligem Fehlen des Gerinnungsfaktors VIII führen. Schweregrad und Häufigkeit der Blutungen sind abhängig vom Ausmaß der FVIII-Verminderung. Die Therapie erfolgt durch die Gabe von aus Plasma oder gentechnisch hergestelltem FVIII-Konzentrat.

Das FVIII-Gen liegt auf dem X-Chromosom und besteht aus 26 Exonen, die ein 2.351 Aminosäuren großes Protein kodieren. Die Größe des FVIII-Gens und die Vielfalt der genetischen Defekte haben deren Aufklärung über viele Jahre erschwert. Inzwischen gibt es eine Reihe von effizienten Mutations-

screening- und Sequenziermethoden, welche die routinemäßige Analyse auch großer Gene ermöglichen. Die häufigste Mutation mit einem Anteil von fast 50 % ist die Intron-22-Inversion. Sie beruht auf einer intragenen Rekombination des FVIII-Gens. Weitere wichtige Mutationstypen mit einem Anteil von jeweils 10-15 % sind Nonsense-Mutationen, Missense-Mutationen und kleine Deletionen oder Insertionen. Bei den weniger schweren Verlaufsformen kommen fast ausschließlich Missense-Mutationen vor. Alle bisher publizierten Mutationen sind in einem internationalen Mutationsregister aufgeführt (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>).

Es ist seit langem bekannt, dass nicht alle Hämophilie-Phänotypen durch Mutationen im FVIII-Gen zu erklären sind. Jedoch konnten erst in jüngster Zeit einige der anderen molekularen Defekte aufgeklärt werden. Bei der VWE Typ 2N liegt ein Bindungsdefekt des von Willebrand-Faktors (VWF) für den FVIII vor, so dass FVIII nicht an den VWF binden kann. Dadurch reduziert sich die Halbwertszeit von FVIII von – normalerweise – 8-12 h auf 1 h. Beim kombinierten FVIII/FV-Mangel liegen Mutationen in einem der für das intrazelluläre Processing beider Proteine wichtigen Chaperone LMAN1 und MSDF2 vor. Hierdurch wird die Sekretion beider Proteine beeinträchtigt.

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass der Typ der Mutation ganz entscheidend für das Risiko der Hemmkörperbildung ist, welche heutzutage die schwerste Komplikation der Hämophiliebehandlung darstellt und bei etwa 20-30% aller schwer betroffenen Patienten auftritt. **Abbildung 2** zeigt

eine Übersicht zu den verschiedenen Mutationsgruppen und den damit verbundenen Hemmkörperrisiken. Die Hemmkörperprävalenzen reichen von 88% bei großen, mehreren FVIII-Proteindomänen umfassenden Deletionen bis zu 3% bei z. B. Spleißstellen-Mutationen. Bisher sind zehn Mutationsgruppen mit deutlich verschiedenen Hemmkörperrisiken identifiziert worden (Oldenburg et al. 2004). Eine wichtige Ursache für die verschiedenen Hemmkörperprävalenzen sind Unterschiede in der Menge an endogenem FVIII-Protein, das ein Patient bilden kann. Während das FVIII-Protein bei einigen Mutationsgruppen vollständig fehlt, z. B. bei großen Deletionen und Intron 22-Inversionen, so wird bei anderen Mutationstypen, z. B. Missense-Mutationen, noch ein

– wenn auch funktionsloses – FVIII-Protein gebildet, das offensichtlich ausreicht, um bei diesen Patienten eine natürliche Immuntoleranz gegenüber den therapeutisch zugeführten FVIII-Präparaten zu erzeugen.

## Hämophilie B

Die Hämophilie B wird ebenfalls X-chromosomal rezessiv vererbt und ist mit einer Inzidenz von 1:25.000 der männlichen Neugeborenen seltener als die Hämophilie A. Ursächlich für die Blutungsneigung ist ein Mangel des Gerinnungsfaktors IX (FIX). Das klinische Erscheinungsbild und das therapeutische Prinzip – Substitution des fehlenden Gerinnungsfaktors – unterscheiden sich praktisch nicht von der Hämophilie A.



Abbildung Sequencer  
 „Kapillar-Sequencer ABI PRISM 3100 zur  
 Ermittlung von Gensequenzen.“

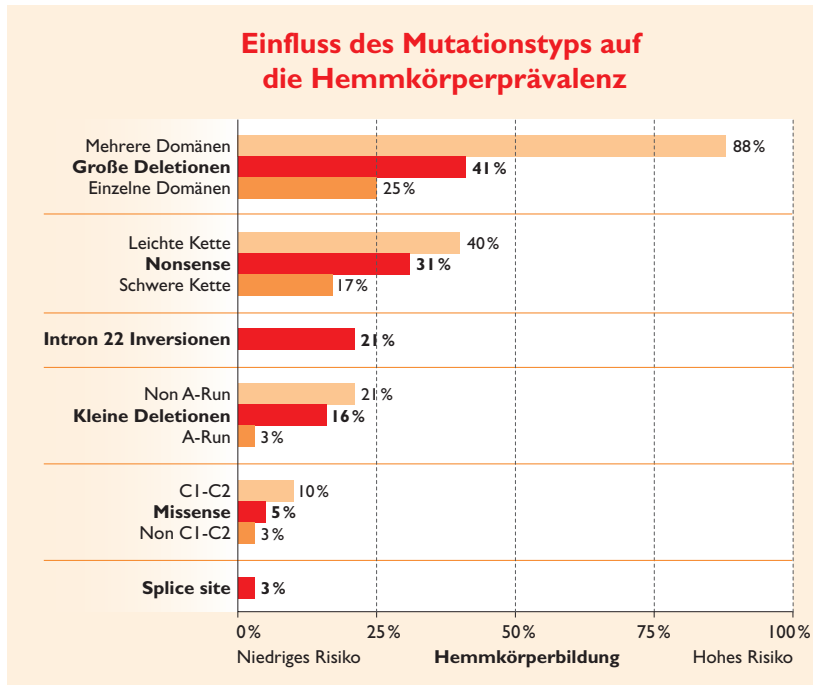


Abbildung 2 ^

Das FIX-Gen kartiert auf dem langen Arm des X-Chromosoms und besteht aus 8 Exons, die ein 461 Aminosäuren großes Protein kodieren. Wegen seiner geringen Größe ist die Sequenzierung der kompletten cDNA die Methode der Wahl für die Mutationsdiagnostik (Herrmann and Wulff 2004). Im Gegensatz zur Hämophilie A sind die meisten Mutationen Nukleotid austausche, die zu Missense-Mutationen (68%) und Nonsense-Mutationen (14%) führen. Alle anderen Mutationsarten sind selten und weisen Häufigkeiten von unter 5% auf. Die verschiedenen Mutationen sind in einem internationalen Mutationsregister über Internet verfügbar (<http://www.umds.ac.uk/molgen/haemBdatabase.htm>).

Wie bei der Hämophilie A hat auch bei der Hämophilie B die Art der Mutation einen entscheidenden Einfluss auf das Hemmkörperisiko. Insbesondere Patienten mit großen Deletionen, aber auch solche mit Nonsense-Mutationen, haben ein vergleichsweise hohes Hemmkörperisiko. Insgesamt liegt die Hemmkörperinzidenz bei der Hämophilie B allerdings mit etwa 3% sehr viel niedriger als bei der Hämophilie A. Ein wichtiger Grund hierfür ist das unterschiedliche Mutationsprofil mit einem sehr viel geringeren Anteil an Risikomutationen, wie große Deletionen und Nonsense-Mutationen (20% vs 80%). Ein anderer Grund könnte die beträchtliche strukturelle Homologie zu den anderen Vitamin-K-abhängigen Ge-

rinnungsfaktoren sein, die ein Erkennen des substituierten FIX als körperfremd unwahrscheinlicher macht. Eine Besonderheit bei der Hämophilie B ist das mit dem Hemmkörper gleichzeitige Auftreten von anaphylaktischen, allergischen Reaktionen gegen den substituierten FIX, insbesondere bei Patienten mit großen Deletionen. Hierdurch wird die Erfolgswahrscheinlichkeit einer Immuntoleranzinduktion durch hochdosierte FIX-Gabe ganz erheblich reduziert.

Der FIX-Leiden-Phänotyp ist eine weitere sehr interessante Besonderheit der Hämophilie B. Diese Patienten werden zwar mit einer schweren Verlaufsform der Hämophilie B geboren, nach der Pubertät steigt die FIX-Aktivität jedoch auf Werte über 10-20% an, so dass die Patienten nur noch eine leichte Verlaufsform aufweisen. Ursächlich für diesen Phänotyp sind Mutationen in einem 40bp großen Bereich im FIX-Promotor. Dieser Abschnitt ist wichtig für die Bindung von Steroidhormonen wie z. B. Androgenen, durch welche die FIX-Expression ganz erheblich gesteigert werden kann.



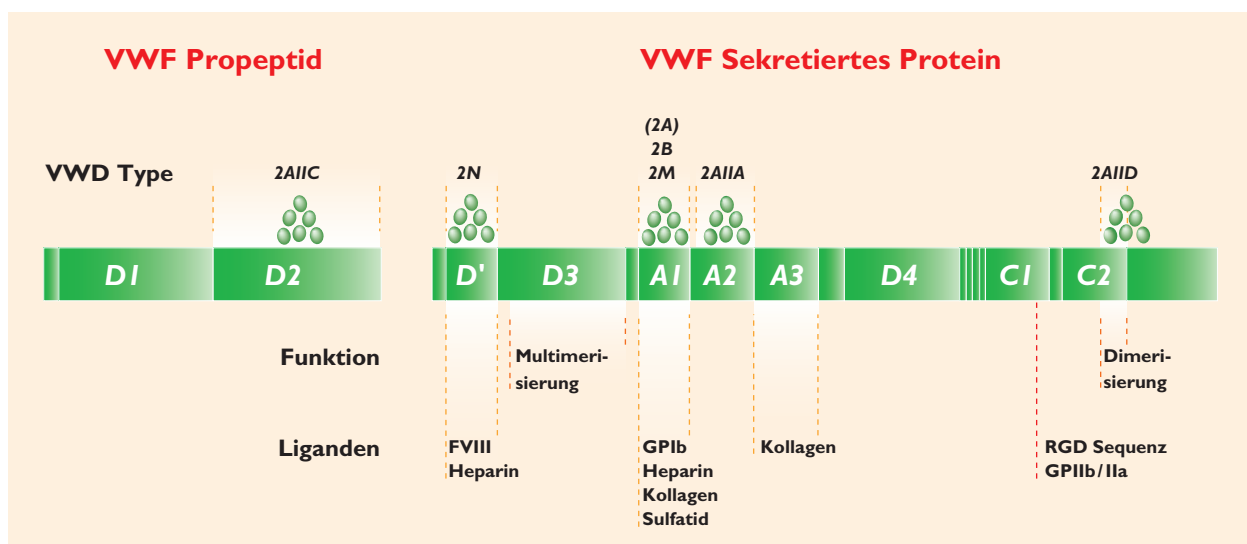
## Von Willebrand Erkrankung

Die Von Willebrand Erkrankung VWE ist, unter Berücksichtigung der leichten Verlaufsformen, die häufigste erbliche Blutungsneigung mit einer geschätzten Prävalenz von bis zu 1 % in der Bevölkerung. Das klinische Bild dieser Erkrankung ist äußerst heterogen. Mehr als 80 % der Patienten zeigen eine sehr milde Verlaufsform (VWE Typ 1), 15-20 % haben einen milden bis moderaten Schweregrad und nur eine sehr kleine Gruppe von etwa 1 % der Patienten weist die Symptome einer schweren VWE mit einem nahezu kompletten Fehlen des Von Willebrand Faktors (VWF) auf (VWE Typ 3). Entsprechend der Funktion des VWF als Vermittler der Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktion und als

Transportmolekül des FVIII wird sowohl die primäre als auch die sekundäre Hämostase beeinträchtigt. Besonders häufig treten Schleimhautblutungen wie Epistaxis und Menorrhagie auf. Die Behandlung erfolgt je nach Schweregrad mit Desmopressin und / oder einem VWF-haltigen Gerinnungskonzentrat.

Das VWF-Gen befindet sich auf Chromosom 12 und umfasst 52 Exone, die ein 2.813 Aminosäuren großes Protein kodieren. Ein Pseudogen des VWF mit einer 97 %-igen Homologie zu den Exonen 23 und 24 kompliziert die genetische Analyse des VWF-Gens. Bis heute konnte eine große Anzahl von Mutationen in allen Domänen des VWF-Gens aufgeklärt und in einer Datenbank zusammengefasst werden (<http://mmg2.im.med.umich.edu/v/VWF/>).

Die VWE ist sowohl auf der Ebene des Genotyps als auch auf der des Phänotyps äußerst heterogen (Schneppenheim et al. 2004). Die Phänotypen werden in drei Hauptkategorien eingeteilt. Typ 1 und Typ 3 bezeichnen das partielle oder komplette Fehlen des VWF Proteins, während Typ 2 sich durch ein qualitativ verändertes, dysfunktionelles VWF-Protein auszeichnet. Der Typ 2 der VWE ist ein ausgezeichnetes Beispiel dafür, wie Defekte in einer bestimmten Region selektiv einzelne Funktionen des VWF beeinflussen und so Phänotypen hervorrufen, die typisch für diese Regionen sind (**Abbildung 3**). Bei der schweren VWE Typ 3 liegen in der Regel schwere molekulare Defekte wie große Deletionen oder Nonsense-Mutationen vor, die im gesamten Gen lokalisiert sein können. Beim häufigen VWE Typ 1 ist bekannt,



dass er überwiegend (zu 80 %) mit der Blutgruppe 0 assoziiert ist, und somit offensichtlich andere Genloci eine den VWF modulierenden Einfluss haben.

Entsprechend werden bei diesem Typ nur vergleichsweise selten Mutationen im VWF-Gen gefunden.

### Seltene hämorrhagische Diathesen anderer Gerinnungsfaktoren

Schwerwiegende Mangelzustände anderer Gerinnungsfaktoren sind sehr selten, da es sich um autosomal rezessive Erbgänge handelt und für eine klinische Manifestation beide Allele betroffen sein müssen. Entsprechend weisen diese Hämorrhagien Inzidenzen von 1 : 500.000 bis 1 : >1.000.000 auf und kommen vorwiegend in Bevölkerungsgruppen vor, in denen blutsverwandte Ehen verbreitet sind.

Die kongenitale Afibrinogenämie, die durch Mutationen im Fibrinogen-Gen ausgelöst wird, hat in der kaukasischen Bevölkerung eine Inzidenz von 1 : 1.000.000. Die klinische Blutungsneigung kann sehr erheblich sein und manifestiert sich häufig bereits in den ersten Lebensstagen durch Nachblutungen aus dem Stumpf der Nabelschnur.

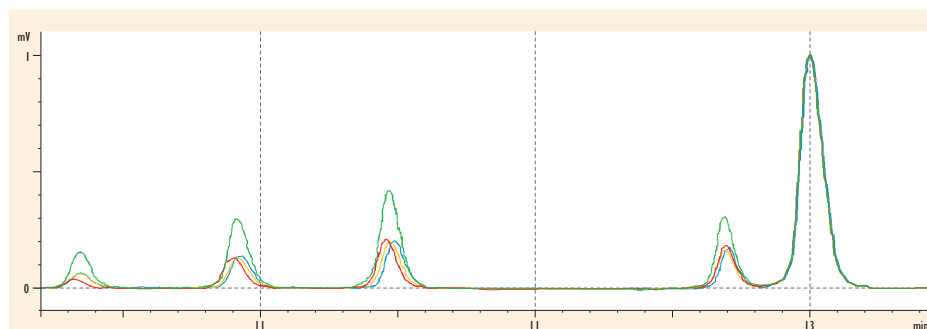
Mangelzustände der Vitamin K abhängigen Faktoren FII, FVII und FX können als Mangel eines einzelnen Faktors oder als kombinierter Mangel aller Vitamin K abhängigen Faktoren auftreten. Der FVII-Mangel ist, mit einer Inzidenz von 1 : 500.000, der am häufigsten auftretende Mangel, während ein schwerer isolierter Mangel von FII oder FX bisher nur in wenigen Familien beschrieben wurde. Die klinische Blutungsneigung ist sehr variabel und reicht von leichten bis hin zu schweren Verlaufsformen mit Gelenkblutungen und auch zerebralen Blutungsmanifestationen. Der Phänotyp eines kombinierten Mangels aller Vita-

min K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (VKCFD-Vitamin K Combined Factor Deficiency) ist außerordentlich selten. Ursächlich hierfür können Gendefekte in der gamma-Carboxylase oder in einem Gen des Vitamin K-Epoxid-Reduktase-Komplexes (VKORC1) sein (Rost & Fregin et al. 2004).

Der FV hat im Prothrombinasekomplex bei der Aktivierung von FII durch FXa eine sehr ähnliche Funktion wie der FVIII im Tenasekomplex bei der Aktivierung von FX durch FIXa. Entsprechend weisen Gen- und Proteinstruktur gewisse Homologien auf. Der schwere FV-Mangel ist mit einer Inzidenz von 1 : 1.000.000 sehr selten. Bisher sind nur wenige Mutationen bei diesem klinisch sehr variablen Phänotyp aufgeklärt. Die therapeutischen Möglichkeiten sind beschränkt, da es kein FV-Konzentrat gibt und Patienten mit diesem Phänotyp ausschließlich mit gefrorenem Frischplasma (GFP) behandelt werden können.

Abbildung 4

Deletions-Screening mittels „Wave“-System:  
Der hohe Peak rechts bei 13 min. steht für ein Exon des Gens für das Wachstumshormon. Die Peaks links zeigen Exone des Gerinnungsfaktors VII (FVII) bei einer gesunden Person (grün) und bei Patienten mit einem FVII-Mangel durch eine mehrere Exone umfassende, große Deletion (rot, gelb und blau).





Der FXI ist ein Glykoprotein, das in seiner aktiven Form in der frühen Phase des intrinsischen Systems den FIX aktiviert. Der FXI-Mangel ist in der kaukasischen Bevölkerung sehr selten, kommt aber bei den Ashkenazi-Juden mit einer Frequenz von ca. 8 % häufig vor. Ursächlich hierfür sind insbesondere zwei Mutationen, eine Nonsense-Mutation in Exon 5 und eine Missense-Mutation in Exon 9, die sich durch eine hohe Konsanguinitätsrate innerhalb dieser sehr kleinen Bevölkerungsgruppe als Founder-Mutationen verbreitet haben. Es sind aber auch andere Mutationen in Familien mit FXI-Mangel beschrieben worden. Das klinische Bild ist äußerst variabel und die Blutungsneigung lässt sich häufig nicht aus der FXI-Restaktivität ableiten.

Der FXIII vermittelt die kovalente Verknüpfung der Fibrinpolymere und ist damit essentiell für die Festigkeit des Thrombus. FXIII zirkuliert im Blut als Tetramer, das sich aus zwei A- und zwei B-Untereinheiten zusammensetzt. Die A-Untereinheiten katalysieren die kovalente Bindung der Fibrinpolymere, während die B-Untereinheiten als Trägermolekül fungieren. Der schwere FXIII-Mangel ist mit 1 : 5.000.000 sehr selten. Der größte Teil der Mutationen ist bisher in der A-Untereinheit gefunden worden. Die Patienten kön-

nen eine schwere Blutungssymptomatik aufweisen mit Gelenkblutungen und auch intrazerebralen Blutungen. Die Therapie besteht in der Substitution von FXIII-Konzentrat.

## Thrombophilien

Arterielle und venöse thromboembolische Ereignisse sind im Gegensatz zu den hämorrhagischen Diathesen pro Jahr sehr häufig, wobei die Inzidenz mit dem Alter deutlich zunimmt, im Bereich der venösen Thrombose von 1 : 100.000 im Kindesalter bis zu 1 : 1.000 bei über 60-jährigen. Die Thrombophilien lassen sich in zwei unterschiedliche Phänotypen einteilen: einen Phänotyp, dem seltene Mutationen in einzelnen Genen von inhibitorisch wirkenden Gerinnungsfaktoren (Antithrombin, Protein C, Protein S) zugrunde liegen und einen Phänotyp, der mit häufigen Polymorphismen (z. B. Faktor-V-Leiden, Faktor-V-HR2-Haplotyp, Prothrombin G20210A) assoziiert ist. Es gibt zahlreiche weitere Polymorphismen, wie Methylentetrahydrofolatreduktase C677T (MTHFR), Faktor XIII Val34Leu, PAI-1 4G/5G, GP1AC807T, HPA1 a1/b u. a., deren Bedeutung für venöse oder arterielle Thrombosen nicht gesichert ist. Ein sehr häufig untersuchter genetischer Marker ist der MTHFR-C677T-Polymorphismus. Er

kommt heterozygot bei 32 % der kaukasischen Bevölkerung vor – eine Frequenz die bereits seinen prädiktiven Wert sehr relativiert – und besitzt nur in Verbindung mit einer gleichzeitig vorliegenden Hyperhomocysteinämie einen Aussagewert und dies eher bei den arteriellen als bei venösen thromboembolischen Ereignissen. Die Untersuchung der Polymorphismen MTHFR C677T, Faktor XIII Val34Leu, PAI-1 4G/5G, GP1AC807T und HPA1 a1/b ist nach Ansicht des Autors nur in besonderen Einzelfällen gerechtfertigt, z. B. wenn die Familienanamnese eindeutig ein erbliches Risiko erkennen lässt und keine anderen Ursachen gefunden werden. Auf diese Polymorphismen soll daher im Folgenden nicht weiter eingegangen werden. Ohnehin stellt die genetische Untersuchung von häufigen Polymorphismen in verschiedener Hinsicht ein Problem dar. Selbst bei Trägern der Faktor V-Leiden-Variante oder der Prothrombin-Mutation G20210A, für die eine Kausalität funktionell gesichert ist, ist die Penetranz einer Thrombosemanifestation gering. Der größte Teil der heterozygoten Merkmalsträger wird im Laufe seines Lebens keine klinisch manifeste Thrombosekomplikation entwickeln. Daher ist die Indikationsstellung für eine solche Untersuchung besonders wichtig, um Verunsicherungen der Patienten zu vermeiden. Bei bereits



erlittener Thrombose, insbesondere dann, wenn das Ereignis ohne erkennbare äußere Umstände oder in jungem Alter stattgefunden hat oder bei anamnestisch eindeutig erkennbarem familiären Risiko, ist die Untersuchung in der Regel indiziert. Hier kann das Ergebnis wichtige Hinweise zur Dauer und Intensität der Antikoagulation liefern. Bei asymptomatischen Patienten ohne erkennbare familiäre Belastung liefert die Untersuchung in der Regel keine entscheidenden Informationen. Abzuraten ist von der routinemäßigen Untersuchung von Polymorphismen, deren Bedeutung in der Literatur widersprüchlich diskutiert wird. Hier ist neben der fraglichen Ursächlichkeit zu berücksichtigen, dass bei der Untersuchung mehrerer Polymorphismen bei dem größten Teil der Bevölkerung belastete Allele identifiziert werden, ohne dass sich hieraus eine Krankheitsbedeutung ableiten ließe.

Während die Komplettagenanalysen von Antithrombin, Protein C und Protein S, ähnlich wie bei den Genen der hämorrhagischen Diathesen, in wenigen spezialisierten Labors durchgeführt werden, sind die Nachweise für die Polymorphismen FV-Leiden und Prothrombin G20210A in praktisch allen große-

ren Laboren und Krankenhauseinrichtungen etabliert.

### Seltene Mutationen in den Genen Antithrombin, Protein C und Protein S

Etwas 5 % der familiär auftretenden Thrombophilien sind bedingt durch einen Mangel der klassischen Inhibitoren Antithrombin, Protein C oder Protein S. Die Eigenschaften der Gene sind in **Tabelle 1** aufgeführt. Der Erbgang ist in der Regel autosomal dominant mit unvollständiger jedoch, deutlich höherer Penetranz als bei den Polymorphismen FV-Leiden und Prothrombin G20210A.

Antithrombin ist der wichtigste direkte Inhibitor einer Reihe von prokoagulatorisch wirkenden Gerinnungsfaktoren (z. B. FII, FIX, FX). Eine große Zahl verschiedener Mutationen ist bisher bei Patienten mit Antithrombin-Mangel und Thrombosemanifestation identifiziert und in einem internationalen Register zusammengeführt worden (<http://www.ed.ic.ac.uk/divisions/7/antithrombin/>).

Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges Protein, das in seiner aktiven Form die Gerinnungsfaktoren FV

und FVIII inaktiviert. Die Prävalenz von Mutationen im Protein-C-Gen wird in der Normalbevölkerung mit bis zu 1,5 auf 1.000 Individuen angegeben. Die Mutationen können praktisch alle Bereiche des Protein C-Gens betreffen und sind ebenfalls in einem internationalen Register verfügbar ([http://www.xs4all.nl/~reitsma/Prot\\_C\\_home.htm](http://www.xs4all.nl/~reitsma/Prot_C_home.htm)).

Protein S verstärkt als Cofaktor des Protein C dessen Bindung an Phospholipidoberflächen und damit dessen Funktion bei der Inaktivierung von FV und FVIII. Auch hier ist ein breites Spektrum verschiedener Mutationen bei Patienten mit Protein-S-Mangel und gleichzeitiger Thrombosemanifestation gefunden worden.

### Häufige Polymorphismen: Faktor-V-Leiden und Prothrombin G20210A

Venöse Thrombosen resultieren aus einem komplexen Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und exogenen Faktoren. Die beiden wichtigsten SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), die das Risiko für diese Erkrankungen erhöhen, sind die R506Q Variante des FV-Gens und der G20210A Polymorphismus des Prothrombin-Gens. Sie treten mit ei-



ner Häufigkeit von jeweils 6-8 % und 1-2 % in der Normalbevölkerung auf. Der R506Q Polymorphismus ist ursächlich für den Phänotyp der aktivierten Protein-C-(APC-) Resistenz. Die R506Q-Variante ist mit einem 3-8fach höheren thromboembolischen Risiko im heterozygoten und einem geschätzten 80fach höheren Risiko im homozygoten Zustand assoziiert. Allerdings relativieren sich diese Risiken, wenn man bedenkt, dass lediglich ca. 10 % der Träger der FVL-Variante im Laufe ihres Lebens von einer thromboembolischen Komplikation betroffen werden, die oft im direkten Zusammenhang, z. B. mit Traumen, chirurgischen Eingriffen und längerer Immobilisation steht (Lee, 2001). Die Prävalenz von venösen thromboembolischen Ereignissen bei Trägern der R506Q-Variante ist mit 0,19 % gegenüber 0,07 % nur geringfügig erhöht, so dass ein allgemeines Screening kaum zu rechtfertigen ist (Martinelli et al. 2000). Würde es sich bei der R506Q-Variante um einen gravierenden Risikofaktor hinsichtlich Gesundheit und Lebenslänge handeln, so würde man erwarten, dass die Zahl der Allelträger mit höherem Alter abnimmt. Dies ist nicht der Fall (Hessner et al., 2001).

Der G20210A-Polymorphismus im Prothrombin-Gen führt zu einem

erhöhten Prothrombin-Spiegel. Bei Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen liegt die Prävalenz dieses Polymorphismus bei bis zu 20 %, Heterozygote tragen ein ca. dreifach höheres Thromboserisiko. Die Prothrombinvariante ist phänotypisch aufgrund der natürlichen Schwankungsbreite der Faktor-II-Aktivität nur sehr unsicher zu bestimmen, so dass es hier zur Genotypisierung keine Alternative gibt. (Die Faktor-V-Leiden-Mutation wird dagegen phänotypisch sehr gut durch die APC-Resistenz erkannt.)

Interessanterweise handelt es sich sowohl beim R506Q FV Polymorphismus als auch beim G20210A-Prothrombin-Polymorphismus um Founder-Mutationen, die vor etwa 30.000 bis 60.000 Jahren entstanden sind und sich seitdem insbesondere in der europäischen Bevölkerung durch positive Selektion verbreitet haben. Als Gründe hierfür werden ein geringerer Blutverlust bei der Geburt und/oder eine höhere Einnistungsrate von Embryonen diskutiert, die über viele tausend Jahre einen Überlebensvorteil dargestellt haben, während heute – angesichts einer deutlich verlängerten Lebenserwartung – diese Polymorphismen zu einer erhöhten Morbidität beitragen. Lane und Grant (2000) haben 23 SNPs in 14 Genen

des hämostatischen Systems zusammengenommen, für die Änderungen des Risikos für thromboembolische Ereignisse diskutiert werden.

## Pharmakogenetik

Warfarin, ein Cumarin-Derivat und häufig angewendetes Antikoagulum, ist ein Paradebeispiel für die klinisch bedeutsamen Wechselwirkungen zwischen Pharmaka und Genen. Warfarin wird in der Leber durch das Cytochrom P450 2C9 metabolisiert. Zwei allelische Varianten dieses Enzyms (CYP2C9\*2 und CYP2C9\*3) sind mit einem Aktivitätsverlust von bis zu 95 % assoziiert. In Deutschland sind annähernd 1-3 % der Bevölkerung homozygot oder compound heterozygot und etwa 35 % heterozygot für diese Allele. In beiden Gruppen führen die durch ungenügenden Metabolismus erhöhten Plasma-Warfarinkonzentrationen zu einem signifikant erhöhten Risiko für schwere Blutungskomplikationen.

Kürzlich konnten wir das Gen für die Vitamin-K-Epoxidoxid-Reduktase (VKOR) identifizieren. Diese stellt das molekulare Ziel der Cumarinderivate dar (Rost & Fregin et al. 2004). Mutationen in diesem Gen



sind für den Phänotyp der Cumarinresistenz bei Menschen und Nagern wie auch einer gesteigerten Cumarinsensitivität beim Menschen verantwortlich. Eine gesteigerte Cumarinsensitivität liegt auch bei zwei seltenen Varianten im Faktor-IX-Propeptid (Ala-10Val und Ala-10Thr) vor (Oldenburg et al. 2001). Im Alltagsleben sind diese Varianten ohne Bedeutung. Bei Verabreichung von Cumarinen zur Antikoagulation entwickelt sich jedoch innerhalb weniger Tage zwangsläufig eine schwere Blutungskomplikation, die auf eine selektive Verminderung der Faktor-IX-Aktivität zurückzuführen ist und das Ausmaß einer schweren Verlaufsform der Hämophilie B erreicht. Bei diesen Patienten kann eine therapeutische Antikoagulation mit Cumarin-Derivaten nicht durchgeführt werden.

Bei den Genanalysen zur Cumarinsensitivität gibt es breite Erfahrungen zu den Cytochrom P450 2C9 (CYP2C9)-Polymorphismen, wobei diese offensichtlich nur beim Warfarin eine Rolle spielen und weniger bedeutsam für Phenprocoumon sind, das vor allem in Deutschland angewendet wird. Bezüglich des VKORC1-Gens, dem eigentlichen Target der Cumarine, gibt es bisher wenig Erfahrungen. Die seltenen Fälle einer

eindeutigen Cumarinsensitivität oder Cumarinresistenz werden überwiegend durch die genetische Untersuchung des FIX- bzw. VKORC1-Gens erfasst. Des Weiteren scheinen bestimmte Haplotypen des VKORC1-Gens, ähnlich wie die CYP2C9-Polymorphismen, einen Einfluss auf die Cumarindosis zu haben. Insgesamt lässt sich feststellen, dass nach jetzigem Kenntnisstand kein Mutationsscreening vor Beginn einer Cumarintherapie indiziert ist. Im Falle einer deutlich vom Erwartungswert abweichenden Cumarindosis bzw. auffälligem Phänotyp, z. B. schwere Blutung, können die genetischen Untersuchungen aber wichtige Hinweise für die Fortführung der Antikoagulationstherapie liefern.

### **Schlussfolgerung**

Molekulargenetische Tests sind für die routinemäßige Diagnostik aller wesentlichen hereditären Hämostasestörungen verfügbar und werden sowohl für die Diagnostik von Patienten als auch für die genetische Beratung von Familienangehörigen eingesetzt. Die Untersuchung kompletter Gene bei den entsprechenden klinischen Phänotypen ist wenig umstritten und in Hinblick auf die hohe Penetranz der genetischen

Veränderungen in der Beurteilung weitgehend eindeutig. Bei Polymorphismen sollten nur solche analysiert werden, für die hinsichtlich ihrer krankheitsassoziierten Ursächlichkeit in der Literatur Konsens besteht, wie z. B. die Faktor-V-Leiden- und die Prothrombin-G20210A-Variante. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den sog. Risikoallelen um relative Risiken mit vergleichsweise geringer Penetranz handelt und daher die Untersuchung von asymptomatischen Patienten in der Regel nicht indiziert ist. Die Durchführung dieser Tests sollte mit einer detaillierten Aufklärung des Patienten, klaren Indikationstellungen und insbesondere einer kompetenten Beratung hinsichtlich der Bedeutung der Untersuchungsergebnisse für den Patienten einhergehen. Unter diesen Voraussetzungen können genetische Untersuchungen sehr wichtige und die klassischen phänotypischen Tests gut ergänzende Informationen liefern.