

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde  
-Pädiatrische Hämatologie und Onkologie-  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens-

Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den  
Apolipoprotein (a)-Polymorphismen 93 CT und 121 GA und  
Lp(a)-Phänotypisierung unter Berücksichtigung  
thromboembolischer Ereignisse im Kindesalter

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Lubna Halimeh

aus Douma/Syrien

2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. W. Schmitz  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Nowak-Göttl  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Mesters

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde  
-Pädiatrische Hämatologie und Onkologie-  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens-  
Referent: Prof. Dr. med. U. Nowak-Göttl  
Prof. Dr. med. R. Mesters

## Zusammenfassung

### ***Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den Apolipoprotein (a) - Polymorphismen 93 CT und 121 GA und Lp(a) – Phänotypisierung unter Berücksichtigung thromboembolischer Ereignisse im Kindesalter***

Lubna Halimeh

Die präsentierte Studie wurde durchgeführt um den statistischen Zusammenhang zwischen Lp(a), Kringle IV Repeats und den genetischen Polymorphismen 121 GA und 93 CT in einem deutschen Kinderkollektiv mit frühem Auftreten von thromboembolischen Ereignissen (TE) oder venösen Thrombosen (VT) im Vergleich zu nicht betroffenen gesunden Familienmitgliedern (Kernfamilie) zu untersuchen. Weiterhin wurde untersucht welchen Einfluss nicht genetisch bedingte Komponenten (Haushalt/Umwelt) auf die Höhe des Lipoprotein (a) –Spiegels/Kringle IV Struktur sowie auf Fettstoffwechsel und Gerinnungsfaktoren bei Kindern mit TE haben.

Es wurden 1002 erstgradige Familienmitglieder aus 282 Kinder – Schlaganfallfamilien in die Studie aufgenommen. Bei den 282 Patienten und 720 gesunden Kontrollen wurde der Lp(a) – Polymorphismus genotypisiert und der Lp(a) – Spiegel bestimmt.

Es wurden weiterhin bei dem Patienten – und Kontrollkollektiv die Heritabilität und Haushaltseinflüsse für Lp(a), Kringle IV Repeats, Cholesterin, LDL - und HDL – Cholesterin unter Adjustierung von Lebensalter, Geschlecht, Rauchen, Einnahme der „Pille“ untersucht.

In dem hier durchgeführten wissenschaftlichen Projekt konnten wir keine Assoziation zwischen den genetischen Lp(a)-Polymorphismen 121 GA und 93 CT und dem frühen Auftreten thromboembolischer Ereignisse und venöser Thrombosen in Familienbasierenden Ansätzen finden.

Die Familienbasierende Varianzanalyse im TE-Kollektiv hat ergeben, dass hohe Werte von Lp(a) und die dazugehörigen Lp(a) Phänotypen in circa 80% genetisch bedingt sind, und dass weder die Kovariaten Rauchen, Hormontherapie und Geschlecht noch Haushalts-/Umweltkomponenten diese Spiegel signifikant beeinflussen.

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2010

Diese Arbeit ist meinen Eltern  
Dr. Salim und Hiam Halimeh  
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Hämostaseologie	1
1.1.1 Blutstillung	1
1.1.2 Das exogene und endogene Gerinnungssystem	3
1.1.3 Physiologische Inhibitoren der Gerinnung	5
1.1.4 Fibrinolyse	7
1.1.5 Entwicklung der Hämostase	11
1.2 Thrombophilie	14
1.3 Thrombosen	22
1.3.1 Definition	22
1.3.2 Pathophysiologie	22
1.3.3 Risikofaktoren – angeboren	23
1.3.4 Risikofaktoren – erworben	25
1.4 Schlaganfall	27
1.4.1 Definition	27
1.4.2 Pathophysiologie	27
1.4.3 Der Schlaganfall im Kindesalter	28
1.5 Zytologie und Genetik	30
1.5.1 Die Zelle	30
1.5.2 DNA –Aufbau	31
1.5.3 DNA – Replikation	33
1.6 Studienziel	35

<b>2. Methoden und Patientenkollektiv</b>	<b>36</b>
2.1 Informationen über die Studienteilnehmer	36
2.1.1 Studiendesign und Studiengruppen	36
2.1.2 Patienten – und Kontrollkohorte	37
2.2 Definition genetisch – epidemiologischer Begriffe	38
2.2.1 Genetische Variabilität und Heritabilität	38
2.3 Blutentnahmeprotokoll	39
2.4 Labormethoden	40
2.4.1 Lp(a) – Bestimmungsmethoden	40
2.4.1.1 Immunassay (ELISA)	40
2.4.1.2 HITACHI	42
2.4.2 Lp(a) – Phänotypen	43
2.5 Genetische Analysen	44
2.5.1 Blutentnahme für genetische Analysen	44
2.5.2 DNA – Isolierung	45
2.5.3 Polymerase – Kettenreaktion	46
2.5.4 Agarosegelelektrophorese	51
2.5.5 DNA – Restriktion	52
2.5.6 Elektrophorese nach Restriktion	54
2.5.7 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	55
2.5.8 Sequenzierung	55
2.6 Geräte	63
2.7 Statistische Methoden	64
2.7.1 Median	64
2.7.2 Nullhypothese – Alternativhypothese	64
2.7.3 Die 4-Feldertafel	64
2.7.4 Chi – Quadrat – Test	65
2.7.5 Fisher´s exact Test	65
2.7.6 Odds Ratio	65
2.7.7 Logistische Regression	66
2.7.8 Haplotypanalyse	67
2.7.9 Transmission – Disequilibrium – Test (TDT)	67
2.7.10 Varianzkomponentenanalyse (Solar)	68
2.7.11 Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test	68
2.7.12 Kruskal-Wallis-Test	68

2.7.13 Bonferroni	69
2.7.14 Kolmogrov-Smirnov	69
2.8 Statistischer Hintergrund für die phänotypische Varianz	69
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>71</b>
3.1 Ziel der Untersuchung	71
3.2 Patienten – und Kontrollkohorte	71
3.3 Einfluss auf den Fettstoffwechsel	73
3.4 Phänotypische Varianz	74
3.5 Zusammenhang zwischen den Lp(a)-Mutationen und dem Auftreten von TE und VT	75
3.5.1 Ergebniss der Sequenzierung	75
3.5.2 PCR zur Genotypisierung der Mutationen 93 CT und 121 GA im Lp(a) –Gen	75
<b>4. Diskussion</b>	<b>78</b>
4.1 Einfluss genetischer Polymorphismen auf den Fettstoffwechsel und die Gerinnungsparameter sowie auf das frühe Auftreten von thromboembolischen Ereignissen	79
4.2 Einfluss nicht-genetischer Faktoren auf den Fettstoffwechsel und die Gerinnungsfaktoren sowie auf die Höhe des Lp(a)-Spiegels und der Kringle IV Struktur	82
4.3 Einfluss des Fettstoffwechsels und der Gerinnung	84
4.4 Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen	87
<b>5. Literatur</b>	<b>89</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>107</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>109</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Hämostaseologie

Die Lehre von der Blutstillung oder Hämostaseologie umfasst das Zusammenspiel von Gefäßwand, Thrombozyten, plasmatischen Gerinnungsfaktoren und Fibrinolysemechanismen (Kleihauer et al. 1978).

Im Rahmen der primären Hämostase oder Blutstillung entsteht zunächst ein Plättchenthrombus, der nach etwa 1-3 Minuten Blutungszeit zur vorläufigen Blutstillung führt.

Durch enzymatische Bildung eines Fibringerüstes (sekundäre Hämostase oder Blutgerinnung) wird dieser Thrombus vergrößert und verfestigt. Später wird der Thrombus organisiert und überflüssiges Fibrin durch das fibrinolytische System aufgelöst.

Unter physiologischen Bedingungen stehen Gerinnung und Fibrinolyse in einem Gleichgewicht, das aber unter pathologischen Bedingungen sowohl zugunsten der Gerinnungsförderung als auch der Gerinnungshemmung mit daraus resultierender Thrombose- bzw. Blutungsneigung verschoben sein kann.

### 1.1.1 Blutstillung

Als Blutstillung werden die physiologischen Reaktionen auf einen durch eine Gefäßverletzung von Arteriolen oder Venolen drohenden Blutverlust bezeichnet. Bei Verletzung größerer Gefäße ist zumeist eine spontane Blutstillung nicht möglich (Kleihauer et al. 1978).

Der Ablauf der Blutstillung lässt sich in drei Phasen aufteilen, wobei die Übergänge fließend sind (Hiemeyer et al. 1972, Weiß et Jelkmann 1997):

#### **1. Posttraumatische Sofort- oder Frühphase**

(reflektorische Vasokonstriktion, Thrombozytenadhäsion, Aktivierung des Extrinsic- und des Intrinsic-Systems)

In dieser Phase kommt es an Gefäßen mit glatter Muskulatur zu einer proximal und distal der Läsion auftretenden reflektorischen Vasokonstriktion,

so dass sich der Blutstrom verlangsamt und sowohl die zelluläre als auch die plasmatische Gerinnung begünstigt wird. Diese als Reparaturischämie bezeichnete Kontraktion glatter Muskelzellen wird ausgelöst durch aus der Gefäßwand und den Thrombozyten freigesetzte Katecholamine sowie Serotonin und ADP.

In der Mehrzahl werden allerdings Kapillaren lädiert, die keine glatten Muskelzellen besitzen, so dass die Blutstillungsmechanismen vielmehr durch den direkten Blut-Gewebe-Kontakt ausgelöst werden (Hemker et Poliwoda 1997).

Entscheidend für die Aktivierung der Thrombozyten ist ihr Kontakt mit den Kollagenen Typ IV und V der Basalmembran, die durch den Defekt in der Gefäßintima freigelegt werden. Vermittelt wird die Adhäsion der Blutplättchen durch subendotheliale Glykoproteine wie dem Fibronectin und vor allem dem von-Willebrand-Faktor (vWF).

Der vWF ist ein oligomeres Glykoprotein, das in Endothelzellen und  $\alpha$ -Granula der Plättchen gespeichert wird, sowie im Plasma als Trägerprotein für den Faktor VIII vorhanden ist (Walsh 1985).

Durch Brückenbildung des vWF zwischen subendothelialen Strukturen und einem spezifischem Rezeptor der Thrombozytenmembran, dem Glykoprotein Ib, verformen sich die Blutplättchen unter Ausbildung von Pseudopodien kugelig.

Zu einer sprunghaften Thrombinbildung kommt es durch Aktivierung des Extrinsic- und des Intrinsic-Systems .

## **2. Ausbildung eines reversiblen Gefäßwandverschlusses**

Aus verletzten Endothelzellen freigesetztes ADP bzw. ATP und die tiefer im Gewebe liegenden Kollagene Typ I und III lösen eine reversible Plättchenaggregation aus. Praktisch gleichzeitig wird die Thromboxansynthese und damit die irreversible Thrombozytenaggregation durch Thrombin eingeleitet (Weiss et Jelkmann 1997).

Durch die Reaktion von Thrombin mit spezifischen Rezeptoren der Thrombozytenmembran werden intrazelluläre Proteine phosphoryliert und  $Ca^{2+}$ -Ionen freigesetzt. Diese Reaktion aktiviert die calciumabhängige Phospholipase A<sub>2</sub>, die wiederum die Freisetzung der Arachidonsäure ka-

talisiert. Das Enzym Zykllooxygenase wandelt diese um in die Endoperoxyde PGG<sub>2</sub> und PGH sowie in die Thromboxane A<sub>2</sub> und B<sub>2</sub>. Diese lösen die irreversible Aggregation und eine Strukturauflösung der Plättchen aus, wobei  $\alpha$ -Granula (mit verschiedenen Plasmaproteinen), Dense bodies (mit ATP, Serotonin und Calcium) und Lysosomen aus Speichergranula frei werden.

Die Lysosomen spielen für die Proteinverdauung eine wichtige Rolle (Hemker et Poliwoda 1997).

### **3. Verfestigung des Gefäßwandverschlusses**

Die visköse Metamorphose der Thrombozyten - so werden alle morphologischen, biochemischen und funktionellen Thrombozytenveränderungen bezeichnet - wird dadurch vollendet, dass Thrombin aus dem im Plasma gelösten Fibrinogen Fibrin abspaltet, welches das fadenähnliche Gerüst des Gerinnsels bildet.

Zur Verfestigung der faserigen Fibrinstrukturen bedarf es des aktivierten Faktors XIII, dessen Wirkung durch Thrombin sowie subendotheliales Fibronektin an den Defekträndern verstärkt wird. Fibrinfäden vernetzen sich mit den zwischen ihnen gefangenen Blutzellen zu einem Maschenwerk, dem gemischten oder roten Thrombus. Dieser verschließt das eröffnete Gefäß, indem er an dessen Rändern haftet und diese durch Retraktion zusammenzieht. Dazu ist eine von den Thrombozyten freigesetzte ATPase, das Thrombostenin, erforderlich (Gaetgens 1994).

Bei nachlassender Vasokonstriktion im Verletzungsbereich verhindert die Retraktion das Herausspülen des Plättchenpropfes und schafft gleichzeitig günstige Bedingungen für das Einsprossen von Bindegewebszellen.

### **1.1.2 Das exogene und das endogene Gerinnungssystem**

Die Bildung von Fibrin kann sowohl über das exogene als auch das endogene Gerinnungssystem erfolgen. Beide sind sowohl durch wechselseitige Interaktionen miteinander als auch mit der Thrombozytenaktivierung verknüpft und führen zu einer Aktivierung des im Überschuss vorhandenen Faktors X zu Xa.

### **Das Extrinsische (exogene) System**

Das Extrinsic-System wird durch Lipoproteine (Gewebethromboplastin) aktiviert, welche bei einer Gefäßläsion freigesetzt werden.

Durch Gewebethromboplastin (Faktor III) wird zunächst der frei im Plasma zirkulierende Faktor VII aktiviert, der dann in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen den Faktor IX und X aktiviert.

Die Gerinnungsfaktoren IX und X wirken wiederum positiv auf den Faktor VII ein und beschleunigen damit den Gerinnungsablauf (Williams et Norris 1966, Zur et al. 1982).

Faktor Xa allein wandelt Prothrombin nur langsam zu Thrombin um. Diese Reaktion wird um ein Vielfaches beschleunigt durch Anwesenheit bestimmter Membranoberflächen (negativ geladener Phospholipide), Calciumionen und vor allem Faktor V, der als Cofaktor fungiert (Jobin et Esnouf 1967, Hemker et Poliwoda 1997).

Thrombin spaltet vom Fibrinmolekül die Fibrinopeptide A und B ab, wobei sich die verbleibenden Fibrinmonomere zu Fibrinpolymeren zusammenschließen. Die Bildung kovalenter Querverbindungen zwischen den Fibrinmonomeren unter Einwirkung von Faktor XIII, einer Plasmatransglutaminase, stabilisiert das Fibrinnetz, so dass das Fibringerinnsel weitgehend gegen den fibrinolytischen Abbau durch Plasmin geschützt ist (Bettelheim 1956, Blombäck et al. 1978, Mc Kee et al. 1970).

Da von der Aktivierung des Faktors VII bis zur Fibrinbildung nur wenige Schritte notwendig sind, reagiert das exogene System vergleichsweise schnell auf Gefäßverletzungen. Allerdings reicht die Menge des auf diese Weise gebildeten Thrombins nicht für die vollständige Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin aus (Gaehtgens 1994).

### **Das Intrinsische (endogene) System**

Aufgrund einer höheren Anzahl von Reaktionsschritten verläuft die endogene Gerinnung langsamer als die exogene, bildet aber ausreichende Mengen von Thrombin.

Der Hagemann-Faktor (Faktor XII) aktiviert das endogene System, indem er nach Adsorption an subendotheliale Kollagenfasern seine Konformation ändert und so durch Kallikrein in seine aktive Form, den Faktor XIIa über-

führt wird. Im Sinne einer positiven Rückkopplung katalysiert der Faktor XIIa wiederum die Umwandlung von Präkallikrein zu Kallikrein.

Nachdem Faktor XIIa auch den Faktor XI aktiviert hat, wandelt letzterer in Anwesenheit von Calciumionen Faktor IX (Christmas-Faktor) in seine aktive Form (Faktor IXa) um (Bouma et Griffin 1977).

Da auch der Faktor VIIa den Faktor IX aktivieren kann (s.o.), besteht hier eine Verbindung zwischen dem exogenen und endogenen System, die als Josso-Schleife bezeichnet wird (Hemker 1984, Hemker et Beguin 1991, Ma et al. 1989).

Faktor IXa löst anschließend unter Mitwirken von Phospholipiden, Ca<sup>2+</sup>-Ionen und dem Gerinnungsfaktor VIIIa die Aktivierung von Faktor X aus.

Im weiteren Verlauf der Gerinnungskaskade folgt im intrinsischen wie im extrinsischen System die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin durch den Faktor Xa.

### **1.1.3 Physiologische Inhibitoren der Gerinnung**

Damit es nicht zu einer unkontrollierten Thrombenbildung im Gefäßsystem kommt, ist ein Regulationsmechanismus erforderlich, um die Blutgerinnung auf den Verletzungsbereich zu beschränken.

Zu den wichtigsten Inhibitoren der Gerinnungskaskade gehören die Antithrombine, Alpha2-Makroglobulin, C1-Inaktivator, Heparinkofaktor II (HK II), Thrombomodulin, Protein C und Protein S.

#### **Antithrombin**

Das frei im Plasma zirkulierende Antithrombin inaktiviert Thrombin und die Gerinnungsfaktoren Xa, IXa, XIa und XIIa, sowie Kallikrein und Plasmin durch Komplexbildung irreversibel (Burrowes et al. 1975, Damus et al. 1973, Highsmith et Rosenberg 1974).

In Abwesenheit von Heparin verläuft die Komplexbildung zwischen hämostatischen Enzymen und Antithrombin nur langsam, sodass die Inaktivierung der Enzyme erst erfolgt, nachdem sie ihre physiologische Funktion erfüllt haben. Demnach kann die Blutgerinnung am Ort der Verletzung ungestört erfolgen, wobei aber eine Verschleppung aktivierter Gerinnungs-

faktoren in den Blutkreislauf mit der Gefahr von Thrombenbildung verhindert wird.

Viele der oben genannten Serinproteasen und Plasmin werden auch vom  $\alpha$ 2-Makroglobulin inaktiviert, indem es die Substrate in seiner „Käfigstruktur“ einfängt (Feldman et al. 1985).

Der C1- Inaktivator (C1-Esteraseinhibitor) hemmt Faktor XIIa (Mannhalter 1999) und ist der wichtigste natürliche Inaktivator von aktiviertem Präkallikrein (Müller-Esterl 1999).

Der Heparinkofaktor II (HC II) inaktiviert Thrombin und zwei weitere Serinproteasen. Ähnlich wie beim Antithrombin wird die Reaktionsgeschwindigkeit von HC II in Anwesenheit von Heparin um das 10 000fache gesteigert (Tollefsen et al. 1982).

### **Protein C und Protein S**

Das Vitamin-K-abhängige Protein C wird durch einen Komplex aus Thrombin und Thrombomodulin, einem Rezeptor an der Oberfläche von Endothelzellen, etwa 20.000 fach stärker aktiviert als durch ungebundenes Thrombin (Esmon et Owen 1981).

Aktiviertes Protein C (APC) hemmt calcium- und phospholipidabhängig die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa, die beide keine eigene enzymatische Aktivität besitzen, durch limitierte Proteolyse (Kisiel 1979, Marlar et al. 1982, Vehar et Davie 1980, Walker et al. 1979).

Wenn APC an seinen Kofaktor, das Vitamin-K-abhängige Protein S, binden kann, wird die enzymatische Spaltung von Faktor Va und VIIIa beschleunigt (Gardiner et al. 1984, Walker 1980, Walker 1981).

Protein S zirkuliert im Plasma in zwei Formen, von denen nur die ungebundene Form, das sogenannte freie Protein S (30-40%) als APC-Kofaktor wirkt. In der inaktiven Form bildet es mit einem C4b-Bindungsprotein einen Komplex und regelt die klassische Komplementkaskade (Dahlbäck 1991).

### **1.1.4 Fibrinolyse**

Die Fibrinolyse ist als Gegenstück zur Blutgerinnung ein Schutzmechanismus des Organismus, der dazu dient, Fibrin dort wieder aufzulösen, wo es keine physiologische Funktion mehr ausübt. Sie führt so zur Wiederherstellung des vaskulären Blutflusses.

Fibrin wird durch das proteolytische Enzym Plasmin gespalten, das aus dem in der Leber synthetisierten Plasminogen entsteht.

Plasmin spaltet außerdem Fibrinogen, Prothrombin und die Gerinnungsfaktoren V, VIII, IX, X und XII. Plasmin bewirkt daher nicht nur die Auflösung von Blutgerinnseln, sondern auch eine Verminderung der Blutgerinnungsfähigkeit (Weiß et Jelkmann 1994).

Bei der enzymatischen Aufspaltung von Fibrinogen entstehen Spaltprodukte, die sowohl die Fibrinpolymerisation als auch die Thrombozytenaggregation hemmen und so im Sinne eines negativen feed-back-Mechanismus wirken.

#### **Aktivierung der Fibrinolyse**

Der wichtigste Aktivator der Fibrinolyse ist der Gewebeplasminogenaktivator (t-PA), der bereits in der aktiven Form aus Endothelzellen als Single-Chain-t-PA (sct-PA) freigesetzt wird (Binder et al. 1979).

Unter physiologischen Bedingungen bildet t-PA mit dem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) einen Komplex. Lediglich 5% des t-PA liegen in der nativen Form ungebunden vor, so dass eine generalisierte, durch t-PA ausgelöste Fibrinolyse verhindert wird (Kristensen et al. 1984, Sprengers et Kluft 1987, Kluft 1988).

Der ungebundene Anteil kann allerdings stark erhöht werden durch die lokale Freisetzung von t-PA, die ausgelöst wird durch Stress, venösen Stau, Thrombin oder vasoaktive Substanzen (Bachmann 1987, Levin et Santell 1988).

Die katalytische Aktivität von t-PA wird durch die Anwesenheit von Fibrin um das 200-bis 300 fache gesteigert. Denn wenn die lokale Konzentration an Fibrinmonomeren ansteigt, dissoziiert der t-PA/PAI-Komplex und erhöht so die Konzentration an freiem t-PA.

Faktor Xa, Plasmin und Kallikrein wandeln sct-PA in die aktivere zweikettige Form (tc t-PA) um. Sowohl sct-PA als auch tct-PA kann Plasminogen zu Plasmin aktivieren.

Ein weiterer Aktivator des Plasminogens ist der „urokinase-like plasminogen activator“ (u-PA), über den die extravasale Proteolyse erfolgt. Er wird sezerniert von Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Tumorzellen und kann ebenfalls in der einkettigen (scu-PA) oder in der zweikettigen Form (tcu-PA) vorliegen.

Jedoch ist das Einkettenmolekül scu-PA nur zellgebunden in Anwesenheit eines Fibringerinnsels aktiv, während tcu-PA Plasminogen auch in freier Lösung aktivieren kann (Fleury et al. 1993, Priglinger et Binder 1999).

Die Umwandlung von scu-PA zu tcu-PA bewirken Plasmin und Faktor XIIa-abhängiges Kallikrein.

Faktor XIIa ist als Blutaktivator auch an der intravaskulären Fibrinolyse beteiligt, benötigt aber zur Wirksamkeit sogenannte Proaktivatoren. Die wichtigsten Proaktivatoren (u.a. Präkallikrein) sind Lysinokinasen, die durch traumatische oder entzündliche Gewebeschäden aus Blutzellen freigesetzt werden (Weiß et Jelkmann 1994).

Indirekt aktiviert auch Protein C die Fibrinolyse über eine Hemmung des Plasminogenaktivatorinhibitors (PAI 1).

Durch die Bindung und Aktivierung von Plasminogen und Plasminogenaktivator wird nicht nur die Fibrinolyse gestartet, sondern es werden auch weitere Proteasen wie Stromelysin und Kollagenase aktiviert und Wachstumsfaktoren sowie Zytokine lokal freigesetzt (Binder 1990, Ossowski et al. 1991).

Hierdurch kommt es zu einer engen Kopplung von destruktiven (Gewebeabbau), protektiven (Immunität) und reparativen (Zell- und Bindegewebsvermehrung) Vorgängen (Priglinger et Binder 1999).

## **Hemmung der Fibrinolyse**

Die Inhibitoren der Fibrinolyse werden in Antiaktivatoren und Antiplasminen eingeteilt. Die drei wichtigsten Antiaktivatoren sind Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) und Typ 2 (PAI-2), sowie ein histidinreiches Glykoprotein, welche die Fibrinolyse durch Verhinderung der Plasminogenaktivierung hemmen.

Der hauptsächlich in Endothelzellen und Thrombozyten gebildete PAI-1 geht mit allen physiologischen Plasminogenaktivatoren stabile 1:1-Komplexe ein (Wiman et al. 1984).

PAI-2, hauptsächlich in Makrophagen und Plazenta gebildet, hemmt nur die zweikettige Form von t-PA und u-PA (Lecander et Astedt 1986).

Histidinreiches Glykoprotein geht mit zirkulierendem Plasminogen reversible Bindungen ein, so dass die Bindung von Plasminogen an Fibrin verhindert wird (Lijnen et al. 1980).

Demgegenüber stören Antiplasminen wie  $\alpha_2$ -Antiplasmin,  $\alpha_2$ -Makroglobulin und C1-Inaktivator die Fibrinolyse, indem sie das aktivierte Plasmin deaktivieren.

$\alpha_2$ -AP inaktiviert sehr schnell freies Plasmin durch Komplexbildung. Zusätzlich hemmt es kompetitiv Plasminogen, da es ebenfalls an Fibrin bindet. In das entstehende Fibringerinnsel eingebaut, ist es funktionell aktiv und bewirkt eine Resistenz des Fibrinnetzes gegenüber einer plasmininduzierten Fibrinolyse (Moroi et Aoki 1977, Wallen et al. 1983).

$\alpha_2$ -Makroglobulin neutralisiert Kallikrein und t-PA, und bindet überschüssiges Plasmin, wenn die Bindungskapazität von  $\alpha_2$ -AP überschritten ist.

C1-Inaktivator hemmt, wie schon erwähnt, Kallikrein, und den Faktor XIIIa und somit auch die Umwandlung von scu-PA zu tcu-PA. Aber er neutralisiert auch direkt Plasmin (Bachmann 1987).

## **Lipoprotein (a) –Erhöhung**

Lipoprotein (Lp) (a) ist eine verwandte Substanz der low-density Lipoproteine (LDL), da es eine Proteinkomponente des LDLs, das Apolipoprotein (Apo) B, und ebenso wie LDL einen hohen Cholesterinanteil enthält.

Ein zusätzliches und charakteristisches Protein des Lp(a) ist durch Disulfidbrücken mit dem Apo B 100 verbunden und wird als Apolipoprotein (Apo) (a) bezeichnet.

Das Gen von Apo(a) liegt auf Chromosom 6q2,6 - q2,7 in enger Nachbarschaft zu Plasminogen, zu dem Apo(a) und seine cDNA eine hohe Homologie aufweisen (McLean et al. 1987, Murray et al. 1987).

So enthält Apo(a) die Proteasedomäne des Plasminogens, die durch einen Aminosäureaustausch des Arginins durch Serin inaktiviert ist, eine Kopie des Kringel V und eine variable Anzahl des Kringel IV. Marcovina et al. zeigten 1993, dass die unterschiedliche Größe der Apo(a)-Isoforme, deren Gewicht zwischen 200 und 800 kilo Dalton variiert, mit einer unterschiedlichen Anzahl von Kringel IV Typ 2-Sequenzen im Apo(a)-Gen korreliert. Zwischen dem Gewicht von Apo(a) und der Lp(a)-Serumkonzentration scheint eine negative Korrelation zu bestehen (Utermann 1989). Die genetisch festgelegte variable Anzahl von Kringel IV und anderen Polymorphismen im Apo(a)-Gen bestimmen zum größten Teil die interindividuellen Unterschiede der Lp(a)-Konzentration (Boerwinkle et al. 1992, Nowak-Goettl et al. 1999).

In vitro und in vivo greifen Lp(a) und Apo(a) an mehreren Stellen antifibrinolytisch in das Gerinnungs- und Fibrinolyse-System ein. So hemmt Lp(a) die Bindung von Plasminogen an seinen Rezeptor am Endothel oder auf mononukleären Zellen (Hajjar et al. 1989, Miles et al. 1989). Außerdem konkurriert Lp(a) mit t-PA um Bindungsstellen an Fibrin und hemmt t-PA durch Bindung an sich selbst auch direkt (Loscalzo et al. 1990, Simon et al. 1991).

Zusätzlich bedingen erhöhte Lp(a)-Konzentrationen ein vermehrtes Angebot von Lp(a) in der Gefäßwand und fördern so, ähnlich wie LDL, die arteriosklerotische Entwicklung.

Ein Zusammenhang zwischen erhöhten Lp(a)-Werten und dem Risiko für koronare Herzkrankheiten ist aus klinischen Studien offensichtlich; besonders ab einer Lp(a)-Konzentration >30 mg/dl steigt das Risiko stark an (Cremer et al. 1994, Utermann 1989, Wald et al. 1994).

### 1.1.5 Entwicklung der Hämostase

Zum größten Teil sind die Faktoren, die zur Sicherung einer funktionsfähigen Hämostase beitragen, schon vor Erreichen eines lebensfähigen Gestationsalters im fetalen Blut nachweisbar (Bleyer et al. 1971, Holmberg et al. 1974).

Aber das Gerinnungsgleichgewicht der Früh- und Neugeborenen ist sehr störanfällig und weist viele Besonderheiten auf, die für die Bewertung und Zuordnung hämostaseologischer Veränderungen von Bedeutung sind.

Die Gerinnungsfaktoren werden im endoplasmatischen Retikulum, im Gefäßendothel und in der Leber gebildet. Die Leber entsteht in der Embryonalperiode aus dem Mesenchym des Septum transversum und Abschnitten des Vorderdarms und beginnt ab der 6. Schwangerschaftswoche (SSW) mit der Hämatopoese. Bereits ab der 5. SSW setzt die Fibrinogensynthese ein (Gitlin et Biasucci 1969) und ab der 11. SSW sind Thrombozyten nachweisbar (Gibson 1989).

Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren sind schon während der 12.-24. SSW nachweisbar und liegen bei ca. 20% der Erwachsenenorm (Forestier 1985, Holmberg 1974). Auch alle anderen Gerinnungsfaktoren zirkulieren bereits im Blut und zwar in Höhe von ca. 30% der Erwachsenenwerte.

Die Aktivität der Gerinnungsfaktoren steigt erst im letzten Trimenon deutlich an. Auch die Konzentration des Vitamin K - abhängigen Protein C ist zu Beginn der Schwangerschaft deutlich erniedrigt. Demnach existiert in diesem Alter wahrscheinlich ein funktionsfähiges Gerinnungssystem, das jedoch auf einem niedrigeren Niveau als im Erwachsenenalter arbeitet.

Bei gesunden Frühgeborenen und reifen Neugeborenen zeigen sich schon normale Werte für Fibrinogen, während die Kontaktphasefaktoren XI und XII, sowie Präkallikrein noch erniedrigt sind und erst innerhalb der ersten 6 Lebensmonate auf subnormale Erwachsenenwerte ansteigen.

$\alpha$ 2-Antiplasmin und C1-Inaktivator, Inhibitoren der Fibrinolyse, steigen bereits bis zum 3. Lebensmonat auf normale Erwachsenenwerte an und ab dem 6. Lebensmonat sogar über diese hinaus. Das zu den Inhibitoren der

Fibrinolyse zählende  $\alpha$ 2-Makroglobulin ist schon bei der Geburt erhöht, und erreicht im 6. Lebensmonat das Doppelte der Erwachsenenorm.

Perinatal erhöhte Werte lassen sich bei Faktor V, VII, VIII und beim von-Willebrand-Faktor messen, die sich aber alle bis zum 6. Lebensmonat normalisieren (Andrew et al. 1988).

Protein C und Prothrombin sind bei Geburt erniedrigt und erreichen die untere Grenze der Erwachsenenwerte erst zu Beginn des 4. Lebensjahres (Nardi et al. 1986).

Protein S kann sogar bis zum 18. Lebensjahr unter der Norm der Erwachsenenwerte liegen (Hach-Wunderle 1990).

Eine weitere Besonderheit stellt der im Plasma von Früh- und Neugeborenen nachweisbare Heparin-like Inhibitor dar, der möglicherweise als Thromboseschutz fungiert (Muller et al. 1977).

Auch ein fetales Antithrombinmolekül wird beschrieben, das zwar eine quantitative, aber keine qualitative Erniedrigung aufweist (McDonald et al. 1982).

Das fetale Fibrinogen unterscheidet sich vom Fibrinogen Erwachsener durch eine Überladung mit Neuraminsäure in der Leber, wodurch es relativ unempfindlich gegenüber Thrombozyten ist (Gibson 1989).

Die niedrigen Werte der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren sind nicht, wie früher angenommen, auf einen Vitamin K Mangel, sondern auf die unreife Leber zurückzuführen, da Vitamin K plazentagängig ist und auch bei Vitamin K Substitution kein Anstieg dieser Gerinnungsfaktoren erfolgt (Aballi et de Lameres 1962, Peters et al. 1985).

In der Neugeborenenphase sprechen demnach vor allem zwei Ursachen für ein noch unreifes Gerinnungssystem: Zum einen ist die fibrinolytische Aktivität vermindert durch verringerte Werte von Plasminogen und erhöhte Werte von  $\alpha$ 2-Antiplasmin und  $\alpha$ 2-Makroglobulin. Auf der anderen Seite sind auch die Werte von Inhibitoren der Gerinnung (Antithrombin, Protein C und S) vermindert bei erhöhter Konzentration an Faktor VIII.

Hieraus resultiert eine Hyperkoagulabilität, die in der Neonatalphase unter anderem dem physiologischen Verschluss der Nabelgefäße dient, die aber bei gesunden Neugeborenen nicht zu einer Thrombophilie führt.

Allerdings ist das Gerinnungsgleichgewicht besonders bei Neugeborenen sehr labil, so dass bereits banale Ursachen mit einem Thromboserisiko einhergehen können (Corrigan 1985).

Dabei sollte besonders in diesem Alter eine Früherkennung hämostaseologischer Probleme im Vordergrund stehen, damit eine gezielte Therapie möglich wird. Denn die therapeutischen Möglichkeiten sind begrenzt, da nur geringe Mengen an Volumen (5-10 ml/kg KG) substituiert werden können.

Vom 7. Lebensmonat bis zum 18. Lebensjahr stehen die Gerinnungskomponenten in einem solchen Verhältnis zueinander, dass das Risiko einer Thrombose niedriger ist als im Erwachsenenalter (Andrew et al. 1992).

### **Normalwerte im Kindesalter**

Die Werte der Gerinnungsparameter bei Kindern und Jugendlichen können teilweise stark von der Erwachsenennorm abweichen. So liegen die Werte des von-Willebrand-Faktors mit 52-140% der Erwachsenenwerte durchaus noch im Normbereich, während die Werte des Fibrinolyseinhibitors  $\alpha_2$ -Antiplasmin mit 92% bis 155% und des  $\alpha_2$ -Makroglobulins mit 261% bis 731% deutlich darüber liegen.

Dagegen sind die Werte für Protein C, Antithrombin, Fibrinogen und Plasminogen in der Regel im Bereich der Erwachsenenwerte angesiedelt (Nowak-Göttl 1991).

## 1.2 Thrombophilie

Unter Thrombophilie wird die Tendenz zur Ausbildung von venösen oder arteriellen Thrombosen verstanden.

Als hereditäre Thrombophilie bezeichnet man eine erbliche Thromboseneigung, die in der Bevölkerung mit einer Häufigkeit von 1:2.500 bis 1:5.000 vorliegt (Mannucci 1987).

Diese Defekte müssen nicht notwendigerweise eine dauerhafte klinische Beeinträchtigung bedeuten. Vielmehr besteht eine reduzierte Fähigkeit, den Zustand eines eukoagulatorischen Gleichgewichts unter dem Einfluss exogener und endogener Faktoren aufrecht zu halten (Lane et al. 1996).

Ursachen einer Thrombophilie können zum Beispiel sein:

- APC-Resistenz (Faktor V G1691A)
- Antithrombin III-Mangel
- Protein C-Mangel
- Protein S-Mangel
- Prothrombin G20210A-Mutation
- Lipoprotein (a)-Erhöhung
- Antiphospholipidantikörper
- Hyperhomocysteinämie
- Erhöhung des histidinreichen Glykoproteins
- Thrombomodulin-Mangel bzw.-Defekte
- Glykoprotein IIb/IIIa-Defekte und Störungen der Fibrinolyse durch
- Plasminogenmangel und Dysplasminogenämie
- kongenitale Dysfibrinogenämie
- erhöhte Aktivität des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (PAI).

### **APC-Resistenz**

Die APC-Resistenz basiert in den meisten Fällen auf einer Punktmutation des Faktor V-Gens in Nukleotidposition 1691 auf Chromosom 1, bei der Guanin gegen Adenin ausgetauscht ist und daher als Faktor V-G1691A-Mutation bezeichnet wird (Bertina et al. 1994, Wang et al. 1988, Zöller et Dahlbäck 1994).

Dieser Nucleotidaustausch hat den Austausch der Aminosäure an Stelle 506 zur Folge:

Arginin (Arg) wird durch Glutamin (Gln) ersetzt.

Der Zusammenhang zwischen der Faktor V-G1691A-Mutation und dem Auftreten einer APC-Resistenz gilt als erwiesen (Kalafatis et Mann 1997) und wird autosomal dominant vererbt.

Zur Inaktivierung des Faktors V durch APC dienen vor allem 2 Schnittstellen, Arg506 und Arg306.

Als initiale Schnittstelle wurde 1994 von Kalafatis et al. Arg506 identifiziert, die wiederum eine schnellere Spaltung bei Arg306 katalysiert, welches wiederum den eigentlichen Schritt der Inaktivierung darstellt. Die Inaktivierung durch APC ist deshalb bei Faktor V Gln506 verzögert, da keine verstärkte Spaltung bei Arg306, katalysiert durch vorherige Spaltung bei Arg506, stattfinden kann (Lane et Grant 2000).

Eine andere Theorie vertritt die Arbeitsgruppe um Nicolaes (1995), die eine Spaltung an der einen bzw. an der anderen von beiden Schnittstellen als zufällig beschreibt, wobei die Inaktivierung bei Arg306 sehr viel langsamer abläuft. Da Faktor V Gln506 aber nur bei Arg306 gespalten werden kann, läuft die Inaktivierung verzögert ab.

Abgesehen davon wie die Faktor V Arg506Gln Mutation nun genau eine APC-Resistenz verursacht, ist sicher, dass ihre Vererbung das Risiko für venöse Thrombosen erhöht (Koster et al. 1993, de Stefano 1995 et 1996). Bezüglich arterieller Erkrankungen ist die Rolle der APC-Resistenz umstritten.

Während einige Studien keinen kausalen Zusammenhang messen konnten (Ridker et al. 1995, Catto et al. 1995), berichten andere Studien von einem erhöhten Erkrankungsrisiko auch bei arteriellen Verschlüssen (Ronsdaal et al. 1997, Kiechl et al. 1999).

Die Prävalenz der Faktor V-G1691A-Mutation ist regional unterschiedlich und reicht von 0% in China und Japan über 6% in den USA bis zu 15% in der kaukasischen Bevölkerung (Rees et al. 1995).

Homozygot sind etwa 10% der Personen mit einer Faktor V-Mutation.

### **Prothrombin G20210A-Mutation**

Das Glykoprotein Prothrombin (PT) entspricht Faktor II der Gerinnungskaskade und stellt die inaktive Vorstufe des Thrombins dar, welches Fibrinogen in Fibrin umwandelt.

Es wird kodiert durch ein 21kb langes Gen, das auf Chromosom 11 an Position 11p11-q12 lokalisiert ist (Royle et al. 1987). Am 5'- und am 3'-Ende befinden sich nicht kodierende Sequenzen, die regulierende Funktionen bei der Genexpression ausüben (Degen et Davie 1987). Die Arbeitsgemeinschaft um Poort identifizierte 1996 am letzten Nukleotid der 3'-nicht kodierenden Sequenz eine Punktmutation von G zu A in Position 20210, die wahrscheinlich eine höhere Translationseffektivität oder eine stabilere mRNA bewirkt.

Das Prothrombin-20210A-Allel ist mit erhöhten Prothrombin Werten verbunden und scheint so für ein erhöhtes Risiko für Thrombosen verantwortlich zu sein (Lane et Grant 2000, Martinelli et al. 1998).

Die Prävalenz dieses Gendefektes liegt in der Normalbevölkerung zwischen 1 und 3,2%, für Homozygote bei 0,010 - 0,014 (Cumming et al. 1997, Kloster et al. 1993, Poort et al. 1996).

### **Protein C Mangel**

Nach Aktivierung durch den Thrombin-Thrombomodulin-Komplex wirkt aktiviertes Protein C (APC) durch proteolytische Spaltung der Faktoren Va und VIIIa antikoagulatorisch.

Eine erworbene Verminderung des Protein C findet sich bei Vitamin K-Mangel, Lebererkrankungen, Verbrauchskoagulopathien, entzündlichen Darmerkrankungen, Cumarin - oder Asparaginasetherapie, bei Neugeborenen oder postoperativ (Miletich 1990, Jorens et al. 1990, Nowak-Göttl et al. 1996).

Der kongenitale Protein C-Mangel ist ein autosomal dominanter Erbgang mit einer Inzidenz von 1: 16.000.

Molekulargenetisch kann der Mangel an Protein C unterteilt werden in Typ I als quantitativer Proteinmangel bei normaler Funktion mit erniedrigten Werten für PC-Antigen und PC-Aktivität und in Typ II, der aufgrund eines

funktionellen Defektes eine geringere Aktivität, aber normale Antigenwerte aufweist.

Abhängig von der Vererbung ist dabei die Ausprägung der klinischen Symptome unterschiedlich. So ist der homozygote Protein C-Mangel verbunden mit einer schweren Thrombophilie, die sich nicht selten schon während der Neonatalperiode als lebensbedrohliche Purpura fulminans oder innerhalb des ersten Lebensjahres durch ernste thrombotische Ereignisse manifestiert (Marciniak et al. 1985, Seligsohn et al. 1984).

Bei diesen Patienten liegen die Werte der Protein C-Aktivität unter 1%, während eine andere Gruppe ebenfalls homozygoter Merkmalsträger eine Protein C-Aktivität von 5-20% aufweist, so dass thrombotische Ereignisse zwischen dem 11. und 45. Lebensjahr auftreten (Conard et al. 1992, Grundy et al. 1991, Tripody 1990).

Heterozygote haben ein erhöhtes Risiko an venösen Thrombosen oder pulmonalen Embolien zu erkranken ( Broekmans et Conard 1988, Nowak-Göttl et al. 1996). Aber es werden auch asymptomatische Heterozygote beschrieben (Miletich et al. 1987).

### **Protein S - Mangel**

Protein S, das dem aktivierten Protein C (APC) bei der Inaktivierung von Faktor Va und VIIIa als Kofaktor dient, liegt im Plasma zu ca. 40% als aktives Protein S in freier Form vor und zu ca. 60 % funktionell inaktiv als Komplex mit dem C4b-Bindungsprotein.

Analog zum Protein C-Mangel wird der ebenfalls autosomal dominant vererbte Protein S-Mangel eingeteilt in Typ I als Ausdruck eines quantitativen Mangels und Typ II, der einen funktionellen Defekt widerspiegelt.

Die erhöhte Affinität des freien Protein S zum C4b-Bindungsprotein, und der dadurch reduzierte Anteil an ungebundenem Protein S, wird als Typ III beschrieben (Dahlbäck 1991).

Die klinische Symptomatik des kongenitalen Protein S-Mangels entspricht weitgehend der des Protein C-Mangels. Meistens stehen zwar venöse Thrombosen als Manifestation im Vordergrund, aber es wird auch von arteriellen thrombotischen Ereignissen berichtet (Allaart et al. 1990, Siè et al. 1989; Simoni et al. 1992).

Der erworbene Protein S-Mangel verläuft in der Regel milder und kommt bei Lebererkrankungen oder Verbrauchskoagulopathien vor. Gelegentlich kann sich aber auch im Rahmen einer Sepsis ein schwerer Protein S-Mangel mit Purpura fulminans entwickeln.

### **Antithrombin III- (AT III-) Mangel**

Das im Plasma zirkulierende Antithrombin (AT III) ist der wichtigste Thrombininhibitor und bildet auch mit anderen Gerinnungsfaktoren, die sich von der Gefäßläsion entfernt haben, Komplexe mit irreversibler Hemmung ihrer Aktivität.

Der kongenitale AT III-Mangel ist ein autosomal dominanter Erbgang mit unterschiedlicher Penetranz und einer Prävalenz, die je nach Literaturquellen zwischen 1:2.000 und 1:5.000 liegt (Hirsh et al. 1989, Lane et al. 1992).

Bei Sequenzanalysen des menschlichen Antithrombins werden zahlreiche Variationen und Polymorphismen beschrieben, Es sind also verschiedene Mutationen als Auslöser eines Antithrombindefekts möglich (Bock et al. 1982, Chandra et al. 1983).

Molekulargenetisch kann der Typ I als quantitativer AT III-Mangel von Typ II, einem qualitativen Mangel, unterschieden werden. Typ II wird weiter untergliedert in Störungen des reaktiven Zentrums (II RS), der heparinbindenden Seite (II HBS) oder multiple funktionelle Defekte (Pleiotropic Effect, II PE) (Finazzi et al. 1987, Lane et al. 1991). Klinisch manifestiert sich der Antithrombin III-Mangel sehr unterschiedlich, wobei der Typ II mit einem relativ geringeren Risiko einhergeht, da z.B. die Inzidenz von Thromboembolien sehr viel höher ist bei Defekten im Bereich der thrombinbindenden Seite (58%) als bei Störungen an der heparinbindenden Seite (6%) (Hathaway 1991).

Verglichen mit dem Protein C- oder Protein S-Mangel ist das Risiko für Thrombosen beim kongenitalen Antithrombin III-Mangel jedoch höher (Thaler et Lechner 1981).

Ein erworbener Antithrombin III-Mangel kann durch ähnliche klinische Symptome wie der kongenitale Mangel auffallen und wird verursacht durch einen erhöhten Verbrauch (Verbrauchskoagulopathie, Präe-

klampsie, bösartige Erkrankungen), eine verminderte Synthese (Lebererkrankungen, Malnutrition), Proteinurie bei nephrotischem Syndrom oder durch verschiedene Medikamente (Heparin, L-Asparaginase, orale Kontrazeptiva).

### **Antiphospholipidantikörper**

Anticardiolipin-Antikörper (aCL) und Lupus-Antikoagulans (LA) werden zusammenfassend als Antiphospholipid-Antikörper bezeichnet.

Die Antikörper können autosomal dominant vererbt, aber auch erworben werden. Oft werden Antiphospholipidantikörper bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) diagnostiziert (Prävalenz von LA 34% und von aCL 44% bei SLE), aber fast die Hälfte der Patienten mit Antiphospholipidantikörpern sind nicht an SLE erkrankt, wobei die meisten dieser Patienten an anderen Autoimmunerkrankungen leiden. Thromboembolische Ereignisse treten bei 40% der Patienten mit Antiphospholipidantikörpern und SLE auf, aber nur bei 12-18% der Patienten mit Antiphospholipidantikörpern, die nicht an SLE erkrankt sind. (Love et Santaro 1990).

Dabei können die betroffenen Patienten sowohl Blutungen, eher bei jüngeren Kindern, als auch Thrombosen, die z.T. rezidivieren, erleiden (Pengo et al. 1996, Perona et al. 1995, Muntean et al. 1992).

### **Hyperhomocysteinämie**

Homocystein ist ein Zwischenprodukt des Methioninmetabolismus. Ein erhöhter Homocystein-Plasmaspiegel kann durch einen Mangel an Folsäure oder Vitamin B12 erworben sein oder genetisch bedingt sein durch einen Mangel an Cystathion- $\beta$ -Synthetase oder durch das Vorhandensein einer thermolabilen Form der

Methylenetetrahydrofolatreduktase (MTHFR). MTHFR ist ein Enzym, das in die Bildung von Methionin aus Homocystein involviert ist. Der thermolabilen Variante der Reduktase liegt die Mutation von Cytosin zu Thymin im Nukleotid 677 (C677T) zugrunde (Frosst et al. 1995), welche zu einem Austausch der Aminosäure Adenin durch Valin führt. Diese Variante führt

im homozygoten Zustand zu einer milden Hyperhomocysteinämie mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Klujtmans et al. 1996).

### **Erhöhung des histidinreichen Glykoproteins**

Histidinreiches Glykoprotein (HRG) ist ein nicht enzymatisches Protein, das an die lysinbindende Seite des Plasminogens gebunden ist und mit diesem einen 1:1 Komplex im Plasma bildet, wodurch die Konzentration an freiem Plasmin um ca. 50% reduziert wird (Lijnen et al. 1980).

In einigen Fällen konnte eine Korrelation zwischen HRG-Erhöhung und Thrombophilie gezeigt werden (Engesser et al. 1987).

### **Thrombomodulin**

Thrombomodulin ist ein transmembranöses Protein, das als Thrombinrezeptor fungiert und die Spezifität des gebundenen Thrombins so ändert, dass es seine prokoagulatorischen Fähigkeiten verliert und eine erhöhte Affinität zu aktiviertem Protein C erhält ( Lane et Grant 2000).

Es ist anzunehmen, dass ein Mangel bzw. Defekt mit einem erhöhten Risiko an thrombotischen Komplikationen einhergeht (Ohlin et Marlar 1995). Zur Zeit sind einige Mutationen des Thrombomodulin-Gens bekannt, deren klinische Relevanz noch Gegenstand von Studien ist.

### **Plasminogenmangel und Dysplasminogenämie**

Als Plasminogenmangel (Typ I) wird ein Mangel an Plasminogen bei gleichzeitig reduzierter Aktivität bezeichnet, während die Dysplasminogenämie (Typ II) die Reduktion der Aktivität bei normaler Konzentration beschreibt (Dolan et Preston 1988).

Typ I wird für ein erhöhtes Thromboserisiko verantwortlich gemacht (Santeri et al 1994, Tait et al. 1991), während der in der japanischen Bevölkerung häufige Typ II nicht zu einer verstärkten Thromboseneigung zu führen scheint.

### **Hereditäre Dysfibrinogenämie**

Die meist autosomal dominant vererbte Dysfibrinogenämie führt zur Bildung eines funktionell gestörten Fibrinogens und zeigt sich durch eine verlängerte Plasma-Thrombinzeit. In vielen Fällen bleibt die kongenitale Dysfibrinogenämie klinisch inapparent, während sich die klinischen Symptome von einzelnen Blutungsneigungen bis hin zu venösen Thrombosen erstrecken (McDonagh et Carell 1987).

### **Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1)**

PAI-1 verhindert als schneller Hemmer von t-PA eine systemische Fibrinolyse und ermöglicht dadurch eine lokale Thrombolyse ohne systemische Blutung. Einige Studien beschreiben erhöhte Werte für PAI-1 in Zusammenhang mit dem Genotyp 4G/4G des Deletion/Insertion-4G/5G-Polymorphismus (Dawson et al. 1991, Eriksson et al. 1995). Dieser 4G/5G-Polymorphismus zeigte Varianten in der Transkription in Reaktion auf IL-1 in HepG2-Zellen mit einer Erhöhung der PAI-1 Synthese in Zellen des 4G/4G Genotyps (Dawson et al. 1993). Es wurde angenommen, dass die 5G-Seite sowohl einen Verstärker als auch einen Inhibitor bindet, während die 4G-Seite nur einen Verstärker bindet, so dass im 4G/4G Genotyp eine höhere Transkription erfolgen kann (Dawson et al. 1991).

Trotzdem wird in homozygoten Trägern des 4G-Allels von Werten berichtet, die im Vergleich zum 5G/5G Genotyp nur ca. 25% über der Norm liegen (Ye et al. 1995, Ossei-Gerning et al. 1997). Insulinresistenz wird dagegen als bedeutender für erhöhte PAI-1-Spiegel beschrieben als genetische Ursachen (Henry et al. 1998).

Ob erhöhte PAI-1 Werte nun mit einem Risiko für arterielle oder venöse Thrombosen einhergehen, ist umstritten.

### **Glykoprotein IIb/IIIa (Gp IIb/IIIa)**

GpIIb/IIIa ist ein Glykoprotein der Thrombozytenmembran, das eine bedeutende Rolle bei der Thrombozytenaggregation und -adhäsion spielt. Die bedeutendste Punktmutation im Glykoprotein IIIa ist der Austausch von Leucin durch Prolin an Position 33, wobei der Wildtyp mit Leucin

(PLA1) bei 85% der weißen Bevölkerung und die Prolin-Substitution an Position 33 bei 15 % gefunden wird (Newman 1997).

Ein ursächlicher Zusammenhang mit Myokardinfarkten oder cerebralen Ischämien ist aufgrund verschiedener Studienergebnisse noch umstritten.

## 1.3 Thrombosen

### 1.3.1 Definition

Unter einer **Thrombose** versteht man die Gerinnung des Blutes (Gerinnungselbstbildung) im Blutgefäßsystem, was zu einem Blutpfropf (Thrombus) mit Verstopfung des Blutgefäßes führt. Dadurch wird die Blutzirkulation gestört und eine Blutstauung vor dem Verschluss ist die Folge.

Thrombose kommt vom griechischen Wort "thrombosis", was "Gerinnen" bedeutet.

### 1.3.2 Pathophysiologie

Die von **Rudolf Virchow** 1856 beschriebene Trias (Virchow-Trias) zur Entstehung einer Thrombose gilt auch heute noch uneingeschränkt. In seiner Trias beschrieb er drei wesentliche Ursachen für die Entstehung:

#### 1. Verlangsamung des Blutflusses

Zu einer Verlangsamung oder Stillstand des Blutflusses kommt es natürlicherweise bei mangelnder Bewegung oder Verlegung von Blutwegen, z.B. durch langes Anwinkeln der Kniegelenke beim Langstreckenflug (Langstreckenthrombose, Reisetrombose).

Zu einer mangelnden Blutzirkulation kommt es auch nach operativen Eingriffen. Durch die postoperative ‚Bettruhe‘ kommt es zu einer ungenügenden Betätigung der Muskelpumpe der Wadenmuskulatur. Durch den Gehvorgang spannt sich die Wadenmuskulatur an und presst damit die venösen Gefäße leer und beugt somit einer Thrombosebildung vor. Durch die postoperative Bettruhe kommt es zu einem vermehrten Blutstillstand-das Risiko für eine **Thrombose** steigt.

## **2. Veränderung der Zusammensetzung des Blutes**

Die Zusammensetzung des Blutes ändert sich täglich mit der Flüssigkeitszunahme. Der Anteil von Flüssigkeit zu Blutzellen beträgt ca. 50:50. Ein Flüssigkeitsmangel führt zu einer Verschiebung des Verhältnisses zu Gunsten der Blutzellen (z.B. durch starkes Schwitzen oder mangelnde Flüssigkeitszunahme). Dadurch dickt das Blut ein. Das **Thromboserisiko** steigt. Nach operativen Eingriffen reagiert der Körper auf Blutverlust mit einer verstärkten Gerinnungsneigung, um die Blutverluste zu begrenzen. Folge ist, dass die **Thromboseneigung** ebenfalls ansteigt.

## **3. Veränderung / Schädigung der Gefäßwand**

Veränderung oder Schädigung der Gefäßwand kommen besonders im arteriellen Gefäßsystem vor. Im Rahmen des Alterungsprozesses kommt es zu einer zunehmenden Gefäßverkalkung (Arteriosklerose). Kommt es zu einem Aufbruch dieser Gefäßverkalkung, bildet sich sofort eine Thrombose über dem Gefäßdefekt. Im Bereich der Herzkranzarterien ist die Folge, dass das hinter der Thrombose gelegene Areal nicht mehr durchblutet wird und ein Herzinfarkt entsteht. Aber auch Entzündungen der Gefäßwand kann zu Entzündungen führen.

### **1.3.3 Angeborene Risikofaktoren für Thrombosen und Schlaganfälle**

Angeborene Gerinnungsstörungen können Ursache kindlicher Thrombosen und Schlaganfälle sein. Interessanterweise finden sich diese angeborenen Störungen auch bei den meisten Patienten mit einer Thrombose oder einem Schlaganfall, bei denen gleichzeitig eine Grunderkrankung vorliegt.

Durch die Entdeckung vieler dieser Faktoren ist die Ursache für Thrombosen und Schlaganfälle bei Kindern in den letzten Jahren klarer geworden. Die Liste dieser Störungen beinhaltet quantitative und qualitative Störungen. Es kann sich also um den Mangel an antithrombotischen Eiweißen handeln, es kann sich aber auch um einen falschen Aufbau dieser Eiwei-

ße mit Funktionsverlust handeln. Es können auch Mutationen der Gerinnungsfaktoren ursächlich für die Thromboseneigung sein oder Stoffwechselstörungen wie erhöhte Werte für Homocystein oder Lp (a).

	<b>Prothrombotische Risikofaktoren</b>
Häufig	Faktor V G1691 A Gen Mutation Faktor II G20210 A Gen Mutation Erhöhte Apolipoprotein (a)-Konz. Hyperhomocysteinämie Homozygoter C677T Polymorphismus im Methylentetrahydrofolat Reduktase Gen (MTHFR Gen) Tissue Faktor Pathway Inhibitor Mangel Protein Z Erhöhung
Selten	Protein C Mangel Protein S Mangel Antithrombin Mangel Heparin Cofaktor II Mangel
Sehr selten	Dysfibrinogenämie Dys- / Hypoplasminogenämie Homozygote Homozystinurie
Genetische Prädisposition mit möglichem erhöhtem Risiko für Thrombose	Erhöhte Konzentrationen der Faktoren VIIIc, IX oder Fibrinogen, Verminderte Konzentrationen von Faktor XII

**Tabelle 1:** Prothrombotische Risikofaktoren

Im Folgenden sollen einige der häufigeren Risikofaktoren erklärt werden:

- Protein C - / Protein S - / Antithrombin - / Tissue Faktor Pathway Inhibitor (TFPI)-Mangel: Gerinnungshemmende Eiweiße, die altersabhängig sind; Unterhalb der jeweiligen Altersnorm sind reproduzierbar erniedrigte Werte bei Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen als pathologisch zu betrachten.

- Die Faktor V G1691 A-Mutation, die in der plasmatischen Untersuchung mit der APC-Ratio beschrieben wird, geht mit einem ca. 4-7-fach erhöhten Risiko einher an einer venösen Thrombose oder einem ischämischen Schlaganfall zu erkranken.
- Die Faktor II (Prothrombin G20210A)-Mutation, ist mit einem 2-4-fach erhöhten thrombembolischen Risiko assoziiert.
- Lp(a) ist altersabhängig: ein erhöhtes Lp (a) >30mg/dl (bei Säuglingen niedrigere Grenzwerte) stellt ein 4-7-fach erhöhtes Risiko dar.
- Eine Homocysteinerhöhung (>10 µmol/l) ist assoziiert mit einem frühen Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen, Senkung kann durch die Gabe von Vitaminen (Folsäure, Vit. B6/12) versucht werden.

Angeborene oder vererbte Gerinnungsstörungen (s. Tabelle) bedeuten, dass die Kinder sie in der Regel von einem Elternteil geerbt haben. Liegt bei beiden Elternteilen eine Gerinnungsstörung vor, so besteht die Möglichkeit, dass Kinder von jedem Elternteil eine Gerinnungsstörung erben, so dass sie selber eine kombinierte Gerinnungsstörung haben. Kombinierte Gerinnungsstörungen bedeuten in der Regel ein höheres Risiko für ein frühes Auftreten von Thrombosen oder Schlaganfällen.

### 1.3.4 Erworbene Risikofaktoren-Begleiterkrankungen

#### Risikosituationen / thromboseauslösende Faktoren:

Bei Kindern treten Thrombosen oder Schlaganfälle häufiger spontan auf als bei Erwachsenen. Erfragt und untersucht man die Bedingungen, die zum Zeitpunkt des Schlaganfalls / Thrombose vorlagen, so stellt sich häufig heraus, dass eine thrombusauslösende Situation zugrunde lag.

Es gibt viele Faktoren, die einen Einfluss auf die Gerinnung haben.

Dazu gehören bei **Neugeborenen** mit Thrombosen/Schlaganfällen z.B.:

- Infektion nach der Geburt
- Sauerstoffmangel unter der Geburt
- Erhöhter Blutzucker der Mutter in der Schwangerschaft
- Schwangerschaftsvergiftung (Gestose, HELLP)
- Herzerkrankung, Herzfehler des Neugeborenen

- Zentralvenöser Katheter
- Frühgeburtlichkeit
- Operationen
- Angeborene Nierenerkrankungen

Bei älteren **Kindern/Jugendlichen:**

- Einnahme von Hormonen (Pille)
- Rauchen
- Übergewicht
- Gipsverband bei Knochenbruch
- Immobilisierung, auch Langstreckenflüge, lange Autofahrten
- Operationen
- Durchfallerkrankungen
- Infektionserkrankungen u.a. Windpocken
- Krebserkrankungen wie Leukämien
- Kortisonbehandlung bei verschiedenen Grunderkrankungen
- Rheumatische Erkrankungen
- Zentralvenöse Katheter u.v.m.

## **1.4 Schlaganfall**

### **1.4.1 Definition**

Der Begriff „Schlaganfall“ oder englisch „Stroke“ umfasst mehrere Krankheitsbilder mit unterschiedlicher Ursache und unterschiedlichem Erscheinungsbild. Die WHO-Definition lautet: Krankheitsbilder, bei denen sich die klinischen Anzeichen einer fokalen oder globalen Störung cerebraler Funktionen rasch bemerkbar machen, mindestens 24 Stunden anhalten oder zum Tode führen und offensichtlich auf nichts anderes als vaskuläre Ursachen zurückgeführt werden können (Aho et al. 1980).

Gewöhnlich werden cerebrale hämorrhagische Infarkte (ca. 10 % aller Schlaganfälle), cerebrale ischämische Infarkte (ca. 80%) und Subarachnoidalblutungen unter dem Begriff des Schlaganfalls zusammengefasst (Whisnant et al. 1990).

### **1.4.2 Pathophysiologie**

Ein völliger Ausfall der Hirndurchblutung führt binnen 15-20 Sekunden zur Bewusstlosigkeit und nach 7-10 Minuten zur irreversiblen Schädigung des Gehirns. Ein Verschluss einzelner Gefäße führt zum Ausfall umschriebener Gehirnregionen (Schlaganfall). Ursächlich schädigend ist dabei immer der Energiemangel infolge einer Ischämie (z.B. Arteriosklerose, Embolie). Auch Blutungen (Traumen, Gefäßaneurysmen, Hypertonie) führen durch Kompression benachbarter Gefäße zur Ischämie. Der Energiemangel verursacht über Hemmung der Na/K-ATPase die zelluläre Akkumulation von Natrium und Calcium, sowie eine Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration und damit der Depolarisation. Diese führt zu Chlorid-Einstrom, Zellschwellung und Zelltod. Sie fördert außerdem die Ausschüttung von Glutamat, das über Einstrom von Natrium und Calcium den Zelltod beschleunigt.

Zellschwellung, Freisetzung vasokonstriktiver Mediatoren und Verlegung der Gefäßlumina durch Granulozyten verhindern bisweilen die Reperfusion trotz Behebung der primären Ursache. Der Zelltod führt zu einer

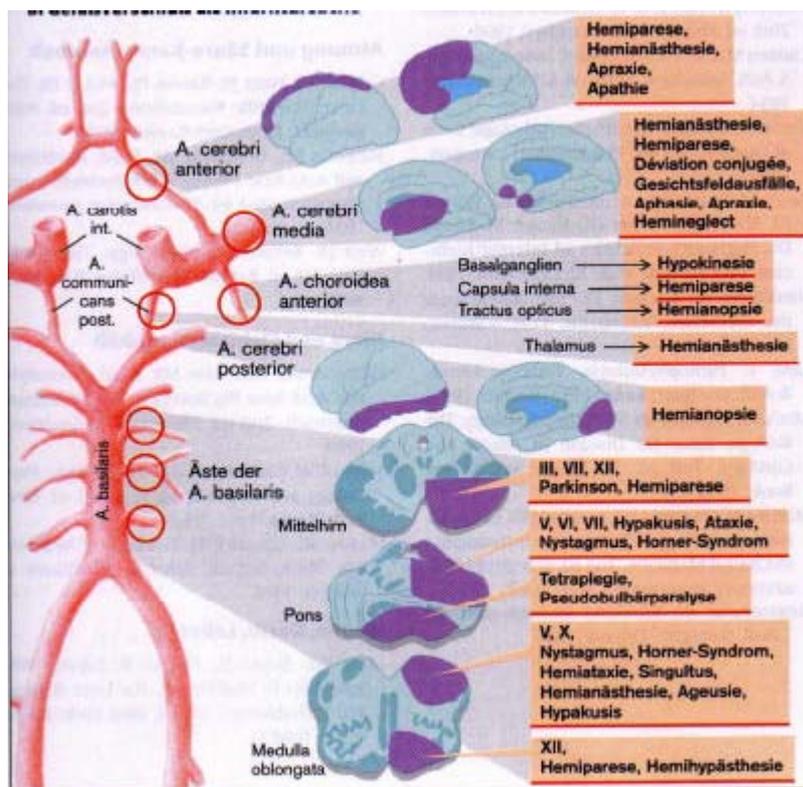
Entzündung, die auch Zellen im ischämischen Randbezirk (Penumbra) schädigt. (Lang 1998).

### 1.4.3 Der Schlaganfall im Kindesalter

Cerebrovaskuläre Erkrankungen sind die führenden Todesursachen in den Industrienationen. Dagegen sind cerebrovaskuläre Erkrankungen im Kindesalter mit einer Inzidenz zwischen 2,1 und 2,52 pro 100.000 pro Jahr relativ selten, wobei ungefähr die Hälfte davon ischämische Schlaganfälle darstellen (Schoenberg et al. 1978, Eeg-Olofsson et Ringheim 1983).

#### Klinische Symptome

Die Symptomatik hängt im Kindesalter ähnlich wie bei Erwachsenen hauptsächlich von der Lokalisation der Durchblutungsstörung, d. h. dem Versorgungsgebiet des Gefäßes ab (s. Abb. 1).



**Abbildung 1:** Gefäßverschluss als Infarktursache

Eine plötzlich auftretende Symptomatik kann dabei auf ein embolisches Geschehen hinweisen, während ein sich langsam entwickelndes neurolo-

gisches Defizit eher ein thrombembolisches Geschehen vermuten lässt (Bogousslavsky et Caplan 1995, Williams et al. 1997).

### **Bildgebende Diagnostik**

Der ischämische Infarkt kann schon nach wenigen Stunden im Magnetresonanztomogramm (MRT) dargestellt werden; durch eine neuere Technik, das DWI (Diffusion- Weighted Imaging), ist dies sogar schon Minuten nach Einsetzen des initialen Insults möglich (Yuh et al. 1991, Cowan et al. 1994). Wenn ein Magnetresonanztomogramm nicht verfügbar ist, sollte unbedingt ein Computertomogramm (CT) angefertigt werden, um eine Blutung differentialdiagnostisch auszuschließen, da diese möglicherweise neurochirurgisch behandelt werden muss.

### **Therapie**

In der Akutbehandlung sollte die Stabilisierung des Patienten im Vordergrund stehen, die auch die Behandlung von Krämpfen und die Korrektur metabolischer Entgleisungen beinhaltet.

Die weitere Behandlung richtet sich nach der zugrundeliegenden Ursache oder Erkrankung, wobei es bislang im Gegensatz zur Behandlung erwachsener Schlaganfallpatienten keine neuroprotektive Strategie gibt, die für die Behandlung bei Kindern als Maßstab gesetzt werden kann. Ein Schutz vor Fieber in den ersten Tagen scheint allerdings das Infarktvolu- men und das Outcome positiv zu beeinflussen, auch wenn ein kausaler Zusammenhang bislang nicht bewiesen werden konnte (Kirkham 1999, Reith et al. 1996).

### **Risikofaktoren**

Die wichtigsten Risikofaktoren für Schlaganfälle im Erwachsenenalter wie Hypertonie, Arteriosklerose, Diabetes, Alkohol- und Nikotinabusus kommen bei Kindern nicht gehäuft vor.

Als Ursachen für Schlaganfälle im Kindesalter sind Infektionen, Herz- und Gefäßfehlbildungen, Sichelzellanämie, Schädigung des Endothels, Kollagenosen, sowie einige seltene kongenitale metabolische Erkrankungen

wie z. B. MELAS oder das Fabry-Syndrom bekannt (Riikonen et Santavuori 1994, Göbel 1994, Nicolaides et Appleton 1996).

Trotzdem bleibt bei einem Drittel die zugrunde liegende Ursache oder Erkrankung unklar (Riela et Roach 1993).

Da mindestens 80% der Schlaganfälle thromboembolische Prozesse sind, konzentrieren sich viele Studien auf Hämostase und vermehrt auch auf prothrombotische Gen-Polymorphismen (Feinberg et al. 1996, Harmon et al. 1999, Jürgens et Koltringer 1987).

## **1.5 Zytologie und Genetik**

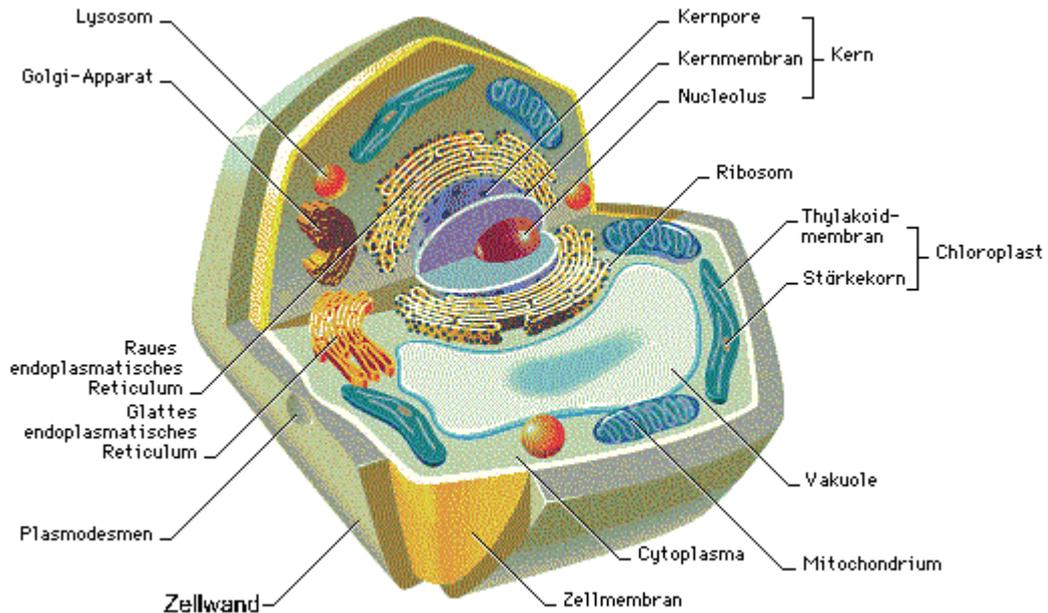
### **1.5.1 Die Zelle**

Im Zytoplasma liegt als Steuerzentrum der Zelle der Zellkern (Nucleus). Er enthält die Erbinformation (DNA) und steuert damit den Aufbau der Proteine. Er ist von einer Doppelmembran, der Kernhülle, umgeben, die ihn von der übrigen Zelle abtrennt, gleichzeitig aber Poren ausbildet, durch die der Transport von Makromolekülen zwischen Cytoplasma und Zellkern erfolgt. Die äußere Kernhülle ist Teil des weit verzweigten Membransystems, das die ganze Zelle durchzieht, des endoplasmatischen Retikulums (ER). Es besteht aus einem System von Hohlräumen, die von einer Membran umschlossen sind.

Diese ist in weiten Bereichen von Ribosomen besetzt, die der Proteinsynthese dienen (raues ER). Ein geringer Teil der Membran ist frei von Ribosomen (glattes ER). Dieses dient u. a. der Synthese von Lipiden und Steroiden sowie dem Glykogenabbau in der Leber.

Der Golgi-Apparat ist ebenfalls ein Membransystem in der Zelle, das aus Stapeln von Hohlräumen besteht, die an ihren Rändern Vesikel (Bläschen) abschnüren können. Die einzelnen Stapel werden als Dictyosomen bezeichnet. Diese werden von den Proteinen durchlaufen, die vom rauen ER kommen, hier umgewandelt werden, dann in Vesikel verpackt und zu ihrem Bestimmungsort dirigiert werden. Weitere Zellorganellen sind die Mi-

tochondrien, die auch als „Kraftwerke“ der Zelle bezeichnet werden, weil in ihnen die Energiegewinnung stattfindet.



**Abbildung 2: Zellaufbau**

## 1.5.2 DNA-Aufbau

### 1. Bausteine

Die DNA kommt im Zellkern vor und ist als phosphorhaltige Säure beschrieben. Diese Nucleinsäure besteht aus Vertretern von drei verschiedenen chemischen Verbindungsklassen: Sie enthält Phosphorsäure, einen Zucker und vier verschiedene organische Stickstoffbasen. Der Zucker der DNA ist die Desoxyribose, welche 5 C-Atome (Pentose) enthält. Bei der Desoxyribose ist jedoch die OH-Gruppe am zweiten C-Atom durch ein H-Atom ersetzt (desoxy = ohne Sauerstoff). Unter den Stickstoffbasen befinden sich zwei Pyrimidinbasen ( Cytosin "C", Thymin "T") und zwei Purinbasen (Guanin "G", Adenin "A").

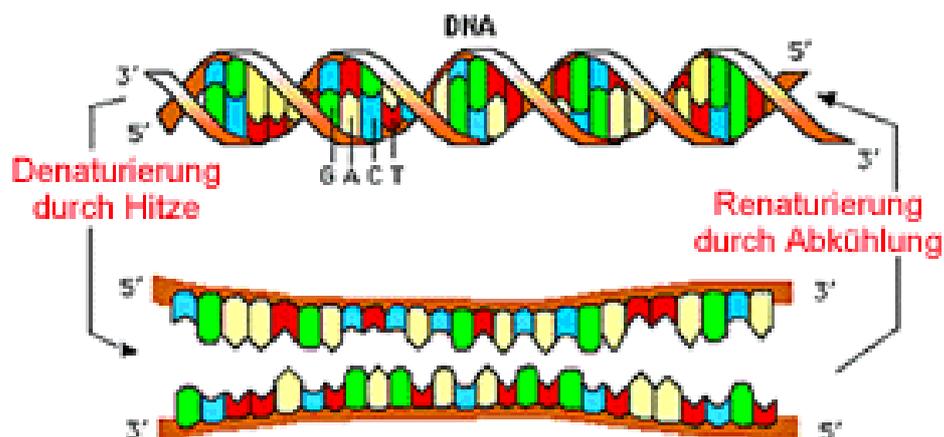
### 2. Anordnung der Bausteine

Die DNA ist eine Doppelhelix, die aus zwei antiparallelen (entgegengesetzt gerichtete; 5´-3´-Richtung und 3´-5´-Richtung) Einzelsträngen besteht. Die Doppelhelix wird durch abwechselnd miteinander verknüpfte

Zucker- und Phosphatgruppen gebildet. Die Basen der DNA zeigen in das Innere der Doppelhelix. Die komplementären Basen (Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin) ziehen sich aufgrund ihrer Ladungsverteilung an und geben der Doppelhelix eine gewisse Stabilität.

Die Basenfolge der DNA liest sich wie Buchstaben eines Textes, in dem die Anleitung für Bau und Betrieb eines Organismus in kodierter Form beschrieben ist. Abschnitte der DNA, die Informationen für ein bestimmtes Protein tragen, werden als Gene bezeichnet. Andere DNA-Abschnitte enthalten keine genetische Information (nicht kodierende Bereiche), weisen dafür aber eine hohe Variabilität innerhalb der Bevölkerung auf. Die Untersuchung solcher variablen DNA-Abschnitte (Merkmalssysteme) wird für die forensische DNA-Analytik herangezogen, da sich verschiedene Personen in der Ausprägung dieser Merkmale voneinander unterscheiden.

Das Ergebnis einer Analyse mehrerer Merkmalssysteme ist das DNA-Profil. Jeder Mensch besitzt in jedem Merkmalssystem zwei Merkmalsausführungen (Allele), wobei er ein Allel vom Vater, das andere von seiner Mutter geerbt hat. Somit zeigt das DNA-Profil einer Person jeweils zwei Allele pro Merkmalssystem.



**Abbildung 3:** DNA-Doppelhelix

### 1.5.3 Die DNA-Replikation

Das Ziel der Mitose ( Zellteilung ) ist die Bildung zweier identischer Tochterzellen aus einer Mutterzelle. Vor der eigentlichen Zellteilung muss deswegen die DNA verdoppelt werden ( Replikation ), so dass beide Tochterzellen die gleiche Erbinformation enthalten.

Die DNA-Replikation verläuft nach dem sog. semikonservativen Mechanismus. Hierbei wird die DNA, welche als Doppelhelix vorliegt, zunächst entspiralisiert und mit Hilfe des Enzyms Helicase in zwei DNA-Einzelstränge aufgespalten. Bei diesem Vorgang entsteht die sogenannte Replikationsgabel.

Damit sich die beiden DNA-Einzelstränge nicht wieder sofort zu einer Doppelhelix verbinden, lagern sich Proteine locker an die nun freien Basen an.

Während die Helicase die Doppelhelix aufspaltet, beginnt das Enzym DNA-Polymerase mit der Synthetisierung von jeweils einem komplementären Tochterstrang zu den beiden Einzelsträngen. Dieser wird aus vier verschiedenen Nucleotiden gebildet, die an den vorhandenen DNA-Einzelstrang angeheftet werden. Die für die Synthese benötigte Energie wird durch die Nucleotide aufgebracht, die in der energiereichen Form von Nucleosid-triphosphaten vorliegen. Bei der Verknüpfung der Nucleotide zum DNA-Tochterstrang werden jeweils zwei Phosphatreste abgespalten, wodurch die notwendige Energie freigesetzt wird.

Die DNA-Polymerase besitzt allerdings zwei entscheidende Nachteile:

1. Sie kann nur mit der Synthese der Tochterstränge beginnen, wenn sich an dem zu verdoppelnden DNA-Strang ein Startpunkt ( Primer ) befindet.
2. Sie kann einen Tochterstrang nur in der 5'-3' Richtung synthetisieren.

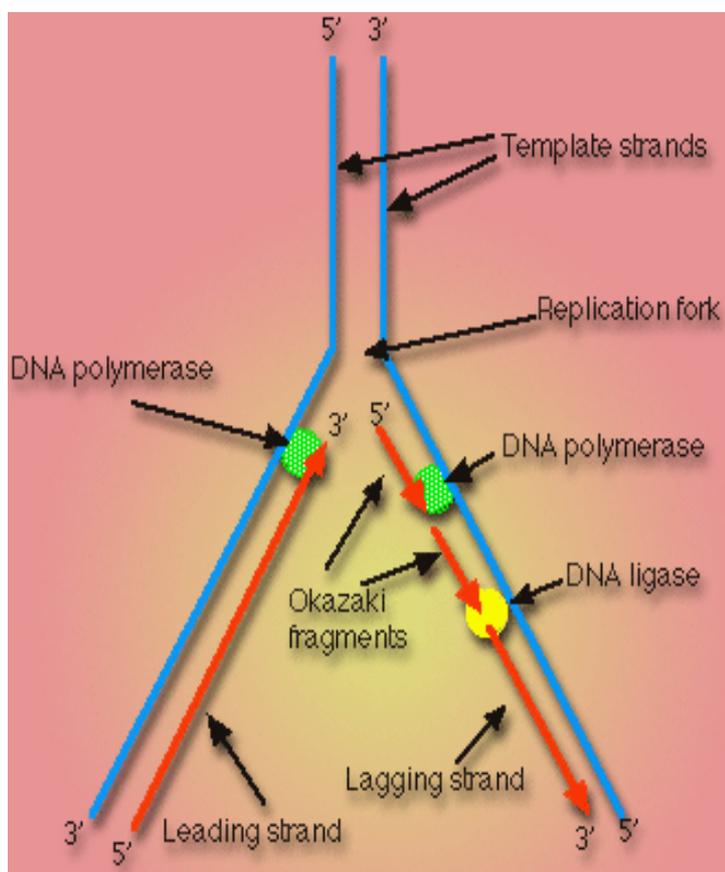
Um diesen Problemen entgegenzuwirken, wird zunächst durch das Enzym Primase (RNA-Polymerase) der benötigte Primer an den Anfang des DNA-Stranges synthetisiert. Dieser Primer besteht aus einer kurzen RNA Sequenz. Verläuft der Elternstrang in 3'-5' Richtung, kann die DNA-

Polymerase der Helicase direkt folgen und den DNA-Tochterstrang in 5'-3'-Richtung vervollständigen (kontinuierliche Synthese).

Der zweite Tochterstrang, der zu synthetisieren ist, muss dann allerdings in entgegengesetzter, d.h. in 3'-5'-Richtung verlaufen. Aufgrund dieser Tatsache arbeitet die DNA-Polymerase an diesem Strang in entgegengesetzter Richtung zur Helicase. Auch hier erfolgt die Synthetisierung schon während der Aufspaltung der Doppelhelix, wodurch dieser Tochterstrang nur Stück für Stück fertiggestellt werden kann. Die DNA-Polymerase synthetisiert ca. 1000 Nucleotide zu einem DNA-Stück und bricht dann ab (diskontinuierliche Synthese). Sie setzt unterhalb der Helicase von neuem an. Dafür werden wiederum Primer benötigt. Die einzelnen DNA-Stücke werden nach ihrem Entdecker Okazaki-Stücke genannt.

Im darauffolgenden Schritt werden die Primer enzymatisch abgebaut und durch DNA ersetzt.

Diese DNA-Nukleotide werden dann mit den bereits vorhandenen DNA-Stücken durch das Enzym DNA-Ligase zu einem durchgehenden Strang



verbunden.

**Abbildung 4: DNA-Replikation**

## 1.6 Studienziel

### Fragestellungen:

1. Besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Lp(a), Kringle IV Repeats und den genetischen Polymorphismen 121 GA oder 93 CT in einem deutschen Kinderkollektiv mit frühem Auftreten von
  - a) thromboembolischen Ereignissen (TE) oder
  - b) venösen Thrombosen (VT)im Vergleich zu nicht betroffenen gesunden Familienmitgliedern (Kernfamilie)?
  
2. Welchen Einfluss haben nicht genetisch bedingte Komponenten (Haushalt/Umwelt) auf die Höhe des Lipoprotein (a)-Spiegels, der Kringle IV Struktur sowie auf Fettstoffwechsel und Gerinnungsfaktoren bei Kindern mit TE?

## **2. Patienten, Material und Methoden**

### **2.1 Informationen über die Studienteilnehmer**

Die vorliegende Kandidatengenstudie wurde in Übereinstimmung mit den ethischen Standards, die in der update Version 1964 in der Deklaration von Helsinki niedergelegt worden sind, durchgeführt und wurde von der medizinischen Ethik-Kommission der Medizinischen Universität Münster genehmigt.

#### **2.1.1 Studiendesign und Studiengruppen**

Der hier untersuchten Studie liegt eine deutschlandweite multizentrische Kinder-Kohortenstudie zugrunde. Es sollte der Zusammenhang zwischen Lp(a), Kringle IV Repeats und den genetischen Polymorphismen 121 GA oder 93 CT und frühem Auftreten von TE oder VT im Vergleich zu nicht betroffenen gesunden Familienmitgliedern (Kernfamilie) untersucht werden. Zusätzlich sollte der Einfluss nicht genetisch bedingter Komponenten (Haushalt/Umwelt) auf die Höhe des Lipoprotein (a)-Spiegels, Kringle IV Struktur sowie auf Fettstoffwechsel und Gerinnungsfaktoren bei Kindern mit TE erfasst werden.

Von 1994 bis Dezember 2006 wurden 438 Familien von Kindern (Neugeborene bis < 18 Jahren) mit thrombembolischen Ereignissen in die Studie eingeschlossen. Davon waren 268 Familien mit Schlaganfall und 154 Familien mit cerebraler Sinusvenen - Thrombose.

Frühgeborene (< 36. SSW), Patienten älter als 18 Jahre und Kinder mit einem Schlaganfall einer Gefäßerkrankung (z.B. Moyamoya, Vakulitis, Dissektion, Fibromukulärer Dysplasie und fokale Stenosierung auf dem Boden einer Arteriopathie) wurden ausgeschlossen.

Andere Ausschlusskriterien waren zusätzlich Leber-, Nieren- oder inflammatorische und Tumorerkrankungen.

## 2.1.2 Patienten- und Kontrollkohorte

Charakteristika	Indexpatienten (n=282)	Geschwister (n=216)	Eltern (n=504)
<u>Krankheit/Gesundheitsstatus</u>			
AIS/TVT/MI	282/-/-	3/-/-	1/8/3
Alter bei Blutentnahme Median (min-max)	4(0,1-18)	6(0,1-18)	35(17-65)
Männliches Geschlecht (%)	152(54)	115(53)	241(47,9)
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) Median (min-max)	16,0(7,9-30,9)	17,4(10,8-29,3)	24,6(17,7-46,9)
<u>Risikofaktoren</u>			
F VG1691A: Anzahl (%)	41 (14,5)	23 (10,6)	59 (11,7)
ProthrombinG20210A: Anzahl(%)	19 (6,7)	6 (2,8)	18 (3,6)
Antithrombin-/Protein C-/ Protein S-Mangel/APS (no.)	0/4/0/4	0/0/0/0	0/4/0/1
Lp(a)>30mg/dl (no.(%))	72 (25,5)	53 (24,4)	131 (26,0)
Rauchen>12 J. (no.(%))	3 (1,1)	10 (4,6)	77 (15,3)
Orale Kontrazeption (no.(%))	-	6 (2,8)	31 (11,8)
<u>Therapie</u>			
Aspirin/ Vit. K Antagonisten (no.)	25/0	-/-	3/7
Antihypertensive/antidiabetische/ fettsenkende Therapie	4/0/0	0/0/0	75/5/18

**Tabelle 2:** Patienten – und Kontrollgruppe

Abkürzungen:

- AIS: akuter ischämischer Schlaganfall
- TVT: tiefe Venenthrombose
- MI: Myokardinfarkt

Die Kontrollwerte wurden im Rahmen der Familienuntersuchung gewonnen.

## 2.2 Definition genetisch-epidemiologischer Begriffe

### 2.2.1 Genetische Variabilität und Heritabilität

Ein Maß für die Variabilität eines Merkmals innerhalb einer Population ist seine Varianz. Sie ist als durchschnittliche quadratische Abweichung der Messwerte vom Mittelwert definiert (Köhler et al., 1996).

Als phänotypische Varianz VP bezeichnet man die Varianz des Phänotypwertes eines Merkmals, also die Varianz der messbaren Merkmalsausprägung in einer Population.

Als genotypische oder totale genetische Varianz VG wird die Varianz des Genotypwertes, also des Wertes, den der Genotyp auf die Individuen überträgt (Falconer, 1984), bezeichnet. VG ist abhängig von der Anzahl verschiedener Genotypen in der Population und von der Häufigkeit ihres Auftretens. Die Genotypwerte werden von der Umwelt abgelenkt. Das Ergebnis dieser Ablenkung sind die Phänotypwerte der Individuen.

Somit lässt sich für die phänotypische Varianz folgende Gleichung aufstellen:  $VP = VG + VU$ , wobei VU die durch Umwelteinflüsse verursachte Varianz ist.

Die genotypische Varianz setzt sich wiederum aus *additiv-genetischer Varianz VA*, *Dominanz- VD* und *Interaktionsvarianz VI* zusammen. Bei quantitativen Merkmalen spielen mehrere Gene bei der Merkmalsausprägung eine Rolle. Der Wert ihres Genotyps ist gleich der Summe der Werte aller beteiligten Einzelgene.

Die einzige Komponente der *genotypischen Varianz*, die sich direkt aus phänotypischen Beobachtungen schätzen lässt, ist die *additiv-genetische Varianz VA*. Diese wird zur phänotypischen Varianz in Beziehung gesetzt.

Das Verhältnis  $VA/VP$  ist die **Heritabilität** (im engeren Sinn)  $h^2$ . Sie drückt den Anteil der additiv-genetischen an der phänotypischen Varianz der Population aus. Die additiv-genetische Varianz heritabler Merkmale hat einen starken Einfluss auf die phänotypische Varianz und VU, VD sowie VI spie-

len eine untergeordnete Rolle. Eine Veränderung des Populationsmittels heritabler Merkmale ist durch Selektionsmaßnahmen möglich.

Ist  $h^2$  sehr klein oder gar Null, ist das entsprechende Merkmal in dieser Population züchterisch kaum bzw. nicht beeinflussbar. Die **Heritabilität** ist somit ein Maß für die genetische Variabilität eines Merkmals in einer Population.

Neben der Einschätzung der genetischen Variabilität anhand metrischer Merkmale gibt es die Möglichkeit der Untersuchung von Mikrosatelliten. Mikrosatelliten sind Abschnitte extragenomischer, nicht kodierender DNA, die aus kurzen, sich häufig wiederholenden Sequenzen bestehen. Die genetische Variabilität einer Population an einem Mikrosatelliten-Locus wird durch Anzahl und Häufigkeit der in der Stichprobe gefundenen Allele beschrieben.

## 2.3 Blutentnahmeprotokoll

Die Blutentnahmen für die Genotyp – Phänotypstudie fanden nach elterlichem Einverständnis und ausführlicher Information der Eltern über die Ziele der Studie statt. Die Blutproben wurden im Rahmen der diagnostischen Familienuntersuchung gewonnen, so dass keine zusätzlichen Punktionen erforderlich waren.

Die Blutproben wurden bei Indexpatienten bei akutem Auftreten des thrombotischen Ereignisses und in einem Zeitraum von 3-6 Monaten nach dem akuten Ereignis durch peripher venöse Punktion gewonnen und in Sarstedt® Monovetten (Sarstedt®, Nümbrecht, Deutschland) à 3 und 5 ml mit Citrat 3,8% und Blut im Verhältnis 1:10 asserviert. Familienangehörige wurden zu einem der o.g. Zeitpunkte im „gesunden“ Zustand (ohne Entzündungszeichen) abgenommen.

Die Blutentnahmen wurden morgens nüchtern unter möglichst geringem venösem Stau durchgeführt. Direkt nach der Entnahme wurden die Monovetten in Eiswasser gelegt und bei 4°C und 3000g für 20 Minuten zentrifugiert. Das plättchenarme Plasma wurde in polystyrene Röhren (NUNC Life Technologies GmbH, Karlsruhe) pipettiert und bei -80 °C (193,15 K) eingefroren. Peripher venöse Blutentnahmen erfolgten morgens zwischen 8 und 10 Uhr.

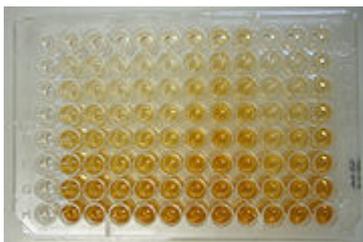
## 2.4 Labormethoden

### 2.4.1 Lipoprotein (a)-Bestimmungsmethoden

#### 2.4.1.1 Immunassay (ELISA)

##### Testprinzip

ELISA steht für enzyme linked immunosorbent assay. Er dient dem quantitativen Nachweis von Antigenen. Es wurde der „IMMUNOZYM Lp(a)“ der Firma Immuno verwendet, bei dem es sich um einen Einschritt-Sandwich-ELISA handelt (Immunozytm Lp(a), Immuno GMBH). In einem ersten Reaktionsschritt werden Plasmaproben zusammen mit einem Konjugat in die Vertiefungen des ELISA-Teststreifen gegeben. Die Vertiefungen sind mit spezifischen, polyklonalen Antikörpern gegen Apo(a) beschichtet. Das Konjugat besteht aus spezifischen, monovalenten, gegen Apo(a) gerichtete Fab-Fragmenten, die mit einer Peroxidase gekoppelt sind. In einem ersten Schritt werden Apo(a)-haltige Partikel an die Festphase gebunden und gleichzeitig durch das Fab-Fragment an das Enzym gekoppelt. Im zweiten Schritt wird Wasserstoffperoxid und ein Chromogen zugeführt, das durch die Peroxidase zu einer blau gefärbten Substanz oxidiert wird. Je mehr Lp(a) im Plasma vorhanden ist, desto mehr Peroxidase ist an das Apo(a) gebunden und desto schneller erfolgt die Farbreaktion. Durch Zugabe von Schwefelsäure wird die Reaktion gestoppt und es kommt zu einem Farbumschlag nach gelb. Da die Farbinintensität der Lp(a)-Konzentration proportional ist, kann jene nach Messung der Extinktion errechnet werden.



**Abbildung 5:** Typischer ELISA („Anti human IgG“ double Antibody Sandwich)

### **Testvorbereitung**

Die bei minus 20 °C eingefrorenen Plasmaproben wurden zusammen mit den übrigen ELISA-Komponenten auf Eis aufgetaut.

Währenddessen ist der Arbeitspuffer angesetzt worden. Hierzu wurden 100 ml Pufferkonzentrat mit 900 ml Aqua dest. verdünnt und gevortext.

Anschließend erfolgte die Herstellung der Kalibratoren und Kontrollseren. Man versetzte die lyophilisierten Humanseren mit je 200 µl Arbeitspuffer, ließ sie 15 Minuten stehen und mischte sie zuletzt mit einem Probenmischer.

Dann wurden die Kalibratoren, Kontrollseren und Plasmaproben verdünnt. 5000 µl Arbeitspuffer wurden vorgelegt und jeweils 10 µl der oben genannten Substanzen dazupipettiert.

Die anschließende Mischung ist mit einem Probenmischer durchgeführt worden.

Zur Herstellung der Konjugat-Stammlösung wurde zu lyophilisiertem Konjugat, bestehend aus spezifischen, polyklonalen Antikörpern vom Schaf, 1,3 ml Arbeitspuffer hinzugegeben.

Dieses Gemisch wurde darauf 15 Minuten rekonstituiert.

Die Konjugat-Gebrauchslösung gewann man, indem ein ml der Stammlösung mit zehn ml des Arbeitspuffers versetzt wurde.

Die Substratlösung ist erst kurz vor der Substratreaktion hergestellt worden. Hierfür wurde ein ml Chromogen, bestehend aus Tetramethylbenzidin in Ethanol/DMSO, mit 20 ml Substratpuffer gemischt. Jener bestand aus 0,025 mol/l Acetat und Wasserstoffperoxid.

### **Testablauf**

Zu Beginn der ELISA wurden jeweils 100 µl der Konjugat-Gebrauchslösung in die Testvertiefungen pipettiert. Jene sind mit spezifischen, polyklonalen Anti - Apo(a) - Antikörpern vom Schaf beschichtet. Es waren zwölf Teststreifen zu je acht Testvertiefungen

vorhanden. Anschließend wurden je 100 µl der verdünnten Kalibratoren in die ersten beiden Teststreifen hinzugegeben. Die verdünnten Kontrollse-

ren und Plasmaproben wurden den anderen Testvertiefungen zugeführt, ebenfalls jeweils 100 µl.

Darauf wurden die Proben bei Raumtemperatur 120 Minuten inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit sind die Teststreifen gewaschen worden. Es wurden jeweils 200 µl des Arbeitspuffers in die Vertiefungen pipettiert, und dann der Inhalt aller Testvertiefungen verworfen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Teststreifen auf Zellosepapier ausgeklopft und leergesaugt.

Nach dem Waschvorgang wurden 200 µl Substratlösung in alle Testvertiefungen gegeben und bei Raumtemperatur 30 Minuten stehen gelassen. Während der Inkubationszeit färbten sich die Lösungen in unterschiedlicher Intensität blau.

Zum Stoppen der Reaktion wurde mit einer Dispensierpipette in die Testvertiefungen jeweils 50 µl der Stopplösung (1,9 mol/l Schwefelsäure) verabreicht. Es kam zu einem Farbumschlag nach gelb.

Die anschließende Messung der Extinktionen wurde in einem computer-gesteuerten ELISAREADER durchgeführt. Die Erstellung der Bezugskurve und die Bestimmung der Konzentrationen erfolgten durch den Computer des ELISA-Readers. Als Auswertsoftware verwendete man ein Rechenprogramm mit multipler nichtlinearer Regression.

Bei jedem ELISA wurden 90 Lp(a)-Werte bestimmt. Da jeder Lp(a) Plas-mawert eines Patienten zweimal gemessen wurde, konnten folglich pro ELISA die Parameter von 45 Patienten bestimmt werden. Es wurden zwei ELISA durchgeführt.

#### **2.4.1.2 HITACHI**

##### **Testprinzip**

Immunologischer Trübungstest zur quantitativen in vitro Bestimmung von Lipoprotein(a) in Humanserum und – plasma.

Zu der Probe erfolgt die Zugabe von R1, anschließend Zugabe von R2 (Anti-Apolipoprotein A-1-Antikörper) und Start der Reaktion:

Anti-Apolipoprotein A-1-Antikörper reagieren mit dem Antigen aus der Probe unter Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes, der nach Agglutination turbidimetrisch gemessen wird.

Das heißt, es wurde die Trübungszunahme  $\Delta E$  der Probe nach Bildung eines Immunkomplexes aus dem gesuchten Substrat unbekannter Konzentration und einem Antikörper mit bekannter Konzentration gemessen. Aus den photometrischen Absorptionswerten  $E_1$  und  $E_2$  bei einer bestimmten Lichtwellenlänge vor und nach Zugabe des Antikörpers wurde  $\Delta E$  errechnet.

Es wurde gegen den Reagenzienleerwert (RLW) gemessen, also gegen  $E_1$  und  $E_2$  des nur mit NaCl-Lösung gefüllten Probengefäßes.

$$\Delta E = (E_{2 \text{ Probe}} - E_{1 \text{ Probe}}) - (E_{2 \text{ RLW}} - E_{1 \text{ RLW}})$$

### **Testdurchführung**

Die Tests wurden bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C durchgeführt. Zu 12 µl Serum wurden 500 µl 3%iges Polyethylenglycol (PEG) in Pufferlösung (Reagens 1 von cobas<sup>®</sup>, Roche Diagnostik GmbH, Mannheim) zur Reaktionsbeschleunigung zugefügt. Die Probe wurde 5 Min. lang bei 37 °C inkubiert und anschließend  $E_1$  gemessen.

Nach Zugabe von 100 µl Anti-Human-Lipoprotein(a)-Antikörper vom Kaninchen (Reagens 2, cobas<sup>®</sup>, Roche Diagnostik GmbH, Mannheim) und weiteren 5 Min. erfolgte die Messung von  $E_2$ .

Die Extinktionsmessungen wurden absorptionsphotometrisch bei 340 nm Wellenlänge durchgeführt.

### **2.4.2 Lp(a) – Phänotypen**

Zum Nachweis des Phänotyps wird vorwiegend die isoelektrische Fokussierung (IEF) von Plasma mit anschließendem Immunoblotting verwendet. Diese Methode ist allerdings nicht standardisiert, recht aufwendig und

anfällig auf Störfaktoren (z.B. Peptide seltener Allelvarianten mit gleicher elektrischer Ladung). Fehlklassierungen können auch erfolgen, weil die Plasmakonzentration von ApoE bei e4-Trägern allgemein niedrig ist, was zu schwachen Banden führt, die übersehen werden können. Die Phänotypisierung bleibt deshalb weitgehend Speziallaboratorien vorbehalten. Die Genotypisierung wurde entwickelt, um die Unzulänglichkeiten der Phänotypisierung zu umgehen. Sie ist methodisch völlig unproblematisch und zuverlässig. Nach DNA Amplifikation mittels PCR und Verdau des Amplifikats mit Restriktionsenzymen werden die Fragmente im Anschluss an eine Gelelektrophorese analysiert.

Die genaue Bestimmung von Lp(a) – Phänotypen ist sehr aufwendig. Sie kann entweder über die Bestimmung des Apo(a) – Molekulargewichtes mittels Agarosegelelektrophorese oder durch Analyse des Apo(a) – Gens mittels Pulsed-field Elektrophorese und anschließendem Southern Blot erfolgen.

## **2.5 Genetische Analysen**

### **Durchgeführte molekulargenetische Methodik und verwendete Protokolle**

Die molekulargenetische Untersuchung der beiden Lipoprotein (a) Polymorphismen erfolgte mit PCR mit nachfolgender Restriktion und anschließender elektrophoretischer Auftrennung sowie durch direkte Sequenzierung.

#### **2.5.1 Blutentnahme für genetische Analysen**

Für die genetischen Untersuchungen wurde venöses Blut in EDTA-Röhrchen (Ethylendiamintetraessigsäure) der Firma Sarstedt® aus Nümbrecht, Deutschland, gefüllt und zur Zellseparation bei 3000g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die dabei entstehende mittlere leukozytenreiche Schicht (buffy coat) wurde bei -70°C zur DNA-Extraktion aufbewahrt.

## 2.5.2 DNA-Isolation mit QIAamp-Säulen von Qiagen aus peripheren Leukozyten

### Testprinzip:

Die QIAamp Säulen binden mittels Anionentauscher DNA, welche enzymatisch aus den Zellen des Probenmaterials aufgeschlossen werden, an ihre Silikaoberflächen. In Ethanol gelöste Zelltrümmer und Proteine werden ausgewaschen und die DNA aus den Säulen eluiert.

### Reagenzien:

- Protease mit 7 ml Aqua dest. lösen, kühl lagern, 2-3 Monate bei 4°C haltbar
- AW 1- und AW 2-Puffer mit der auf der Flasche angegebenen Menge Ethanol 96% rekonstruieren, bei RT mind. 3 Monate haltbar
- AL-Puffer dunkel lagern, mit Alu-Folie umwickeln

### Ansatz:

1. Wasserbad auf 56°C erwärmen
2. Je 100 µl Protease in Sarstedt – Röhrchen vorlegen
3. 1000 µl EDTA – Vollblut zugeben (wenn weniger Material verfügbar ist: mit PBS – Puffer auf 1000 bzw. 500 µl auffüllen, bei den nachfolgenden Schritten das Volumen entsprechend anpassen).
4. je 1000 µl AL – Puffer (dunkel lagern) zugeben, mit Deckel verschließen, ca. 15 sec. Vortexen bis Lyse erreicht ist
5. im vorgewärmten Wasserbad die Proben für 10 min inkubieren
6. je 1000 µl Ethanol (ETOH 96%) zugeben, gut vortexen
7. QIAamp Säulen beschriften und je 630 µl Lysat zugeben, 2 min bei 10000 rpm zentrifugieren
8. QIAamp Säulen auf frische Coll.Tubes stellen, Schritt 7 wiederholen bis das ganze Lysat aufgetragen ist, maximal 5x

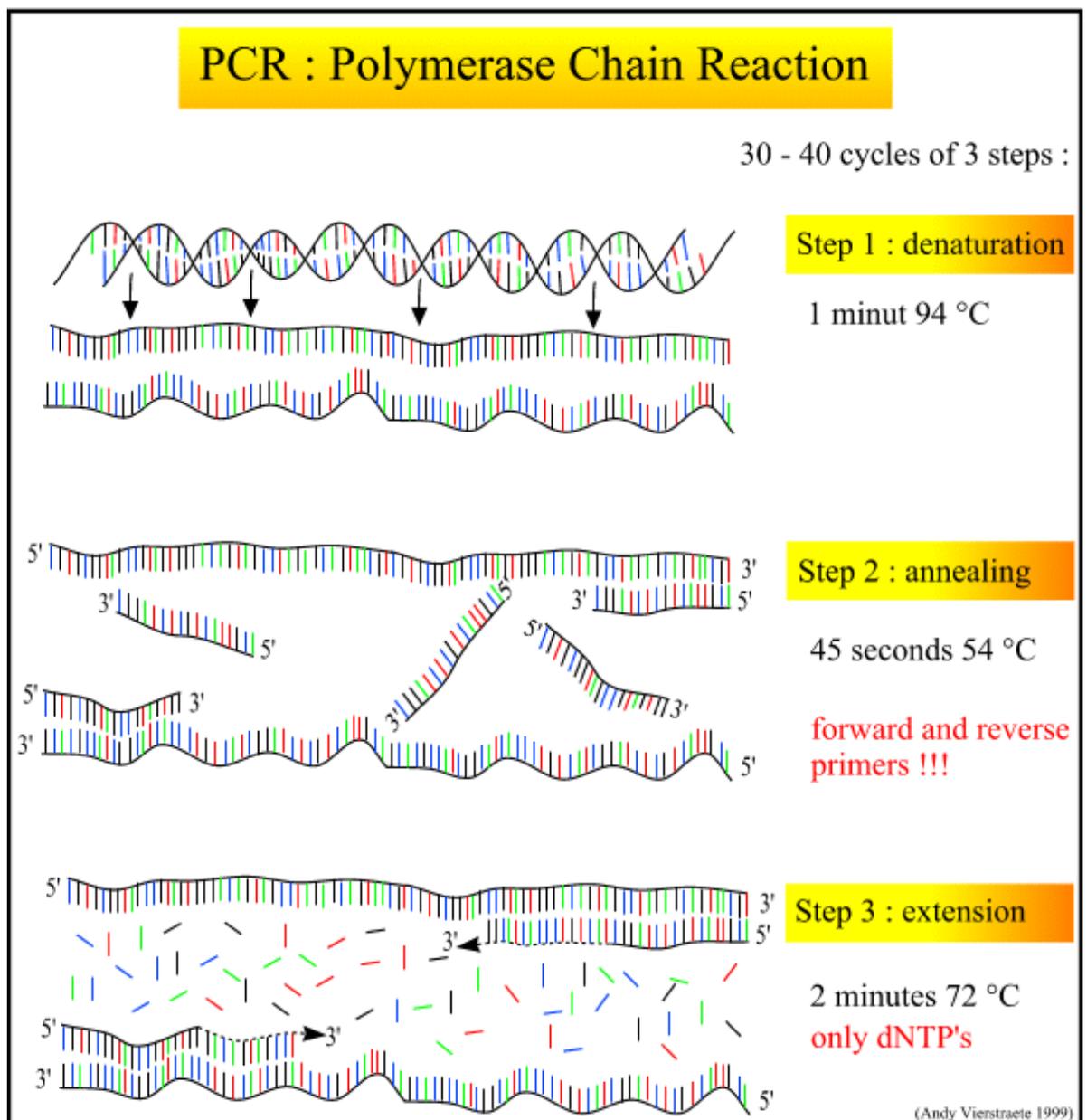
**WICHTIG:** das Filtrat darf nach jeder Zentrifugation die Säule nicht berühren

9. QIAmp Säulen auf frische Coll.Tubes stellen, je 500 µl AW 1-Puffer zugeben, 2 min. bei 10000 rpm zentrifugieren, 1 x wiederholen
10. QIAmp Säulen auf frische Coll.Tubes stellen, je 500 µl AW 2-Puffer zugeben, 5 min. bei 13000 rpm zentrifugieren, bei starken Rückständen Waschschrirte wiederholen
11. QIAmp Säulen auf 2 ml Eppendorfröhrchen stellen, je 100 µl AE – Puffer zugeben, 5 min. bei RT inkubieren, 2 min. bei 10000 rpm zentrifugieren
12. Je 100 µl AE –Puffer zugeben, 2 min. bei RT inkubieren, 2 min bei 10000 rpm zentrifugieren
13. QIAmp Säulen verwerfen, Eppendorfhütchen mit Patientennamen und Geburtsdaten beschriften und bei -20°C lagern

### **2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Grundlage nahezu jeder molekularbiologischen Diagnostik ist die Polymerase- Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR). Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, mit deren Hilfe man selektiv Abschnitte der DNA in vitro vermehren kann. Dabei werden synthetische Oligonukleotide als Primer verwendet. Primer bestehen aus 15-30 Nukleotiden, die komplementär zu einer DNA-Sequenz sind, welche den zu synthetisierenden DNA-Abschnitt einschließt. Durch Temperaturerhöhung auf 94°C werden die DNA – Stränge der DNA - Doppelhelix getrennt, Vorwärts- und Rückwärtsprimer können sich an die komplementären Abschnitte bei Abkühlung auf die Hybridisierungstemperatur von ca. 55°C anlagern und die hitzestabile Taq-Polymerase – aus *Thermophilus aquaticus* – synthetisiert den zur DNA komplementären Strang bei 72°C. Der Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wird mehrere Male wiederholt. Ab dem dritten Schritt entspricht die Länge des synthetisierten DNA-Abschnitts dem Abstand zwischen den Primern und verläuft von nun an exponentiell zur Zykluszahl. Zum Gelingen der PCR müssen DNA, Taq-Polymerase, Desoxyribonukleotidphosphate und ein geeigneter Puffer in einem bestimmten Verhältnis vorliegen. Die optimalen PCR-Bedingungen werden für jedes Primerpaar empirisch ermittelt. Dabei wer-

den alle Ansätze auf Eis pipettiert, um einen vorzeitigen Start der Reaktion zu vermeiden. Die als Matrize dienende DNA wird vorgelegt. Die übrigen Reaktionssubstanzen werden in einem Ansatz gemischt und anschließend auf die Proben verteilt. Als Negativkontrolle dient ein so genannter Leerwert (Ansatz ohne DNA), der zum Ausschluss von DNA-Kontamination mitgeführt wird. Die PCR erfolgt auf programmierbaren Thermocyclern mit beheizbaren Deckeln.



**Abbildung 6:** Die verschiedenen Schritte einer Standard – PCR

### **Im Folgenden werden die Schritte einer PCR beschrieben:**

Die Polymerase – Kettenreaktion benötigt mehrere grundlegende Komponenten:

- Die Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält
- Zwei Primer, um auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festzulegen, wodurch der zu vervielfältigende Bereich von beiden Seiten begrenzt wird.
- DNA-Polymerase, die bei hohen Temperaturen nicht zerstört wird, um den festgelegten Abschnitt zu replizieren (kopieren) (z. B. Taq-Polymerase)
- Desoxynukleosidtriphosphate, die Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang
- Mg<sup>2+</sup>-Ionen, für die Funktion der Polymerase essentiell
- Pufferlösungen, die eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellen

### **Schritt 1: Denaturierung der doppelsträngigen DNA (dsDNA)**

Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 95 °C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen.

### **Schritt 2: Primerhybridisierung (primer annealing)**

Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 2–3 °C unter ihrem Schmelzpunkt, typischerweise zwischen 50 °C und 65 °C. Bei der hier durchgeführten Lp(a) - PCR werden die Primer LpF und LpR bei 56°C eingesetzt. Wird die Temperatur falsch gewählt, kann das dazu führen, dass die Primer sich nicht (Temperatur zu hoch) oder an falschen Stellen (Temperatur zu niedrig) an der Ausgangs-DNA anlagern.

### Schritt 3: Extension

Schließlich füllt die DNA – Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden (dNTPs) auf. Sie beginnt am 3'- Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA – Strang. Der Primer wird nicht wieder abgelöst, da er den Anfang des Einzelstrangs bildet. Die Temperatur hängt nun von der verwendeten DNA-Polymerase ab (bei der hier durchgeführten PCR: 72°C); die Zeit, die dieser Schritt benötigt, hängt ebenfalls von der verwendeten DNA – Polymerase und der Länge des DNA-Fragments, das vervielfältigt werden soll ab. Alle Schritte werden je nach Anwendung, 20 – 40 mal wiederholt (hier wurden 35 Zyklen durchgeführt). Im letzten Zyklus wird der dritte Schritt um einige Minuten verlängert, damit alle Stränge bis zum Ende synthetisiert werden.

Der fertige PCR – Ansatz kann auf 4°C heruntergekühlt werden.

Das Ergebnis der PCR wird auf einem 4%igen Agarosegel überprüft. Die PCR Produkte können bei -20 °C aufbewahrt werden.

Der Ansatz für die PCR für das Lipoprotein(a) wurde wie folgt durchgeführt:

Abkürzungen:

- dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphate
- LpF: Vorwärts – Primer
- LpR: Rückwärtsprimer

	<b>1x</b>	<b>30x</b>
<b>Aqua dest.</b>	35,75 µl	1072,5 µl
<b>Puffer</b>	5 µl	150 µl
<b>dNTP</b>	5 µl	150 µl
<b>LpF</b>	1 µl	30 µl
<b>LpR</b>	1 µl	30 µl
<b>Taq Eppendorf</b>	0,25 µl	7,5 µl
<b>Gesamt</b>	<b>48 µl + 2 µl DANN</b>	

**Tabelle 3:** Lp(a) – PCR – Ansatz

Es wurde jedes Mal ein Ansatz für 30 Proben vorbereitet. In jedem Experiment wurden 2 Positivkontrollen (GG-CC und GA-CT) hinzugefügt. Eine Kontrolle mit 2 µl destilliertem Wasser statt DNA diente als Negativkontrolle.

Die Amplifikationen wurden durchgeführt in dem Eppendorf Mastercycler® gradient.

Nach einer dreiminütigen Denaturierungsperiode bei 95°C folgten 35 thermozyklische Reaktionen bei 95°C über eine Minute, 56°C über eine Minute und 72°C über eine Minute. Es folgten 10 Minuten bei 72°C um die Synthese zu komplettieren. Am Ende wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt.

	Temperatur °C	Zeit
<b>Denaturierung</b>	95 °C	3 min.
	95 °C	1 min. (35 Zyklen)
<b>Annealing</b>	56°C	1 min. (35 Zyklen)
<b>Extension</b>	72°C	1 min. (35 Zyklen)
<b>Finale Synthese</b>	72°C	10 min.
<b>Stop</b>	4°C	∞

**Tabelle 4:** *Lp(a)* – PCR - Programm

**Ergebnis:**

Für das Lipoprotein a Allel entstand ein Produkt mit einer Länge von 322 bp. Bei der Tail-Schnittstelle im Wildtyp entstand ein Produkt von 248bp + 74bp → 322bp

Bei der Bsp 1286 I – Schnittstelle entstand im Wildtyp ein Produkt von 42 bp + 280 bp → 322 bp.

Bei vorhandener Mutation (homozygot) wird die Schnittstelle zerstört, es ist nur eine Bande bei 322 bp sichtbar. Beim homozygot vorliegenden

Wildtyp wird das PCR – Produkt komplett geschnitten, es liegt eine Bande bei 248 (Tail) bzw. 280 bp (Bsp 1286 I) vor und eine weitere (schwache) Bande bei 74 bzw. 42 bp. Die heterozygote Form hat eine Bande bei 322, eine Bande bei 248 bzw. 280 bp und eine weitere (schwache) Bande bei 74 bzw. 42 bp.

Diese werden auf einem Polysaccharid Gel aufgetrennt, welches über 80 Minuten bei 170 V läuft aufgetrennt.

## **2.5.4 Agarosegelelektrophorese**

Zur Erfolgskontrolle von PCRs verwendet man Agarosegele. Agarose ist ein lineares pflanzliches Polysaccharid, das nach Aufkochen geliert und netzähnliche Strukturen ausbildet, durch die DNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe während der Elektrophorese wandern.

In dieser Studie erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 4%igen Methaphor-Agarosegel, dem 20 µl Ethidiumbromid zugesetzt werden.

Die Herstellung gestaltet sich wie folgt:

Zunächst wiegt man 8 g Metaphoragarose (MetaPhor® NuSieve Agarose GTX CAMBREX Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME USA; Vertrieb durch Biozym Hessisch Oldendorf, Deutschland) ab und gibt sie in einen Erlenmeyerkolben. Nun fügt man 196 ml reines Wasser (Aqua destillata) und 4 ml 50fachen TAE Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, SIGMA) hinzu und erhitzt die Mischung unter konstantem Schwenken, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Zu dem abgekühlten Gel gibt man 20 µl Ethidiumbromid (GelStar® Nucleic Acid Gel Stain von CAMBREX Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME USA; Vertrieb durch Biozym Hessisch Oldendorf, Deutschland).

Ethidiumbromid ist ein lichtempfindlicher Farbstoff, daher lässt man das Gel unter einem Pappkarton laufen. Wird das Gel zäher, so gießt man die Lösung in einen vorbereiteten waagrecht stehenden Gelschlitten, in den

Kämme zur Aussparung von Probenaschen (15µl Volumen) eingehängt sind. Nachdem das Gel erstarrt ist, wird es in die mit Laufpuffer (0,5%iger TAE Puffer) gefüllte Gelkammer eingesetzt.

Die fertigen PCR-Produkte werden mit (10 µl) Volumen Puffer versetzt. Dieser erhält Ficoll und beschwert die Proben, so dass diese sich gleichmäßig in den Geltaschen verteilen. Außerdem ist diesem Puffer entweder Xylencyanol oder Bromphenolblau bzw. beide Farbstoffe gemeinsam zugesetzt. Diese Farbstoffe erleichtern das Beladen der Geltaschen, wandern ebenfalls zur Anode und ermöglichen eine visuelle Kontrolle der zurückgelegten Laufstrecke. Gleichzeitig mit den Proben wird ein Längensstandard (kb-Leiter) in eine Geltasche pipettiert.

Die aufgetrennte DNA wurde nach der Elektrophorese auf einem UV-Transluminator (302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert.

### **2.5.5 DNA – Restriktion**

Viele DNA-Moleküle sind für eine detaillierte Analyse zu lang. Durch gezielte Spaltung der mit Hilfe der PCR vervielfältigten DNA mit Restriktionsendonukleasen (hier BSP1286I und Tail), die spezifisch für definierte Basensequenzen sind, werden definierte Spaltfragmente diskreter Länge gewonnen.

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, welche die Phosphodiesterbindungen im Inneren eines DNA-Moleküls an genau definierten Stellen hydrolysieren. Sie erkennen hierbei eine ganz spezifische DNA-Sequenz von vier bis acht Nukleotiden mit Palindrom-Struktur.

1 Einheit (Unit) Enzym schneidet hierbei bei seinem Temperaturoptimum 1 µg DNA.

Enthielt das Amplifikat die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym, wurde es geschnitten, sonst blieb es in ursprünglicher Länge.

Zur Bestimmung der Lipoprotein(a) – Polymorphismen C93T und G121A waren 2 verschiedene Restriktionsansätze erforderlich mit unterschiedlichen Enzymen und zwar zur Bestimmung der 121 GA – Mutation das Enzym Bsp1286I und zur Bestimmung der 93 CT – Mutation das Enzym Tail.

Der Ansatz und die Durchführung wurden auf Eis durchgeführt, um einen vorzeitigen Beginn der Restriktion zu verhindern.

2 x 29 Tubes wurden beschriftet und auf 2 Ständern aufgestellt (einen für den Ansatz mit Bsp1286I und einen für Tail). Nun wurde je ein Master-Mix hergestellt. Es wurde jedesmal ein Ansatz für 30 Proben hergestellt.

Für den Ansatz mit dem Enzym Bsp1286I wurden zunächst 137µl Aqua dest. in ein Eppendorfhüttchen gegeben. Dazu wurden 30µl Puffer (NEB4) hinzugefügt. Weiterhin erfolgte noch die Zugabe von 3 µl BSA und anschließend noch 10 µl des Enzyms Bsp1286I.

Für den Master – Mix mit dem Enzym Tail wurden zunächst 144 µl Aqua dest. vorgelegt. Es erfolgte die Zugabe von 30 µl Puffer (R+) und anschließend noch 6 µl des Enzyms Tail.

Somit entstand jeweils ein Master – Mix mit 180 µl, von dem jeweils 6 µl in die Tubes vorgelegt wurden.

Nun wurde mit der 8 er Pipette 4 µl des Lp(a) - PCR – Produktes in die jeweiligen Tubes pipettiert. Anschließend wurden die Tubes kurz zentrifugiert (Fuge auf 12,4 rpm hochfahren, dann stoppen).

Nun werden die Tubes des Bsp – Ansatzes in den Eppendorf – Mastercycler gestellt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Tubes des Tail - Ansatzes werden ebenfalls in den Eppendorf – Mastercycler gestellt und für 3,5 Stunden bei 65°C inkubiert.

	<b>Bsp1286I</b>		<b>Tail</b>	
Aqua	<b>1x</b> 4,6 µl	<b>30x</b> 137 µl	<b>1x</b> 4,8 µl	<b>30x</b> 144 µl
Puffer	(NEB4) 1 µl	30 µl	(Buffer R+) 1 µl	30 µl
BSA	0,1 µl	3 µl	--	--
Enzym	<b>(Bsp1286I)</b> 0,3 µl	10 µl	<b>(Tail)</b> 0,2 µl	6 µl
-----	-----		-----	
<b>Gesamt:</b>	6 µl + 4 µl PCR – Produkt		6 µl + 4 µl PCR –Produkt	
-----	-----		-----	
<b>Inkubation</b>	2h bei 37°C		3,5h bei 65°C	

**Tabelle 5:** Restritkionsansatz für Lp(a)

## 2.5.6 Elektrophorese nach Restriktion

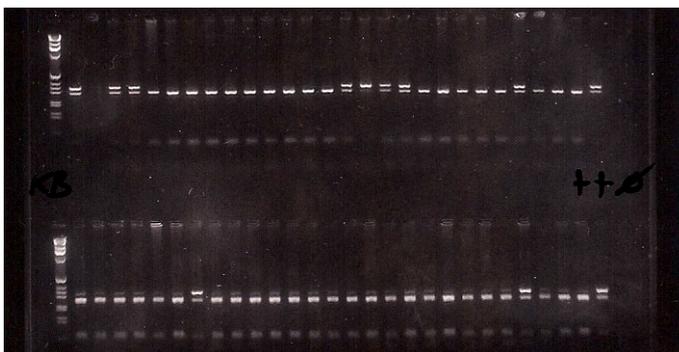
Die fertigen Restriktions-Produkte werden mit (2 µl) Volumen Puffer versetzt. Dieser enthält Ficoll und beschwert die Proben, so dass diese sich gleichmäßig in den Geltaschen verteilen. Außerdem ist diesem Puffer entweder Xylencyanol oder Bromphenolblau bzw. beide Farbstoffe gemeinsam zugesetzt. Diese Farbstoffe erleichtern das Beladen der Geltaschen, wandern ebenfalls zur Anode und ermöglichen eine visuelle Kontrolle der zurückgelegten Laufstrecke.

Die Proben werden in die Probetaschen des Agarosegels pipettiert, gleichzeitig mit den Proben wird ein Längenstandard (kb-Leiter) in die erste Geltasche pipettiert.

Nach Anlegen einer Spannung von 170 V für 120 Minuten sind die DNA – Fragmente abhängig von Ihrer Schwere unterschiedlich weit zur Anode gewandert. Das leichtere Restriktionsprodukt wandert schneller und ist als unterer weißer Querstrich zu erkennen, das schwerere Restriktionsprodukt wandert langsamer und ist als oberer weißer Querstrich zu erkennen.

Liegt bei dem Bsp – Verdau der homozygote Wildtyp GG vor, so ist nur ein dicker Querstrich unten (entspricht 2 x G) zu erkennen, liegt ein heterozygoter Mutationstyp GA vor, so ist ein Querstrich unten (entspricht G) und einer oben (entspricht A) zu erkennen; beim homozygoten Mutationstyp AA ist ein dicker Querstrich oben zu erkennen (entspricht 2 x A). Bei dem Tail – Verdau ist entsprechendes zu erkennen.

Die aufgetrennte DNA wurde nach der Elektrophorese auf einem UV-Transluminator (302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert.



**Abbildung 6:** Foto einer Lp(a) – Restriktion

## 2.5.7 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Als Polymorphismus wird eine häufig vorkommende Variation in der DNA-Sequenz bezeichnet. Die Prävalenz des selteneren Allels muss dabei mindestens 1% betragen. Die Polymorphismen gehen von einer stattgefundenen Mutation aus und können als Nukleotidsubstitution, Insertion, Deletion oder Mikrosateliten auftreten.

### „Single nucleotide polymorphism“

Der „single nucleotide polymorphism“ (SNP) ist definitionsgemäß die Position eines Basenpaares in der DNA, in der verschiedene Sequenzalternativen (Allele) bei normalen Individuen in einer Population vorkommen. Das seltenste Allel muss dabei mit einer Häufigkeit von mindestens 1% auftreten. Theoretisch kann ein SNP di-, tri-, oder tetraallelisch sein (A,T,C,G), die tri- und tetraallelische Varianten sind aber extrem selten. Die möglichen Austausche – C>T (G>A im DNA-Gegenstrang), C>A (G>T), C>G (G>C) und T>A (A>T) treten nicht gleich häufig auf – etwa  $\frac{2}{3}$  aller SNPs stellen C>T bzw. G>A Varianten dar (Brookes 1999).

## 2.5.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung beruht auf der Tatsache, dass die DNA-Polymerase solange den komplementären Strang zu verlängern vermag, bis sie ein verändertes Nucleotid (Didesoxynucleotid, dd NTP) einbaut. Danach stoppt die Reaktion durch Kettenabbruch (Sanger et al., 1977). Wird bei der Sequenzierreaktion eine bestimmte Mindestzeit eingehalten, so liegen bis zu einer bestimmten Fragmentlänge alle möglichen Fragmentgrößen bis zu dieser vor, d.h. jeweils mit einem Längenunterschied von einer Base zueinander. Diese Mischung unterschiedlicher Fragmentgrößen lässt sich schließlich in der Acrylamidgelelektrophorese bis auf eine Base Unterschied genau auftrennen, so dass sich die Basenabfolge der untersuchten DNA erkennen lässt. Der Ablauf besteht aus den unter „PCR“ beschriebenen Temperaturschritten.

Die Sequenzierung erfolgte am ABI Prism 3700 (Applied) durch Kapillarelektrophoretische Auftrennung der DNA-Sequenzierproben.

**Verwendete Primer:**

LpF: AGA TGA AGG TCT AGG GGT GAG  
LpR: GAA GAA CCA CTT CCT TAT GTT CC

Die Sequenzierung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**1) PCR mit Taq PCR Core Kit von Qiagen**

- DNA: working solution von 0,5 ng/µl ansetzen (Steriles Wasser)
  - Primer: working solution von 20 pmol/µl ansetzen (mit TE-Puffer, pH 8)
  - **PCR-Ansatz:**
    - 10 µl DNA (0,5 ng/µl)
    - 2,5 µl Qiagen Puffer (10x)
    - 0,5 µl dNTPs (10 nM)
    - 0,5 µl MgCl<sub>2</sub>
    - 0,5 µl Primer forward
    - 0,5 µl Primer reverse
    - 0,2 µl Taq-Polymerase
    - 10,3 µl steriles Wasser
    - 25 µl Gesamtansatz
- 
- zunächst wird aus allen Komponenten außer der DNA einen Mastermix für alle Proben hergestellt
  - Mastermix vorlegen
  - DNAs dazupipettieren
  - Primer und Mastermix auf Eis halten
  - Taq-Polymerase direkt vor Gebrauch aus -20°C Schrank nehmen und danach auch wieder einfrieren (bleibt bei -20°C flüssig)
  - ggf. Proben kurz zentrifugieren

- **PCR-Protokoll (1 h 12 min):**

96°C 5 min

96°C 30 sec

58°C 30 sec

72°C 30 sec

72°C 7 min

4°C hold

}  
40 x  
}

**Aufbewahrung:**

2-3 Tage bei 4°C (Kühlschrank), für längere Zwischenlagerung einfrieren (-20°C)

**2) Gel nach PCR (wenn Primer noch nicht etabliert sind)**

- Probenvorbereitung: 1 µl 10 x Auftragspuffer (Blaumarker) und 2 µl PCR-Produkt
- 5 µl BenchTop PCR Marker von Promega auftragen
- Gel bei 100 V laufen lassen bis Marker vollständig getrennt
- Ausdruck

**3) Aufreinigung der PCR Produkte mit Millipore Multiscreen Platten**

- 96er Filter-Platten von Millipore, MANU030 (nach unten offen mit eingesetztem Filter)
- 96er Mikrotiterplatte mit blauem Adapterring daruntersetzen
- 10 µl steriles Wasser auf die Filter in der oberen Filterplatte geben, 15 Minuten einweichen lassen (Deckel auf Filterplatte)
- (nur so viele Filter-Wells mit Wasser befeuchten, wie man Proben aufreinigen will, die restlichen Wells kann man dann später noch benutzen)
- 23 µl PCR-Produkt (alles was noch da ist) darauf pipettieren (Deckel auf Filterplatte)
- zentrifugieren: 10 Minuten, 3000 rpm (Zentrifugeneinsätze für Platten, Platte wiegen und Gegengewicht basteln aus Platten, Einzeleppe etc., nicht mehr als 0,5 g Abweichung zwischen Platte und Gegengewicht!)

- Erklärung: der Filter hält DNA Stücke von ca. 50-70 Basen und größer fest (also auch das PCR-Produkt) und lässt Primer (bis ca. 40 Basen), Nucleotide, Salze, TaqPolymerase passieren
- untere Mikrotiterplatte nach zentrifugieren ausschütten und wieder mit Adapterring unter die Filterplatte setzen
- sofort 20 µl steriles Wasser auf die Filter geben (Deckel auf Filterplatte)
- wichtig, dass man nicht zu lange wartet, wenn der Filter trocken wird, sind die DNA-Fragmente schwierig herauszulösen
- Plattenschüttler: 10 Minuten, 800 rpm (mit Klebeband die Platte gut am Schüttler festkleben)
- Erklärung: das Wasser geht hierbei nicht durch die Membran, die DNA wird nach oben mechanisch aus dem Filter herausgelöst; das ist nicht das offizielle Protokoll, eigentlich soll mit der Vakuumpumpe das Wasser und die DNA nach unten abgesaugt werden, geht aber auch ohne Pumpe)
- das Wasser mit den PCR Produkten von oben abpipettieren (Platten dazu am besten leicht kippen) und in neue 96 Well Platte geben

Aufbewahrung:

2-3 Tage bei 4°C (Kühlschrank), für längere Zwischenlagerung einfrieren (-20°C)

**4) Gel zur Mengenbestimmung der PCR Produkte**

- Probenvorbereitung: 1µl 10 x Auftragspuffer (Blaumarker) und 2 µl gereinigtes PCR-Produkt
- 5 µl GeneRuler 100 bp DNA-Leiter von Fermentas als Marker auftragen
- Gel bei 100 V laufen lassen bis Marker vollständig getrennt
- Ausdruck
- an Hand der Markerbanden Menge (siehe Markerinfo) die PCR-Produkte quantifizieren

## 5) Sequenzierreaktion mit BigDye Terminator v3.1 Kit

- **Ansatz pro Probe:**

1  $\mu$ l BigDye

2  $\mu$ l 5 x Puffer

0,5  $\mu$ l 5 pmol/ $\mu$ l Primer (entweder forward oder reverse, nicht beide gleichzeitig!)

200 ng gereinigtes PCR-Produkt

x  $\mu$ l steriles Wasser

10  $\mu$ l Gesamtansatz

- Erst Reaktionsmastermix erstellen mit BigDye, Puffer, Primer und Wasser für alle Proben
- Mastermix in 96 Well – Platte vorlegen
- gereinigtes PCR – Produkt dazugeben
- wenn vorwärts und rückwärts sequenziert werden soll, dann 2 Ansätze machen

Die Menge der eingesetzten DNA ist kritisch für das Gelingen der Sequenzierung (die Peaks der Chromatographie können sonst nicht klar separiert werden, da entweder überschießend oder zu klein); das Gel nach der Aufreinigung ist daher wichtig.

Man kann maximal 7,5  $\mu$ l gereinigtes PCR-Produkt einsetzen, daher ist es wichtig zu Beginn einen mindestens 25  $\mu$ l PCR-Ansatz zu wählen, damit genug Produkt da ist (in weniger als 20  $\mu$ l Wasser kann man das gefilterte PCR-Produkt bei der Reinigung nicht aufnehmen, um höhere Konzentrationen zu erreichen).

Die Komponenten des Mastermixes auf Eis halten, die gereinigten PCR-Proben ebenfalls (oder in Kühlaggregat). BigDye ist lichtempfindlich, dunkel halten.

- **Sequenzierungs-PCR-Protokoll**

Vor dem Starten der Sequenzierungs-PCR die Ansätze runterzentrifugieren.

96 °C 10 sec	}	25 x (Dauer: ~ 1h 50 min)
55°C 10 sec		
60°C 4 min		
4°C hold		

Man kann die PCR über Nacht laufen lassen, wird dann am Ende der Sequenzierzyklen auf 4°C gehalten).

**Aufbewahrung:**

Man kann den Sequenzieransatz nach der PCR aufbewahren, wenn er nicht direkt weiterverarbeitet wird: 1-2 Tage im Kühlschrank (4°C), für längere Zeiträume einfrieren (-20°C).

**WICHTIG:** Die Aufbewahrung muss lichtgeschützt erfolgen (fluoreszenzmarkierte Dideoxynucleotide), Platte in Alufolie einwickeln oder in dunkle Box legen.

**6) Aufreinigung der Sequenzierprodukte**

- MANHV45 96 Well-Platten von Millipore nehmen (auch unten offen und eingesetztem Filter)
- mit blauem Adapterring auf 96-Well-Mikrotiterplatte setzen.
- auf die Filter kommt diesmal zusätzlich eine Säule
- Säulenmaterial: Sephadex G50, ultrarein von Sigma
- Sephadex G50 Pulver in den Column-Loader von Millipore (Neurologielabor) füllen
- mit Plexiglasscheibe gleichmäßig in Löcher verteilen
- Millipore Filterplatte darüberschieben, umdrehen und ausklopfen
- Filterplatte wieder auf Adapterring setzen

- 300 µl steriles Wasser auf jede Säule pipettieren (Pulver nicht berühren), Deckel drauf und mit Parafilm umwickeln
- Säulen quellen lassen (3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank)
- danach direkt gebrauchen oder bis max. 14 Tage bei 4°C versiegelt aufbewahren
- zentrifugieren: 5 min, 2720 rpm (910 g), Raumtemperatur (Gegengewicht!)
- Wasser in Mikrotiterplatte verwerfen und Mikrotiterplatte ersetzen durch ThermoFast96 Well-Platte
- 10 µl steriles Wasser auf jede Säule pipettieren (Säule nicht berühren)
- 10 µl Sequenzieransatz auftragen
- zentrifugieren: 5 min, 2720 rpm (910 g), Raumtemperatur (Gegengewicht!)
- PCR-Folie darüber kleben

(Die 10 µl Wasser werden zugesetzt, weil in der Labormedizin zur chromatographischen Trennung der Fragmente 15-20 µl gereinigtes Sequenzierprodukt gebraucht werden, der Sequenzieransatz aber nur 10 µl umfasst (reduzierter BigDye-Verbrauch, BigDye ist teuer)

Aufbewahrung:

Man kann den gereinigten Sequenzieransatz aufbewahren, wenn er nicht direkt weiterverarbeitet wird: 1-2 Tage im Kühlschrank (4°C), für längere Zeiträume einfrieren (-20°C).

**WICHTIG:** Die Aufbewahrung muss lichtgeschützt erfolgen (fluoreszenzmarkierte Dideoxynucleotide), Platte in Alufolie einwickeln oder in dunkle Box legen.

## **7) Chromatographische Trennung der Sequenzierfragmente in der Labormedizin**

- auf die Platte mit den gereinigten Sequenzierprodukten Name der Arbeitsgruppe schreiben (ST für Stoll), eigenen Nachnamen und Plattennamen (an die Seite, nicht auf die Folie)
- Auftragsformular ausfüllen
- Plattenlayout in Vordruck eintragen
- Abgabe der Proben: 9.30-10.00 Uhr und 13.30-14.00 Uhr in der Labormedizin

## 2.6 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

- Zentrifuge:** Heraeus Instruments Biofuge 13  
D-37520 Osterode  
Fabr.-Nr.: 224697  
Baujahr 1995  
Bestell-Nr.: 75003635/01
- Wasserbad:** Julabo P  
Julabo Labortechnik GmbH  
D-77960 Seelbach  
Messbereich: 0-100°C  
Baujahr 1985
- Vortex:** Vortex Genie 2  
Scientific Industries Bohemia, N.Y. 11716 USA  
Vertrieb: Bender & Hobein AG Zürich  
Serien-Nr.: 2-62832  
Baujahr 1990
- Thermocycler:** eppendorf Mastercycler® gradient  
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH  
D-22331 Hamburg  
Serien-Nr.: 5331 02189
- Elektrophorese:** Elektrophoresekammer Nautico 2020  
Firma Hölzel  
Sitz der Firma  
Consort Power Supply E863  
Belgien
- UV-Transluminator:** CAMAG Reprostar II
- Sequenzierung:** ABI Prism 3700 (Applera)

## 2.7 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung verwendeten wir das Programm Stat-View Version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

### 2.7.1 Median

Median (oder Zentralwert) bezeichnet eine Grenze zwischen zwei Hälften. In der Statistik halbiert der Median eine Verteilung. Gegenüber dem arithmetischen Mittel, auch Durchschnitt genannt, hat der Median den Vorteil, robuster gegenüber Ausreißern (extrem abweichenden Werten) zu sein. Deswegen eignet sich der Median besonders gut als Lageparameter und für nicht normalverteilte Grundgesamtheiten.

### 2.7.2 Nullhypothese- Alternativhypothese

Die Nullhypothese besagt, dass das untersuchte Merkmal keinen Einfluss auf die untersuchten Zielgrößen hat.

**H<sub>0</sub>**: Die Mutation 93 CT und 121 GA der Promotor Region des Apolipoprotein(a)-Gens hat keinen Einfluss auf die Aktivität des Lp(a) bzw. die Mutation hat keinen Einfluss auf die Ausbildung einer venösen Thrombose. Die Alternativhypothese besagt, dass das untersuchte Merkmal einen Einfluss auf die untersuchten Zielgrößen hat.

**H<sub>1</sub>**: Die Mutation hat einen Einfluss auf die Aktivität des Lipoprotein(a) bzw. hat einen Einfluss auf die Ausbildung einer venösen Thrombose. Bei zweiseitigem Test bedeutet dies, dass die Aktivität sowohl zu- als auch abnehmen kann durch die Mutation, bzw. dass die Mutation sowohl vermehrt zu einer Thrombose führen kann, als auch vor einer venösen Thrombose schützen kann.

### 2.7.3 Die 4- Feldertafel

Die 4-Feldertafel bezeichnet in Kreuztabellen die absoluten Häufigkeiten bestimmter Merkmalsausprägungen, in dieser Studie betrifft dies das Vor-

handensein des Merkmals TT=1 und AA=1, was bedeutet homozygote Mutation bei Nukleotid 93 bzw. 121 der Promotorregion des Lipoprotein(a) - Gens, Lipoprotein(a) - Konzentration unterhalb der 10. Perzentile der entsprechenden Altersgruppe und die Zugehörigkeit zur Patienten oder zur Kontrollgruppe. Diese Merkmale werden in zweidimensionalen Tafeln dargestellt. Die statistische Auswertung einer 4-Feldertafel erfolgt anhand des Chi-Quadrat-Tests oder des Fisher's exact test (bei Werten  $n < 4$  pro Gruppe).

#### **2.7.4 Chi-Quadrat-Test**

Zur Berechnung, ob der gefundene Zusammenhang zwischen zwei Variablen auf Zufall oder auf einer Systematik beruht, verwendet man den **Chi-Quadrat-Test**.

Dabei wird ein p-Wert festgelegt. Ist  $p < 0,05$ , so ist das Ergebnis signifikant, man kann von einem systematischen Zusammenhang zwischen den untersuchten Variablen sprechen. Ist  $p \geq 0,05$ , so ist das Ergebnis nicht signifikant; der scheinbare Zusammenhang zwischen den untersuchten Variablen beruht auf Zufall.

Der Chi-Quadrat-Test wird für  $n > 4$  angewendet. Der **Fisher's exact test** wird für  $n < 4$  angewendet.

#### **2.7.5 Fisher's exact test**

Mit diesem Test, der im Unterschied zum Chi-Quadrat-Test auch für kleine Stichproben exakte Daten liefert, können Nominaldaten (relative Häufigkeiten) zweier unabhängiger Stichproben miteinander verglichen werden. Er kommt dann zur Anwendung, wenn in einem Feld der 4-Feldertafel ein Wert kleiner 5 vorkommt.

#### **2.7.6 Odds Ratio**

Die Odds Ratio (OR) kann als ungefähre Näherung für das relative Risiko gelten, wenn das Basisrisiko des Zielereignisses in der Bevölkerung klein ist (wird in retrospektiven Auswertungen benutzt). Als Maß für den Zu-

sammenhang zwischen der Exposition und dem Zielereignis verwendet man bei Fall-Kontroll-Studien die OR. Sie vergleicht im Gegensatz zu dem relativen Risiko keine Wahrscheinlichkeiten sondern Chancen. Es kann drei Ergebnisse für die OR geben:

OR = 1: kein Einfluss (hier: Mutation hat keinen Einfluss auf Zielgrößen)

OR < 1: Mutation wirkt schädigend (hier: Aktivität↓ bzw. Thromboserisiko↑)

OR > 1: Mutation wirkt schützend/präventiv (hier: Aktivität↑ bzw. Thromboserisiko↓)

Das Konfidenzintervall (=Vertrauensbereich) besagt, dass die errechnete OR mit 95%iger Wahrscheinlichkeit tatsächlich innerhalb der errechneten Grenzen liegt, z.B. 95% KI: OR= 1,5

Ist die OR=1, so gilt die Nullhypothese, ist die OR ≠ 1, so wird die Nullhypothese verworfen, es gilt dann die Alternativhypothese.

### **2.7.7 Logistische Regression**

Die logistische Regression ist eine Methode um Probleme zu analysieren, die eine oder mehrere Variablen enthalten, die das Ergebnis bestimmen können. Das Ergebnis wird dabei entweder anhand einer dichotomen Variablen gemessen (die Variable kann nur 2 verschiedene Werte annehmen, hier gilt: 0=Merkmal nicht vorhanden, 1=Merkmal vorhanden) oder es werden kontinuierliche Daten verglichen (z.B. das unterschiedliche Alter in Jahren).

Das Ziel der logistischen Regression ist es, das am besten passende Modell zu finden, um die Beziehung des abhängigen (hier: Kontrollgruppe/Gruppe der venösen Thrombosen) von der/den unabhängigen Variablen (hier: Lipoprotein(a) 93 CT- und 121 GA - Polymorphismus bzw. Lipoprotein(a)-Aktivität unter der 10. Perzentile ja/nein) zu beschreiben, so genannter "goodness of fit"-Test ( $R^2$ ).

## **2.7.8 Haplotypanalyse**

Ausgehend von den ermittelten Lp(a)-Genotypen wurden in der vorliegenden Arbeit die Frequenzen der möglichen Haplotypen untersucht.

Die Ableitungen wurden mit Hilfe des Programms Haploview® Version 3.32 bzw. Version 4.1 (Broad Institute, Cambridge, USA, 2006) sowie mit einer Varianzkomponentenanalyse: Solar durchgeführt.

Mittels des Haploview® Programms wurde bestimmt, ob sich die Frequenz der spezifischen Haplotypen bei Patienten signifikant von der der Kontrollen unterscheidet.

Desweiteren wurden mögliche Assoziationen zwischen TE und zwischen VT und Lp(a) Polymorphismen mit dem Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) untersucht (Vergleich Indexpatient versus Eltern).

Haploview® führte darüber hinaus Permutationstests auf eine globale Assoziation der Haplotypen mittels zufälligen Zuweisens der Fall- Kontroll-Markierungen durch. Werden mit dieser Methode eine bestimmte Anzahl signifikanterer p-Werte erhalten als in der Auswertung mit den „echten“ Markierungen, spricht dies dafür, dass es sich um Zufallsbefunde handelt; dies spiegelt sich dann in einem Permutations-korrigierten p-Wert größer 0,05 wieder.

## **2.7.9 Transmission-Disequilibrium-Test (TDT)**

Mit Hilfe des TDT wird untersucht, welches Allel häufiger von einem heterozygoten Elternteil an ein erkranktes Kind übertragen wird. Dieser Sachverhalt lässt sich leicht mit Hilfe einer Vierfeldertafel aufstellen. Damit wird eine Assoziationsstudie mit internen Kontrollen und daher höchstmöglicher Homogenität durchgeführt, weil die beiden nicht auf das erkrankte Kind übertragenen elterlichen Allele automatisch als interne Kontrollgruppe fungieren. Der TDT entspricht dem aus der Statistik bekannten McNemar-Test für dichotome Merkmale in verbundenen Stichproben.

Ein wesentlicher Vorteil des TDT gegenüber klassischen Fall-Kontroll-Studien ist seine Robustheit gegenüber Stratifizierungen innerhalb der untersuchten Population. Es werden nämlich falsch-positive Resultate aus Fall-Kontroll-Studien, die auf eine nicht spezifizierte Populationsstratifizie-

rung zurückzuführen sind, durch die Verwendung interner Kontrollen vermieden.

### **2.7.10 Varianzkomponentenanalyse SOLAR®**

Die Varianzkomponentenanalyse hat sich zu einem der beliebtesten Werkzeuge für die Analyse von polygenen Phänotypen entwickelt. Insbesondere für Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit und Herzinfarkt. Die Varianzkomponentenanalyse enthält einige Vorteile.

Das Analysekonzept ist vielseitig, sie gibt dem Benutzer die Möglichkeit, den Einfluss rein genetischer Einflüsse - und die Interaktion von Haushalts- und Umwelteinflüssen auf die Lp(a)-Spiegel und Kringle IV-Phänotypen bei Kindern mit TE zu untersuchen.

Heritabilität und Haushaltseinflüsse wurden für Lipoprotein (a), Cholesterin, LDL-/HDL- Cholesterin, Fibrinogen, Faktor II, V, VIIIc, von Willebrand Faktor, Antithrombin, Protein C, Protein S, Plasminogen, Protein Z, Gewebefaktor Inhibitor, Prothrombin Fragment f1.2 und D-Dimer bei 1032 erstgradigen Familienmitgliedern aus 282 Kinder – Schlaganfallfamilien mit o.g. statistischen Spezialverfahren (Varianzkomponentenanalyse: SOLAR®) untersucht.

### **2.7.11 Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test**

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ist ein parameterfreier statistischer Test. Der U-Test ist ein Homogenitätstest. Er dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen, also ob zwei unabhängige Verteilungen A und B (zum Beispiel eine unbeeinflusste und eine beeinflusste) zu derselben Grundgesamtheit gehören.

### **2.7.12 Kruskal-Wallis-Test**

Der Kruskal-Wallis-Test ist ein parameterfreier statistischer Test, mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse verglichen wird, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben (Gruppen) hinsichtlich einer ordinalskalierten Variable unterscheiden. Er ähnelt einem Mann-Whitney-U-Test und ba-

siert wie dieser auf Rangplatzsummen, mit dem Unterschied, dass er für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen angewendet werden kann.

### **2.7.13 Bonferroni**

Die Bonferroni-Methode oder Bonferroni-Korrektur (nach Carlo Emilio Bonferroni) gibt es in der mathematischen Statistik. Mit ihrer Hilfe wird die Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen neutralisiert. Sie besagt, dass, wenn man  $n$  unabhängige Hypothesen an einem Datensatz getestet, die statistische Signifikanz, die für jede Hypothese getrennt benutzt werden soll,  $1/n$  der Signifikanz ist, die sich bei der Testung nur einer Hypothese ergeben würde.

### **2.7.14 Kolmogorov-Smirnov**

Der Kolmogorov – Smirnov – Test ist ein statistischer Test auf Übereinstimmung zweier Wahrscheinlichkeitsverteilungen.

Mit seiner Hilfe kann anhand von Zufallsstichproben geprüft werden, ob zwei Zufallsvariablen die gleiche Verteilung besitzen oder eine Zufallsvariable einer zuvor angenommenen Wahrscheinlichkeitsverteilung folgt.

## **2.8 Statistischer Hintergrund für die phänotypische Varianz**

Unter der Annahme, dass mehrere Gene mit kleinen Effekten einen pädiatrischen AIS beeinflussen, wurde, unter der Prämisse der Normalverteilung in der Bevölkerung, die Heritabilität ( $h^2r$ ) für die Lipid-Konzentrationen und Gerinnungsfaktoren nach der Varianz-Komponenten Analyse in SOLAR geschätzt.

Diese Methode ermöglicht die Messungen der gesamten phänotypischen Varianz zu separieren und damit zum einen die verursachenden polygenen Effekte und die zufällig durch die Umwelt verursachten Faktoren getrennt untersuchen zu können, zum anderen den Anteil der Varianz zu

ermitteln, welcher auf gemeinsame Umwelt- und Haushaltsfaktoren ( $c^2$ ) zurückzuführen ist.

Dabei erklärt die berechnete  $h^2$  die Schätzungen der gesamten Varianz eines Merkmals durch additive genetische Effekte.

Vor der Varianzkomponentenanalyse wurde die phänotypische Verteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov Test überprüft, um die Normalverteilung des Merkmals innerhalb der Bevölkerung sicherzustellen, was als Bedingung für parametrische analytische Verfahren gilt.

Sämtliche Eigenschaften lagen normalverteilt vor, außer  $Lp(a)$ , welches anschließend logarithmisch transformiert und dann in dem Kolmogorov-Smirnov-Test für Normalität bestimmt wurde.

Um die phänotypische Variation  $h^2$  oder  $c^2$  in dieser pädiatrischen AIS Studienfamilie zu bestimmen, wurden die möglichen Kovariaten - wie FV G1691A Mutation, die Prothrombin G20210A Mutation, Alter bei Blutentnahme, Blutgruppe, Geschlecht, Rauchen sowie die Verwendung von oralen Kontrazeptiva - in das endgültige Modell der Varianzkomponentenanalyse adjustiert.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Ziel der Untersuchung**

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob eine Assoziation zwischen Lp(a), Kringle IV Repeats und den genetischen Lp(a)-Polymorphismen 121 GA und 93 CT mit dem frühen Auftreten TE und VT in familienbasierenden Ansätzen besteht.

Desweiteren wurde der Einfluss von nicht-genetischen Faktoren wie Haushalt und Umwelt und der Kovariaten Rauchen, Hormontherapie und Geschlecht auf die Höhe des Lp(a)-Spiegels / Kringle IV Struktur sowie auf Fettstoffwechsel und Gerinnungsfaktoren bei Kindern mit TE überprüft.

### **3.2 Patienten- und Kontrollkohorte**

In 282 Familien und Haushalten wurden insgesamt 1.002 Patienten, davon 498 Kinder, rekrutiert und untersucht. Die untersuchten Familien haben zwischen 3 und 10 Familienmitglieder mit einem Median von 3 Mitgliedern in einem gemeinsamen Haushalt.

Die wichtigsten Merkmale der 1.002 Familienangehörigen sind in Tabelle 1 dargestellt (siehe unten). Von den Indexpatienten der vorliegenden Stichprobe sind 54% männlich, das Durchschnittsalter beträgt 4 Jahre mit einer Spannweite von 0,1 bis 18 Jahren, das Alter der restlichen Stichprobe liegt bei durchschnittlich 22 Jahren mit einer Spannweite von 0,1 bis 65 Jahren. Das Geschlecht, der Body Mass Index (BMI), und der Anteil prothrombotischer Risikofaktoren unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Nachkommen.

Charakteristika	Indexpatienten (n=282)	Geschwister (n=216)	Eltern (n=504)
<u>Krankheit/Gesundheitsstatus</u>			
AIS/TVT/MI	282/-/-	3/-/-	1/8/3
Alter bei Blutentnahme Median (min-max)	4 (0,1-18)	6 (0,1-18)	35 (17-65)
Männliches Geschlecht (%)	152 (54)	115 (53)	241 (47,9)
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) Median (min-max)	16,0 (7,9-30,9)	17,4 (10,8-29,3)	24,6 (17,7-46,9)
<u>Risikofaktoren</u>			
F VG1691A: Anzahl (%)	41 (14,5)	23 (10,6)	59 (11,7)
ProthrombinG20210A: Anzahl (%)	19 (6,7)	6 (2,8)	18 (3,6)
Antithrombin-/Protein C-/Protein S- Mangel/APS (no.)	0/4/0/4	0/0/0/0	0/4/0/1
Lp(a)>30mg/dl, Anzahl (%)	72 (25,5)	53 (24,4)	131 (26,0)
Rauchen>12 J. Anzahl (%)	3 (1,1)	10 (4,6)	77 (15,3)
Orale Kontrazeption Anzahl (%)	-	6 (2,8)	31 (11,8)
<u>Therapie</u>			
Aspirin/ Vit. K Antagonisten	25/0	-/-	3/7
Antihypertensive/antidiabetische/ fettsenkende Therapie	4/0/0	0/0/0	75/5/18

**Tabelle 6:** Patienten- und Kontrollkohorte

### 3.3 Einfluss auf den Fettstoffwechsel

Tabelle 7 zeigt die Medianwerte und die Spannweite (Minimum-Maximum) von Lipidbestandteilen sowie den Einfluss von Lp (a) – Spiegeln und Kringle IV – Phänotypen auf Parameter des Fettstoffwechsels.

Zwischen den pädiatrischen Gruppen war kein signifikanter Unterschied ersichtlich.

Hingegen waren, wie erwartet, die Medianwerte (Minimum-Maximum) von Cholesterin und LDL bei den Eltern im Vergleich zu Ihren Nachkommen erwartungsgemäß signifikant höher.

Charakteristika	Testpersonen (Anzahl)	Indexpatienten (n=282)	Geschwister (n=216)	Eltern (n=504)
<u>Lipid Bestandteile</u> (Median(min-max))				
Lp(a) (mg/dl)	1.002	14 (0-168)	16 (0,6-126)	18 (1-201)
Lp(a) kringle 4 repeats	971	27 (12-37)	25 (13-37)	27 (8-37)
Gesamtcholesterin (mg/dl)	870	161 (91-249)	160 (96-222)	192 (93-323)
LDL (mg/dl)	868	85 (24-177)	87 (38-171)	111 (22-236)
HDL (mg/dl)	870	55 (25-104)	58 (29-96)	59 (27-111)

**Tabelle 7:** Median und Spannweite (min-max) von Lipidbestandteilen bei Indexpatienten und Verwandten

### 3.4.1 Phänotypische Varianz

In Tabelle 8 werden die Anteile der phänotypischen Varianz für  $h^2r$  sowie  $c^2$  auf den Lp (a)-Spiegel und Kringle IV Phänotypen bei Familien mit Thromboembolie ersichtlich.

Als die  $h^2r$  ohne Berücksichtigung eventueller Umwelteffekte gemessen wurde, zeigte sich bei den Heritabilitätsschätzungen ein hoch signifikanter Einfluss auf die Lipid-Konzentrationen ( $p < 0,0001$ ).

Der signifikante Anteil der phänotypischen Varianz, der durch die  $h^2r$  erklärt wurde, reichte von 10,6 für Cholesterin bis 85% für Lp (a) kringle 4 repeats.

In einem weiteren Schritt wurden außer der  $h^2r$  zusätzlich die  $c^2$  Alter, Geschlecht und Rauchen in das Messmodell aufgenommen. Es fanden sich hohe und signifikante Heritabilitätsschätzungen für Lp(a) - Serumspiegel, Lp(a) kringle 4 repeats und LDL mit einer entsprechenden phänotypischen Varianz, erklärt durch die Heritabilität von 84,3% (Lp(a)), 76,5% (Lp(a) kringle 4 repeats) und 24,3% (LDL). Ein signifikanter Haushaltseffekt wurde für Cholesterin gemessen (16,3%;  $p < 0,01$ ).

Wichtige Faktoren	Kovariate (%)	Heritabilität ( $h^2r$ ) $\pm$ SE	p-Value	Haushaltsfaktoren ( $c^2$ ) $\pm$ SE	p-Value *
Lp(a)	R	84,3 $\pm$ 9,5	<0,0001	0,4 $\pm$ 6,5	0,5
Lp(a) kringle 4 repeats	R	76,5 $\pm$ 8,5	<0,0001	8,0 $\pm$ 6,7	0,11
Gesamtchol.	A/S (23,5)	9,3 $\pm$ 1,3	0,23	16,3 $\pm$ 6,5	0,006
HDL	A/G/S (10)	15,7 $\pm$ 14,6	0,14	9,4 $\pm$ 7,2	0,1
LDL	A/G/S (16,8)	24,3 $\pm$ 13,1	0,034	10,2 $\pm$ 6,6	0,060

**Tabelle 8:** Anteile der phänotypischen Varianz, ausgeführt in Kovariaten (%), Heritabilität ( $h^2r$ ) und Haushaltsfaktoren ( $c^2$ ) ( $\% \pm SE$ )

SE: Standardabweichung

R: aus dem Model entfernt

\*angepasst für Alter (A), Geschlecht (G), Rauchen (S)

## **3.5 Zusammenhang zwischen den Lp(a)-Mutationen und dem Auftreten von TE und VT**

### **3.5.1 Ergebnis der Sequenzierung**

Die Sequenzierung erfolgte am ABI Prism 3700 (Applied Biosystems) durch Kapillarelektrophoretische Auftrennung der DNA-Sequenzierproben.

Der „single nucleotide polymorphism“ (SNP) ist definitionsgemäß die Position eines Basenpaares in der DNA, in der verschiedene Sequenzalternativen (Allele) bei normalen Individuen in einer Population vorkommen. Das seltenste Allel muss dabei mit einer Häufigkeit von mindestens 1% auftreten. In dieser Arbeit zeigten sich die häufigsten SNPs hier im Lipoprotein (a) – Gen als Lp(a) 121 G>A und 93 C>T.

### **3.5.2 PCR zur Genotypisierung der Mutationen 93 CT und 121 GA im Lp(a) –Gen**

1996 identifizierte Ichinose et al. Nukleotidpolymorphismen, die Substitution von 93 Cytosin zu Thymidin sowie die Substitution von 121 Guanin zu Adenosin in der Promotor -Region des Lipoprotein(a) - Gens. Diese Nukleotidpolymorphismen sind in der 5` flankierenden Region lokalisiert.

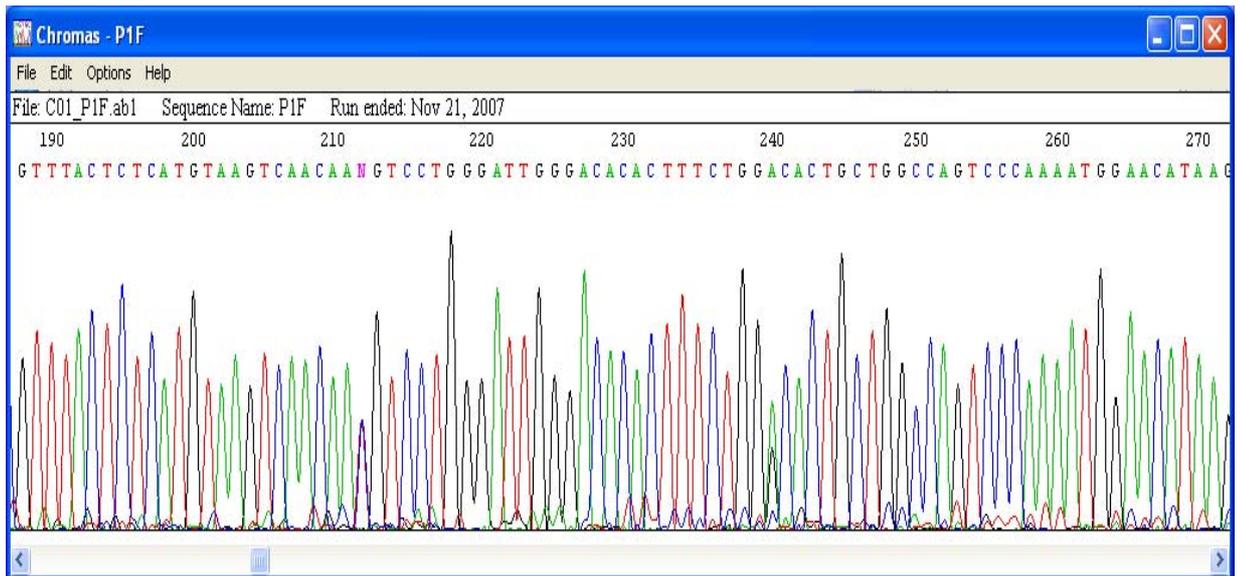
Suzuki et al. erforschte den Einfluss der beiden Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphismus SNP) auf die Genexpression. Es wurde gezeigt, dass ein T in der Position 93 zu einer negativen Genexpression und ein A in der Position 121 zu einer positiven Genexpression führte.

Weiterhin wurden Lp(a) Werte bei Japanischen Individuen gemessen, wobei signifikant erhöhte Lp(a)-Werte bei homozygoten Trägern des 93 C Allels und des 121 A Allels im Vergleich zu homozygoten Trägern des 93 T Allels und des 121 G Allels aufgezeigt werden konnten.

#### **Verwendete Primer:**

LpF: AGA TGA AGG TCT AGG GGT GAG  
LpR: GAA GAA CCA CTT CCT TAT GTT CC

Lp(a)C93T CT  
Lp(a)G121A GA



**Abbildung 7:** Chromatographie –Peaks der Sequenzierung

Es sind 2 Haplotypen SNPs zu identifizieren mit einer Minorellfrequenz von mehr als 1%, von denen 97,5% genetische Variationen von Lp(a) erfassen. Angewendet wurde diese Genotyp Information vom „Centre d’Etude du Polymorphisme Humain (CEPH)“.

Bei denjenigen 2htSNPs, die im Lipoprotein (a) lokalisiert sind, handelt es sich um rs1800769 und rs1853021.

Die unten aufgeführte Tabelle (9) zeigt die Assoziation zwischen den beiden Lp(a)–Polymorphismen (SNPs) und dem Auftreten einer Thrombembolie. In beiden Fällen konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang gemessen werden ( $p \geq 0,05$ ).

#	Name	Overtransmitted	T:U	Chi Square	P Value	
1	rs1800769	G	66:65	0.008	0.9304	Lp(a) 121 GA
2	rs1853021	C	55:43	1.469	0.2254	Lp(a) 93 CT

**Tabelle 9:** „Single-point“ Assoziation (TDT) zwischen Lp(a)-Polymorphismen und Thromboembolie

Im Gegensatz zu den Thromboembolien wurde bei der Untersuchung der Venösen Thrombosen (VT) ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem SNP rs1853021s und VT festgestellt (Chi-Square = 4.0;  $p < 0,05$ ).

	Name	Overtransmitted	T:U	Chi Square	P Value	
1	rs1800769	G	36:25	1.984	0.159	Lp(a) 121 GA
2	rs1853021	C	40:24	4.0	0.045	Lp(a) 93 CT

**Tabelle 10:** „Single-point“ Assoziation (TDT) zwischen Lp(a)-Polymorphismen und venöser Thrombose

Daraus ergaben sich für die Familien mit einem Kind mit erster VT die folgenden drei Haplotypen (Tabelle 11):

Haplotype	Freq.	T:U	Chi Square	P Value
Lp(a)				
<b>GC</b>	<b>0,74</b>	<b>49.1:31.0</b>	<b>4.109</b>	<b>0.0427</b>
AC	0,13	20.0:27.0	1.436	0.3072
GT	0,128	19.0:29.1	2.139	0.1436

**Tabelle 11:** Assoziation zwischen Lp(a)-Polymorphismen und venöser Thrombose

Die Tabelle oben zeigt, dass nur der Haplotyp GC einen signifikanten Zusammenhang mit dem frühen Auftreten einer venösen Thrombose aufweist (Chi-Square = 4.109;  $p < 0,05$ ).

Dieser statistisch signifikante Unterschied zwischen den drei Haplotypen verlor nach Permutationstestung (x1000) jedoch seinen signifikanten Einfluss auf das Ereignis der Assoziation mit dem frühen Auftreten einer venösen Thrombose (Chi-Square = 4.109; Permutations-p = 0.2040).

## 4 DISKUSSION

Zahlreiche klinische sowie Haushalts- und Umweltfaktoren führen nicht nur bei Erwachsenen sondern auch bei Kindern zu erhöhter Thrombin-Generation mit nachfolgender Thrombusbildung (Andrew et al. 1994; Schmidt und Andrew 1995). Sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse haben sich als Ursachen von kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) etabliert, wie zum Beispiel Herz-Kreislauf-Krankheit, Schlaganfall und TVT (Edwards et al. 1999; Stephens et Humphries 2003). Schlaganfälle bei Kindern sind seltene Erkrankungen mit einer Inzidenz von 2,6 pro 100.000 Personen im Jahr (Schoenberg et al. 1978). Die Hälfte der gemeldeten Ereignisse treten in Form des akuten ischämischen Schlaganfalls (AIS) auf.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob eine Assoziation zwischen Lp(a), Kringle IV-Repeats und den genetischen Lp(a)- Polymorphismen 121 GA und 93 CT mit dem frühen Auftreten TE und VT in familienbasierenden Ansätzen besteht.

Desweiteren wurde der Einfluss nicht-genetischer Variablen wie Haushalts- und Umweltfaktoren und der Kovariaten Rauchen, Hormontherapie und Geschlecht auf die Höhe des Lp(a)-Spiegels / Kringle IV-Struktur sowie auf Fettstoffwechsel und Gerinnungsfaktoren bei Kindern mit TE überprüft.

## **4.1 Einfluss genetischer Polymorphismen auf den Fettstoffwechsel und die Gerinnungsparameter sowie auf das frühe Auftreten von thromboembolischen Ereignissen**

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigen, dass kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Lp(a)-Polymorphismen 121 GA und 93 CT und dem frühen Auftreten einer Thromboembolie besteht. Im Gegensatz zu den Thromboembolien wurde bei der Untersuchung der Venösen Thrombosen (VT) ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem SNP rs1853021s und VT festgestellt (Chi-Square = 4.0;  $p < 0,05$ ).

In einer Studie von Snieder et al. (1996, Niederlande) wurden genetische und nicht-genetische Ursachen für die Stabilität und Veränderung von Lipiden und Apolipoproteinen, die während der Lebensdauer auftreten, analysiert. Es wurden zwei unterschiedliche Forschungsprojekte miteinander kombiniert. In dem ersten Projekt wurden die Parameter von 160 Eltern mittleren Alters und ihrem Zwillingsnachwuchs ausgewertet. In dem zweiten Projekt wurden Daten von Zwillingen mittleren Alters mit aufgenommen. Die gemessenen Werte von Gesamtcholesterin, Triglyceriden, HDL und LDL wiesen daraufhin, dass in der Kindheit, verglichen mit dem Erwachsenenalter, teilweise unterschiedliche Gene die oben genannten Parameter beeinflussen. Im Gegensatz dazu fand man sowohl bei den Kindern als auch bei den Erwachsenen dieselben Gene, welche mit der Konzentration der Apolipoproteine und dem Lipoprotein (a) positiv korrelieren.

Auch in einer Studie von Ariéns et al. wurde ein genetischer Einfluß auf prothrombotische Faktoren herausgestellt. Es wurde untersucht, in welchem Umfang prothrombotische Faktoren von genetischen Faktoren abhängig sind. Gemessen wurden Aktivierungsfaktoren der Gerinnung und der Fibrinolyse bei Zwillingen. Auch hier wurde festgestellt, dass genetische Faktoren die Aktivierungsfaktoren im Plasma beeinflussen.

Eine weitere Studie von Vossen et al. (2003 Journal of Thrombosis and Haemostasis) wurde durchgeführt, um Beweise für eine genetische Basis für die Plasmakonzentrationen von Gerinnungsparametern zu etablieren mit dem Ziel das Risiko für Thrombosen besser einzuschätzen. Dazu wurden 330 Blutproben aus einer großen französisch-kanadischen Verwandtschaft mit Protein C-Mangel gesammelt. Untersucht wurden die Heritabilität und der Einfluss der Haushaltsfaktoren auf die Plasmakonzentrationen von verschiedenen Gerinnungsfaktoren und prothrombotischen Faktoren. Insgesamt fanden sich starke Hinweise für die Heritabilität einzelner Gerinnungsfaktoren und der prothrombotischen Parameter. Die Ergebnisse der Varianzanalyse zeigte die höchste Heritabilität für die Komponente der Thrombin-Aktivität an. Hohe Heritabilität wurde ebenfalls für Prothrombin, Faktor V, Faktor IX, Protein C und Protein Z nachgewiesen. Geringe Heritabilität wurde für den von Willebrand Faktor, Antithrombin, Prothrombinfragmente 1+2, D-Dimere und für Protein S gemessen.

In einer Studie von Heller et al. (1993, New England Journal) wurden genetische und Umwelteinflüsse auf Serumlipidspiegel bei Zwillingen untersucht. Dabei wurden Stichproben von Zwillingen, die in einem gemeinsamen Haushalt mit gemeinsamen Umweltfaktoren aufwuchsen mit Stichproben von Zwillingen, welche getrennt aufwuchsen, verglichen. Weiterhin wurden bei der Auswertung die Eizigkeit und das Geschlecht berücksichtigt. Es wurden deutliche Unterschiede zwischen jüngeren und älteren Gruppen bezüglich der Heritabilität des Apolipoprotein B- und Triglyceridspiegels gefunden mit dem Hinweis darauf, dass die Heritabilität für Apolipoprotein B- und Triglyceridspiegel im Alter sinkt. Weiterhin zeigte die Studie, dass die genetischen Effekte der Frauen den Apolipoprotein B-Spiegel stärker beeinflussen als die der Männer.

In verschiedenen Studien wurde bereits berichtet, dass Genpolymorphismen, welche bei verschiedenen Gerinnungsparametern gefunden wurden, die Proteinkonzentrationen und das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen beeinflussen.

Auch in einer Untersuchung von de Lange et al. (2001, Lancet) wurde dies bestätigt. Sie führten eine klassische Zwillingsstudie durch um die Heritabilität der Gerinnungsparameter Fibrinogen, Faktor VII und VIII, von Willebrand Faktor, Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) und Tissue plasminogen activator auf das Risiko für koronare Herzerkrankungen zu bewerten. In dieser Studie wurden 1.002 weibliche Zwillingspaare untersucht. Es wurde verdeutlicht, dass genetische Faktoren einen erheblichen Einfluss auf die Plasmakonzentrationen der Gerinnungsproteine haben, welche das Risiko für koronare Herzerkrankungen erhöhen. Die Ergebnisse der Studie unterstützt die Bedeutsamkeit diejenigen Proteine genetisch zu erforschen, welche an der Gerinnung und an atherothrombotischen Erkrankungen beteiligt sind.

Auf Grund der Ergebnisse früherer Studien galt das Apo (a)-Gen als Haupteinflussfaktor auf die Höhe des Lp(a)-Spiegels. Desweiteren haben verschiedene Studien herausgestellt, dass die schwarze Bevölkerung durchschnittlich höhere Lp(a)-Spiegel aufweist als die Caucasier.

Auch in der Studie von Scholz et al. (1999, Österreich) wurden diese Hypothesen bestätigt. Bei 63 österreichischen Familien, 55 schwarzen Familien (Südafrika) und 22 Familien aus der Bevölkerungsgruppe der Khoisan („Hottentotten“ aus dem Süden und Südwesten Afrikas) wurden der Lp(a)-Spiegel und das Apo(a)-Gen der Kringle IV-Struktur untersucht. Bei allen Bevölkerungsgruppen konnte der Lp(a)-Spiegel in hohem Maße durch genetische Faktoren erklärt werden (50% - 70%). Bei der schwarzen Bevölkerung 51%, bei den Khoisan 61% und bei den Caucasiern 71%. Bei den Caucasiern war die Einflussgröße geringer als in vorherigen Studien geschätzt wurde (>90% bei Kraft et al.). Während praktisch alle genetischen Einflüsse bei Caucasiern durch den Zusammenhang der Variation mit dem Apo(a)-Gen erklärt werden konnten, war dies bei den Afrikanern nicht der Fall.

## **4.2 Einfluss nicht-genetischer Faktoren auf den Fettstoffwechsel und die Gerinnungsfaktoren sowie auf die Höhe des Lp(a)-Spiegels und der Kringle IV Struktur**

Die hier vorliegende Studie wurde durchgeführt, um zu ermitteln, ob Heritabilität und ökologische Faktoren möglicherweise das Auftreten von akuten ischämischen Schlaganfällen (AIS) bei kaukasischen Kindern und ihren Familien beeinflussen.

Bisher wurden lediglich Zwillingsstudien zu diesem Thema durchgeführt, wie die Lipidmessungen von Heller et al. (1993), Snieder et al. (1997) und Middelberg et al. (2002, 2006), oder Studien über Heritabilitätsschätzungen für Gerinnungsfaktoren bei gesunden Zwillingen von de Lange et al. (2001), Ariens et al. (2002) sowie von Souto et al. (2000).

Die für diese Studie erhobenen Daten basieren auf der Stichprobe junger AIS-Patienten, die in der pädiatrischen Schlaganfall-Datenbank in Münster gesammelt wurden. Die Erhebung schließt sowohl die Indexpatienten als auch Brüder, Schwestern und Eltern (Kernfamilien) der Betroffenen ein. Mit dem Follow-up eines 5-Jahres-Intervalls konnten zusätzliche Informationen über genetische und Umweltvariationen in dieser AIS-Kohorte erlangt werden.

Die vorliegenden Analyseergebnisse zeigten die höchsten Heritabilitätsschätzungen für Messwerte des Lp(a) auf und niedrigere, aber immer noch erhebliche Heritabilitäten wurden für LDL identifiziert. Zusätzlich zu der starken Heritabilität, die für Lp(a) Kringle IV repeats und Lp(a)-Konzentrationen gefunden wurden, sind auch die gemeinsamen Umwelteinflüsse auf Lipid- und Gerinnungsfaktorwerte während der Kindheit und im frühen Erwachsenenalter für die Erkrankung mit AIS bedeutsam. Es wird deutlich, dass der familiäre Lebensstil eine wichtige Rolle spielt.

In einer Studie von Osborne et al. wurde herausgefunden, dass die Gesamtcholesterinspiegel bei Zwillingen in einem Alter von 18 bis 55 Jahren vom Alter nicht beeinflusst wurden. Hingegen zeigten die Forschungsergebnisse von McDonough et al. 1962 ein Ansteigen des Cholesterinspiegels bei Zwillingen im Alter auf.

In der oben aufgeführten Studie von Heller et al. (1993, New England Journal), wo Zwillingsstichproben bezüglich der Haushaltsbedingungen verglichen wurden, konnte aufgezeigt werden, dass ein gemeinsames Aufwachsen sowohl die Apolipoprotein A-I und B-Spiegel bei älteren Zwillingen als auch die Apolipoprotein B-Spiegel bei Frauen signifikant beeinflussten.

In der o.g. Studie von Snieder et al. (1996, Niederlande) wurde verdeutlicht, dass sich in der Jugend unabhängig vom Geschlecht - und bei Frauen in den Wechseljahren - erhebliche Veränderungen bei den Lipidkonzentrationen zeigten. In diesen Zeiträumen finden große Veränderungen in der Produktion von Sexualhormonen statt, welche auf LDL-Rezeptoren und Lipidenzymen wirken und dadurch Lipidveränderungen verursachen können. Diejenigen Frauen der Zwillingsgruppe mittleren Alters, die sich in den Wechseljahren befanden, zeigten signifikant höhere Werte für Gesamtcholesterin, LDL und ApoB, wohingegen Frauen, welche die Pille einnahmen, höhere Werte für HDL, ApoA1 und Triglyceride aufwiesen.

In der bereits oben erwähnten Studie von Ariéns et al. fand man keinen Einfluss von Umweltfaktoren wie Rauchen, menopausaler Status oder Einnahme oraler Kontrazeptiva auf Aktivierungsfaktoren der Gerinnung und der Fibrinolyse bei Zwillingen.

In der Studie von Vossen et al. (2003 Journal of Thrombosis and Haemostasis) wurde, wie oben beschrieben, eine geringe Heritabilität für den von Willebrand Faktor, Antithrombin, Prothrombin fragmente 1+2, D – Dimeren und für Protein S gefunden. Hingegen wurden für diese Parameter ein hoher Einfluss der gemeinsamen Haushaltsfaktoren auf die phänotypi-

sche Variation gefunden. Insgesamt wurde herausgestellt, dass gemeinsame Haushaltseinflüsse (z.B. Diät, sportliche Betätigung) einen Teil der zuvor veröffentlichten Heritabilität für die Höhe der von Willebrand Faktor-Spiegel erklären können.

In einer Studie von Mitchell et al. von 1996 wurden 42 mexikanische Familien, darunter 1.236 Verwandtschaftsmitglieder ersten, zweiten und dritten Grades untersucht. Hier wurde das Ergebnis der Genetik und der Haushaltseinflüsse mit den kardiovaskulären Risiken in Verbindung gebracht (Fettstoffwechsel, Lipoprotein (a), Zucker, Hormone, Blutdruck und BMI). Die Heritabilität für Cholesterin in dieser Studie lag bei 39% und war somit mittelmäßig zu interpretieren, während in zuvor durchgeführten Studien mit 40-60% diesbezüglich eher hohe Heritabilitäten gemessen wurden (Hansen et al. 1986). Somit konnte gezeigt werden, dass nicht nur die genetischen Marker, sondern auch die allgemeinen kardiovaskulären Risiken eine Rolle für thromboembolische Ereignisse spielen.

### **4.3 Einfluss des Fettstoffwechsels und der Gerinnung**

In der hier vorliegenden Studie wurden Medianwerte und Spannweite von Lipidbestandteilen bei Indexpatienten, deren Geschwister und Eltern gemessen. Zwischen den pädiatrischen Gruppen konnte diesbezüglich kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Dagegen zeigte sich, wie erwartet, die Medianwerte von Cholesterin und LDL bei den Eltern im Vergleich zu Ihren Nachkommen signifikant höher.

Als die Heritabilität ( $h^2_r$ ) ohne Berücksichtigung eventueller Umwelteffekte gemessen wurde, zeigte sich bei den Heritabilitätsschätzungen ein hoch signifikanter Einfluss auf die Lipid-Konzentrationen ( $p < 0,0001$ ).

In einem weiteren Schritt wurden außer der Heritabilität ( $h^2_r$ ) zusätzlich die Haushaltsfaktoren ( $c^2$ ) sowie die Variablen Alter, Geschlecht und Rauchen in das Messmodell aufgenommen. Es fanden sich hohe und signifikante

Heritabilitätsschätzungen für Lp(a)-Serumspiegel, Lp(a) kringle 4 repeats und LDL mit einer entsprechenden phänotypischen Varianz, erklärt durch die Heritabilität von 84,3% (Lp(a)), 76,5% (Lp(a) kringle 4 repeats) und 24,3% (LDL). Ein signifikanter Haushaltseffekt wurde für Cholesterin gemessen (16,3%;  $p < 0,01$ ).

In unterschiedlichen Studien wurde aufgezeigt, dass die Hyperkoagulabilität sowohl durch die Präsenz der Faktor V G1691A-Mutation und der FII G20210A Mutation als auch durch erhöhte Konzentrationen von Lipoprotein (a) [Lp (a)] und durch den Mangel an Antithrombin III, Protein C, Protein S und Tissue factor pathway Inhibitor (TFPI) beeinflusst wird. Diese stellen Risikofaktoren für AIS in der Kindheit dar (Düring et al. 2004; Haywood et al. 2005; Israels und Seshia 1987; Nowak- Göttl et al. 1999a, 1999b; Sträter et al. 2002).

Diese Studien legen nahe, dass die Entstehung der CVD insbesondere von genetischen Faktoren abhängt. Bei Kohorten von Erwachsenen gibt es jedoch zunehmend Hinweise, dass neben den genetischen Risikofaktoren, welche den Fettstoffwechsel und die Gerinnungsfaktoren beeinflussen, wahrscheinlich auch modifizierbare Umweltfaktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum, Ernährung oder Bewegung die Pathogenese von CVD bewirken (Czerwinski et al. 2004; Mosher et al. 2005; Pérusse et al. 1997).

Auf der einen Seite zeigte Vasse et al. 2001, dass AIS durch erniedrigte Protein Z-Konzentrationen begünstigt werden, auf der anderen Seite wurde in einer Studie von Kobelt et al. (2001), Lichy et al. (2004) und Staton et al. (2005) verdeutlicht, dass erhöhte Protein Z-Konzentrationen AIS im Erwachsenenalter beeinflussen. Da die Protein Z-Phänotypen nicht nur durch die Gene beeinflusst werden, sondern auch durch Akute-Phase-Reaktionen (MCQuillan et al. 2003), wird die Identifikation von zusätzlichen genetischen Einflüssen auf diese Phänotypen in Zukunft eine wichtige Rolle spielen, um die Rolle des Protein Z in Bezug auf AIS bei Kindern und im Erwachsenenalter zu verstehen.

In einer Studie von Middelberg et al. aus dem Jahre 2002 konnte gezeigt werden, dass Lipide insgesamt unabhängig von genetischen und Umwelteinflüssen zu betrachten sind. Nur das Lipoprotein (a) zeigte eine sehr hohe Heritabilität von 87%, und zwar gleichermaßen vor und nach der Menopause.

## 4.4 Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen tragen mit rund 50% zur Gesamtmorbidität und -mortalität bei. Epidemiologische Untersuchungen haben die Bedeutung der Atheroskleroserisikofaktoren eindeutig belegt. Die vorbeugenden Maßnahmen werden in die Primärprävention, die Patienten mit erhöhtem Risiko, aber nicht bekannten atherosklerotischen Gefäßveränderungen betreffen, und die Sekundärprävention, die bei Patienten mit bereits bekannten Gefäßveränderungen bzw. bereits abgelaufener Erkrankung erfolgen, eingeteilt. Bei primärpräventiven Maßnahmen stehen Allgemeinmaßnahmen und Lebensstilmodifikation im Vordergrund. Dazu gehören, wie z.B. in der Framingham-Studie (begonnen 1948) beschrieben wurde, verschiedene Faktoren. Zum einen stellt das Zigarettenrauchen einen wichtigen Risikofaktor dar. Raucher haben ein 2- bis 4fach erhöhtes koronares Risiko im Vergleich zu Nichtrauchern. Erfolgreiche Raucherentwöhnung reduziert das KHK- und Insultrisiko rasch. Nach ca. 3 Jahren wird jenes Risiko erreicht, das auch vergleichbare lebenslängliche Nichtraucher haben. Erhöhte Cholesterin- und Blutdruckwerte sind auch Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen. Eine Senkung dieser Faktoren kann zu einer deutlichen Reduktion führen. Des Weiteren leisten eine gesunde Ernährung und eine regelmäßige Bewegung einen wichtigen Beitrag zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen.

Whitfield und Martin stellten fest, dass gleiche Haushaltsfaktoren auf die Serumcholesterinspiegel bei Frauen und Männern unterschiedlich wirken. Bei Frauen ist der Einfluss auf die Cholesterinspiegel signifikant höher. Aus diesem Grund ist die Einhaltung von Diäten sowie ausgewogene und gesunde Kochgewohnheiten bei Frauen noch wichtiger anzusehen als bei Männern.

Auch in unserer Arbeit wurde herausgestellt, dass gemeinsame Umwelteinflüsse auf Lipid- und Gerinnungsfaktorwerte während der Kindheit und im frühen Erwachsenenalter für die Erkrankung mit AIS bedeutsam sind. Es wurden Medianwerte und Spannweite von Lipidbestandteilen bei Indexpatienten, deren Geschwister und Eltern gemessen. Zwischen den pädiatrischen Gruppen konnte diesbezüglich kein signifikanter Unter-

schied gemessen werden. Dagegen zeigte sich, wie erwartet, die Medianwerte von Cholesterin und LDL bei den Eltern im Vergleich zu Ihren Nachkommen signifikant höher. Es wurde deutlich, dass der familiäre Lebensstil eine wichtige Rolle spielt.

## 5 Literaturverzeichnis

1. AMER L, KISIEL W, SEARLESS RP, WILIAMS RC JR (1990).  
Impairment of Protein C anticoagulant pathway in a patient with systemic lupus erythematosus, anticardiolipin antibodies and thrombosis. *Throm Res* 57: 247-258.
2. ASHERSON RA (1988).  
A "primary antiphospholipid syndrom"? *J Rheumatol* 15: 1742-1746.
3. BACHMANN F (1984).  
Fibrinolysis. In: Verstraete M, Vermeylen J, Lijnen R, Arnout J Thrombosis and haemostasis. Leuven University Press: 227-265.
4. BACHMANN F (1987).  
Plasminogen activators. In: Colman RW, Hirch J, Marder VJ, Salzman EW. Haemostasis and thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice, 2<sup>nd</sup> ed. Lippincott, Philadelphia.
5. BACHMANN F (1994).  
Molecular aspects of plasminogen, plasminogen activators and plasmin. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds. Haemostasis and thrombosis, 3<sup>rd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone: 575-613.
6. BANG C-O, PARK H-K, AHN M-Y, SHIN H-K, HWANG K-Y, HONG S-Y (2001).  
4G/ 5G Polymorphism of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene and Insertion/ Deletion Polymorphis, of the Tissue-Type Plasminogen Activator Gene in Atherothrombotic Stroke. *Cerebrovasc Dis* 11 (4): 294-9.

7. BERG K (1963).  
A new serum type system in man: the Lp system. *Acta Pathol Microbiol Scand* 59: 369-382.
8. BERG K, ROALD B, SANDE H (1994).  
High Lp(a) lipoprotein level in maternal serum may interfere with placental circulation and cause fetal growth retardation. *Clin Gen* 46: 52-6.
9. BERRY CW, BRAMBATI B, ESKES TKAB, EXALTO N, FOX H, GERAEDTS JPM, GONZALES F, GRUDZINSKAS JG, HUSTIN J, JOUPPILA P, LINDBLOM BKA, MANTONI M, MONTENEGRO N, NOGALES F, RAHILLY RO, PEDERSEN JF, PETERS PW, REGAN L, RUSHTON DI, VAN STRAATEN HWM, TARLATZIS BC, WELLS M (1995).  
The Euro-Team Early Pregnancy. (ETEP) protocol for recurrent miscarriage. *Human Reproduction* Vol.10 No.6 pp:1516-1520.
10. BERTINA RM, KOELMANN BP, KOSTER T, ROSENDAAL FR, DIRVEN RJ, DE RONDE H, VAN DER VELDEN PA, REITSMA PH (1994).  
Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369: 64-67.
11. BLUMENFELD Z, BRENNER B (1999).  
Thrombophilia-associated pregnancy wastage. *Fertil Steril* 72: 765-774.
12. BOCK SC, WION KL, VEHAR GA, LAWN RM (1982).  
Cloning and expression of the cDNA for human antithrombin III. *Nucl Acids Res* 10: 8113-25.

13. BOERWINKEL E, LEFFERT CARLA C, LIN JINGPING, LACKNER CAROLIN, CHIESA GUILIA, HOBBS HELEN H (1992).  
Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of variation in Plasma Lipoprotein(a) Concentrations. *J Clin Invest* Vol 90: 52-60.
14. BONNAR J, DALY L, SHEPPARD BL (1990).  
Changes in the Fibrinolytic System During Pregnancy. *Semin Thromb Haemost* 16: 221.
15. BOUMA BN, GRIFFIN HJ (1986).  
Initiation mechanisms: the contact activation system in plasma. In: Zwaal RFA, Hemker (eds) *Blood coagulation*. Elsevier. Amsterdam-New York-Oxford 103-128.
16. BRANCH DW, HATASAKA HH (1997).  
The role of antiphospholipid antibodies in reproductive failure. *Reprod Med Rev* 6: 3 133-143.
17. BREMME K, ÖSTLUND E, ALMQVIST I, HEINONEN K, BLOMBÄCK M (1992).  
Enhanced Thrombin Generation and Fibrinolytic Activity in Normal Pregnancy and the Puerperium. *Obstet & Gynecol* Vol 80, NO 1.
18. BRENNER B, MANDEL H, LANIR N, YOUNIS J, OHEL G, BLUMENFELD Z (1997).  
Activated protein C resistance can be associated with recurrent fetal. *British J of Haem* 97: 551-554.
19. BRENNER B (2000).  
Inherited thrombophilia and fetal loss. *Cur Opin in Haem* 7: 290-295

20. BRENNER B, SARIG G, WEINER Z, YOUNIS J, BLUMENFELD Z, LANIR N (1999).  
Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Hämost* 82: 6-9.
21. BUECHLER C, ULLRICH H, RITTER M, ET AL (2001).  
Lipoprotein(a) up-regulates the expression of the plasminogen activator inhibitor 2 in human blood monocytes. *Blood* 97: 981-6.
22. BURROWES CE, HABAL FM, MOVAT HZ (1975).  
The inhibition of human plasma kallikrein by antithrombin III. *Thromb Res* 7: 175-183.
23. COCHRANE CG, REVAK SD, WUEPPER KD (1973).  
Activation of Hagemann factor in solid and fluid phases. A critical role of kallikrein. *J Exp Med* 138: 1564-1583.
24. CONTINO P, REPKE D, NEMMERSON Y (1991).  
A continuous flow reaction system for the study of blood coagulation. *Throm Haemost* 66: 138-140.
25. CHANDRA T, STACKHOUSE R, KIDD VJ, WOO SLC (1983).  
Isolation and sequence characterisation of a cDNA clone of human antithrombin III. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1845-8.
26. DAHLBÄCK B, CARLSSON M, SVENSSON PJ (1993).  
Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1004-1008.

27. DAHLBÄCK B (1991).  
Protein S and C4b-binding protein: Components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost* 66: 49-61.
28. DAHLBÄCK B, HILDEBRAND B (1994).  
Inherited resistance to activated protein C is corrected by antikoagulant cofaktor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 91: 1396-1400.
29. DAMUS PS, HICKS M, ROSENBERG RD (1973).  
Anticoagulant action of heparin. *Nature* 246: 355-357.
30. DANESH J, COLLINS R, PETO R (2000).  
Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Metaanalysis of prospective studies. *Circulation* 102: 1082-5.
31. DEMERS C, GINSBERG JS, HIRSH J, HENDERSON P, BLAJCHMANN MA (1992).  
Thrombosis in antithrombin-III-deficient persons. Report of a large kindred and literature review. *Ann Intern Med* 116: 754-61.
32. DE STEFANO V, LEONE G, MASTRANGELO S, TRIPODI A, RODIGHIERO F, CASTMAN G, BARBUI T, FINAZZI G, BIZZI B, MANUCCI PM (1994).  
Clinical manifestations and management of inherited thrombophilia: retrospective analysis and follow-up after diagnosis of 238 patients with congenital deficiency of antithrombin III, protein C, protein S. *Thromb Haemost* 72: 352-8.
33. EDELBERG JM, PIZZO SV (1991).  
Lipoprotein(a): The link Between Impaired Fibrinolysis and Artherosclerosis. *Fibrinolysis* 5: 135-143.

34. ESMON CT, OWEN WG (1981).  
Functional properties of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2248-2252.
35. FALCON CR, CATTANEO M, PANZERRI D, MARTINELLI I, MANUCCI PM (1994).  
High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler Thromb* 14: 1080-3.
36. FEIGE A, REMPEN A, WÜRFEL W, JAWNY J, CUFFIER H (2001).  
*Frauenheilkunde 2. überarbeitete Auflage Fortpflanzungsmedizin, Geburtsmedizin, Onkologie*, Urban & Fischer Verlag: 297-310.
37. FINAZZI G, CACCIA R, BARBUI T (1987).  
Different prevalence of thromboembolism in the subtypes of congenital antithrombin III deficiency: review of 404 cases. *Throm Haemost* 58: 1094.
38. FOKA ZJ, LAMBROPOULLOS AF, SARAVELOS H, KARAS GB, KARAVIDA A, AGORASTOS T, ZOURNATZI V, MAKRIS PE, BONTIS J, KOTSIS A (2000).  
Faktor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 15: 458-462.
39. GALIT S, YOUNIS JS, HOFFMANN R, LANIR N, BLUMENFELD Z, BRENNER B (2002).  
Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. *Fertil Steril* Vol 77 No 2: 342-347.

40. GARDEMANN A, LOHRE J, KATZ N, TILLMANN S H, HEHRLEIN FW, HABERBOSCH W (1999).  
The 4G/ 4G Genotype of the Plasminogen Activator Inhibitor 4G/ 5G Gene Polymorphism Is Associated with Coronary Atherosclerosis in Patients at High Risk for this Disease. *Thromb Haemost* 82 (3): 1121-6.
41. GUREWICH V, PANNEL R, LOUIE S, KELLEY P, SUDDITH RL, GREENLY R (1984).  
Effective and fibrin-specific clot lysis by a zymogen precursor form of urokinase (pro-urokinase). A study in vitro and two animal species. *J Clin Invest* 73: 1731-1739.
42. GLUECK CJ, PHILIPS H, CAMERON D, WANG P, FONTAINE RN, MOORE SK, SIEVE-SMITH L, TRACY T (2000).  
The 4G/4G Polymorphism of the Hypofibrinolytic Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Gene: An Independent Risk Factor for Serious Pregnancy Complications. *Metabolism* 49: 845-852.
43. GLUECK CJ, WANG P, FONTAINE RN, SIEVE-SMITH L, TRACY T, MOORE SK (1999).  
Plasminogen activator inhibitor activity: An independent risk factor for high miscarriage rate during pregnancy in women with Polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 48 (12): 1589-1595.
44. HAJJAR KA, GAVISH D, BRESLOW JL, NACHMANN RL, (1989).  
Lipoprotein(a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature* 339: 303-5.
45. HAJJAR KA, NACHMAN RL (1996).  
The role of Lipoprotein(a) in atherogenesis and thrombosis. *Annu Rev* 47: 423-42.

46. HARPEL PC, GORDON BR, PARKER TS (1989).  
Plasmin catalyzes binding of lipoprotein(a) to immobilized fibrinogen and fibrin. Proc Natl Acad sci USA 86: 3847-51.
47. HARRIS EN, CHAN JKH, ASHERSON RA, ABER VR, GHARAVI AE, HUGLES GRV (1986).  
Thrombosis, recurrent fetal loss and thrombozytopenia. Arch Intern Med 146: 2153-2156.
48. HELLGREN R F, BLOMBAECK M (1981).  
Studies on blood coagulation and fibrinolysis in pregnancy, during delivery and in the puerperium. Gynecol Obstet Invest 12: 141-154.
49. HEMKER HC (1984).  
In memory of Francois Josso. Why do hemophilias bleed? Scand J Haematol 40: 11-19.
50. HEMKER HC, BEGUIN S (1991).  
Mode of Activation of heparin and related drugs. Thromb Haemost 17 (1) Suppl 1: 29-34.
51. HINNEY B, NEUMEYER H (1999).  
Immuntherapie habitueller Aborte. Reproduktionsmedizin Springer-Verlag 15: 200-211.
52. HIEMEYER V, RASCHE H, DIEHL K (1972).  
Hämorrhagische Diathesen. Thieme Verlag, Stuttgart.
53. HIGHSMITH RF, ROSENBERG RD (1974).  
The inhibition of human plasmin by human antithrombin-heparin co-factor. J Biol Chem 249: 4335-4338.
54. HOFFBRAND AV (1986).  
Essential Haematology, Blackwell Scientific Publications.

55. HOSMER DW, LEMESHOW S (1989).  
Applied logistic regression. New York: Wiley pp: 187-215.
56. ICHINOSE A, FUJIKAWA K, SUYAMA T (1986).  
The activation of urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. J Biol Chem 261: 3486-3489.
57. JUNKER R, KOCH HG, AUBERGER K, MÜNCHOW N, EHRENFORTH S, NOWK-GÖTTL U (1999).  
Prothrombin G20210A gene mutation and further prothrombotic risk factors in childhood thrombophilia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 2568-72.
58. JUSTUS B, SIEGERT G, TIEBEL O (1992).  
Veränderungen im Gerinnungs- und Fibrinolysesystem während des Verlaufs der normalen Schwangerschaft. Zent. bl. Gynäkol. 114: 165-170.
59. KIENAST J, OSTERMANN H, MESTERS R (1994).  
Sepsis und disseminierte intravasale Gerinnung. In: Martin E, Nawroth P. Fachübergreifende Aspekte der Hämostaseologie. Springer Verlag Berlin-Heidelberg.
60. KLEIHAUER E, KONE E, RASCHE H (1978).  
Die Haemostase: Physiologie-Pathologie-Klinik. Springer Verlag Berlin Heidelberg
61. KRISTENSEN P, LARSON LI, NIELSEN LS, GRONDAHL-HANSEN J, ANDREASEN PA, DANO K (1984).  
Human endothelial cells contain one type of plasminogen activator. FEVBS Lett 168: 33-37.

62. LANE DA, IRELAND H, OLDS RJ, THEIN SL, PERRY DJ, AICH M (1991).  
Antithrombin III: A database of mutations. *Thromb Haemost* 66: 657-61.
63. LANE DA, MANNUCCI PM, BAUER KA, BERTINA RM, BOCHKOV NP, BOULYIENKOV V, CHANDY M, DAHLBÄCK B, GINTER EK, MILETICH JP, ROSENDAAL FR, SELIGSOHN U (1996 A).  
Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 76: 651-662.
64. LOCKSHIN MD (1999).  
Pregnancy Loss in the Antiphospholipidsyndrome. *Thromb Haem* 82 (2): 641-646.
65. MALINOV MR (1994).  
Homocystein an arterial occlusive disease. *J Int Med* 236: 603.
66. MANNUCCI PM; TRIPODI A (1987).  
Laboratory of inherited thrombotic syndromes. *Thromb Haemost* 57: 247-251.
67. MCDONAGH J, CARELL N (1987).  
Disorders of fibrinogen structure and function. In Colman RW, Hirsh J, Marder J, Salzman EW: *Haemostasis and Thrombosis. Basic Principles an Therapy, 2<sup>nd</sup>* : Lippincott, Philadelphia; p 301.6.
68. MUDD SH, LEVY HL, SKOBY F (1989).  
Disorders of transulfuration. Aus: *The metabolic basis of inherited disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. Mc. Graw Hill, New York S. 693.
69. NEMMERSON Y, FURIE B (1980).  
Zymogens and cofactors of blood coagulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 9: 45-85

70. NOWAK-GÖTTL U, DEBUS O, FINDEISEN M, KASSENBÖHMER R, KOCH H G, POLLMANN H, POSTLER C, WEBER P, VIELHABER H (1997).  
Lipoprotein(a): Its role in childhood thromboembolism. *Pediatr* Vol 99 No 6.
71. NOWAK-GÖTTL U, JUNKER R, HARTMEIER M, KOCH H G, MÜNCHOW N, ASSMANN G, VON ECKARDSTEIN A (1999).  
Increased Lipoprotein(a) is an Important Risk Faktor for Venous Thromboembolism in Childhood. *Circulation*; 100: 743-748.
72. NOWAK-GÖTTL U, SONNTAG B, CIRKEL U, VON ECKARDSTEIN A (2000).  
Evaluation of Lipoprotein(a) and genetic prothrombotic risk factors in patients with recurrent fetal loss. *Thromb Haemost* 83: 350-1.
73. NOWAK-GÖTTL U, KOHLHASE B, VIELHABER H, ASKAR I, SCHNEPPENHEIM R, JÜRGENS H (1996).  
APC Resistance in neonates and infants: adjustment of the aPTT-based method. *Thromb Res* 81: 665-670.
74. POORT SR, ROSENDAAL FR, REITSMA PH, BERTINA RM (1996).  
A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and increase in venous thrombosis. *Blood* 88: 3698-3703.
75. POORT SR, BERTINA RM, VOS HL (1997).  
Rapid detection of the prothrombin 20210 A variation by allele specific PCR. *Thromb Haemost* 78: 1157-1158.

76. PRESTON FE, ROSENDAAL FR, WALKER ID, BRIET E, CONRAD J, FONTCUBERTA J, MAKRIS M, MARIANI G, NOTEBOOM W, PABINGER I, LEGNANI C, SCHARRER I, SCHULMAN S, VAN DER MEER FJM (1996).  
Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. Lancet 348: 913-16.
77. RAI R, SHLEBAK A, COHEN H, BACKOS M, HOLMES Z, MARRIOTT K, REGAN L (2001).  
Factor V Leiden and acquired activated protein C resistance among 1000 women with recurrent miscarriage. Hum Reprod Vol 16 No 5 pp: 961-965.
78. RATH W, WIEDING J U, KUHN W (1991).  
Neue Erkenntnisse über hämasteologische Veränderungen bei Gestose und HELLP-Syndromen für die klinische Praxis Geburtsh. u. Frauenheilk. Georg Thieme Verlag Stuttgart. New York 51: 741-746.
79. RIESEN W F (1991).  
Lipoprotein(a) Bindeglied zwischen Fettstoffwechsel und Gerinnungssystem? Schweiz Med Wschr 121: 1813-1818.
80. REY E, KAHN SR, DAVID M, SHRIER I (2003).  
Thrombophilic disorders and fetal loss: a metaanalysis. Lancet 361: 901-8.
81. SCANU AM, FLESS GM (1990).  
Lipoprotein(a). Heterogeneity and biological relevance. J Clin Invest 85: 1709-15.
82. SCHAEFER EJ, FINAZZI G, MANNUCCI PM (1996).  
Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. Blood 87:3531-44.

83. SCHNEIDER D, HEILMANN L, HARENBERG J (1995).  
Zur Plazentagängigkeit von niedermolekularem Heparin. Geburtsh. u. Frauenh. Georg Thieme Verlag Stuttgart. New York 55: 93-98.
84. SCHNEIDER D M, V. TEMPELHOFF G-F, HOPPENSTAEDT J, FAREED J, HEILMANN L (1998).  
Die erworbene Resistenz gegen aktiviertes Protein C in der Schwangerschaft. ZGeburtsh Neonatol 202: 107-110.
85. SEGUI R, ESTELLES A, MIRA Y, ESPANA F, VILLA P, FALCO C, VAYA A, GRANCHA S, FERRANDO F, AZNAR J (2000).  
PAI-1 promotor 4G/ 5G genotype as an additional risk faktor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects. Br J Haematol 111 (1): 122-128.
86. SERIOLO B, ACCARDO S, FASCIOLO D, BERTOLINI S, CUTOLO M (1996).  
Lipoproteins, anticardiolipin antibodies and thrombotic events in rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 14: 593-9.
87. SOUZA SS, FERRIANI RA, PONTES AG, ZAGO MA, FRANCO RF (1999).  
Faktor V Leiden and factor II G 20210A mutations in patients with recurrent abortion. Hum Reprod Vol 14 No 10 pp: 2448-2450.
88. SPRENGERS ED, KLUFT C (1987).  
Plasminogen activator inhibitors. Blood 69: 381-387.
89. STENFLO J, FERNLUND P, EGAN W, ROEPSTORFF P (1974).  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 2730-2733.

- 90 STIRRAT GM (1990).  
Recurrent miscarriage II: clinical associations, causes, and management. Lancet 336: 728-33.
- 91 STIRRAT GM (1992).  
Recurrent spontaneous abortion. In: Coulam CB, Faulk WP, McIntrtrue JA, eds. Immunological Obstetrics. New York: W.W. Norton & Company: 357-76.
92. STIRRAT GM (1999).  
Recurrent miscarriage I: definition and epidemiology. Lancet 336: 673-75.
- 93 STRÄTER R, BECKER S, VON ECKARDSTEIN A, ET AL (2002).  
Prospective assessment of risk factors of recurrent stroke during childhood - a 5-year follow-up study. Lancet 360: 1540-45.
94. STRYER, LUBERT (1996).  
Biochemie, Spektrum Akad. Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
95. THALER E, LECHNER K (1981).  
Antithrombin III deficiency and thromboembolism. Clin Haematol 10: 369-90.
96. THOMAS L (1998).  
Labor und Diagnose. TH-Books Verlagsgesellschaft GmbH, Frankfurt/ Main 574.
97. UTERMANN G, DUBA C, MENZEL HJ (1988).  
Genetics of quantitative Lp(a) lipoprotein trait. II. Inheritance of Lp(a) glycoprotein phenotypes. Hum Genet 78: 47-50.

98. UTERMANN G (1989).  
The Mysteries of Lipoprotein(a). *Science* 246; 904-10.
99. VISANJI JM, SEARGENT J, TAHRI D, CROFT A, MAKRIS M, PRESTON FE, PEAKE IR, DALY ME (2000).  
Influence of the -675 4G/ 5G dimorphism of the plasminogen activator inhibitor 1 promoter on thrombosis risk in patients with factor V Leiden. *Br J Haematol* 110 (1): 135-8.
100. VON DEPKA M, NOWAK-GÖTTL U, EISERT R, ET AL (2000).  
Increased lipoprotein(a) levels as an independent risk factor for venous thrombembolism. *Blood* 96: 3364-8.
101. VON ECKARDSTEIN A, SCHULTE H, CULLEN P, ASSMANN G (2001).  
Lipoprotein(a) further increases the risk of coronary events in men with high global cardiovascular risk. *J Am Col Cardiol* 37: 434-9.
102. VON KRIES R, JUNKER R, OBERLE D, KOSCH A, NOWACK-GÖTTL U (2001).  
Fetal growth restriction in children with prothrombotic risk factors. *Thromb Haemost* 86: 1012-6.
103. VON PAMPUS M G, KOOPMAN M M W, WOLF H, BÜLLER H R, PRINS M H, VAN DEN ENDE A (1999).  
Lipoprotein(a) concentrations in women with a history of severe preeclampsia – a case control study. *Thromb Haemost* 82: 10-3.
104. WALKER FJ (1981).  
Regulation of bovine activated protein C by protein S: the role of the cofactor protein in species specificity. *Thromb Res* 22: 321-327.

105. WILIAMS WJ NORRIS DG (1966).  
Purification of a bovine plasma protein (factor VII) which is required for the activity of lung microsomes in blood coagulation. J Biol Chem 241: 1847-1856.
  
106. WRAMSBY ML, STEN-LINDER M, BREMME K (2000).  
Primary habitual abortions are associated with high frequency of Factor V Leiden mutation. Fertil Steril Vol 74 No 5: 987-991.
  
107. Younis JS (1999).  
Thrombophilia and recurrent fetal loss- Related? Fertil Steril Vol 73 No 3: 652-653.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Gefäßverschluß als Infarkursache
Abbildung 2:	Zellaufbau
Abbildung 3:	DNA – Doppelhelix
Abbildung 4:	DNA – Replikation
Abbildung 5:	Typischer ELISA
Abbildung 6:	Die verschiedenen Schritte einer Standard - PCR
Abbildung 7:	unter dem UV – Tranluminator sichtbar gemachtes Ergebniss der Lpa – Restriktion
Abbildung 8:	Chromatographie – Peaks der Sequenzierung

## 7 Abkürzungsverzeichnis

aCL:	Anticardiolipin
ADP:	Adenosindiphosphat
AIS:	akuter ischämischer Schlaganfall
APC:	Aktiviertes Protein C
Apo:	Apolipoprotein
Arg:	Arginin
AT III:	Antithrombin
ATP:	Adenosintriphosphat
CVD:	kardiovaskuläre Erkrankungen
c <sup>2</sup> :	Umwelt – und Haushaltsfaktoren
CT:	Computertomogramm
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
ER:	endoplasmatisches Retikulum

Gln:	Glutamin
Gp:	Glykoprotein
h <sup>2</sup> r:	Heritabilität
LA:	Lupus – Antikoagulanz
LDL:	low-density Lipoproteine
Lp:	Lipoprotein
MI:	Myokardinfarkt
MTHFR:	Methylentetrahydrofolatreduktase
MRT:	Magnetresonanztomogramm
OR:	Odds Ratio
PAI:	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PCR:	Polymerasekettenreaktion
PT:	Prothrombin
RNA:	Ribonukleinsäure
sct-PA:	Single-Chain-t-PA
SLE:	systemischer Lupus erythematoses
SNP:	Single Nucleotide Polymorphism
SSW:	Schwangerschaftswoche
TDT:	Transmission-Disequilibrium-Test
TE:	thromboembolische Ereignisse
t-PA:	Gewebeplasminogenaktivator
TVT:	tiefe Venenthrombose
u-PA:	urokinase-like plasminogen activator
VT:	venöse Thrombosen
vWF:	von Willebrand-Faktor

## **8. LEBENSLAUF**



## 9. Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Doktormutter und Betreuerin, Frau Prof. Dr. Nowak – Göttl, insbesondere für die Bereitstellung des Themas und ein jeweils blitzschnelles Korrekturlesen, die mir sowohl während der Datenauswertung als auch beim späteren Niederschreiben der Studienergebnisse immer und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Ein weiterer besonderer Dank gilt meiner Schwester, Dr. Susan Halimeh, die eine wichtige Unterstützung beim Fertigstellen der Arbeit gewesen ist.

Weiterhin möchte ich Carola Kindermann danken, die mir eine große Hilfe beim Korrekturlesen und Korregieren des Layouts war.

Insbesondere möchte ich auf diesem Weg meinen Eltern, denen diese Doktorarbeit gewidmet ist, danken. Sie haben mir jederzeit und in jeder Hinsicht zur Seite gestanden und mich nicht zuletzt fortlaufend ermuntert, diese Doktorarbeit fertig zu stellen.