

Einfluss der homozygoten und heterozygoten Faktor-V-Leiden-Mutation auf die
Ergebnisse funktioneller Protein-S-Assays

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Vorgelegt von Christine Constanze Gnida
aus Hannover
2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. P. Hanfland
2. Gutachter: Prof. Dr. med. E. Rabe

Tag der Mündlichen Prüfung: 08.09.2008

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der
Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. J. Oldenburg

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1	Einleitung	8
1.1	Die Regulation der Gerinnung durch den APC-Komplex.....	8
1.2	Protein S.....	10
1.3	C4-binding Protein.....	11
1.4	Faktor V und Faktor Va.....	13
1.5	APC-Resistenz.....	15
1.5.1	APC-Resistenz/Faktor-V-Leiden-Mutation als Risikofaktor für venöse Thrombosen.....	16
1.5.2	Labordiagnose der APC-Resistenz.....	18
1.6	Hereditäre Thrombophilien.....	19
1.6.1	Die Faktor-V-Leiden-Mutation.....	19
1.6.2	Weitere Mutationen am Faktor-V-Gen.....	20
1.6.3	Protein-S-Mangel.....	21
1.6.3.1	Hereditärer Protein-S-Mangel.....	21
1.6.3.2	Erworbener Protein-S-Mangel.....	22
1.7	Protein S unter oraler Antikoagulation.....	23
1.8	Prinzipien und Problematik der Protein-S-Bestimmung.....	24
1.8.1	Entwicklung von Globaltests zum Screening des Protein-C/S-Systems.....	25
1.8.2	Die Entwicklung der Bestimmung des gesamten und freien Protein S.....	25
1.8.3	Die Entwicklung der Methode zur Bestimmung des funktionellen Protein S.	27
1.9	Fragestellung der Arbeit.....	28
2	Patienten und Methoden	30
2.2.1	Patienten mit homozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation.....	30
2.2.2	Patienten mit heterozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation.....	31
2.2.3	Kontrollkollektiv.....	32
2.2.4	Matching der Gruppen.....	34
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Gewinnung und Lagerung des Untersuchungsmaterials.....	34
2.2.2	Bestimmung des gesamten Protein-S-Antigen (ELISA Asserachrom®	

	Total Protein S, Fa. Roche).....	35
2.2.3	Bestimmung des freien Protein-S-Antigen (ELISA Asserachrom [®] Free Protein S, Fa. Roche).....	38
2.2.4	Bestimmung des funktionellen Protein S (STA Protein S clotting, Fa. Roche).....	41
2.2.5	Leistungsmerkmale des STA Protein S clotting der Fa. Roche.....	43
2.2.6	Bestimmung des funktionellen Protein S (Protein S Ac, Fa. Dade Behring).	44
2.2.7	Leistungsmerkmale des Protein S Ac der Fa. Dade Behring.....	47
2.2.8	Die Bestimmung der Faktor-VIII-Aktivität (koagulometrischer Test der Fa. Dade Behring).....	48
2.2.9	Prinzip der Detektion der FVL-Mutation mittels doppelfluoreszenz- markierter Hydrolysesonden (TaqMan-Sonden).....	50
2.2.10	Bestimmung der APC-Ratio.....	50
2.2.11	Mögliche Fehlerquellen/Interferenzen der Testsysteme (Hersteller- angaben).....	52
2.2.12	Statistische Methoden.....	52
3	Ergebnisse	55
3.1	Demografische Kennwerte des Patientenkollektivs und der Kontrollen.....	55
3.2	Gesamtes Protein-S-Antigen (ELISA).....	56
3.2.1	Patienten ohne orale Antikoagulation.....	56
3.2.2	Patienten mit oraler Antikoagulation.....	58
3.3	Freies Protein S (ELISA).....	60
3.3.1	Patienten ohne orale Antikoagulation.....	59
3.3.2	Patienten mit oraler Antikoagulation.....	61
3.4	Funktionelle Protein S Aktivität mit zwei koagulometrischen Tests unterschiedlicher Hersteller.....	62
3.4.1	Patienten ohne orale Antikoagulation.....	62
3.4.2	Patienten mit oraler Antikoagulation.....	64
3.5	Untersuchungen zum Einfluss der Lagerungsdauer der Plasmaproben Auf die Analyseergebnisse.....	66
3.5.1	Zeitpunkt der Probengewinnung.....	66
3.5.2	Analyse von Plasmaproben mit gleicher Lagerungsdauer.....	68

3.5.3	Vergleich der im Rahmen des Experimentes untersuchten Protein-S-Parameter mit Protein-S-Parametern, die zum Zeitpunkt der Proben-gewinnung ermittelt wurden.....	70
3.5.4	Korrelation zwischen der Lagerungsdauer der Plasmaproben und der funktionellen Protein-S-Bestimmung.....	73
3.5.5	Die Faktor-VIII-Aktivität als Surrogatmarker für das Alter der Proben.....	74
3.6	Korrelation von freier Protein S-Bestimmung und funktioneller Protein S-Bestimmung.....	75
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	78
4	Diskussion	80
4.1	Berücksichtigung von Einflüssen auf das Protein-S.....	81
4.2	Bestimmung des Protein-S-Antigen mittels ELISA bei Patienten mit Faktor-V-Leiden-Mutation.....	83
4.3	Bestimmung der funktionellen Protein-S-Aktivität bei Patienten mit Faktor-V-Leiden-Mutation mit zwei kommerziell erhältlichen Testsystemen (Protein S clotting Fa. Roche Diagnostics, Protein S Ac Fa. Behring).....	85
4.4	Korrelation des funktionellen Protein-S-Anteils mit der Bestimmung des freien Protein S.....	88
4.5	Die Interpretation der Befunde unter dem Aspekt der Lagerungsdauer der Plasmaprobe.....	89
5	Zusammenfassung	92
	Literaturverzeichnis	94

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Akt.	Aktivität
APC	Aktiviertes Protein C
aPTT	Activated Partial Thromboplastin Time (aktivierte partielle Thromboplastinzeit)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Arg	Arginin
ASS	Acetylsalicylsäure
C4BP	C4-Binding-Protein
ca.	Circa
CI	Konfidenzintervall
CRP	C-Reaktives-Protein
CV	Coefficient Of Variation (Variationskoeffizient)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F	Faktor
Fa.	Firma
FVL	Faktor-V-Leiden
Glu	Glutamin
H	Stunden
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
INR	International Normalized Ratio
kDa	Kilodalton
LE	Lungenembolie
LETS	Leiden Thrombophilia Study
N	Fallzahl
M	Mol
nM	Nanomol
Nm	Nanometer
min.	Minuten
MP	Mangelplasma

OA	Orale Antikoagulanzen
OAT	Orale Antikoagulantientherapie
OPD	Orthophenyldiamin
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PC	Protein C
PEG	Polyethylenglykol
POD	Peroxydase
PS	Protein S
PSAC	Protein S Ac (Fa. Dade Behring)
PSCL	Protein S clotting (Fa. Roche Diagnostics)
PT	Prothrombin Time (Prothrombinzeit)
PTT	Partial Thromboplastin Time (partielle Thromboplastinzeit)
r	Korrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
RVV	Russel Viper Venom
s	Sekunden
STABW	Standardabweichung
TMB	Tetramethylbenzidin
TVT	Tiefe Beinvenenthrombose
TF	Tissue Factor
vs	Versus

1 Einleitung

1.1 Die Regulation der Gerinnung durch den APC-Komplex

Die regelrechte Funktion des Hämostasesystems wird unter physiologischen Bedingungen durch ein Zusammenwirken von Gefäßwand, Thrombozyten und plasmatischer Gerinnung, welche von koagulatorischen und fibrinolytischen Faktoren gebildet wird, aufrechterhalten. Die physiologischen Reaktionen der Komponenten bestehen aus einer Vasokonstriktion der Gefäßwand, die durch sympathische nervale Stimulation im Verletzungsfall induziert wird. An die verletzte Gefäßwand lagern sich Thrombozyten an und bilden einen Thrombus, der zur Okklusion der Läsion führt. Die plasmatische Gerinnung erfolgt über eine Kaskade von Aktivierungen inaktiver Vorstufen von Gerinnungsfaktoren, an deren Ende die Umwandlung von Fibrinogen zu vernetztem Fibrin steht. Je nach Initiierung der Gerinnung unterscheidet man einen exogenen (extrinsischen), von Faktor VII ausgehenden und einen endogenen (intrinsischen), von Faktor XII ausgehenden Aktivierungsweg der Blutgerinnung. Der tissue factor (TF) besitzt bei der extrinsischen Gerinnungsaktivierung eine zentrale Funktion in der Hämostaseregulation. Nach einer Gefäßverletzung bindet Faktor VII an den von extravaskulären Zellen gebildeten Tissue factor. Es bildet sich der TF/Faktor-VIIa-Komplex, welcher wiederum Faktor X und Faktor IX der intrinsischen Gerinnungskaskade aktiviert (Tilley und Mackman 2006). Dieses mündet in Thrombingenerierung, Fibrinbildung und die anschließende Gerinnselformung. Die Gerinnungskaskade wird durch verschiedene inhibitorisch wirkende Proteine, die an verschiedenen Stufen der Gerinnungskaskade ansetzen, reguliert. Die hauptsächlichen Inhibitoren der Gerinnung sind der tissue factor pathway inhibitor (TFPI), Antithrombin und aktiviertes Protein C.

Die Aktivierung von Protein C beginnt auf der Oberfläche von Endothelzellen durch die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin (Dahlbäck 2004, siehe Abb.1). Aktiviertes Protein C (APC) inhibiert die Blutgerinnung durch proteolytische Spaltung der aktivierten Gerinnungsfaktoren Faktor VIIIa und Faktor Va. Das Vitamin K abhängige Protein S ist bereits seit mehr als 20 Jahren als Kofaktor bei dieser Inaktivierung bekannt (Dahlbäck 1997), wobei die Menge des zur Verfügung stehenden Protein S durch das Akut-Phase-Protein C4BP reguliert wird (Walker 1984). Faktor V gilt als balancierender

Gerinnungsfaktor der Hämostase, da er nicht nur als prokoagulatorischer Gerinnungsfaktor wirkt, sondern auch eine antikoagulatorische Kofaktor-Funktion des APC-Komplexes besitzt (Nicolaes und Dahlbäck 2002).

Genetische Defekte, aber auch erworbene Hämostasestörungen können die Funktion des APC-Komplexes beeinträchtigen und führen zur so genannten APC-Resistenz, ein Oberbegriff für verschiedene Störungen innerhalb des Protein-C-/Protein-S-Systems. Weiterhin ist bekannt, dass das Protein-C-System nicht nur hämostaseologische Aufgaben erfüllt, sondern auch antiinflammatorisches und antiapoptotisches Potenzial besitzt (Bernard et al. 2001). Seit einigen Jahren wird rekombinantes APC als hilfreiches Instrument zur Behandlung schwerer septischer Erkrankungen einschließlich der damit häufig einhergehenden disseminierten intravasalen Gerinnung eingesetzt (Bernard et al. 2001). Dabei kann APC die inflammatorische Antwort auf Infektionen verringern, indem es die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen limitiert und die Migration von Monozyten und neutrophilen Granulozyten beeinflusst. Somit erfüllt der APC-Komplex in der Sepsis die Aufgabe der Regulation/Inhibition der Gerinnung und die Modulation der Immunantwort (Bernard et al. 2001).

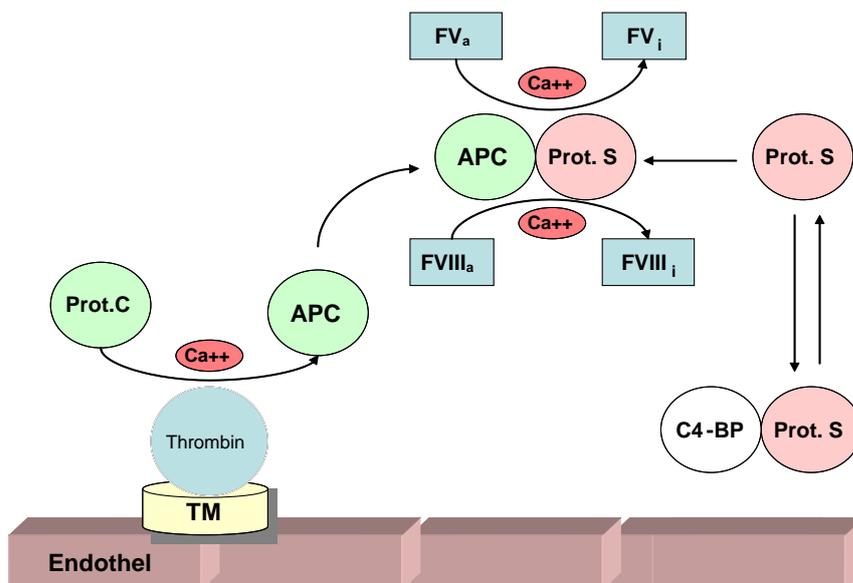


Abb.1 Die Rolle des APC-Komplexes in der Gerinnung: TM = Thrombomodulin, APC = Aktiviertes Protein C, C4-BP= C4-Binding Protein, F = Faktor, Ca = Calcium, Prot. S = Protein S, Prot. C = Protein C, a = aktiviert, i = inaktiviert

1.2 Protein S

Protein S ist ein Vitamin-K-abhängiges Plasmaglykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa (DiScipio und Davie 1979, Lundwall et al. 1986). Protein S wurde 1977 von DiScipio und Davie isoliert, beschrieben und nach dem Ort seiner Erstbeschreibung (S = Seattle) benannt. Im menschlichen Organismus wird Protein S überwiegend in Hepatozyten (Dahlbäck 1991), nach Dahlbäck (1991), Dougherty und Lowe-Krentz (1998) auch in Endothelzellen synthetisiert und freigesetzt. Die Plasmakonzentration des gesamten Protein S wird im Mittel mit 25 mg/l (0,3 μ mol/l) mit einem interindividuellen Schwankungsbereich zwischen 17 und 33 mg/l angegeben. Die Konzentration des antikoagulatorisch aktiven, freien Protein S beträgt 10 mg/l mit einer durchschnittlichen Plasmakonzentration von 5 bis 15 mg/l (Müller-Berghaus und Pötzsch 1999). Die Halbwertszeit des Protein S liegt im Mittel bei 42,5 h (24-58 h) (D'Angelo et al. 1988). Protein-S-Spiegel sind beim Neugeborenen und bei Kindern bis zum 3. Lebensjahr im Vergleich zu den Referenzwerten bei Erwachsenen deutlich niedriger (Fernandez et al. 1989). Diese Tatsache lässt sich mit hepatischer Unreife des Neugeborenen/Kindes erklären. Ebenso findet sich eine passagere Erniedrigung während Schwangerschaft, Stillzeit und unter oraler Antikoagulation. Frauen weisen niedrigere Protein-S-Parameter als Männer auf. Bei Frauen steigt die Protein-S-Konzentration mit zunehmendem Alter an, bei Männern hingegen nicht. Man vermutet hormonelle Einflüsse und Veränderungen, insbesondere bei Frauen in der Postmenopause (Goodwin et al. 2002). Die genetische Analyse des Protein S war lange Zeit erschwert, da zwei homologe Gene für Protein S auf dem Chromosom 3 existieren, ein Pseudogen und ein aktives Gen (Schmidel et al. 1990). Hypothesen über die Beteiligung des 1977 von DiScipio und Davie isolierten, neu entdeckten Proteins bei der Regulation der Gerinnungsinhibition zusammen mit dem APC-Komplex wurden erstmalig von Walker 1980 aufgestellt. Nachfolgende Studien belegten, dass die biologische Funktion von Protein S das Potenzial beinhaltet, die APC-abhängige, proteolytische Spaltung und somit Inaktivierung von Faktor Va und Faktor VIIIa zu verstärken.

Protein S liegt im Organismus bereits als aktiver Kofaktor vor, so dass eine Aktivierung durch proteolytische Spaltung wie beim Protein C nicht erforderlich ist. Entscheidend für

die APC-Kofaktor-Funktion ist jedoch die Interaktion zwischen Protein S und negativ geladenen Phospholipidmembranen (Walker 1981, Norstrom et al. 2003). Protein S und APC bilden einen stöchiometrischen Komplex (1:1) an negativ geladenen Lipidoberflächen (Walker 1981, 1984). Diese Komplexformation erhöht die Affinität des APC für Phospholipidmembranen (Walker 1980) und gilt derzeit als der wichtigste Mechanismus des Protein S in der Inhibition des Gerinnungssystems. Phospholipide stellen somit einen essenziellen Bestandteil im APC-System dar (van Wijnen et al. 1996).

Faktor Va besitzt drei wesentliche Schnittstellen zur proteolytischen Inaktivierung (siehe Kapitel 1.5), wobei eine der drei Schnittstellen (Arg506) eine hohe katalytische Aktivität aufweist (Gale et al. 2000). Bei struktureller Veränderung dieser Schnittstelle, z.B. durch die Faktor-V-Leiden(FVL)-Mutation (siehe Kapitel 1.7.1), werden alternative Schnittstellen (Arg306, Arg679) zur Inaktivierung von Faktor Va verwendet. Protein S vermag die proteolytische Spaltung an der Schnittstelle Arg306 um das Zwanzigfache zu steigern und kann somit eine Kompensation bei struktureller Veränderung der Schnittstelle Arg506 erzielen (van der Neut Kofschoten et al. 2004). Darüber hinaus gibt es eine direkte, APC-unabhängige antikoagulative Aktivität des Protein S, die auf der bereits bei Walker 1981 beschriebenen Affinität zu Phospholipiden basiert (Heeb et al. 2006). Heeb et al. (2006) konnten feststellen, dass Protein S in vivo als Monomer und Multimer vorliegt und beide Formen eine direkte antikoagulative Wirkung besitzen. Weiterhin wird vermutet, dass Protein S bei der Apoptose von neutrophilen Granulozyten eine Rolle spielt (Webb et al. 2003).

1.3 C4-binding Protein

Das Komplementsystem ist der Überbegriff für im Serum und auf Zelloberflächen vorkommende Proteine, die als funktionelles System in den Organismus eingedrungene Fremdstoffe mit oder ohne Beteiligung von Antikörpern inaktivieren können. Das Komplementsystem ist die phylogenetisch älteste Form der Akut-Phase-Reaktion.

Das C4-binding Protein (C4BP) ist ein Bestandteil des Komplementsystems. Es agiert als Kofaktor beim Abbau des C4b bei einer durch Komplement vermittelten Reaktion und gilt als Schlüsselprotein bei inflammatorischen Prozessen (Rezende et al. 2003). Im

Falle einer Entzündungsreaktion kann die Konzentration des C4BP im menschlichen Blut bis zu 400% ansteigen. Das Molekulargewicht des C4BP liegt bei 500 kDa (Blom et al. 2004). Charakteristisch für dieses Protein ist neben dem hohen Molekulargewicht eine oktopusähnliche Molekularstruktur mit sieben identischen Alpha-Ketten und einer Beta-Kette, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Nur die Beta-Kette ist in der Lage, Protein S zu binden (Dahlbäck 1991).

Im menschlichen Plasma zirkuliert das Protein S zu 60% in einer Komplexbildung mit C4BP, welches dem gebundenen Protein S entspricht; 40% des menschlichen Protein S liegt in einer ungebundenen, freien Form vor (Walker 1981, Dahlbäck 1991). Freies Protein S kann mit hoher Affinität einen stöchiometrischen Komplex (1:1) mit C4BP eingehen, welcher durch Calcium-Ionen verstärkt wird (Rezende et al. 2003). Die Bindung zwischen Protein S und C4BP ist nonkovalent.

Mittlere Werte von Protein S, C4BP und CRP in	Akuter -Phase -Reaktion	
	Kontrolle N = 40	Akut -Phase -Plasma N = 59
Protein S, nmol/L		
Gesamt	343 ± 54	426 ± 113
Frei	93 ± 22	78 ± 28
Gebunden	250 ± 46	347 ± 106
C4BP, nmol/L		
C4BP β+	269 ± 41	328 ± 118
Gesamt	340 ± 83	552 ± 236
CRP mg/L	<10	56,8 ± 58

Tab. 1: Werte von Protein S, C4BP und CRP in Akut-Phase-Reaktionen, modifiziert nach de Frutos 1994

In Akut-Phase-Reaktionen kann die Konzentration von C4BP und die Affinität zu Protein S derart ansteigen, dass der gebundene Anteil des Protein S zunimmt. Infolge dessen sinkt der Anteil des freien Protein S, so dass ein Mangel an freiem Protein S vorliegt (Barthels und von Depka 2003). Die Menge des C4BP und des C4BP-gebundenen Protein-S-Anteils steigt mit zunehmendem Lebensalter an (Simmonds et al. 1997). In der Tabelle 1 wird die Variabilität des Gehaltes an C4BP und Protein S im menschlichen Blut im Rahmen einer Akut-Phase-Reaktion, z.B. im Rahmen von inflammatorischen Prozessen, deutlich (nach de Frutos et al. 1994).

Die Aufgabe von C4BP besteht darin, durch Bindung von Protein S die Inhibition der Gerinnung zu steuern, da die Kofaktorfunktion von Protein S am APC-Komplex durch die Bindung an C4BP verhindert wird (Dahlbäck 1991). Dabei scheint durch die Bindung von C4BP und Protein S lediglich die Inaktivierung von Faktor Va, nicht aber die Inaktivierung von Faktor VIIIa beeinflusst zu werden (van de Pool et al. 2001).

1.4 Faktor V und Faktor Va

Entdeckt wurde der Faktor V bereits 1947 von Owren. Er beschrieb einen Gerinnungsfaktor, der im normalen Plasma nachweisbar war, nicht jedoch im Plasma eines Patienten, der eine schwere Blutungsneigung aufwies. Seitdem wird Faktor V eine wesentliche Bedeutung bei der Aktivierung der Gerinnung zugeschrieben (Owren 1947). Als jedoch Anfang der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts das Phänomen der APC-Resistenz entdeckt wurde (Dahlbäck 1993), wurde deutlich, dass Faktor V auch eine inhibierende Funktion in der Gerinnungskaskade einnimmt und somit einen balancierenden Faktor im Hämostasesystem darstellt (Nicolaes und Dahlbäck 2002). Faktor V ist ein großes, einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 330 kDa. Seine Konzentration beträgt im menschlichen Plasma 0,007 mg/ml (20 nmol/l). Faktor V wird überwiegend in der Leber und in Megakaryozyten synthetisiert (Lane et al. 1996). 25% des zirkulierenden Faktors sind in Thrombozyten gespeichert (Tracy et al. 1982).

Faktor V ist die inaktive Vorstufe von Faktor Va, welcher der Kofaktor der Serinprotease Faktor Xa im Prothrombinasekomplex ist. Faktor V wird zu Faktor Va durch Thrombin

aktiviert, durch dessen Einwirkung konzentrationsabhängig die messbare Aktivität des Faktors V um ein Vielfaches steigt (Rosing et al. 1980). Erst der aktivierte Faktor Va ist gerinnungswirksam.

Faktor Va katalysiert und beschleunigt als Kofaktor in Gegenwart von Calciumionen und Faktor Xa die Bildung von Thrombin aus Prothrombin; eine eigene enzymatische Funktion besitzt Faktor Va hingegen nicht. Kalafatis et al. untersuchten 1994 den Mechanismus der Inaktivierung von humanem Faktor V und Faktor Va. Das Faktor-Va-Molekül wird dabei zunächst an der Spaltstelle Arg506 (siehe Abb. 2) proteolytisch abgebaut, dann erfolgt der Abbau über die Spaltstelle Arg679, welcher jedoch mit einer langsameren Geschwindigkeit erfolgt. Die Inaktivierung von Faktor Va über Arg679 kann durch die Anwesenheit von Protein S beschleunigt werden und, für den Fall, dass die Spaltstelle an Arg506 z.B. durch einen molekulargenetischen Defekt nicht benutzt werden kann, diese teilweise kompensieren (van der Neut Kofschoten et al. 2004). Mutationen an der Spaltstelle Arg306, wie z.B. Faktor-V-Cambridge oder Faktor-V-Hong Kong, haben aufgrund der untergeordneten Funktion von Arg306 nur einen geringen Effekt auf die verminderte Inaktivierung von Faktor Va (Norstrom et al. 2002).

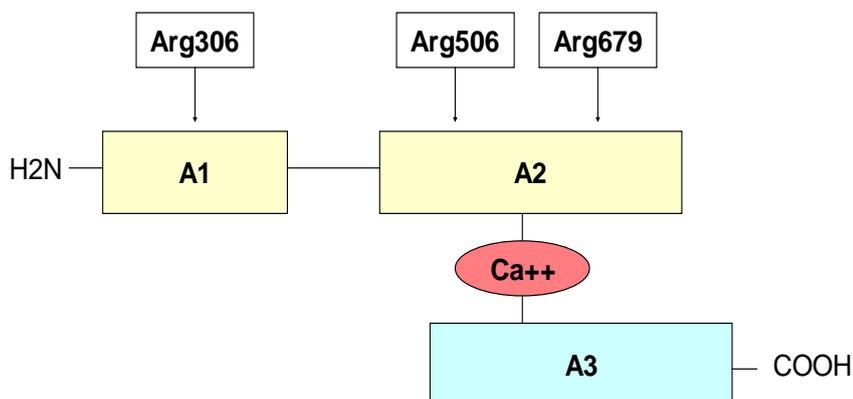


Abb. 2

Schematische Struktur des Faktor-Va-Moleküls (modifiziert nach Müller-Berghaus und Pötzsch 1999) A1, A2, A3 = Faktor-V-Domäne, Arg306 = Arginin, Nucleotidposition 306, H2N = N-terminales Ende, COOH = C-terminales Ende

1.5 APC-Resistenz

Das Phänomen der APC-Resistenz wurde 1993 erstmals von Dahlbäck et al. entdeckt und beschrieben. Es wurden seltsame Ergebnisse bei der Anwendung eines Protein-C-Tests an Plasma eines Patienten mit multiplen thrombotischen Ereignissen in der Anamnese beobachtet. In mehreren Versuchen konnte festgestellt werden, dass selbst die Zugabe von APC die Zeit bis zum Einsetzen der Gerinnung bei diesem Patienten nicht verlängern konnte (siehe Abb. 4). Bei gesunden Probanden wurde dagegen nach Zugabe von APC-Reagenz eine Verlängerung der Gerinnungszeit induziert. Man bezeichnete das Phänomen als Resistenz gegenüber APC und definierte sie als unzureichende antikoagulatorische Antwort des Plasmas auf die Zugabe von APC (Dahlbäck 2003).

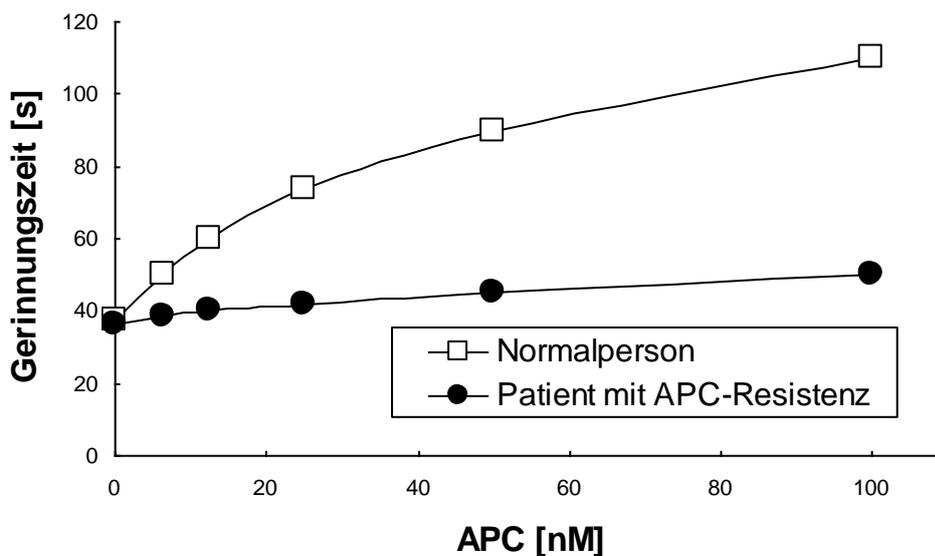


Abb. 3 Gerinnungszeit in Abhängigkeit der APC-Konzentration bei Normalpersonen und Patienten mit APC-Resistenz jeweils nach Zugabe von APC-Reagenz (Grafik modifiziert nach Dahlbäck et al. 1993), APC = aktiviertes Protein C, s = Sekunden, nM = Konzentration in nanoMol

Die APC-Resistenz ist in nahezu allen Fällen durch eine Punktmutation G1691A in Exon 10 des Gerinnungsfaktor-V-Gens (1q23) bedingt (Bertina 1994).

Die Mutation hat zur Folge, dass Arginin in der Position 506 durch Glutamin ersetzt wird (A506G, bzw. R506Q). Diese strukturelle Veränderung der Aminosäuresequenz Arg506 führt, wie bereits in Kapitel 1.5 beschrieben, zu einem verzögerten Abbau des prokoagulatorisch wirksamen Faktors Va. Bertina et al. stellten 1994 fest, dass in 80% der Fälle von APC-Resistenz eine Faktor-V-Leiden-(FVL) Mutation vorlag.

Die Angehörigen des oben beschriebenen Patienten litten ebenfalls an rezidivierenden Thrombosen, so dass Zöller und Dahlbäck (1994) erstmalig eine genetische Familienuntersuchung auf die FVL-Mutation durchführten. Hierbei wurde erneut bestätigt, dass in allen Fällen die beobachtete Resistenz gegenüber APC durch die hereditäre FVL-Mutation verursacht wurde (Zöller und Dahlbäck 1994).

Zu Beginn der APC-Resistenz-Testung fiel auf, dass bei einem Teil der Patienten eine verminderte APC-Ratio (siehe Seite 17 ff) ermittelt wurde, obwohl die Faktor-V-Leiden-Mutation molekularbiologisch ausgeschlossen werden kann. Henkens et al. (1995) stellten z.B. fest, dass Frauen, die orale Kontrazeptiva einnahmen, eine geringere Sensitivität gegenüber APC besaßen, welche in funktionellen APC-Tests durch eine niedrigere APC-Ratio reflektiert wurden (Henkens et al. 1995). Physiologisch liegt meistens eine hormoninduzierte Verschiebung im Protein-C/S-System vor, so dass die APC-Resistenztestung hiervon beeinflusst wurde. Mit dem Einsatz von Faktor-V-Mangelplasmen konnte die Spezifität bezüglich der Faktor-V-Leiden-Mutation bedeutend erhöht werden (de Ronde et al. 1999). Ebenso konnten durch Vorverdünnungen des Untersuchungsmaterials (Patientenplasma) andere Störeinflüsse minimiert werden (de Ronde et al. 1999), so dass in den heutigen APC-Resistenz-Tests eine Spezifität nahe 100% bezüglich der Detektion der Faktor-V-Leiden-Mutation besteht.

1.5.1 APC-Resistenz/Faktor-V-Leiden-Mutation als Risikofaktor für venöse Thrombosen

Die erste Untersuchung eines größeren Kollektivs hinsichtlich der APC-Resistenz erfolgte in der Leiden Thrombophilia Study (LETS) (Koster et al. 1993). In dieser Studie wurden 474 Patienten mit dem Erstereignis einer tiefen Beinvenenthrombose

eingeschlossen. Als Kontrolle wurden alters- und geschlechtsgebunden 474 gesunde Probanden gematcht. 21% der Kranken und 5% der Gesunden wiesen eine verminderte APC-Ratio auf. Es wurde ein ca. siebenfach erhöhtes Thromboserisiko für die Patienten mit APC-Resistenz ermittelt. Es folgten weitere Untersuchungen zur Abschätzung des relativen Risikos bezüglich der Entwicklung einer thromboembolischen Komplikation bei Vorliegen einer APC-Resistenz, bzw. bei Vorhandensein einer Faktor-V-Leiden-Mutation. Eine Auswahl entsprechender Studien zeigt Tabelle 2.

Autor (Jahr), Journal	Anzahl der Patienten (n) mit FVL-Mutation	Anzahl der Patienten (n) ohne FVL-Mutation (Kontrolle)	Relatives Risiko für Thrombosen (95% CI)
Martinelli et al. (1998), Blood	n = 200	n = 327	2.2 (1.1-4.7)
Faioni et al. (1999), Blood	n = 238	n = 300	4.2 (1.6-11.3)
Simioni et al. (1999), Thromb Haemost	n = 224	n = 154	2.8 (1.1-8.6)
Lensen et al. (2000), Thromb Haemost	n = 108	N = 89	3.0 (1.1-8.1)
Simioni et al. (2002), Blood	n = 299	N = 248	6.6 (1.1-39.8)

Tab. 2: Faktor-V-Leiden-Mutation als Riskofaktor für thromboembolische Ereignisse
CI = Konfidenzintervall

1.5.2 Labordiagnose der APC-Resistenz

Die verminderte antikoagulatorische Antwort bei APC-Resistenz wird seit ihrer Entdeckung überwiegend mittels modifizierter aPTT-Messung nachgewiesen (Bertina 1997). Der meistverwendete Test geht auf Dahlbäck et al. (1993) zurück, welcher beobachtete, dass Plasma von gesunden Probanden nach Zugabe von APC durch die Inhibierung von Thrombin mit einer Verlängerung der aPTT reagierte. Plasmen von APC-resistenten Individuen weisen dagegen eine aPTT auf, die sich durch Zugabe von APC nicht verlängern lässt. Aus dieser Beobachtung heraus wurde ein Test konstruiert, welcher auf einer zweifachen aPTT-Bestimmung basiert, mit und ohne Zugabe einer standardisierten Menge von aktiviertem Protein C. Aktiviertes Protein C inaktiviert die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa und verlängert konzentrationsabhängig die aPTT um das 2-3fache des Leerwertes (Tripodi et al. 1998). Der daraus gebildete Quotient wurde als so genannte APC-Ratio angegeben, welche im Normalfall einen Wert größer 2 aufweisen sollte:

$$\text{APC-Ratio} = \frac{\text{aPTT mit APC + CaCl}_2}{\text{aPTT ohne APC + CaCl}_2}$$

Findet sich eine erniedrigte APC-Ratio, so sollte die weitere molekulargenetische Diagnostik auf das Vorliegen einer FVL-Mutation erfolgen (Lane et al. 1996).

Je nach Ausmaß der Erniedrigung der APC-Ratio sind Rückschlüsse auf eine heterozygote oder homozygote Mutation möglich. Eine APC-Ratio von 1,5-2,0 lässt auf eine heterozygote, eine APC-Ratio von 1,0-1,3 auf eine homozygote Faktor-V-Leiden-Mutation schließen (Barthels und von Depka 2003). Der in unserer Untersuchung verwendete Test weist als Modifikation zu dem oben beschriebenen Testverfahren die Besonderheit auf, dass dem Testansatz ein größerer Anteil an APC hinzugefügt wird, so dass die APC-Ratio für das Normalkollektiv/Kontrollkollektiv 3,0-4,3 beträgt. Die Intervalle zwischen den Ergebnissen für Patienten mit heterozygoter und homozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation werden dadurch vergrößert und die Trennschärfe des Tests

erhöht, so dass eine genauere Diskriminierung zwischen den beiden Genotypen und dem Wildtyp möglich ist.

Tests der ersten Generation wiesen eine Spezifität von 85-90% bezüglich des Vorliegens der Faktor-V-Leiden-Mutation auf (Svensson et al. 1997). Die Spezifität auf Faktor-V-Leiden-Mutation konnte auf annähernd 100% erhöht werden, indem Faktor-V-Mangelplasma eingesetzt wurde. Dadurch kam es durch das verminderte Angebot von Faktor V im Testansatz zu einer höheren Sensitivität gegenüber der Faktor-V-Leiden-Mutation und einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber anderen Faktoren, wie z.B. Protein-S-Mangel, Faktor-VIII-Aktivitätserhöhung, therapeutischen Antikoagulanzen und Lupus-Antikoagulanzen (de Ronde und Bertina 1999).

1.6 Hereditäre Thrombophilien

Thrombophilie ist eine Tendenz, Thrombosen zu entwickeln. Unter hereditären Thrombophilien versteht man die genetische Prädisposition für thromboembolische Komplikationen, welche nicht immer ein klinisches Korrelat besitzen müssen (Lane et al. 1996). Kliniker verwenden den Begriff der Thrombophilie häufig nur bei Patienten mit atypischen thromboembolischen Ereignissen, wie z.B. eine frühe Erstmanifestation der Symptomatik, rekurrierende Ereignisse, deutliche familiäre Häufung und ungewöhnliche oder ausgedehnte Lokalisationen und Schwere der thrombotischen Antwort auf exogene Stimuli.

Bertina beschrieb 1997, dass eine hereditäre Thrombophilie zu 5–25% in einem unselektionierten Kollektiv und zu 15–63% in Familien mit rezidivierenden thromboembolischen Komplikationen vorkommt (Bertina 1997). Im Folgenden werden die hereditären Thrombophilien FVL-Mutation und Protein-S-Mangel beschrieben.

1.6.1 Die Faktor-V-Leiden-Mutation

Die FVL-Mutation besitzt in der kaukasischen Bevölkerung eine relativ hohe Prävalenz mit einem deutlichen Süd-Nord-Gefälle. Sie wurde 1994 erstmals von Bertina et al. beschrieben. Aufgrund der relativ hohen Allelfrequenz sind heterozygote Träger der Mutation nicht selten. In der europäischen Bevölkerung findet man eine

durchschnittliche Allelfrequenz von 4,4% mit regionalen Differenzen. Die höchste Prävalenz wurde in der griechischen Bevölkerung mit 7% beobachtet, eine sehr niedrige (0,6%) in der asiatischen Bevölkerung (Rees et al. 1995).

Dahlbäck et al. (1997) ermittelten eine Prävalenz der FVL-Mutation von 2-15% in der europäischen Bevölkerung. Aufgrund des regelmäßigen Vorkommens der Mutation in der Bevölkerung kann abgeleitet werden, dass es sich um einen eher milden thrombophilen Risikofaktor handelt. In Patientenkollektiven mit Thrombosen in der Anamnese liegt die Prävalenz der FVL-Mutation bei 20-30% (Bertina 1997). Patienten mit heterozygoter FVL-Mutation haben ein ca. fünffach erhöhtes Thromboserisiko gegenüber der Normalbevölkerung (Bates und Ginsberg 2004). Eine detaillierte Übersicht über das relative Risiko, eine thromboembolische Komplikation bei Vorliegen einer Faktor-V-Leiden-Mutation zu entwickeln, geht aus Tabelle 2 hervor.

Die heterozygote FVL-Mutation stellt eher einen milden Risikofaktor dar und ist meistens klinisch inapparent, bis ein weiterer oder mehrere, exogene thrombophile Risikofaktoren, z.B. orale Kontrazeption, Gravidität oder Immobilisation, hinzukommen (Barthels und von Depka 2003). Das Auftreten der homozygoten Mutation ist selten. Nach der Hardy-Weinberg-Formel errechnet sich ein Anteil von 0,107% Individuen mit homozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation in der Bevölkerung (Rosendaal et al. 1995).

Das Thromboserisiko bei Individuen mit homozygoter FVL-Mutation ist gegenüber den Individuen mit heterozygoter FVL-Mutation ca. 10fach erhöht, so dass sich ein ca. 50fach erhöhtes Thromboserisiko gegenüber der Normalbevölkerung errechnet (Bates und Ginsberg 2004). Das durchschnittliche Alter bei der ersten thromboembolischen Komplikation (Erstmanifestation) liegt bei 31 Jahren für die homozygote und bei 44 Jahren für die heterozygote Faktor-V-Leiden-Mutation (Rosendaal et al. 1995).

1.6.2 Weitere Mutationen am Faktor-V-Gen

Weitere bekannte Mutationen am Faktor-V-Gen sind die Mutationen Faktor-V-Cambridge (Arg306Thr) und Faktor-V-Hong-Kong (Arg306Gly) (Norstrom et al. 2002). Faktor-V-Cambridge geht oft mit einer APC-Resistenz einher, Faktor-V-Hong-Kong dagegen nicht. Da die Spaltstelle Arg306 jedoch nicht hauptsächlich für die Inaktivierung des Faktor-V-Moleküls verwendet wird (siehe Kapitel 1.5), ist die Bedeutung für

thromboembolische Ereignisse bei Vorliegen dieser Mutation als gering einzuschätzen (Norstrom et al. 2002). Faioni et al. (1999) konnten nachweisen, dass bei bereits bestehender FVL-Mutation ein zusätzlich bestehender Faktor-V-HR2-Haplotyp das thromboembolische Risiko zusätzlich zu dem Risiko der FVL-Mutation um den Faktor 3-4 zu erhöhen vermag. Der Faktor-V-HR2-Polymorphismus ist definiert durch missense und silent Mutationen auf dem R2-Allel des Faktor-V-Gens und führt ohne die Faktor-V-Leiden-Mutation zwar zu einer Erhöhung der im Plasma enthaltenen Faktor-V-Aktivität, jedoch nicht zu einer Erhöhung des thrombophilen Risikos (Nicolaes und Dahlbäck 2002)

1.6.3 Der Protein-S-Mangel

1.6.3.1 Hereditärer Protein-S-Mangel

Comp (1984) bestätigte einen Zusammenhang zwischen thromboembolischen Komplikationen und einem Protein-S-Mangel in klinischen Studien. Er konnte nachweisen, dass verschiedene Phänotypen bzw. Verteilungsmuster des Protein-S-Mangels vorliegen können.

Insgesamt ist die Klassifikation des hereditären Protein-S-Mangels durch das Vorliegen einer freien und einer an C4BP-komplexierten Form erschwert. Unter Berücksichtigung dieser Gegebenheiten definierte Comp bereits 1986 die erste Klassifikation des Protein-S-Mangels, die als Grundlage für die aktuell verwendeten Klassifikationen dienen (primäre Klassifikation nach Comp). Er beschrieb initial zwei Typen eines Protein-S-Mangels, die aufgrund einer abnormalen Verteilung durch vermehrte bzw. verminderte Bindung an C4BP resultierte. Später wurde der hereditäre Protein-S-Mangel in drei Typen eingeteilt:

Typ I ist charakterisiert durch eine Reduktion des gesamten, freien und funktionellen Protein S.

Typ II (nach der primären Klassifikation nach Comp Typ IIb) weist normale freie und gesamte Protein-S-Konzentrationen auf, jedoch eine Verminderung des funktionellen Protein S.

Typ III (Typ IIa nach Comp) ist durch ein normales gesamtes Protein S, jedoch ein reduziertes freies und funktionelles Protein S charakterisiert.

Zwei Drittel der Patienten mit Protein-S-Mangel weisen einen Typ I auf, ca. ein Drittel leidet am Typ III. Der Protein-S-Mangel vom Typ II ist sehr selten (Goodwin et al. 2002).

Es ist nicht vollständig geklärt, ob alle drei Typen ein genetisches Korrelat besitzen.

Jüngere Studien belegen ein hohes Thromboembolierisiko für den Protein-S-Mangel Typ I (Brouwer et al. 2005) und ein geringes bis vernachlässigbares Risiko für den Protein-S-Mangel Typ III (Libourel et al. 2005).

Das Risiko zur Entwicklung einer venösen Thrombose bei Patienten mit Protein-S-Mangel beträgt mutationsabhängig das ca. 5-14fache gegenüber der Normalbevölkerung ohne hereditäre Thrombophilie (Hertfelder et al. 2004). Insbesondere in der Altersgruppe der 30- bis 40jährigen, in welcher die Entwicklung einer Thrombose ohne prädisponierende Faktoren sehr selten ist, bekommt der Protein-S-Mangel klinische Relevanz: Mit durchschnittlich 36 Jahren kommt es häufig zu einer erstmaligen thromboembolischen Komplikation (de Stefano et al. 2006). Nach de Stefano et al. beträgt die Inzidenz einer Thrombose beim hereditären Protein-S-Mangel 7.4 auf 100 Patientenjahre (de Stefano et al. 2006).

Bei Neugeborenen mit homozygoter Protein-S-Mutation wurde eine Purpura fulminans mit letalem Ausgang beobachtet. Viele Patienten mit heterozygotem Protein-S-Mangel müssen lebenslang mit oralen Antikoagulanzen behandelt werden, um rekurrenden thrombotischen Ereignissen vorzubeugen.

1.6.3.2 Erworbener Protein-S-Mangel

Die Tatsache, dass Protein S mit einer starken Affinität stöchiometrisch an C4BP gebunden werden kann, erklärt, dass bei Zuständen mit erhöhter C4BP-Konzentration mehr gebundenes als freies Protein S vorliegt (Comp 1986). In Kapitel 1.3. wurde erwähnt, dass C4BP zu der Gruppe der Akut-Phase-Proteine gehört und, zusammen mit gebundenem Protein S, demnach bei inflammatorischen Prozessen, wie z.B. Infektionen, Sepsis oder posttraumatischen Phasen, erhöht ist. Einen erworbenen Protein-S-Mangel findet man dagegen bei konsumierenden Erkrankungen, wie z.B. HIV oder neoplastischen Erkrankungen, infolge eines gesteigerten Proteinturnovers (Matei et al. 2001). Bei Proteinverlust, z.B. durch chronisch entzündliche Darmerkrankungen oder Proteinurie beim Nephrotischen Syndrom, kommt es meistens zu einem Abfall des

freien und gebundenen Protein S (Müller-Berghaus und Pötzsch 1999). Kaba et al. (2003) konnten nachweisen, dass es im Rahmen gewöhnlicher respiratorischer Infektionen während der Wintermonate zu einem Abfall der freien Protein-S-Werte kommt und somit eine Steigerung der Mortalität in Bezug auf thromboembolische Komplikationen zu beobachten ist. Bei verminderter Protein-Synthese, z.B. durch Lebererkrankungen oder orale Antikoagulation, werden verminderte Protein-S-Werte gemessen (Takahashi et al. 1989). Weiterhin wird durch Sexualhormone, insbesondere das Östrogen, eine Erhöhung von C4BP induziert, was geringfügig niedrigere Referenzwerte von freiem Protein S für Frauen als für Männer zur Folge hat. Die Schlussfolgerung, dass dadurch generell Frauen leichter als Männer von Thrombosen betroffen seien, ist jedoch nicht zulässig (Liberti et al. 1999). Erst bei über die Norm hinaus erhöhten Östrogenspiegeln, wie z.B. in der Gravidität, in der Stillzeit und während der Einnahme oraler Kontrazeptiva, scheint es zu klinisch bedeutenden Veränderungen der freien Protein-S-Parameter und der Thrombosehäufigkeit zu kommen (Comp et al. 1986, Fernandez et al. 1989). Jedoch kommt es unter der Einnahme von oralen Kontrazeptiva lediglich zu einer Protein-S-Verminderung um 10-20% des Ausgangswertes, wobei in der Schwangerschaft ein deutlich ausgeprägter Abfall registriert wird (Comp 1997). In der Schwangerschaft wurden Reduktionen des freien Protein S bis auf 50% des Ausgangswertes beobachtet (Malm et al. 1988). Infolge einer Asparaginasetherapie kann es zu einem Abfall des gesamten und freien Protein S kommen. In sehr seltenen Fällen wird im Rahmen eines Autoimmungeschehens ein Hemmkörper gegen Protein S gebildet, der das im Körper zirkulierende Protein S neutralisiert (Barthels und von Depka 2003).

1.7 Protein S unter oraler Antikoagulation

Während für die kurzfristige Therapie thromboembolischer Komplikationen oft Heparinoide verwendet werden, werden für die langfristige Antikoagulation zumeist orale Antikoagulanzen (z.B. Phenprocoumon) eingesetzt.

Voraussetzung für eine normal ablaufende Blutgerinnung ist die posttranslationale Modifikation (γ -Carboxylierung) der Faktoren II, VII, IX und X, sowie der Inhibitoren Protein C, S (Rost et al. 2004).

Orale Antikoagulanzen, wie z.B. Phenprocoumon, inhibieren den Vitamin-K-Epoxid-Reduktase-Komplex (VKOR). Dieser Komplex recycelt Vitamin-K-2,3-Epoxid zu Vitamin-K-Hydrochinon. Vitamin-K-Hydrochinon ist ein essenzieller Kofaktor für die posttranslationale γ -Carboxylierung des Prothrombinkomplexes (Rost et al. 2004). Phenprocoumon unterbricht diesen Zyklus, indem es die enzymatische Regeneration zu biologisch wirksamem Vitamin K verhindert, sowie die Zunahme von inaktiven Vorstufen der Gerinnungsproteine in Leber und Plasma bewirkt (Stafford 2005).

Besonders in der Einleitungsphase einer oralen Antikoagulation sind daher Patienten durch thromboembolische Komplikationen bedroht, wenn nicht zusätzlich eine alternative Antikoagulation betrieben wird. Da die ermittelte Halbwertszeit des Protein C nur 7 h beträgt, zirkulieren in der Einleitungsphase einer Antikoagulationstherapie aufgrund der überproportionalen Verminderung des Inhibitors Protein C zunächst mehr prokoagulatorische Faktoren im Blut (Weiss et al. 1987, D'Angelo et al. 1988). Dieser Pathomechanismus kommt auch bei der komplizierend auftretenden Cumarinnekrose zum Tragen. Die Cumarinnekrose ist gekennzeichnet durch eine vaskuläre Schädigung mit nachfolgender Nekrose, die vor allem bei zu intensiver Einleitung einer oralen Antikoagulation beobachtet wird, da es zu einem überproportionalen Abfall des Protein C kommt.

Während der Cumarintherapie ist ein kongenitaler Protein-S-Mangel nur schwer zu erkennen. Zur Diagnosesicherung empfiehlt sich eine Untersuchung 6–8 Wochen nach Beendigung der Cumarintherapie (Barthels und von Depka 2003) oder eine molekulargenetische Diagnostik.

1.8 Prinzipien und Problematik der Protein-S-Bestimmung

In den vorangegangenen Kapiteln wurde beschrieben, wie Protein S den Ablauf der Gerinnung reguliert und dass Protein S ein integraler Bestandteil des Hämostasesystems ist. Weiterhin wurde darauf eingegangen, dass nicht nur hereditäre Ursachen, sondern auch viele exogene Faktoren die Konzentration und die Aktivität dieses Gerinnungsfaktors beeinflussen können. Diese Problematik wurde besonders apparent, als man sich nach der Entdeckung des Protein S damit beschäftigte, valide Testsysteme zu konstruieren, um eine möglichst präzise Aussage über den Protein-S-

Haushalt im menschlichen Organismus zu erhalten. Während der Konstruktion präziser Testsysteme wurde die Labilität von Protein S und die Störanfälligkeit der Tests deutlich. Im Folgenden soll auf die Prinzipien und Problematik der Entwicklung einer zuverlässigen Protein-S-Bestimmung eingegangen werden.

1.8.1 Entwicklung von Globaltests zum Screening des Protein-C/S-Systems

Mitte der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurden Globaltests zum Screening des Protein-C/S-Systems inklusive APC-Resistenz entwickelt. Es handelte sich um aPTT-basierte Testsysteme, die mit PROTAC[®] (Enzym der Schlange Agkistrodon contortrix) zur Aktivierung von Protein C arbeiteten. Die Sensitivität der Testsysteme war teilweise sehr hoch (Preda 1996), jedoch war die Spezifität schon aufgrund der Mannigfaltigkeit der Gründe, die ein pathologisches Messergebnis liefern können, sehr niedrig und lag mitunter bei 63-79% (Goodwin et al. 2002). In der Routine haben sich die Globaltests nicht in größerem Umfang etablieren können.

1.8.2 Die Entwicklung der Bestimmung des gesamten und freien Protein S

Erste Protein-S-Nachweismethoden beschränkten sich auf den Nachweis des gesamten Protein S mittels eines polyklonalen Elektroimmunoassays (Laurell-Methode). Das freie Protein S wurde ebenfalls mittels zweidimensionaler Immunelektrophorese gemessen, nachdem der C4BP-gebundene Anteil durch Zugabe von Polyethylenglykol (PEG 6000) ausgefällt wurde. Da die PEG-Zugabe sehr zeitaufwändig war (Probe wurde über Nacht ausgefällt) und die Methode wenig standardisiert und reproduzierbar war, wurden kommerziell erhältliche ELISAs konzipiert, die in einem Schritt gesamtes und freies Protein S messen können. Allerdings wies die Fällung mit Polyethylenglykol eine hohe Präzision auf, so dass die Methode allgemein als der Goldstandard in der Messung des freien Protein S einging (Goodwin et al. 2002). 1996 wurde von einem Konsensus der International Society of Thrombosis and Haemostasis und der World Health Organization festgelegt, dass lediglich die Bestimmung des freien Protein S einen Stellenwert in der Diagnose des Protein-S-Mangels haben sollte, da lediglich das freie Protein S eine biologische Aktivität besitzt (Lane et al. 1996). Ferner wurde durch die

Konsensuskonferenz beschlossen, dass lediglich Immunoassays (ELISAs) für eine Aussage zum Protein-S-Mangel herangezogen werden sollten, da die ebenfalls erhältlichen und zum Teil verwendeten aPTT-basierten Testsysteme für die Bestimmung des funktionellen Protein S eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Störfaktoren und somit eine geringe Spezifität aufwiesen (Lane et al. 1996). Dieser Beschluss über funktionelle Testsysteme exkludiert jedoch die Möglichkeit, den seltenen Protein-S-Mangel Typ II nach Comp zu diagnostizieren.

Am Beispiel des in der vorliegenden Untersuchung verwendeten ELISAs zur Bestimmung des freien Protein S der Fa. Roche wird deutlich, dass Referenzwerte und erzielte Ergebnisse von Labor zu Labor stark differieren können. So wurde im Jahr 2000 in der Arbeitsgruppe College of American Pathologists bei einer Untersuchung mit verschiedenen kommerziell erhältlichen ELISAs zur Bestimmung des freien Protein S ein interlaboratory coefficient of variation (Variationskoeffizient für Messergebnisse derselben Probe in verschiedenen Labors = CV) von 7-8% für Normalplasmen und 12-13% für pathologische Plasmen (Protein-S-defiziente Plasmen) ermittelt, was für eine schlechte Reproduzierbarkeit des Tests sprechen könnte. Jedoch wurde angemerkt, dass für die Bestimmung der Parameter unterschiedliche Labormethoden und Geräte angewendet wurden, so dass ein Einfluss auf die Protein-S-Bestimmung durch unterschiedliche Methoden nicht ausgeschlossen werden kann (Goodwin et al. 2002). Demnach ist eine Standardisierung der Bedingungen notwendig, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. In einer Untersuchung von Persson et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Untersuchungen mittels ELISA mit monoklonalen Antikörpern für freies Protein S eine starke Abhängigkeit von Inkubationszeit, Temperatur und Verdünnungsstufe aufweisen. So wurden signifikant unterschiedliche Ergebnisse erzielt, je nachdem, ob die Proben bei Raumtemperatur oder bei 37°C analysiert wurden (Persson et al. 2001). Außerdem wurden mit zunehmender Inkubationszeit der Reagenzien höhere Protein-S-Konzentrationen gemessen als bei kurzer Inkubationszeit (Persson et al. 2001). Auch hier war eine Standardisierung dringend erforderlich.

Um Störeinflüsse durch die Variabilität des C4BP, welches eine hohe Affinität zum freien Protein S aufweist, zu minimieren, entwickelte man Protein-S-ELISAs, die nicht nur eine Matrix mit monoklonalem Anti-Protein-S-Antikörper, sondern auch Anti-C4BP-Antikörper

besitzen. Obwohl solche Tests zeit- und materialaufwändig (Serra et al. 2002) sind, geht die Tendenz dahin, freies und gesamtes Protein S in einem einzigen Test und Arbeitsgang zu bestimmen.

Der One-step-ELISA hat heute in vielen Laboratorien Einzug gehalten und die Fällung mit PEG 6000 abgelöst, allein schon aus Gründen des verminderten Zeit- und Arbeitsaufwandes bei sehr hoher Präzision.

1.8.3 Die Entwicklung der Methode zur Bestimmung des funktionellen Protein S

Seit 1988 werden funktionelle Protein-S-Tests verwendet. Die in den funktionellen Testsystemen ermittelte Protein-S-Aktivität kann zum einen über ein aPTT- oder ein PT-abhängiges Format gemessen werden. Im aPTT-Verfahren wird verdünntes Patientenplasma zusammen mit Protein-S-Mangelplasma und aktiviertem Protein C vermischt. Nach der Initiierung der Gerinnung mit einem Aktivator, z.B. mit Russel viper venom (RVV), wird die Zeit bis zur Bildung eines Fibringerinnsels gemessen. Die Zeit bis zum „clotting“ ist der Protein-S-Aktivität direkt proportional und dauert umso länger, je mehr Protein S sich in der zu untersuchenden Probe befindet.

Die initial verwendeten funktionellen Protein-S-Tests wurden im aPTT-Format angewendet und mit Protein-S-Mangelplasma, Thromboplastinreagenz und im Patientenplasma enthaltenem Protein C durch die Zugabe von PROTAC[®] (Enzym der Schlange *Agkistrodon contortrix*) aktiviert und die Zeit bis zur Fibringeneration gemessen (Preda et al. 1990). PROTAC[®] wurde bereits 1988 für erste funktionelle Protein-S-Tests eingesetzt (Suzuki et al. 1988) und wird noch heute als Aktivator für Protein C verwendet.

Negativeinflüsse auf die Entwicklung eines funktionellen Protein-S-Tests ergaben sich jedoch bei Vorliegen einer APC-Resistenz (Faioni et al. 1993, 1994, D'Angelo et al. 1995), einer FVL-Mutation sowie hoher Faktor VIIIa und Faktor VIIa-Konzentrationen. Ferner fand man eine Beeinflussung durch Lupus-Antikoagulanzen (aPTT-Verlängerung), denen durch die Verdünnung des Patientenplasmas entgegengewirkt werden kann. Ein ähnlicher korrigierender Effekt auf die Messwtergebnisse wurde bei Proben erzielt, die eine hohe Faktor-VIII-Aktivität aufwiesen. Faktor-VIII-Aktivitäten >300%, wie sie bei Akut-Phase-Reaktionen vorkommen können, verursachten bei

unverdünnten Plasmen eine scheinbar erniedrigte Protein-S-Aktivität durch ein Ungleichgewicht zugunsten prokoagulatorischer Faktoren im Testansatz. Störeinflüsse, die durch Heparin im Untersuchungsmaterial verursacht wurden, wurden durch Neutralisation mit Polybren coupiert.

Bereits in einer frühen Phase der funktionellen Protein-S-Bestimmung wurde versucht, durch die zusätzliche Zugabe von bovinem Faktor Va die Präzision der Tests zu verbessern. Mit Protein-S-Mangelplasmen und Normalplasmen wurden gute Korrelationen zum freien Protein S erzielt ($r = 0,95$), jedoch wurde der Test nicht an APC-Resistenten oder Plasmen von Patienten mit FVL-Mutation getestet (Wolf et al. 1989).

1.9 Fragestellung der Arbeit

Protein S nimmt einen bedeutenden Stellenwert in der Inhibition der Gerinnung ein. Die Bestimmung des Protein S ist ein essentieller Bestandteil in der Abklärung der hereditären Thrombophilie. Der Protein-S-Mangel ist eine Erkrankung mit weitreichenden Konsequenzen für den Patienten, welchem diese Diagnose gestellt wird. Teilweise ist in Abhängigkeit von der Häufigkeit und Schwere thrombotischer Ereignisse eine lebenslange Antikoagulation mit allen Risiken und Nebenwirkungen erforderlich. Seit der Beschreibung der drei Typen des Protein-S-Mangels ist die funktionelle Protein-S-Bestimmung neben dem gesamten und freien Protein S wesentlicher Bestandteil der Protein-S-Diagnostik. Leider ist dieses Testprinzip störanfällig, was die Interpretation der Befunde häufig erschwert. Über besonders störende Einflüsse durch das Vorliegen einer APC-Resistenz wird in der Literatur häufig berichtet.

Die hier vorliegenden Untersuchungen basieren auf der Arbeitshypothese, dass auf Grund des koagulometrischen Messprinzips der funktionellen Protein-S-Bestimmung Hämostasedefekte, die unmittelbar mit dem Protein-C/S-System interferieren, Einfluss auf die funktionelle Protein-S-Bestimmung nehmen. Die FVL-Mutation beeinflusst die Bestimmung dahingehend, dass sie zu einer erhöhten Koagulabilität führt, in vitro also zu einer relativ kürzeren Gerinnungszeit, die sich als falsch niedrige Protein-S-Aktivität niederschlägt. Sofern diese Hypothese zutrifft, dürfte der Effekt der FVL-Mutation sich nur bei der funktionellen, nicht aber bei der immunologischen Protein-S-Bestimmung

bemerkbar machen, weswegen immunologische Methoden (ELISA) und funktionelle Tests in dieser Arbeit miteinander verglichen wurden. Basierend auf vorausgegangenen Beobachtungen bei einzelnen Patienten wurde ferner erwartet, dass sich ein „Dosiseffekt“ in Bezug auf die Protein-S-Aktivität in Abhängigkeit vom Faktor-V-Genotyp abzeichnet, je nachdem, ob eine homozygote oder heterozygote FVL-Mutation oder ein Faktor-V-Wildtyp vorliegt. Der funktionelle Test der Fa. Roche versucht diesen Effekt durch die Verwendung eines zusätzlichen bovinen Faktor-Va-Reagenz auszugleichen. Zur Überprüfung der Wirksamkeit von diesem bovinem Faktor Va wurden zwei verschiedene funktionelle Protein-S-Tests verglichen.

2 Patienten und Methoden

2.1.1 Patienten mit homozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation

Es wurden Plasmaproben von insgesamt 46 Patienten mit homozygoter FVL-Mutation untersucht. Diese Plasmaproben wurden von 1997 bis 2003 in der Thrombophilie-Ambulanz des Institutes für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn gesammelt. Die Patienten hatten sich dort zu einer Untersuchung auf thrombophile Risikofaktoren vorgestellt. Von jedem Patienten wurde daher eine ausführliche Anamnese erstellt, auf die beim Vergleich der Patienten mit heterozygoter FVL-Mutation und FV-Wildtyp zurückgegriffen werden konnte.

Nach Auswertung der anamnestischen Daten setzt sich die Gruppe der Patienten mit homozygoter FVL-Mutation wie folgt zusammen:

18 männliche und 28 weibliche Patienten im Alter von 23-73 Jahren. Das mittlere Patientenalter betrug $42,5 \pm 13,6$ Jahre. Das mittlere Probenalter, gerechnet vom Entnahmeterrin bis zur Untersuchung im Rahmen der Studie betrug $48,8 \pm 23,7$ Monate. An weiteren Risikofaktoren besteht bei vier Patienten eine heterozygote Prothrombin-G20210A-Mutation. Von den 46 Patienten hatten insgesamt 32 eine oder mehrere tiefe Beinvenenthrombosen (TVT): 24 Patienten eine TVT, 5 Patienten 2 TVT, 3 Patienten 3 TVT (siehe Abb. 4), 14 Patienten waren bislang ohne thromboembolisches Ereignis geblieben. Eine Lungenembolie, konsekutiv nach Beinvenenthrombose oder als isoliertes Ereignis, erlitten 7 Patienten (siehe Abb. 4). Zum Untersuchungszeitpunkt nahmen 13 Patienten einen Vitamin-K-Antagonisten (meist Marcumar[®]) ein, 11 Patienten führten eine Therapie mit niedermolekularem Heparin in subkutaner Applikationsform durch. 5 Patienten nahmen ASS 100 mg zum Zeitpunkt der Blutentnahme ein. 4 Patientinnen nahmen ein orales Kontrazeptivum, 3 Patientinnen waren zum Untersuchungszeitpunkt schwanger.

Aufgrund der vorliegenden Daten wurde ein alters- und geschlechtsspezifisches matching zur Gruppe der Patienten mit homozygoter FVL-Mutation durchgeführt (siehe Kapitel 2.1.4).

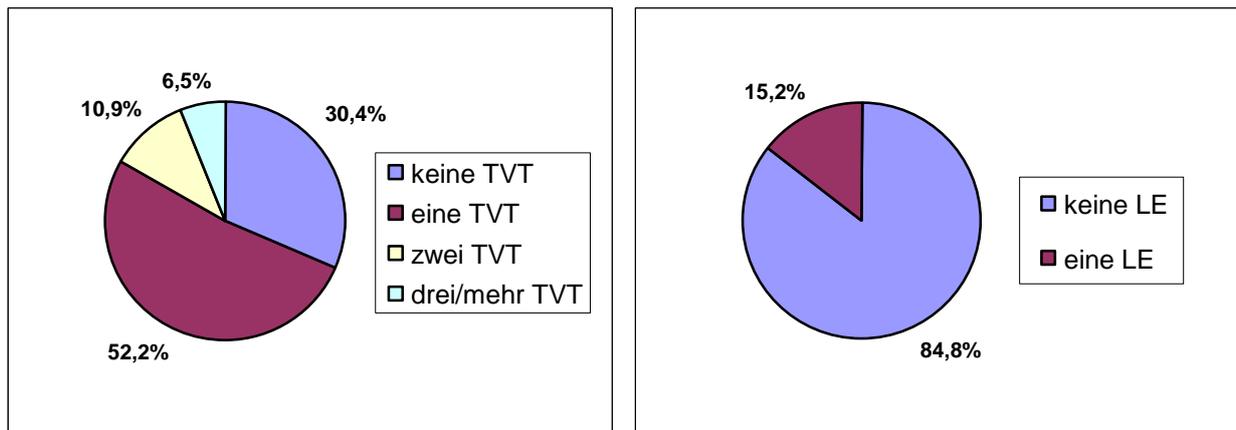


Abb. 4: Inzidenz der Tiefen Venenthrombose (TVT) und der Lungenembolie (LE) in der Gruppe der Patienten mit homozygoter FVL-Mutation

2.1.2 Patienten mit heterozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation

Nach Auswertung der anamnestischen Daten setzt sich die Gruppe der Patienten mit heterozygoter FVL-Mutation wie folgt zusammen:

15 männliche und 31 weibliche Patienten im Alter von 22-73 Jahren. Das mittlere Patientenalter beträgt $41,0 \pm 13,9$ Jahre. Das mittlere Probenalter beträgt $22,5 \pm 15,4$ Monate. An weiteren Risikofaktoren bestehen bei zwei Patienten eine heterozygote Prothrombin-G20210A-Mutation, bei einem Patienten ein Faktor-V-HR2-Haplotyp, bei einem weiteren Patienten ein leichtgradiger AT-III-Mangel. Von den 46 Patienten hatten insgesamt 20 eine oder zwei tiefe Venenthrombosen (15 Patienten eine TVT, 5 Patienten zwei TVT), 26 Patienten waren ohne thromboembolische Ereignisse. Bei 5 Patienten ereignete sich eine Lungenembolie (siehe Abb. 5). Zum Untersuchungszeitpunkt nahmen 14 Patienten einen Vitamin-K-Antagonisten (meist Marcumar[®]) ein, 3 Patienten führten eine Therapie mit niedermolekularem Heparin in subkutaner Applikationsform durch. 3 Patienten nahmen ASS 100 mg täglich ein, ein Patient ASS 300 mg täglich. 5 Patientinnen nahmen ein orales Kontrazeptivum, 3 Patientinnen waren schwanger.

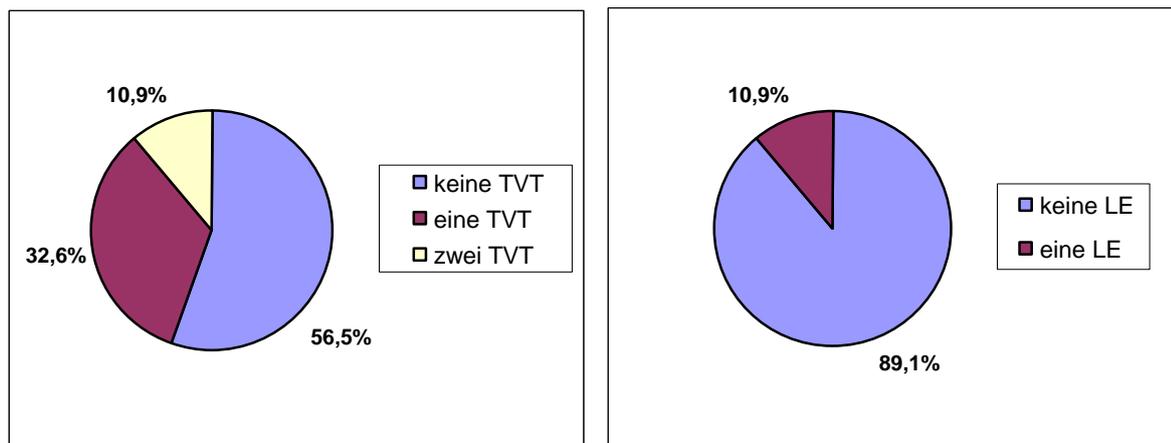


Abb. 5: Inzidenz der Tiefen Venenthrombose (TVT) und der Lungenembolie (LE) in der Gruppe der Patienten mit heterozygoter FVL-Mutation

2.1.3 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv setzt sich wie folgt zusammen:

16 männliche und 30 weibliche Patienten/Normalpersonen im Alter von 23-77 Jahren. Das mittlere Patientenalter betrug $42,1 \pm 14,2$ Jahre. Das mittlere Probenalter, gerechnet vom Entnahmeterrin bis zur Untersuchung im Rahmen der Studie betrug $18,9 \pm 9,1$ Monate. Bei allen Patienten/Normalpersonen konnte das Vorliegen eines thrombophilen Risikofaktors bzw. einer APC-Resistenz ausgeschlossen werden. Von den 13 antikoagulierten Patienten erlitten 10 eine TVT, 2 zwei TVT, eine Patientin eine Sinusvenenthrombose und 6 eine Lungenembolie (spontan, beziehungsweise konsekutiv, siehe Abb. 6). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme nahmen 2 Patienten zusätzlich ASS 100 mg ein. Zwei der Patientinnen waren mit niedermolekularem Heparin antikoaguliert und waren schwanger. Eine Patientin befand sich in der Einleitungsphase der Antikoagulation mit Phenprocoumon und applizierte sich parallel niedermolekulares Heparin. Der therapeutische Quick-Wert war bereits erreicht. 4 Patientinnen nahmen orale Kontrazeptiva ein.

Das Kollektiv der Individuen ohne FVL-Mutation (Wildtyp) und ohne orale Antikoagulation wurde aus einer Gruppe von Blutspendern gebildet, die alters- und geschlechtsgebunden zu der Gruppe der Patienten mit homozygoter FVL-Mutation gematcht wurde. Die Plasmaproben der Blutspender entstammen überwiegend aus dem

Jahr 2003. Das mittlere Probenalter betrug zum Zeitpunkt der Untersuchung $18,5 \pm 6,8$ Monate. Als Screeningtest für das Vorliegen einer FVL-Mutation wurde ein APC-Resistenz-Test durchgeführt, der nach Literaturangaben eine Sensitivität von nahezu 100% bezüglich der Detektion einer FVL-Mutation aufweist (de Ronde et al. 1999). Keiner der Blutspender wies eine APC-Ratio unterhalb des Referenzwertes auf. Die Gruppe der Blutspender setzt sich wie folgt zusammen: 8 männliche und 25 weibliche Blutspender (insgesamt 33) im Alter von 23-65 Jahren. Das mittlere Alter der Blutspender betrug $42,2 \pm 13,0$ Jahre. Es wurden keine thromboembolischen Ereignisse in der Vergangenheit angegeben.

Die Patienten mit oraler Antikoagulation wurden aus der Thrombophilie-Ambulanz rekrutiert, da eine Einnahme von oralen Antikoagulanzen ein Ausschlusskriterium für die Teilnahme an der Blutspende ist. Bei den Ambulanzpatienten dieser Gruppe konnten zwar alle gegenwärtig erfassbaren thrombophilen Risikofaktoren ausgeschlossen werden, jedoch ereigneten sich in der Vorgeschichte thromboembolische Komplikationen, die die Einnahme von Antikoagulanzen notwendig machten. Die Untergruppe der Patienten mit Antikoagulation aus der Thrombophilie-Ambulanz bestand aus 8 männlichen und 5 weiblichen Patienten (insgesamt 13 Patienten). Das mittlere Patientenalter betrug $42,0 \pm 17,6$ Jahre, das mittlere Probenalter der antikoagulierten Patienten betrug $20,0 \pm 13,7$ Monate.

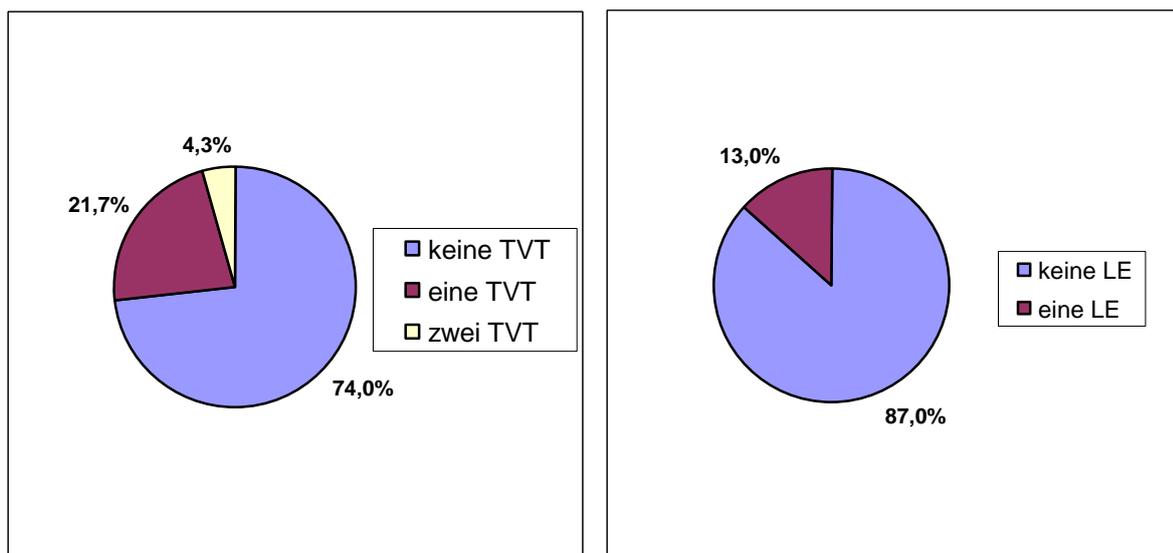


Abb. 6: Prävalenz der Tiefen Venenthrombose (TVT) und der Lungenembolie (LE) in der Wildtyp-/Kontrollgruppe

2.1.4 Matching der Gruppen

Da Protein S eine alters- und vor allem geschlechtsgebundene Varianz aufweist (Goodwin et al. 2002), wurden die Gruppen mit unterschiedlichen Faktor-V-G1691A-Genotypen alters- und geschlechtsgebunden gematcht. Damit sollte zumindest bezüglich des Alters und des Geschlechtes eine homogene Binnenstruktur der Gruppen geschaffen werden und ein systematischer Fehler durch diese Faktoren ausgeschlossen werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung und Lagerung des Untersuchungsmaterials

Die Blutproben der Patienten wurden in der Regel im Laufe des Vormittags während der Ambulanzsprechstunden, die Blutproben der Blutspender wurden tageszeitunabhängig während der regulären Blutspendezeiten im Rahmen der Spende gewonnen. Bei den Ambulanzpatienten wurde nach kurzem Oberarmstau von 60-80 mmHg eine Kubital- oder Unterarmvene mit einer 21-G-Butterfly-Kanüle punktiert. Die Blutspender wurden mit dem Punktionsset Opti Pure RC der Fa. Baxter mit einer 1,6 mm (16G) Venenkanüle punktiert. Die Einheit besteht aus einem Blutentnahmeschlauch mit integriertem Entnahmeadapter und nachfolgendem Blutsammelbeutel. Für alle in der Untersuchung durchgeführten Analysen wurde 10 ml Citratblut (Citratmonovette, Fa. Saerstedt) mit einem Antikoagulan-Mischungsverhältnis von 1:10 (1 Teil 3,8% Natrium-Citrat und 9 Teile Vollblut) verwendet. Das Citratblut wurde direkt nach der Entnahme mit 3600 g bei 20°C zentrifugiert und anschließend in 1 ml- bis maximal 2 ml-Aliquots portioniert und bei -40°C tiefgefroren und bis zur Analyse gelagert.

2.2.2 Bestimmung des gesamten Protein-S-Antigen (ELISA Asserachrom® Total Protein S, Fa. Roche)

Das kommerziell erhältliche Testkit der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, wird entsprechend den Angaben des Herstellers nach der von Amiral et al. (1994) beschriebenen Methode durchgeführt.

Testprinzip:

Bei dem angewendeten ELISA handelt es sich um einen Sandwich-ELISA nach Keller (1981).

In die Vertiefungen (microwells) eines mit monoklonalen Antikörpern von der Maus gegen Protein S (entspricht Reagenz 1) vorbeschichteten Kunststoffstreifens wird das Reagenz 2 (zweiter, Peroxidase-gekoppelter monoklonaler Antikörper) hinzugegeben, sowie die Probe, die das zu bestimmende gesamte Protein S enthält. Das Protein S der Plasmaprobe wird **gleichzeitig** (One-step-ELISA) vom ersten Antikörper an der Wand der Vertiefung, sowie vom zweiten monoklonalen Antikörper-Peroxidase-Konjugat gebunden. Auf diese Weise wird ein „sandwich“ in einem einzigen Reaktionsschritt gebildet. Die gebundene Peroxidase wird durch ihre Aktivität auf das Substrat OPD/Harnstoffperoxid (Reagenz 3a+3b) detektiert (Extinktionsmessung bei 492 nm). Die Farbintensität nach Abstoppen der Reaktion mit Hilfe einer starken Säure (H₂SO₄) ist abhängig von der Menge an freiem Protein S, die ursprünglich in der Probe enthalten war.

Reagenzien und Geräte:

Ein Asserachrom® Free Protein-S-Testkit der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim enthält:

Reagenz 1: Mikrotitrationsstreifen (microwells), beschichtet mit F(ab')₂-Fragmenten eines monoklonalen Maus-Antikörpers, der gegen freies Protein S (human) gerichtet ist.

Reagenz 2: Monoklonaler Maus-Antikörper gegen lyophilisiertes, Peroxydasegekoppeltes (sich vom ersten unterscheidendes) freies, humanes Protein S.

Reagenz 3 a: 2 mg ortho-Phenylendiamin (OPD, 2 HCl)

Reagenz 3 b: 5 mg Harnstoffperoxid als Wasserstoffperoxidlieferant

Reagenz 4: Phosphat-Puffer (Konzentrat)

Reagenz 5: Waschlösung (Konzentrat)

Reagenz 6: Lyophilisiertes Humanplasma mit bekannter Menge an Protein S nach Rekonstitution. Der Sollwert wurde anhand des zweiten, 1995 etablierten, Internationalen Standards 93/590 bestimmt. Das Reagenz 6 wird zum Erstellen der **Bezugskurve** verwendet.

Reagenz 7: Lyophilisiertes Humanplasma mit bekannter Menge an gesamten Protein S. Die Konzentration wird gegenüber einer Sekundärstandardlösung des Internationalen Standards 93/590 aus dem Jahre 1995 bestimmt. Das Reagenz 7 wird als **Qualitätskontrolle** verwendet.

Reagenz 6 und 7 sind identische Reagenzien. Da jedoch für die Erstellung der Bezugskurve und Qualitätskontrolle jeweils unterschiedliche Verdünnungen erforderlich sind, hat der Hersteller zwei Reagenzienflaschen für den Test zur Verfügung gestellt.

Schwefelsäure 3 mol/l

Fa. Merck-Eurolab GmbH, Darmstadt, Nr. 9912

Gerätetyp: BEP 2000, Fa. Dade Behring, Marburg.

Herstellung/Vorbereitung der Reagenzien:

Reagenz 1: Vor Testdurchführung 30 min. bei RT lagern

Reagenz 2: Mit 2 ml Verdünnungspuffer (Reagenz 4) lösen. Inkubation 30 min bei RT.

- Reagenz 3a + 3b:** Substratlösung 5 min. vor Gebrauch zubereiten.
Je 2 Tabletten 3a und 3b in 8 ml Aqua dest. lösen.
- Reagenz 4:** 1:10 mit Aqua dest. Verdünnen (15 min vor Testbeginn)
- Reagenz 5:** 1:20 mit Aqua dest. Verdünnen (15 min vor Testbeginn)
- Reagenz 6** Mit 0,5 ml Aqua dest. verdünnen, Inkubation 30 min. bei RT.
- Reagenz 7** Mit 0,5 ml Aqua dest. verdünnen, Inkubation 30 min. bei RT.

Vorbereitung der Probe: 45 min. bei RT auftauen.

Verdünnung der Plasmaprobe mit Reagenz 4

Erstellung der Bezugskurve: Mit dem 1:10 verdünnten Phosphat-Puffer (Reagenz 4) wird eine geometrische Verdünnungsreihe mit Reagenz 6 hergestellt. Die Eichpunkte gelten als Bezugswerte für nachfolgende Messungen:

100%	75%	50%	25%	12,5%	6,25%	Verdünnung
1 : 1	1 : 1,5	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	Reagenz 6 : Puffer

Testdurchführung:

Immunreaktion 1:

Die mit monoklonalem Maus-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten werden je Kavität mit 50 µl Reagenz 2 und 200 µl 1:10 verdünntem Untersuchungsmaterial (Plasmaprobe) beschickt. Die Vertiefungen werden anschließend abgedeckt und das Reaktionsgemisch eine Stunde bei 18-25°C inkubiert. Durch fünfmaliges Waschen mit dem 1:20 verdünnten Waschlösungsansatz (Reagenz 5) können die ungebundenen Antikörper entfernt werden.

Farbentwicklung:

Durch die Zugabe von 200 µl Orthophenyldiamin und Harnstoffperoxid (Reagenz 3a+b) als Substrat für das Enzym Peroxidase wird die Farbentwicklung eingeleitet und nach

Inkubation von genau 5 Minuten bei 18-25°C durch die Zugabe von 50 µl 3M H₂SO₄ beendet.

Nach Zugabe von Säure in alle Kavitäten wird die Platte zum Vermischen der Reagenzien durch den Automaten bewegt.

Extinktionsmessung:

Nach Abstoppen der Reaktion sollte nach 10 min. bis 2 Stunden der Farbumschlag der Lösung mit einer Extinktionsmessung bei 492 nm gemessen werden.

2.2.3 Bestimmung des freien Protein-S-Antigen (ELISA Asserachrom[®] Free Protein S, Fa. Roche)

Das kommerziell erhältliche Testkit der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim wird entsprechend den Angaben des Herstellers nach der von Amiral et al. (1994) beschriebenen Methode durchgeführt.

Testprinzip (entspricht dem des gesamten Protein-S-Antigen):

Bei dem angewendeten ELISA handelt es sich um einen Sandwich-ELISA.

In die Vertiefungen eines mit monoklonalen Antikörpern von der Maus gegen freies Protein S (entspricht Reagenz 1) beschichteten Kunststoffstreifens wird einerseits das Reagenz 2 (zweiter, Peroxidase-gekoppelter monoklonaler Antikörper) hinzugesetzt, andererseits die Probe, die das zu bestimmende freie Protein S enthält. Das zu bestimmende freie Protein S der Plasmaprobe wird **gleichzeitig** (One-step-ELISA) von den zwei spezifischen Antigen determinanten des freien Protein S eingefangen. Auf diese Weise wird es in einem einzigen Schritt gebunden und markiert. Die gebundene Peroxidase-Konzentration wird durch ihre Aktivität auf das Substrat ortho-Phenylendiamin (Reagenz 3a) in Gegenwart von Harnstoffperoxid (Reagenz 3b) gemessen (Extinktionsmessung bei 492 nm). Die Farbintensität nach Abstoppen der Reaktion mit Hilfe einer starken Säure (H₂SO₄) verhält sich proportional zu der Menge an freiem Protein S, die ursprünglich in der Probe enthalten ist.

Reagenzien und Geräte:

Ein Asserachrom[®] Free Protein S-Testkit der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim enthält:

- Reagenz 1:** Microwells mit 16 Kavitäten, beschichtet mit F(ab')₂-Fragmenten eines monoklonalen Maus-Antikörpers der gegen freies Protein S gerichtet ist.
- Reagenz 2:** Monoklonaler Maus-Antikörper, gerichtet gegen lyophilisiertes, Peroxydase-gekoppeltes (sich vom ersten unterscheidendes) freies Protein S.
- Reagenz 3 a:** 2 mg ortho-Phenylendiamin (OPD, 2 HCl).
- Reagenz 3 b:** 5 mg Harnstoffperoxid als Wasserstoffperoxidlieferant.
- Reagenz 4:** Konzentrierter TRIS-Puffer
- Reagenz 5:** Waschlösung
- Reagenz 6:** Lyophilisiertes Humanplasma mit bekannter Menge an freiem Protein S nach Rekonstitution. Diese Konzentration wird gegenüber einer Sekundärstandardlösung des Internationalen Standards 93/590 aus dem Jahre 1995 bestimmt. Das Reagenz 6 wird zur Erstellung der Bezugskurve der Bestimmung verwendet.
- Reagenz 7:** Lyophilisiertes Humanplasma mit bekannter Menge an freiem Protein S. Die Konzentration wird gegenüber einer Sekundärstandardlösung des Internationalen Standards 93/590 aus dem Jahre 1995 bestimmt. Das Reagenz 7 wird als **Qualitätskontrolle** verwendet.

Reagenz 6 und 7 sind identische Reagenzien. Da jedoch aus beiden unterschiedliche Verdünnungen erstellt werden, stehen zwei Reagenzienflaschen zur Verfügung.

Schwefelsäure 3 mol/l

Fa. Merck-Eurolab GmbH, Darmstadt, Nr. 9912

Gerätetyp: BEP 2000, Fa. Dade Behring, Marburg.

Herstellung/Vorbereitung der Reagenzien:

- Reagenz 1:** Vor Testdurchführung 30 min. bei RT lagern
- Reagenz 2:** Mit 2 ml Verdünnungspuffer (Reagenz 4) lösen. Inkubation 30 min bei RT.
- Reagenz 3a + 3b:** Jeweils 2 Tabletten in 8 ml Aqua dest. lösen.
- Reagenz 4:** 15 min. vor Beginn 1:10 mit Aqua dest. verdünnen.
- Reagenz 5:** 15 min. vor Beginn 1:20 mit Aqua dest. verdünnen.
- Reagenz 6:** Mit 0,5 ml Aqua dest. verdünnen, Inkubation 30 min. bei RT.
- Reagenz 7:** mit 0,5 ml Aqua dest. verdünnen, Inkubation 30 min. bei RT.

Vorbereitung der Probe: 45 min. bei RT auftauen.

Verdünnung der Plasmaprobe mit Reagenz 4 1:20

Erstellung der Bezugskurve: Mit 1:10 verdünntem Phosphat-Puffer (Reagenz 4) wird eine geometrische Verdünnungsreihe mit Reagenz 6 hergestellt. Die Eichpunkte gelten als Bezugswerte für nach folgende Messungen:

100%	75%	50%	25%	12,5%	6,25%	Verdünnung
1 : 1	1 : 1,5	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	Reagenz 6 : Puffer

Testdurchführung:

Immunreaktion 1:

Die mit monoklonalem Maus-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten werden je Kavität mit 50 µl Reagenz 2 und 200 µl 1:20 verdünntem Untersuchungsmaterial (Plasmaprobe) beschickt. Die Vertiefungen werden anschließend abgedeckt und das Reaktionsgemisch eine Stunde bei 18-25°C inkubiert. Durch fünfmaliges Waschen mit dem 1:20 verdünnten Waschlösungsansatz (Reagenz 5) können die ungebundenen Antikörper entfernt werden.

Farbentwicklung:

Durch die Zugabe von 200 µl Orthophenyldiamin und Harnstoffperoxid (Reagenz 3a+b) als Substrat für das Enzym Peroxidase wird die Farbentwicklung eingeleitet und nach Inkubation von 5 Minuten bei 18-25°C durch die Zugabe von 50 µl 3 M H₂SO₄ beendet.

Extinktionsmessung:

30 Minuten nach Abstoppen der Reaktion sollte bis zu 2 Stunden der Farbumschlag der Lösung mit einer Extinktionsmessung bei 492 nm gemessen werden.

2.2.4 Bestimmung des funktionellen Protein S (STA Protein S clotting, Fa. Roche)

Das kommerziell erhältliche Testkit der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim wird entsprechend den Angaben des Herstellers nach der von Wolf et al. (1989) beschriebenen Methode durchgeführt.

Testprinzip:

Protein S ist ein Kofaktor des aktivierten Protein C und steigert dessen gerinnungshemmende Wirkung. Diese Steigerung zeigt sich in der Verlängerung der Gerinnungszeit eines Systems, das mit Faktor Va, einem physiologischen Substrat des aktivierten Protein C, angereichert ist. Je mehr Protein S sich im Ansatz befindet, desto später kommt es zur Ausbildung eines Fibringerinnsels. Der Zeitpunkt der Fibringerinnselbildung wird koagulometrisch bestimmt.

Reagenzien und Geräte:

Ein STA Protein S clotting-Testkit der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim enthält:

- Reagenz 1:** Lyophilisiertes Humanplasma, frei von Protein S (Immuno-Absorption)
- Reagenz 2:** Lyophilisiertes humanes **aktiviertes** Protein C
- Reagenz 3:** Lyophilisierter boviner Faktor Va

Nicht im Testkit enthalten, aber zusätzlich benötigt werden:
(alle Reagenzien von der Fa. Roche)

- Reagenz 4:** STA Unicalibrator (Bestell-Nr. 11776584)
- Reagenz 5:** STA Diluent Buffer (Bestell-Nr. 03138097)
- Reagenz 6:** STA Calcium chlorid (0,025 mol/l)
(Bestell-Nr. 03138089) oder eigene Herstellung (siehe unten).

Natriumcitratlösung (0,11 mol/l)
Aqua dest.

Gerätetyp: Thrombolyzer der Fa. Organon Teknika GmbH, Eppelheim

Herstellung/Vorbereitung der Reagenzien:

- Reagenz 1 – 4:** Mit 1 ml Aqua dest. anlösen, vor Testdurchführung 45 min. bei RT lagern
- Reagenz 5:** Gebrauchsfertig
- Reagenz 6:** 0,386g CaCl₂ einwiegen und mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen.
(bei eigener Herstellung, ansonsten gebrauchsfertig)

Vorbereitung der Probe: 45 min. bei RT auftauen. Mindestvolumen 200 µl.

Testdurchführung:

In der Untersuchung wurde eine vollautomatisierte funktionelle Protein-S-Messung durchgeführt. Diese wird nach unten stehendem (Tabelle 3) Pipettierschema auf dem Thrombolyzer der Fa. Organon Teknika durchgeführt.

Zunächst wird eine 1:13,5fache Verdünnung des Untersuchungsmaterials mit STA Diluent Buffer hergestellt. 40 µl des verdünnten Plasmas werden in eine für die koagulometrische Messung vorgesehene Küvette pipettiert, in welche nachfolgend 50 µl immunabsorbiertes Mangelplasma, sowie 50 µl boviner Faktor Va zugegeben werden. Nach Zugabe von 100 µl bereits aktiviertem Protein C wird die Gerinnungskaskade durch die Zugabe von 50 µl Calciumchloridlösung gestartet.

Reagenz	Aufnahme des Gerätes (µl)	Abgabe des Gerätes (µl)
Puffer	50	0
Plasma	4	40
Mangelplasma	50	40
Faktor Va	50	40
APC-Reagenz	100	80
Calciumchlorid	50	40

Tab. 3: Pipettierschema (gerätespezifische Dokumentation) für die funktionelle Protein-S-Bestimmung mit dem Testkit der Fa. Roche (STA Protein S clotting) adaptiert auf den Thrombolyzer der Fa. Organon

Der Zeitpunkt der Gerinnungsbildung wird mechanisch über ein Kugelkoagulometer gemessen. Die gemessene Gerinnungszeit ist der Protein-S-Konzentration direkt proportional.

2.2.5 Leistungsmerkmale des STA Protein S clotting der Fa. Roche

Der Hersteller gibt einen Intraassay-Variationskoeffizienten von 2,7–3,4% an. Der Interassay-Variationskoeffizient wird angegeben mit 2,0–3,7%.

In unserem Labor wurden der Inter- und Intratest-Variationskoeffizient berechnet. Der Variationskoeffizient (CV) berechnet sich aus dem Quotienten Standardabweichung/Mittelwert x 100. Der Interassay-Variationskoeffizient betrug für den STA Protein S clotting der Fa. Roche Diagnostics 7,4–8,3%. Der Intraassay-Variationskoeffizient lag bei 5,6%.

Eine Übersicht über den Gehalt an Einzelfaktoren im Mangelplasma gibt Tabelle 4.

Faktoren	Aktivität (%)
F II	104
F V	98
F VII	199
F VIII	87
F X	166
Protein S	nicht nachweisbar

Tab. 4: Einzelfaktorengehalt des Protein-S-Mangelplasmas des STA Protein S clotting der Fa. Roche

2.2.6 Bestimmung des funktionellen Protein S (Protein S Ac, Fa. Dade Behring)

Testprinzip:

Aktiviertes Protein C (APC) spaltet proteolytisch Faktor Va, der bei Aktivierung der Gerinnungskaskade entsteht. Protein S wirkt dabei als Kofaktor des APC, der die Reaktion beschleunigt. Dadurch kommt es zu einer mit der Aktivität an Protein S in der Probe proportional verlängerten Gerinnungszeit. Der Zusatz von Protein-S-Mangelplasma versorgt den Ansatz mit Fibrinogen, Faktor V und anderen benötigten Gerinnungsfaktoren.

Die Gerinnung wird auf der Stufe des Faktors X durch den Faktor-X-Aktivator Russel Viper Venome (RVV) initiiert. Faktor Xa bildet mit Faktor Va als akzelerierenden Faktor Thrombin aus Prothrombin, Thrombin setzt schließlich Fibrinogen in Fibrin um. Die Gerinnungsbildung wird optisch erfasst.

Reagenzien und Geräte:

Ein Protein-S-Ac-Testkit der Fa. Dade Behring, Marburg enthält:

Protein S Ac Mangelplasma: Lyophilisiertes, humanes Citrat-Plasma mit nicht messbarer Restaktivität an Protein S. Das Plasma ist ebenfalls frei von C4BP.

Protein S Ac APC Reagenz: Lyophilisiertes, gereinigtes und **aktiviertes**, humanes Protein C mit Zusatz von **Calciumchlorid**

Protein S Ac Startreagenz: Lyophilisierter Aktivator aus dem Gift der Russel Viper (Vipera russelli)

Konservierungsmittel: Natriumazid (0,5 g/l)

Zusätzlich benötigte Materialien:

Standard-Human-Plasma, Bestell-Code ORKL

Kontroll-Plasma N, Bestell-Code ORKE

Kontroll-Plasma P, Bestell-Code OUPZ

Gerätetyp: BCS der Fa. Dade Behring, Marburg, SN 160 177

Herstellung/Vorbereitung der Reagenzien:

Protein S Ac Mangelplasma: Mit 1 ml Aqua dest. anlösen, vor Testdurchführung 60 min. bei RT inkubieren.

Protein S Ac APC Reagenz: Mit 1 ml Aqua dest. anlösen, vor Testdurchführung 60 min. bei RT inkubieren.

Protein S Ac Startreagenz: Mit 1 ml Aqua dest. anlösen, vor Testdurchführung 60 min. bei 37°C im Wasserbad inkubieren

Vorbereitung der Probe: 45 min. bei RT auftauen. Mindestvolumen 200 µl.

Testdurchführung:

In der Untersuchung wird eine vollautomatisierte funktionelle Protein-S-Messung durchgeführt. Diese wird nach unten stehendem (Tabelle 5) Pipettierschema auf dem BCS der Fa. Dade Behring durchgeführt.

Pipettiermedium/Ziel	Reagenz	Volumen (µl)
Luftaufnahme		20
Reagenzaufnahme	PS-Mangelplasma	26
Reagenzaufnahme	PS-Mangelplasma	30
Probenaufnahme	Patientenplasma	3
Abgabe Küvette		56
Luftaufnahme		20
Reagenzaufnahme	APC-Reagenz	78
Abgabe Küvette		75
Luftaufnahme		20
Reagenzaufnahme	Startreagenz	190
Abgabe Küvette		188

Tab. 5: Pipettierschema (gerätespezifische Dokumentation) für die funktionelle Protein-S-Bestimmung mit dem Test-Kit der Fa. Dade Behring (Protein S Ac) adaptiert auf den BCS der Fa. Dade Behring.

Zunächst wird eine 1:18,6fache Mischung des **unverdünnten** Untersuchungsmaterials mit Protein S Ac Mangelplasma hergestellt. 56 µl des gemischten Plasmas werden in

eine Küvette pipettiert, in welche nachfolgend 75 µl APC-Reagenz und 188µl Startreagenz hinzugegeben werden.

Nach Zugabe des Startreagenz (RVV) wird die Gerinnungskaskade aktiviert. Der Zeitpunkt der Gerinnungsbildung wird optisch über Extinktionsmessung bei 405 nm gemessen. Die gemessene Gerinnungszeit ist der Protein-S-Konzentration direkt proportional.

2.2.7 Leistungsmerkmale des Protein S Ac der Fa. Dade Behring

Der Hersteller gibt einen Intraassay-Variationskoeffizienten von 3,6-5,1% an. Der Interassay-Variationskoeffizient wird mit 2,0–4,1% angegeben. Die Gesamtpräzision befindet sich nach Herstellerangaben zwischen 2,0–4,1%.

Der bei unserer Untersuchung ermittelte Intraassay-Variationskoeffizient betrug für den Protein S Ac der Fa. Behring 5,0%. Der Interassay-Variationskoeffizient lag bei 4,0-4,7%.

Eine Übersicht über den Gehalt an Einzelfaktoren im Mangelplasma gibt Tabelle 6.

Faktoren	Aktivität (%)
F II	81
F V	78
F VII	107
F VIII	52
F X	94
Protein S	nicht nachweisbar

Tab. 6: Einzelfaktorengehalt des Protein-S-Mangelplasmas des Protein-S-Ac-Tests der Fa. Dade Behring

2.2.8 Die Bestimmung der Faktor-VIII-Aktivität (koagulometrischer Einphasen-Test der Fa. Dade Behring)

Testprinzip:

Der Mangel an Faktor VIII führt zu einer verlängerten aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT). Die Bestimmung des Faktor VIII als Faktor des intrinsic systems erfolgt mit einer Einphasenmethode und der Bestimmung der Gerinnungszeit im (a)PTT-System. Patientenplasma wird mit Faktor-VIII-Mangelplasma gemischt, dadurch hängt die gemessene Gerinnungszeit nur von der Faktor-VIII-Aktivität im Patientenplasma ab. Die Aktivität des Faktor VIII in % der Norm wird über eine Bezugskurve ermittelt, die mit Verdünnungen von Standard-Humanplasma oder einem Normalplasma erstellt wird. Für die Bestimmung werden mindestens 300 µl citratantikoaguliertes Plasma benötigt.

Reagenzien und Geräte:

- Reagenz 1:** Faktor-VIII-Mangelplasma (human, durch Immunabsorption von Faktor VIII gereinigt), Fa. Dade Behring, Bestell-Code OTXW 17
- Reagenz 2:** Actin FS (aPTT-Reagenz)
Fa. Dade Behring, Bestell-Code B4218-100
- Reagenz 3:** Calciumchlorid-Lösung (eigene Herstellung)
0,386g CaCl₂ einwiegen und mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen.
- Reagenz 4:** Dade[®] Owrens Veronal Buffer (Puffer), Bestell-Code B4234

Weitere, zur internen Qualitätskontrolle benötigte Reagenzien:

Kontrollplasma N, Bestell-Code ORKE

Kontrollplasma P, Bestell-Code OUPZ

Standard-Humanplasma, Bestell-Code ORKL

Gerätetyp: Amax C190 der Fa. Sigma/Amelung

Herstellung/Vorbereitung der Reagenzien:

Reagenz 1: Faktor-VIII-Mangelplasma mit 1 ml Aqua dest. verdünnen, bei RT 15 min lagern und agitieren.

Alle übrigen Reagenzien sind gebrauchsfertig und sollten 15 min. vor Testbeginn bei RT lagern.

Testdurchführung:

40 µl Veronal-Puffer

10 µl Patientenplasma (zu untersuchendes Material)

50 µl mit Aqua dest. verdünntes Mangelplasma

50 µl Actin FS

werden in eine für eine koagulometrische Messung vorgesehene Küvette pipettiert und 3 min. bei 37°C inkubiert.

Durch Zugabe von 50 µl Calciumchloridlösung wird der Gerinnungsprozess gestartet. Der Zeitpunkt der Gerinnungsbildung wird koagulometrisch bestimmt und die Zeitdauer ist der Faktor-VIII-Aktivität umgekehrt proportional.

Eine Übersicht über den Gehalt an Einzelfaktoren im Mangelplasma gibt Tabelle 7.

Faktoren	Aktivität (%)
F II	86
F V	81
F VII	71
F VIII	nicht nachweisbar
F X	79

Tab. 7: Einzelfaktorengehalt des Faktor-VIII-Mangelplasmas der Fa. Dade Behring

2.2.9 Prinzip der Detektion der FVL-Mutation mittels doppeltfluoreszenzmarkierter Hydrolysesonden (Taqman-Sonden)

Zum Nachweis der FVL-Mutation wird eine allelspezifische TaqMan-PCR durchgeführt. Die PCR wird nach der Methode von Happich et al. 1999 durchgeführt. Hierbei wird isolierte genomische DNA eingesetzt. Neben zwei Primern werden zwei fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt. Während eine der Sonden die Wildtyp-Sequenz besitzt, trägt die andere die Mutationssequenz. An den 5'-Enden der Sonden sind verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. An den 3'-Enden befindet sich ein sogenannter Quencher, der trotz Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes eine Emission verhindert. Nach Anlagerung der Sonden an die komplementäre Zielsequenz wird diese durch die Polymerase hydrolysiert, was zur räumlichen Trennung des Fluoreszenzfarbstoffes von dem Quencher führt. Hierdurch steigt die Emission des Farbstoffes nach Anregung mit jedem Zyklus an. Lagert sich z.B. die Wildtypsonde an die die Mutationssequenz an, so wird diese Sonde nicht hydrolysiert, sondern aufgrund der Fehlpaarung vom Template abgestoßen. Hierbei kommt es nicht zu einer Trennung von Farbstoff und Quencher, so dass kein Fluoreszenzsignal entstehen kann.

2.2.10 Bestimmung der APC-Ratio

Testprinzip:

Das zu untersuchende Plasma wird mit Faktor-V-Mangelplasma verdünnt und mit aPTT-Reagenz inkubiert. Die Zeitdauer bis zur Fibrinbildung wird nach Zugabe von Calciumchlorid mit und ohne Zugabe von APC gemessen. Nach Ermittlung beider Messwerte wird der Quotient aus aPTT mit APC-Zugabe und aPTT ohne APC-Zugabe gebildet. Der Normbereich befindet sich zwischen 3,0–4,3.

Die Methode wird analog nach Tripodi et al. 1998 durchgeführt.

Reagenzien und Geräte:

Reagenz 1: Faktor-V-Mangelplasma (eigene Herstellung, gebrauchsfertig)

- Reagenz 2:** Actin FS (aPTT-Reagenz)
Fa. Dade Behring, Bestell-Nr. B4218-100
- Reagenz 3:** Calciumchlorid-Lösung (eigene Herstellung)
0,386g CaCl₂ einwiegen und mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen.
- Reagenz 4:** APC/Calciumchlorid-Lösung
(eigene Herstellung, gebrauchsfertig)

Gerätetyp: Thrombolyzer der Fa. Organon Teknika GmbH, Eppelheim

Herstellung/Vorbereitung der Reagenzien:

Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig und sollen 15 min. vor Testdurchführung bei RT gelagert werden.

Testdurchführung:

Es werden je zwei Ansätze mit

15 µl Patientenplasma (zu untersuchendes Material)

60 µl Faktor-V-Mangelplasma

75 µl Actin FS (aPTT-Reagenz)

in eine für eine koagulometrische Messung vorgesehene Küvette pipettiert und 3 min. bei 37°C inkubiert. Die Gerinnung wird im ersten Test durch Zugabe von 75 µl Calciumchloridlösung aktiviert, im zweiten Test durch 75 µl APC/Calciumchlorid-Lösung.

Reagenz	Test 1	Test 2
Patientenplasma	15 µl	15 µl
Faktor-V-MP	60 µl	60 µl
Actin FS	75 µl	75 µl
Inkubationszeit	3 Min. 37°C	3 Min. 37°C
CaCl ₂	75 µl	-
APC/ CaCl ₂	-	75 µl

Tab 8: Pipettierschema des Thrombolyzers der Fa. Organon zur Bestimmung der APC-Ratio. **APC-Ratio = Test 2/Test 1**, MP=Mangelplasma

Die Pipettierschritte mit definierten Volumina werden vom Thrombolyzer automatisch durchgeführt entsprechend einer vorgegebenen Programmierung. Diese wird für unseren Versuch in der Tabelle 8 wiedergegeben.

2.2.11 Mögliche Fehlerquellen/Interferenzen der Testsysteme (Herstellerangaben)

Protein S gesamt/frei/funktionell: Unter oraler Kontrazeption, Leberinsuffizienz, Schwangerschaft, L-Asparaginasetherapie, Diabetes und entzündlichen Reaktionen können erniedrigte Protein-S-Parameter auftreten. Erhöhte Protein-S-Parameter werden beim Nephrotischen Syndrom und bei der Verbrauchskoagulopathie beschrieben sowie bei der Therapie mit Thrombininhibitoren (z.B. Hirudin oder Argatroban).

Funktionelle Protein-S-Bestimmung: Der Protein-S-clotting-Test der Fa. Roche Diagnostics und der Protein-S-Ac-Test der Fa. Dade Behring werden laut Herstellerangaben nicht von erhöhten F-VIII-Aktivitäten beeinflusst. Theoretisch wäre eine Beeinflussung durch ein prokoagulatorisch gesteigertes Gerinnungspotential, das z.B. im Rahmen einer Akut-Phase-Reaktion auftritt, denkbar. Die Fa. Roche gibt keine Interferenzen bis zu einer F-VIII-Aktivität von 250% (Dade Behring bis 400%) an. Heparindosen bis 1,0 IU/ml (bei Dade Behring laut Herstellerangaben 3,0 IU/ml) im Vollblut erzeugen ebenfalls keine Interferenzen. Somit ist eine Beeinflussung des Ergebnisses bei Patienten, die eine Antikoagulation mit niedermolekularem Heparin durchführen, unwahrscheinlich. Lupus-Antikoagulanzen und Anti-Phospholipid-Antikörper können Protein-S-Werte artifiziell verändern.

Faktor-VIII-Aktivitätsbestimmung: Lupus-Antikoagulanzen und Anti-Phospholipid-Antikörper können die Faktor-VIII-Aktivität artifiziell verändern.

2.2.12. Statistische Methoden

Die meisten Analysen wurden mit dem Programm SPSS für Windows® (Version 12.01 deutsch) durchgeführt. Zunächst wurden die Ergebnisse auf Normalverteilung geprüft. Für den Vergleich quantitativer Werte (Protein-S-Parameter) zwischen den durch den FVL Genotyp definierten Gruppen wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Die anschließenden paarweise durchgeführten Gruppenvergleiche wurden mit einem t-Test

für unabhängige Stichproben durchgeführt. In Anlehnung an das entsprechende konfirmatorische Testverfahren für einen Dreigruppenvergleich wurden die p-Werte der t-Tests in Abhängigkeit von dem Ergebnis der jeweiligen Varianzanalyse korrigiert. Die Verteilung der einzelnen Werte in den Gruppen gab keinen Hinweis auf Varianzinhomogenitäten zwischen den Gruppen oder wesentliche Abweichungen von der Normalverteilung der Werte innerhalb der Gruppen.

Variable: STA Protein S clotting, Fa. Roche

	SSQ	Freiheitsgrade	MSQ	F-Verteilung	p-Wert
Genotyp	20937,9565	2	10198,9783	15,02	0,0001
Fehler	91669,8696	135	679,0361		
Total	112067,8261	137			

Variable: Protein S Ac, Fa. Behring

	SSQ	Freiheitsgrade	MSQ	F-Verteilung	p-Wert
Genotyp	33314,62319	2	16657,31159	37,18	0,0001
Fehler	60474,91304	135	447,96232		
Total	93789,53623	137			

Variable: Freies Protein-S-Antigen (Asserachrom, Fa. Roche)

	SSQ	Freiheitsgrade	MSQ	F-Verteilung	p-Wert
Genotyp	680,05797	2	340,02899	1,09	0,3400
Fehler	42209,56522	135	312,66345		
Total	42889,62319	137			

Variable: Gesamtes Protein-S-Antigen (Asserachrom, Fa. Roche)

	SSQ	Freiheitsgrade	MSQ	F-Verteilung	p-Wert
Genotyp	345,84058	2	172,92029	0,41	0,6665
Fehler	57374,73913	135	424,99807		
Total	57720,57971	137			

Tab. 9: Ergebnisse der Varianzanalyse von Genotypen und untersuchten Protein-S-Parametern

SSQ (sum of squares) = Abweichungsquadrate

MSQ (mean of squares) = mittlere Abweichungsquadrate

Bei allen analytischen Verfahren wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgesetzt. Grafisch wurden die Ergebnisse überwiegend mit Boxplot-Wiskers-Diagrammen dargestellt. Dabei entspricht die untere Begrenzungslinie dem unteren Quartil und die obere dem oberen Quartil. Die Trennlinie stellt den Median dar. Die von der unteren Quartillinie nach unten, bzw. von der oberen Linie nach oben gezogenen Linien (Wiskers) erstrecken sich zu den Extrempunkten Minimum und Maximum, sofern die die Extremwerte den zweifachen Quartilabstand nicht überschreiten. Über diese Abstände hinausgehende Ausreißer sind als Einzelmesspunkte dargestellt.

Die Korrelationen und kumulative Häufigkeiten wurden teilweise zusätzlich mit dem Programm Microsoft Office Excel 2003 (deutsche Version) berechnet und grafisch gestaltet. In Streudiagrammen wurden Wertepaare zweier statistischer Merkmale grafisch mittels einer Punktwolke dargestellt.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse für Patienten mit und ohne orale Antikoagulanzen-Therapie (OAT) gesondert dargestellt. Zunächst werden die Ergebnisse für diejenigen Protein-S-Parameter vorgestellt, die quantitativ mittels ELISA ermittelt wurden. Hierbei handelt es sich um gesamtes und freies Protein S. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse der funktionellen Testmethoden betrachtet. Zur Gegenüberstellung und besseren Vergleichbarkeit werden die beiden untersuchten funktionellen Tests in einem Kapitel dargestellt, wobei die getrennte Darstellung von antikoagulierten und nicht-antikoagulierten Patienten beibehalten wird. Nach Untersuchungen zur Korrelation von Protein-S-Parametern folgen Ergebnisse zu Untersuchungen zum Themenkomplex Beeinflussung der Protein S-Bestimmung durch die Lagerungsdauer der Plasmaproben.

3.1 Demografische Kennwerte des Patientenkollektivs und der Kontrollen

Da alle Patienten einem alters- und geschlechtsbezogenem Matching unterzogen wurden, soll die folgende tabellarische Darstellung (Tab. 10) einen Überblick über wesentliche Charakteristika des untersuchten Kollektivs geben. Die Untergruppeneinteilung erfolgte nach FV-G1691A-Genotyp (homozygot, heterozygot, Wildtyp) und umfasste pro Gruppe n=46 Patienten. Das Alter der Patienten und der Plasmaproben sowie der Quick-Wert wurde in Mittelwert±Standardabweichung angegeben. Die übrigen Parameter in [%] oder Fallzahl n.

Weitere patientenbezogene Merkmale werden in Kapitel 2 aufgeführt.

	Kontrollgruppe Wildtyp n = 46	Heterozygote FVL n = 46	Homozygote FVL n = 46
Alter [Jahre]	42,1 ± 14,2	41 ± 13,9	42,5 ± 13,6
Geschlecht [n]			
m	16	15	18
w	30	31	28
Pat. ohne OAT [n]	33	33	33
Pat. mit OAT [n]	13	13	13
Pat. mit thrombo- embolischen Komplikationen [%]	28,3	39,1	61,9
Quick-Wert ohne OAT [%]	91,7 ± 8,2	87,8 ± 9,0	87,2 ± 8,9
Quick-Wert mit OAT [%]	27,2 ± 8,8	27,5 ± 5,8	24,3 ± 7,4
Lagerungsdauer Plasmaprobe [Monate]	18,9 ± 9,1	22,5 ± 15,4	48,8 ± 23,7

Tab. 10: Demografische Daten und klinische Charakteristika des Patientenkollektivs

3.2 Gesamtes Protein-S-Antigen (ELISA)

3.2.1 Patienten ohne orale Antikoagulation

Zunächst werden die Ergebnisse der Bestimmung des gesamten (Kapitel 3.2.1.) und freien Protein S (Kapitel 3.3.1.) vorgestellt, da mit dieser Untersuchung festgestellt werden soll, ob bereits bei dieser Messmethode mit nachgewiesener hoher Messpräzision ein signifikanter Unterschied zwischen den Untergruppen bzw. ein klinisch relevanter Protein-S-Mangel vorliegt.

Da das gesamte Protein S, wie in Kapitel 1.7 beschrieben, durch die Einnahme von Vitamin-K-Antagonisten erniedrigt wird, wurden auch die Berechnungen an Patienten ohne und mit Antikoagulation getrennt durchgeführt.

Zur Vereinfachung der Darstellung des Ergebnisteiles werden im Folgenden die Messweltergebnisse in Untergruppen dargestellt. Gemeint ist hiermit die Aufteilung in Gruppen nach Genotyp (FV-1691AA = Wildtyp-/Kontrollgruppe, FV-1691GA = Patienten mit heterozygotem FVL und FV-1691GG = Patienten mit homozygotem FVL).

In der Untergruppenanalyse (Tab.11, Abb.7) fand sich bei nicht oral antikoagulierten Patienten in der Wildtypgruppe (n=33) ein gesamtes Protein S von 79,6%±13,6%, bei den Patienten mit heterozygoter FVL-Mutation (n=33) 78,7%±14,5% und mit homozygoter FVL-Mutation (n=33) 77,6%±16,8%.

Gesamtes Protein-S-Antigen (ELISA Asserachrom [®] , Fa. Roche)					
	N	Mittelwert [%]	Stabw. [%]	Minimum [%]	Maximum [%]
Wildtyp	33	79,6	13,6	57,0	111,0
FVL heterozygot	33	78,7	14,5	52,0	124,0
FVL homozygot	33	77,6	16,8	55,0	116,0

Tab.11: Statistische Kennwerte für das gesamte Protein S (ELISA Asserachrom[®] Fa. Roche) bei Patienten und Kontrollen ohne orale Antikoagulation in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp.

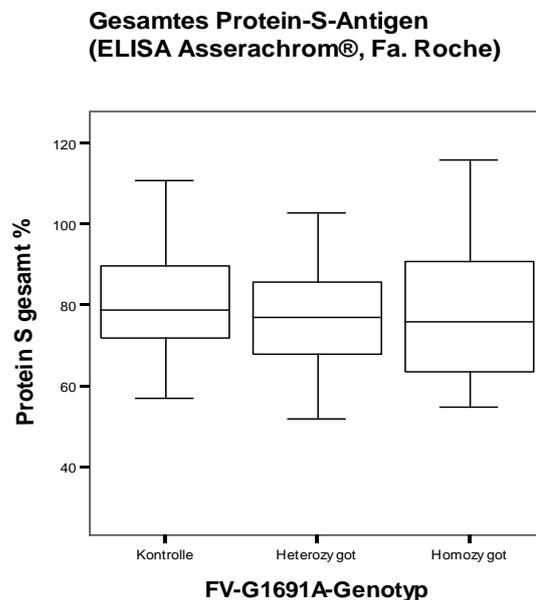


Abb. 7: Boxplot-Darstellung der Messweltergebnisse des gesamten Protein S (ELISA Asserachrom[®] Fa. Roche) in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp für Patienten ohne orale Antikoagulation. In jeder Gruppe wurden n=33 Patienten untersucht.

Linie innerhalb der Box=Median, Ober-/Untergrenze der Box=oberes/unteres Quartil
T-Balken=Minimum/Maximum

Zur Überprüfung der Hypothese, ob ein signifikanter Unterschied der Protein-S-Parameter in Abhängigkeit vom Faktor-V-Genotyp besteht, wurde ein T-Test für unabhängige Stichproben zwischen den Untergruppen durchgeführt.

Die ermittelten p-Werte konnten zeigen, dass das gesamte Protein-S-Antigen durch die Faktor-V-Leiden-Mutation nicht signifikant beeinflusst wird.

3.2.2 Patienten mit oraler Antikoagulation

Gesamtes Protein-S-Antigen (ELISA Asserachrom[®], Fa. Roche)					
	N	Mittelwert [%]	Stabw. [%]	Minimum [%]	Maximum [%]
Wildtyp	13	49,7	17,8	27,0	93,0
FVL heterozygot	13	44,3	4,9	38,0	54,0
FVL homozygot	13	43,6	9,7	28,0	60,0

Tab. 12: Statistische Kennwerte für das gesamte Protein S (ELISA Asserachrom[®] Fa. Roche) bei Patienten und Kontrollen mit oraler Antikoagulation in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp

In der Untergruppenanalyse (Tab. 12, Abb. 8) fand sich bei den Patienten in der Kontrollgruppe/Wildtypgruppe (n=13) mit oraler Antikoagulation (n=13) ein gesamtes Protein S von (n=13) 49,7%±17,8%, in der Gruppe der Patienten mit heterozygoter FVL-Mutation (n=13) 44,3%±4,9% und in der Gruppe der Patienten mit homozygoter FVL-Mutation (n=13) 43,6%±9,7%.

**Gesamtes Protein-S-Antigen
(ELISA Asserachrom®, Fa. Roche)**

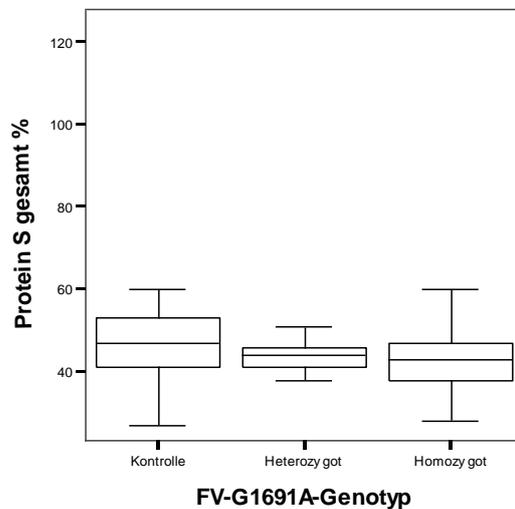


Abb. 8: Boxplot-Darstellung der Messweltergebnisse des gesamten Protein S (ELISA Asserachrom® der Fa. Roche) in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp für Patienten mit oraler Antikoagulation. In jeder Gruppe wurden n=13 Patienten untersucht. Linie innerhalb der Box=Median, Ober-/Untergrenze der Box=oberes/unteres Quartil T-Balken=Minimum/Maximum

Der T-Test für die Gruppe der antikoagulierten Patienten erreichte bezüglich der Subgruppenvergleiche nicht das Signifikanzniveau.

Daher wird auch bei Patienten mit oraler Antikoagulation keine signifikante Beeinflussung des gesamten Protein-S-Antigens durch die Faktor-V-Leiden-Mutation festgestellt.

3.3 Freies Protein S (ELISA)

3.3.1 Patienten ohne orale Antikoagulation

In der Untergruppenanalyse fand sich, wie in Tabelle 13 und Abbildung 9 dargestellt, bei nicht antikoagulierten Patienten der Kontrollgruppe/Wildtypgruppe ein freies Protein S von $71,0\% \pm 11,9\%$, bei den Patienten mit heterozygoter FVL-Mutation $70,0\% \pm 10,5\%$ und bei Patienten mit homozygoter FVL-Mutation $66,7\% \pm 11,8\%$.

Freies Protein-S-Antigen (ELISA Asserachrom®, Fa. Roche)					
	N	Mittelwert [%]	Stabw. [%]	Minimum [%]	Maximum [%]
Wildtyp	33	71,0	11,9	38,0	95,0
FVL heterozygot	33	70,0	10,5	53,0	91,0
FVL homozygot	33	66,7	11,8	48,0	88,0

Tab.13: Statistische Kennwerte für das freie Protein S (ELISA Asserachrom®, Fa. Roche) bei Patienten und Kontrollen ohne orale Antikoagulation in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp

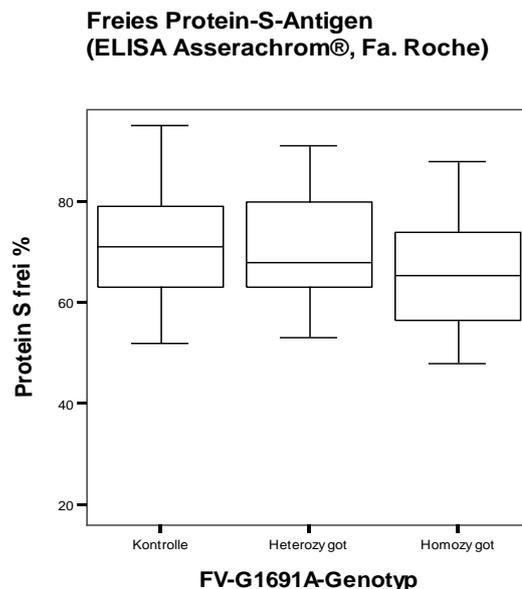


Abb. 9: Boxplot-Darstellung der Messweltergebnisse des freien Protein S (ELISA Asserachrom® der Fa. Roche) in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp für Patienten ohne orale Antikoagulation. In jeder Gruppe wurden n=33 Patienten untersucht. Linie innerhalb der Box=Median, Ober-/Untergrenze der Box=oberes/unteres Quartil T-Balken=Minimum/Maximum

Es wurde ein T-Test für unabhängige Stichproben zwischen den einzelnen Gruppen durchgeführt. Auch hier besteht kein signifikanter Unterschied der Mittelwertvergleiche des freien Protein-S-Antigen in den Untergruppen.

3.3.2 Patienten mit oraler Antikoagulation

In der Gruppe der antikoagulierten Patienten fand sich in der Kontrollgruppe/Wildtypgruppe ein freies Protein S mit $43,0\% \pm 14,8\%$, bei den Patienten mit heterozygoter FVL-Mutation $36,5\% \pm 4,5\%$ und bei Patienten mit homozygoter FVL-Mutation $37,0\% \pm 6,9\%$. Die statistischen Kennwerte werden in Tabelle 14 und Abbildung 10 dargestellt.

Freies Protein-S-Antigen (ELISA Asserachrom®, Fa. Roche)					
	N	Mittelwert [%]	Stabw. [%]	Minimum [%]	Maximum [%]
Wildtyp	13	43,0	14,8	19,0	71,0
FVL heterozygot	13	36,5	4,5	31,0	47,0
FVL homozygot	13	37,0	6,9	26,0	47,0

Tab.14: Statistische Kennwerte für das freie Protein-S-Antigen (ELISA Asserachrom® Fa. Roche) bei Patienten und Kontrollen mit oraler Antikoagulation in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp

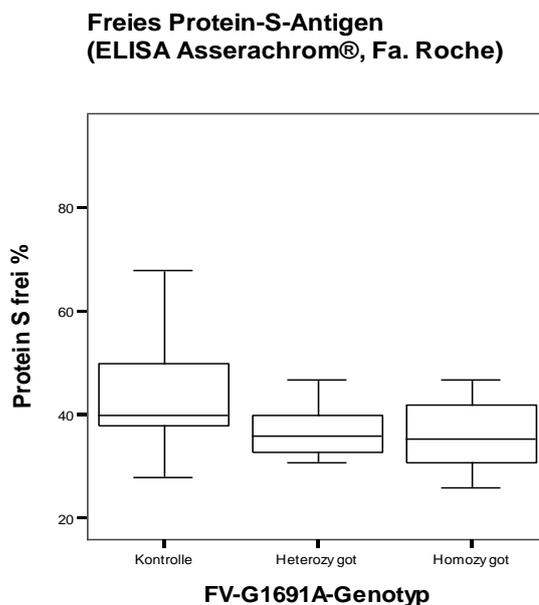


Abb. 10: Boxplot-Darstellung der Messwtergebnisse des freien Protein S (ELISA Asserachrom® der Fa. Roche) in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp für Patienten mit oraler Antikoagulation. In jeder Gruppe wurden n=13 Patienten untersucht.

Linie innerhalb der Box=Median, Ober-/Untergrenze der Box=oberes/unteres Quartil
T-Balken=Minimum/Maximum

Der T-Test für die Gruppe der antikoagulierten Patienten erreichte im Subgruppenvergleich zu keiner Zeit das Signifikanzniveau.

3.4 Funktionelle Protein S Aktivität mit zwei koagulometrischen Tests unterschiedlicher Hersteller

3.4.1 Patienten ohne orale Antikoagulation

Die Messergebnisse werden in einer direkten Gegenüberstellung beider Testsysteme (STA Protein S clotting der Fa. Roche und Protein S Ac der Fa. Dade Behring) dargestellt.

	Test	Wildtyp	FVL heterozygot	FVL homozygot
Mittelwert [%]	PSCL	92,2	72,4	60,2
	PSAC	86,7	60,0	42,9
Standard- Abweichung [%]	PSCL	19,7	15,6	17,6
	PSAC	20	9,5	10,2
Minimum Maximum [%]	PSCL	44 -132	43 – 110	32 – 96
	PSAC	33 - 130	38 - 77	26 - 74

Tab.15: Statistische Kennwerte für das funktionelle Protein S bei Patienten und Kontrollen ohne orale Antikoagulation in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp

PSCL=Messwerte für den STA Protein S clotting der Fa. Roche

PSAC=Messwerte für den Protein S Ac der Fa. Dade Behring

Wie aus Tabelle 15 und Abbildung 11 ersichtlich wird, fand sich bei der Bestimmung des funktionellen Protein S mit dem Test der Fa. Roche in der Kontrollgruppe (n=33) ein funktionelles PS von 92,2%, bei den Patienten mit heterozygotem FVL (n=33) von 72,4% und bei Patienten mit homozygoter FVL-Mutation (n=33) 60,2%. Bei der Bestimmung des funktionellen Protein S mit dem Test der Fa. Dade Behring fand sich in der Kontrollgruppe (n=33) ein funktionelles Protein S von 86,7%, bei den Patienten mit heterozygotem FVL (n=33) 60,0% und in der Gruppe der Patienten mit homozygotem FVL (n=33) von 42,9%.

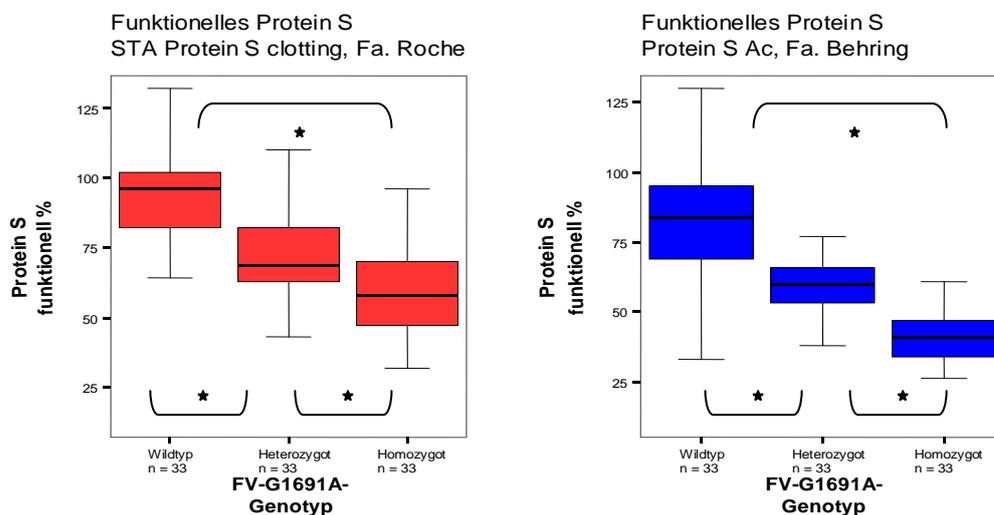


Abb. 11: Boxplot-Darstellung der Messwterergebnisse des funktionellen Protein S in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp für Patienten ohne orale Antikoagulation. In jeder Gruppe wurden n=33 Patienten untersucht.

Links die Darstellung für den STA Protein S clotting der Fa. Roche, rechts für den Protein S Ac der Fa. Behring.

Signifikante Gruppenunterschiede wurden mit Klammer und Stern markiert.

Linie innerhalb der Box=Median, Ober-/Untergrenze der Box=oberes/unteres Quartil

T-Balken=Minimum/Maximum

Im T-Test für unabhängige Stichproben konnten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Genotyp-Gruppen festgestellt werden.

Dieses Ergebnis zeigt bei beiden funktionellen Protein-S-Tests eine signifikante Beeinflussung der Protein-S-Aktivität durch die Faktor-V-Leiden-Mutation.

3.4.2 Patienten mit oraler Antikoagulation

Im Folgenden werden die unter 3.4.1 beschriebenen Berechnungen bei Patienten mit oralen Antikoagulanzen durchgeführt.

In der Untergruppenuntersuchung (siehe Tab. 16 Abb. 12) fand sich bei der Messung des funktionellen Protein S mittels Protein S clotting der Fa. Roche Diagnostics in der Kontrollgruppe (n=13) ein funktionelles Protein S von $41,0\% \pm 14,5\%$, bei den Patienten mit heterozygotem FVL (n=13) von $27,0\% \pm 5,0\%$ und in der Gruppe der Patienten mit homozygotem FVL (n=13) $20,9\% \pm 5,6\%$.

	Test	Wildtyp	FVL heterozygot	FVL homozygot
Mittelwert [%]	PSCL	41,0	27,0	20,9
	PSAC	38,8	25,5	18,5
Standard- Abweichung [%]	PSCL	14,5	5,0	5,6
	PSAC	16,0	4,4	5,4
Minimum Maximum [%]	PSCL	12 – 66	19 – 37	14 – 34
	PSAC	10 - 79	22 – 38	10 - 27

Tab.16: Statistische Kennwerte für das funktionelle Protein S bei Patienten und Kontrollen mit oraler Antikoagulation in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp

PSCL=Messwerte für den STA Protein S clotting der Fa. Roche

PSAC=Messwerte für den Protein S Ac der Fa. Dade Behring

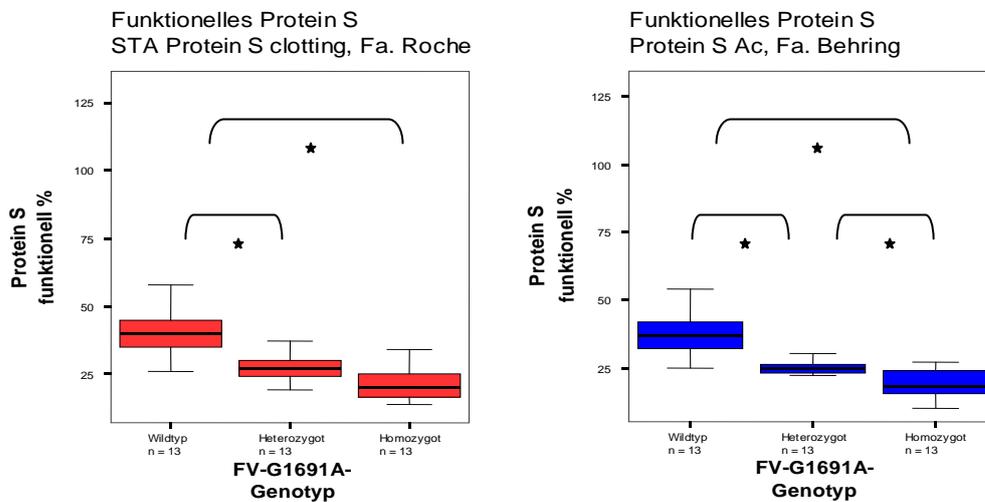


Abb. 12: Boxplot-Darstellung der Messwterergebnisse des funktionellen Protein S in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp für Patienten mit oraler Antikoagulation. In jeder Gruppe wurden n=13 Patienten untersucht. Links die Darstellung für den STA Protein S clotting der Fa. Roche, rechts für den Protein S Ac der Fa. Behring.

Signifikante Gruppenunterschiede wurden mit Klammer und Stern markiert.

Linie innerhalb der Box=Median, Ober-/Untergrenze der Box=oberes/unteres Quartil

T-Balken=Minimum/Maximum

Im T-Test für unabhängige Stichproben zwischen den einzelnen Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

Lediglich zwischen der heterozygoten und der homozygoten Subgruppe konnte beim Test der Fa. Roche nicht das Signifikanzniveau erzielt werden.

In der folgenden Tabelle 17 sind alle Protein-S-Parameter in Abhängigkeit vom F-VG1691A-Genotyp und in Abhängigkeit des Antikoagulationsstatus abgebildet.

Protein S	Gesamt	Frei	Fkt. (Roche)	Fkt. (Behring)
Wildtyp gesamt n = 46	71,1 ± 20,0	63,1 ± 17,9	77,7 ± 29,6	73,2 ± 28,9
Wildtyp ohne OAT n = 33	79,6 ± 13,6	71,0 ± 11,9	92,2 ± 19,7	86,7 ± 20,1
Wildtyp mit OAT n = 13	49,7 ± 17,8	43,0 ± 14,8	41,0 ± 14,5	38,8 ± 16,0
FVL heterozygot gesamt n = 46	69,0 ± 20,0	60,5 ± 17,8	59,6 ± 24,6	49,5 ± 17,4
FVL heterozygot ohne OAT n = 33	78,7 ± 14,5	70,0 ± 10,5	72,4 ± 15,6	59,0 ± 9,5
FVL heterozygot mit OAT n = 13	44,3 ± 4,9	36,5 ± 4,5	27,0 ± 5,0	25,5 ± 4,4
FVL homozygot gesamt n = 46	67,2 ± 21,7	57,7 ± 17,4	48,2 ± 23,6	35,5 ± 14,5
FVL homozygot ohne OAT n = 33	77,6 ± 16,8	66,7 ± 11,8	60,2 ± 17,6	42,9 ± 10,3
FVL homozygot mit OAT n = 13	43,6 ± 9,7	37,0 ± 6,8	20,9 ± 5,6	18,5 ± 5,4

Tab. 17: Statistische Kennwerte (Mittelwert±Standardabweichung) für alle ermittelten Protein-S-Parameter

3.5 Untersuchungen zum Einfluss der Lagerungsdauer der Plasmaproben auf die Analyseergebnisse

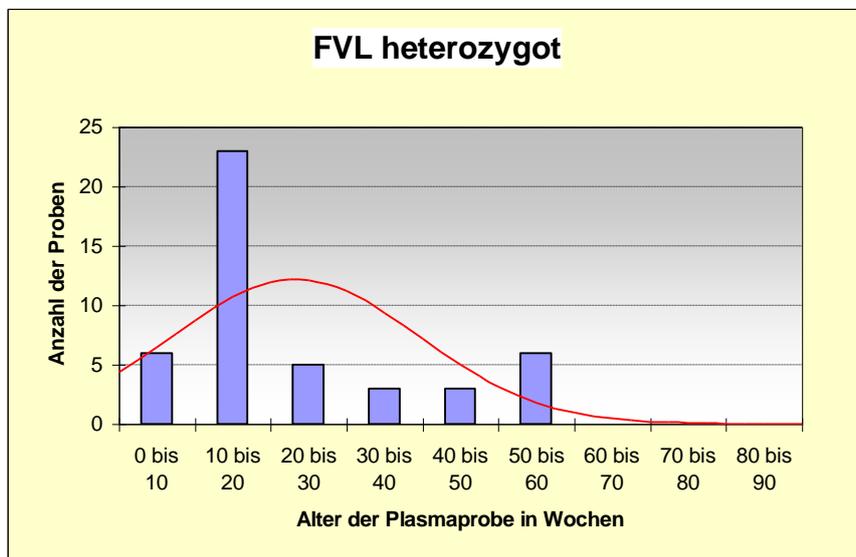
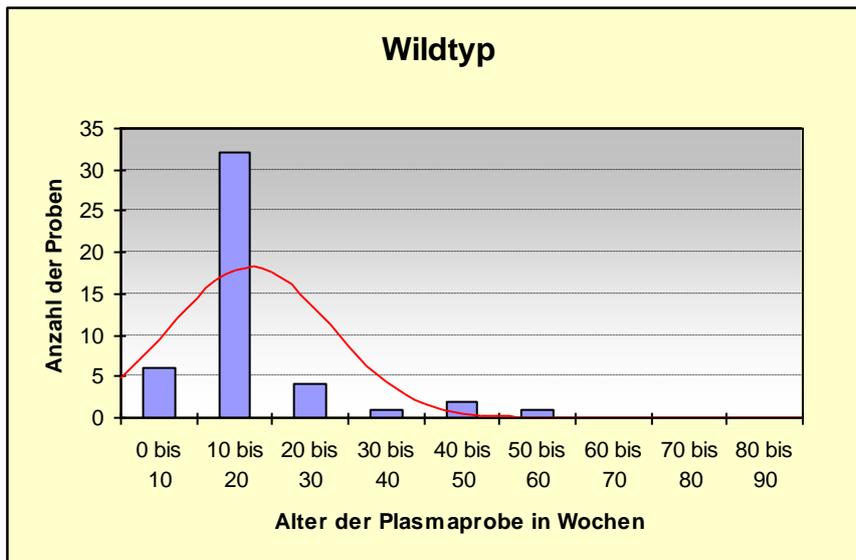
3.5.1 Zeitpunkt der Probengewinnung

Die in der Untersuchung verwendeten Plasmaproben von Patienten mit homozygoter FVL-Mutation wurden in einem Zeitraum von 6 Jahren (1997-2003) in unserer Thrombophilieambulanz gesammelt und tiefgefroren bei -40°C gelagert. Der lange Sammelzeitraum ist durch die geringe Prävalenz der homozygoten FVL-Mutation zu erklären (siehe Kapitel 1.7.1). Da dadurch in den Untergruppen eine heterogene Zusammensetzung des Probenalters besteht, wurden ausführliche Untersuchungen zum Einfluss der Lagerungsdauer der Plasmaproben auf die Analyseergebnisse durchgeführt.

Die 138 Proben, die am Tag der Gewinnung in 1-2 ml-Portionen bei -40°C tiefgefroren wurden, hatten ein Mindestalter vom Zeitpunkt der Blutentnahme bis zur Analyse von 4 Monaten. Die Probe mit längster Lagerungsdauer war zum Zeitpunkt der Analyse 86 Monate alt (Mittelwert aller Proben $30,7 \pm 21,9$). Es konnte gezeigt werden, dass die

Verteilung des Probenalters in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp in Monaten eine deutliche Kurtosis aufwies, welche in Abb. 13 ersichtlich ist. Das mittlere Alter der Probe in Monaten \pm Standardabweichung (Minimum/Maximum) verteilte sich in den Untergruppen wie folgt:

Kontrolle/Wildtypgruppe $18,9 \pm 9,1$ (4–52) Monate, heterozygote FVL: $22,5 \pm 15,4$ (5–56) und in der Gruppe homozygote FVL $49,5 \pm 23,7$ (7–86) Monate.



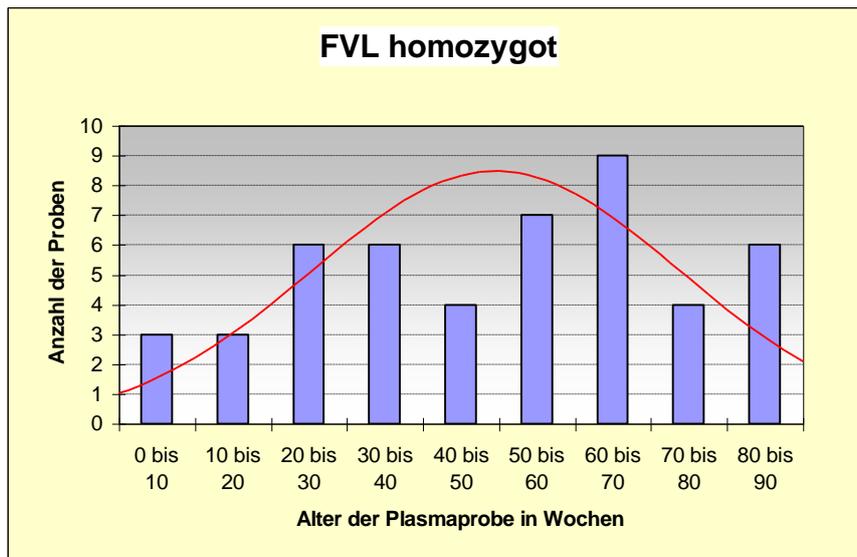


Abb. 13: Verteilung der Lagerungsdauer von Plasmaprobe in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp

Dargestellt sind kumulative Häufigkeiten. Ein Balken stellt ein Zeitintervall von 10 Wochen dar. Die Verteilung wird in der Kurve dargestellt.

Es zeigt sich eine Kumulation der ältesten Proben in der Gruppe mit homozygoter FVL. Diese Tatsache wird durch den langen Sammelzeitraum aufgrund der niedrigen Frequenz der homozygoten FVL-Mutation erklärt.

Im folgenden Kapitel soll untersucht werden, ob Korrelationen zwischen Proben unterschiedlichen Entnahmedatums existieren.

3.5.2 Analyse von Plasmaprobe mit gleicher Lagerungsdauer

Aufgrund der unterschiedlichen Lagerungsdauer der Plasmaprobe konnte vermutet werden, dass der beobachtete Einfluss der Faktor-V-Leiden-Mutation durch das Alter der Probe mitverursacht wurde.

Die unter 3.4. durchgeführten Berechnungen wurden daher an den Plasmaprobe wiederholt, die die kürzeste Lagerungsdauer bei -40°C aufwiesen. Die Plasmaprobe stammten von Patienten, die sich ausschließlich in den Jahren 2002 und 2003 in unserer Ambulanz vorgestellt hatten. Die Lagerungsdauer betrug im Mittel bei diesem

Probenpool $16,8 \pm 4,3$ Monate. In jeder Untergruppe (FVL homozygot, heterozygot und Wildtyp) wurden n=9 Proben untersucht. Es wurden ausschließlich Patienten ohne orale Antikoagulation untersucht. Die älteste Probe war 27 Monate alt. Die jüngste Probe 7 Monate. Die Mittelwerte des Probenalters in Monaten (Tab. 18) der einzelnen Untergruppen lagen in der Kontrollgruppe/Wildtypgruppe bei $18,1 \pm 0,3$, in der Gruppe mit heterozygotem FVL $16,7 \pm 3,5$ und bei den Patienten mit homozygotem FVL bei $15,7 \pm 9,0$.

Lagerungsdauer der Plasmprobe in Monaten					
	N	Mittelwert [Monate]	Stabw. [Monate]	Minimum [Monate]	Maximum [Monate]
Wildtyp	9	15,7	9,0	7	27
FVL heterozygot	9	16,7	3,5	8	21
FVL homozygot	9	18,1	0,3	18	19

Tab.18: Statistische Kennwerte für das Alter der Plasmprobe in Monaten bei Patienten und Kontrollen ohne Antikoagulation bei einer Auswahl von Proben mit homogener Lagerungsdauer in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp

Der Vergleich der funktionellen Protein-S-Werte der Untergruppen (siehe Tab. 19) mittels T-Test erzielt ähnliche Ergebnisse und Signifikanzniveaus, wie unter 3.4. beschrieben, trotz deutlich kleinerem n bei den Plasmproben mit homogener Lagerungsdauer. In allen Gruppen liegt ein signifikanter Unterschied vor.

	Test	Wildtyp	FVL heterozygot	FVL homozygot
Mittelwert [%]	PSCL	89,1	65,2	49,8
	PSAC	79,1	58,4	35,9
Standard- Abweichung [%]	PSCL	22,9	10,9	10,3
	PSAC	22,5	6,6	7,8
Minimum Maximum [%]	PSCL	12 – 66	19 - 37	14 – 34
	PSAC	10 - 79	22 – 38	10 – 27

Tab. 19: Statistische Kennwerte für das funktionelle Protein S bei Patienten und Kontrollen ohne orale Antikoagulation bei einer Auswahl von Proben (n=9) mit homogener Lagerungsdauer in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp

Somit konnte gezeigt werden, dass die Protein-S-Aktivität in Proben mit kurzer, vergleichbarer Lagerungsdauer ebenso wie in Proben mit langer, heterogener Lagerungsdauer vom Faktor-V-G1691A-Genotyp beeinflusst werden.

3.5.3 Vergleich der im Rahmen des Experimentes untersuchten Protein-S-Parameter mit Protein-S-Parametern, die zum Zeitpunkt der Probengewinnung ermittelt wurden

Das Kollektiv der Patienten mit heterozygoter und homozygoter FVL-Mutation wurde, wie zuvor erwähnt, in unserer Thrombophilie-Ambulanz in den Jahren 1997-2004 bezüglich des Vorliegens weiterer thrombophiler Risikofaktoren untersucht. Bei nahezu allen Patienten wurden dabei auch die Protein-S-Parameter (gesamtes und freies Protein S) bestimmt, bei einem Teil der Patienten (n=77) wurde auch eine funktionelle Protein-S-Bestimmung (Protein S Asserachrom® der Fa. Roche) jeweils zum Zeitpunkt der ambulanten Vorstellung des Patienten, d.h. mit einem maximalen Zeitverzug von 2

Wochen bis zur Bestimmung durchgeführt. Bei einem kleinen Teil der Patienten (n=14) sind keine Protein-S-Parameter erhoben worden. Die erhobenen Vorwerte werden im Folgenden mit den aktuell erhobenen Werten verglichen. Die damaligen Testsysteme sind mit den heute verwendeten Systemen nahezu identisch. Für die Untersuchung von gesamtem und freiem Protein S wurde bereits 03/1997 (Zeitpunkt der ältesten Untersuchung) der Protein-S-clotting-Test der Fa. Roche (damals Boehringer Ingelheim) verwendet. Im Unterschied zur heutigen Untersuchung wurde jedoch noch kein „One-step-ELISA“ durchgeführt. Der ELISA bestand aus mehreren Einzelschritten mit längerer Inkubationszeit und aufwändigerem Pipettierschema. Der Test wurde jedoch mit Reagenzien gleicher Zusammensetzung durchgeführt. Das gleiche gilt für den Protein-S-Clotting-Test der Fa. Roche Diagnostics (damals Boehringer Ingelheim), der identisch mit dem heutigen Testprinzip ist. Vergleiche wurden nur mit den jetzt erhobenen Protein-S-Clotting-Ergebnissen der Fa. Roche Diagnostics durchgeführt, da der Protein S Ac der Fa. Dade Behring nicht in der Routinediagnostik verwendet wurde und somit keine Ausgangsdaten erhoben wurden. Die statistischen Kennwerte werden in Tabelle 20 und 21 dargestellt.

Zur Überprüfung, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Vorwerten und den aktuell erhobenen Werten besteht, wurde ein zweiseitiger T-Test für unabhängige Stichproben angewendet und für Patienten mit homozygoter und heterozygoter FVL-Mutation getrennt durchgeführt.

Funktionelle Protein-S-Bestimmung mit Protein S clotting der Fa. Roche					
FVL Homozygot					
	N	Mittelwert [%]	Standard-abweichung [%]	Minimum/Maximum [%]	Differenz relativ [%]
PS frei, Vorwert	9	63,9	22,1	25/111	-9,7
PS frei, aktueller Wert	9	57,7	17,3	26/88	
PS gesamt, Vorwert	9	72,0	17,5	42/102	-6,7
PS gesamt, aktueller Wert	9	67,2	21,7	28/116	
PS funktionell, Vorwert	9	52,8	31,0	10/129	-8,3
PS funktionell, aktueller Wert	9	48,2	23,6	14/96	

Tab. 20: Statistische Kennwerte für die funktionelle Protein-S-Bestimmung bei Patienten mit homozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation

Vorwerte wurden mit dem Protein S clotting, aktuelle Werte wurden mit STA Protein S clotting der Fa. Roche gemessen.

Funktionelle Protein-S-Bestimmung mit Protein S clotting der Fa. Roche					
FVL Heterozygot					
	N	Mittelwert [%]	Standard-abweichung [%]	Minimum/Maximum [%]	Differenz relativ [%]
PS frei, Vorwert	9	62,7	21,0	22/102	-3,5
PS frei, aktueller Wert	9	60,5	17,8	31/91	
PS gesamt, Vorwert	9	68,4	16,7	33/94	+0,9
PS gesamt, aktueller Wert	9	69,0	20,0	38/124	
PS funktionell, Vorwert	9	66,4	29,4	21/131	-10,2
PS funktionell, aktueller Wert	9	59,6	24,6	19/110	

Tab. 21: Statistische Kennwerte für die funktionelle Protein-S-Bestimmung bei Patienten mit heterozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation

Vorwerte wurden mit dem Protein S clotting, aktuelle Werte wurden mit STA Protein S clotting beide von der Fa. Roche gemessen.

Mittels T-Test konnte kein signifikanter Unterschied der Mittelwertvergleiche ermittelt werden, was in Verbindung mit den unter 3.5.2. dargestellten Ergebnissen einen weiteren Beleg dafür darstellt, dass der Einfluss des Faktor-V-G1691A-Genotyps auf die Protein-S-Aktivität unabhängig von der Probenlagerungsdauer ist.

3.5.4 Korrelation zwischen der Lagerungsdauer der Plasmaproben und der funktionellen Protein-S-Bestimmung

Aus den vorhergehenden Berechnungen ergibt sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem funktionellen Protein S, gemessen mit den Testsystemen der Fa. Roche und der Fa. Behring, und dem Alter der Proben. In der Berechnung der Korrelation findet sich eine negative Korrelation der Parameter Alter der Probe und funktionelles Protein S, sowie ein niedriger Korrelationskoeffizient (Roche: $r = -0,2853$, Behring $r = -0,3857$), der einen schwachen Zusammenhang der untersuchten Parameter belegt.

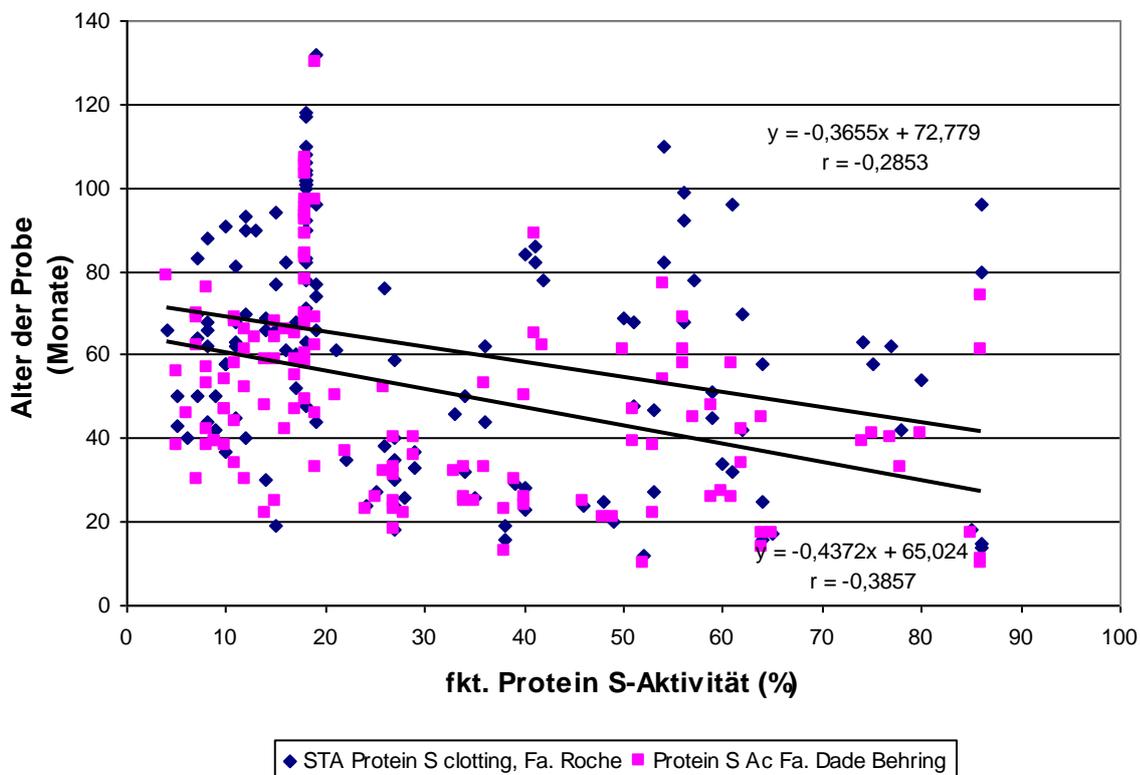


Abb. 14: Korrelation von Alter der Probe (Lagerungsdauer) mit funktioneller (fkt.) Protein-S-Bestimmung

3.5.5 Die Faktor-VIII-Aktivität als Surrogatmarker für das Alter der Proben

Die F-VIII-Aktivität wird nicht durch die Einnahme von oralen Antikoagulanzen beeinträchtigt, da die Synthese Vitamin-K-unabhängig in der Leber erfolgt.

Daher wurden alle Berechnungen bezüglich des Faktor-VIII-Vergleichs sowohl an nicht antikoagulierten, als auch an antikoagulierten Patientenproben gemeinsam vorgenommen. Wie aus Tabelle 22 und Abb. 15 ersichtlich wird, liegen die Mittelwerte für die Faktor-VIII-Aktivität in allen drei Gruppen nahe beieinander: In der Kontrollgruppe bei $107,3 \pm 36,2\%$, in der Gruppe mit heterozygotem FVL bei $105 \pm 36,9\%$ und bei FVL homozygot $107,5 \pm 32,3\%$ (Tab. 22).

Koagulometrische Faktor-VIII-Aktivitätsbestimmung (Fa. Behring)					
	N	Mittelwert [%]	Stabw. [%]	Minimum [%]	Maximum [%]
Wildtyp	46	107,3	36,2	40,0	209,0
FVL heterozygot	46	105,0	36,9	28,0	199,0
FVL homozygot	46	107,5	32,3	49,0	195,0

Tab. 22: Statistische Kennwerte für die Faktor-VIII-Aktivitätsbestimmung (koagulometrische Bestimmung, Fa. Behring) beim Gesamtkollektiv (Patienten mit und ohne Antikoagulation) in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp

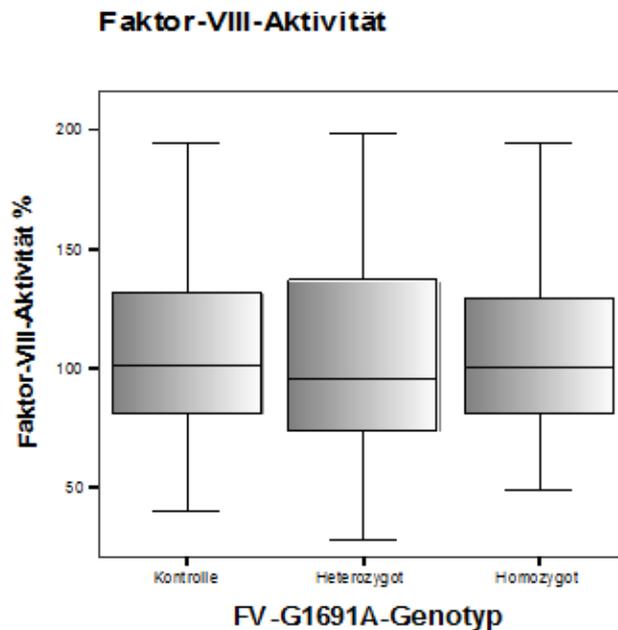


Abb. 15: Boxplot-Darstellung der Faktor-VIII-Aktivität in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp

Untersucht und dargestellt wurden alle Patienten (mit und ohne Antikoagulation) je Untergruppe n=46 Patienten

Im T-Test für unabhängige Stichproben konnte kein signifikanter Unterschied der F-VIII-Aktivität zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

3.6 Korrelation von freier Protein S-Bestimmung und funktioneller Protein S-Bestimmung

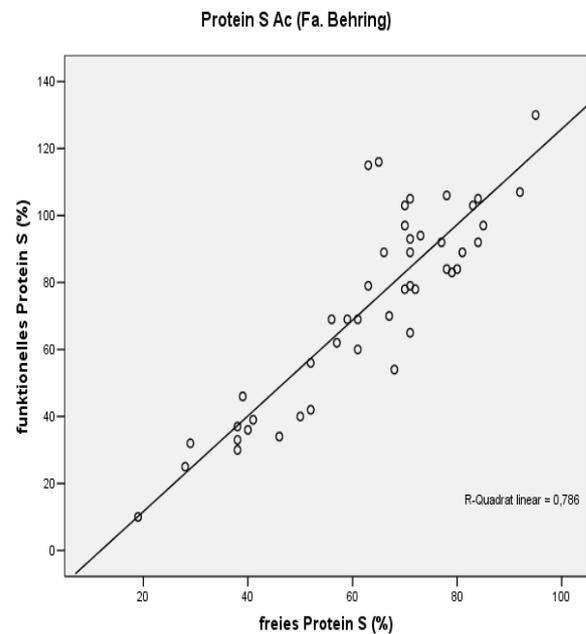
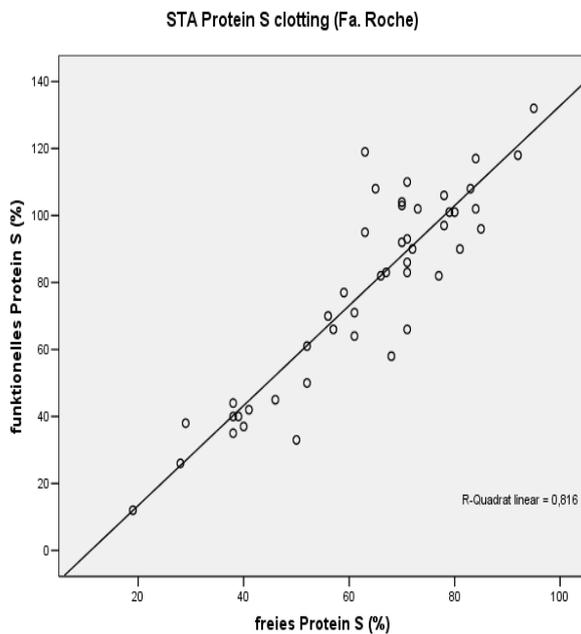
Die Aufgabe von C4BP liegt darin, durch Bindung von Protein S die Inhibition der Gerinnung zu steuern, da die Kofaktorfunktion von Protein S am APC-Komplex durch die Bindung an C4BP verhindert wird (Dahlbäck 1991). Aufgrund dieser Tatsache wird deutlich, dass lediglich das freie, ungebundene Protein S eine Wirkung im Hämostasesystem entfaltet. Die Qualität der funktionellen Protein-S-Tests wird daher u.a. an der Korrelation zum freien Protein S, gemessen mittels ELISA, bemessen. (Goodwin et al. 2002).

In den folgenden Abbildungen (Tab. 23 und Abb. 16) werden statistisch und grafisch die Stärke des Zusammenhangs zwischen dem freien Protein S und der durch die funktionellen Tests ermittelten Protein S-Aktivität verdeutlicht.

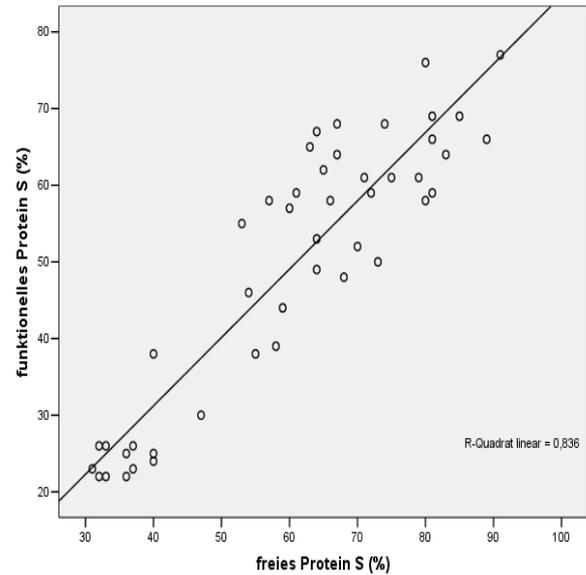
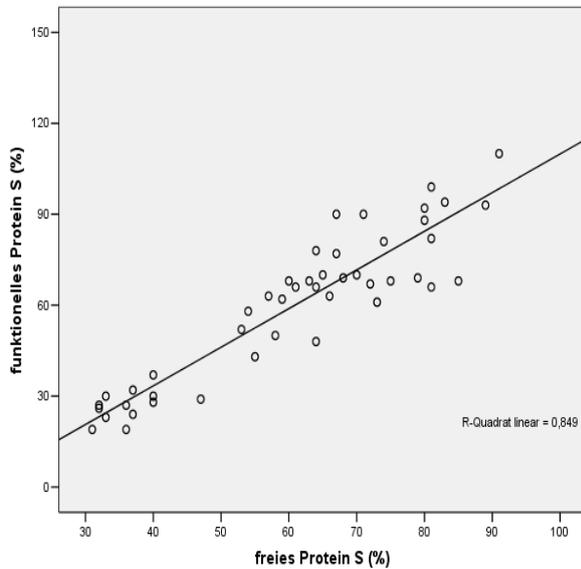
Korrelation von freier Protein-S-Bestimmung zu funktioneller Protein-S-Bestimmung		
	STA Protein S clotting Fa. Roche	Protein S Ac Fa. Behring
Wildtyp/Kontrollgruppe	r = 0,90	r = 0,89
FVL heterozygot	r = 0,92	r = 0,91
FVL homozygot	r = 0,96	r = 0,91

Tab. 23: Stärke des statistischen Zusammenhangs (Korrelationskoeffizient r) zwischen freier und funktioneller Protein-S-Bestimmung in Abhängigkeit vom FV-G1691A-Genotyp

a)



b)



c)

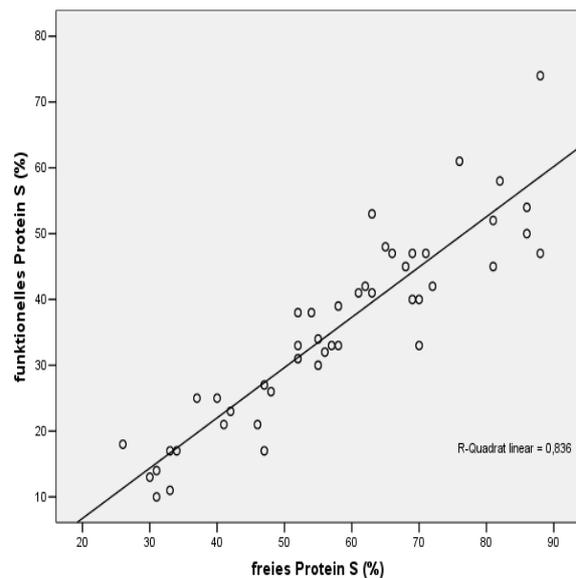
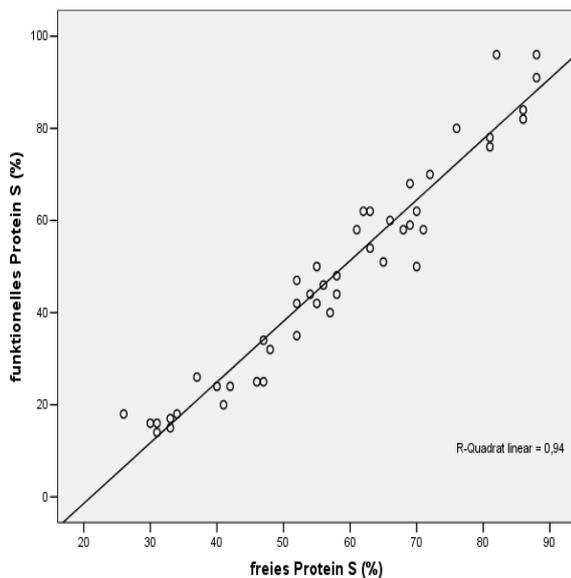


Abb. 16: Korrelation zwischen freier Protein-S-Bestimmung (ELISA Asserachrom[®], Fa. Roche) und funktioneller Protein-S-Bestimmung (linke Abb. STA Protein S clotting der Fa. Roche, rechte Abb. Protein S Ac der Fa. Behring)

a) Kontrollgruppe/Wildtyp, b) FVL-Mutation heterozygot, c) FVL-Mutation homozygot

Es besteht eine sehr hohe Korrelation zwischen dem freien Protein S und dem funktionellen Anteil, was die Hypothese vom physiologischen Zusammenhang zwischen freiem Protein S und funktionellem Protein S bestätigt.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchung konnte zeigen, dass die Bestimmung des funktionellen Protein S durch das Vorliegen der FVL-Mutation dahingehend beeinflusst wird, dass heterozygote und homozygote Anlageträger der FVL-Mutation testbedingt niedrigere Protein-S-Parameter aufweisen als Patienten/Kontrollen ohne FVL-Mutation. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass eine Beeinflussung durch die FVL-Mutation bei beiden untersuchten Testsystemen zur funktionellen Protein-S-Bestimmung nachweisbar ist, wobei der Protein-S-Ac-Test der Fa. Dade Behring etwas stärker von dem Phänomen betroffen ist als der STA Protein S clotting der Fa. Roche. Zuverlässige Messwerte werden jedoch von keinem der beiden Tests erzielt. Bereits in der Patientengruppe, die einen heterozygoten FV-G1691A-Genotyp besitzt, welcher immerhin eine Prävalenz von 5–8% in der kaukasischen Bevölkerung aufweist, kann ein signifikant von der Wildtypgruppe abweichendes Messergebnis festgestellt werden. Konträr dazu konnte gezeigt werden, dass die immunologisch bestimmten Protein-S-Parameter, wie gesamtes und freies Protein S durch die FVL-Mutation sowohl in heterozygoter als auch homozygoter Form keinem Einfluss durch den Genotyp unterliegen.

Die Korrelation zwischen dem ermittelten funktionellen und dem freien Protein S ist sehr hoch, was der Hypothese entspricht, dass nur das freie, nicht C4b-gebundene Protein S biologisch aktiv ist.

Ferner wurde der Einfluss von Alter und Lagerungsdauer der Plasmaproben auf die Gerinnungsparameter untersucht, da eine Kumulation der ältesten Proben in der Gruppe der Patienten mit homozygoter FVL-Mutation vorhanden war und der Aktivitätsverlust von Gerinnungsparametern mit zunehmender Lagerungsdauer bekanntermaßen größer wird. Als Surrogatmarker für die Stabilität der Gerinnungsfaktoren wurde der gegenüber Aufbewahrung und Auftauprozessen sehr labile Faktor VIII gewählt. Die Mittelwerte der Faktor-VIII-Aktivitätsbestimmung lagen bei allen drei Faktor-V-Genotyp-Gruppen in einem Messniveau. Statistisch konnte kein signifikanter Unterschied der Faktor-VIII-Aktivität zwischen den Gruppen festgestellt werden. Es gab nur eine leichte negative Korrelation zwischen der funktionellen Protein-S-Aktivität und dem Alter der Proben. Vorwerte und aktuell erhobene Protein-S-Parameter wurden mittels T-Test verglichen, auch hier ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den zum Teil

mehrere Jahre auseinander liegenden Messungen. Es zeigte sich lediglich ein zu erwartender geringfügiger, statistisch nicht signifikanter und konkordant alle Proben betreffender Aktivitätsverlust, der als lagerungsbedingt zu betrachten ist. Eine Verursachung der falsch niedrigen funktionellen Protein-S-Parameter bei Vorliegen der heterozygoten oder homozygoten FVL-Mutation durch die Lagerungsdauer der bei -40°C tiefgefrorenen Proben konnte durch diese Untersuchungen ausgeschlossen werden. Daher besteht insbesondere für Patienten mit homozygoter FVL-Mutation die Gefahr der fehlerhaften Diagnose eines zusätzlichen Protein-S-Mangels.

4 Diskussion

Die Bestimmung des funktionellen Protein-S-Anteils ist bei Patienten mit vermuteten hereditären oder erworbenen thrombophilen Risikofaktoren ein fester Bestandteil der Diagnostik geworden. Protein S ist allerdings ein gegenüber vielfältigen Einflüssen und Störfaktoren sensibler Parameter, was die Protein-S-Diagnostik erschweren kann. Ein in der Routinediagnostik immer wieder beobachtetes Phänomen war die auffällige überproportionale Erniedrigung des funktionellen Protein-S-Anteils im Vergleich zum freien und gesamten Protein S bei Patienten mit Faktor-V-Leiden-Mutation.

Seit der Entwicklung von funktionellen Protein-S-Testsystemen ist dieser Einfluss (vor Detektion der Faktor-V-Leiden-Mutation war es die APC-Resistenz) beobachtet und untersucht worden. Dieser Effekt wurde jedoch in vorangegangenen Untersuchungen in relativ kleinen, zum Teil sehr heterogenen Kollektiven untersucht: D' Angelo et al. 1995: 11 Patienten mit heterozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation, Moraes et al. 2000: 17 Patienten mit heterozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation, 2 Patienten mit homozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation, Jennings et al. 2002: 9 Patienten mit heterozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation, 4 Patienten mit homozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation.

Da der vermeintliche Kombinationsdefekt (FVL-Mutation und Protein-S-Mangel) nicht mit der zu erwartenden, höheren Inzidenz thromboembolischer Ereignisse korrelierte, wurde eine artifizielle Beeinflussung der Protein-S-Bestimmung durch die Faktor-V-Leiden-Mutation vermutet (Faioni et al. 1993).

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluss der Faktor-V-Leiden-Mutation auf die funktionelle Protein-S-Bestimmung an einem großen Gesamtkollektiv von 138 Patienten systematisch untersucht. Die Gruppe setzt sich aus jeweils 46 Patienten mit homozygoter und heterozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation, sowie einer Wildtyp-Gruppe zusammen. In den nachfolgenden Kapiteln soll gezeigt werden, dass in der Untersuchung darauf geachtet wurde, mögliche Störfaktoren der Protein-S-Bestimmung auszuschalten und in Bezug auf solche ein homogenes Kollektiv zu schaffen, damit ein präzises Abbild der vermutlich falsch niedrig gemessenen Protein-S-Werte entsteht.

4.1 Berücksichtigung von Einflüssen auf das Protein S

Da die Protein-S-Bestimmung durch verschiedene Faktoren beeinflussbar ist, wurden bei der Planung des Studienaufbaus die hauptsächlichsten Einflussfaktoren berücksichtigt. Die in der Literatur am häufigsten beschriebenen und berücksichtigten Einflüsse sind neben Schwangerschaft und hormoneller Kontrazeption Lebensalter und Geschlecht.

Da Protein S eine alters- und vor allem geschlechtsgebundene Varianz aufweist (Goodwin et al. 2002), wurden die Gruppen mit unterschiedlichen Faktor-V-G1691A-Genotypen in der Untersuchung alters- und geschlechtsgebunden gematcht. Damit sollte eine bezüglich des Alters und des Geschlechtes weitgehend homogene Binnenstruktur der Gruppen geschaffen werden. Voruntersuchungen von Boyer-Naumann et al. (1993), sowie Moraes et al. (2000) haben ebenfalls in den Kontrollgruppen ein alters- und geschlechtsabhängiges matching der Gruppen durchgeführt. In unserer Untersuchung wurde beim matching der Klasse „Alter“ eine Abweichung von ± 3 Lebensjahren nicht überschritten, so dass kein signifikanter Altersunterschied zwischen den Gruppen entstand. Da die Protein-S-Spiegel bei Neugeborenen und bei Kindern bis zum 3. Lebensjahr im Vergleich zu den Referenzwerten bei Erwachsenen niedriger sind (Fernandez et al. 1989), wurden in der vorliegenden Untersuchung lediglich Erwachsene eingeschlossen. Die jüngste Probandin war zum Zeitpunkt der Untersuchung 22 Jahre alt. Das Geschlecht war in allen Gruppen nahezu gleich verteilt. In Untersuchungen von Wolf et al. (1994) und Jennings et al. (2003) wurden Schwangere von der Studie ausgeschlossen, da das funktionelle Protein S in der Schwangerschaft mit fortschreitendem Gestationsalter abnimmt (Weilenmann und von Felten 1991, Comp et al. 1986). Da sich in der Indexgruppe der Patienten mit homozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation schwangere Patientinnen befanden, wurden in der vorliegenden Untersuchung Patientinnen in der Gravidität untersucht, dabei wurde darauf geachtet, dass die Anzahl der Schwangeren in den Gruppen gleich hoch war und möglichst die Zahl von 2 oder 3 nicht überschritt. Dies entspricht lediglich einem Anteil von 6-7% des Gesamtkollektivs.

Da es unter der Therapie mit oralen Antikoagulanzen nicht nur zu einer Verminderung der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren, sondern auch der Inhibitoren kommt,

wurde von einer gleichsinnigen Erniedrigung von Protein S in Abhängigkeit von der Stärke der Antikoagulation ausgegangen. In der Gruppe der Patienten, die mit oralen Antikoagulanzen behandelt wurden, wurde daher besondere Aufmerksamkeit auf die Intensität der Antikoagulation gelegt. In der Untersuchung von Boyer-Naumann et al. (1993) wurde in der Gruppe der oral antikoagulierten Patienten ein INR-Zielbereich von 2-4 angegeben. Wir führten ein matching der Klasse „Quick-Wert“ in unserer Untersuchung durch, dabei wurde eine Abweichung von $\pm 5\%$ des Quick-Wertes nicht überschritten.

Weitere Störfaktoren der Protein-S-Bestimmung sind das Vorliegen von Lupus-Antikoagulanzen, heparinisierte Proben und erhöhte Faktor-VIII-Aktivitäten, die insbesondere das Testformat (Verlängerung der PT oder aPTT) im Hinblick auf Verkürzung oder Verlängerung der gemessenen Zeit beeinflussen können (Goodwin et al. 2002).

Patienten mit nachgewiesenen Lupus-Antikoagulanzen wurden entweder in einer getrennten Gruppe untersucht (Moraes et al. 2000) oder ausgeschlossen (Jennings et al. 2002). Moraes et al. (2000) konnten zwar nachweisen, dass sowohl Lupus-Antikoagulanzen als auch heparinisierte Proben keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe der funktionellen Protein-S-Bestimmung haben, in dieser vorliegenden Studie zählte das Vorliegen von Lupus-Antikoagulanzen als Ausschlusskriterium. Da nach Herstellerangaben keine Beeinflussungen durch Heparin in der Probe zu erwarten sind, wurden Patienten unter Heparintherapie nicht ausgeschlossen. D'Angelo et al. (1995) konnten feststellen, dass testbedingt erniedrigte Protein-S-Werte durch hohe Verdünnungen korrigiert werden können. Welcher Einfluss jedoch hierdurch ausgeschaltet wurde, ist nicht bekannt. Auf die Problematik der Faktor-VIII-Aktivität wird dezidiert in Kapitel 4.4. eingegangen.

Erworbene Protein-S-Mängel, wie sie z.B. bei Leberinsuffizienz, disseminierter intravaskulärer Gerinnung und Kollagenosen vorkommen können (Takahashi et al. 1989), konnten über Anamneseerhebungen und den Vergleich der Quick-Werte in allen drei Gruppen weitgehend ausgeschlossen werden. Eine sekundäre Beeinflussung des Protein-S-Spiegels durch Primärerkrankungen ist somit unwahrscheinlich. Weiterhin ist eine Beeinflussung des Protein S durch orale Antikoagulanzen bekannt, da es sich bei

Protein S um einen Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktor handelt (Weiss et al. 1987). Bei n=13 Patienten pro Gruppe (FVL homozygot, heterozygot, Wildtyp) war die Einnahme einer oralen Antikoagulation anamnestisch bekannt und über den Quick-Wert verifizierbar (Quick-Mittelwerte Kontrolle/Wildtyp: 27,2%, heterozygote FVL-Mutation: 27,5%, homozygote FVL-Mutation: 24,3%).

Persson et al. (2001) konnten in ihrer Untersuchung nachweisen, dass die Menge des freien Protein S und somit auch die Höhe des funktionell bestimmten Protein S von der Dissoziationskonstante des C4BP-Protein-S-Komplexes abhängt. Die Dissoziationskonstante erhöht sich bei ansteigenden Untersuchungstemperaturen erheblich, so dass deutlich erhöhte Protein-S-Parameter bei einer Untersuchungstemperatur von 37°C im Vergleich zu Messungen bei Raumtemperatur ermittelt wurden. In unserer Untersuchung wurde der Temperatureinfluss durch Messung der Proben an drei aufeinander folgenden Werktagen bei Raumtemperatur berücksichtigt.

Die Tatsache, dass der C4BP-Anteil und somit der gebundene Anteil des Protein S (gesamtes Protein S) mit zunehmendem Alter ansteigt (Simmonds et al. 1997) wurde mit dem altersgebundenen matching berücksichtigt.

4.2 Bestimmung des Protein-S-Antigen mittels ELISA bei Patienten mit Faktor-V-Leiden-Mutation

Zunächst soll der Stand der Protein-S-Diagnostik kurz erörtert werden:

Bedingt durch die Tatsache, dass Protein S im menschlichen Organismus in einer C4BP-gebundenen und in einer freien Form vorliegt und nur der freie Anteil eine biologische Funktion erfüllen kann, gehört zu einer kompletten Protein-S-Diagnostik die Bestimmung des gesamten, freien und funktionellen Anteils. Die Annahme, eine alleinige Bestimmung des funktionellen Protein-S-Anteils reiche zur Beurteilung des Protein-S-Haushaltes aus, ist nach Meinung von Jennings et al. (2002) nicht gerechtfertigt. Das funktionelle Protein S ist zwar bei allen drei Typen des Protein-S-Mangels nach Comp erniedrigt, erlaubt jedoch bei alleiniger Bestimmung keine Differenzierung zwischen den Typen untereinander. Die Diagnose eines Protein-S-Mangels Typ II kann nur über einen funktionellen Protein-S-Test gestellt werden, da

hierbei gesamtes und freies Protein S normal sind. Daher sind die Anforderungen an die Präzision und Reproduzierbarkeit des Tests sehr hoch zu stellen.

Die APC-Resistenz und insbesondere die FVL-Mutation wurden erst nach der Entdeckung des Protein S und nach der Entwicklung von Protein-S-Testsystemen (funktionelle Testsysteme) als potenzieller Störfaktor für die funktionelle Protein-S-Bestimmung vermutet (Faioni et al. 1993, 1994). Seitdem versucht man die Problematik durch Modifikationen der Testreagenzien zu beheben – mit unterschiedlichem Erfolg.

In unserer Untersuchung wurde bei der Anwendung eines Protein-S-ELISAs (One-step-ELISA) keine signifikante Beeinflussung durch den FVL-Genotyp festgestellt (siehe Kapitel 3.2. und 3.3.). Die Beeinflussung des ELISAs durch die FVL-Mutation ist auch in der Literatur nicht beschrieben worden (Goodwin et al. 2002). Der Protein-S-ELISA gilt als Goldstandard der Protein-S-Bestimmung, ob mit PEG-Fällung oder als mittlerweile kommerziell erhältlicher One-step-ELISA mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern (Wolf et al. 1994, Goodwin et al. 2002). In einer Untersuchung von Wolf et al. (1994) konnte gezeigt werden, dass die neue Generation des One-step-ELISAs eine nahezu identische Präzision der zuvor verwendeten ELISAs mit polyklonalen Antikörpern erzielte. In die Untersuchung wurden „Problemkollektive“, wie z.B. Patienten mit kongenitalem Protein-S-Mangel, Patienten unter oraler Antikoagulation, Patienten mit Leberzirrhose und Patienten mit entzündlichen Systemerkrankungen eingeschlossen. Die Korrelation der beiden ELISAs lag in jedem Fall zwischen 0.96 und 0.98. Seit dieser Untersuchung werden die zeitaufwändigen ELISAs mit polyklonalen Antikörpern und/oder PEG-Fällung durch One-step-ELISAs ersetzt und auch in der vorliegenden Studie verwendet. Die genaue Methode wird bei Amiral et al. 1994 beschrieben.

Eine systematische Untersuchung zur Beeinflussung des Protein-S-ELISAs (gesamt und frei) durch die Faktor-V-Leiden-Mutation konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Bei der Bestimmung des freien Protein S in unserer Untersuchung über One-step-ELISA war der Mittelwert bei Patienten ohne Antikoagulation in der Gruppe der Patienten mit homozygoter FVL-Mutation im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe zwar etwas niedriger (66,7% vs. 71,0%), jedoch bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,142$). Gleiches gilt für die Bestimmung des gesamten Protein S ($p=0,562$).

Die Anzahl der Männer und Frauen war in allen Gruppen annähernd gleich verteilt. Das mittlere Alter der Probanden betrug in der Gruppe der homozygoten Individuen 42 ± 14 Jahre, in der Gruppe der heterozygoten Individuen 41 ± 14 Jahre und in der Kontrollgruppe (Wildtypgruppe) 42 ± 14 Jahre. Eine Beeinflussung durch das Lebensalter kann somit ausgeschlossen werden.

Der Unterschied der Quickwerte zwischen den Untergruppen war aufgrund der Güte des matching nicht signifikant. Die p-Werte für den T-Test bezüglich des Quick-Wertes lagen bei den Patienten ohne orale Antikoagulation bei $p=0,276$ (Wildtyp vs. FVL heterozygot), $p=0,538$ (FVL heterozygot vs. FVL homozygot) und für Patienten mit oraler Antikoagulation bei $p=0,630$ (Wildtyp vs. FVL heterozygot), $p=0,360$ (FVL heterozygot vs. FVL homozygot).

Zusammenfassend ließ sich keine Beeinflussung der Protein-S-Bestimmung im ELISA durch die FVL-Mutation feststellen.

4.3 Bestimmung der funktionellen Protein-S-Aktivität bei Patienten mit Faktor-V-Leiden-Mutation mit zwei kommerziell erhältlichen Testsystemen (Protein S clotting Fa. Roche Diagnostics, Protein S Ac Fa. Behring)

Eine Störanfälligkeit der funktionellen Protein-S-Testsysteme gegenüber der APC-Resistenz (und seit Bertina et al. 1994 auch bekanntermaßen durch die FVL-Mutation) wurde schon zu Beginn der Entwicklung der Methode beschrieben (Faioni et al. 1993, 1994, D'Angelo et al. 1995). Bereits vor der Kenntnis der Pathophysiologie des mutierten Faktor V durch die FVL-Mutation bei der Bestimmung des funktionellen Protein-S-Anteils wurde von Wolf et al. (1989) ein funktionelles Testprinzip beschrieben, welches im Vergleich zu anderen kommerziell erhältlichen Protein-S-Clotting-Tests nicht nur eine höhere Korrelation zu den gemessenen freien Protein-S-Parametern erzielte sondern auch höhere Messwertergebnisse für die funktionelle Protein-S-Bestimmung im Vergleich zu anderen Tests erreichte. Dieses Testprinzip beruht auf der zusätzlichen Zugabe von bovinem Faktor Va zum Testansatz und wird auch noch aktuell (wie z.B. in dem von uns dargestellten Protein S clotting der Fa. Roche Diagnostics) verwendet. Weiterhin wurde bei dem Testprinzip von Wolf et al. (1989) ein Puffer (STA® Diluent Buffer) zur Verdünnung des Patientenplasmas angewendet, um Störeinflüsse durch

eventuell vorhandene Lupus-Antikoagulanzen oder erhöhte Faktor-VIII-Aktivitäten auszuschalten, wie in Kapitel 4.1. beschrieben wurde.

In der vorliegenden Studie wurde eine Verdünnung des Patientenplasmas mit STA diluent Puffer vorgenommen, jedoch nur beim Protein-S-Clotting-Test der Fa. Roche Diagnostics, wie vom Hersteller empfohlen. Dagegen schreibt der Protein-S-Ac-Test der Fa. Behring nach Herstellerangaben keine Verdünnung des Patientenplasmas vor. In diesem Fall wurde unverdünntes Patientenplasma eingesetzt.

Unser Testansatz der Fa. Roche Diagnostics verwendet Patientenplasma in einer vom Hersteller empfohlenen 1:13,5 Verdünnung mit einer Puffer-Mischung aus Calciumchlorid und Aqua dest. (entspricht STA[®] Diluent Buffer, siehe auch Kapitel 2.2.4 und 2.2.6).

Eine Beeinflussung der Messergebnisse durch Lupus-Antikoagulanzen wurde nicht erwartet, da Patienten mit diesem Phänomen in der vorliegenden Studie ausgeschlossen wurden. Ebenso ist ein Effekt durch erhöhte Faktor-VIII-Aktivitäten unwahrscheinlich, da die höchste F-VIII-Aktivität bei einem Patienten aus unserer Kontrollgruppe 209% betrug. Beeinflussungen der Faktor-VIII-Aktivität von >300% wurden bei Goodwin et al. (2002) beschrieben, Werte <300% hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Messwerte.

D'Angelo et al. (1995) konnten in einer vergleichenden Untersuchung von zwei kommerziell erhältlichen Protein S-Clotting-Tests (Fa. Instrumentation Laboratories (IL) und Fa. Stago) feststellen, dass bei stärkeren Verdünnungen des Patientenplasmas (1:160 bzw. 1:200) die funktionellen Protein-S-Parameter im Vergleich zu geringeren Verdünnungen oder unverdünnten Proben anstiegen. Welcher Einfluss hierbei ausgeschaltet wurde, ist jedoch unklar.

Andere experimentelle Ansätze, wie z.B. die zusätzliche Zugabe von Faktor Xa konnten sich in der Routinediagnostik der funktionellen Protein-S-Bestimmung nicht etablieren, weil die Messweltergebnisse, gerade bei Patienten mit FVL-Mutation im Vergleich zu der Faktor-Va-Zugabe, nicht überzeugen konnten. Jennings et al. (2003) untersuchten in einem Ringversuch 3 kommerziell erhältliche funktionelle Protein-S-Clotting-Tests: Den Test der Fa. IL (zusätzlich bovines Thromboplastin), den Test der Fa. Stago (mit zusätzlicher Zugabe von bovinem Faktor Va) und den Test der Fa. Biopool (mit zusätzlichem Faktor-Xa-Reagenz). Dabei zeigte sich, dass alle drei Testmethoden

bereits von der heterozygoten Faktor-V-Leiden-Mutation signifikant ($p < 0,001$) beeinflusst wurden, was im Einklang mit unseren Testergebnissen steht. Bei der Untersuchung von 4 Patienten mit homozygoter Faktor-V-Leiden-Mutation wurden mit dem Test der Fa. Biopool, der Faktor Xa enthielt, wesentlich niedrigere Protein-S-Werte erzielt als bei dem Test mit der Zugabe von bovinem Faktor Va (28,8% vs. 53,1% Aktivität) (Jennings et al. 2003). Daher scheint die Zugabe von Faktor Xa zum Testansatz keinen korrigierenden Effekt auf die funktionelle Protein-S-Bestimmung zu haben und wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht.

Es wurde daher das in der Routine etablierte Prinzip der Faktor-Va-Zugabe (Protein S clotting der Fa. Roche Diagnostics, ehemals Protein-S-clotting, bzw. STA[®] clot der Fa. Stago) gegen einen anderen kommerziell erhältlichen PTT-basierten Protein-S-Clotting-Test ohne zusätzliche Faktor-Va-Zugabe (Protein S Ac der Fa. Behring) getestet. Es stellte sich heraus, dass beide Testsysteme sensitiv gegenüber der FVL-Mutation sind, wobei die Beeinflussung bei dem Testprinzip ohne Faktor-Va-Zugabe etwas stärker zu sein scheint, als mit Faktor-Va-Zugabe. (Signifikanzniveau heterozygote FVL-Mutation vs. homozygote FVL-Mutation bei Patienten ohne Antikoagulation $p < 0,05$ vs. $p < 0,001$, heterozygote FVL-Mutation vs. homozygote FVL-Mutation bei Patienten mit Antikoagulation $p < 0,1$ vs. $p < 0,05$, siehe Kapitel 3.4.1. und 3.4.2.). Obwohl beide Testsysteme unterschiedliche Signifikanzen aufweisen, muss konstatiert werden, dass beide Tests gegenüber der FVL-Mutation sensibel sind. Sie bestätigen die von Jennings et al. (2003) in einem kleineren Kollektiv erhobenen Resultate im Ringversuch.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Schwachstelle in der Protein-S-Diagnostik nach wie vor in der Bestimmung des funktionellen Anteils liegt, der die höchste Störanfälligkeit zeigt.

Die Diskrepanz der Messergebnisse wird von Jennings et al. unter dem Aspekt der Testprinzipien, die bei jedem Test anders strukturiert waren, erklärt. Dieses Phänomen kann auch in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden.

4.4 Korrelation des funktionellen Protein-S-Anteils mit der Bestimmung des freien Protein S

Lediglich die freie Form des Protein S kann hämostaseologische Aufgaben wahrnehmen, die C4BP-gebundene Form des Protein S weist keine APC-Kofaktor-Funktion auf (Dahlbäck 1991). Aus dieser Tatsache ergibt sich die Annahme, dass die funktionelle Protein-S-Aktivität eng mit dem freien Protein-S-Anteil korreliert sein muss. In einer Multicenter-Studie von Boyer-Neumann et al. (1993) wurden 4 verschiedene kommerziell erhältliche funktionelle Protein S-Clotting-Tests (Fa. Stago, Fa. Behring, Fa. Biopool und Fa. IL) bei Patienten mit kongenitalem Protein-S-Mangel, oraler Antikoagulation (Ziel-INR 2-4), Leberzirrhose oder entzündlichen Erkrankungen untersucht und die Resultate mit Ergebnissen eines Protein-S-ELISAs korreliert. Die Korrelationen lagen zwischen 0.84-0.92, lediglich der Test der Fa. Behring zeigte in dieser Untersuchung eine schlechtere Korrelation zum ELISA von 0.70. Dabei muss erwähnt werden, dass in der Untersuchung von Boyer-Neumann keine Testung auf Faktor-V-Leiden-Mutation erfolgte und ein Zusammenhang zwischen der funktionellen Protein-S-Bestimmung und der Faktor-V-Leiden-Mutation nicht untersucht wurde.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Ergebnisse beider Protein-S-Clotting-Tests mit den Ergebnissen des ELISA zur Bestimmung des freien Protein S (Asserachrom®) von der Fa. Roche Diagnostics korreliert. Nicht nur in der Wildtyp-Gruppe (Kontrollkollektiv) fand sich ein hoher Korrelationskoeffizient (Fa. Roche $r=0.90$, Fa. Behring $r=0.89$), sondern auch in der Gruppe der Patienten mit heterozygoter FVL-Mutation (Fa. Roche $r=0.92$, Fa. Behring $r=0.91$) und homozygoter FVL-Mutation (Fa. Roche $r=0.96$, Fa. Behring $r=0.91$) fanden sich sehr hohe Korrelationen, wobei der Test der Fa. Behring eine etwas geringere Korrelation aufweist. Die von uns ermittelten Korrelationen für den Test der Fa. Behring zeigen bessere Ergebnisse als die Untersuchungen von Boyer-Naumann et al. (1993), welche einen deutlich niedrigeren Korrelationskoeffizienten (0.70) ermittelt haben.

Ähnlich hohe Korrelationen finden sich bei Wolf et al. (1989), welche ebenfalls bei der Entwicklung und Prüfung eines neuartigen Protein S-Clotting-Tests die Präzision des Tests an der Korrelation zu einem Protein-S-ELISA zur Bestimmung des freien Protein-

S-Anteils bestimmt haben. Der damals neu entwickelte Test, der das Grundprinzip des in der vorliegenden Studie verwendeten funktionellen Protein-S-Clotting-Tests der Fa. Roche darstellt, korrelierte damals in einer Gruppe von n=25 (Kontrollen n=20, Plasmen von Patienten mit gesichertem Protein-S-Mangel n=5) zu $r=0.97$ mit einem ELISA zur Bestimmung des freien Protein S.

4.5 Die Interpretation der Befunde unter dem Aspekt der Lagerungsdauer der Plasmaprobe

Aufgrund der geringen Prävalenz der homozygoten FVL-Mutation in der europäischen Bevölkerung (mit einer Allelfrequenz von ca. 1,5% wird eine Prävalenz von 0,107% in der Bevölkerung vermutet, Rosendaal et al. 1995), war zum Erreichen einer großen Stichprobe wie in der vorliegenden Untersuchung ein längerer Sammelzeitraum (1997-2004) notwendig. Wie die deskriptive Statistik für das durchschnittliche Alter der Proben in Abhängigkeit vom Faktor-V-G1691A-Genotyp zeigt, finden sich in der Gruppe der Patienten mit homozygoter FVL-Mutation die am längsten gelagerten Proben (siehe Abb. 13, Kapitel 3). Deutlich kürzer gelagerte Proben finden sich in der Gruppe der Patienten mit heterozygoter FVL-Mutation und in der Kontrollgruppe/Wildtypgruppe wieder, da wegen der häufigen Allelfrequenz kein langer Sammelzeitraum erforderlich war und asservierte Proben aus früheren Jahren hier nicht zur Verfügung standen. Es wurden im Rahmen der Arbeit verschiedene Untersuchungen zum Thema Lagerungsdauer der Plasmaprobe und funktionelle Protein-S-Bestimmung durchgeführt, da ein Zusammenhang zwischen Abnahme der funktionellen Protein-S-Parameter und längerer Lagerungsdauer möglich erschien. Wir korrelierten daher beide Parameter und fanden zwischen Werten der funktionellen Protein-S-Bestimmung und der Lagerungsdauer der Plasmaprobe einen schwachen, jedoch statistisch nicht signifikanten Zusammenhang ($r=0.39$) (siehe Kapitel 3.5.4.). Dieser ist durch den bekannten, lagerungsbedingten Aktivitätsverlust von Gerinnungsfaktoraktivitäten zu erklären (Woodhams et al. 2001)

Der Vergleich von zum Zeitpunkt der Probenentnahme ermittelten Parametern und im Rahmen des systematischen Experiments ermittelten Parametern bestätigt die Hypothese, dass keine Beeinflussung der Gerinnungsparameter durch die

Lagerungsdauer der Plasmaprobe erfolgt ist. Es konnten keine signifikanten Differenzen zwischen Vorwerten und aktuell ermittelten Werten erhoben werden ($p=0.29$ – $p=0.87$) (siehe Kapitel 3.5.3.).

Wie O'Neill et al. (1999) feststellten, wird bei längerer Lagerung bei Raumtemperatur hauptsächlich Faktor VIII von einer Erniedrigung in Bezug auf das Ausgangshämostasepotenzial betroffen. Die Labilität des Faktor VIII in Bezug auf längere Lagerungszeiten und unterschiedliche Gefriereschwindigkeiten und –temperaturen (Präanalytik) wurde von Woodhams et al. (2001) untersucht. Faktor VIII wird aufgrund seiner Labilität, besonders bei längerer Lagerung bei Raumtemperatur daher auch gerne als Surrogatmarker für die korrekte Präanalytik und Aufbewahrung verwendet und dient indirekt als Stabilitätsfaktor einer Probe (O'Neill et al. 1999). Faktor VIII zeigt sich insbesondere sehr empfindlich gegenüber wiederholten Auftauprozessen (Nifong et al. 2002). In den Hämotherapie-Richtlinien (Gesamtnovelle 2005) wird die Faktor-VIII-Aktivität daher auch als Marker für die Qualitätskontrolle von gefrorenem Frischplasma herangezogen.

In der Untersuchung von O'Neill et al. (1999) wurden Plasmaproben miteinander verglichen, die für 8 h nach der Blutentnahme bei $1-6^{\circ}\text{C}$ oder $20-24^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Nach Ablauf der Zeit wurden beide Proben für weitere 24 h bei 4°C gelagert und anschließend eine Bestimmung der Faktoren V, VII, VIII, X, Fibrinogen und Antithrombin III durchgeführt. Die meisten Parameter waren stabil, die Faktor-VIII-Aktivität wurde jedoch nach 8 h Lagerung bei $20-24^{\circ}\text{C}$ bereits um 13% und nach 24 h Lagerung in beiden Aliquots um 15-20% reduziert. Dies entspricht in beiden Fällen (8 h und 24 h) einer signifikanten Verminderung ($p<0,05$).

Aus dieser Studie können zwei Schlussfolgerungen für die Untersuchung von Protein S gezogen werden. Zum einen zeigt die Studie, dass Protein S weitaus weniger labil gegenüber präanalytischen und lagerungsbedingten Einflüssen als die Faktor-VIII-Aktivität ist (Zeitpunkt der Zentrifugation bis zum Einfrierprozess, Lagerungstemperatur), zum anderen können über die Faktor-VIII-Aktivitäts-Bestimmung Varianzen in der Präanalytik und Einflüsse der Lagerungsdauer erfasst werden. Daher wurde die Faktor-VIII-Aktivitäts-Bestimmung als Surrogatmarker für das Alter der Probe in die Untersuchung mitaufgenommen.

Es konnte bei der koagulometrischen Bestimmung der Faktor-VIII-Aktivität (siehe Abb. 15, Kapitel 3) kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Untergruppen festgestellt werden (homozygote FVL-Mutation: 107%, heterozygote FVL-Mutation: 105%, Wildtyp/Kontrollgruppe: 107% Faktor-VIII-Aktivität; Referenzwerte für die Faktor-VIII-Aktivität 60%-150%), und das, obwohl der Faktor VIII als Akut-Phase-Protein eine starke Schwankungsbreite aufweisen kann (siehe Kapitel 3.5.5.). Auch diese Untersuchung unterstützt eindeutig die Hypothese, dass die Erniedrigung des funktionellen Protein S in der Gruppe der Patienten mit homozygoter FVL-Mutation kein Effekt der Lagerungsdauer der Probe, sondern ein Problem des Testprinzips ist.

Das nur geringe Ausmaß des Lagerungseffektes wird auch anhand der Tabellen 26 bis 28 deutlich, in welchen die Differenzen zwischen dem initial und dem in der vorliegenden Studie gemessenen Werten als relative Differenz ausgedrückt wird. Die Messungen wurden weiterhin einem T-Test für unabhängige Stichproben unterzogen, in welchem kein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten festgestellt werden konnte.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluss der Faktor-V-Leiden-Mutation auf die koagulometrische Protein-S-Bestimmung untersucht. Hierfür wurden zwei kommerziell erhältliche Tests verwendet (STA[®]clot der Fa. Roche Diagnostics und Protein S Ac der Fa. Behring), die beide ein aPTT-basiertes Messprinzip verwenden. Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Testsystemen beruht auf der Zugabe von bovinem Faktor Va zum Test der Fa. Roche Diagnostics. Für die Untersuchung wurden Patienten mit homozygoter FVL-Mutation (n=46) und Patienten mit heterozygoter FVL-Mutation (n=46) aus unserer Ambulanz mit n=46 Kontrollpersonen ohne FVL-Mutation (Wildtyp) alters- und geschlechtsgebunden gematcht. Von jedem Patienten wurde aus einer Citratblutprobe eine Bestimmung des gesamten und freien Protein S, eine funktionelle Protein-S-Bestimmung und eine koagulometrische Faktor-VIII-Bestimmung durchgeführt.

In der vorliegenden Untersuchung konnte die Beeinflussung der koagulometrischen Protein-S-Bestimmung durch die FVL-Mutation mit hoher Signifikanz nachgewiesen werden. Dabei stellte sich weiterhin heraus, dass der Genotyp der FVL-Mutation einen „Dosiseffekt“ auf die funktionelle Protein-S-Bestimmung hatte: Bereits die heterozygote FVL-Mutation wirkte sich durch deutlich verminderte funktionelle Protein-S-Parameter aus. Diese Tendenz war bei der homozygoten FVL-Mutation noch deutlicher ausgeprägt und im Vergleich zu der Wildtyp-Gruppe hochsignifikant. (Wildtyp vs. FVL heterozygot ohne Antikoagulation $p < 0,001$ (Roche und Behring), mit Antikoagulation $p < 0,01$ (Roche), $p < 0,05$ (Behring), Wildtyp vs. FVL homozygot ohne und mit Antikoagulation $p < 0,0001$ (Roche und Behring))

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass bei der immunologischen Bestimmung des gesamten und freien Protein S mittels ELISA kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Subgruppen (FVL heterozygot, FVL homozygot und Wildtyp) bestand. Im T-Test für unverbundene Stichproben wurde das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht erreicht.

Eine Beeinflussung der Protein-S-Aktivität durch längere Lagerungsdauer konnte über den Vergleich mit dem lagerungslabilen Faktor VIII ausgeschlossen werden. Der hierfür verwendete Surrogatmarker in Form der koagulometrischen Faktor-VIII-Bestimmung

erbrachte nahezu identische Mittelwerte in allen drei Gruppen (Wildtyp 107%, FVL heterozygot 105%, FVL homozygot 107%). Der negative Korrelationskoeffizient (funktionelles Protein S versus Alter der Probe) von $-0,082$ (STA[®]clot) und $-0,060$ (Protein S Ac) belegt, dass zwischen diesen beiden Variablen lediglich ein schwacher Zusammenhang besteht.

Zusammenfassend gibt es demnach für Patienten mit FVL-Mutation keine sichere Methode zum Ausschluss eines Protein-S-Mangels Typ II nach Comp. Es besteht die Gefahr der Überdiagnose eines Kombinationsdefektes, der für den Patienten weitreichende therapeutische Konsequenzen haben kann.

Literaturverzeichnis

Amiral J, Grosley M, Boyer-Neumann C, Marfaing-Koka A, Peynaud-Debayle E, Wolf M, Meyer D. New direct assay of free protein S antigen using two distinct monoclonal antibodies specific for the free form. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5: 179-186

Barthels M und von Depka M. *Das Gerinnungskompendium*. Stuttgart - New York: Thieme, 2003

Bates SM und Ginsberg JS. Treatment of deep-vein Thrombosis. *N Engl J Med* 2004; 351: 268-277

Bernard G, Vincent J, LaRosa S, Dhainaut J, Lopez Rodriguez A, Steingrub J, Garber G, Helterbrand J, Ely E. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C and severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344: 81

Bertina RM, Koelemann BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Blom H, van der Velden P, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-76

Bertina RM. Laboratory diagnosis of resistance to activated protein C (APC resistance). *Thromb Haemost* 1997; 78: 478-482

Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Functions of human complement inhibitor C4b-binding protein in relation to its structure. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2004; 52: 83-95

Boyer-Neumann C, Bertina RM, Tripodi A, D'Angelo A, Wolf M, Vigano-D'Angelo S, Mannuci PM, Meyer D, Larrieu MJ. Comparison of functional assays for protein S: European collaborative study of patients with congenital and acquired deficiency. *Thromb Haemost* 1993; 70: 946-950

Brouwer JL, Veeger NJGM, van der Schaaf W, Kluin-Nelemans C, van der Meer J. Difference in absolute risk of venous and arterial thrombosis between familial protein S

deficiency type I and type III. Results from a family cohort study to assess the clinical impact of a laboratory test-based classification. *Br J Haematol* 2005; 128: 703-710

Comp PC, Nixon R, Cooper M, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1984; 74: 2082-2088

Comp PC, Doray D, Patton D, Esmon CT. An abnormal plasma distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. *Blood* 1986; 67: 504-508

Comp PC, Thurnau GR, Welsh J, Esmon CT. Functional and immunologic protein S levels are decreased during pregnancy. *Blood* 1986; 68: 881-885

Comp PC. Thrombophilic mechanisms of OCs. *Int J Fertil Womens Med* 1997; Suppl 1: 170-176

D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Esmon CT, Comp PC. Acquired deficiencies of protein S. Protein S activity during oral anticoagulation, in liver disease, and in disseminated intravascular coagulation. *J Clin Invest* 1988; 81: 1445-1454

D'Angelo SV, Mazzola G, Della Valle P, Testa S, Pattarini E, D'Angelo A. Variable interference of activated protein C resistance in the measurement of protein S activity by commercial assays. *Thromb Res* 1995; 77: 375-378

Dahlbäck B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost* 1991; 66: 49-61

Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson P. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1004-1008

Dahlbäck B. Factor V and protein S as cofactors to activated protein C. *Haematologica* 1997; 82: 91-95

Dahlbäck B. The discovery of activated protein C resistance. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 3-9

Dahlbäck B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Int J Hematol* 2004; 79: 109-116

de Frutos P, Alim R, Hardig Y, Zöller B, Dahlbäck B. Differential regulation of alpha- and beta-chains of C4b-binding protein during acute-phase response resulting in stable plasma levels of free anticoagulant protein S. *Blood* 1994; 84: 815-822

de Ronde H, Bertina R. Laboratory diagnosis of APC-resistance: a critical evaluation of the test and the development of diagnostic criteria. *Thromb Haemost* 1994; 72: 880-886

de Ronde H, Bertina R. Careful selection of sample dilution and factor-V-deficient plasma makes the modified activated protein C resistance test highly specific for the factor V Leiden mutation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10: 7-17

de Stefano V, Simioni P, Rossi E, Tormene D, Za T, Pagnan A, Leone G. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with inherited deficiency of natural anticoagulants antithrombin, protein C and protein S. *Haematologica* 2006; 91: 695-698

DiScipio R, Davie E. Characterization of protein S, a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma. *Biochemistry* 1979; 18: 899-904

Dougherty CS, Lowe-Krentz LJ. Heparin increases protein S levels in cultured endothelial cells by causing a block in degradation. *J Vasc Res* 1998; 35: 437-448.

Faioni EM, Boyer-Neumann C, Franchi F, Wolf M, Meyer D, Mannuci P. Another protein S functional assay is sensitive to resistance to activated protein C. *Thromb Haemost* 1994; 72: 648

Faioni EM, Franchi F, Asti D, Sacchi E, Bernardi F, Mannuci P. Resistance to activated protein C in nine thrombophilic families: Interference in a protein S functional assay. *Thromb Haemost* 1993; 70: 1067-1071

Faioni EM, Franchi F, Bucciarelli P, Margaglione M, de Stefano V, Castamann G, Finazzi G, Mannuci PM. Coinheritance of the HR2 Haplotype in the factor V gene

confers an increased risk of venous thromboembolism to carriers of Faktor V R506Q (Factor V Leiden). *Blood* 1999; 94: 3062-3066

Fernandez JA, Estelles A, Gilabert J, Espana F, Aznar J. Functional and immunologic protein S in normal pregnant women and in full-term newborns. *Thromb Haemost* 1989; 61: 474-478

Gale AJ, Heeb MJ, Griffin JH. The autolysis loop of activated protein C interacts with factor Va and differentiates between the Arg 506 and Arg 306 cleavage sites. *Blood* 2000; 69: 585-593

Goodwin AJ, Rosendaal FR, Kottke-Marchant K, Bovill EG. A review of the technical, diagnostic, and epidemiologic considerations for protein S assays. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 1349-1366

Happich D, Madlener K, Schwaab R, Hanfland P, Pötzsch B. Allelic discrimination of factor V Leiden using a 5' nuclease assay. *Thromb Haemost* 1999;82: 1294-1296

Heeb MJ, Schuck P, Xu X. Protein S multimers and monomers each have direct anticoagulant activity. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 385-391

Henkens CMA, Bom VJJ, Seinen AJ, van der Meer J. Sensitivity to activated protein C; influence of oral contraceptives and sex. *Thromb Haemost* 1995; 73: 402-404

Hertfelder HJ, Harbrecht U, Hanfland P. *Praxisbuch Antikoagulation*. München-Jena: Urban & Fischer 2004

Jennings I, Kitchen S, Cooper P, Makris M, Preston FE. Sensitivity of functional protein S assays to protein S deficiency: a comparison study of three commercial kits. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1112-1114

Kaba NK, Francis CW, Hall WJ, Falsey AR, Smith BH. Protein S declines during winter respiratory infections. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 729-734

Kalafatis M, Rand M, Mann K. The mechanisms of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 1994; 269: 31869-31880

Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 342: 1503-1506

Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandy M, Dahlbäck B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 1996; 76: 651-662

Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandy M, Dahlbäck B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited thrombophilia: Part 2. *Thromb Haemost* 1996; 76: 824-834

Lensen RPM, Bertina RM, de Ronde H, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Venous thrombotic risk in family members of unselected individuals with Factor V Leiden. *Thromb Haemost* 2000; 83: 817-821

Liberti G, Bertina GM, Rosendaal FR. Hormonal state rather than age influences cut-off values of protein S: reevaluation of the thrombotic risk associated with protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1093-1096

Libourel EJ, Bank I, Veeger NJGM, Hamulyak K, Middeldorp S, Prins MH, Büller HR, van der Meer J. Protein S type III deficiency is no risk factor for venous and arterial thromboembolism in 168 thrombophilic families: a retrospective study. *Blood Coag Fibrinolysis* 2005; 16: 135-140

Lundwall A, Dackowski W, Cohen E. Isolation and sequence of the cDNA for human protein S, a regulator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 6716-6720

Malm J, Dahlbäck B. Changes in the plasma levels of vitamin K dependent proteins C and S during pregnancy and oral contraception. *Br J Haematol* 1988; 68: 437

Martinelli I, Manucci PM, de Stefano V, Taioli E, Rossi V, Crosti F, Paciaroni K, Leone G, Faioni EM. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: A study of 150 families. *Blood* 1998; 92: 2653-2658

Matei D, Brenner B, Marder V. Acquired thrombophilic syndromes. *Blood Reviews* 2001; 15: 31-48

Moraes C, Lofthouse E, Eikelboom J, Thom J, Baker R. Detection of protein S deficiency: a new functional assay compared to an antigenic technique. *Pathology* 2000; 32: 94-97

Müller-Berghaus G, Pötzsch B. Hämostaseologie. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1999

Nicolaes GAF, Dahlbäck B. Factor V and thrombotic disease. Description of a Janus-faced protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 530-538

Nicolaes GAF, Dahlbäck B. Congenital and acquired activated protein C resistance. *Semin Vasc Med* 2003; 3: 33-46

Nifong T, Light J, Wenk R. Coagulant stability and sterility of thawed S/D-treated plasma. *Transfusion* 2002; 42: 1581-1584

Norstrom EA, Thorelli E, Dahlbäck B. Functional characterisation of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Blood* 2002;100: 524-530.

Norstrom EA, Steen M, Tran S, Dahlbäck B. Importance of protein S and phospholipid for activated protein C-mediated cleavages in factor Va. *J Biol Chem* 2003; 278: 24904-24911

O'Neill E, Rowley J, Hansson-Wicher M, McCarter S, Ragno G, Valeri C. Effect of 24-hour whole-blood storage on plasma clotting factors. *Transfusion* 1999; 39: 488-491

Owren P. Parahaemophilia: Haemorrhagic diathesis due to the absence of a previously unknown clotting factor. *Lancet* 1947; 1: 446-448

Persson KE, Hillarp A, Dahlbäck B. Analytical considerations for free protein S assays in protein S deficiency. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1144-1147

Persson KE, Dahlbäck B, Hillarp A. Diagnosis protein S deficiency: analytical considerations. *Clin Lab* 2003; 49: 103-110

Preda L, Simioni P, Legnani C, Palareti G, Poggio M, Rossi E, Girolami A. A new global test for the evaluation of the protein C-protein S-system. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7: 465-469

Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 1133-1134

Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, Inflammation and Apoptosis: Different roles for protein S and the protein S-C4b binding complex. *Blood* 2003; 103: 1214-1215

Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Köln: Deutscher Ärzteverlag, 2005.

Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-1508

Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog J. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 1980; 255: 274-283

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

Schmidel DK, Tatro A, Phelps L, Tomczak JA, Long GL. Organization of the human protein S gene. *Biochemistry* 1990; 29: 7845-7852

Serra J, Sales M, Chitolie A, Domenech P, Rossi E, Borrell M, Dahlbäck B. Multicentre evaluation of IL Test free PS: a fully automated assay to quantify free protein S. *Thromb Haemost* 2002; 88: 975-983

Simioni P, Sanson BJ, Prandoni P, Tormene D, Friederich PW, Girolami B, Gavasso S, Huisman MV, Buller HR, Wouter ten Cate J, Girolami A, Prins MH. Incidence of venous thromboembolism in families with inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 1999; 81: 198-202

Simioni P, Tormene D, Prandoni P, Zerbinati P, Gavasso S, Cefalo P, Girolami A. Incidence of venous thromboembolism in asymptomatic family members who are carriers of factor V Leiden: a prospective cohort study. *Blood* 2002; 99: 1938-1942

Simmonds RE, Zöller B, Ireland H. Genetic and phenotypic analysis of a large (122-member) protein-S-deficient kindred provides an explanation for the familial coexistence of type I and type III plasma phenotypes. *Blood* 1997; 89: 4364-4370.

Stafford DW. The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost* 2005;3: 1873-1978

Suzuki K, Nishioka J. Plasma protein S activity measured using Protac, a snake venom derived activator of protein C. *Thromb Res* 1988; 49: 241-251

Svensson PJ, Zoller B, Dahlbäck B. Evaluation of original and modified APC-resistance tests in unselected outpatients with clinically suspected thrombosis and in healthy controls. *Thromb Haemost* 1997; 77: 332-335

Takahashi H, Tatewaki W, Wada K, Shibata A. Plasma protein S in disseminated intravascular coagulation, liver disease, collagen disease, diabetes mellitus, and under oral anticoagulant therapy. *Clin Chim Acta* 1989; 182: 195-208

Tilley R, Mackman R. Tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 5-10

Tracy P, Eide L, Bowie E. Radioimmunoassay of factor V in human plasma and platelets. *Blood* 1982; 60: 59-63

Tripodi A, Chantarangkul V, Negri B, Mannucci PM. Standardization of the APC resistance test. Effects of normalization of results by means of pooled normal plasma. *Thromb Haemost* 1998; 79: 564-566

van de Poel RH, Meijers JC, Bouma BN. C4b-binding protein inhibits the factor V-dependent but not the factor V-independent cofactor activity of protein S in the activated protein C-mediated inactivation of factor VIIIa. *Thromb Haemost* 2001; 85: 761-765

van der Neut Kolfschoten M, Dirven RJ, Vos HL, Trans G, Rosing J, Bertina RM. Factor Va is inactivated by activated protein C in the absence of cleavage sites at Arg-306, Arg-506, and Arg-679. *J Biol Chem* 2004; 279: 6567-6575

van Wijnen M, Stam JG, van't Veer C, Meijers JC, Reitsma PH, Bertina RM, Bouma BN. The interaction of protein S with the phospholipid surface is essential for the activated protein C-independent activity of protein S. *Thromb Haemost* 1996; 76: 397-403

Walker FJ. Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J Biol Chem* 1980; 255: 5521-5524

Walker FJ. Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation. *J Biol Chem* 1981; 256: 11128-11131

Walker FJ. Protein S and the regulation of activated protein C. *Semin Thromb Hemost* 1984; 10: 131-138

Walker FJ. Inactivation of factor VIII by activated protein C and protein S. *Arch Biochem Biophys* 1987; 252: 322-328

Webb JH, Blom AM, Dahlbäck B. The binding of protein S and the protein S-C4BP complex to neutrophils is apoptosis dependent. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 355-359

Weilenmann D, von Felten A. Levels of free and total protein S in women on oral contraceptives and during pregnancy: significant decrease in certain individuals only. *Thromb Haemost* 1991; 65: 1203

Weiss P, Soff GA, Halkin H, Seligsohn U. Decline of proteins C and S and factors II, VII, IX and X during the initiation of warfarin therapy. *Thromb Res* 1987; 45: 783-790

Wolf M, Boyer-Neumann C, Martinoli JL, Leroy-Matheron C, Amiral J, Meyer D, Larrieu MJ. A new functional assay for human protein S activity using activated factor V as a substrate. *Thromb Haemost* 1989; 62: 1144-1145

Wolf M, Boyer-Neumann E, Peynaud-Debayle, Marfaing-Koka A, Amiral J, Meyer D. Clinical applications of a direct assay of free protein S antigen using monoclonal antibodies. A study of 59 cases. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 4: 187-192.

Woodhams B, Girardot O, Blanco M, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12: 229-236

Zöller B, Dahlbäck B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 1994; 343: 1536-1538