

# Genetik von erblichen Störungen der Blutgerinnung

Johannes Oldenburg

Institut für Transfusionsmedizin  
und Immunhämatologie  
DRK Blutspendedienst  
Baden Württemberg – Hessen  
Frankfurt

## Zusammenfassung

Genetische Untersuchungsmethoden wie PCR, verschiedene Mutationsscreeningstechniken 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 zugrundeliegenden erblichen Anteils des Thrombose-Risikos und geben so wichtige Informationen zu dem Risiko eines Thrombose-Rezidivs 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. Coumarin. Hier können genetische Tests dazu beitragen, Nebenwirkungen zu ver-

meiden 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.

## Keywords

Blutgerinnung, Thrombose, Hämophilie, genetische Tests

## Genetics of Hereditary Disorders of Blood Coagulation

### Summary

Genetic tools such as PCR, mutation screening and sequencing nowadays allow routine diagnosis of various genes acting in blood coagulation. Either single polymorphisms or complete genes can be analysed within hours to days. Historically, the majority of genetic tests were used for genetic counselling of family relatives, where as today most genetic tests in haemostasis are performed to support the

patient's medical care. In thrombophilic conditions genetic tests are useful in certain clinical situations facilitating therapeutic decisions on type, dosage and duration of anticoagulant treatment. However, such tests may do more harm than good in healthy individuals. In haemorrhagic disorders such as haemophilia A, the underlying gene mutations provide information on the expected clinical course of the patients, especially for the severe complication of inhibitor development. Pharmacogenetics represents another fast developing field in blood coagulation. Polymorphisms and mutations in several genes (CYP2C9, VKORC1) are causing increased sensitivity, increased resistance or other side effects of haemostasis-related drugs such as coumarins. In given cases, genetic analysis can prevent side effects by adjusting dosage or switching the mode of treatment. While phenotypic tests reflect the actual situation of blood coagulation, genetic tests reveal an individual trait that may have untoward personal and social implications. Therefore, these tests require careful handling with respect to informed consent of the individual before performing the analysis, clear medical indication and competent counselling regarding the results and possible consequences. Keeping this in mind, genetic tests may provide important, complementary information to the classic phenotypic assays.

## Keywords

Blood Coagulation, Thrombosis, Haemophilia, genetic tests

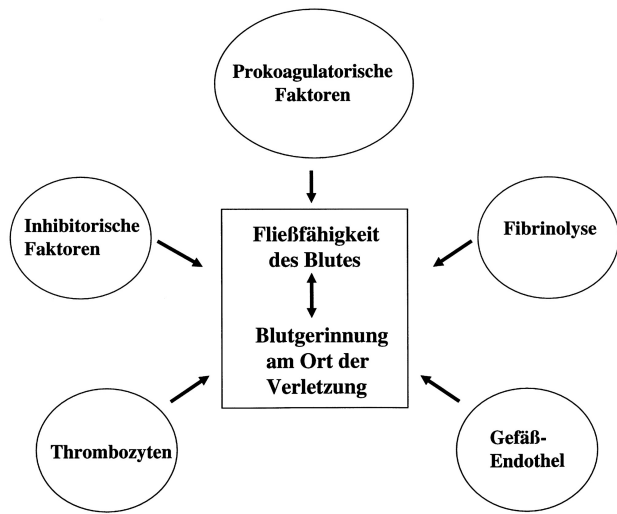


Abb 1 Komponenten des Hämostasesystems

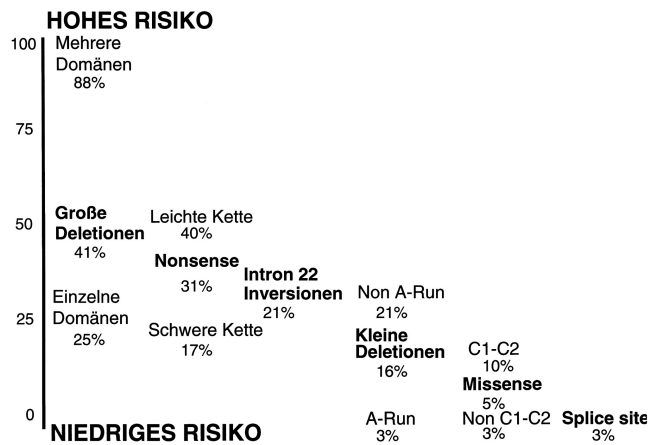


Abb 2 Einfluss des Mutationstyps auf die Hemmkörperprävalenz

### 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 (Abb. 1). Praktisch alle Gerinnungsfaktoren können von genetischen Veränderungen (Mutationen) betroffen sein, die – je nachdem welche Funktion der Gerinnungsfaktor hat – entweder zu einer erblichen Form der Blutungsneigung (Hämorrhagische Diathese) oder der Thromboseneigung (Thrombophilie) führen oder aber die Interaktion mit Medikamenten der Blutgerinnung betreffen können (Oldenburg et al. 2001). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der chromosomalen Lokalisation und Struktur von Genen der Blutgerinnung. Nachfolgend sollen die genetischen und diagnostischen Grundlagen von einigen wichtigen Krankheitsbildern der Blutgerinnung, unterteilt in die hämorrhagischen und die thrombophilen Diathesen dargestellt werden.

#### 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 zugrundeliegen.

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-chosomal-rezessiv vererbt und ist mit einer Inzidenz von 1:5000 der männlichen Neugeborenen die häufigste schwere Form einer erblich bedingten Blutungsneigung. Ursächlich für die Erkrankung sind Mutationen 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 Exons, die ein 2351 Aminosäure 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 Mutationsscreening- und Sequenziermethoden, welche die routinemäßige Analyse auch großer Gene ermöglichen. Die häufigste Mutation – mit einem Anteil von fast 50% – ist die In-

tron-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 8–12h auf 1h. Beim kombinierten FVIII/FV-Mangel liegen Mutationen in einem der für das intrazelluläre Processing beider Proteine wichtigen Chaperone LMAN1 und MSD2 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. Abb. 2 zeigt

Tab 1 Chromosomale Lokalisation und Struktur von Genen der Blutgerinnung

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

eine Übersicht zu den verschiedenen Mutationsgruppen und den damit verbundenen Hemmkörperisiken. Die Hemmkörperprävalenzen reichen von 88% bei grossen, mehrere FVIII-Proteindomänen umfassenden Deletionen bis zu 3% bei z.B. Spleissstellen-Mutationen. Bisher sind zehn Mutationsgruppen mit deutlich verschiedenen Hemmkörperisiken 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 gegen 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.

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 Nukleotidaustausche, 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 geringerem Anteil an Risikomutationen, wie große Deletionen und Nonsense-Mutationen (20% versus 80%). Ein anderer Grund könnte die beträchtliche strukturelle Homologie zu den anderen Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren sein, die ein Erkennen des substituierten FIX als körperfremd unwahr-

scheinlicher macht. Eine Besonderheit bei der Hämophilie B ist, dass mit dem Hemmkörper gleichzeitig anaphylaktische, allergische Reaktionen gegen den substituierten FIX auftreten, 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

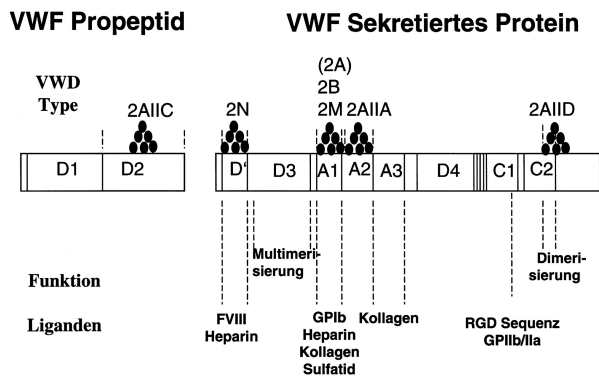


Abb 3 Phänotyp-bezogene Lokalisierung der Mutationen bei der von-Willebrand-Erkrankung

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 Exons, die ein 2813 Aminosäure großes Protein kodieren. Ein Pseudogen des VWF mit einer 97%igen Homologie zu den Exons 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 dem häufigen VWE Typ 1 ist bekannt, dass er überwiegend (zu 80%) mit der Blutgruppe 0 assoziiert ist, und somit offensichtlich andere Genloci einen 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 konsanguine 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 Lebenstagen 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 Vitamin 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.

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 können 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 zu 1:1000 Individuen bei über 60jährigen.

Die Thrombophilien lassen sich in zwei unterschiedlichen Phänotypen einteilen:

- einen Phänotyp, dem seltene Mutationen in einzelnen Genen von inhibitorisch wirkenden Gerinnungsfak-

toren (Antithrombin, Protein C, Protein S) zugrundeliegen 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, GP1AC 807T, 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, GP1AC 807T und HPA1a1/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 erkenn-

barem 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 größeren Laboren und Krankenhaus-einrichtungen etabliert.

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

Etwa 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.med.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 1000 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 einer Häufigkeit von jeweils 6–8% und 1–2% in der Normalbevölkerung auf. Der R506Q-Polymorphismus ist ursächlich für den Phänotyp der inaktivierten Protein-C-(APC)-Resistenz. Die R506Q-Variante ist mit einem 3–8fach höheren thromboembolischen Risiko im heterozygoten und einer 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, sodass 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 Foundermutationen, 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 SNP's in 14 Genen des hämostatischen Systems zusammengetragen, für die Änderungen des Risikos für thromboembolische Ereignisse diskutiert werden.

#### **Pharmakogenetik**

Warfarin, ein Cumarin-Derivat und häufig angewendetes Antikoagulans, 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-Epoxid-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 bzw. 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, 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.

### Literatur

Herrmann FH, Wulff K (2004). [Factors VII, VIII, IX, and X: molecular genetics and gene diagnosis]. *Hamostaseologie*.24:94-107

Hessner MJ, Dinauer DM, Kwiatkowski R, Neri B, Raife TJ (2001) Age-dependent prevalence of vascular disease-associated polymorphisms among 2689 volunteer blood donors. *Clin Chem*;47:1879-84

Lane DA, Grant PJ (2000). Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood*; 95:1517-1532

Lee R. (2001) Factor V Leiden: a clinical review. *Am J Med Sci.*;322:88-102

Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Mannucci PM (2000) The risk of venous thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *Br J Haematol*;111:1223-9

Oldenburg J, Kriz K, Willemin WA, Maly FE, Felten von A, Siegemund A, Keeling DM, Baker P, Chu K, Konkle B, Lämmle B, Albert T (2001) Genetic predisposition to bleeding during oral anti-coagulant therapy: Evidence for common founder mutations (FIXVal-10 and FIXThr-10) and an independent CpG hotspot mutation (FIXThr-10). *Thromb Haemost* 85:454-457

Oldenburg J, Schwaab R (2001) Molecular biology of coagulation factors. *Semin Thromb Hemost* 27:313-324

Oldenburg J, Schröder J, Brackmann HH, Müller CR, Schwaab R, Tuddenham E (2004) Environmental and genetic factors influencing inhibitor development. *Semin Hematol* 41(1 Suppl):82-88

Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz H-J, Lappégard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EGD, Müller CR, Strom TM, Oldenburg J (2004) Mutations in the VKORC1 gene cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427:537-541

Schneppenheim R (2004). [Molecular genetics of von Willebrand disease] *Hamostaseologie*;24:37-43.

### Korrespondierende Adresse

PD Dr. med. Johannes Oldenburg  
Institut für Transfusionsmedizin  
und Immunhämatologie  
DRK Blutspendedienst  
Baden Württemberg – Hessen  
Sandhofstr. 1  
60528 Frankfurt  
Tel. 069 6782 177  
Fax 069 6782 204  
joldenburg@bsdhessen.de