

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

**Faktor XII Genotyp-Phänotyp bei Kindern mit venösen  
Thrombosen im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Yurtcu, Nurhayat  
aus Hamm

2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. V. Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. U. Nowak-Göttl

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. R. Mesters

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.2008

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

Zusammenfassung

## **Faktor XII Genotyp-Phänotyp bei Kindern mit venösen Thrombosen im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv**

Nurhayat Yurtcu

Die präsentierte Studie wurde durchgeführt um den Zusammenhang zwischen dem Faktor XII C46T Polymorphismus, der Faktor XII-Aktivität und dem Auftreten venöser Thrombosen bei Kindern und Jugendlichen zu untersuchen. Es wurde ein Patientenkollektiv mit einem gesunden Kontrollkollektiv im Verhältnis 1:2 verglichen. Weiterhin wurde der Zusammenhang etablierter prothrombotischer Risikofaktoren mit dem Faktor XII C46T Polymorphismus untersucht.

In der Zeit zwischen 2000 und 2004 wurden Kinder mit venösen Thrombosen und gesunde Kinder im Alter zwischen 0,1 Jahr und 18 Jahren in die Studie aufgenommen. Bei den 64 Patienten und 126 gesunden Kindern gleichen Alters wurde der Faktor XII C46T Polymorphismus genotypisiert und die Faktor XII-Aktivität bestimmt.

Es wurden weiterhin beim Patienten- und im Kontrollkollektiv die Faktor V (FV) G1691A Mutation, die Faktor II (FII) G20210A Variante, Lipoprotein(a) (Lp(a)), Protein C (PC), Protein S (PS) und Antithrombin (AT) untersucht.

Die mediane Faktor XII-Aktivität unterschied sich nicht signifikant zwischen den untersuchten Gruppen. Auch zeigten sich in der altersspezifischen Subgruppenanalyse innerhalb beider Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Der bereits bekannte Zusammenhang zwischen dem Faktor XII C46T Polymorphismus und einer erniedrigten Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile (p-value: <0,0001) wird in dieser Studie auch im Kindesalter unterstrichen.

Der Faktor XII C46T Polymorphismus zeigt keine statistisch relevante Assoziation mit dem Phänotyp – dem Auftreten venöser Thrombosen – im Kindes- und Jugendalter.

Über eine multivariate Analyse konnte die signifikante Assoziation der etablierten Risikofaktoren (Faktor V G1691A Mutation, Faktor II G20210A Variante, Lipoprotein(a) >30 mg/dl, Protein C-, Protein S-Mangel und Antithrombin-Mangel) zum Auftreten einer venösen Thrombose im Kindesalter bestätigt werden (odds ratio (OR): 7/ 95% Konfidenzintervall (CI): 3,5-14, p-value: <0,0001).

Ein Zusammenhang zwischen einer Faktor XII C46T Mutation mit etablierten Risikofaktoren konnte im hier untersuchten Patientenkollektiv nicht nachgewiesen werden (OR:1,5/ 95% CI: 0,4-6,7, p-value: 0,5260).

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.08

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Allgemeine Zusammenhänge des Gerinnungssystems	1
1.1.1. Die primäre Blutstillung	2
1.1.2. Die sekundäre Blutstillung	4
1.1.2.1. Das extrinsische System	4
1.1.2.2. Das intrinsische System	4
1.1.2.3. Die gemeinsame Endstrecke	5
1.1.3. Regulation der Blutgerinnung	7
1.1.4. Inhibitoren der Gerinnung	7
1.1.4.1. Antithrombin: AT (Heparin-Kofaktor I)	7
1.1.4.2. Heparin-Kofaktor-II	8
1.1.4.3. Das Protein C-System	8
1.1.4.4. Alpha-2-Makroglobulin	9
1.1.4.5. C1-Inaktivator	9
1.1.4.6. Alpha-1-Antitrypsin	9
1.2. Das fibrinolytische System	10
1.2.1. Aktivatoren der Fibrinolyse	10
1.2.1.1. Tissue-Type Plasminogen-Aktivator (t-PA)	10
1.2.1.2. Urinary-Type-Plasminogen-Aktivator (u-PA)	11
1.2.1.3. Faktor XIIa	11
1.2.1.4. Protein C	11
1.2.2. Inhibitoren der Fibrinolyse	12
1.2.2.1. Antiaktivatoren der Fibrinolyse	12
1.2.2.2. TAFI (Thrombozytenaktivierbarer Fibrinolyse-Inhibitor)	12
1.2.2.3. Antiplasmin	12
1.3. Neonatale Hämostaseologie und Entwicklung der Hämostase	14
1.4. Defekte des Hämostasesystems	17
1.4.1. Thromboembolische Ereignisse im Kindesalter	17
1.4.1.1. Definition der Thrombose	17
1.4.1.2. Definition der Thromboembolie	18
1.4.1.3. Pathophysiologie der Thromboseentstehung	18
1.4.1.4. Häufigkeit von Thrombosen im Kindes- und Jugendalter	18
1.4.1.5. Lokalisation von thromboembolischen Ereignissen	19
1.4.1.6. Diagnosestellung	20
1.4.2. Hereditäre prothrombotische Risikofaktoren für venöse und arterielle Thrombosen	20
1.4.2.1. Faktor V G1691A Mutation	21
1.4.2.2. Prothrombin G20210A Mutation	22
1.4.2.3. Lipoprotein(a)-Erhöhung	22
1.4.2.4. Hyperhomocysteinämie (C677T-Mutation im 5,10-MTHFR-Gen)	24
1.4.2.5. Protein-C-Mangel	25
1.4.2.6. Protein-S-Mangel	25
1.4.2.7. Antithrombinmangel	26
1.4.2.8. Heparin-Kofaktor II-Mangel	27
1.4.2.9. Dysfibrinogenämie	28

1.4.2.10. Dysplasminogenämie, Hypoplasminogenämie	28
1.4.2.11. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1-Überschuss (PAI 1-Überschuss)	28
1.4.2.12. Antiphospholipid-Syndrom	29
1.4.3. Erworbene Risikofaktoren (primär nicht-haemostaseologische Risikofaktoren)	30
1.5. Faktor XII	31
1.5.1. Aktivierung des Faktor XII	31
1.5.2. Struktur des Faktor XII	32
1.5.3. Charakterisierung des Faktor XII-Gens	34
1.5.4. Vorkommen und Bestimmung von Faktor XII	34
1.5.5. Mutationen im Faktor XII-Gen	34
1.6. Problemstellung der Arbeit	35
<b>2. Patienten, Material und Methoden</b>	<b>36</b>
2.1. Informationen über die Studienteilnehmer	36
2.1.1. Patienten	36
2.1.2. Die Kontrollgruppe	36
2.1.3. Matching	37
2.1.4. Altersgruppen	37
2.1.5. Schwankungsbreite der Faktor XII-Aktivität	38
2.2. Labordiagnostische Untersuchungen	38
2.2.1. Blutentnahme	38
2.2.2. Faktor XII-Aktivität-Bestimmung	39
2.3. Genetische Analysen	39
2.3.1. Blutentnahme für genetische Analysen	39
2.3.2. DNA-Isolation mit mit QIAmp-Säulen aus peripheren Blutleukozyten	39
2.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
2.3.4. PCR zur Genotypisierung der FXII C46T Variante	42
2.3.5. Gelelektrophorese	45
2.3.6. Agarosegelelektrophorese	45
2.4. Geräte und Chemikalien	48
2.4.1. Geräte	48
2.4.2. Chemikalien	48
2.5. Statistische Methoden	49
2.5.1. Fall-Kontroll-Assoziationsstudien	49
2.5.2. Nullhypothese-Alternativhypothese	49
2.5.3. 4-Feldertafel	49
2.5.4. Chi-Quadrat-Test	50
2.5.5. Fisher´s exact test	50
2.5.6. Odds Ratio	50
2.5.7. Logistische Regression	51
2.5.8. Cut-off-Klassifikation	51
2.5.9. Wilcoxon-Mann-WhitneyU-Test	51
2.5.10. Kruskal-Wallis-Test	51

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>52</b>
3.1. Etablierte prothrombotische Defekte	52
3.2. Faktor XII-Aktivität	52
3.2.1. Faktor XII-Aktivität in den jeweiligen Altersgruppen	52
3.3. Zusammenhang Faktor XII C46T Genotyp und Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile	55
3.4. Prävalenz des Faktor XII C46T Polymorphismus	56
3.5. Häufigkeit des Faktor XII C46T Polymorphismus im Bezug auf Individuen mit Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile	57
3.6. Zusammenhang zwischen Faktor XII-Mangel und anderen etablierten Defekten in Bezug auf ein thromboembolisches Ereignis	59
3.7. Faktor XII TT in Kombination mit etablierten prothrombotischen Risikofaktoren	60
3.8. Zusammenhang zwischen Faktor XII-Aktivität < 10. Perzentile und etablierten Defekten	60
<b>4. Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1. Prävalenzen des Faktor XII C46T Polymorphismus	62
4.2. Zusammenhang zwischen Faktor XII C46T Polymorphismus und Faktor XII-Aktivität	63
4.3. Bedeutung des Faktor XII-Mangels	65
4.4. Zusammenhang zwischen Faktor XII C46T Polymorphismus und Koronarerkrankungen	67
4.5. Zusammenhang zwischen Faktor XII C46T Polymorphismus und venösen Thrombosen	68
4.6. Theorie des thromprotektiven Effektes des Faktor XII-Mangels	70
4.7. Faktor XII-Mangel und rezidivierende Aborte	70
4.8. Faktor XII C46T Polymorphismus in Bezug auf etablierte prothrombotische Risikofaktoren	72
4.9. Methodendiskussion	73
4.10. Therapie von Kindern mit hereditären Thrombophilien	73
4.11. Fazit	74
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>89</b>
<b>7. Lebenslauf</b>	<b>90</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>91</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemeine Zusammenhänge des Gerinnungssystems

Die Lehre von der Blutstillung oder Hämostaseologie umfasst Wechselwirkungen zwischen Gefäßendothel, Thrombozyten, plasmatischen Gerinnungsfaktoren, die aus dem Blutplasma und dem verletzten Gewebe stammen, und Fibrinolysemechanismen (Kleihauer et al.1978).

Es erfolgt zunächst eine primäre Blutstillung durch einen Plättchenthrombus, der noch durch nachfolgende Fibrinbildung vergrößert und verfestigt wird. Der Thrombus wird dann organisiert und überschüssiges Fibrin wird durch das fibrinolytische System wieder abgebaut (Kleihauer et al. 1978).

Das Blut wird während seiner Zirkulation durch intakte Blutgefäße unter physiologischen Umständen im flüssigen Zustand belassen. An verletzten Gefäßstellen sorgt die Hämostase jedoch für eine rasche Gerinnungsbildung.

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

Aus hämostaseologischer Sicht kann es durch zwei Störungen zu einer Beeinträchtigung der lebenserhaltenden Funktion des Blutes kommen:

Dies ist zum einen eine Blutung, die zu großem Blutverlust bis hin zum Schock und letztendlich zum Tode führen kann. Zum anderen ist dies der thrombotische Verschluss von Gefäßen mit möglicherweise lebensbedrohlichen Komplikationen, vor allem durch das Loslösen von Anteilen des Thrombus mit anschließender Verlegung von lebenswichtigen Arterien als Thromboembolie (Cochrane et al. 1973).

Zur Beseitigung dieser Gefahr bzw. zu Wiederherstellung der physiologischen Bedingungen dienen folgende Gegenregulationsmechanismen (Kleihauer et al. 1978):

1. Verhinderung von Blutungen durch das funktionelle Zusammenwirken von Thrombozyten, plasmatischen Gerinnungsfaktoren und Gefäßwand
2. Blutstillung nach Verletzung der Gefäßintegrität
3. Verhinderung intravasaler Gerinnung
4. Beseitigung intravasaler Fibrinablagerungen



### **1.1.1. Die primäre Blutstillung**

Die physiologische Reaktion auf einen durch eine Gefäßverletzung im Bereich von Arteriolen und Venolen drohenden Blutverlust wird als Blutstillung bezeichnet. Nach Verletzung kleiner Blutgefäße hört die Blutung beim Gesunden nach ein bis drei Minuten von alleine auf. Bei Verletzung größerer Gefäße (Arterien, Venen) ist in der Regel keine spontane Blutstillung möglich (Kleihauer et al. 1978).

Der Ablauf der Blutstillungsvorgänge lässt sich in drei Phasen aufteilen, wobei die Übergänge von einer Phase zur anderen fließend sind (Gaehgens 1994).

#### **(1) posttraumatische Sofort- oder Frühphase (reflektorische Vasokonstriktion, Thrombozytenadhäsion, Aktivierung des extrinsischen und des intrinsischen Systems)**

Diese Phase dauert 0-15 Sekunden. Es kommt 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 spezifischen Rezeptor der Thrombozytenmembran, dem Glykoprotein Ib, verformen sich die Blutplättchen unter Ausbildung von Pseudopodien zu einer Kugelform.

Zu einer sprunghaften Thrombinbildung kommt es durch Aktivierung des extrinsischen und des intrinsischen Systems.

## **(2) Ausbildung eines reversiblen Gefäßverschlusses**

Diese Phase dauert 15 Sekunden bis 10 Minuten und beginnt mit der Bildung eines lockeren reversiblen Plättchenaggregates durch Thrombozytenadhäsion vermittelt durch Kollagen, ADP und den vWF aus den verletzten Endothelzellen. Praktisch gleichzeitig wird die Thromboxansynthese und damit die irreversible Thrombozytenaggregation durch Thrombin eingeleitet (Weiss and Jelkmann 1997).

Durch die Reaktion von Thrombin mit spezifischen Rezeptoren der Thrombozytenmembran werden intrazelluläre Proteine phosphoryliert und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen freigesetzt. Diese Reaktion aktiviert die kalziumabhängige Phospholipase A2, die wiederum die Freisetzung der Arachidonsäure katalysiert. Das Enzym Cyclooxygenase wandelt diese um in die Endoperoxidase PGG2 und PGH sowie in die Thromboxane A2 und B2. Diese lösen die irreversible Aggregation und eine Strukturauflösung der Plättchen aus, wobei alpha-Granula (mit verschiedenen Plasmaproteinen), Dense bodies (mit ATP, Serotonin und Kalzium) und Lysosomen aus Speichergranula frei werden. Die Lysosomen spielen für die Proteinverdauung eine wichtige Rolle (Hemker et Poliwoda 1997).

## **(3) Verfestigung des Gefäßverschlusses**

Diese Phase dauert 10 Minuten bis 2 Stunden. Die Thrombozyten vollziehen hierzu eine „visköse Metamorphose“, so werden alle morphologischen und funktionellen Thrombozytenveränderungen bezeichnet. Thrombin spaltet aus dem im Plasma gelösten Fibrinogen Fibrin ab, welches das fadenähnliche Gerüst des Gerinnsels bildet.

Zur Verfestigung der faserigen Fibrinstrukturen bedarf es des aktivierten Faktors XIII, dessen Wirkung durch Thrombin sowie subendotheliales Fibronectin 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 (Gaehtgens 1994).

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

### **1.1.2. Die sekundäre Blutstillung**

Die wesentlich langsamer ablaufende (6-9 Minuten) sekundäre Hämostase (Blutgerinnung) führt über eine enzymatische Bildung eines Fibringerüsts zu einer Stabilisierung des zuvor reversiblen Thrombozytenaggregates.

Die enzymatische Bildung eines stabilen Fibringerüsts beruht auf der kaskadenartigen Aktivierung zahlreicher Plasmaproteine. Diese Gerinnungsfaktoren werden einem intrinsischen, d.h. intravasal aktivierten und einem extrinsischen, außerhalb der Gefäße gestarteten System zugeordnet. Beide Systeme sind über wechselseitige Interaktionen sowohl miteinander als auch mit der Thrombozytenaktivierung verknüpft.

Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren die Gerinnungsfaktoren, die in der Mehrzahl Serinproteasen entsprechen, als inaktive Form im Blut und sind dadurch dem Einfluss der Inhibitoren entzogen. Ihre Aktivierung erfolgt durch die Einwirkung mehrerer Reaktionsparameter, die dem Fibrinolyse-, dem Kinin- und dem Komplementsystem entstammen. Faktor V und Faktor VIII haben selbst keine enzymatische Aktivität, sondern aktivieren Faktoren IX und X durch Komplexbildung (Nemerson et al.1980).

#### **1.1.2.1. Das extrinsische System**

Die wesentliche Anfangsstrecke der in vivo Blutgerinnung ist das extrinsische System (exogenes System), welches sowohl Blut- als auch vaskuläre Elemente beinhaltet. Das extrinsische System wird aktiviert durch die Verbindung von Gewebsthrombokinase, einem Membranprotein (bzw. Membranphospholipide, Tissue factor = Faktor III = Gewebethromboplastin), das aus verletzten Gefäßstrukturen (extravasalen Strukturen) freigesetzt wird, mit dem im Plasma zirkulierenden Faktor VII. Der Faktor VIIa/Thrombokinase-Enzymkomplex hat zwei wesentliche Substrate, Faktor IX und Faktor X. Die Gerinnungsfaktoren IXa und Xa aktivieren nun wiederum den Faktor VII und beschleunigen damit den Gerinnungsablauf (Colman et al. 1994, Williams et al. 1966, Zur et al. 1982).

#### **1.1.2.2. Das intrinsische System**

Parallel zum extrinsischem System existiert das intrinsische System. In diesem System wird die Gerinnung durch Bestandteile, die nur im vaskulären System enthalten sind, eingeleitet (Colaman et al. 1994). Aufgrund der höheren Anzahl an Reaktionsschritten verläuft die endogene Gerinnung langsamer als die exogene,

bildet aber ausreichende Mengen von Thrombin. Der Hageman Faktor (Faktor XII) nimmt hier eine zentrale Rolle ein. Nach Adsorption an negativ geladenen subendothelialen Kollagenfasern ändert er seine Konformation und wird dadurch bis zu 500fach empfindlicher auf einen proteolytischen Angriff durch das Kallikrein-Kininogen System (Cochrane et al. 1973). Der aktivierte Faktor XII (FXIIa) katalysiert die Umwandlung von Präkallikrein zu Kallikrein. Faktor XIIa aktiviert dann an der Gefäßoberfläche Faktor XI (Bouma et Griffin 1986).

Bei den Interaktionen zwischen Präkallikrein und Faktor XII sowie bei der Aktivierung von Faktor IX wirkt das hochmolekulare Kininogen als nicht-enzymatischer Kofaktor (Mandle et al. 1976, Thompson et al. 1977).

Durch Faktor XIIa wird ebenfalls Plasminogen zu Plasmin sowie das Komplementsystem aktiviert.

In Anwesenheit von Kalziumionen erfolgt die Aktivierung von Faktor IX (Christmas Faktor) durch Faktor XIa. Faktor IXa aktiviert dann anschließend wiederum unter Mithilfe von Kalziumionen, Phospholipiden und Faktor VII (aus dem extrinsischem System) den Gerinnungsfaktor X (Margolias 1956, Barton 1967, Hemker und Kahn 1967, Hougie et al. 1967).

Unter pathophysiologischen Bedingungen kann der Gerinnungsablauf auch durch kleine Mengen Gewebsthrombokinase ausgelöst werden. Faktor IX wird hierbei durch einen Komplex aus Faktor VIIa, Gewebsthromboplastin, Phospholipid und Kalzium aktiviert. Daraufhin erfolgt die Aktivierung von Faktor X. Der weitere Ablauf der Gerinnungskaskade entspricht dem Ablauf des exogenen Systems, es erfolgt also eine indirekte Aktivierung von Faktor X über Faktor VII. Dieser Reaktionsweg wird als „Josso loop“ (Josso Schleife) bezeichnet (Hemker 1984, Xi M et al. 1989, Hemker et Beguin 1991).

### **1.1.2.3. Die gemeinsame Endstrecke**

Die weitere Aktivierung der Gerinnungskaskade erfolgt im intrinsischen und extrinsischen System auf dem gleichen Wege. Faktor Xa bewirkt eine sehr langsame Umwandlung von Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa). Diese Reaktion wird durch Anwesenheit von Phospholipiden, Kalziumionen und Faktor V um ein Vielfaches beschleunigt (Colman et al. 1994, Davie et al. 1975, Jobin et al. 1967).

Thrombin (Faktor IIa) spaltet aus dem langkettigen Fibrinogenmolekül die Fibrinopeptide A und B ab. Es entstehen zunächst lösliche Fibrinmonomere, die sich zu Fibrinpolymeren zusammenlagern. Unter Einwirkung von Faktor XIII werden kovalente Bindungen zwischen benachbarten Monomeren gebildet, die das nunmehr unlösliche Fibringerinnsel festigen und es dem fibrinolytischen Abbau durch Plasmin weitgehend entziehen (Bettelheim 1956, Blombäck et al. 1978, McKee et al. 1970).

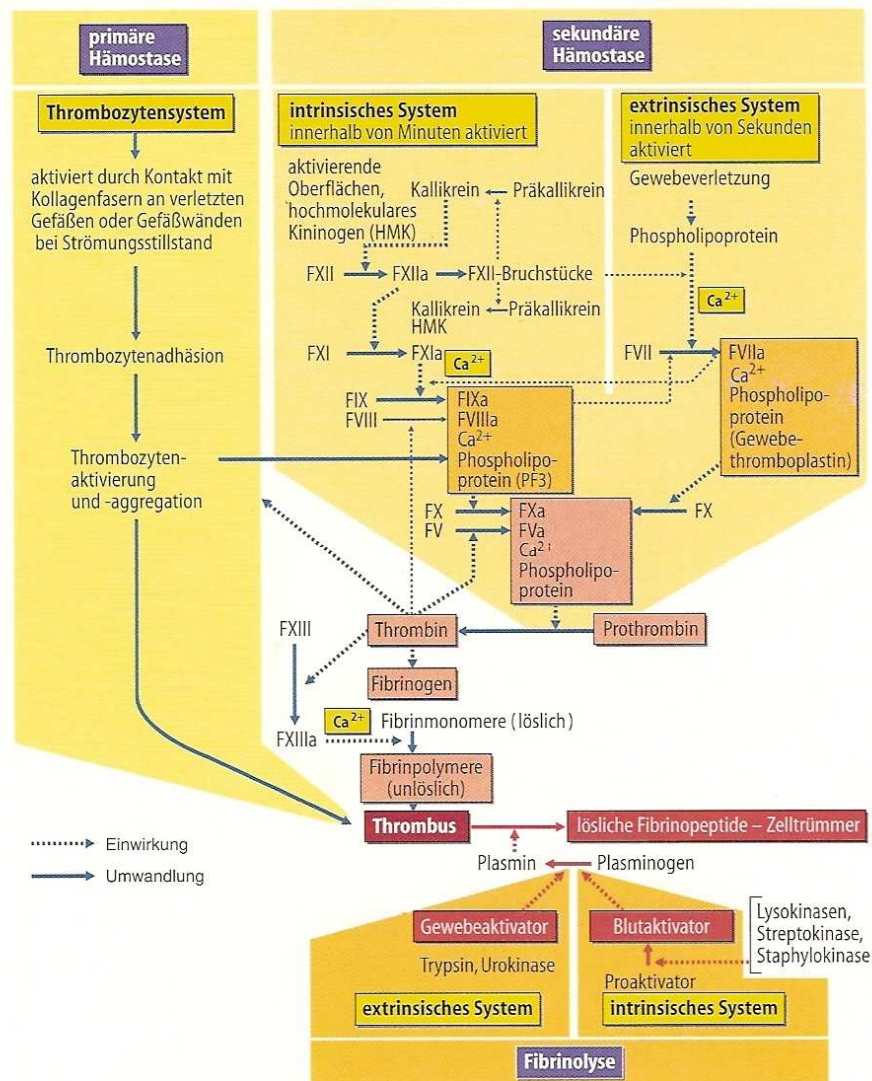


Abb. 1: Schema der Blutgerinnung und Fibrinolyse (Schmidt et Thews 1995, S. 432).

### **1.1.3. Regulation der Blutgerinnung**

Dem Gerinnungssystem stehen in Form der Antikoagulation und der Fibrinolyse zwei Regulationsmechanismen gegenüber, die eine mögliche Dominanz der Blutgerinnung verhindern sollen.

Funktionen dieser Regulationssysteme bestehen in der spezifischen Hemmung aktivierter Gerinnungsfaktoren durch die Antikoagulatoren und in der Auflösung bereits gebildeter Thromben durch die Fibrinolyse. Die Antikoagulation läuft zeitgleich mit der Gerinnungskaskade ab; sie kann diese auf beinahe allen Reaktionsstufen regulieren. Die Fibrinolyse hingegen greift im Wesentlichen nach Abschluss der Blutgerinnung ein, indem sie bereits gebildete Fibrinpolymere enzymatisch spaltet. Die Fibrinolyse beugt zusammen mit der Blutströmung und der Antithrombogenität des Endothels der Bildung spontaner Thrombosen vor.

### **1.1.4. Inhibitoren der Gerinnung**

Das antikoagulatorische System umfasst spezifische Inhibitoren, die aktivierte Gerinnungsfaktoren der sekundären Hämostase enzymatisch spalten. Die wichtigsten Inhibitoren sind Antithrombin (AT), Heparinkofaktor II (HK II), Protein C, Protein S und Thrombomodulin. Weitere Inhibitoren sind der C1-Inaktivator,  $\alpha$ 2-Makroglobulin und  $\alpha$ 1-Antitrypsin.

#### **1.1.4.1. Antithrombin: AT (Heparin-Kofaktor I)**

Der wichtigste physiologische Inhibitor der aktivierten Gerinnungsfaktoren ist das Antithrombin aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums. Das hauptsächlich in der Leber gebildete Glykoprotein kann durch die Elektrophorese der  $\alpha$ 2-Fraktion zugeordnet werden, es hat ein Molekulargewicht von 65000 Dalton. Die normale Plasmakonzentration beträgt 18-30 mg/dl (Abildgard 1967, Lane et al. 1996).

Antithrombin kann auf allen Stufen der Gerinnungskaskade durch proteolytische Spaltung der Serinprotease Thrombin (Faktor IIa) und der Faktoren IXa, Xa, XIa und XIIa regulierend eingreifen.

Die regulatorische Wirkung von Antithrombin beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Gerinnung, sondern umfasst über die Hemmung von Plasminogen auch die Fibrinolyse. Somit verhindert Antithrombin einerseits eine überschießende Gerinnung, hemmt aber andererseits die Fibrinolyse, die sonst in dem sehr komplexen Regulationssystem leicht dominieren könnte.

Mit den verschiedenen aktivierten Gerinnungsfaktoren bilden sich jeweils 1:1-Komplexe, die eine langsame Inaktivierung des jeweiligen Faktors nach sich ziehen. Durch endogenes (aus z.B. Endothel- oder Mastzellen) oder exogenes (therapeutisch zugefügtes) Heparin kann die Inaktivierung der einzelnen Faktoren um das bis zu 1000fache gesteigert werden. In Abwesenheit von Heparin ist die Komplexbildungsrate zwischen hämostatischen Enzymen und Antithrombin nur sehr gering. Heparin bindet sich mit Lysylresten an Antithrombin und sorgt dadurch für eine deutlich beschleunigte Komplexbildung.

#### **1.1.4.2. Heparin-Kofaktor II**

Heparin-Kofaktor II wird ebenso wie Antithrombin als Glykoprotein in der Leber gebildet. Es besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette. Es verfügt über ein Molekulargewicht von 65.000 Dalton und kann in seiner Wirksamkeit durch Heparin gesteigert werden (Tollefsen et al. 1983).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Antithrombin und Heparin-Kofaktor II besteht im Wirkungsspektrum: Heparin-Kofaktor II hemmt spezifisch Thrombin (Faktor IIa) und zeigt im Gegensatz zu Antithrombin keinerlei Einfluss auf andere Gerinnungsfaktoren (Tollefsen et al. 1981).

Ähnlich wie Antithrombin wird die Reaktionsgeschwindigkeit von Heparinkofaktor II in Anwesenheit von Heparin um das 100.000fache gesteigert (Tollefsen et al. 1982).

#### **1.1.4.3. Das Protein C-System**

Das Protein C-System umfasst die Inhibitoren Protein C (PC), Protein S (PS) und aktiviertes Protein C (APC).

Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges Plasmaglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 62000 Dalton (Beckmann et al. 1985). Um seine antikoagulatorische Funktion erfüllen zu können, wird humanes Protein C durch Thrombin, der einzigen physiologisch relevanten Serinprotease, die diese Reaktion bewirken kann, zu aktiviertem Protein C umgewandelt (Kisiel et al. 1977). Der zugrundeliegende Mechanismus wurde 1981 in seinen komplexen Aktivierungsschritten aufgedeckt (Esmon et Owen 1981): Thrombin bindet an einen endothelständigen Rezeptor „Thrombomodulin“, das die Aktivierung des Inhibitors Protein C in aktiviertes Protein C (APC) katalysiert, dessen antikoagulatorische Wirkung zusätzlich noch von Kalziumionen und Phospholipiden abhängt. Diese Kofaktoren werden vom Organismus in membrangebundener Form an aktiviertem Faktor V (FVa) bereitgestellt, der

somit ebenfalls eine Kofaktorfunktion einnimmt. Aktiviertes Protein C hemmt die Gerinnungsfaktoren Va und VIII a durch eine limitierte Proteolyse kalzium- und phospholipidabhängig, während die noch nicht aktivierten Vorstufen V und VIII verhältnismäßig widerstandsfähig gegenüber dem proteolytischen Effekt von aktiviertem Protein C sind. Eine weitere Funktion von Protein C ist die Inaktivierung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors, was auch als profibrinolytische Aktivität des Protein C beschrieben wird.

Humanes Protein S ist ein Vitamin K-abhängiges Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 69000 Dalton (Di Scipio et al. 1977, Di Scipio et Davie 1979). Die Plasmakonzentration liegt zwischen 20 und 25 µg/ml, die Halbwertszeit beträgt 42 Stunden. Protein S ist eingebunden in die durch aktiviertes Protein C ausgelöste Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa. Protein S zirkuliert im Plasma als aktive, ungebundene Form oder als inaktive Form, die an C4b-bindendem Protein gebunden ist (Schwalbe et al. 1990). Protein S verstärkt die Bindung von aktivem Protein C an Zellmembranen und beschleunigt die enzymatische Spaltung von Faktor Va und VIIIa, indem es mit aktiviertem Protein C auf phospholipidhaltigen Oberflächen in Gegenwart von Kalziumionen einen stoichiometrischen Komplex bildet (Andrew et al 1994, Walker 1980 und 1981, Walker et al.1987).

#### **1.1.4.4. Alpha<sub>2</sub>-Makroglobulin**

α<sub>2</sub>-Makroglobulin inaktiviert Faktor IIa, Kallikrein und Plasmin, indem es die Substrate in einer Käfigstruktur einfängt (Feldmann et al. 1985).

#### **1.1.4.5. C1-Inaktivator**

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

#### **1.1.4.6. Alpha<sub>1</sub>-Antitrypsin**

α<sub>1</sub>-Antitrypsin hemmt Faktor IIa (Thrombin) und Plasmin.



## **1.2. Das fibrinolytische System**

Mit der Fibrinolyse steht der Blutgerinnung ein Regulationssystem gegenüber, das sowohl gebildete Thromben durch proteolytische Spaltung der Fibrinpolymere auflösen als auch die Gerinnungsbildung durch Abbau der Fibrinogenmoleküle limitieren kann.

Das wirksame Enzym der Fibrinolyse ist das Plasmin. Es entsteht durch enzymatische Spaltung von Plasminogen, einer inaktiven, in der Leber gebildeten Vorstufe, die im Blut zirkuliert.

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 1997).

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

### **1.2.1. Aktivatoren der Fibrinolyse**

Faktor XII, Geweb plasminogenaktivator (Tissue-Type-Plasminogen-Aktivator: t-PA) und Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (u-PA) sind die auslösenden Faktoren für die Aktivierung der Fibrinolyse. Eine indirekte Aktivierung erfolgt durch die Hemmung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (PAI-1) durch Protein C (Van Hinsberg et al. 1985, Sakata et al. 1985, De Fouw et al. 1987).

#### **1.2.1.1. Tissue-Type-Plasminogen-Aktivator (t-PA)**

Der wichtigste Aktivator des fibrinolytischen Systems ist der Geweb plasminogenaktivator (Tissue-Type-Plasminogen-Aktivator: t-PA). Dieser Hauptaktivator des Intravaskulär-raumes, wird als „single-chain-t-PA“ (sct-PA) von Endothel-zellen, Leukozyten und Thrombozyten sezerniert und zirkuliert als Komplex mit Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1) im Plasma. Es liegen 5% des t-PA in der nativen Form ungebunden vor (Kristensen et al. 1984, Sprengers et Klufft 1987, Klufft 1988). Der ungebundene Anteil kann 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 Umwandlung der einkettigen in die zweikettige Form „two-chain-t-PA“ (tct-PA) erfolgt durch

geringe Mengen von Plasmin, Faktor Xa oder Kallikrein. Bei der Anwesenheit von Fibrin wird diese Reaktion um das 200-400fache beschleunigt (Bachmann 1987). Beide Formen sind in der Lage Plasminogen zu aktivieren und in Plasmin umzuwandeln.

#### **1.2.1.2. Urinary-Type-Plasminogen-Aktivator (u-PA)**

Der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (Urinary-Type-Plasminogenaktivator) ist der Hauptaktivator des Extravaskulärtraumes. Er wird sezerniert von Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Tumorzellen und kann ebenfalls in zwei Formen vorliegen, in der einkettigen single-chain-Form (scu-PA) oder in der zweikettigen two-chain-u-PA (tcu-PA)-Form (Gurewich et al. 1984, Ichinose et al. 1986). 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 in tcu-PA bewirken Plasmin und FXIIa-abhängiges Kallikrein (Gurewich et al. 1984, Ichinose et al. 1986).

#### **1.2.1.3. Faktor XIIa**

Faktor XIIa ist als Blutaktivator auch an der intravaskulären Fibrinolyse beteiligt, benötigt zur Wirksamkeit aber so genannte Proaktivatoren. Die wichtigsten Proaktivatoren (u.a. Präkallikrein) sind Lysokinasen, die durch traumatische oder entzündliche Gewebeschäden aus Blutzellen freigesetzt werden (Weiß et Jelkmann 1997).

#### **1.2.1.4. Protein C**

Indirekt aktiviert auch Protein C die Fibrinolyse über eine Hemmung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (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 und 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).

### **1.2.2. Inhibitoren der Fibrinolyse**

Auch die Fibrinolyse unterliegt – als Kontrollsystem der Gerinnung – einem Regulationsmechanismus, der sowohl Inhibitoren der Fibrinolyseaktivatoren als auch Hemmstoffe des Plasmins beinhaltet. Man unterscheidet Antiaktivatoren und Antiplasmin.

#### **1.2.2.1. Antiaktivatoren der Fibrinolyse**

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

PAI-1 wird hauptsächlich in Hepatozyten und Endothelzellen gebildet und hemmt alle physiologischen Plasminogenaktivatoren durch die Bildung stabiler, molarer 1:1-Komplexe (Wiman et al. 1984).

PAI-2 wird hauptsächlich in Makrophagen und in der Plazenta gebildet, es hemmt die zweikettigen Formen 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).

Ein weiterer Antiaktivator der Fibrinolyse ist Lipoprotein (a), das durch Konkurrenz mit Plasminogen um die Fibrinbindungsstelle die fibrinabhängige Stimulierung der t-PA-induzierten Aktivierung von Plasminogen verhindert (Harpel et al. 1989).

#### **1.2.2.2. TAFI (Thrombozytenaktivierbarer Fibrinolyse-Inhibitor)**

TAFI, auch Carboxypeptidase U (CPU) genannt, verzögert die Auflösung des Fibringerinnsels durch Abspaltung von Lysin und Arginin am C-terminalen Ende des Fibrins, wodurch vor allem die Anbindung von Plasminogen an das Fibrinmolekül verhindert wird.

#### **1.2.2.3. Antiplasmin**

Zu den Antiplasminen gehören  $\alpha_2$ -Antiplasmin und  $\alpha_2$ -Makroglobulin und C1-Inaktivator. Sie inaktivieren das aktivierte Plasmin.

Die Inaktivierung des Plasmins erfolgt hauptsächlich durch  $\alpha_2$ -Antiplasmin, das in hoher Konzentration im Plasma vorkommt und durch stabile Komplexbildung (er bindet im Verhältnis 1:1) kleine Mengen entstehenden Plasmins sofort neutralisieren kann.

Zudem konkurriert es mit Plasminogen um die Bindung an Fibrin und schützt auf diese Weise den Thrombus vor einem Abbau durch Plasminogen (Wallen et al. 1983).

$\alpha_2$ -Makroglobulin bindet überschüssiges Plasmin, sobald die Bindungskapazität von  $\alpha_2$ -Antiplasmin überschritten ist. Außerdem werden Kallikrein und t-PA durch  $\alpha_2$ -Makroglobulin neutralisiert (Thomas 1998).

Der C1-Inaktivator übt eine inhibitorische Wirkung aus auf die Faktoren des Kontaktphasesystems, nämlich Faktor XIIa, Faktor XIa und Kallikrein, die alle schwache Plasminogenaktivatoren sind (Colman 1969, Goldsmith et al. 1978, Mandle et Kaplan 1979), und hemmt dabei die Umwandlung von scu-PA zu tcu-PA. Der C1-Inaktivator neutralisiert auch direkt Plasmin (Bachmann 1987a).

### 1.3. Neonatale Hämostaseologie und Entwicklung der Hämostase

Größtenteils 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).

In der Früh- und Neugeborenenperiode finden sich einige Besonderheiten, die eine wesentliche Rolle bei der richtigen Beurteilung von hämostaseologischen Veränderungen in dieser Altersklasse spielen. Das Gleichgewicht zwischen den einzelnen Gerinnungsparametern ist in dieser Altersstufe noch besonders stör anfällig.

Die Synthese der Gerinnungsfaktoren findet im endoplasmatischen Retikulum (RES), im Gefäßendothel und in der Leber statt. Die Leber entsteht in der Embryonalphase 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 (Gittlin et Biasucci 1969), ab der 11. SSW sind Thrombozyten nachweisbar (Gibson 1989).

In der Arbeit von Holmberg 1974 mit Abortfeten aus der 12. bis 24. Schwangerschaftswoche konnten die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren in einer Konzentration nachgewiesen werden, die ca. 20-30% der Erwachsenennorm entspricht (Holmberg 1974). Eine weitere Studie mit Feten aus der 18. bis 29. Schwangerschaftswoche von Forestier et al. (1985) kam zu einem ähnlichen Ergebnis. Hier wurden Gerinnungsanalysen von fetalem Nabelschnurblut durchgeführt, die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren machten zwischen 9% und 20 % der Erwachsenennorm aus. Auch alle anderen Gerinnungsfaktoren waren bereits nachweisbar und lagen im Mittel bei ca. 30 % der Erwachsenennorm. Im gesamten Kollektiv zeigten sich jeweils gleiche Konzentrationen für die Gerinnungsfaktoren. Ein weiterer Anstieg erfolgt erst wieder im letzten Schwangerschaftstrimenon. Forestier zeigte auch für das Vitamin K-abhängige Protein C einen erniedrigten Plasmaspiegel. Somit wird ein funktionsfähiges Gerinnungssystem diskutiert, das sich lediglich auf einem niedrigeren Niveau abspielt.

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 sechs 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. Lebens-

monat 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. Zum anderen sind auch die Werte von Inhibitoren der Gerinnung (Antithrombin, Protein C und S) bei erhöhter Konzentration an Faktor VIII vermindert.

Hieraus resultiert eine Hyperkoagulabilität, die in der Neonatalphase unter anderem dem physiologischen Verschluss der Nabelgefäße dient, 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).

Besonders in diesem Alter sollte 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/kgKG) substituiert werden können.

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

In einer Untersuchung von Nowak-Göttl (1991, Habilitationsschrift) wurden die Parameter der plasmatischen Gerinnung und der Fibrinolyse von Kindern und Jugendlichen jenseits der Neugeborenenperiode erfasst.

Für den vWF ergaben sich hierbei niedrignormale Erwachsenenwerte von 52-140%. Die beiden wichtigsten Fibrinolyseinhibitoren zeigten jeweils erhöhte Erwachsenenwerte, das  $\alpha_2$ -Antiplasmin als der wichtigere Inhibitor erreichte Werte von 92-155%, während das  $\alpha_2$ -Makroglobulin sogar auf Werte von 261-733% anstieg.

## **1.4. Defekte des Hämostasesystems**

Unter physiologischen Bedingungen besteht zwischen den Gerinnungsfaktoren und den regulatorischen Systemen (Antikoagulation und Fibrinolyse) ein ausgewogenes Gleichgewicht, das bei Verletzungen lokalisiert und unter strenger Kontrolle durch die antagonistischen Systeme zugunsten der Blutgerinnung verschoben wird. Liegt jedoch eine allgemeine Störung dieses hämostatischen Gleichgewichts vor, so resultieren aus der Dominanz eines der beiden antagonistischen Systeme gegensätzliche Krankheitsbilder, die mit den Begriffen „Hämorrhagische Diathese“ sowie „Thrombophilie“ (Hyperkoagulabilität) beschrieben werden. Die Pathogenese der Hyperkoagulabilität kann auf einer Schwächung der Gerinnungsregulation (Defekte der Antikoagulation oder der Fibrinolyse) oder einer Stärkung der Gerinnungskaskade (Fibrinogen-, Faktor II- oder Faktor VII-Überschuss) beruhen. In beiden Fällen ist das komplexe Gleichgewicht zwischen Gerinnung und Regulation gestört. Für diese Arbeit sind die Verschiebungen des Gleichgewichts zugunsten der Hyperkoagulabilität im Kindesalter von besonderer Bedeutung.

### **1.4.1. Thromboembolische Ereignisse im Kindesalter**

#### **1.4.1.1. Definition der Thrombose**

Der Begriff „Thrombus“ leitet sich vom griechischen Wort für „Klumpen“ ab. In der medizinischen Terminologie wird damit die Blutpfropfbildung bezeichnet. Als Thrombose wird der pathologische Verschluss eines arteriellen oder venösen Blutgefäßes bezeichnet.

Bei der Thrombose kommt es zu einer intravasalen Blutgerinnung, die das Gefäß partiell oder vollkommen verschließen kann. Sie kann sowohl in arteriellen als auch in venösen Gefäßen auftreten. Der Thrombus besteht aus einem fibrinhaltigen Thrombozytenaggregat und ist von den postmortalen Gerinnseln abzugrenzen.

Neben den durch Fibrinbildung gebildeten Verschlüssen werden auch Gefäßobstruktionen, die durch Thrombozyten, Leukozyten (Leukostase wie bei der Leukämie) oder Erythrozyten (Erythrothrose wie bei der Sichelzellanämie) verursacht werden, als Thrombose bezeichnet (Sutor et al. 1996).



#### 1.4.1.2. Definition der Thromboembolie

Thromboembolie bezeichnet eine Obstruktion eines Gefäßes durch Thrombusanteile, die sich an anderer Stelle im Organismus gebildet haben und von dort disloziert sind. Man unterscheidet nach dem Ausgangspunkt des Thrombus venöse und arterielle Thromboembolien.

#### 1.4.1.3. Pathophysiologie der Thromboseentstehung

Der Pathomechanismus der Thrombosierung eines Gefäßes wurde in Grundzügen bereits 1859 von Rudolf Virchow beschrieben und ist mit seinem Modell der „Virchowschen Trias“ im Prinzip noch heute gültig. Demnach lässt sich die Thrombusbildung zurückführen auf Veränderungen der Gefäßwand, Veränderungen der Zusammensetzung des Blutes und Veränderungen der Blutströmung. Blutzusammensetzung und Blutstrom sind dabei voneinander abhängige Größen, sie sind durch zahlreiche Wechselwirkungen miteinander verbunden (Müller-Berghaus 1998, Virchow 1847).

Das Modell nach Virchow besagt, dass eine Störung einer oder mehrerer der drei Grundelemente Endothel, Blutzusammensetzung und Blutströmung pathogenetisch die Bildung eines intravasalen Blutgerinnsels bewirkt.

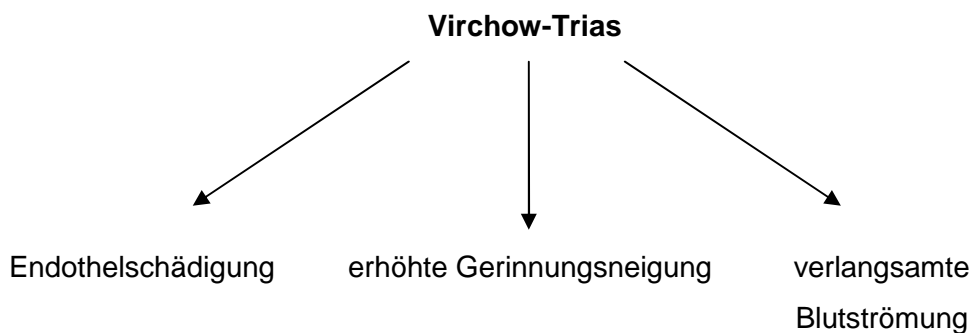


Abb. 2: Virchowsche Trias: Ursachen der Thrombusentstehung

#### 1.4.1.4. Häufigkeit von Thrombosen im Kindes- und Jugendalter

Venöse und arterielle Thrombosen im Kindesalter sind seltene Erkrankungen, zu deren Häufigkeit es nur wenige Untersuchungen gibt. Sie werden aber immer häufiger im Neugeborenen- und Kindesalter diagnostiziert.

Aus einer 1990 in Deutschland durchgeführten retrograden Umfrage lässt sich die Prävalenz von 1,9 pro 100.000 Kinder schätzen (Sutor 1992), während die ESPED-

Studie über Neugeborenenenthrombosen 1996 eine Prävalenz von 5,1 pro 100000 Geburten zeigte (Nowak-Göttl et al. 1996).

In einer Studie in Kanada traten symptomatische thrombotische Ereignisse bei 0,07/10.000 Kindern auf, bei stationär aufgenommenen Kindern betrug die dokumentierte Rate 5,3/10.000, während die Zahl bei intensivpflichtigen Kindern sogar bei 24/10.000 lag (Andrew 1995). Im Vergleich dazu werden bei Erwachsenen Prävalenzen von 2,5 bis 5% angegeben (Michelson et al. 1995).

Das Auftreten von Thrombosen im Kindesalter hat einen hohen Altersgipfel in der Säuglingsperiode (Andrew et al. 1996, Abilgaard 1969, Nowak-Göttl et al. 1996, Pabinger et al. 1996). Vielleicht haben Neugeborene ein höheres Risiko einer Thrombose aufgrund der niedrigeren Konzentrationen von Antithrombin, Heparin-Kofaktor II und Protein C, der reduzierten fibrinolytischen Kapazität, der Erhöhung des Hämatokritwertes und Erhöhung des vWFs. Beim Neugeborenen treffen schon physiologischerweise mehrere prädisponierende Risikofaktoren wie kleiner Gefäßdurchmesser, langsamer Blutstrom, hoher Hämatokrit und ein besonderes Hämostasesystem zusammen, was die besondere Thrombosegefährdung dieser Altersgruppe erklärt (Alkalay et al. 1993).

Die Inzidenz einer thromboembolischen Erkrankung wird nach dem ersten Lebensjahr signifikant niedriger. Ein zweiter Altersgipfel für das Auftreten einer Thrombose ist in den Pubertätsjahren wiederum assoziiert mit der reduzierten fibrinolytischen Aktivität (Andrew 1995).

Zusammen umfassen diese beiden Altersgipfel etwa 70% der Thrombosen im Kindesalter. Im ersten Lebensjahr sind wegen des erhöhten Thromboserisikos beim Neugeborenen Thrombosen etwa 40 Mal häufiger als in jedem späteren Lebensjahr (Andrew et al. 1994).

#### **1.4.1.5. Lokalisation von thromboembolischen Ereignissen**

Bei Neonaten sind die häufigsten Manifestationen einer vaskulären Obstruktion die venöse Thrombose der Nierenvenen, der Vena cava und der peripartale thromboembolische Schlaganfall. Weiterhin wurde eine hohe Rate von katheterinduzierten Thrombosen dokumentiert. Zentrale Venenkatheter führen insbesondere dann zu Thrombosen, wenn prothrombotische Risikofaktoren involviert sind. Weitere Lokalisationen von Thrombosen bei Kindern sind zerebral venöse Thrombosen, intrakardiale Thrombosen, portale und mesenteriale venöse Thrombosen, tiefe Venenthrombosen der Extremitäten und pulmonale Embolien.

#### 1.4.1.6. Diagnosestellung

Die Diagnose einer venösen Thrombose wird durch Duplexsonographie, Phlebographie, Computertomographie oder Magnetresonanztomographie (MRT) gestellt. Eine Perfusionsszintigraphie, ein Spiral-CT oder eine MR-Angiographie sind Methoden um eine Pulmonalembolie zu diagnostizieren.

#### 1.4.2. Hereditäre prothrombotische Risikofaktoren für venöse und arterielle Thrombosen

Die Prävalenz der hereditären Thrombophilie in der Bevölkerung beträgt zwischen 1:2500 und 1:5000 und ist damit häufiger als die angeborene Blutungsneigung (Mannucci 1987).

Während beim Erwachsenen 40% der Thrombosen als idiopathisch eingestuft werden (Michelson et al. 1995), lassen sich bei Kindern und Jugendlichen fast immer thrombophile Risikofaktoren hereditärer oder erworbener Art eruieren.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von humoralen Risikofaktoren als Ursache einer erhöhten Gerinnungsbereitschaft nachgewiesen. Diese hereditären Risikofaktoren für Thrombophilie werden bei venösen Thrombosen und zerebralen Insulten mit unterschiedlicher Häufigkeit gefunden.

Bislang sind folgende Risikofaktoren für venöse und arterielle Thrombosen im Kindesalter bekannt:

##### **Häufig:**

- Faktor V G1691A Mutation (APC-Resistenz)
- Prothrombin G20210A Mutation
- Lipoprotein(a)-Erhöhung >30mg/dl
- Moderate Hyperhomozysteinämie
- Homozygote MTHFR C677T-Mutation

##### **Selten:**

- Protein C-Mangel
- Protein S-Mangel
- Antithrombin-Mangel
- Heparin Kofaktor II-Mangel

**Sehr selten Störungen der Fibrinolyse durch:**

- Dysfibrinogenämie
- Plasminogenmangel und Dysplasminogenämie
- Homozygote Homozysteinurie
- erhöhte Aktivität des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (PAI)

**1.4.2.1. Faktor V G1691A Mutation**

Faktor V ist ein einkettiges Molekül mit einem Molekulargewicht von 300.000 Dalton, das von Leber und Megakaryozyten synthetisiert wird. Die Plasmakonzentration liegt bei 4-14 mg/l. In Verbindung mit FXa erfolgt durch Thrombin die Spaltung von drei Peptidbindungen und damit die Aktivierung von FV zu FVa. Die katalytische Aktivität des Prothrombinase-Komplexes wird durch FVa um ein Vielfaches gesteigert. FVa wird proteolytisch durch aktiviertes Protein C abgebaut.

1994 wurde durch Bertina und Mitarbeiter eine G>A-Punktmutation an Position 1691 in Exon 10 des Faktor V-Gens entdeckt, die zur Ausbildung einer Variante des FV-Moleküls führt. Der Tausch einer Aminosäure Arginin zu Glutamin an Position 506 des FV-Moleküls bedeutet den Verlust einer Schnittstelle für aktiviertes Protein C und einen um den Faktor 10 verlangsamten Abbau des FVa-Moleküls. Dadurch kommt es zu einer Verlängerung der Plasmahalbwertszeit von FVa und einer gesteigerten Aktivität des Prothrombinase-Komplexes. Die Häufigkeit der Resistenz von FVa gegenüber aktiviertem Protein C (APC-Resistenz) liegt, abhängig von der geographischen Region, bei 0-10% in der Gesamtbevölkerung und bei 10-64% bei Patienten mit venösen Thrombosen (Bertina et al. 1994, Dahlbäck 1997, Griffin et al. 1995).

In der kaukasischen Bevölkerung liegt die Prävalenz für heterozygote Träger dieser Mutation bei ungefähr 3-5%. Diese Mutation tritt aus entwicklungsgeschichtlichen Gründen bei der schwarzen und asiatischen Bevölkerung praktisch nicht auf.

Faktor V-Leiden ist mit einem hyperkoagulatorischen Status und einer erhöhten Anfälligkeit für venöse Thrombosen verknüpft und wurde darüber hinaus bei bis zu 8% der Frauen mit rezidivierend idiopathischen Fehlgeburten festgestellt.

#### **1.4.2.2. Prothrombin G20210A Mutation**

Prothrombin wird Vitamin K-abhängig in der Leber synthetisiert und besitzt ein Molekulargewicht von 72.000 Dalton. Als inaktiver Vorläufer des Thrombins stellt Prothrombin ein zentrales Molekül im Hämostasesystem dar. Die Plasmakonzentration von Prothrombin beträgt 100-200 µg/ml, das Molekül hat eine Halbwertszeit von 72-96 Stunden. Es wird durch ein 21kb langes Gen kodiert, welches auf Chromosom 11 an Position 11p11-q12 lokalisiert ist (Royle 1987).

1996 wurde eine Punktmutation (G/A) in der Nukleotid-Position 20210 in der 3'-nicht kodierten Sequenz des Prothrombin-Gens als Risikofaktor für venöse und Thrombosen identifiziert (Poort et al. 1996, Junker 1998, Cumming et al. 1997, Ehrenforth et al. 1998, Ferraresi et al. 1997).

Durch den Austausch von Guanin zu Adenin kommt es phänotypisch zu einer erhöhten Prothrombinkonzentration im Plasma.

Der prozentuale Anteil der Mutationsträger an der gesunden Bevölkerung variiert zwischen 0 und 4%. Innerhalb Europas ist eine Zunahme von Nord nach Süd zu erkennen (Poort et al.1996).

Es handelt sich um einen relativ weit verbreiteten Risikofaktor für venöse Thrombosen, der gehäuft in der Kombination mit einer Faktor V-Mutation in Erscheinung tritt (Poort 1996).

#### **1.4.2.3. Lipoprotein(a)-Erhöhung**

Lipoprotein(a) wurde 1962 von Blumberg und 1963 von Berg erstmals beschrieben. Lipoprotein(a) ist eine verwandte Substanz der low-density Lipoproteine (LDL). Es besteht aus dem Apolipoprotein(a), einem hydrophilen, hochglykolysierten Protein und einem LDL ähnlichen Partikel. Dieser Anteil enthält wie LDL Lipidkomponenten und Apo B-100. Lp(a) unterscheidet sich vom LDL in seiner Proteinzusammensetzung, seinem Kohlenhydratanteil, seinen elektrophoretischen Eigenschaften, seinem größeren Partikelumfang, seiner höheren Dichte und seinem Neuraminidaseanteil.

Das Apolipoprotein(a) ist durch eine Disulfidbrücke an das Apolipoprotein B-100 gebunden (Kostner 1992, McLean et al. 1987, Scanu 1992).

Das Gen von Apo(a) liegt auf dem 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).

Apo(a) enthält drei verschiedene Strukturdomänen, deren Sequenzen in hohem Ausmaß mit denen des Plasminogens übereinstimmen: Die Proteasedomäne des Plasminogens, die aufgrund der Aminosäuresubstitution des Arginins durch Serin inaktiviert ist, eine Kopie des Kringle V („Kringle“ genannt wegen der Ähnlichkeit mit einem dänischem Kuchen) und eine variable Anzahl von Kopien des Kringle IV. Diese Kringle sind durch Disulfidbrücken miteinander stabilisiert.

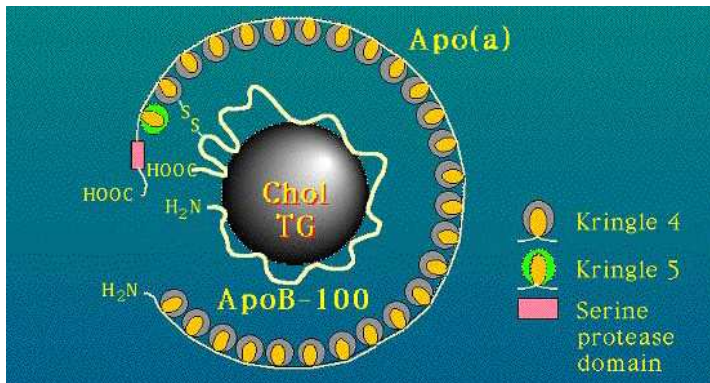


Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur von Lipoprotein(a)

Marcovina et al. zeigten 1993, dass die unterschiedliche Größe der Apo(a)-Isoforme, deren Gewicht zwischen 200 und 800 Kilodalton variiert, mit einer unterschiedlichen Anzahl von Kringle 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 Kringle IV und anderen Polymorphismen im Apo(a) bestimmen zum größten Teil die interindividuellen Unterschiede der Lp(a)-Konzentration (Boerwinkle et al. 1992, Nowak-Göttl 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 seinem 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).

Büchler et al. zeigten 2000, dass Lp(a) Endothelzellen schädigt und die Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 Expression in Monozyten aktiviert.

Erhöhte Lp(a)-Konzentrationen bedingen ein vermehrtes Angebot von Lp(a) in der Gefäßwand und fördern so in ähnlicher Weise 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). Lp(a)-Konzentrationen über 30 mg/dl stellen außerdem einen wichtigen Risikofaktor bei der Entstehung tiefer Beinvenenthrombosen von Kindern und Jugendlichen dar (Nowak-Göttl 1997 und 1999).

#### **1.4.2.4. Hyperhomozysteinämie (C677T-Mutation im 5,10-MTHFR-Gen)**

Homozystein ist eine essentielle Aminosäure für die Übertragung von Methylgruppen (Transmethylierung), die im menschlichen Körper nicht gebildet werden kann. Weiterhin ist es bedeutsam für die Übertragung von S-H-Gruppen (Transsulfuration). Transmethylierung und Transsulfuration sind jeweils abhängig von verschiedenen Kofaktoren wie Vitamin B<sub>6</sub> und B<sub>12</sub> und Folsäure. Bei Mangelzuständen dieser Vitamine entsteht eine Hyperhomozysteinämie.

Homozystein wird gebildet als Intermediärprodukt im Stoffwechsel von Methionin, das mit der Nahrung aufgenommen wird. Die normale Plasmakonzentration von Homozystein liegt zwischen 5 und 16 µmol/l (de Stefano 1996).

Ein erhöhter Homozystein-Plasmaspiegel kann durch einen erworbenen Mangel an Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub>, die für die Remethylierung von Homozystein zu Methionin erforderlich sind, oder durch Vitamin B<sub>6</sub>-Mangel entstehen (Rees et al. 1993).

Ein erhöhter Homozystein-Plasmaspiegel kann auch durch verschiedene genetische Störungen, wie Mangel an Cystathion-β-Synthetase oder Vorhandensein einer thermolabilen Form der 5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR), bedingt sein.

Die homozygote Veränderung der 5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) C677T führt zu einer 50%igen Reduktion der spezifischen Aktivität von MTHFR (Mudd 1989, Malinov 1994). Es folgt eine reduzierte Umwandlung von Homozystein zu Methionin innerhalb des Transmethylierungs-Stoffwechselweges. Sie liegt bei ca. 5% der Bevölkerung in homozygoter Form vor.

Die homozygoten Stoffwechseldefekte manifestieren sich in erhöhten Plasmahomozysteinspiegeln über 100 µmol/l und stellen einen erheblichen Risikofaktor vor allem für arterielle, aber auch für venöse Gefäßverschlüsse dar. Auch die heterozygoten Genotypen, die wesentlich mildere klinische Verläufe zeigen, stellen mit Plasmakonzentrationen von 16-25 µmol/l ein thrombogenes Risiko dar.

#### **1.4.2.5. Protein C-Mangel**

1981 wurde erstmals die Krankengeschichte einer Familie mit rezidivierenden venösen Thrombosen publiziert, die auf einen Protein C-Mangel beruhten (Griffin et al. 1981).

Bei diesem Gerinnungsdefekt werden zwei Typen unterschieden: Typ I mit einer Verminderung der Aktivität und des Antigens sowie Typ II mit einer Aktivitätsverminderung bei normaler Antigenkonzentration. Das Protein C-Gen weist wie beim Antithrombinmangel zahlreiche Mutationen und Polymorphismen auf, so dass auch hier der diagnostische Nachweis nicht über eine einzelne Mutation möglich ist. Der Nachweis eines Protein C-Mangels erfolgt über die Messung der Protein C-Aktivität, wobei diese auch durch Leberfunktionsstörungen, durch eine Behandlung mit Cumarinderivaten und im Rahmen von Verbrauchskoagulopathien reduziert sein kann.

Protein C-Mangel wird ebenfalls auf autosomal-dominantem Weg vererbt und ist assoziiert mit familiärer venöser Thrombose (Beckermann et al. 1983). Der Protein C-Wert bei Heterozygoten beträgt 40 bis 60% des Normalwertes. Über 75% der Personen mit Protein C-Mangel entwickeln im Laufe ihres Lebens eine oder mehrere Thrombosen (Bauer 1995).

Klinisch manifestiert sich Protein C-Mangel ähnlich wie Antithrombin-Mangel. Ein homozygoter Gendefekt zeigt schon im Neugeborenenalter klinische Symptome (Purpura fulminans, persistierender hyperplastischer primärer Glaskörper, Glaskörperblutungen) und erfordert die Substitution dieses Inhibitors.

#### **1.4.2.6. Protein S-Mangel**

Die hereditäre Form des Protein S-Mangels ist seit 1984 bekannt (Comp et al. 1984).

Es werden drei Subtypen unterschieden: Typ I mit einer Reduktion des gesamten Protein S-Antigens verbunden mit einer Aktivitätsminderung, Typ II mit einer Aktivitätsminderung bei normaler Konzentration sowohl des gesamten wie des freien Protein S und Typ III, bei dem sowohl die Aktivität als auch das freie Protein S vermindert sind.

Die Prävalenz des Protein S-Mangels bei Patienten mit einer venösen Thrombose, die jünger als 45 Jahre alt sind, wird mit 5-8% angegeben (Gladson et al. 1988, Broekmans et al. 1986). Der hereditäre Protein S-Mangel wird analog zu den übrigen Defekten des antikoagulatorischen Systems auch autosomal-dominant



vererbt (Gladson et al. 1988). Der heterozygote Genotyp führt zu einer Antigenkonzentration von 50% des Normalwertes. Klinisch weisen die Patienten bereits in jüngerem Alter (<45 Jahre) eine erhöhte Thromboseneigung auf, die sich häufig in rezidivierenden thromboembolischen Ereignissen äußert.

Ein erworbener Protein S-Mangel resultiert aus einer Behandlung mit Cumarinderivaten, kann aber auch während einer Schwangerschaft, durch Ovulationshemmer, postmenopausale Hormonbehandlung sowie HIV-Infektionen auftreten.

#### **1.4.2.7. Antithrombinmangel**

Der Antithrombinmangel wurde 1965 als erster thrombophiler Gerinnungsdefekt identifiziert (Egeberg 1965). Antithrombinmangel wird autosomal-dominant vererbt und betrifft somit beide Geschlechter gleichermaßen (Bauer 1995). Die molekularbiologische Grundlage weist sowohl verschiedene Genmutationen als auch vollständige Gendeletionen auf (Blajchmann et al. 1992, Olds et al. 1994).

Die Prävalenz in der gesunden, asymptomatischen Bevölkerung wurde 1977 von Odegard mit 1 zu 5000 angegeben, während die Häufigkeit in Patientenkollektiven mit Thrombosen unbekannter Ursache bei 2% bis 5% liegt.

Man unterscheidet molekulargenetisch den Typ I-Mangel mit einer Reduktion des Antithrombins um etwa 50%, verbunden mit einer entsprechenden Aktivitätsminderung (Konzentrationsminderung), und den Typ II-Mangel, bei dem die Antithrombinmenge zwar normal, die Aktivität aber durch verschiedene konfigurierende Änderungen des Antithrombinmoleküls eingeschränkt ist (Funktionsminderung). Bei Typ II treten Störungen des reaktiven Zentrums (II RS), der Heparin Binding Site (II HBS) oder multiple funktionelle Defekte (Pleiotropic Effect, II PE) auf (Finazzi 1997, Lane 1991).

Der hereditäre Antithrombinmangel ist mit einem hohen Thromboserisiko assoziiert. Bei den betroffenen heterozygoten Patienten liegt der Antithrombin-Spiegel bei 40 bis 60% des Normalwertes. Charakteristischerweise treten bereits im frühen Jugend- und Erwachsenenalter – bei der Hälfte der Betroffenen im Alter vor dem 25. Lebensjahr – venöse Thrombosen auf. Bis zum 50. Lebensjahr haben 80% der Patienten eine Thrombose durchgemacht (Hirsh et al. 1989).

Eine Reduktion des Antithrombin-Spiegels auf 50% des Normalwertes ist ein Prädispositionsfaktor für das Auftreten einer venösen Thrombose (Hirsh et al 1994). Genetisch bedingter Antithrombinmangel liegt in der Gesamtbevölkerung in einer Häufigkeit von 0,02 bis 0,17% vor, bei Patienten mit venösen Thrombosen zwischen 0,5 und 4,9%.

Die Thrombosen treten gewöhnlich in den tiefen Beinvenen auf oder manifestieren sich als Pulmonalembolien, können aber auch an ungewöhnlichen Stellen wie den mesenterialen, renalen oder zerebralen Venen in Erscheinung treten.

Unter Heparintherapie sinken die Antithrombinspiegel geringfügig ab, wobei daraus jedoch keine klinische Relevanz ersichtlich wird. Bei DIC und schweren Lebererkrankungen kommt es dagegen zu einem massiven Abfall der Antithrombinwerte. Ebenso sinken die Antithrombin-Spiegel bei Eiweißverlusten, was wahrscheinlich die Ursache des erhöhten thrombotischen Risikos bei nephrotischem Syndrom ist (Hirsch et al. 1994). Auch die Einnahme oraler Kontrazeptiva oder von Östrogen bewirkt eine milde Antithrombin-Reduktion (Panicucci et al. 1980, Thaler et Lechner 1981).

Ein hereditärer Antithrombinmangel wird über eine Bestimmung der funktionellen Aktivität diagnostiziert, da eine alleinige Messung der Antigenkonzentration einen Typ II-Mangel nicht erfassen würde (Willeke et al. 2002).

Ein Antithrombin-Mangel macht eine Antikoagulation mit Heparin wirkungslos (Montgomery et Scott 1993).

#### **1.4.2.8. Heparin-Kofaktor II-Mangel**

Das Wirkungsprinzip von Heparin-Kofaktor II legt die Vermutung nahe, dass ein Mangel dieses antikoagulatorischen Proteins über eine verminderte Inaktivierung von Thrombin zu einer Dominanz der Gerinnungskaskade gegenüber den antagonistischen Systemen führt und somit ein Thromboserisiko darstellt.

1985 konnten Sie et al. und Tran unabhängig voneinander anhand von jeweils einer untersuchten Familie mit Thromboseneigung einen Heparin-Kofaktor II-Mangel als autosomal dominant vererbten Gerinnungsdefekt nachweisen. Bertina et al. konnten 1987 in einer Studie keine eindeutige Korrelation zwischen heterozygotem Heparin-Kofaktor II-Mangel und erhöhtem Thromboserisiko finden. Ihren Angaben zufolge liegt die Prävalenz dieses Gerinnungsdefektes sowohl bei Thrombosepatienten als auch in der gesunden Bevölkerung bei 1%.

Im Unterschied zum AT-Mangel ist die klinische Bedeutung des Heparin-Kofaktor II-Mangels noch weitgehend ungeklärt und bedarf noch zahlreicher Untersuchungen (Mannucci et al. 1987, Conrad et al. 1988).

#### **1.4.2.9. Dysfibrinogenämie**

Qualitative Fibrinogenanomalien werden gewöhnlich autosomal-dominant vererbt. Da viele unterschiedliche genetische Mutationen zur Produktion von anorganischen Fibrinogenmolekülen in der Leber führen können, sind die Dysfibrinogenämien eine heterogenen Gruppe von klinischen Störungen. Dysfibrinogenämien können symptomlos bleiben. Sie können aber auch eine Blutungsneigung oder rezidivierende Thromboembolien zur Folge haben (Mc Donagh et Carell 1987). Einige der Fibrinogenanomalien haben die Potenz, die fibrinolytische Aktivitäten zu verringern was dann zur thrombotischen Diathese führen kann (Bauer 1995).

#### **1.4.2.10. Dysplasminogenämie, Hypoplasminogenämie**

In Einzelfällen ist eine Dysplasminogenämie oder Hypoplasminogenämie als Ursache von Thromboembolien beschrieben worden. Die durch die Dysplasminogenämie verursachte Störung des fibrinolytischen Systems verursacht die Thromboseneigung (Bauer 1995).

#### **1.4.2.11. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1-Überschuss (PAI 1-Überschuss)**

Plasminogen-Aktivator-Inhibitor wird aus dem Gefäßendothel freigesetzt und führt über eine indirekte Hemmung der Fibrinolyse zu einer Hyperkoagulabilität mit Thromboseneigung. Bei einem PAI-Überschuss handelt es sich meist um eine erworbene Thrombophilie aufgrund einer generalisierten Endothelschädigung, die häufig auf den allgemein atherogenen Risikofaktoren wie Nikotin, Hypercholesterinämie, Adipositas, Hypertonie und Diabetes mellitus beruht (Stiko-Rahm et al. 1990).

Erhöhte Werte für PAI-1 werden in Zusammenhang mit dem Genotyp 4G/4G des Deletion/Insertion-4G/5G-Polymorphismus beschrieben (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 heute als bedeutender für erhöhte PAI 1-Spiegel beschrieben als genetische Ursachen (Henry et al. 1998).

Ob erhöhte Werte für PAI-1 mit einem Risiko für arterielle oder venöse Thrombosen einhergehen wird widersprüchlich diskutiert.

#### **1.4.2.12. Antiphospholipid-Syndrom**

Unter einem Antiphospholipid-Syndrom versteht man den Nachweis zirkulierender Antiphospholipidantikörper, die mit thromboembolischen Ereignissen einhergehen. Dieses Syndrom ist zwar häufig mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises assoziiert (Asherson et al. 1989), kann jedoch auch als „primäres Antiphospholipid-Syndrom“ auftreten und zählt mit zu den häufigsten erworbenen Gerinnungsstörungen (Gerber et al. 1990). Man unterscheidet eine Vielzahl von Antiphospholipid-Antikörpern, z.B. Lupus-Antikoagulantien, Anti-Cardiolipin-Antikörper, die gegen Phospholipidoberflächen gerichtet sind und meist zu einer aPTT-Verlängerung führen.

Thromboembolische Ereignisse treten bei 40% der Patienten mit Antiphospholipidantikörpern und systemischem Lupus erythematoses (SLE) auf, aber nur bei 12-18% der Patienten mit Antiphospholipidantikörpern, die nicht an SLE erkrankt sind (Love et Santaro 1990).

Die betroffenen Patienten können selten Blutungen (eher bei Kindern) oder Thrombosen erleiden (Pengo et al. 1996, Perona et al. 1995, Muntean et al. 1992).

### 1.4.3. Erworbene Risikofaktoren (primär nicht-haemostaseologische Risikofaktoren)

Einen Überblick über erworbene Risikofaktoren für Thrombophilie im Kindesalter gibt die folgende Tabelle (Nowak-Göttl et al. 2002):

#### **Perinatale Erkrankungen:**

Asphyxie, RDS, maternaler Diabetes, neonatale Infektionen, nekrotisierende Enterokolitis, Dehydratation, Kongenitales nephrotisches Syndrom, Polyzythämie

#### **Medizinische Interventionen:**

Gefäßkatheter, chirurgische Eingriffe, Transplantationen, Immobilisierung, Gipsverbände

#### **Akute Erkrankungen:**

Trauma, Sepsis, Dehydrierung, akute rheumatische Erkrankungen, nephrotisches Syndrom, HUS (Hämolytisch urämisches Syndrom), TTP (Thrombotisch thrombozytopenische Purpura), ALL (Akute lymphoblastische Leukämie)

#### **Chronische Erkrankungen:**

Onkologische-, renale-, kardiale- oder chronisch rheumatische Erkrankungen, Sichelzellanämie, chronisch entzündliche Darmerkrankung

#### **Medikamente:**

E.coli asparaginase, Prednisolon, aktivierte Gerinnungsfaktorkonzentrate, exzessive Gerinnungsfaktorsubstitution, Heparine, antifibrinolytische Medikamente, orale Kontrazeptiva

## 1.5. Faktor XII

Ratnof und Colopy berichteten 1955 erstmals über einen Patienten, Mr. John Hageman, mit Faktor XII-Mangel (Ratnof et Colopy 1955). Im Plasma zeigte sich eine verlängerte aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT). Es wurde das Fehlen eines Plasmaproteins postuliert, welches zunächst als Hageman-Faktor, später als Faktor XII bezeichnet wurde. Hier wurde erstmals festgestellt, dass das Fehlen von Faktor XII nicht assoziiert ist mit spontanen oder exzessiven verletzungsbedingten Blutungen (Ratnof et Colopy 1955, Colman 2001). Dies indizierte, dass Faktor XII nicht für die Fibrinbildung erforderlich ist (Gailani et Broze 1991).

Es wurde aber ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung thromboembolischer Komplikationen behauptet, wie auch bei dem erstbeschriebenen Mr. Hageman, der an einer Pulmonalembolie verstarb.

Dagegen wird in neueren Untersuchungen postuliert, dass Faktor XII-Mangel oder die Inhibition von Faktor XII möglicherweise eine Strategie zur Prävention von ischämischen Schlaganfällen und anderen thromboembolischen Erkrankungen bietet (Renné et al. 2006).

### 1.5.1. Aktivierung des Faktor XII

Faktor XII liegt im Plasma als Zymogenform vor und kann als Proenzym aus dem Plasma isoliert werden. Es hat eine große Affinität zu negativ geladenen Oberflächen. Durch die Bindung an die Oberfläche wird die Struktur des Faktor XII geändert und dadurch die Aktivierung des Kontaktsystems initiiert. Der oberflächen-gebundene FXII initiiert die Umwandlung von Präkallikrein (PK) in das Enzym Kallikrein (KK).

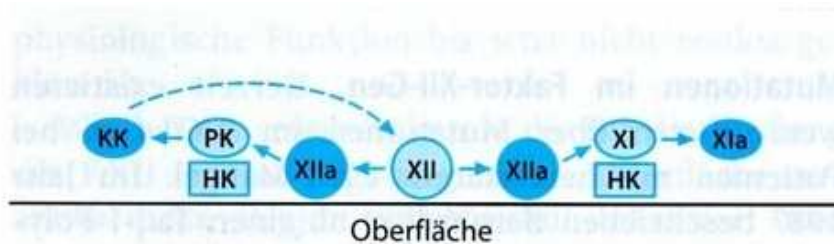
Der entstehende Faktor XIIa ist an der Aktivierung der Gerinnung, der Fibrinolyse, des Komplementsystems, des Renin-Angiotensin-Systems und der Freisetzung von Kinin beteiligt (Kluft et al. 1987).

Durch Bindung an eine negativ geladene Oberfläche wird Faktor XII in seiner Konformation so geändert, dass er gegenüber seinem Substrat Präkallikrein proteolytische Aktivität entwickeln kann. Der aktivierte Faktor XII wandelt Faktor XI in Faktor XIa um, welcher in der Folge Faktor IX zu Faktor IX a aktiviert.

Neben seiner Wirksamkeit im endogenen Gerinnungssystem nimmt Faktor XIIa durch die Präaktivierung von Faktor VII auch Einfluss auf das exogene Gerinnungssystem.

Faktor XIIa ist an der Aktivierung des Fibrinolyseystems beteiligt. Dies erfolgt einerseits durch die direkte Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin, andererseits greift Faktor XIIa über die Umwandlung von Präkallikrein zu Kallikrein in die Fibrinolyseaktivierung ein.

Der Ablauf der endogenen Gerinnungskaskade wird durch Phospholipidoberflächen vermittelt, die Fibrinolyse wird durch die Gegenwart von Fibrin stimuliert.



**Abb. 15.6.** Interaktion des Kontaktsystems. *XII* Faktor XII, *XIIa* aktivierter FXII; *PK* Präkallikrein; *KK* Kallikrein; *HK* hochmolekulares Kininogen; *XI* Faktor XI; *XIa* aktivierter Faktor XI

Abb. 4: Interaktion des Kontaktsystems. XII Faktor XII, XIIa aktiviertes FXII; PK Präkallikrein; KK Kallikrein; HK hochmolekulares Kininogen; XI Faktor XI, XIIa aktivierter Faktor XI (aus: Mannhalter 2001, S. 128).

### 1.5.2. Struktur des Faktor XII

Faktor XII (F XII) zirkuliert im Blut als einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 76000 Dalton. Es besteht aus 596 Aminosäuren und besitzt einen Kohlenhydratanteil von 16,8% (Cool et al. 1985).

Das Faktor XII gehört zur Familie der Serin-Proteasen mit der typischen katalytischen Triade bestehend aus Histidin, Asparaginsäure und Serin (Schlösser et Engel 1996).

Das Faktor XII-Molekül ist aus mehreren, auch in anderen Proteinen zu findenden Domänen aufgebaut. Innerhalb des Faktor XII-Moleküls wurden sog. Kringel-domänen identifiziert, wie wir sie von Prothrombin, Plasminogen oder Gewebepasminogenaktivator (t-PA) kennen. Kringle-Domänen sind Komponenten, welche häufig in den meisten Proteinen gefunden werden, die in die Fibrinolyse involviert sind (Magnusson et al. 1976).

Daneben enthält Faktor XII, wie viele andere Gerinnungsproteine auch, zwei Domänen vom Typ des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF). Faktor XII weist eine 40%ige Sequenzhomologie zu t-PA auf. Weiterhin besitzt Faktor XII auch Homologien zu den Typ I- und Typ II-Regionen des Fibronectin (Magnusson et al. 1976).

Das Faktor XII-Protein wird durch mehrere intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Die für die Bindung des Faktor XII an eine negativ geladene Oberfläche verantwortliche Region im Molekül liegt in der aminoterminalen Kette innerhalb der ersten 28 Aminosäuren des Faktor XII-Moleküls und beinhaltet eine stark hydrophile Region (mit positiv geladenen Lysinresten), während das carboxyterminale Ende das enzymatisch aktive Zentrum enthält (Revak et Cochrane 1976).

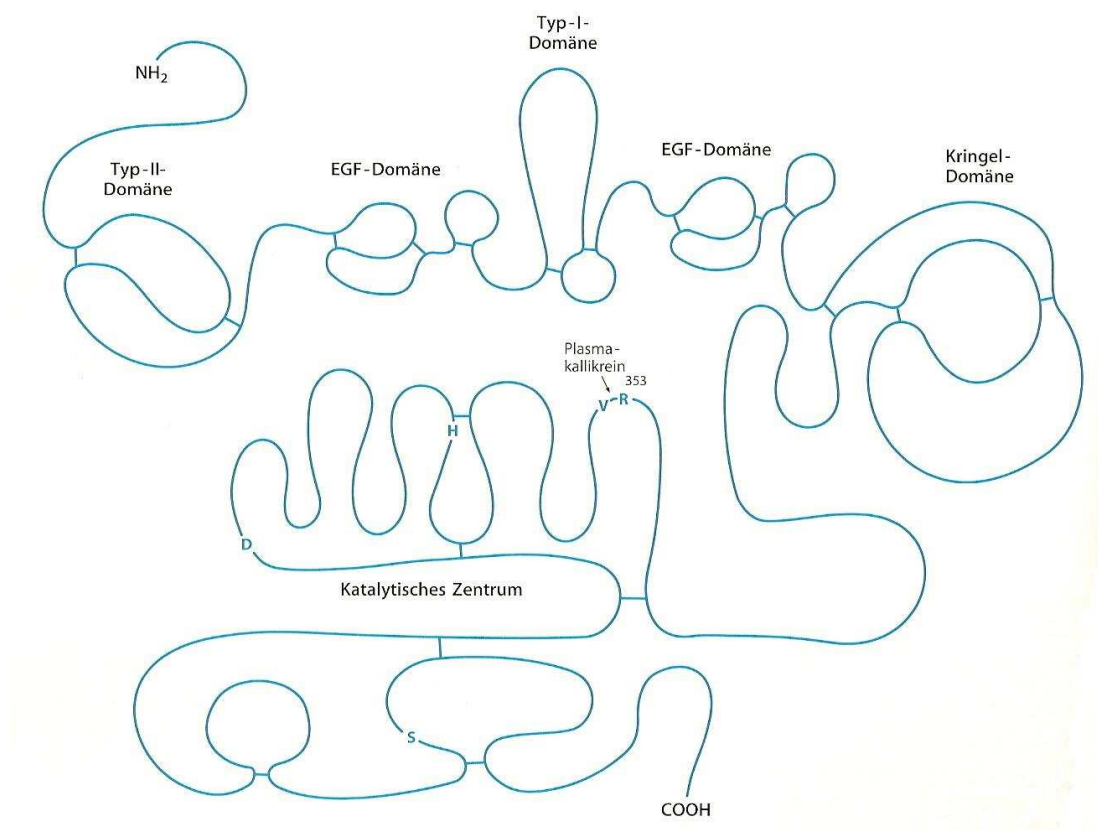


Abb.5: Strukturvorschlag für den humanen Faktor XII. Die Disulfidbrücken sind durch Querverbindungen dargestellt und sind in Analogie zu Plasmin angeordnet. Die verschiedenen Domänen des Faktor XII (die Typ-I- und Typ-II-Domänen des Fibronektin, die Wachstumsfaktor- oder EGF-Domäne und die Kringel-Domäne) sind gekennzeichnet. Die katalytische Triade Histidin (H), Asparaginsäure (D) und Serin (S) ist gekennzeichnet, ebenso wie die Kallikreinspaltstelle bei Valin (V) und Asparagin (R) 353 (Mannhalter 2001, S. 126)



### **1.5.3. Charakterisierung des Faktor XII-Gens**

Das Faktor XII-Gen wurde 1987 kloniert und sequenziert (Cool und MacGillivray). Das Gen hat eine Größe von ca. zwölf Kilobasen (kB) (Cool et al. 1987) und besteht aus 14 Exons, unterbrochen durch 13 Introns. Es ist auf dem langen Arm von Chromosom 5, genauer 5q 33-qter, lokalisiert (Citarella et al. 1988, Royle et al. 1988). Die cDNA ist 2044 Basen lang und besteht aus 49 Basen der 5'-nichttranslatierten Sequenz, 1845 Basen der aminosäurecodierenden Sequenz und 150 Basen der 3'-nichtkodierenden Sequenz. Die Transkription beginnt 49 Basen vor dem Translationsinitiationscodon ATG, wie durch S1 Nuclease-Mapping und Primer Extensionsmethoden bestimmt werden konnte (Cool et MacGillivray 1987). Auch im Faktor XII-Gen stellte man, wie schon im Faktor XII-Protein, eine hohe Homologie zu Fibronektin und t-PA fest.

Die Aufklärung der Intron-/Exonstruktur des Faktor XII zeigte eine engere Verwandtschaft des Faktor XII mit der Familie der Plasminogenaktivatoren als mit der Familie der Gerinnungsfaktoren.

### **1.5.4. Vorkommen und Bestimmung von Faktor XII**

Faktor XII findet sich im Plasma und in der interstitiellen Körperflüssigkeit. Der Hauptsyntheseort ist die Leber. Bei Patienten mit Leberzirrhose findet man reduzierte Plasmaspiegel. Die Ausscheidung erfolgt über Nieren und Haut. Die Halbwertszeit von FXII beträgt 50-70 Stunden. Die Bestimmung der Faktor XII-Aktivität und Konzentration erfolgt mittels Gerinnungstest unter Verwendung von FXII- Mangelplasma.

### **1.5.5. Mutationen im Faktor XII-Gen**

Es wurden verschiedene Mutationen im Faktor XII festgestellt, die zu einer Abnahme der Faktor XII Konzentration im Plasma führen. Bei den Mutationen handelt es sich in den meisten Fällen um Punktmutationen. Im Kapitel 2 wird die Faktor XII C46T Mutation beschrieben.

## 1.6. Fragestellung dieser Arbeit

Bislang sind für Thrombosen einige Risikofaktoren bekannt. So werden, wie bereits oben erläutert, die Prothrombinmutation G20210A, die Faktor V G1691A Mutation, der Protein C/S- bzw. Antithrombinmangel, erhöhte Lp(a)-Werte für ein erhöhtes Thromboserisiko verantwortlich gemacht.

Die genaue Rolle des Faktor XII in der Regulation der Blutgerinnung und in der Fibrinolyse wird immer noch kontrovers diskutiert.

Im Rahmen dieser Studie wird untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen venösen thrombotischen Ereignissen im Kindesalter und dem Faktor XII C46T Polymorphismus bzw. einem Faktor XII Mangel vorliegt. Dazu werden Kinder mit einer venösen Thrombose mit gesunden Kindern im Verhältnis 1:2 verglichen.

Es ergeben sich für diese experimentelle Arbeit folgende Fragestellungen:

- Besteht ein Zusammenhang zwischen Faktor XII C46T Genotyp und Faktor XII Aktivität im Kindesalter?
- Besteht eine altersabhängige Faktor XII-Aktivität?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen erniedrigten Faktor XII-Plasmaspiegeln und venösen Thrombosen im Kindesalter?
- Besteht eine Interaktion des Faktor XII C46T Polymorphismus und anderen etablierten Risikofaktoren für venöse Thrombosen im Kindesalter?

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

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

Die vorliegende Fall-Kontroll-Studie wurde in Übereinstimmung mit den ethischen Richtlinien, die in der gültigen Version 1964 in der Deklaration von Helsinki niedergelegt worden sind, durchgeführt und wurde von der medizinischen Ethikkommission der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster genehmigt.

#### **2.1.1. Patienten**

Es wurden in dieser retrospektiven Fall-Kontrollstudie im Zeitraum von 2000 bis 2004 64 Kinder und Jugendliche Patienten mit einem Lebensalter von 0,1 bis 18 Jahren bei Diagnosestellung einer venösen Thrombose in die Studie eingeschlossen. Das mediane Alter bei Diagnosestellung betrug zehn Jahre. 25 (39,1%) Patienten waren weiblich, 39 (60,9%) männlich.

Patienten mit gleichzeitigem Vorliegen anderer chronischer Erkrankungen, Leberversagen, Sepsis, Tumorerkrankungen, Anwender oraler Kontrazeptiva und Raucher wurden ausgeschlossen.

Die Diagnose einer venösen Thrombose wurde (von unabhängigen Radiologen) anhand von Standardmethoden, wie z. B.: Duplexsonographie, Phlebographie, Computertomographie oder Magnetresonanztomographie gesichert.

#### **2.1.2. Die Kontrollgruppe**

Die Kontrollgruppe bestand aus 126 alters- und geschlechtsgepaarten Kindern. Die Zuordnung erfolgte unter Beachtung der ethnischen Herkunft. Das mediane Alter betrug 8,539 Jahre, 51 (40,47%) Individuen waren weiblich, 75 (59,52%) Individuen waren männlich. Keines der Kinder hatte jemals ein thromboembolisches Ereignis.

Die Kontrollwerte wurden im Rahmen einer präoperativen Blutentnahme vor einem chirurgischen Eingriff wie Leistenhernienoperation, Zirkumzision oder Orchidopexie, zum Teil auch von potentiellen Knochenmarkspendern gewonnen.

### 2.1.3. Matching

Es wurden jedem Patienten zwei gesunde Kontrollen zugeordnet nach folgenden Kriterien (Matching 1:2):

- Ähnliches Alter, nach Möglichkeit bei Kindern unter 1 Jahr Alter 0 +/- 3 Monate, Kinder über 1 Jahr Alter +/- 1 Jahr
- Gleiches Geschlecht
- Gleiche ethnische Herkunft

### 2.1.4. Altersgruppen

Patienten und Kontrollen wurden nach vier Altersgruppen sortiert, die Altersgruppen wurden folgendermaßen unterteilt:

Altersgruppe	Alter
Altersgruppe 1	0,1 bis einschließlich 1,0 Jahr
Altersgruppe 2	1,1 Jahr bis einschließlich 5,0 Jahre
Altersgruppe 3	5,1 Jahre bis einschließlich 9,0 Jahre
Altersgruppe 4	9,1 Jahre bis einschließlich 18,0 Jahre

Tab. 1: Altersgruppen Faktor XII

Altersgruppe	Anzahl der Kontrollen
0,1-12 Monate	24
1,1-5,0 Jahre	20
5,1-9,0 Jahre	19
9,1-18,0 Jahre	63

Tab. 2: Kontrollen Gesamtanzahl n=126

Altersgruppe	Anzahl der Kinder mit venösen Thrombosen
0,1- 12 Monate	13
1,1- 5,0 Jahre	9
5,1- 9,0 Jahre	8
9,1- 18,0 Jahre	34

Tab. 3: Venöse Gruppe Gesamtanzahl n=64

### 2.1.5. Schwankungsbreite der Faktor XII-Aktivität

Es wurden für die jeweiligen Altersgruppen 1 bis 4 jeweils die 10. Perzentile festgelegt.

Anhand der Faktor XII-Aktivitäten des Kontrollkollektivs wurden die jeweiligen 10. Perzentile der unterschiedlichen Altersgruppen als Cut offs festgelegt.

Altersgruppe	Faktor XII-Aktivität in IU/ml <10. Perzentile
0,1- 12 Monate	<42
1,1- 5 Jahre	<67
5,1- 9 Jahre	<57
9,1- 18,0 Jahre	<64

Tab. 4: Faktor XII-Aktivität in IU/ml unterhalb der 10. Perzentile der jeweiligen Altersgruppe

## 2.2. Labordiagnostische Untersuchungen

### 2.2.1. Blutentnahme

Die Blutentnahmen fanden nach elterlichem Einverständnis und ausführlicher Information der Eltern über die Ziele der Studie statt. Die Blutproben konnten im Allgemeinen bei routinediagnostischen Untersuchungen gewonnen werden, so dass keine zusätzlichen Punktionen erforderlich waren.

Die Blutproben wurden 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 Sarsted® Monovetten (Sarsted, Nümbrecht, Deutschland) à 3 und 5 ml mit Citrat 3,8% und Blut im Verhältnis 1:10 asserviert. 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 Röhrchen (NUNC Life Technologies GmbH, Karlsruhe) pipettiert und bei -80 °C (193,15 K) eingefroren. Peripher venöse Blutentnahmen erfolgten morgens zwischen 8 und 10 Uhr.

### **2.2.2. Faktor XII-Aktivität-Bestimmung**

Die Bestimmung der Faktor XII-Aktivitäten erfolgte mittels der aPTT-basierten Methode mit Faktor XII-Mangelplasma von Dade Behring am BCS (Dade Actin-FS, Dade Behring, Marburg, Germany). Sie erfolgte mindestens acht Wochen nach dem akuten thromboembolischen Ereignis im Rahmen eines Thrombophiliescreenings (Faktor V G1691A, Faktor II G20210A, Antithrombin, Protein C, Protein S, Plasminogen, Lipoprotein(a), Antikardiolipin-Antikörper).

## **2.3. Genetische Analysen**

### **2.3.1. Blutentnahme für genetische Analysen**

Für die genetischen Untersuchungen wurde venöses Blut in EDTA-Röhrchen (Ethylendiamintetraessigsäure) der Firma Sarsted<sup>®</sup> 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.

### **2.3.2. DNA-Isolation mit QIAmp-Säulen aus peripheren Blutleukozyten**

Für die genetischen Untersuchungen der Faktor XII C46T Mutation wurden zunächst die DNA des Probenmaterials mit Hilfe eines kommerziellen Standardverfahrens (QIAmp Blood Mini Kit<sup>®</sup>, QIAGEN GmbH Hilden, Deutschland) extrahiert. Bis zur labor diagnostischen Untersuchung wurden aliquotierte Plasmaproben bei -70°C, DNS bei -20°C gelagert.

Die Isolierung der Nukleinsäuren erfolgt nach dem folgenden Prinzip:

Die im Probenmaterial enthaltenen Zellen werden enzymatisch mit Detergenzien aufgeschlossen. Dazu wird 100 µl Protease in einem Sarsted<sup>®</sup>-Röhrchen vorgelegt. Nach Zugabe von 1000 µl Vollblut aus dem EDTA-Röhrchen und 1000 µl AL-Puffer werden die Sarsted Röhrchen gevortext, bis die Lyse erreicht ist (ca. 15 Sek.). Die Proben werden in einem auf 56°C erwärmtes Wasserbad 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1000 µl 96%igem Ethanol.

Um die in der Suspension enthaltenen Zelltrümmer, Proteine und andere nicht gewünschte Bestandteile zu entfernen, wird die DNA selektiv an eine Anionenaustauschermembran an Silikaoberflächen gebunden. Dazu wird 620 µl Lysat auf eine Säule mit integrierter Anionenaustauschermembran gegeben und zwei Minuten lang bei 10.000 rpm zentrifugiert.

Nach Überführung der Säule auf ein neues Collection-Tube wird dieser Schritt so lange wiederholt bis das Lysat aufgebraucht ist, höchstens jedoch fünfmal.

Durch mehrfache Waschschrte wird ungebundenes Material entfernt. Dazu wird die Säule auf ein neues Tube gestellt und nach Zugabe von 500 µl AW1 Puffer für zwei Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wird ein zweites Mal wiederholt, dann ein drittes Mal mit AW2-Puffer für fünf Minuten bei 13.000 rpm.

Die anschließende Elution der DNA erfolgt durch Zugabe von 200 µl AE-Puffer, Inkubation bei Raumtemperatur für fünf Minuten und Zentrifugation für zwei Minuten bei 10.000 rpm. Dieser Prozess wird mit 100 µl AE Puffer wiederholt. Die gewonnene gereinigte DNA wird aliquotiert und kann entweder direkt für eine PCR verwendet oder bei -80°C gelagert werden.

Bei der allelspezifischen PCR wurden zwei getrennte Amplifikationen durchgeführt, jeweils eine Reaktion mit Einsatz eines Primers, der nur für eines der beiden nachzuweisenden Allele spezifisch war.

### **2.3.3. 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 getrennt, Vorwärts- und Rückwärtsprimer können sich als Amplimer 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 werden 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.

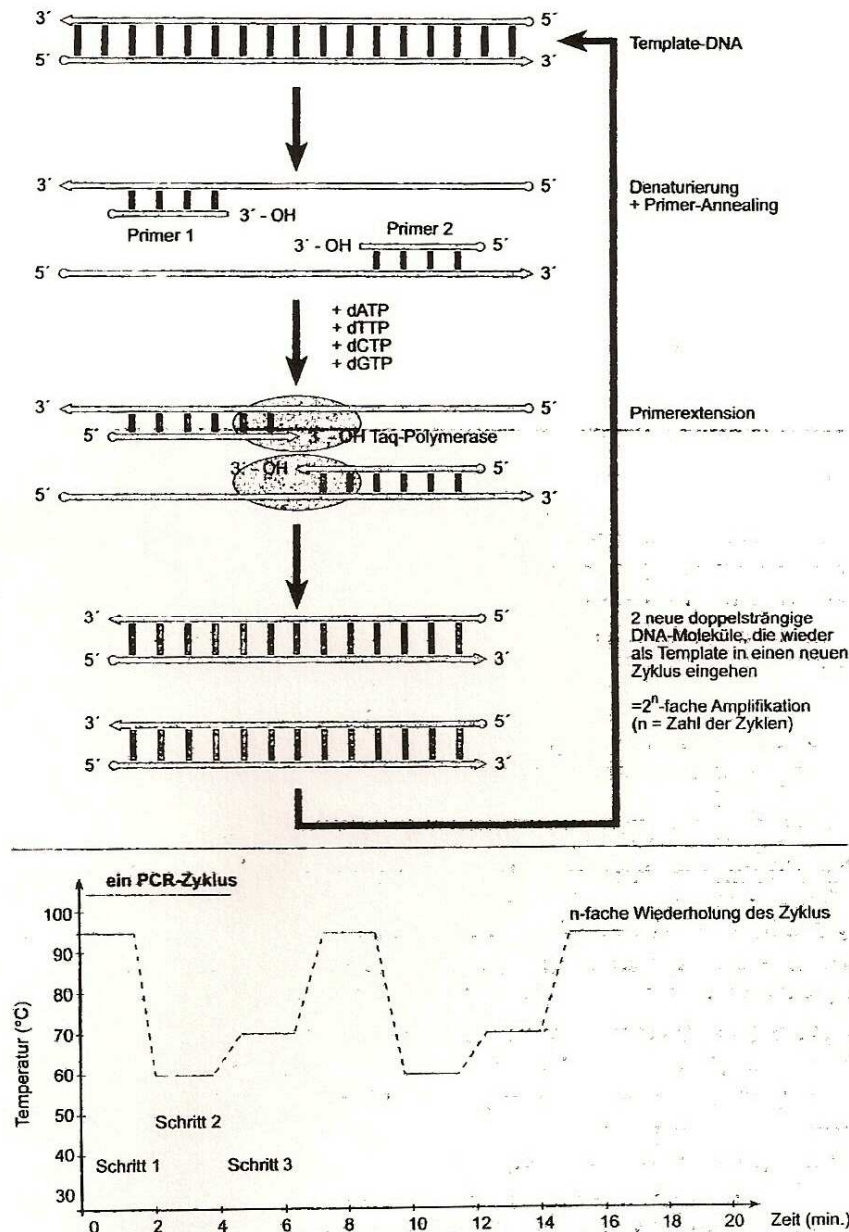


Abb. 6: Die Polymerase-Kettenreaktion (MTA-Dialog 2000, S. 120)



Im Folgenden werden die Schritte einer PCR beschrieben:

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

Das Reaktionsgemisch (dsDNA, Primer, Puffer, dNTPs und hitzestabile DNA-Polymerase) wird auf 95°C erhitzt.

### **Schritt 2: Primer-Annealing**

Die Reaktion wird auf die optimale Primerbindungstemperatur heruntergekühlt.

### **Schritt 3: Extension**

Die Temperatur wird auf das Optimum für den enzymatischen Einbau der dNTPs durch die DNA-Polymerase eingestellt. Alle Schritte werden, je nach Anwendung, 20-40 Mal wiederholt. 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.

	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Zeit</b>
<b>Denaturierung</b>	94	5 Min.
	94	30 Sec.
<b>Hybridisierung</b>	50-60	30 Sec.
<b>Elongation</b>	72	30 Sec.
<b>Finale Synthese</b>	72	5 Min.
<b>Stopp</b>	4	∞

Tab. 5: Standard-PCR-Programm

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

#### **2.3.4. PCR zur Genotypisierung der FXII C46T Variante**

1998 identifizierten Kanaji et al. einen Nukleotidpolymorphismus, die Substitution von 46 Cytosin zu Thymin im Exon 1 des Faktor XII-Gens. Dieser Nukleotidpolymorphismus ist in der 5' nichttranslatierten Region, 4 Basen stromaufwärts vom Translationsinitiierungscodon ATG lokalisiert.

Zur schnellen Erkennung der Mutation diente die von Endler et al. 2000 entwickelte und modifizierte allelspezifische mutationsseperierende Polymerase-Kettenreaktion (MS PCR), welche die Mutationserkennung erlaubt ohne Restriktionsenzyme zu gebrauchen.

MS-PCR ist eine „Ein-Röhrchen PCR-basierte Methode“, die auf allelspezifischen Primern beruht, die sich in der Länge der Basenpaare um 8-10 unterscheiden.

Basenfehlpaarungen an bestimmten Positionen der allelspezifischen Primer (unterstrichen in der unten stehenden Abbildung) wurden bewusst eingefügt, um Kreuzreaktionen der durch zwei unterschiedliche Allele entstandenen PCR-Produkte während der PCR- Vervielfältigung zu minimieren. Ein zusätzlicher Verdau nach der Amplifikation mittels Restriktionsenzyme ist nicht mehr erforderlich, denn die beiden Allele können anhand ihrer Länge unterschieden werden. In jeder Probe werden je nach Genotyp ein oder zwei verschiedene Produkte erzeugt. Die PCR Amplifikation wurde in Mengen von 50 µl durchgeführt.

Auf 35,7 µl destilliertes Wasser kommen 5 µl Puffer, welcher 1,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub> enthält. Die MG<sup>2+</sup>-Ionen wirken als Katalysator, da sie von der Taq-Polymerase für den Einbau der dNTPs benötigt werden. Hinzu kommen 5 µl Desoxyribonukleosid-triphosphate (dNTPs von Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Des Weiteren werden jeweils 1 µl eines jeden Primers benötigt: FXII 46C-forward primer, FXII 46T-forward primer sowie FXII-reverse primer (alle Tib Molbiol, Berlin, Deutschland). Hinzu kommen 1,25 U (=0,25 µl) Beckmann Taq und ca. 50 ng DNA.

Es wurden folgende **Primer** verwendet:

- FXII 46C-forward primer (Vorwärts-Primer): 8 pmol, 23 bp  
5´ -GGC AGC TGG ACC AAC GGA CCG AC-3´  
(Verdünnung zu 8 pmol/µl: 1:43 >> 10plus 420)
- FXII 46T-forward primer (Vorwärts-Primer): 12 pmol, 32 bp  
5´-TCC TGG ATA AAC AGC TGG ACC AAC GGA CGA AT-3´  
Verdünnung zu 12 pmol/µl : 1:25,5 >> 10 plus 245
- FXII-reverse primer (Rückwärts Primer): 10 pmol, 24 bp  
5´-GAA CAA TCC TGG GAC AAT CCT GGT-3´  
Verdünnung zu 10 pmol/ µl:1:34,2 >> 10 plus 332

	<b>1x</b>	<b>30x</b>
<b>Aqua dest.</b>	35,75 µl	1072,5
<b>Puffer</b>	5µl	150
<b>dNTPs (200 µmol/l)</b>	5µl	150
<b>F XII 46 CF</b>	1µl	30
<b>F XII 46 TF</b>	1µl	30
<b>F XII R</b>	1µl	30
<b>Beckmann Taq</b>	0,25µl	7,5
<b>Gesamt</b>	<b>49µl</b>	
<b>DNA (50 ng)</b>	1µl	

Tab. 6: Reaktionsansätze für die FXII MS PCR34

Es wurde jedes Mal ein Ansatz für 30 Proben vorbereitet. In jedem Experiment wurde als Positivkontrolle 1 µl DNA eines Individuums mit gesicherter Faktor XII-Mutation (TT), 1 µl mit heterozygoter Faktor XII-Mutation (CT) und eine Wildtypkontrolle (CC) hinzugefügt. Eine Kontrolle mit 1 µl destilliertes Wasser statt DNA diente als Negativkontrolle.

Die Amplifikationen wurden durchgeführt in dem eppendorf Mastercycler® gradient. Einer dreiminütigen Denaturierungsperiode bei 95°C folgten 34 thermozyklische Reaktionen bei 95°C über eine Minute, 52°C über zwei Minuten 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.

Programm: **MS FXII 34**

95°C	3 min	
95°C	1 min	} 34x
52°C	2 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°	hold	

Für das Faktor XII 46 C Allel entstand ein Produkt mit einer Länge von 122 bp, für das FXII 46 T Allel entstand ein Produkt mit einer Länge von 131 bp. Diese werden auf einem Polysaccharid Gel aufgetrennt, welches über 80 Minuten bei 170 V läuft aufgetrennt.

### **2.3.5. Gelelektrophorese**

Nukleinsäuren können mit der Agarose- bzw. Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden, da sie aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist sowohl von der DNA-Fragmentgröße der Agarose- bzw. Polyacrylamidkonzentration des Gels als auch von der angelegten Spannung abhängig. Die DNA-Fragmente werden mit Ethidiumbromid- oder Sibernitratfärbung sichtbar gemacht.

Ethidiumbromid ist ein planares Kation. Im elektrischen Feld wandert es den DNA-Fragmenten entgegengesetzt und lagert sich zwischen den gestapelten Basen der DNA ein. Durch UV-Licht (302 nm) angeregt, fluoresziert es mit einer Wellenlänge von 560 nm. Auf diese Art kann man die DNA-Fragmente lokalisieren, anhand der Größenstandards zuordnen und anschließend photographieren.

### **2.3.6. 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 Probenfächern (15 µl 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 Gelfächern verteilen. Außerdem ist diesem Puffer entweder Xylencyanol oder Bromphenolblau bzw. beide Farbstoffe gemeinsam zugesetzt. Diese Farbstoffe erleichtern das Beladen der Gelfächern, wandern ebenfalls zur Anode und ermöglichen eine visuelle Kontrolle der zurückgelegten Laufstrecke. Gleichzeitig mit den Proben wird ein Längenstandard (kb-Leiter) in eine Gelfachse pipettiert.

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

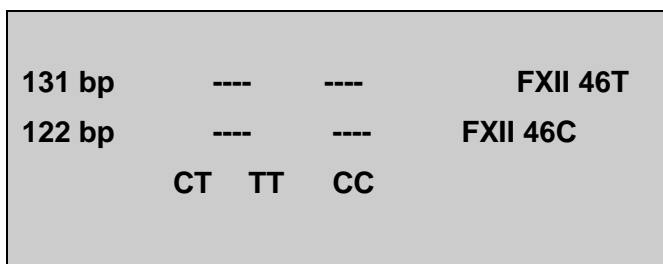


Abb. 7: Gel-Elektrophorese eines MS PCR Produktes. Die linken Linien zeigen ein Individuum, welches heterozygot für FXII C46T ist, die mittlere Linie zeigt die Bande für eine homozygoten Faktor XII TT und die rechte Bande zeigt den Faktor XII 46C Wildtyp. Auf der rechten Seite sind die Allelen Genotype markiert, links sind die Längen der PCR Produkte aufgezeigt (aus: Endler et al. 2001, S. 2).

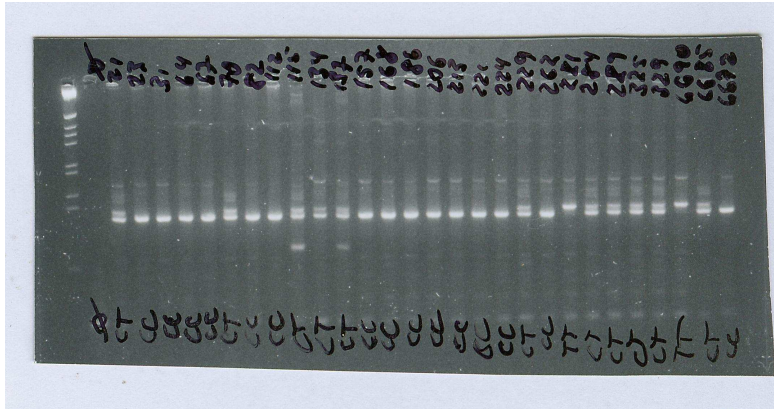


Abb. 8: unter dem UV-Transluminator sichtbar gemachtes Ergebnis der PCR.

Das PCR-Produkt wird in die Probetaschen pipettiert (oben im Bild). Nach Anlegen einer Spannung von 170 V für ca. 120 Minuten sind die DNA-Fragmente abhängig von ihrer Schwere unterschiedlich weit zur Anode gewandert: Das leichtere PCR-Produkt mit einer Länge von 122 Basenpaaren, welches dem Allel C entspricht, wandert schneller und ist als unterer weißer Querstrich zu erkennen; das schwerere PCR-Produkt mit einer Länge von 131 Basenpaaren, welches dem T Allel entspricht, wandert langsamer und ist als oberer weißer Querstrich zu erkennen. Liegt der homozygote Wildtyp CC vor, so ist nur ein dicker Querstrich unten (entspricht 2 x C) zu erkennen; liegt ein heterozygoter Mutationstyp CT vor, so ist ein Querstrich unten (entspricht C) und einer oben (entspricht T) zu erkennen; beim homozygoten Mutationstyp TT ist ein dicker Querstrich oben zu erkennen (entspricht 2 x T).

## 2.4. Geräte und Chemikalien

### 2.4.1. 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

### 2.4.2. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind an der jeweiligen Stelle unter Angabe des Namens der Produktionsfirma und ihres Sitzes beschrieben.

## 2.5. Statistische Methoden

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

### 2.5.1. Fall-Kontroll-Assoziationsstudien

In einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wird untersucht, ob eine bestimmte Gensequenzvariante bei Betroffenen häufiger vorkommt als bei Kontrollpersonen. Dazu wird die Genotypfrequenz in einer Gruppe Betroffener mit der in einer Gruppe Nichtbetroffener (Kontrollen) verglichen. Die Nullhypothese  $H_0$  besagt, dass der beobachtete Häufigkeitsunterschied der Genotypwahrscheinlichkeit zwischen den beiden Gruppen zufallsbedingt ist. Die Alternativhypothese  $H_1$  lautet, dass zwischen der Gruppenzugehörigkeit und der Genotypfrequenz eine statistische Abhängigkeit besteht.

### 2.5.2. Nullhypothese- Alternativhypothese

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

**$H_0$ :** Die Mutation nt C46T der Promotor Region des Faktor XII-Gens hat keinen Einfluss auf die Aktivität des Faktor XII 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.

**$H_1$ :** Die Mutation hat einen Einfluss auf die Aktivität des Faktor XII 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.

### 2.5.3. 4- Feldertafel

Die 4-Feldertafel bezeichnet Kreuztabellen absoluter Häufigkeiten bestimmter Merkmalsausprägungen, in dieser Studie betrifft dies das Vorhandensein des Merkmals  $TT=1$ , was bedeutet homozygote Mutation bei Nukleotid 46 der Promoterregion des Faktor XII, Faktor XII 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.

#### 2.5.4. 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 große n angewendet. Der **Fisher's exact test** wird für kleine n angewendet.

#### 2.5.5. 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.

#### 2.5.6. 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. Als Maß für den Zusammenhang 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)  
< 1 → Mutation wirkt schädigend (hier: Aktivität↓ bzw. Thromboserisiko↑)  
> 1 → Mutation wirkt schützend/präventiv (hier: Aktivität↑ bzw. Thromboserisiko↓)

Das Konfidenzintervall besagt, dass die errechnete OR mit 95%iger Wahrscheinlichkeit tatsächlich innerhalb der errechneten Grenzen liegt, z.B. 95% KI: OR= 1,5 [1,2-1,8].

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

### **2.5.7. Logistische Regression**

Die logistische Regression ist eine Methode um Probleme zu analysieren, die eine oder mehrere unabhängige Variablen beinhalten, die das Ergebnis bestimmen. Das Ergebnis wird dabei anhand einer dichotomen Variablen gemessen (die Variable kann nur 2 verschiedene Werte annehmen, hier gilt: 0=Merkmal nicht vorhanden, 1=Merkmal vorhanden).

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: Faktor XII C46T Polymorphismus bzw. Faktor XII-Aktivität unter der 10. Perzentile ja/nein) zu beschreiben, so genannter "goodness of fit"-Test R quadrat.

### **2.5.8. Cut-off-Klassifikation**

Faktor XII-Konzentrationen unterhalb der 10. Perzentile der jeweiligen Altersgruppe wurden als Cut-offs festgelegt.

### **2.5.9. Wilcoxon-Mann-WhitneyU-Test**

Evaluationen und Vergleiche zwischen Patienten und Kontrollen werden mit dem Mann-WhitneyU-Test (zwei Gruppen) oder falls erforderlich mit dem Kruskal-Wallis Test (> 2 Gruppen) durchgeführt.

### **2.5.10. Kruskal-Wallis-Test**

Mit dem Test nach Kruskal-Wallis werden die Mittelwerte der Faktor XII-Aktivitäten in den unterschiedlichen Altersgruppen (> 2 Untergruppen) verglichen.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Etablierte prothrombotische Defekte**

Bei 39 (60,9%) Patienten mit venösen Thrombosen kann mindestens ein einzelner etablierter prothrombotischer Risikofaktor ausgemacht werden. So finden sich bei zwölf Patienten eine Faktor V G1691A Mutation (18,8%). Eine Differenzierung zwischen einer homozygoten und heterozygoten Faktor V G1691A Mutation wurde nicht vorgenommen. Bei 23 Patienten (35,9%) liegt eine Lipoprotein(a) Erhöhung über 30 mg/dl. Die Prothrombinmutation haben drei Patienten (4,6%). Bei drei Patienten findet sich ein Antithrombinmangel (4,7%), ein Patient (1,6%) mit Protein C- und sechs Patienten mit Protein S-Mangel (9,4%). Bei acht (12,5%) Patienten können Kombinationen von verschiedenen Risikofaktoren (FV-, PT-Mutation, AT-, PC-, PS-Mangel, Lp(a)-Erhöhung) gefunden werden.

In der Kontrollgruppe der 126 Kinder ohne Thrombosen kann bei 23 Individuen (18,25%) mindestens ein einzelner prothrombotischer Risikofaktor, der mit venösen Thrombosen assoziiert ist, festgestellt werden. Bei den Kontrollen liegt folgende Verteilung der Risikofaktoren vor: zwölf (9,5%) mit Faktor V G1691A Mutation, zwei (1,6%) mit Prothrombin G20210A Mutation, jeweils einer mit Antithrombin- und Protein S-Mangel (0,8%), kein Kind mit Protein C-Mangel, zwölf Kinder mit Lipoprotein(a)-Erhöhung über 30 mg/dl (9,5%).

Die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten einer Thrombose bei Vorliegen eines etablierten Risikofaktors wurde in dieser Studie nicht einzeln berechnet. Dies wurde bereits in vorangegangenen Studien bei Kindern gezeigt. Für alle hier untersuchten prothrombotischen Risikofaktoren gilt, dass die OR bei den Patienten mit spontanen Thrombosen höher liegen, als bei den Kontrollen.

#### **3.2. Faktor XII-Aktivität**

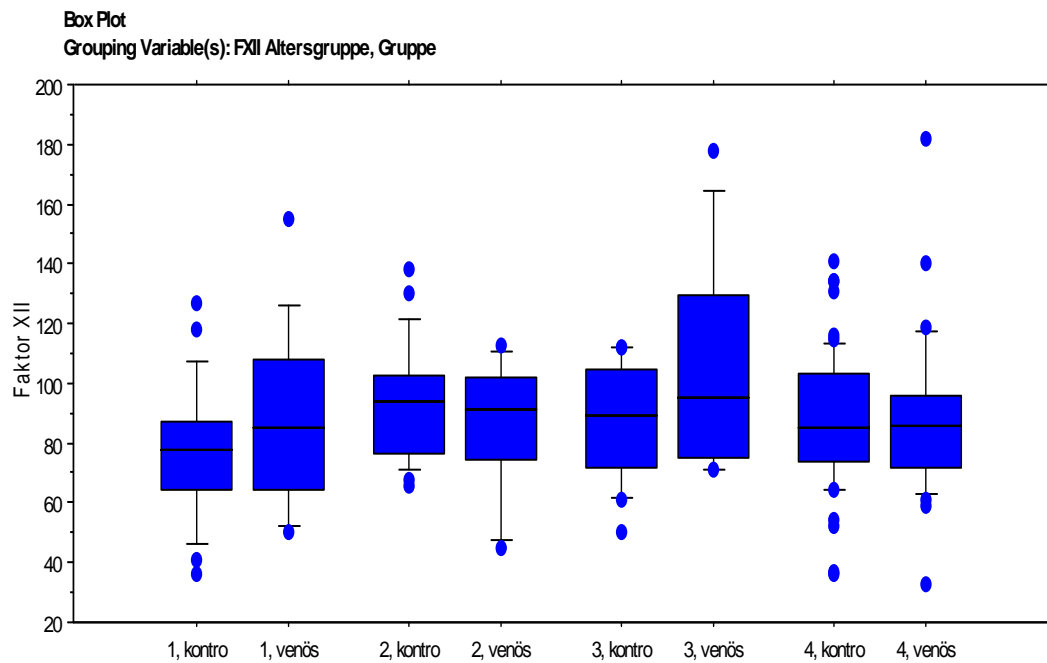
##### **3.2.1. Faktor XII-Aktivität in den jeweiligen Altersgruppen**

Nach Einteilung der Faktor XII-Aktivität in verschiedene Altersgruppen (1-4) zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei beiden Gruppen (Kruskal-Wallis-Test, p-value: 0,0923).

# Groups	4
# Ties	49
H	6,434
<b>P-Value</b>	<b>0,0923</b>
H corrected for ties	6,436
Tied P-Value	0,0922

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
<b>1</b>	37	2792,000	75,459
<b>2</b>	28	2957,000	105,607
<b>3</b>	27	2782,500	103,056
<b>4</b>	95	9046,500	95,226

Tab. 7: Kruskal-Wallis Rank Info for Faktor XII; Grouping Variable: FXII Altersgruppe



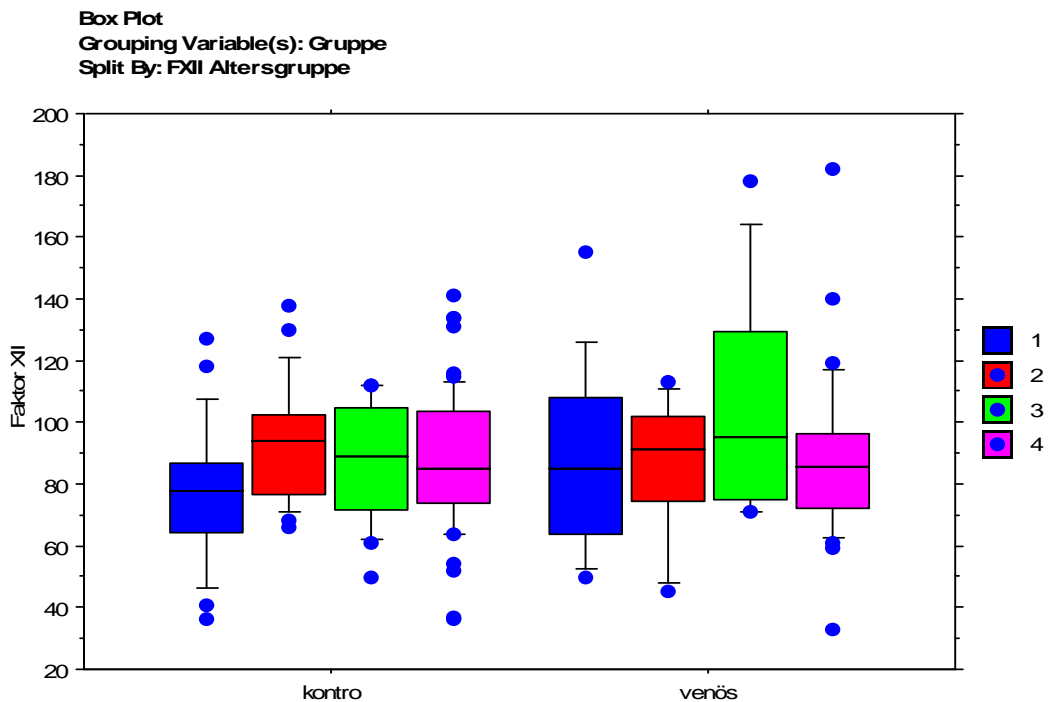


Abb. 9: Box-Plot

Verteilung der medianen Faktor XII-Aktivität sowie der Streubreite der jeweiligen Altersgruppen (1-4) bei der Kontrollgruppe (kontro) und der Patientengruppe (venös). Es besteht keine Altersabhängigkeit der Faktor XII-Aktivität.

Bei den 64 Kindern, die an einer venösen Thrombose erkrankt gewesen waren, war der Medianwert von Faktor XII etwas höher als bei den Kontrollkindern. Bei den erkrankten Kindern betrug die Faktor XII-Aktivität von 33 bis 182% bei einem Medianwert von 90,1%. In der Kontrollgruppe lagen die Werte zwischen 36 und 141% bei einem Medianwert von 86,4%.

Es besteht kein signifikanter Unterschied der Medianwerte der Kinder mit venösen Thrombosen im Vergleich zum Kontrollkollektiv (vgl. Abbildung Nr. 10).

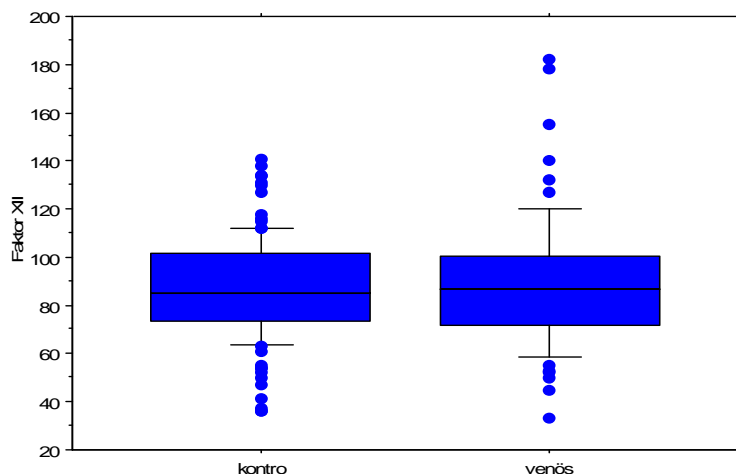


Abb. 10: Medianwerte und Streubreite der Faktor XII-Aktivität der Kontrollgruppe (kontrollo) und der Kinder mit venösen Thrombosen (venös).

### 3.3. Zusammenhang Faktor XII C46T Genotyp und Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile

In der Gesamtstudienpopulation haben 176 Individuen den Genotyp CC oder CT, insgesamt haben 170 Individuen keine erniedrigte Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile. 167 Individuen haben den Genotyp CC oder CT **und** haben eine Faktor XII-Aktivität oberhalb der 10. Perzentile. Neun Individuen von 176 haben den Genotyp CC oder CT **und** haben eine Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile.

Drei Individuen haben den Genotyp TT und eine Faktor XII-Aktivität oberhalb der 10. Perzentile. Sieben Individuen haben den Genotyp TT und gleichzeitig eine Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile.

Die Homozygotie für die Faktor XII TT Variante geht signifikant mit einer Abnahme der Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile einher, der Fisher`s exact p-Value beträgt <0,0001. Diese Daten bestätigen die bereits in der Literatur festgestellte Korrelation zwischen dem Faktor XII 46C/T Polymorphismus für den Faktor XII TT Genotyp und der erniedrigten Faktor XII-Aktivität im Plasma.

Es besteht eine statistisch signifikante Assoziation zwischen Genotyp und Werten der Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile.

	Faktor XII > 10. Perzentile 0	Faktor XII < 10. Perzentile 1	Gesamt
Faktor XII CC/CT	167	9	176
Faktor XII TT	3	7	10
<b>Gesamt</b>	<b>170</b>	<b>16</b>	<b>186</b>

Tab. 8: Häufigkeiten für Faktor XII TT=1, Faktor XII < 10. Perzentile, Fishers exact p-value beträgt <0,0001

### 3.4. Prävalenz des FXII C46T Polymorphismus

Die Genotypen und Allelfrequenzen bei Patienten und Kontrollen zeigt die folgende 4-Feldertafel:

Gruppe	TT		Gesamt
	0	1	
<b>Kontrollen</b>	120 95,2%	6 4,8%	126 100%
<b>Venöse Thrombosen</b>	57 93,4%	4 6,6%	61 100%
<b>Gesamt</b>	177	10	187

Tab. 9: Homozygotie für Faktor XII C46T Polymorphismus im Bezug auf die Gruppenzugehörigkeit (Kontrollen/Kinder mit venösen Thrombosen), der Fisher`s exact p-value beträgt: 0,7306

Bei den 61 Patienten mit einer venösen Thrombose haben vier Kinder eine Faktor XII TT Mutation (6,55%). Bei den 126 Kindern aus der Kontrollgruppe haben sechs Kinder eine Faktor XII TT Mutation (4,76%).

Die Prävalenz der T/T Homozygoten beträgt sechs (4,76%) bei den Kontrollen. Die Prävalenz der T/T Homozygoten beträgt vier (6,55%) bei den Patienten.

Der Fisher`s exact p-value beträgt 0,7306, bei einem angenommenem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  besteht demnach keine Signifikanz.

Der Faktor XII TT Genotyp ist im Fallkollektiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv nicht signifikant erhöht.

### 3.5. Häufigkeit des FXII C46T Polymorphismus im Bezug auf Individuen mit Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile

Zur weiteren Analyse wurden die Individuen mit Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile und die Häufigkeit von FXII C46T Polymorphismus betrachtet.

In der Kontrollgruppe haben zehn Individuen (8%) eine Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile. In der Patientengruppe haben sechs Individuen eine Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile (9,4%).

Die Erniedrigung der Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile ist im Patientenkollektiv nicht signifikant erhöht gegenüber dem Kontrollkollektiv. Das Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests beträgt 0,7856, demnach besteht keine Signifikanz.

Gruppe	Faktor XII < 10. Perzentile		Gesamt
	0	1	
<b>Kontrollen</b>	115	10	125
<b>Venöse Thrombosen</b>	58	6	64
<b>Gesamt</b>	<b>173</b>	<b>16</b>	<b>189</b>

Tab. 10: Häufigkeiten der Faktor XII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile bei Kontrollen und venösen Thrombosen



**Tabelle 11: Charakteristika der Patienten und Kontrollen**

<b>Charakteristika</b>	<b>Kinder mit venösen Thrombosen</b>	<b>Kontrollgruppe</b>
	<b>n=64</b>	<b>n=126</b>

**Geschlechter und Altersverteilung**

Alter bei Blutentnahme: Median in Jahren	10 (0,1-18)	9,5 (0,1-18)
Geschlecht männlich: Anzahl (%)	39 (60,9)	75 (59,5)

**Risikofaktoren**

FV G1691A: Anzahl (%)	12 (18,8)	12 (9,5)
Prothrombin G20210A: Anzahl (%)	3 (4,6)	2 (1,6)
Antithrombin-/Protein C-/Protein S-Mangel: Anzahl	3/1/6 3 AT-Mangel 1 Protein C-Mangel 6 Protein S-Mangel	1/0/1 1 AT-Mangel 1 Protein S-Mangel
LP(a) > 30 mg/dl: Anzahl (%)	23 (35,9)	12 (9,5)

Medianwertwert der Faktor XII-Aktivität	90,1	86,4
Faktor XII-Aktivität (min-max)	33-182	36-141
Faktor XII <10. Perzentile: Anzahl (%)	6 (9,4)	10 (7,9)
Faktor XII Genotyp CC: Anzahl (%)	29 (47,5)	60 (47,6)
Faktor XII Genotyp CT: Anzahl (%)	28 (45,9)	60 (47,6)
Faktor XII Genotyp TT: Anzahl (%)	4 (6,5)	6 (4,7)

### 3.6. Zusammenhang zwischen FXII-Mangel und anderen etablierten Defekten in Bezug auf ein thromboembolisches Ereignis

Um zu beurteilen, ob ein Faktor XII C46T Polymorphismus und etablierte prothrombotische Risikofaktoren unabhängig voneinander sind, wurde der Faktor XII C46T Polymorphismus, die Faktor V G1691A-Mutation, Protein C, Protein S, Antithrombin und Lipoprotein(a) > 30 mg/dl multivariat analysiert (logistisches Regressionsmodell).

<b>Etablierte prothrombotische Defekte</b>	<b>venöse Thrombosen Odds Ratio 95%CI (p-values)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• FV G1691A</li> <li>• FII G20210A</li> <li>• Lipoprotein(a) &gt; 30 mg/dl</li> <li>• AT-, PC-, PS-Mangel</li> </ul>	OR: 7 95% Konfidenzintervall (3,5-14) p<0,0001

Tab. 12: Etablierte prothrombotische Risikofaktoren bei Kindern bei Erstauftreten einer venösen Thrombose

Bei Vorliegen von einem oder mehreren der oben genannten etablierten Defekte besteht ein 7fach erhöhtes Risiko ein thrombotisches Ereignis zu erleiden (OR: 7, 95%, CI [3,5-14], p<0,0001).

Der Faktor XII TT Genotyp spielt im Zusammenhang mit etablierten prothrombotischen Risikofaktoren keine Rolle für die Ausbildung einer venösen Thrombose (OR: 1,5/95%, CI [0,4-6,7], p-value: 0,5260).

### 3.7. Faktor XII TT in Kombination mit etablierten prothrombotischen Risikofaktoren

Neben Faktor XII TT wiesen zwei Kinder mit einer venösen Thrombose gleichzeitig mindestens einen etablierten prothrombotischen Risikofaktor auf (von insgesamt vier Kindern mit dem Faktor XII TT Genotyp). Ein Kind aus der Gruppe mit venösen Thrombosen wies neben dem Faktor XII TT Genotyp gleichzeitig eine Faktor V G1691A Mutation auf, ein zweites Kind wies als etablierten prothrombotischen Risikofaktor gleichzeitig eine MTHFR-Mutation auf.

Die beiden anderen Kinder mit venöser Thrombose und dem Faktor XII TT Genotyp wiesen keinen etablierten prothrombotischen Risikofaktor auf.

Von den sechs Kindern mit dem Faktor XII TT Genotyp wies nur ein Kind gleichzeitig prothrombotische Risikofaktoren auf, wobei bei diesem Kind gleichzeitig mehrere etablierte Risikofaktoren, wie Lipoprotein(a) > 30mg/dl, MTHFR-Mutation sowie eine Faktor V G1691A Mutation nachgewiesen werden, ohne dass ein thromboembolisches Ereignis zum Zeitpunkt der Blutentnahme vorlag.

Bei den übrigen fünf Kindern mit dem Faktor XII TT Genotyp bestand kein etablierter prothrombotischer Risikofaktor.

### 3.8. Zusammenhang zwischen Faktor XII-Aktivität < 10. Perzentile und etablierten Defekten

<b>Count</b>	189
<b># Missing</b>	1
<b># Response Levels</b>	2
<b># Fit Parameters</b>	3
<b>Log Likelihood</b>	-103,874
<b>Intercept Log Likelihood</b>	-120,982
<b>R Squared</b>	0,141

Tab. 13: Logistic Summary Table for Gruppe

	Coef	Std. Error	Coef/SE	Chi-Square	P-Value	Exp(Coef)	95% Lower	95% Upper
<b>venös: constant</b>	-1,402	0,227	-6,176	38,144	<0,0001	0,246	0,158	0,384
<b>Faktor XII &lt; 10th: 1</b>	-0,063	0,604	-0,105	0,011	0,9163	0,939	0,288	3,064
<b>Defekte etabliert 2:1</b>	1,973	0,346	5,598	31,342	<0,0001	6,938	3,521	13,669

Tab. 14: Logistic Model Coefficients Table for Gruppe

<b>Count</b>	187
<b># Missing</b>	1
<b># Response Levels</b>	2
<b># Fit Parameters</b>	3
<b>Log Likelihood</b>	-100,143
<b>Intercept Log Likelihood</b>	-118,082
<b>R Squared</b>	0,152

Tab. 15: Logistic Summary Table for Gruppe

	Coef	Std. Error	Coef/SE	Chi-Square	P-Value	Exp(Coef)	95% Lower	95% Upper
<b>1: constant</b>	-1,578	0,244	-6,454	41,652	<0,0001	0,206	0,128	0,333
<b>Faktor XII &lt; 10th: 1</b>	0,564	0,593	0,951	0,905	0,3415	1,757	0,550	5,614
<b>Gruppe: venös</b>	1,973	0,349	5,651	31,934	<0,0001	7,194	3,626	14,263

Tab. 16: Logistic Model Coefficients Table for Defekte etabliert 2

Faktor XII-Mangel unterhalb der 10. Perzentile hat keine Auswirkung auf das Thromboserisiko.

## 4. Diskussion

Ein Hauptanliegen der Gen-Ära ist es, DNA-Polymorphismen zu identifizieren, die verantwortlich sind für komplexe Erkrankungen. Die Genloci zu identifizieren, welche verantwortlich sind für komplexe Phänotypen, soll uns helfen diese Erkrankungen zu verstehen und neue Ziele für klinische Interventionen zu schaffen. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl hereditärer hämostatischer Anomalien entdeckt, die zu einem erhöhten Risiko venöser Thrombosen führen.

Es wurde in Studien gezeigt, dass Faktor V-G1691A Mutation, die Prothrombin G20210A Mutation, der Antithrombinmangel, der Protein C/S-Mangel und erhöhte Lipoprotein(a)-Werte ein Risiko für venöse Thrombosen auch während des Kindes- und Jugendalters sind, insbesondere bei der Kombination mehrerer Risikofaktoren.

In dieser hier vorliegenden Fall-Kontroll-Studie wird der Zusammenhang zwischen dem C46T Polymorphismus im Faktor XII Gen und das Risiko für venöse Thrombosen bei Kindern und Jugendlichen untersucht. Bisher haben sich die Studien über den Faktor XII C46T Polymorphismus auf Erwachsene konzentriert. Klinische Studien zu Faktor XII C46T Polymorphismus im Kindesalter liegen bislang nicht vor. Die im Folgenden diskutierten Ergebnisse anderer Studien beziehen sich daher nur auf Erwachsene.

### 4.1. Prävalenzen des Faktor XII C46T Polymorphismus

Die Häufigkeit des Faktor XII C46T Polymorphismus bei den Patienten liegt in der hier vorliegenden Studie für den Genotyp TT bei 6,5%. Im Vergleich dazu sind 4,7% der gesunden Kontrollen Träger des Faktor XII TT Genotyps. Der Fisher`s exact p-value beträgt 0,7306, demnach besteht keine Signifikanz.

Die Häufigkeit der heterozygoten Träger des Faktor XII C46T Polymorphismus betragen hier im Patientenkollektiv 28 (45,9%). 29 (47,6%) tragen den Faktor XII CC Genotyp. Im Vergleich dazu tragen 60 (47,6%) der Gesunden den Faktor XII CT Genotyp und 60 (47,6%) den Faktor XII CC Genotyp. Damit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Faktor XII C46T Polymorphismus bei gesunden Kindern und Kindern mit venösen Thrombosen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass kein Zusammenhang zwischen dem Faktor XII C46T Polymorphismus und dem Auftreten von Thrombosen im Kindesalter besteht.

In der Literaturübersicht zeigt sich, dass in der Regel in der Normalpopulation die Häufigkeiten des Faktor XII CC und CT Genotyps von der hier vorliegenden Verteilung abweichen. Der Wildtyp tritt in einer gesunden Normalpopulation deutlich häufiger auf als der CT Genotyp. Warum die Prävalenz des CC und CT Allels in der hier vorliegenden Studie in beiden Gruppen fast gleich ist, ist unklar. Dies könnte mit der relativ kleinen Fallzahl in Kontroll- und Patientengruppe zusammenhängen.

Endler et al. fanden 2000 bei 100 gesunden Neugeborenen einer mitteleuropäischen Bevölkerung 64% homozygote Träger des Wildtyps FXII 46C Allel. 29% waren heterozygot für FXII C46T und 7% waren homozygot für FXII 46T. Das Verhältnis der homozygoten Faktor XII 46T-Mutation zu CC/CT entspricht in etwa der Verteilung im Kontrollkollektiv der hier vorliegenden Studie. Die Prävalenz der Träger des homozygoten T Allels entsprechen hier in beiden Gruppen den Untersuchungen von Endler et al.

Die Häufigkeit des Mutationstyps entspricht vorangegangenen Studien. In einer Untersuchung von Kohler et al. 1997 waren 7% aller untersuchten Subjekte (Patienten und Kontrollen, n=451) homozygot für das T Allel.

Die Prävalenz des Faktor XII TT Genotyp liegt in der Studie von Tirado et al. bei 6,0% (95% CI: 3,4-9,7%) der untersuchten Patienten und bei 2,0% (95% CI: 0,7-4,6%) der Kontrollen (Tirado et al. 2004).

Die relative Häufigkeit dieses Gerinnungsdefektes in der Normalbevölkerung wird zwischen 1,5% und 3,0% angegeben (Halbmayer et al. 1994)

#### **4.2. Zusammenhang zwischen Faktor XII C46T Polymorphismus und Faktor XII-Aktivität**

In dieser Studie wurde in der Gesamtpopulation gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen dem Faktor XII TT Genotyp und erniedrigter FXII-Aktivität unterhalb der 10. Perzentile besteht. Der Fisher's exact p-value beträgt  $p < 0,001$ . Damit werden die Ergebnisse früherer Studien bei Erwachsenen bestätigt. Es ist bereits bekannt, dass der homozygote Faktor XII C46T Polymorphismus mit erniedrigter Faktor XII-Aktivität einhergeht. Hervorzuheben ist, dass die Ergebnisse dieser Studie diesen Zusammenhang auch bei Kindern weiter untermauern konnten.

Eine kontinuierliche Abnahme der Faktor XII-Aktivität von CC über CT nach TT wurde erstmals durch Kanaji et al. 1998 bei Orientalen beschrieben. Kanaji et al. haben signifikante Unterschiede der Faktor XII-Aktivitäten bei gesunden Personen bei den drei verschiedenen Alleltypen festgestellt. Folgende Plasma-Konzentrationen wurden festgestellt: CC 170 (+/- 38%), CT 141 (+/- 29%), TT 82 (+/-19%). Patienten mit dem TT Genotyp hatten die niedrigsten Faktor XII-Konzentrationen. Es wurde in dieser in vitro Transkriptions-/Translationsstudie gezeigt, dass die verringerte Faktor XII-Aktivität durch eine verringerte Translationsrate beim Faktor XII 46T-Allel zustande kommt und nicht durch eine Veränderung der Transkriptionsrate. Die Menge des translatierten Produktes von Faktor XII 46C ist dreimal höher als die von Faktor XII 46T. Die Arbeitsgruppe vermutete ein weiteres Initiations-ATG-Codon, welches ursächlich ist für die Verringerung der Faktor XII-Konzentration. Die Initialstudie von Kanaji et al. war familienbezogen, es wurde gezeigt, dass dieser Polymorphismus die Genexpression beeinflusst. Damit wäre dieser Polymorphismus der erste Fall, bei dem durch die Nachbarschaft zu einem Initiations-ATG-Codon die Translationseffizienz reduziert und die Plasmakonzentration des Translationsproduktes reguliert werden.

Auch in der Studie von Endler et al. 2000 wurde eine strenge Assoziation des FXII 46 T Allels mit reduzierter Faktor XII-Plasmaaktivität bei der Population Österreichs, welche Mitteleuropa repräsentiert, festgestellt. Individuen mit homozygotem FXII 46C Genotyp zeigten eine durchschnittliche Konzentration von 1,17 U/ml (+/-0,31 U/ml), Individuen mit heterozygotem FXII C46T Genotyp zeigten eine durchschnittliche Konzentration von 0,70 U/ml (+/-0,31 U/ml), Individuen mit homozygotem FXII 46T Genotyp zeigten eine Konzentration von 0,44 U/ml (+/-0,10 U/ml).

Weiterhin fanden Kohler et al. 1999 übereinstimmende Resultate bei der britischen Bevölkerung.

Auch in anderen vorangegangenen Untersuchungen wurde ein klarer und strenger Zusammenhang zwischen dem Faktor XII C46T Polymorphismus und Faktor XII-Konzentrationen belegt (Soria et al. 2002, Zito et al. 2000, Ishii 2000, Tirado et al. 2004).

Gordon et al. haben 1981 festgestellt, dass Faktor XII-Konzentrationen bei Orientalen deutlich niedriger sind als bei Kaukasiern. Die Arbeitsgruppe von Kanaji

hat gezeigt, dass die Prävalenz des T Allels bei Orientalen 73% beträgt. Im Vergleich hierzu beträgt sie nur 20% bei Kaukasiern. Dies ist eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Faktor XII-Konzentrationen bei diesen beiden ethnischen Gruppen.

### **4.3. Die Bedeutung des Faktor XII-Mangels**

Die Bedeutung des Faktor XII-Mangels, insbesondere als thrombophile Gerinnungsstörung, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die mögliche Beziehung zwischen Faktor XII-Mangel und einer venösen Thrombose wurde, wie bereits oben genannt, erstmals durch die Publikation von Ratnoff et al. 1955 beschrieben.

Der erstbeschriebene Faktor XII-Mangelpatient Mr. Hageman verstarb an einer Pulmonalembolie (Ratnoff et al. 1955). Der Faktor XII-Mangel schützte ihn nicht davor eine Thrombose zu erleiden (Ratnoff et al. 1968). Patienten mit Faktor XII-Mangel wurden hauptsächlich dadurch identifiziert, dass eine verlängerte Thromboplastinzeit vor einer geplanten Operation vorlag (verlängerte aPTT). Es ist hervorzuheben, dass Faktor XII-Mangelpatienten keine erhöhte Blutungsneigung haben bzw. dass Faktor XII-Mangel nicht mit spontanen Blutungen oder verletzungsbedingt verstärkten Blutungen assoziiert ist. Daraus wurde geschlossen, dass Faktor XII nicht für die eigentliche Hämostase erforderlich ist.

Die Beobachtung, dass Faktor XII an der Aktivierung des fibrinolytischen Systems beteiligt ist, führte zu der Hypothese, dass partieller oder schwerer Faktor XII-Mangel zu einer Thromboseneigung führt (Levi et al. 1992).

Einzelne Fallbeschreibungen wie Barcat et al. 2001, Castaman 1996 und Foncea et al. 2001 wiesen auf einen Zusammenhang zwischen systemisch thromboembolischen Ereignissen und einem Faktor XII-Mangel hin.

Auch aufgrund von Beobachtungen der Arbeitsgruppen von Goodnough und Halbmayr wurde eine Beteiligung des FXII bei der Thrombophilie in Betracht gezogen. So fanden Goodnough et al. 1983 bei einer Untersuchung von 121 FXII-Mangelpatienten eine 8%ige Häufigkeit thrombotischer Komplikationen bei diesen Patienten.



In einer Folgeuntersuchung stellten Halbmayr et al. 1992 eine erstaunlich hohe Prävalenz von verminderten FXII-Konzentrationen bei Patienten mit arteriellen Thrombosen und/oder Myokardinfarkt fest. So konnten Halbmayr et al. bei 15 von 103 Patienten mit rezidivierenden arteriellen und venösen Thrombosen einen Faktor XII-Mangel nachweisen.

Dahingegen konnten größere Studien einen solchen Zusammenhang nicht eindeutig statistisch belegen (Koster et al. 1994, Zerleeder et al. 1999). In der Leiden Thrombophilia Studie von Koster et al. 1994 wurden Faktor XII-Konzentrationen bei Patienten mit venösen Thrombosen im Vergleich zu gesunden Kontrollen untersucht. Hier wurde gezeigt, dass die Häufigkeit erniedrigter FXII-Konzentrationen bei Patienten mit venösen Thrombosen genauso häufig wie bei gesunden Kontrollen vorkommt. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangen Zerleeder et al. Sie veröffentlichten 1999 eine Untersuchung an 65 Patienten aus 12 Familien mit bekanntem Faktor XII-Mangel. Die Studie zeigte, dass diese Patienten nicht häufiger an systemischen thromboembolischen Ereignissen litten, als dies bei den Familienangehörigen ohne Faktor XII-Mangel der Fall war. Andere Studien fanden ebenfalls keine Assoziation zwischen einem teilweise oder schwerem Faktor XII-Mangel und dem Auftreten venöser Thrombosen bei Familien mit hereditärem Faktor XII-Mangel (Lämmle et al. 1991, Rodeghiero et al. 1992).

Auch in der hier vorgelegten Studie sind die durchschnittlichen Faktor XII-Konzentrationen in der Gruppe der Kinder mit venösen Thrombosen im Vergleich zum Kontrollkollektiv nicht signifikant unterschiedlich. Die durchschnittliche Faktor XII-Konzentration in der Patientengruppe beträgt 90,1, wohingegen sie in der Kontrollgruppe 86,4 beträgt.

Diese Ergebnisse decken sich mit einer Untersuchung von Nowak-Göttl et al. 2003. Hier wurde die Rolle des Faktor XII-Mangels als Risikofaktor für venöse thromboembolische Ereignisse bei 66 Kindern mit venösen Thrombosen im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie (263 gesunde Kontrollen) untersucht. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den medianen Faktor XII-Aktivitäten bei Kindern mit venösen Thrombosen im Vergleich mit Kontrollen gefunden. Weiterhin wurden keine signifikanten Unterschiede der Faktor XII-Aktivität bezüglich Alter und Geschlecht in der Kontrollgruppe gefunden. Beim Vergleich der höchsten mit der niedrigsten Quartile wurde keine statistische Differenz festgestellt (OR/CI 1,9/0,7-5,6, p=0,19).

#### **4.4. Zusammenhang zwischen Faktor XII C46T Polymorphismus und Koronarerkrankungen**

In einigen klinischen Studien wurde der Faktor XII C46T Genotyp mit akuten Koronar-Syndromen assoziiert. Zito, Ishi, Kohler et al. 2000 haben eine Beziehung zwischen dieser DNA Variante und kardiovaskulären Erkrankungen festgestellt, zum Beispiel Koronarerkrankungen und Myokardinfarkt (Zito, Ishii, Kohler et al. 2000). Dieser Zusammenhang konnte allerdings nicht in allen untersuchten Kollektiven bestätigt werden.

Kohler et al. zeigten, dass die Faktor XII-Konzentration streng assoziiert ist mit der Ausdehnung der Koronararterienstenose.

Auch in einer Untersuchung von Halbmayer et al. 1994 wurde Faktor XII-Mangel als Risikofaktor für die Entwicklung einer arteriellen und venösen Thrombose beschrieben.

Dahingegen konnte dieser Zusammenhang in den Untersuchungen von Oguchi et al. 2000 und Kohler et al. 1998 nicht bestätigt werden. Hier konnte keine Beziehung zwischen dem Genotyp des Faktor XII C46T Polymorphismus und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen festgestellt werden (Oguchi et al. 2000, Kohler et al. 1998).

Dieselbe Arbeitsgruppe von Kohler et al. zeigte 1998, dass kein Zusammenhang mit dem Auftreten von Koronarerkrankung besteht. Es wurde kein Zusammenhang zwischen der Prävalenz des FXII C46T Polymorphismus bei 266 Patienten mit Myokardinfarkt oder 185 Kontrollen festgestellt. Ebenso bestand kein Zusammenhang zwischen der Ausdehnung der Koronarerkrankung (Ein-, Zwei-, Dreifäß-Erkrankung) und dem Faktor XII Genotyp. 53,7% der Patienten hatten den Faktor XII CC Genotyp, im Vergleich hierzu zeigten 47% der Kontrollen den CC Genotyp. 39,5% der Patienten und 45,4% der Kontrollen trugen den heterozygoten Genotyp CT. Den homozygoten Faktor XII TT Genotyp hatten 6,8% der Patienten mit einer Koronarerkrankung und 7,6% der Kontrollen.

#### **4.5. Zusammenhang zwischen Faktor XII C46T Polymorphismus und venösen Thrombosen**

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie zeigen, dass kein Zusammenhang zwischen dem Faktor XII C46T Polymorphismus und dem Auftreten einer venösen Thrombose im Kindesalter besteht.

Dahingegen wurde in verschiedenen anderen Untersuchungen ein strenger Zusammenhang zwischen dem Faktor XII C46T Polymorphismus und thromboembolischer Erkrankung bei Erwachsenen festgestellt. So wird in der Studie von Soria et al. 2002 ein strenger Zusammenhang zwischen Faktor XII C46T Polymorphismus und thromboembolischer Erkrankung festgestellt.

Tirado et al. zeigten, dass ein 3-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten einer venösen Thrombose für Träger des FXII 46TT Genotyps besteht (crude odds Ratio 3,1; 95% CI 1,1-8,7) und schlossen hieraus, dass das Faktor XII 46T-Allel einen unabhängigen genetischen Risikofaktor in der spanischen Bevölkerung darstellt.

Dahingegen zeigte die Gruppe von Franco et al. bereits 1999, dass homozygote Faktor XII 46T Träger kein erhöhtes Risiko für eine venöse Thrombose haben (OR 0,8, 95% CI 0,3-1,9). Die unterschiedlichen Resultate in beiden Studien sind dadurch zu erklären, dass beide Studien (die von Tirado und Franco) relativ klein waren und sich in ihren Ergebnissen nur auf 15 bzw. 22 Individuen mit dem homozygotem Faktor XII 46T Genotyp bezogen (Bertina et al. 2005).

Es wurde jedoch auch in größeren Studien bei Erwachsenen keine Assoziation zwischen diesem Polymorphismus und dem Auftreten von tiefen Venenthrombosen festgestellt (Bertina et al. 2005, Grünbacher et al. 2005).

Grünbacher et al. schlossen in einer Untersuchung im Jahre 2005 673 Patienten und Kontrollen in eine Studie ein. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Genotyp-Frequenzen zwischen Patienten mit einer tiefen Venenthrombose im Vergleich zu Kontrollen ( $p=0,930$ ). Die Odds ratio für den Faktor XII TT Genotyp für venöse Thrombosen betrug 1,09 (95% CI 0,60-1,98).

Bertina et al. untersuchten 2005 den Zusammenhang des Faktor XII C46T Polymorphismus mit der Faktor XII-Aktivität und dem Risiko einer venösen Thrombose in einer Fall-Kontroll-Studie. Diese Studie bezog sich ebenfalls auf eine große Population (474 Patienten und 474 Kontrollen, durchschnittliches Alter 45 Jahre). Die Häufigkeit des 46T Allels war 0,254 bei den Kontrollen und 0,233 bei den Patienten. Die Ergebnisse waren ähnlich zu den vorher dokumentierten Ergebnissen in der kaukasischen Population (0,2-0,28) (Kanaji et al. 1998, Endler et al. 2001, Tirado et al. 2004, Franco et al. 1999). Homozygote Träger des Faktor XII 46T Allels zeigten kein erhöhtes Risiko für eine venöse Thrombose (Odds Ratio für TT-Träger 0,82, 95% CI 0,47-1,42). Die Odds Ratio von 0,82 für die 46TT Träger ist identisch mit der von Franco et al. (OR 0,8). Dies Ergebnis indizierte einen leicht protektiven Effekt des Faktor XII 46T Allels.

Die Ergebnisse der Studie von Bertina et al. bestätigen die Ergebnisse von Franco et al. 1999 und unterscheiden sich von den Ergebnissen von Tirado et al. 2004. Der Grund, warum Tirado et al. eine Odds Ratio von 3,1 für Faktor XII 46T fanden, ist unklar. Von 250 gesunden Individuen hatten 90 den CT Genotyp und 5 den TT Genotyp. In einer anderen Studie derselben Studiengruppe betrug die Prävalenz vom 46T Allel bei 100 gesunden Individuen 0,23, die Anzahl vom TT Genotyp betrug 4 (Tirado et al. 2003). Diese Resultate legen die Vermutung nahe, dass es sich bei den Ergebnissen von Tirado et al. um falsch positive Ergebnisse im Hinblick auf die niedrige Anzahl von TT Genotyp-Trägern in der gesunden Kontrollgruppe handelt (Bertina et al. 2005).

Girolami et al. untersuchten 2004 das Auftreten venöser Thrombosen bei 21 erwachsenen Patienten mit schwerem Faktor XII-Mangel (homozygoter Faktor XII-C46T Polymorphismus). Nur einer dieser Patienten hatte eine venöse Thrombose, gleichzeitig bestand bei diesem Patienten eine heterozygote Faktor V-Mutation. Girolami postulierte daher, dass Faktor XII-Mangel keine Rolle in der Pathogenese der venösen Thrombose spielt. Girolami kam zudem zu der Ansicht, dass das Auftreten venöser Thrombosen bei Patienten mit schwerem Faktor XII-Mangel vielleicht bedingt ist durch assoziierte Risikofaktoren.

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie zeigen keinen Zusammenhang zwischen dem Faktor XII C46T Polymorphismus und dem Auftreten venöser Thrombosen im Kindesalter. Der Umfang der Kohorte in der hier präsentierten

Studie ist jedoch zu klein und daher ist die statistische Aussagekraft dieser Studie nicht valide genug, um die Möglichkeit auszuschließen, dass hier kein Zusammenhang besteht.

#### **4.6. Theorie des thromboprotektiven Effektes des Faktor XII-Mangels**

Kontrovers zu der bisher angenommenen Bedeutung von Faktor XII stehen die Ergebnisse von Kleinschnitz und Renné 2006. Renné et al. zeigten, dass Faktor XII-Mangel oder die Hemmung von Faktor XII Mäuse vor ischämischen Schlaganfällen schützt. Hier wurde gezeigt, dass ein Mangel oder die Inhibierung von Faktor XII zu einem Schutz vor ischämischen Hirnschäden führt. Es wurde postuliert, dass die Bildung von pathologischen Thromben über einen anderen Weg verläuft als den der normalen Hämostase. Die Hemmung der Faktor XII-Aktivität verschlechtert die pathologische Fibrinbildung und schützt das Hirngewebe während der zerebralen Ischämie. Da dieser Mechanismus auch bei einem Mangel an dem Faktor XII-Substrat Faktor XI zu beobachten ist, wird vermutet, dass der Faktor XII über die intrinsische Gerinnung zu pathologischer Thrombusbildung führt. Wichtig ist hierbei, dass die Neuroprotektion durch die selektive Faktor XII- Inhibierung nicht zu einer verstärkten Blutungsneigung während der Infarktphase oder Rekonvaleszenzphase führt. Sollte sich der Mechanismus auch für den Menschen bestätigen, läge hierin eine pharmakologische Strategie der sicheren und selektiven Prävention von Schlaganfällen und anderen thromboembolischen Ereignissen.

Weitere Untersuchungen sind aber erforderlich, um den genauen molekularen Pathomechanismus für die Faktor XII-Aktivierung in ischämischen Gefäßen und andere Faktor XII assoziierten Gerinnungswege, wie das Komplementsystem und das Kallikrein-Kinin-System, zu verstehen.

#### **4.7. Faktor XII-Mangel und rezidivierende Aborte**

Die Literaturübersicht über den Faktor XII-Mangel zeigt, dass dieser Gerinnungsdefekt bei Frauen mit rezidivierenden Aborten häufiger nachgewiesen wurde als in der Normalbevölkerung (Gris et al. 1997, Matsuura et al. 2001). Darüber hinaus konnte klinisch gezeigt werden, dass eine durchblutungsfördernde Therapie während der Schwangerschaft in Form von 100 mg Aspirin pro Tag die Wahrschein-

lichkeit einer Plazentainsuffizienz bei Frauen mit Faktor XII-Mangel senkt (Ogasawara et al. 2001).

In einer Untersuchung von Cochery-Nouvellon et al. 2007 wurde bei 32463 asymptomatischen Erstgebärenden gezeigt, dass bei einem homozygoten Faktor XII 46 TT Polymorphismus das relative Risiko für das Auftreten eines venösen thromboembolischen Ereignisses signifikant erhöht ist (RR: 5,99, 95% CI: 2,1-17,3,  $p=0,001$ ).

Ebenso stellten Pauer, Burfeind et al. 2003 eine strenge Beziehung zwischen wiederholten Aborten und einem Faktor XII-Mangel fest. Hier wurde jedoch nur die Faktor XII-Aktivität gemessen, keine Genotypisierung durchgeführt. Bei Frauen mit wiederholten Aborten zeigte sich eine Tendenz zum Faktor XII-Mangel.

Im Gegensatz dazu gelangten Walch et al. 2005 zu abweichenden Ergebnissen. Sie untersuchten den Zusammenhang zwischen wiederholten Aborten und einem Faktor XII C46T Polymorphismus. 212 Frauen mit rezidivierenden Aborten und 149 gesunde Kontrollen wurden genotypisiert. Es wurde kein Unterschied in der Allel- und Genotypfrequenz zwischen der Studien- und Kontrollgruppe festgestellt.

Dahingegen stellte Kuhli in ihrer Arbeit 2004 den Faktor XII-Mangel als Risikofaktor für venöse retinale Gefäßverschlüsse heraus.

Die Beobachtung einer Assoziation des Faktor XII-Mangels mit rezidivierenden Aborten und venösen retinalen Gefäßverschlüssen einerseits und einer fehlenden pathogenetischen Bedeutung dieses Gerinnungsdefektes für systemische thromboembolische Ereignisse andererseits deutet auf eine typische Lokalisation thromboembolischer Komplikationen des Faktor XII-Mangels hin. Sowohl retinalen Durchblutungsstörungen als auch dem Krankheitsbild der Plazentainsuffizienz (Pfarrer et al. 2001) ist gemeinsam, dass es sich jeweils um Durchblutungsstörungen des Mikrogefäßsystems handelt. Im Gegensatz hierzu scheint dem Faktor XII-Mangel im systemischen Gefäßsystem keine pathogenetische Bedeutung für Thromboembolien zuzukommen.

#### **4.8. Faktor XII C46T Polymorphismus in Bezug auf etablierte prothrombotische Risikofaktoren**

In dieser Studie wurde gezeigt, dass 60,9% der Patienten mit einer venösen Thrombose mindestens einen etablierten prothrombotischen Risikofaktor aufweisen. Im Gegensatz hierzu haben nur 18,2% der Kinder aus der Kontrollgruppe mindestens einen etablierten Risikofaktor.

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen erneut, dass die Prothrombin G20210A- und die Faktor V G1691A-Mutationen sowie Antithrombin-, Protein C- und Protein S-Mangel für die Entstehung von Thrombosen im Kindes- und Jugendalter eine wesentliche Rolle spielen. Die Ergebnisse früherer Studien an Kindern werden bestätigt (Nowak-Göttl 1996, 1997, 2000, Andrew 1995, Sifontes 1996).

In der hier vorgelegten Studie konnte bei 12,5% der Kinder mit einer stattgehabten Thrombose eine Kombination von Risikofaktoren festgestellt werden. Es ist bereits bekannt, dass die Kombination der Faktor V G1691A-Mutation mit einem weiteren Risikofaktor (Protein C/S-Mangel, Antithrombinmangel) zu einer deutlich höheren Thrombosegefahr führt, als sie vom isolierten Risikofaktor allein genommen ausgeht (Koelemann 1994, 1995, van Boven 1996). In der Kontrollgruppe lag keine Kombination zweier Risikofaktoren vor. Dieses Ergebnis bekräftigt die These, dass kombinierte Defekte die Thrombosegefahr erhöhen und nicht nur bei Erwachsenen eine große Rolle spielen.

Einen Beleg dafür, dass die Kombination des Faktor XII C46T Polymorphismus mit einem etablierten Risikofaktor zu einer Thromboemboliegefahr führt, gibt es bisher nicht. In einem Fallbeispiel von Perez-Montes et al. (2005) wurde allerdings der Fall eines 13-jährigen Mädchens beschrieben, welches an einer schweren Thrombose erkrankte. Als Risikofaktor wurde ein Protein S-Mangel und eine homozygote Faktor XII 46T Mutation festgestellt.

#### **4.9. Methodendiskussion**

Kanaji et al. identifizierten primär den Faktor XII C46T Polymorphismus im Jahre 1998. Sie entwickelten eine Methode zur genetischen Analyse des Genotyps, bei der noch Restriktionsenzyme für den Verdau des PCR-Produktes erforderlich waren.

Endler et al. etablierten 2001 eine neue modifizierte allelspezifische mutations-seperierende (mutagenically separated) Polymerase Kettenreaktion (MS PCR), welche die Mutationserkennung ohne Gebrauch von Restriktionsenzymen erlaubt. Mithilfe dieses Verfahrens wurde der Mutationsnachweis deutlich beschleunigt und zudem preiswerter, so dass ein Screening größerer Probenzahlen möglich wurde (zum Ablauf dieses Verfahrens siehe Kapitel 2: Material und Methoden)

#### **4.10. Therapie von Kindern mit hereditären Thrombophilien**

Bei pädiatrischen Patienten fehlt es für die Therapie der thromboembolischen Ereignisse an detaillierten Studien. Langzeitergebnisse von Kindern mit thromboembolischen Ereignissen wurden bisher selten dokumentiert. Die akute Behandlung von Thrombosen im Kindesalter beruht auf Empfehlungen aus Studien mit kleinem Patientenkollektiv und auf Empfehlungen für die Therapie bei Erwachsenen.

Für die akute Therapie der Thromboembolien im Kindesalter werden Standard-Heparin, niedermolekulares Heparin, Heparinoide und thrombolytische Mittel verwendet.

Bei etablierten prothrombotischen Risikofaktoren im Kindesalter wie z.B. Faktor V G1691A Mutation, Prothrombinmutation G20210A, Protein C-, Protein S- oder Antithrombinmangel, erhöhtes Lipoprotein(a) sollte schon bei Vorliegen der heterozygoten Mutation eine orale Antikoagulation oder niedrigdosiertes Heparin für drei bis sechs (zwölf) Monate nach einem akuten thromboembolischen Ereignis verabreicht werden (Nowak-Göttl et al. 2002).



#### **4.11. Fazit**

Zusammenfassend betrachtet ist festzuhalten, dass durch die vorliegenden Daten bestätigt wird, dass der C46T Polymorphismus des Faktor XII-Gens streng assoziiert ist mit der Faktor XII-Aktivität. Der Faktor XII TT-Genotyp ist streng assoziiert mit Werten unterhalb der 10. Perzentile. Es konnte in dieser Studie jedoch kein Zusammenhang zwischen der FXII-Aktivität bzw. dem FXII-Genotyp und venösen Thrombosen im Kindesalter gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob der Faktor XII C46T selbst einen prothrombotischen Risikofaktor für das Auftreten für venöse Thrombosen im Kindesalter darstellt und um mehr Informationen über die Interaktion zwischen etablierten prothrombotischen Risikofaktoren und Faktor XII C46T Polymorphismus zu erhalten, ist eine Studie mit einer größeren Patientengruppe als der hier vorliegenden erforderlich.

Weiterhin muss festgehalten werden, dass die Erforschung der grundsätzlichen Bedeutung des Faktor XII ein wissenschaftliches Desiderat darstellt. In diesem Kontext sei nochmals auf die Studien von Renné und Kleinschnitz (Renné et al 2006, Kleinschnitz et al. 2006) hingewiesen, die die bisherige Bewertung des Faktor XII-Mangels grundsätzlich in Frage stellen.

## 5. Literaturverzeichnis

- 1) Aballi AJ, De Lamerens S (1962). Coagulation changes in the neonatal period and in early infancy. *Pediatr Clin North Am.* Aug; 9: 785-817.
- 2) Abildgaard U (1967). Purification of two progressive antithrombin of human plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 19: 190-195.
- 3) Abildgaard U (1979). In: Collen D, Wiman B, Verstraete M (Hrsg.) *The physiological inhibitors of coagulation and fibrinolysis.* Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 19-29.
- 4) Alkalay AL, Mazkereth R, Santulli T jr, Pomerance JJ (1993). Central venous line thrombosis in premature infants: a case management and literature review. *Am J Perinat* 10: 323-326.
- 5) Andrew M, Paes B, Milner r, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Castle V, Powers B (1988). Development of the human coagulation system in the healthy premature infant. *Blood* 72(5): 1651-1657.
- 6) Andrew M, David M, Adams M et al. (1994). Venous thromboembolic complications (VTE) in children: first analysis of the Canadian registry of VTE. *Blood* 83: 1251-2157.
- 7) Andrew M (1995) Developmental hemostasis: Relevance to thromboembolic complications in pediatric patients. *Thromb Haemost.* 74: 415-425.
- 8) Andrew M (1996). Indications and drugs for anticoagulation therapy in children. *Thromb Res* 81: 61-73.
- 9) Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J et al. (1989). The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine* 68: 366-374.
- 10) Asherson RA, Merry P, Acheson JF et al. (1989). Antiphospholipid antibodies: a risk factor for occlusive ocular vascular disease in systemic lupus erythematosus and the "primary" antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 48: 358-361.
- 11) Bachmann F (1984). Fibrinolysis. In: Verstraete M, Vermeylen J, Lijnen R, Arnout J (eds) *Thrombosis and Haemostasis.* Leuven University Press: 227-265
- 12) Bauer KA (1995). Natural Anticoagulants and the Prethrombotic State. In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP (eds) *Blood. Principles and Practice of Hematology.* J. B. Lippincott Company. Philadelphia: 1319-1339.
- 13) Barcat D, Bureau C, Bernard J (2001). Deep venous thrombosis of the arm revealing a congenital Factor XII deficiency. *Rev Med Interne.* 22(2): 200-202.
- 14) Barton PG (1967). Sequence theories of blood coagulation re-evaluated with reference to lipid-protein interactions. *Nature.* Sep. 30. 215(5109): 1508-1509.
- 15) Beauchamp NJ, Daly ME, Hampton KK, Cooper PC, Preston FE, Peake IR (1994). High Prevalence of a mutation in the factor V gene within the U.K. population: relationship to activated protein C resistance and familial thrombosis. *Br J Haematol* 88: 219-222.
- 16) Beckmann RJ, Schmidt RJ, Santerre RF et al. (1985). The Structure and Evolution of a 461 amino acid human protein C precursor and its messenger RNA, based upon the DNA sequence of cloned human liver cDNAs. *Nucleic Acids Res.* 13: 5233.

- 17) Beckermann AW, Veltmann JJ, Bertina RM (1983). Congenital protein C deficiency and venous thromboembolism: A study of three Dutch families. *N Engl J Med* 309: 340.
- 18) Berg K (1963). A new serum type system in man – the LP-System. *Acta Pathol Microbiol Scand* 59: 369-382.
- 19) Bernardi F, Marcchetti G, Pinotti M, Arcieri P, Barnocini C, Papacchini M, Zeponi E, Ursicino N, Chiarotti F, Mariani G (1996). Factor VII gene polymorphisms contribute about one third of the factor VII level variation in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 72.
- 20) Bertina RM, van der Linden IK, Engesse L, Muller HP, Brommer EJ (1987). Hereditary heparin cofactor II deficiency and the risk of development of thrombosis. *Thromb Haemost* 57 (2): 196-200.
- 21) Bertina RM, Koeleman 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*; 339: 64-67.
- 22) Bertina RM, Poort SR, Vos H, Rosendaal F (2005). The 46C>T polymorphism in the factor XII gene (F12) and the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost*; 3: 597-599.
- 23) Bettelheim FR (1956). The clotting of fibrinogen. II Fractionation of peptide material liberated. *Biochem Biophys Acta* 19: 121.
- 24) Binder BR (1990). Influence of urokinase on cell proliferation and invasion. *Blood*; 1: 717-720.
- 25) Blajchmann MA, Austin RC, Fernandez-Rachubinski F, Sheffield WP (1992). Molecular basis of inherited human antithrombin deficiency. *Blood*; 89 (9): 2159-2171.
- 26) Blombäck B, Hessel B, Hogg D, Therkildsen L (1978) A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. *Nature* 275: 501-505
- 27) Blumberg BS, Bernanke D, Allison AC (1962). A human lipoprotein polymorphism. *J Clin Invest* 41: 1936-1944.
- 28) Boomsma DI, Hennis BC, van Wees AG, Frants RR, Kluft, C (1993). A parent-twin study of histidine-rich glycoprotein (HRG). *Thromb Haemost*; 70: 848-851.
- 29) Broekmans AW, van der Linden IK, Jansen-Koeter Y, Bertina RM (1986). Prevalence of protein C (PC) and protein S (PS) deficiency in patients with thromboembolic disease. *Thromb Res Suppl.* 6: 135a.
- 30) Büchler 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: 981-986.
- 31) Castaman G, Ruggeri M, Burei F, Rodeghiero F (1993). High levels of histidine-rich glyco-protein and thrombotic diathesis. Report of two unrelated families. *Thromb res*; 69: 297-305.
- 32) Castaman G, Ruggeri M, Tassetto A et al. (1996). Thrombosis in patients with heterozygous and homozygous factor XII deficiency is not explained by the associated presence of factor V Leiden. *Thromb Haemost* 76 (2): 275.
- 33) Chatterjee K, Vogler E, Siedlecki C (2006). Procoagulant activity of surface-immobilized Hageman factor. *Biomaterials* 27: 5643-5650.
- 34) Citarella F, Tripodini M, Fantoni A, Bernardi F, Romeo G, Rocchi M (1988). Assignment of human coagulation factor XII (fXII) to chromosome 5 by cDNA hybridization to DNA from somatic cell hybrids. Dipartimento di Biopatologica Umana, Università di Roma, La Sapienza, Italy.

- 35) Cochery-Nouvellon E, Mercier E, Lissalde-Lavigne G et al. (2007). Homozygosity for the C46T polymorphism of the F12 gene is a risk factor for venous thrombosis during the first pregnancy. *J Thromb Haemost.* 5 (4). 700-707.
- 36) Cochrane CG, Revak SD, Wuepper KD (1973). Activation of Hageman factor in solid and fluid phases. A critical role of kallikrein. *J Exp Med* 138: 1564-1583.
- 37) Colman RW (1969). Activation of plasminogen by plasma kallikrein. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 273.
- 38) Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J (1994). *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.* J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- 39) Conrad J, Horellou MH, Samma M. (1988). Incidence of thromboembolism in association with congenital disorders in coagulation and fibrinolysis. *ACTA Chir Scand Suppl* 543: 15-25.
- 40) Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Emson CT (1984). Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 74 : 2082-2088.
- 41) Cool DE, Edgell CJ, Louie GV, Zoller MJ, Brayer GD, MacGillivray RT (1985). Characterization of human blood coagulation factor XII cDNA. Prediction of the primary structure of factor XII and the tertiary structure of beta-factor XIIa. *J Biol Chem.* Nov 5; 260 (25): 13666-13676.
- 42) Cool DE, MacGillivray RTA (1987). Characterization of the human blood coagulation factor XII gene: Intron/exon gene organization and analysis of the 5-prime flanking region. *JBC* 262: 13662.
- 43) 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.*
- 44) Dahlbäck B (1997). Resistance to activated protein C caused by the factor V R 506Q mutation is a common risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost*; 78: 483-488.
- 45) Davie EW, Fujikawa K (1975). Basic mechanisms in blood coagulation. *Ann Rev Biochem.* 44: 799-829.
- 46) Dawson SJ, Hamsten A, Wiman B, Henney A, Humphries S (1991). Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arterioscler Thromb*; 11: 183-190.
- 47) Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM (1993). The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem*; 268: 10739-10745.
- 48) Doggen C, Rosendaal F, Meijers J (2006). Levels of intrinsic coagulation factors and the risk of myocardial infarction among men: opposite and synergistic effects of factors XI and XII. *Blood* 108, 13: 4045-4051.
- 49) Eaton DL, Flees GM, Kohr WJ, McLean JW, Xu Q, Miller CG ; Lawn RM, Scanu AM (1987). Partial amino acid sequence of apolipoprotein(a) shows that it is homologous to plasminogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3224-3228.
- 50) Ehrenforth S, Zwinge B, Scharrer I (1998). High prevalence of factor V R605Q mutation in German thrombophilic and normal population. *Thromb Haemost* 79: 684-685.

- 51) Egeberg O (1965). Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh*; 15: 516-530.
- 52) Endler G, Exner M, Mannhalter C (2001). A common C→T polymorphism at nt 46 in the promoter region of coagulation factor XII is associated with decreased factor XII activity. *Thrombosis Research* 101: 255-260.
- 53) Endler G, Exner M, Meier S, Kunz F, Wagner O, Wojta J, Huber K, Mannhalter C (2001). A frequent C→T polymorphism in the promoter region of coagulation factor XII (FXII) is a protective factor for the development of the acute coronary syndrome. *Klinisches Institut für medizinische und chemische Labordiagnostik, Abteilung für Interne Medizin II, Universität Wien, Vienna, Austria.*
- 54) Endler G, Mannhalter C, Sunder-Plassmann H, Lalouschek W, Kapiotis S, Exner M, Jordanova N, Meier S, Kunze F, Wagner O, Huber K (2001). Homozygosity for the C→T polymorphism at nucleotide 46 in the 5' untranslated region of the factor XII gene protects from development of the acute coronary syndrome. *Department of Laboratory Medicine, University of Vienna Medical School, AKH-Wien Währinger Gurtel 18-20, 1090 Vienne, Austria.*
- 55) Eriksson P, Kallin B, van Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A (1995). Allele-specific increase in basal transcription of plasminogen-activator-inhibitor-1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 1851-1855.
- 56) Esmon CT, Owen WG (1981). Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalysed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78 (4): 2249-2252.
- 57) Ferraresi P, Marcetti G, Legnani C et al. (1997). The heterozygous 20210 G/A pro-thrombin genotype is associated with early venous thrombosis in inherited thrombo-philiias and is not increased in frequency in artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 17 (11): 2418-2422.
- 58) Finazzi G, Caccia R, Barbui T (1987). Different prevalence of thromboembolism in the subtypes of congenital antithrombin III deficiency: review of 404 cases. *Thromb Haemost* 58: 1094.
- 59) Foncea N, Beldarrain M, Ruiz Ojeda J et al. (2001). Ischemic stroke in a patient with factor XII (Hageman) deficiency. *Neurologia*; 16: 227-228.
- 60) De Fouw NJ, Hinsberg VWM, de Jong YF, Haverkate F, Bertina RM (1987). The interaction of activated protein C and thrombin with plasminogen activator inhibitor released from human endothelial cells. *Thromb Hemost.* 57: 176-182.
- 61) De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM (1996). Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes and management. *Blood.* 1996 May 1; 87(9): 3531-3544.
- 62) Di Scipio RG, Hermodson MA, Yates SG, Davie EW (1977). A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor) and Protein S. *Biochemistry.* 16: 698.
- 63) Di Scipio RG, Davie EW (1979). Characterization of protein S, a gamma-carboxy- glutamic acid containing protein from bovine and human plasma. *Biochemistry.* 18: 899.
- 64) Franco RF, Reitsma PH, Lourenco D et al. (1999). Factor XIII Val34Leu is a genetic factor involved in the aetiology of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 81: 676-679.
- 65) Gaetgens P (1994). *Physiologie des Blutes.* In: Deetjen P, Speckmann EJ (Hrsg.) *Physiologie.* Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore, 2. Aufl.

- 66) Gardiner JE, McGann MA, Berridge CW et al. (1984). Protein S as a cofactor for activated protein C in plasma and in the inactivated of purified factor VIII: C. (Abstract) *Circulation*. 70 (Suppl 2): 205.
- 67) Gerber SL, Cantor LB (1990). Progressive Optic atrophy and the primary antiphospholipid syndrome. *Am J Ophthalmol* 110: 443-444.
- 68) Gibson B (1989). Neonatal haemostasis. *Arch Dis Child* 64 (4): 503-506.
- 69) Girolami A, Sartori MT, Lombardi AM, Pellati D (2004). Rebuttal: factor XII levels, factor XII 46 C→T polymorphism and venous thrombosis: a word of caution is needed. *Thromb Haemost. Oct*; 92(4): 892-3; author reply 894-895.
- 70) Girolami A, Pellati D, Lombardi AM (2005). Factor XII deficiency is neither a cause of thrombosis nor a protection from thrombosis. *Am J Ophthalmol* 139 (3): 578-579.
- 71) Gladson CL, Scharrer I, Hach V, Beck KH, Griffin JH (1988). The frequency of type I heterozygous protein S and protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis. *Thromb Haemost. Feb 25*; 59 (1): 18-22.
- 72) Goodnough LT, Saito H, Hamilton SM (1983). Synthesis and release of Hageman factor (Faktor XII) by isolated perfused rat liver. *J Clin Invest* 72 (3): 948-954.
- 73) Goldsmith G, Saito H, Ratnoff OD (1978). The activation of plasminogen by Hageman factor (factor XII) and Hageman factor fragments. *J Clin Invest*; 12: 54.
- 74) Gordon EM, Donaldson VH, Saito H, Su E, Ratnoff OD (1981). Reduced titers of Hageman factor (Factor XII) in Orientals. *Ann Intern Med* 95: 697.
- 75) Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernández JA, Griffin JH, Evatt B (1994). Activated protein C resistance caused by Arg596Gln mutation in factor Va. *Lancet*; 343: 1361-1362.
- 76) Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C (1981). Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest*; 68 (5): 1370-1373.
- 77) Griffin JH, Heeb MJ, Kojima Y, Fernandez JA, Kojima K, Heckeng TM, Greengard JS (1995). Activated Protein C Resistance: Molecular Mechanisms. *Thromb Haemost* 74 (1): 444-448.
- 78) Gris JC, Ripart-Niveu S, Maugard C, Tailland ML, Brun S, Courtieu C, Biron C, HOFFET M, Hedon B, Mares P (1997). Respective evaluation of the prevalence of haemostasis abnormalities in unexplained primary early recurrent miscarriages. The Nimes Obstetricians and Haematologists (NOHA) Study. *Thromb Haemost*; 77: 1096-1103.
- 79) Grünbacher G, Marx-Neuhold E, Pilger E, Köppel H, Renner W (2005). The functional -4C>T polymorphism of the coagulation factor XII gene is not associated with deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost*; 3: 2815-2817.
- 80) Gurewich V, Pannell R, Louie S, Kelley P, Suddith RL, Greenlee R (1984). Effective and fibrin-specific clot of lysis by a zymogen precursor form of urokinase (pro-urokinase). A study in vitro and in two animal species. *J Clin Invest* 73: 1731-1739.
- 81) Hach-Wunderle V (1990). Hämostaseologisches Risikoprofil bei venöser Thrombose. Habilitationsschrift für das Fach Innere Medizin aus dem Fachbereich Humanmedizin der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- 82) Halbmayer WM, Mannhalter C, Feichtinger C, Rubi K, Fischer M (1992). The prevalence of factor XII deficiency in 103 anticoagulated outpatients suffering from recurrent venous and/or arterial thromboembolism. *Thromb Haemostas*; 68: 285-90.

- 83) Halbmayer WM, Mannhalter CH, Feichtinger CH, Rubi K, Fischer M (1993). Factor XII (Hageman factor) deficiency: a risk factor in the development of thromboembolism. *WMW*; 2: 43-50.
- 84) Halbmayer WM, Haushofer A, Radek J, Schon R, Mannhalter C, Strohmayer E, Baumgarten K, Fischer M (1994). The prevalence of moderate and severe FXII (Hageman factor) deficiency among the normal population: evaluation of the incidence of FXII deficiency among 300 healthy blood donors. *Thromb Haemost*; 71(1): 68-72.
- 85) Halbmayer WM, Haushofer A, Radek J, Schon R, Deutsch M, Fischer M (1994). Prevalence of factor XII (Hageman factor) deficiency among 426 patients with coronary heart disease awaiting cardiac surgery. *Coron Artery Dis* 1994; 5: 541.
- 86) Harpel PC, Gordon BR, Parker TS (1989). Plasmin catalyses binding of lipoprotein(a) to immobilized fibrinogen and fibrin. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86: 3847-3851.
- 87) Hemker HC, Kahn MJ (1967). Reaction sequence of blood coagulation. *Nature*. Sep 9; 215 (5106): 1201-1202.
- 88) Hemker HC (1984). In memory of Francois Jossa. Why do hemophiliacs bleed? *Scand J Haematol*; 40: 11-19.
- 89) Hemker HC, Beguin S (1991). Mode of Activation of heparin and related drugs. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*; 17 (1), Suppl 1: 29-34.
- 90) Hemker HC, Poliwoda H (1997) Theoretische Voraussetzungen. In: Barthels M, Poliwoda H. *Gerinnungsanalysen* Thieme Verlag. Stuttgart, New York. 5. Aufl.: 1-20.
- 91) Henry M, Tregouet DA, Alessi MC et al (1998). Metabolic determinants are much more important than genetic polymorphisms in determining the PAI-1 activity and antigen plasma concentrations: A family study with part of the Stanislas cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 18: 84-91.
- 92) Herrmann FH (1997). *Molekulargenetik hereditärer Hämostasedefekte*. Pabst Science Publishers.
- 93) Hiemeyer V, Rasche H, Diehl K (1972). *Hämorrhagische Diathesen*. Stuttgart. Thieme Verlag.
- 94) Hinsberg van VWM, Bertina RM, Wijngaarden van A, Tilburg van NH, Emaj JJ, Haverkate F (1985). Activated protein C decreases plasminogen activator inhibitor activity in endothelial cell conditioned medium. *Blood* 65: 444-451.
- 95) Hirsh J, Provella F, Pini M (1989). Congenital antithrombin III deficiency: Incidence and clinical features. *Am J Med* 87; (Suppl 3B): 34.
- 96) Hirsh J, Salzman EW, Marder VJ, Colman RW (1994). Overview of the thrombotic process and its therapy. In: *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, Third Edition. J.B. Lippincott Company, Philadelphia; 1151: 1163.
- 97) Hougie C, Denson KWE, Biggd E (1967). A study of the reaction product of factor VIII and factor IX by gel filtration. *Thrombos Diathes Haemorrh* 18: 211-222.
- 98) Hovinga JK, Schaller J, Stricker H, Wuillemin WA, Furlan M, Lammle B (1994). Coagulation factor XII Locarno: the functional defect is caused by the amino acid substitution Arg 353→Pro leading to loss of a kallikrein cleavage site. *Blood*. Aug 15; 84(4): 1173-1181.
- 99) 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.

- 100) Ishii K, Oguchi S, Murata M, et al (2000). Activated factor XII levels are dependent on factor XII 46C/T genotypes and factor XII zymogen levels, and are associated with vascular risk factors in patients and healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis*; 11: 277-284.
- 101) Jobin F, Esnouf M (1967). Studies on the formation of prothrombin-converting complex. *Biochem J* 102: 666-674
- 102) Junker R, Nowak-Göttl U (1998). The prothrombin G 20210A mutation – a common cause of thrombophilia? *J Lab Med*; 22: 472-482.
- 103) Junker R, Koch HG, Auberger K, Münchow N, Ehrenforth S, Nowak-Göttl U (1999). Prothrombin G20210A gene mutation and further prothrombotic risk factors in childhood thrombophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 19: 2568-2572.
- 104) Kanaji T, Okamura T, Niho Y, Sugiyama M (1995). Molecular analysis of a family with factor XII deficiency, Identification of 126 Arg to Pro substitution, *Blood*; 86: 87a
- 105) Kanaji T, Okamura T, Osaki K, Kuroiwa M, Shimoda K, Hamasaki N, Niho Y (1998). A common genetic Polymorphism (46C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood*, Vol 91, No 6; pp 2010-2014.
- 106) Kanaji T, Watanabe K, Hattori S, Urata M, Iida H, Kinoshita S, Kayamori Y, Kang D, Hamasaki N (2006). Factor XII gene (F12)-4C/T polymorphism in combination with low protein S activity is associated with deep vein thrombosis. *Thromb Haemost.* 2006 Dec; 96(6): 854-855.
- 107) Kisiel W, Canfield WM, Ericson LH, Davie EW (1977). Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation of thrombin. *Biochemistry.* 16: 5824.
- 108) Kleihauer E, Kone E, Rasche H (1978). *Die Hämostase: Physiologie-Pathologie-Klinik.* Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- 109) Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M et al. (2006): Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med.* 203: 515-518.
- 110) Kluff C, Dooijewaard G, Emesis JJ (1987). Role of the contact system fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost*; 13: 50.
- 111) Kohler HP, Carter AM, Stickland MH, Grant PJ (1998). Levels of activated FXII in survivors of myocardial infarction – associated with circulating risk factors and extent of coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 79 (1): 14-18.
- 112) Kohler HP, Futers TS, Grant PJ (1999). FXII (46C→T) Polymorphism and in vivo generation of FXII activity, gene frequencies and relationship in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*; 81: 745-747.
- 113) Kohler HP, Carter AM, Stickland MH, et al. (2000). Levels of activated FXII in survivors of myocardial infarction-association with circulating risk factors and extent of coronary artery disease. *Thromb Haemost*: 83: 178-179.
- 114) Kosch A, Junker R, Kurnik K, Schobeß R, Günther G, Koch HG, Nowak-Göttl U (2000). Prothrombotic risk factors in children with spontaneous venous thrombosis and their asymptomatic parents: a family study. *Thrombosis Research*; 99: 531-537.
- 115) Kosch A, von Kries R, Nowak-Göttl U (2000). Thrombosen im Kindesalter. *Monatszeitschrift Kinderheilkd.* 148: 387-397.



- 116) Kosch A, Schulte T, Schobeß R, Kurnik K, Heller C, Nowak-Göttl U (o.J.). Factor XII-deficiency: a risk factor for ischemic stroke but not for venous thrombosis in children. Department of pediatrics, University Hospitals of Münster, Halle, Munich, Frankfurt a. Main, Germany.
- 117) Kostner GM (1992). Immunochemische Bestimmung von Lipoprotein(a). *Berichte ÖGKC* 15: 106-108.
- 118) Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM (1993): Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden thrombophilia study. *Lancet* 342: 1503.
- 119) Koster T, Rosendaal FR, Briet E, Vandenbroucke JP (1994). John Hageman's factor and deep-vein thrombosis: Leiden Thrombophilia Study. *Br J Haematol*; 87: 422-424.
- 120) Kozak M (1992). Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu Rev Cell Biol*; 8: 197-225.
- 121) Krempler F, Kostner GM, Bolzano K, Sandhofer F (1984). Turnover of lipoprotein(a) in man. *J Clin Invest*; 65: 1483-1490.
- 122) Kristensen P, Larsson LI, Nielsen LS, Grondahl-Hansen J, Andreasen PA, Dano K (1984). Human endothelial cells contain one type of plasminogen activator. *FEBS Lett. Mar 12*; 168(1) :33-37.
- 123) Kuhli C, Scharrer I, Koch F, Ohrloff C, Hattenbach L-O (2004). Factor XII deficiency: a thrombophilic risk factor for retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 137: 459-64.
- 124) Lämmle B, Wuillemin WA, Huber I, Krauskopf M, Zurcher C, Pflugshaupt R, Furlan M (1991). Thromboembolism and bleeding tendency in congenital factor XII deficiency – a study on 74 subjects from 14 Swiss families. *Thromb Haemostasis*; 65:117-121.
- 125) Lane DA, Ireland H, Olds RJ, Thein SL, Perry DJ, Aich M (1991). Antithrombin III: A database of mutations. *Thromb Haemost* 66: 657-661.
- 126) Lane DA, Manucci PM, Bauer KA, Bertina RM, et al. (1996). Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost*; 76 (5): 651-662.
- 127) Lane DA, Manucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjankov V, Chandy M, Dahlbäck B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U (1996). Inherited thrombophilia: Part 2. *Thromb Haemost*; 76 (5): 824-834.
- 128) Lecander I, Astedt B (1986). Isolation of a new specific plasminogen activator inhibitor from pregnancy plasma. *Br J Hematol*; 62: 221-228.
- 129) Levin EG, Santell L (1988). Cyclic AMP potentiates phorbol ester stimulation of tissue plasminogen activator release and inhibits secretion of plasminogen activator inhibitor-1 from human endothelial cells. *J Biol Chem. Nov 15*; 263 (32): 16802-16808.
- 130) Lijnen HR, Hoylaerts M, Collen D (1980). Isolation and characterisation of human plasma protein with affinity for the lysine binding sites in plasminogen. *J Biol Chem*; 255: 10214-10222.
- 131) Lunghi B, Iacovelliello L, Gemmati D, Dialasio MG, Bernardi F (1996). Detection of new polymorphic markers in the factor V gene: Association with factor V levels in plasma. *Thromb Haemost*; 75: 45.
- 132) Magnusson S, Sottruo-Jensen L, Petersen TE, Dudeke-Wojciechowska G, Claeys H (1976). Homologous "kringle" structures common to plasminogen and prothrombin. Substrate specificity of enzymes activating prothrombin and plasminogen. In: Ribbons DW, Brew K (eds). *Proteolysis and Physiological Regulation*, vol 11. New York, NY, Academic. 203.
- 133) Malinov MR (1994). Homocystein and arterial occlusive disease. *J Int Med* 236: 603.

- 134) Mandle RJ, Colman RW, Kaplan AP (1976). Identification of prekallikrein and high molecular weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 11; 4179-4183.
- 135) Mandle RJ, Kaplan AP (1979). Hageman factor dependent fibrinolysis: generation of fibrinolytic activity by the interaction of human activated factor XI and plasminogen; 54: 850.
- 136) Mannhalter C (2001). A common C→T polymorphism at nt 46 in the promoter region of coagulation factor XII is associated with decreased factor XII activity. *Thrombosis Research*; 101: 255-260.
- 137) Mannucci PM, Tripodi A. (1987). Laboratory screening of inherited thrombotic syndroms. *Thromb Haemost*; 57 (3); 247-251.
- 138) Margolias A JR, Ratnoff OD (1956). Observations on the hereditary nature of Hageman trait. *Blood*. Jun; 11(6): 565-569.
- 139) Matsuura T, Kobayashi T, Asahina T, Kanayama N, Terao T (2001). Is faktor XII deficiency related to recurrent miscarriages? *Semin Thromb Haemost*; 27: 115-120.
- 140) Ma Xi, Beguin S, Hemker HC (1989). Importance of factor IX dependent prothrom-binase formation – the Josso pathway in clotting plasma. *Haemostasis*; 19: 301-303.
- 141) Mc Donagh J, Carell N (1987). Disorders of fibrinogen structure and function. In: Col-man RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (eds) *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*, ed 2. J.B. Lippincott Company. Philadelphia 301.
- 142) Mc Donald MM, Hathaway WE, Reeve EB, Leonhard BD (1982). Biochemical and functional study of antithrombin III in newborn infants. *Thromb Haemost* 47: 56-58.
- 143) McKee PA, Mattock P, Hill RL (1970). Subunit structure of human fibrinogen, soluble fibrin and cross-linked insoluble fibrin. *Proc Natl Acad Sci (USA)*; 66: 738-744.
- 144) McLean JW, Tomlison JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Flees GM, Scanu AM, Lawn RM (1987). cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 330: 132-137.
- 145) Michelson AD, Bovill E, Andrew M (1995). Antithrombotic therapy in children. *Chest* 108: 506-522.
- 146) Miller GJ, Esnouf MP, Burgess AI, et al. (1997). Risk of coronary heart disease and activation of factor XII im middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 17: 2103-2106.
- 147) Miyata T, Kawabata S, Iwanaga S, Takahashi I, Alving B, Saito H (1989). Coagulation factor XII (Hageman factor) Washington D.C.: inactive factor XIIa results from Cys-571----Ser substitution. *Proc Natl Acad Sci USA*. Nov; 86 (21): 8319-8322.
- 148) Montgomery RR, Scott JP (1993). Hemostasis: Diseases of the fluid Phase. In: Nathan DG, Oski FA (eds) *Hematology of infancy and childhood* W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokio; Bd. 2, 4. Aufl.:1605-1650.
- 149) van Mourik JA, Lawrence DA, Loskutoff DJ (1984). Purification of an inhibitor of plasminogen activator (antiactivator) synthesized by endothelial cells. *J Biol Chem*; 159: 14914-14921.
- 150) Mudd SH, Levy HL, Skoby F (1989): Disorders of transulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Mc. Graw H: *The metabolic basis of inherited disease*. New York: 693.
- 151) Müller-Berghaus G (1998). Hämostaseologie. In: Müller-Berghaus G, Pötsch B (ed.). *Hämostaseologie*. Springer, Berlin: XI-XIII.

- 152) Müller-Berghaus G, Pötsch B (1998). Hämostaseologie, Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 153) Muller AD, van Dorm JM, Hemker HC (1977). Heparin-like inhibitor of blood coagulation in normal newborn. *Nature* 267: 616-617.
- 154) Muntean AD, Finding K, Gamillscheg A, Zenz W (1992). Multiple thrombosis and coumarin-induced skin necrosis in young child with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemorrh Disorders*; 5: 43-45.
- 155) Nardi M, Karpatkin M (1986). Prothrombin and protein C in early childhood: normal adult levels are not achieved until the fourth year of life. *J Pediatr*. Nov; 109 (5): 843-845.
- 156) Nemerson Y, Furie B (1980). Zymogens and cofactors of blood coagulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 9: 45-85.
- 157) Nishimura M, Shimada J, Ito K, Kawachi H, Nishiyama K (2000). Acute arterial thrombosis with antithrombin III deficiency in nephrotic syndrome: report of a case. *Surg today* 30: 663-666.
- 158) Nowak-Göttl U, Koch HG, Aschka I, Kohlhase B, Vielhaber H, Kurlemann G, Olescuk-Raschke K, Kehl HG, Jürgens H (1996). Resistance to activated protein C (APCR) in children with venous or arterial thromboembolism. *Brit J Haematol* 92: 992-998.
- 159) Nowak-Göttl U, Debus O, Findeisen M, Kassenböhmer R, Koch HG, Pollmann H, Postler C, Weber P, Vielhaber H (1997). Lipoprotein(a): Its role in childhood thromboembolism. *Pediatr Vol 99 No. 6*: E 11.
- 160) Nowak-Göttl U, Auberger M, Halimeh S, Junker R, Klinge J, Kreuz WD, Ries M, Schlegel N (1999). Thrombolysis in newborns and infants. *Thromb Haemost*; 82 (Suppl 1): 112-116. (1999a)
- 161) Nowak-Göttl U, Junker R, Hartmeier M, Koch HG, Münchow N, Assmann G, von Eckardstein A (1999). Increased lipoprotein(a) is an important risk factor for venous thromboembolism in childhood. *Circulation*; 100: 743-748. (1999b).
- 162) Nowak-Göttl U, Sträter R, Heinicke A, Junker R, Koch HG, Schuierer G, Eckardstein A (1999). Lipoprotein(a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin, and methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of spontaneous ischemic stroke. *Blood*; 94: 3678-3682. (1999c)
- 163) Nowak-Göttl U, Duering C, Kempf-Bielack B, Sträter R (2003). Thromboembolic diseases in neonates and children. *Pathophysiol Haemost Thromb*. Sep-2004 Dec; 33(5-6): 269-274.
- 164) Odegard OR, Abilgaard U. (1977). Antithrombin III: critical review of assay methods. Significance of variations in health and disease. *Haemostasis*; 7: 127-134.
- 165) Ogasawara MS, Linuma Y, Aoki K, Katano K, Ozaky Y, Suzoromi, K (2001). Low-dose aspirin is effective for treatment of recurrent miscarriage in patients with decreased coagulation factor XII. *Fertil Steril*; 76: 203-204.
- 166) Oguchi S, Ito D, Murata M, et al (2000). Genotype distribution of the 46 C/T polymorphism of its association with ischemic cerebrovascular disease. *Thromb Haemost*; 83: 178-179
- 167) Olds RJ, Lane DA, Mille B, Chowdhury V, Thein SL (1994). Antithrombin: the principal inhibitor of thrombin. *Semin Thromb Haemost*; 20 (4): 353-372.
- 168) Ossei-Gerning N, Mansfield MN, Stickland MH, Wilson IJ, Grant PJ (1997). Plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G5%g genotype and plasma levels in relation to a history of myocardial infarction in patients characterized by coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 17: 33-37.

- 169) Ossowski L, Russo-Payne H, Wilson EL (1991). Inhibition of urokinase-type plas-minogen activator by antibodies: the effect on dissemination of a human tumor in the nude mouse. *Cancer Res.* Jan 1;51(1):274-81.
- 170) Pabinger I, Schneider B (1996). Thrombotic risk in hereditary antithrombin III, protein C or protein S deficiency. A cooperative, retrospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 742-748.
- 171) Panicucci F, Sagripanti A, Conte B, et al. (1980). Antithrombin III, heparin cofactor and antifactor Xa in relation to age, sex and pathological condition. *Haemostasis* 9: 297.
- 172) Pauer HU, Burfeind P, Kostering H, Emons G, Hinney B (2003). Factor XII deficiency is strongly associated with primary recurrent abortions. *Fertil Steril*, 80: 590-594.
- 173) Pengo V, Biasiolo A, Brocco T, Tonetto S, Ruffatti A (1996). Autoantibodies to phospholipid-binding plasma protein in patients with thrombosis and phospholipid-reactive antibodies. *Thromb Haemost*; 75: 721-724.
- 174) Perez-Montes R, Sedano C, Yanez L, Perez-Puente A, Vallverdu H, Hernandez JL, Iriando A (2005). Deep venous thrombosis, protein S deficiency and homozygous factor XII 46T mutation. *Eur J Pediatr* 164: 591-593.
- 175) Perona A, Galligani L (1995). The clinical syndrome associated with antiphospholipid antibodies. A diagnosis to be confirmed after a long follow-up. *Minerva Pediatr*; 47: 39-41.
- 176) Peters M, Cate J, Jansen E, Breederveld C (1985). Coagulation and fibrinolytic factors in the first week of life in healthy infants. *J Pediatr*. 106 (2): 292-295.
- 177) Pfarrer C, Ebert B, Miglino MA et al. (2001). The three dimensional fetomaternal vascular interrelationship during early bovine placental development: a scanning electron microscopic study. *J Anat* 198: 591-602.
- 178) 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.
- 179) Priglinger U, Binder BR (1999). Gewebeplasminogenaktivator: Biochemie, Molekular-biologie und Physiologie. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg). *Haemostaseo-logie*. Springer Verlag: 394-397.
- 180) Rapaport S et al. (2000). Coagulation problems in liver disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 11: 69-74.
- 181) Ratnoff OD, Busse RJ, Sheen RP (1968). The Demise of Mr. Hageman. *New Eng J Med*; 279: 760-761
- 182) Ratnoff OD, Colopy JE (1955). A familial hemorrhagic trait association with a deficiency of a clot promoting fraction from plasma. *J Clin Invest*; 34: 602-613.
- 183) Rees MM, Rodgers GM (1993). Homocysteinemia: Association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. *Thromb Res* 71: 337-359.
- 184) Renne T, Pozgayova M, Grüner S et al. (2005). Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med*. 202: 271-281.
- 185) Revak SD, Cochrane CG, Griffin JH (1974). Structural changes accompanying enzymatic activation of human Hageman factor. *J Clin Invest*; 54: 619.

- 186) Revak SD, Cochrane CG (1976). The relationship of structure and function in human Hageman factor. The association of enzymatic and binding activities with separate regions of the molecule. *J Clin Invest*; 57: 852-860.
- 187) Rodeghiero F, Castaman G, Ruggeri M, Tassetto A (1992). Thrombosis in subjects with homozygous and heterozygous factor XII deficiency. In: *Thromb Haemost* 67: 590.
- 188) Roldan V, Corral J, Martin F et al. (2005). Synergistic association between hyper-cholesterolemia and the C46T factor XII polymorphism for developing premature myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 94 (6): 1294-1299.
- 189) Rosendaal FR, Reitsma PH (2004). Genetic studies in complex disease. *J Thromb Haemost* 2 (2): 342.
- 190) Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JI (1987). Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Mol Genet*. May, 13(3): 285-292.
- 191) Royle NJ, Nigli M, Cool D, MacGillivray RTA, Hamerton JL (1988). Structural gene encoding human factor XII is located at 5q33-qter. *Somat Cell Mol Genet* 14: 217.
- 192) Rust, S, Funke H, Assmann G (1993). Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection. *Nucleic Acids Res*; 21: 3623-3629.
- 193) Sakata Y, Curriden S, Lawrence D, Griffin JH, Loskutoff DJ (1985). Activated protein C stimulates the fibrinolytic activity of cultured endothelial cells and decreases antiactivator activity. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 82: 1121-1125.
- 194) Scanu AM (1992). Lipoprotein(a) – link between structure and morphology. *Ann Epidemiol* 2: 407-412.
- 195) Schlösser M, Engel W (1996). Mutationen im Faktor XII-Gen. In: Herrmann FH (Hrsg.). *Molekulargenetik Hereditärer Hämostasedefekte*, Pabst Science Publishers Lengerich, Berlin, Düsseldorf, Leipzig, Riga, Scottsdale (USA), Wien, Zagreb: 91-98.
- 196) Schloesser M, Zeerleder S, Lutze G, Halbmayr WM, Hofferbert S, Hinney B, Koestering H, Lämmle B, Pindur G, Thies K, Köhler M, Engel W (1997). Mutations in the human factor XII gene. *Blood*; 90: 3967-3977.
- 197) Schmidt RF, Thews G (1995). *Physiologie des Menschen*. 26. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York.
- 198) Schwalbe R, Dahlback B, et al. (1990). Assembly of protein S and C4b-binding protein on membranes. *J Biol Chem* 265: 16074.
- 199) Sie P, Dupouy D, Pichon J, Boneu B (1985). Constitutional heparin cofactor II deficiency associated with recurrent thrombosis. *Lancet*; 2 (8452): 414-416.
- 200) Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A, Martinez-Marchan E, Mateo J, Borrell M, Stone W, Lathrop M, Fontcuberta J, Blangero J (2002). A quantitative-trait locus in the human factor XII gene influences both plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease. *Am J Hum Genet*; 70: 567-74.
- 201) Souto JC, Gari M, Falkon L, Fontcuberta, J (1996). A new case of hereditary histidinuric glycoprotein deficiency with familial thrombophilia. *Thromb Haemost* 75: 374-375.
- 202) Sprengers ED, Kluft C (1987). Plasminogen activator inhibitors. *Blood*. 69 (2): 381-387.
- 203) Stiko-Rahm A, Wiman B, Hamsten A, Nilsson J (1990). Secretion of plasminogen inhibitor-1 from cultured human umbilical vein endothelial cells is induced by very low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*; 10: 1067-1073.

- 204) Sutor AH (1992). Einleitung. In: Sutor AH (Hrsg) Thrombosen im Kindesalter. Risikofaktoren-Diagnose-Prophylaxe-Therapie. Editiones Roches, Basel.
- 205) Sutor AH, Engelhardt W, Mehraïn S, Uhl M, Zuborn K.-H. (1996). Antikoagulation bei Thrombosen im Kindesalter: internationales Symposium, Freiburg/Titisee, 12. und 13. Juli 1996. Schattauer, Stuttgart New York: 255-289.
- 206) Svensson PJ, Dahlbäck B (1994). Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *New Engl J Med* 330: 517-522.
- 207) Thaler E, Lechner K (1981). Antithrombin III deficiency and thromboembolism. *Clin Haematol*; 10: 369.
- 208) Thiemann F (2002) Molekularbiologische Diagnostik. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und weitere Nukleinsäureamplifikationstechniken. MTA-Praxis. Hoppenstedt publishing. Darmstadt 2002.
- 209) Thomas L (1998). Labor und Diagnose. TH-Books Verlagsgesellschaft GmbH. Frankfurt/Main. 574.
- 210) Thompson RE, Mandle RRJr, Kaplan AP (1977). Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J Clin Invest*; 60: 1376-1380.
- 211) Tirado, I, Soria JM, Mateo J et al. (2004). Association after linkage analysis indicates that homozygosity for the 46C→T polymorphism in the F12 gene is a genetic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 91(5): 899-904.
- 212) Tollefsen DM, Blank MK (1981). Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J Clin Invest*; 68: 586-596.
- 213) Tollefsen DM, Pestka CA, Monafó WJ (1983). Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. *J Biol Chem*; 258: 6713-6716.
- 214) Tran TH, Marbet GA, Duckert F (1985). Association of hereditary heparin cofactor II deficiency with thrombosis. *Lancet*; 2 (8452): 413-414.
- 215) Trousseau A (1865). Phlegmatia alba dolens. *Clin Med Hotel-Dieu, Paris*: 695-727.
- 216) Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, Duba HC, Kemmler HG, Seitz C (1987). LP(a) glycoprotein phenotypes: Inheritance and relation to LP(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Invest* 80: 458-465.
- 217) Utermann G (1989). The mysteries of lipoprotein(a). *Science* 246: 904-910.
- 218) Virchow R (1847). Zur pathologischen Physiologie des Blutes. *Virch Arch* 1: 546-583.
- 219) Walch K, Riener EK, Tempfer CB et al. (2005). The C46T polymorphism of the coagulation factor XII gene and idiopathic recurrent miscarriage. *BJOG*. Oct; 112 (10): 1434-1436.
- 220) Walsh PN (1985). Platelet-mediated coagulant protein interactions in hemostasis. *Semin hemat* 22, 178.
- 221) Walker, FJ (1980). The regulation of activated protein C by a new protein: the possible function of bovine protein S. *J Biol Chem*. 255: 5521.
- 222) Walker FJ (1981). Regulation of protein C by protein S: the role of the cofactor protein in species specificity. *Thromb Res*. 22: 321.
- 223) Walker FJ (1981). Regulation of protein C by protein S: the role of phospholipid in factor Va inactivation. *J Biol Chem*. 256: 11128.
- 224) Walker FJ, Chavin SI, Fay PJ (1987). Inactivation of factor VIII by activated protein C and protein S. *Arch Biochem Biophys*. 252: 322.

- 225) Wallen P, Pohl G, Bergsdorf N, Randby M, Ny T, Jorntall H (1983). Structural characterization of tissue plasminogen activator purified by immunosorbent chromatography. In: Davidson JF, Bachmann F, Bouvier CA, Kruithof EKO (eds) Progress in fibrinolysis. Vol 6 Churchill Livingstone, Edinburgh: 338-343.
- 226) Weiss C, Jelkmann W (1997). Funktionen des Blutes. In: Schmidt RF, Thews G (Hrsg.). Physiologie des Menschen; 27. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York: S. 427-435.
- 227) Willike A, Gerdson F, Rupert M et al. (2002). Rationelle Thrombophiliediagnostik. Deutsches Ärzteblatt Jg99, Heft 31-32.
- 228) Williams 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.
- 229) Wimann B, Chmielewska J, Randby M (1984). Inactivation of tissue type plasminogen activator in plasma. Demonstration of a complex with a new rapid inhibitor. J Biol Chem; 259: 3644-3647.
- 230) Winter M, Gallimore M, Jones DW (1995). Should factor XII assays be included in thrombophilia screening? Lancet; 346: 52.
- 231) Xi M, Beguin S, Hemker HC (1989). Importance of factor IX dependent prothrombinase formation – the Josso pathway in clotting plasma. Haemostasis 19: 301-303.
- 232) Ye S, Green FR, Scarabin PY et al (1995). The 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with differences in PAI-1 activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. Thromb Haemost; 74: 837-841.
- 233) Zeerleder S, Schloesser M, Redondo M, Wuillemin WA, Engel W, Furlan M, Lämmle B (1999). Reevaluation of the incidence of thromboembolic complications in congenital factor XII deficiency. Thromb Haemost, 82: 1240-1246.
- 234) Zito F, Drummond F, Bujac SR, et al. (2000). Epidemiological and genetics associations of activated factor XII concentration with factor VII activity, fibrinopeptide A concentration, and risk of coronary heart disease, in men. Circulation; 102: 2058-2062.
- 235) Zur M, Radcliff RD, Oberdick J, Nemerson Y (1982). The dual role of factor VII in blood coagulation. Initiation and inhibition of a proteolytic system by a zymogen. J Biol Chem; 257: 5632-5633.

## 6. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schmidt RF, Thews G (1995). Schema der Blutgerinnung und Fibrinolyse. In:., S. 432.
- Abbildung 2: Virchowsche Trias: Ursachen der Thrombusentstehung
- Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur von Lipoprotein(a)
- Abbildung 4: Mannhalter (2001). Interaktion des Kontaktsystems. *XII* Faktor XII, *XIIa* aktiviertes FXII; *PK* Präkallikrein; *KK* Kallikrein; *HK* hochmolekulares Kininogen; *XI* Faktor XI, *XIIa* aktivierter Faktor XI, S. 128.
- Abbildung 5: Mannhalter (2001). Strukturvorschlag für den humanen Faktor XII. Die Disulfidbrücken sind durch Querverbindungen dargestellt und sind in Analogie zu Plasmin angeordnet. Die verschiedenen Domänen des Faktor XII (die Typ-I- und Typ-II-Domänen des Fibronektin, die Wachstumsfaktor- oder EGF-Domäne und die Kringel-Domäne) sind gekennzeichnet. Die katalytische Triade Histidin (H), Asparaginsäure (D) und Serin (S) ist gekennzeichnet, ebenso wie die Kallikreinspaltstelle bei Valin (V) und Asparagin (R ) 353, S. 126.
- Abbildung 6: Die Polymerase-Kettenreaktion
- Abbildung 7: Endler et al. 2001: Gel-Elektrophorese eines MS PCR Produktes. Die linke Linie zeigt ein Individuum, welches heterozygot für FXII C46T ist, die mittlere Linie zeigt die Bande für eine homozygote Faktor XII TT und die rechte Bande zeigt den Faktor XII 46C Wildtyp. Auf der rechten Seite sind die Allelen Genotype markiert, links sind die Längen der PCR Produkte aufgezeigt, S. 257.
- Abbildung 8: unter dem UV-Transluminator sichtbar gemachtes Ergebnis der PCR
- Abbildung 9: Box-Plot. Verteilung der medianen Faktor XII-Aktivität der jeweiligen Altersgruppen (1-4) bei der Kontrollgruppe (kontro) und der Patientengruppe (venös). Es besteht keine Altersabhängigkeit der Faktor XII-Aktivität.
- Abbildung 10: Medianwerte und Streubreite der Faktor XII-Aktivität der Kontrollgruppe (kontro) und der Kinder mit venösen Thrombosen (venös).

Die Fotos stammen aus dem Material der Studie.



## 7. Lebenslauf

-

## **8. Danksagung**

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Ulrike Nowak-Göttl, die mir das Thema dieser Dissertation zur Verfügung gestellt hat. Sie hat mich in jeder Phase dieser Arbeit unterstützt, ohne ihre Betreuung und ihr Engagement wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

Für ihre Aufmunterung, Motivation und Unterstützung möchte ich auch meiner Familie danken, meinen Eltern und meinen drei Schwestern Nazife, Döne und Sonya.

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich herzlich bei Stefanie Paulin, Marwa Salem und Rüdiger Kurtz und Peter Beckemeyer.