

Der Einfluss gerinnungsphysiologisch relevanter Polymorphismen auf zerebrale  
Ischämien in einer populationsbasierten Fall-Kontroll-Studie

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

Kerstin Smolka geb. Schnez  
Wilhelmshaven

**2008**

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Pohl
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Johannes Oldenburg

Tag der Mündlichen Prüfung: 28.07.2008

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53105  
Bonn.

Direktor: Prof. Dr. med. T. Klockgether

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.



<b>3 Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1 Beschreibung des Kollektivs	37
3.2 Genotypisierung der Kontrollprobanden	38
3.3 Vergleich der Genotypen in der Schlaganfallgesamtgruppe mit Kontrollprobanden	38
3.4 Abhängigkeit der Schlaganfallätiologie von Alter und Geschlecht	39
3.5 Darstellung der vaskulären Risikofaktoren und ihr Bezug zur Schlaganfallätiologie	41
3.6 Vergleich der Polymorphismen der Faktoren II, V, und XIII und Ihr Vorkommen in Abhängigkeit von der Schlaganfallätiologie	42
3.7 Vergleich der Polymorphismen der Faktoren II, V, und XIII bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit vom Geschlecht	47
3.8 Vergleich der Polymorphismen der Faktoren II, V, und XIII bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit vom Alter	48
<b>4 Diskussion</b>	<b>52</b>
4.1 Populationsgenetische Effekte	54
4.2 Studienumfang	54
4.3 Gen-Umgebungseffekte	55
4.4 Interaktion verschiedener Gen-Orte	56
4.5 Fazit	58
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>60</b>
6.1 Danksagung	60
6.2 Votum der Ethikkommission	61
6.3 Patienteninformation/Einverständniserklärung	63
<b>7 Tabellenverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>

# 1 Einleitung

Ischämische zerebrale Insulte gehören zu den häufigsten Mortalitäts- und Morbiditätsursachen in den westlichen Industrienationen. Ätiologisch sind zerebrale Ischämien am häufigsten auf eine atherosklerotische Gefäßerkrankung der hirnversorgenden Arterien oder auf kardial bedingte Embolien zurückzuführen. Allerdings bleiben auch nach Durchführung einer ausführlichen Ursachensuche ca. 20-30% aller zerebralen Ischämien ätiologisch ungeklärt. Der ischämische zerebrale Insult gilt als typisches Beispiel für eine Erkrankung, die entscheidend von Umwelteinflüssen und Umgebungsfaktoren hervorgerufen wird. Trotzdem ist der zerebrale ischämische Insult nicht allein Folge prädisponierender exogener Risikofaktoren. Vielmehr verweisen epidemiologische Untersuchungen darauf, dass Schlaganfälle und andere vaskuläre Erkrankungen familiär gehäuft auftreten und damit von erblichen Faktoren beeinflusst werden (Kiely et al., 1993; Brass et al., 1993; Brass et al., 1996; de Faire et al., 1975).

Obwohl genetische Marker zu den nicht modifizierbaren Risikofaktoren ischämischer Erkrankungen zählen, kann ihr Nachweis bei der Identifizierung von Hochrisikopatienten, die einer besonders rigorosen Kontrolle vaskulärer Risikofaktoren bedürfen, von klinischem Nutzen sein. So konnten jüngste Studien verschiedene genetische Risikofaktoren identifizieren, die auf die Ausprägung klassischer vaskulärer Risikofaktoren wie der arteriellen Hypertonie, der Hypercholesterinämie und des Diabetes mellitus einen Einfluss ausüben. Bei Patienten ohne erkennbare Ursache eines ischämischen Schlaganfalls (kryptogener zerebraler Insult) stellt sich außerdem die Frage, in wie weit eine genetisch bedingte Störung der Blutgerinnung für das Auftreten des Schlaganfalls verantwortlich gemacht werden kann.

In diesem Kontext untersucht die vorliegende Arbeit die Assoziation von drei Polymorphismen, die Proteine des Gerinnungssystems betreffen (Faktor-V-Leiden (FVL), Prothrombin g.20210G>A, Faktor XIII Val34Leu), mit zerebralen Ischämien. Die Bedeutung des hinsichtlich seiner klinisch-epidemiologischen Bedeutung bisher wenig untersuchten Polymorphismus in Faktor XIII soll mit der Bedeutung der etablierten Risiko-Polymorphismen in Faktor V und Prothrombin verglichen werden. Diese Doktorarbeit soll zur Entscheidungsfindung beitragen, ob es sinnvoll ist, bei Patienten

mit zerebralen Ischämien verschiedener Ursachen diese Polymorphismen zu bestimmen. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit waren der FVL- und der Prothrombin-Polymorphismus Bestandteil des Thrombophilie-Diagnostik-Programms des hämostasiologischen Instituts des Universitätsklinikums Bonn.

## 1.1 Faktor II – Funktion, Struktur, Molekularbiologie

Prothrombin (Faktor II) ist eine inaktive Vorstufe des Thrombins, welches ein Schlüsselenzym der plasmatischen Gerinnung ist und prokoagulatorische, antikoagulatorische sowie antifibrinolytische Aktivitäten zeigt (Bertina et al., 1992). Durch Spaltung wird Prothrombin in die aktive Form überführt, welche Fibrinogen in Fibrin umwandelt.

Das Prothrombin-Gen liegt auf Chromosom 11 in Position 11p11-q12 (Royle et al., 1987), enthält 14 Exons und ist 21 kb lang (Degen and Davie, 1987).

Eine genetische Variante des Prothrombins ist ein G>A Basenaustausch an Position g.20210 in der 3'-nichttranslatierten Sequenz des Prothrombins, die zu einer erhöhten Transkription und somit zu einer vermehrten Prothrombin- und Thrombin-Aktivität führt. Heterozygot für die g.20210G>A-Mutation sind ein bis drei Prozent der Normalbevölkerung (Cumming et al., 1997). Träger des g.20210A-Allels haben ein annähernd dreifach erhöhtes Risiko venöser Thrombosen (Poort et al., 1996). Bezüglich des mit der Prothrombin-Mutation verbundenen Risikos arterieller Erkrankungen ist die Studienlage hingegen widersprüchlich. Einige Studien konnten ein erhöhtes Risiko arteriell-vaskulärer Ereignisse durch die g.20210G>A Mutation nachweisen. Rosendaal et al. (1997) zeigten beispielsweise, dass das Herzinfarkttrisiko bei Frauen mit der g.20210G>A Mutation um das Vierfache erhöht ist, und Doggen et al. (1998) zeigten, dass das Myokardinfarkttrisiko bei Männern um das 1,5-fache erhöht ist. De Stefano et al. (1999) wiesen in einem Kollektiv juveniler Patienten mit zerebralem Insult eine Prädisposition für zerebrale Insulte durch die Prothrombin g.20210G>A-Mutation nach.

Andere Studien wie z. B. von Ridker et al. (1999), die eine Gruppe von 14.916 US-amerikanischen Männern mit Herzinfarkt und Schlaganfall hinsichtlich der Prothrombin-g.20210G>A-Mutation untersuchten, konnten im Gegensatz zu oben genannten Studien

keine Assoziation mit erhöhtem Schlaganfall- oder Herzinfarkttrisiko nachweisen. Auch Prohaska et al. (1999) stellten in einer Studie an 284 Patienten aus Nordrheinwestfalen in Deutschland mit koronarer Herzerkrankung keine erhöhte Prävalenz der g.20210G>A Mutation fest. So auch Longstreth et al. (1998) (526 Frauen zwischen 18 und 44 aus dem US-Bundesstaat Washington) und Bentolila et al. (1997) (125 weiße französische Patienten jünger als 45), die in ihren Studien an Schlaganfallpatienten ebenfalls keine Assoziation der Prothrombin-g.20210G>A-Mutation mit zerebralen Insulten nachwiesen. Corral et al. (1997) untersuchten 287 Herzinfarkt- und Schlaganfall-Patienten in Spanien und kamen zu dem Schluss, dass das g.20210G>A-Allel kein relevanter Risikofaktor für arteriell-thrombotische Ereignisse ist. Aufgrund dieser widersprüchlichen Daten, die allenfalls teilweise durch einen unterschiedlichen Einfluss des g.20210G>A-Allels in Abhängigkeit von der entsprechenden Ethnizität zu erklären sein könnten, erscheinen weitere epidemiologische Untersuchungen zur Bedeutung dieses genetischen Risikofaktors sinnvoll.

## **1.2 Faktor V – Funktion, Struktur, Molekularbiologie**

Faktor V ist ein Protein der plasmatischen Gerinnung und gehört zur Gruppe der  $\alpha$ -Globuline. Im Gegensatz zu anderen Gerinnungsfaktoren hat es keine enzymatische Funktion, sondern fungiert als Kofaktor: Faktor Va (aktivierter Faktor V) ist ein essentieller Kofaktor für die durch Faktor Xa katalysierte Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin. Faktor V wird von Thrombin in seine aktive Form gebracht, in dem es in zwei Ketten, eine leichte und eine schwere, gespalten wird, die nicht kovalent durch Kalzium aneinander gebunden sind (Kane et al., 1987).

Faktoren, welche die Blutgerinnung vermindern, sind Protein C, Protein S und Thrombomodulin. Thrombomodulin bildet mit Protein C und S unter Anwesenheit von Kalziumionen einen Komplex, der Faktor V mittels Proteolyse abbaut und wirkungslos macht. Der Thrombomodulin / Protein C / Protein S-Komplex wiederum wird durch Thrombin aktiviert (Marlar and Griffin, 1980), was dazu führt, dass aktivierter Faktor V vermindert wird.

Das Gen für den Gerinnungsfaktor V liegt auf dem ersten Chromosom (1q23), ist über 70 kb groß und enthält 25 Exons (Jenny et al., 1987). Es sind verschiedene Mutationen des Faktor-V-Gens bekannt. Der angeborene Faktor-V-Mangel, der autosomal rezessiv vererbt wird, ist in homozygoter Ausprägung sehr selten und verursacht eine milde Verlaufsform der Hämophilie, das sogenannte Owren-Syndrom. Die heterozygote Form tritt dagegen häufiger auf und bleibt meistens unerkannt, da sie keine signifikante Blutungszeitverlängerung oder signifikantes Blutungsrisiko aufweist (Zehnder et al., 1999).

Andere Mutationen des Faktor-V-Gens sind Ursache venöser Thrombosen. Die häufigste stellt hierbei die Faktor-V-Leiden-Mutation dar, bei der durch eine Punktmutation die Aminosäure Arginin durch eine Glutamin-Aminosäure an der 506. Stelle (R506Q) ersetzt wird (Bertina et al., 1994).

Diese bewirkt, dass die Bindungsstelle von aktiviertem Protein C blockiert ist und es somit zu einer Resistenz des Faktor Va gegen Spaltung und Inaktivierung durch aktiviertes Protein C kommt (Greengard et al., 1994; Zöller and Dahlbäck, 1994). Daher bleibt er aktiv und verstärkt die Bildung von Thromben (Koster et al., 1993). Die Heterozygotenfrequenz der Faktor-V-Leiden-Mutation liegt bei drei bis fünf Prozent (Bertina et al., 1994).

Ob die Faktor-V-Leiden-Mutation einen Einfluss auf arterielle Geschehnisse wie z. B. den Herzinfarkt hat, bleibt nach der aktuellen Datenlage ungeklärt. Einige Studien, deren Fallzahlen zwischen 112 und 560 Patienten lagen, fanden eine Assoziation (Doggen et al., 1998; Rosendaal et al., 1997; Holm et al., 1994; März et al., 1995), in anderen Studien von Patienten (Umfang zwischen 100 und 14.916 Patienten) mit koronarer Herzerkrankung wurde kein Einfluss der Faktor-V-Leiden-Mutation beobachtet (Ridker et al., 1995; Emmerich et al., 1995; Van Bockxmeer et al., 1995; Ardissio et al., 1996).

Die Rolle von Faktor-V-Leiden speziell in Hinsicht auf zerebrovaskuläre Ischämien ist ebenfalls fraglich. Einige Studien mit einem Umfang von 66 bis 14.916 Patienten fanden keinen Zusammenhang zwischen zerebrovaskulären Ereignissen und der Faktor-V-Leiden-Mutation, wie z. B. Lalouschek et al. (1999), Longstreth et al. (1997), Sanchez et al. (1997), Rosendaal et al. (1997), Ridker et al. (1995), Kontula et al. (1995) und Markus et al. (1996).



In anderen Studien (Fallzahlen zwischen 30 und 50 Patienten) gibt es jedoch Hinweise auf eine mögliche Rolle der Faktor-V-Leiden-Mutation in selektierten Schlaganfall-Gruppen (Zenz et al., 1998; Albucher et al., 1996; De Lucia et al., 1996).

### **1.3 Faktor XIII – Funktion, Struktur, Molekularbiologie**

Faktor XIII ist ein nicht proteolytisch wirkendes Enzym der plasmatischen Gerinnungskaskade, das End-polymerisierte Fibrinmonomere untereinander kovalent vernetzt, so dass ein mechanisch stabilisiertes, quervernetztes Fibringerinnsel entsteht (Lorand, 2001). Darüber hinaus bewirkt Faktor XIII eine Stabilisierung des gebildeten Fibringerinnsels durch Einbau von Fibrinolyseinhibitoren ( $\alpha_2$ -Antiplasmin und Plasminogenaktivatorinhibitor) sowie eine Verankerung des Fibringerinnsels mit extrazellulärer Matrix durch Quervernetzung von Fibrin mit Adhäsivproteinen (z.B. Kollagen, Fibronectin, Vitronectin und von-Willebrand-Faktor) (Ichinose and Davie, 1988; Mikkola et al., 1994; Elbaz et al., 2000).

Faktor XIII wurde vor über 80 Jahren von Barkan und Gaspar entdeckt (Barkan und Gaspar, 1923). In der Vergangenheit wurde er vor allem im Zusammenhang mit einem angeborenen Faktor-XIII-Mangel untersucht. Dieser führt zu einer Blutungsneigung und Wundheilungsstörung (Egbring et al., 1998). Patienten mit einem Faktor-XIII-Mangel weisen meist einen kompletten Mangel der A-Untereinheit auf, bedingt durch verschiedene Mutationen im Gen der A-Untereinheit von Faktor XIII (Kohler und Schröder, 2002).

Der plasmatische Faktor XIII hat ein Molekulargewicht von circa 320kDa und besteht aus tetrameren Komplexen aus je zwei identischen Untereinheiten A und B ( $A_2B_2$ ) (Schwarz et al., 1973). Von diesen Untereinheiten übernimmt die A-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von circa 83kDa die enzymatische Aktivität und beinhaltet die Thrombinbindungsstelle. Hauptsyntheseort für den plasmatischen Faktor XIII ist das Leberparenchym (Weisberg et al., 1987). Die physiologische Faktor-XIII-Konzentration beträgt 10-20  $\mu\text{g/ml}$  (Yorifuji et al., 1988). Während die B-Untereinheit von Faktor XIII ausschließlich im menschlichen Plasma und in Hepatozyten nachgewiesen werden konnte, findet sich die A-Untereinheit in verschiedenen anderen Geweben und Zellen

(Prostata, Uterus, Plazenta Endothelzellen, glatte Muskelzellen; Nagy et al., 1988). Insbesondere kann Faktor XIII aus Thrombozyten isoliert werden. Hier besteht er aus 2 A-Untereinheiten ( $A_2$ ) und wird als „thrombozytärer“ Faktor XIII bezeichnet (McDonagh et al., 1969).

Faktor XIII wird in mehreren Zwischenschritten aktiviert: Initial wird durch Thrombin am terminalen Ende der  $\alpha$ -Kette ein Aktivierungspeptid mit einem Molekulargewicht von 4,5kDa abgespalten. Das entstandene Intermediärprodukt ist aus sterischen Gründen nur schwach enzymatisch wirksam. In Anwesenheit von Kalziumionen wird die volle enzymatische Wirksamkeit erst in der Dissoziation der B-Untereinheiten erreicht. Dieser Aktivierungsschritt wird erheblich in Anwesenheit von Fibrinogen beziehungsweise Fibrin beschleunigt. Im Gegensatz zu Thrombin wird Faktor XIII von anderen Enzymen des Hämostasesystems wie Faktor Xa und Kallikrein nur schwach aktiviert. Aktivierter Faktor XIII ( $F\ XIII-A_2^*$ ) katalysiert die Bildung einer Amidbindung zwischen der  $\gamma$ -Carboxylgruppe des Glutamins und der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins (Lewis et al., 1985; Naski et al., 1991; Janus et al., 1983; Greenberg et al., 1985; Greenberg et al., 1987). Entscheidend für die Möglichkeit dieser Reaktion ist dabei die sterische Anordnung von Lysin- und Glutaminresten in Substratproteinen. In diesem Sinne stellt End-zu-End polymerisiertes Fibrin das wesentliche Substrat der Faktor-XIII-Enzymaktivität dar. End-zu-End polymerisierte Fibrinmonomere werden durch Faktor XIII  $A_2^*$  kovalent miteinander vernetzt. Dabei werden Amidbindungen zwischen zwei Ketten der Fibrinmoleküle gebildet. Als Bindungsstellen fungieren, vom n-terminalen Ende des Fibrinmoleküls aus gesehen, ein Lysin in Position 406 und ein Glutamin in Position 398. Diese Form der Quervernetzung wird als DD-Trans-Kontakt bezeichnet. Es kommt dann zur Ausbildung von quervernetzten Fibrinpolymeren im Sinne von sogenannten D-Trimeren und D-Tetrameren (Weisel et al., 1993; Spraggon et al., 1997).

In einem komplexen Prozess werden neben den  $\gamma$ -Ketten der Fibrinmoleküle auch  $\alpha$ -Ketten durch Faktor XIII kovalent vernetzt. An dieser Reaktion sind fünf bis sechs  $\alpha$ -Ketten beteiligt, die Reaktionsgeschwindigkeit der Quervernetzung der  $\alpha$ -Ketten liegt bei circa 24 Stunden (Cottrell et al., 1979). Weitere Substrate für die Wirkung von Faktor XIII- $A_2^*$  sind Fibrinogenmoleküle, wobei die Reaktionsgeschwindigkeiten um zwei Zehnerpotenzen langsamer sind als im Falle von Fibrin (Siebenlist et al., 1996). Darüber

hinaus kann über ein Glutamin in Position zwei der N-terminalen Kette des  $\alpha_2$ -Antiplasminmoleküls eine Quervernetzung an ein Lysin der  $\alpha$ -Kette von Fibrin erfolgen, wodurch das Fibringerinnsel vor einer durch Plasmin induzierten Lyse geschützt wird (Sakata and Aoki, 1980; Kimura and Aoki, 1986). Weitere Substrate der Faktor XIII-A<sup>\*</sup>-Wirkung sind die kontraktilen Proteine Aktin und Myosin sowie die Adhäsivproteine von-Willebrand-Faktor, Vitronektin, Fibronektin, Thrombospondin und  $\alpha_2$ -Makroglobulin (Hada et al., 1986; Sane et al., 1988; Mosher et al., 1980; Mui and Ganguly, 1977; Cohen et al., 1979; Bale et al., 1985).

Das Gen der A-Untereinheit von Faktor XIII liegt auf Chromosom 6 in Position p24-25 und umfasst 7.156 Nukleotide (15 Exons). Das Gen der Faktor-XIII-B-Untereinheit besteht aus 2.613 Basenpaaren und kodiert 641 Aminosäuren. Es liegt auf Chromosom 1 in Position q32-q32.1 und enthält 12 Exons (Webb et al., 1989).

In dieser Arbeit soll der Val34Leu-Polymorphismus des Gens für die A-Untereinheit von Faktor XIII untersucht werden. Es handelt sich hierbei um eine Missense-Mutation, die zu einem Austausch der Aminosäure Valin an der Position 34 der Faktor-XIII-A-Untereinheit durch Leucin führt (Ariëns et al., 2002). Die Allel-Frequenz dieses Polymorphismus liegt in verschiedenen Untersuchungskollektiven bei circa 25% (Ariëns et al., 2002). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz des Leucin-Allels bei Patienten mit zerebralen Infarkten, kardialen Infarkten oder Venenthrombosen niedriger ist als in Kontrollkollektiven (Ariëns et al., 2000). Der Aminosäureaustausch des Val34Leu-Polymorphismus befindet sich drei Aminosäuren entfernt von der Thrombinbindungsstelle. Verschiedene Studien weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass dieser Polymorphismus zu einer Änderung der Thrombin-induzierten Aktivierung von Faktor XIII führt (Sadasivan und Yee, 2000; Balogh et al., 2000). So konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass das Leucin-Allel zu einer erhöhten Bindungsrate von aktiviertem Faktor XIII führt (Ariëns et al., 2000). Dieser Befund entsteht offensichtlich im Zusammenhang mit einer erhöhten Aktivierungsrate von Faktor XIII durch Thrombin, wodurch mittelbar die Struktur der gebildeten Fibringerinnsel beeinflusst wird. So zeigen Fibringerinnsel von Probanden mit einem Faktor XIII Val34Leu-Polymorphismus eine reduzierte Massen/Längen-Ratio sowie eine erhöhte Porosität der gebildeten Fibrinfilamenten (Ariëns et al., 2002). Es kann darüber spekuliert

werden, ob diese Veränderung der Fibrinstruktur mit einer Verminderung der Stabilität von Fibringerinnseln sowie einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber lytischen Prozessen assoziiert ist.

Trotz der Tatsache, dass es sich bei dem Austausch von Valin durch Leucin um eine verhältnismäßig konservative Änderung handelt – die einzige Differenz zwischen diesen beiden Aminosäuren besteht in einer zusätzlichen  $\text{CH}_2$ -Gruppe der Leucin-Seitenkette – hat der Val34Leu-Polymorphismus einen signifikanten Effekt auf die Faktor-XIII-Funktion (Kohler et al., 1998; Ariëns et al., 2000; Wartiovaara et al., 2000; Balogh et al., 2000; Trumbo und Maurer, 2000). So geschieht die Aktivierung der Leu34-Variante durch Thrombin schneller als die der Val34-Variante (Balogh et al., 2000; Trumbo und Maurer, 2000). Dieser Effekt ist unabhängig von der Interaktion zwischen der Faktor XIII A- mit der B-Untereinheit, da sowohl die plasmatische als auch die Plättchen-Leu34-Variante schneller aktiviert werden als ihre Val34-Äquivalente (Wartiovaara et al., 2000; Ariëns et al., 2002). Die katalytische Effektivität der Thrombinwirkung ist durchschnittlich um das 2,5-fache erhöht ( $0,2\mu\text{ms}^{-1}$  der Val34-Aktivierung auf  $0,5\mu\text{ms}^{-1}$  Leu34-Aktivierung (Ariëns et al., 2000)).

Zwei Studien zum Mechanismus, welcher Faktor XIII zu einer stärkeren Thrombin-Aktivierung prädisponiert, legen nahe, dass sterische beziehungsweise strukturelle Effekte eine Rolle spielen: Balogh et al. (2000) berichteten, dass die Leu34-Variante des Faktor XIII in einer computergestützten Simulation der Faktor XIII-Struktur eine höhere Interaktionsenergie mit Thrombin als die Val34-Variante aufweist. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Sadasivan und Yee (2000), welche die Interaktion zwischen Thrombin und Faktor XIII für die verschiedenen Allele mittels computergestützter Kristallographie analysierten. Gestützt wurden diese Ergebnisse durch eine Studie von Trumbo und Maurer (2000) über die Hydrolyse und Konformation der Faktor XIII-A-Untereinheit.

### 1.3.1 Assoziation des Val34Leu-Polymorphismus mit vaskulären Ereignissen

Mehrere Studien haben gezeigt, dass der Val34Leu-Polymorphismus des Faktor XIII mit thrombotischen Ereignissen im arteriellen und venösen Stromgebiet assoziiert ist (siehe Tabelle 1). Dabei zeigte sich zunächst, dass das Leu34-Allel einen protektiven Einfluss gegenüber venösen thrombotischen Ereignissen zu haben scheint (Catto et al., 1999; Franco et al., 1999; Renner et al., 2000). Ähnliche Ergebnisse fanden sich hinsichtlich eines protektiven Effektes des Leu34-Allels auf das Auftreten myokardialer Ischämien. Im Bereich zerebrovaskulärer Erkrankungen konnte nachgewiesen werden, dass der Leu34-Polymorphismus zum einen mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten intrazerebraler Blutungen assoziiert ist (Catto et al., 1998), zum anderen zeigte sich ein protektiver Effekt des Leu34-Allels hinsichtlich ischämischer zerebraler Insulte.

Tabelle 1:

Assoziation des Leu-Allels des Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus mit Gefäß-Erkrankungen  
(Tabelle nach Vorlage und Übersetzung aus Ariëns, 2000)

Erkrankung	Assoziation mit Erkrankung	Anzahl der Patienten	Herkunft der Patienten	Autor
MI	+	398	Nordengland	Kohler et al., 1998
MI	+	470	Finnland	Wartiovaara et al., 1999
MI	+	150	Brasilien	Franco et al., 1999
MI	+	120	Norditalien	Gemmati et al., 2001
MI*	+	68	USA	Reiner et al., 2002
MI	-	201	Südfrankreich	Canavy et al., 2000
MI	-	423	USA	Aleksic et al., 2002
MI	-	101	Südspanien	Corral et al., 2000
MI	-	191	In England lebende Asiaten	Warner et al., 2001
CVD	-	104	Südspanien	Corral et al., 2000
BI	+	120	Norditalien	Gemmati et al., 2001
BI*	-	41	USA	Reiner et al., 2002
BI	+	456	Frankreich	Elbaz et al., 2000
BI	-	718	Österreich	Endler et al., 2003
ICH	+	612	Nordengland	Catto et al., 1998
ICH	+	130	Norditalien	Gemmati et al., 2001
ICH	-	201	Südspanien	Corral et al., 2000
ICH	-	718	Österreich	Endler et al., 2003

\*Alle Patienten sind junge Frauen

MI = Myokardial infarction (Myokardinfarkt)

BI = Brain infarction (Ischämischer Hirninfarkt)

CVD = Cerebrovascular disease (Zerebrovaskuläre Erkrankungen)

ICH = Intracerebral haemorrhage (Intrazerebrale Blutung)

+ = Assoziation mit Erkrankung

- = keine Assoziation mit Erkrankung

Vier Studien haben über keine signifikante Assoziation zwischen Leu34 und dem Risiko eines Myokardinfarkts berichtet (Corral et al., 2000; Canavy et al., 2000; Aleksic et al., 2002; Warner et al., 2001). In diesen Studien wurden respektiv 201 Patienten aus Südafrika, 423 Patienten aus den USA, 101 Patienten aus Südspanien und 191 in England lebende asiatische Patienten rekrutiert. Es wurden neben dem Val34Leu Polymorphismus auch andere Polymorphismen in der Faktor XIII A-Untereinheit mit in die Untersuchung einbezogen. Eine Studie von Kohler et al. (1999) konnte zeigen, dass keine Assoziation zwischen den drei anderen Polymorphismen (Pro564Leu, Val650Ile und Glu651Gln) und Myokardinfarkt besteht. In Bezug auf zerebrovaskuläre Erkrankungen zeigte eine große spanische Studie keine Protektion des Leu34-Allels in Bezug auf zerebrale Ischämien und keine Assoziation mit intrakraniellen Blutungen (Corral et al., 2000).

Auch Endler et al. (2003) fanden in ihrer Studie keinen Zusammenhang zwischen dem Faktor XIII Val34Leu-Polymorphismus und ischämischen oder hämorrhagischen Schlaganfällen.

## **1.4 Fragestellung**

Diese Arbeit untersucht die Assoziation der Faktor-XIII-Variante Val34Leu mit dem Auftreten zerebraler Ischämien im Vergleich zu den als Thrombophilie-Risikofaktoren etablierten Varianten Faktor II (Prothrombin) g.20210G>A und Faktor V R506Q (FVL-Mutation).

Die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Studien weisen darauf hin, dass mögliche Beziehungen zwischen den Polymorphismen und zerebrovaskulären Erkrankungen unter Umständen nicht sehr ausgeprägt sind. Zusammenfassend zeigten einige der Studien eine signifikante Assoziation der Risiko-Allele mit zerebrovaskulären Ereignissen, andere zeigten keine signifikante Assoziation, jedoch zeigte keine der publizierten Studien ein gegensätzliches Ergebnis, also Assoziation vaskulärer Ereignisse mit dem als protektiv angenommenen Allel, sodass die signifikanten Befunde wahrscheinlich keine statistischen Zufallsbefunde darstellen. Die vorliegende Doktorarbeit soll dazu beitragen, die Bedeutung dieser Polymorphismen für zerebrale

Ischämien näher zu untersuchen und als Entscheidungshilfe dienen, ob und in welchen Fällen diese Polymorphismen bei Patienten mit zerebraler Ischämie bestimmt werden sollten. Neben dem Gesamtkollektiv aus 182 deutschen Patienten der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Bonn und 500 Blutspendern als Kontrollen wurden Subgruppen untersucht, definiert durch Art der zerebralen Ischämie, Geschlecht und Alter.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Eingeschlossen wurden Patienten mit ischämischer zerebraler Ischämie, die in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Bonn (165 Patienten) oder in den Rheinischen Kliniken Bonn (17 Patienten) stationär behandelt wurden. Der Rekrutierungszeitraum erstreckte sich von Januar 1999 bis Juni 2000. Die Patienten wurden entweder während des stationären Aufenthalts oder anlässlich einer ambulanten Kontrolluntersuchung in die Studie eingeschlossen.

#### **2.1.1 Einschlusskriterien**

Vorraussetzung für den Studieneinschluss von Patienten war die hinreichend gesicherte Diagnose einer zerebralen Ischämie mit nachgewiesener zerebraler Läsion. Grundlage für diese Diagnose war neben der klinischen Symptomatik das Vorliegen einer zerebralen Bildgebung (CCT oder MRT). Klinisch wurde bei allen Patienten eine apoplektiform aufgetretene zerebrale Symptomatik gefordert, die sich mit einer Läsion in der nachfolgend angefertigten zerebralen Bildgebung deckte. Eine Persistenz der klinischen neurologischen Ausfälle bei nachgewiesener zerebraler Läsion wurde nicht gefordert. Bildgebend wurde bei allen Patienten der Nachweis einer Läsion gefordert,



die entsprechend neuroradiologischer Einschätzung eine für ischämische Läsionen typische Konfiguration und Lokalisation aufwies. Das Vorliegen einer initial nicht ausreichend konklusiven zerebralen Bildgebung bei typischen Befunden in einer zeitnah angefertigten Verlaufskontrolle schloss die Studienteilnahme nicht aus.

Die klinischen Kerndaten wurden von Ärzten der neurologischen Universitätsklinik Bonn sowie der Rheinischen Kliniken Bonn erhoben. Zusätzlich wurden alle Patienten von Doktoranden der neurologischen Universitätsklinik Bonn befragt und untersucht. Die neuroradiologische Beurteilung der zerebralen Bildgebung wurde von den entsprechenden Fachabteilungen der neurologischen Universitätsklinik Bonn sowie der Rheinischen Kliniken Bonn vorgenommen. Auf der Grundlage der hierbei gewonnenen Daten wurde die Studieneignung von Herrn PD Dr. med. Christoph Pohl, Facharzt für Neurologie, beurteilt.

### 2.1.2 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen wurden Patienten, deren Eltern nicht deutsch oder nicht kaukasischer Abstammung waren. Außerdem wurden Patienten ausgeschlossen, die neben dem Verdacht auf eine ischämisch zerebrale Erkrankung eine weitere zentralnervöse Erkrankung aufwiesen. Weiterhin wurden Patienten ausgeschlossen, bei denen die zerebrale Ischämie Folge eines neurochirurgischen Eingriffes oder eines Schädeltraumas war.

### 2.1.3 Ethische Aspekte

Alle Patienten wurden über den wissenschaftlichen Charakter der Untersuchung schriftlich (siehe Anhang) und persönlich aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde eingeholt (Muster siehe Anhang).

Ein positives Votum der Ethikkommission der Universitätsklinik Bonn lag vor (siehe Anhang).

## **2.2 Gruppe der Kontrollprobanden**

Zur Einschätzung der Verteilung des Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus, der Faktor-V-Leiden-Mutation und des Prothrombin g.20210G>A-Polymorphismus in der deutschen Bevölkerung wurde vom Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin eine Gruppe von 500 Blutspendern an der Universitätsklinik Bonn genotypisiert. Hierbei wurden ausschließlich Probanden deutscher Eltern kaukasischer Abstammung untersucht. Weitere Bedingungen wurden zum Einschluss in die Kontrollgruppe nicht gestellt. Klinische Daten wurden bei diesen Probanden nicht erhoben, Alter und Geschlecht waren aber bekannt. Für die Untersuchung lag ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Bonn vor.

## **2.3 Klinische Klassifikation der Patienten**

Patienten mit zerebralen Ischämien wurden nach der TOAST-Klassifikation (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) bezüglich der Ätiologie des Schlaganfalls klassifiziert (Adams et al., 1993). Die TOAST-Klassifikation unterscheidet fünf Kategorien:

1. Makroangiopathische, arterio-arterielle Insulte
2. Kardiale Embolien
3. Lakunäre Insulte
4. Zerebrale Ischämie anderer geklärter Ätiologie
5. Zerebrale Ischämie unklarer Ätiologie

Die TOAST-Klassifikation wurde vorgenommen nach klinischen Kriterien auf der Grundlage technischer Zusatzuntersuchungen, wobei Ergebnisse der zerebralen Bildgebung (CCT/MRT), der kardialen Diagnostik (transthorakale sowie transösophageale Echokardiographie, EKG, Langzeit-EKG, Ergometrie), der Ultraschalluntersuchung der hirnersorgenden Arterien (extra- und intrakranielle Farbduplex- und Dopplersonographie), der Angiographie der hirnersorgenden Gefäße

sowie der Labordiagnostik (Hyperkoagulopathie, Vaskulitisdiagnostik, etc.) ausgewertet wurden. Im Einzelnen wurde die Zuordnung zu den TOAST-Kategorien 1-5 nach folgenden Kriterien vorgenommen (Adams et al., 1993):

1. Atherosklerose der großen Arterien:

Vorraussetzung hierfür war der Nachweis einer größer als 50-prozentigen Stenose oder eines Verschlusses der großen hirnersorgenden Arterien. Die zerebralen Läsionen mussten sich an das Versorgungsgebiet der betroffenen Arterien halten und eine Mindestgröße von 1,5 cm<sup>2</sup> aufweisen.

2. Kardioembolie:

Vorraussetzung hierfür war der Nachweis einer kardialen Emboliequelle. Unterschieden wurden hierbei Hochrisiko- und Niedrigrisiko-Emboliequellen (siehe Tabelle 2). Lag eine kardiale Hochrisiko-Emboliequelle vor, wurde die Kategorie einer kardialen Embolie auch dann angenommen, wenn geringfügige Befunde in der weiteren technischen Zusatzdiagnostik auffielen, und das Infarktareal kleiner als 1,5 cm<sup>2</sup> in der zerebralen Bildgebung war. Lag eine kardiale Niedrigrisiko-Emboliequelle vor, wurde die Kategorie einer kardialen Embolie nur dann angenommen, wenn die weitere technische Zusatzdiagnostik unauffällige Befunde erbrachte und das Infarktareal über 1,5 cm<sup>2</sup> betrug.

Tabelle 2:

TOAST-Klassifikation: Kardiale Hochrisiko- und Niedrigrisiko-Emboliequellen

Hochrisiko-Ursachen:	Niedrigrisiko-Ursachen:
Mechanischer Klappenersatz	Mitralklappenprolaps
Mitralstenose mit Vorhofflimmern	Verkalkung des Anulus mitralis
Linker Vorhof-/Herzohrthrombus	Mitralstenose ohne Vorhofflimmern
Sick Sinus Syndrom	Linksarterielle Turbulenzen
Überstandener Herzinfarkt (< 4 Wochen)	Septales Vorhofaneurysma
Linksventrikulärer Thrombus	Offenes Foramen ovale
Dilatative Kardiomyopathie	Vorhofflimmern
Akinetisches linksventrikuläres Segment	Biologischer Klappenersatz
Vorhofmyxom	Nicht bakterielle thromboembolische
Infektiöse Endokarditis	Endokarditis
	Hypokinetisches linksventrikuläres
	Segment
	Myokardinfarkt (> 4 Wochen, < 6
	Monate)

### 3. Lakunärer Insult:

Von einem lakunären Insult wurde ausgegangen bei Patienten mit zerebralen Läsionen kleiner als  $1,5 \text{ cm}^2$  und ohne Nachweis einer kardialen Hochrisiko-Emboliequelle. Klinisch wurde für das Vorliegen eines lakunären Insults ein lakunäres Syndrom gefordert, bei dem keine wesentlichen kortikalen oder zerebellären Ausfälle entsprechend einem territorialen Infarkt aufgefallen sein sollten. Es sollte keine größer als 50%-ige Gefäßstenose im Versorgungsgebiet der bildmorphologisch nachweisbaren zerebralen Läsionen vorhanden sein.

### 4. Zerebrale Ischämie anderer geklärter Ätiologie:

Diese Kategorie schließt Patienten mit seltenen Schlaganfallursachen ein. Patienten sollten klinisch und bildgebend einen akuten ischämischen Insult aufweisen, wobei Größe und Lokalisation nicht von Bedeutung sind. Eine kardioembolische/arterielle Genese sollte ausgeschlossen worden sein und laborchemisch sollten Hinweise auf eine anderweitige Ätiologie (z. B. Vakulitis, Koagulopathie) vorhanden sein.

### 5. Zerebrale Ischämie unklarer Ätiologie:

Zu dieser Kategorie zählten Fälle, bei denen (trotz der in allen eingeschlossenen Fällen vollständig durchgeführten Untersuchungen) eine Zuordnung zu einer Ätiologie nicht möglich war.

## 2.4 Vaskuläre Risikofaktoren

Eine Beurteilung bezüglich des Vorliegens vaskulärer Risikofaktoren erfolgte anhand der Krankenakten und der Befragung der Patienten durch die Verfasserin der vorliegenden Arbeit. Eine Bewertung bezüglich des Vorliegens einer arteriellen Hypertonie, einer Hypercholesterinämie, eines Diabetes mellitus oder eines Nikotinabusus wurde auf folgenden Grundlagen vorgenommen:

Hypertonie:	Mindestens zweimalige Dokumentation von Blutdruckwerten über 160 mmHg systolisch oder 90 mmHg diastolisch sowie bei bestehender antihypertensiver Medikation.
Hypercholesterinämie:	Nachweis eines Gesamtcholesterins über 260 mg/dl im Nüchternblut und/oder Bestehen einer cholesterinsenkenden Medikation.
Diabetes mellitus:	Wiederholter Nachweis einer hyperglykämischen Stoffwechsellage (Nüchternblutzuckerwert über 120 mg/dl, Blutzuckerwert nach oraler Glucosebelastung über 160 mg/dl) und/oder blutzuckersenkende Medikation.
Nikotinabusus:	Zigarettenkonsum von mindestens einer Zigarette täglich über 1 Jahr.

## 2.5 Statistik

Für alle analysierten Daten wurden deskriptive Statistiken angelegt (Prozentzahlen für Häufigkeiten, Mittelwerte und Standardabweichungen).

Gruppenmittelwertvergleiche wurden mittels der univariaten Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die Häufigkeiten der Genotypen bei Patienten und Kontrollprobanden wurden mittels multivariater nominaler Regression verglichen. Aufgrund der simultanen multivariaten Analyse (Regression) sowie aufgrund des Hypothesen-basierten Studiendesigns (Confirmation) wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ohne Korrektur für multiples Testen für die Annahme eines statistisch signifikanten Unterschiedes vorausgesetzt. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm-Paket SPSS 9 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Mit dem Programm GPOWER (Faul

und Erdfelder, 1995) wurde eine post-hoc Analyse der jeweiligen Power für die Assoziation der drei Polymorphismen mit Schlaganfällen (alle TOASTs als primäre Zielvariable) durchgeführt.

## **2.6 Untersuchungsmethoden**

Als Labormethoden kamen DNA-Extraktion und PCR-Technologie zur Anwendung. Für die DNA-Extraktion wurde das QIAampDNABloodMiniKit verwendet (QIAGEN, Germany, Max-Volmer-Straße 4, 40724 Hilden), durch das aus Vollblut genomische DNA gewonnen werden kann. Die Real-Time TaqMan PCR ermöglicht eine exponentielle Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz, anhand derer die Allelbestimmung vorgenommen werden kann. Diese Technik wurde in vorhergehenden Studien für Faktor-V-Leiden von Happich et al. (1999), für die Prothrombin-Mutation g.20210G>A von Happich et al. (2000) und für Faktor XIII Val34Leu Polymorphismus von Kraus et al. (2002) beschrieben.

Den Probanden wurden nach einer Stauung von 60-80mmHg mit einer 19-21G-Kanüle venös zwei Röhrchen EDTA-Blut entnommen, das zunächst bei -40°C tiefgefroren und bis zur Diagnostik gelagert wurde. Die asservierten Blutproben wurden im weiteren Verlauf zur DNA-Extraktion herangezogen, wobei von jedem Patienten drei Proben extrahierter DNA hergestellt wurden. Nach der Extraktion wurden die Proben wiederum bei -40°C tiefgefroren, um dann der TaqMan-PCR zugeführt zu werden.

## 2.6.1 DNA-Extraktion

QIAampDNABloodMiniKit (QIAGEN, Germany. Max-Volmer-Straße 4; 40724 Hilden)

### Inhalt

* QIAamp Spinsäule	250 Stück
* Collection -Tube (2ml)	750 Stück
* Buffer AL	54ml
* Buffer AW1 (Konzentrat)	95ml
* Buffer AW2 (Konzentrat)	66ml
* Buffer AE	60ml
* QIAGEN Protease	1 vial
* Protease solvent	5,5ml

Vom Benutzer wurde hinzugefügt:

- \* Ethanol (96-100%)
- \* 1,5ml Reaktionsgefäße von Eppendorf
- \* Pipettierspitzen mit Filter von Neolab
- \* Mikrozentrifuge
- \* Vortex

### 2.6.1.1 Prinzip der DNA-Isolation

DNA-Isolierung aus frischem oder gefrorenem EDTA-Blut:

Aus 200 µl Vollblut können im Durchschnitt 6 µg gelöste DNA gewonnen werden.

Das EDTA-Blut wird mit Protease und Lysepuffer versetzt, wodurch Zellen lysiert und „verdaut“ werden. Dadurch wird die DNA aus den Zellen freigesetzt. Das Gemisch aus Zellresten und gelöster DNA wird mittels Zentrifugation durch eine Membran gepresst,



wobei die DNA an der Silizium-Membran absorbiert wird und hängen bleibt, während der Zellüberstand abgepresst wird und verworfen werden kann. Durch zwei Waschschrirte mit den Waschpuffern Puffer AW1 und Puffer AW2 wird der Reinheitsgrad der DNA durch Entfernen verbliebener Kontaminationen gesteigert. Die gereinigte DNA wird mit dem Eluationspuffer (Lösungspuffer), Puffer AE, von der QIAamp Spinsäule gelöst. Das Eluat ist mit der zuvor in der Membran absorbierten und nun gelösten DNA angereichert und kann der PCR-Diagnostik zugeführt werden.

### **2.6.1.2 Vorbereitung zur DNA-Extraktion**

Von jedem Probanden wird ein 3 ml EDTA-Blutröhrchen auf Zimmertemperatur erwärmt. Der Inhalt wird auf EppendorfgefäÙe à 1000 µl verteilt, von denen zwei wieder asserviert werden können. Von den verbliebenen 1000 µl EDTA-Blut werden 200 µl abpipettiert und zur Extraktion weiterverwendet. Der Heizblock wird auf 56°C erwärmt.

### **2.6.1.3 Durchführung der DNA-Extraktion**

20 µl QIAgen Protease werden in ein 1,5 ml EppendorfgefäÙ vorgelegt, in das dann 200 µl EDTA-Blut und 200 µl AL-Puffer hinzugefügt werden. Dieses Gemisch wird 15 Sekunden auf dem Vortex gemischt, bis eine homogene Lösung entsteht. Dies ist notwendig, um eine effiziente Lyse zu erreichen. Dann wird der Ansatz auf dem Heizblock bei 56 °C zehn Minuten inkubiert. Bei der QIAgen-Protease erhält man die maximale DNA-Ausbeute nach zehn Minuten Lyse bei 56 °C.

Zwischenzeitlich werden die Säulen vorbereitet und die EppendorfgefäÙe, in der die extrahierte DNA zuletzt gesammelt wird, mit Namen und Geburtsdatum der Patienten sowie dem Extraktionsdatum versehen.

Nach der Inkubation werden die EppendorfgefäÙe kurz zentrifugiert, um die kondensierten Tropfen im Deckel zu entfernen. Dann werden die Deckel vorsichtig geöffnet, 200 µl Ethanol hinzugegeben und das Gemisch 15 Sekunden auf dem Vortex gemischt. Dann folgt wiederum eine kurze Zentrifugation, um die im Deckel

entstandenen Tropfen zu entfernen. Als nächstes wird das Gemisch vorsichtig aus dem Eppendorfgefäß in die Spinsäule, die auf ein Sammelröhrchen aufgesetzt wird, überführt, der Deckel geschlossen und die Probe eine Minute bei 8.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Danach wird die Probe herausgenommen, die Säule auf ein sauberes Sammelröhrchen gesetzt und das Abfiltrat des alten Sammelröhrchens verworfen. Die Säule wird vorsichtig geöffnet, und 500 µl AW-1-Puffer (Waschpuffer) wird auf die Säule gegeben. Der Deckel wird geschlossen und die Probe wieder eine Minute bei 8.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Danach wird die Säule wieder auf ein sauberes Sammelgefäß gegeben und das alte Sammelröhrchen samt Abfiltrat verworfen. Die Säule wird wieder vorsichtig geöffnet und 500 µl AW-2-Puffer (Waschpuffer) hinzugefügt, der Deckel geschlossen und die Probe drei Minuten bei 14.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Jetzt wird die SpinSäule auf ein sauberes, wie oben beschrieben beschriftetes Eppendorfgefäß gegeben und das Filtrat verworfen. Die Säule wird geöffnet und 200 µl AE-Puffer dazugegeben, der Deckel geschlossen und die Probe eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird sie fünf Minuten bei 8.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Diesmal werden nach der Zentrifugation die Spin-Säulen verworfen und das Eppendorfgefäß zurückbehalten. In diesem befinden sich nun 200 µl Eluat mit circa 6 µg gelöster DNA.

Die mit Namen, Geburtsdatum und Extraktionsdatum versehenen Proben werden in einem Aufbewahrungskasten der Firma Sarstedt bei -40°C bis zur PCR asserviert.

## **2.6.2 Analyse mittels Real-Time TaqMan PCR**

Zur Analyse des genetischen Polymorphismus wurde in dieser Arbeit die Real-Time TaqMan PCR Technologie benutzt.

### **2.6.2.1 Grundlage**

Die in den 1980er Jahren entwickelte Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine schnelle und sensitive Methode zur DNA-Analytik *in vitro*. Mit Hilfe der PCR ist es

möglich, durch spezifische Primer eine exponentielle Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz zu synthetisieren.

In ihrem natürlichen Zustand bildet die DNA eine Doppelhelix, welche aus zwei antiparallel komplementär verlaufenden Strängen besteht, die durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind. Die Wasserstoffbrücken bilden sich zwischen den komplementären Basen Adenin und Thymin, sowie Guanin und Cytosin aus. Jede dieser Basen ist mit einem Zuckermolekül, einer Desoxyribose, verknüpft. Die Zucker sind durch Phosphatgruppen verbunden, wobei jeweils das 5`Kohlenstoffatom des einen mit dem 3`Kohlenstoffatom des anderen Zuckers an der Phosphatgruppe bindet, so dass man ein 5`Ende und ein 3`Ende unterscheiden kann. Die Einheit aus einer Base, dem Zucker und der Phosphatgruppe bezeichnet man als Nucleosid.

Um bestimmte Sequenzen innerhalb der DNA amplifizieren zu können, benötigt man Oligonucleotidprimer, kurze einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten DNA-Sequenz sind, und welche als Start-DNA dienen. Die DNA-Polymerase, ein Enzym, welches entlang eines DNA-Stranges komplementär zu diesem einen neuen DNA-Strang synthetisiert, verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenzen komplementär zur Matrize sind.

Am Anfang der PCR steht die Denaturierungsphase. In dieser wird in einer gewissen Zeitspanne das Reaktionsgemisch (bestehend aus allen vier Desoxynucleotid-Vorläufern, Magnesium, TaqPolymerase, Wasser und Primern) bei hohen Temperaturen (um 90°C) erhitzt, so dass Einzelstrang-DNA-Stücke entstehen. Danach wird die Temperatur gesenkt, damit sich die Primer an die Einzelstränge binden können. Diese Phase wird als Annealing bezeichnet.

Die Temperatur ist entscheidend für die Spezifität einer PCR und abhängig von verschiedenen Faktoren. Als nächstes erfolgt eine erneute Temperaturerhöhung zur Aktivierung der TaqPolymerase. Bei der TaqPolymerase handelt es sich um eine DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, welche bis zu Temperaturen von 94°C relativ stabil ist. Die TaqPolymerase synthetisiert den neuen Strang komplementär (Polymerisation der Nukleotide an das 3'-OH-Ende der Primer bzw. des polymerisierten Strangs).

Nun folgt über einen erneuten Synthesevorgang eine erneute Denaturierungsphase. Jede zusätzliche Strangsynthese bedeutet eine Vermehrungsrunde. Dabei dienen die neu synthetisierten DNA-Stränge ebenfalls als Matrizen. So steigt Zyklus für Zyklus die Konzentration der vervielfältigten Endsequenz im Idealfall exponentiell.

Nach 20 bis 35 Zyklen hat sich die DNA-Menge millionenfach vermehrt. Die Enzymmenge nimmt ab, die Ausgangssubstanzen werden allmählich verbraucht, und die Ausbeute der PCR wird reduziert.

### **2.6.2.2 Unterschied Real Time TaqMan PCR zur Polymerase Kettenreaktion**

Um eine einfache Quantifizierung der PCR zu ermöglichen, entwickelte man ein sogenanntes homogenes Assay, bei dem die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden. Dies gelang erstmals 1991 mit dem von Holland et al. beschriebenen „5'Nuclease PCR Assay“ unter Ausnutzung der 5'Exonucleaseaktivität der TaqPolymerase zur Detektion der sequenzspezifischen Amplifikation (Holland et al., 1991). Bei der so genannten „real time“ PCR wird während der PCR ein Fluoreszenzsignal erzeugt, das proportional zur Zunahme des gewünschten PCR-Produktes ist und direkt im PCR-Reaktionsgefäß gemessen wird. Hierdurch wird die Messung der Effizienz möglich. Für diesen Vorgang benötigt man eine Sonde. Diese Sonde ist ein Oligonukleotid, welches komplementär zum amplifizierenden Fragment ist. Dadurch erhält man eine Spezifität, die einer PCR mit anschließendem Southernblot und Hybridisierung entspricht.

Die oben genannte Sonde ist an ihren Enden mit zwei definierten Fluoreszenzfarbstoffen, einem so genannten „Reporter“ und einem „Quencher“, konjugiert. Der fluoreszente Reporterfarbstoff ist kovalent an das 5'Ende der Sonde geknüpft. Es stehen mehrere Farbstoffe, die sich in ihrem Emissionsspektrum unterscheiden, zur Verfügung. Den verschiedenen Reporterfarbstoffen stehen die Quencherfarbstoffe gegenüber. Der Quencher ist über ein am linken Arm modifiziertes Nukleotid (LAN) mit der Sonde verbunden. Diese Verbindung befindet sich am 3'-Arm. Schließlich wird die Sonde noch chemisch phosphoryliert, um eine mögliche Extension des 3'-Endes während der PCR zu vermeiden.

Wenn das Oligonukleotid intakt ist, wird bei der Anregung des Reporters durch den Laser die Fluoreszenzenergie auf den Quencher übertragen. Dieser emittiert ein Lichtsignal, welches als FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) bezeichnet wird. Wird aber das Oligonukleotid durch die 5'Exonucleaseaktivität der TaqPolymerase bei der Amplifizierung der gewünschten Sequenz gespalten, so entsteht eine räumliche Trennung zwischen Reporter und Quencher, und man erhält ein Lichtsignal vom Reporter. Bei deutlichem Unterschied des Energiespektrums zwischen Quencher und Reporter kann man so aus dem Gesamtspektrum die Zunahme des Reportersignals berechnen und erkennen, ob das spezifische Produkt amplifiziert worden ist.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine wesentliche Erleichterung der DNA-Analytik. Um die PCR-Produkte interpretieren zu können, sind aber aufwändige Anschlussanalytiken (Restriktionsanalyse, Gelelektrophorese) nötig. Die TaqMan real time PCR ermöglicht in einem Arbeitsschritt bei der Amplifikation simultan den Nachweis des PCR-Produkts.

### **2.6.2.3 Material**

Folgende Materialien wurden für die PCR verwendet:

- Reaktionsgefäße 1,5 ml farblos von Sarstedt
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter 1000 µl von Neolab
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter ART 100 E von Neolab
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter ART 10 Reach von Neolab
- PCR Softtubes 0,5 ml gemischte Farben, mit Deckel von Biozym
- PCR Tubes 0,2 ml, gemischte Farben von Biozym



### 2.6.2.5 Durchführung

Zunächst wird nach Arbeitsanweisung (siehe unten) ein Mastermix erstellt:

Pipettierschema für den Mastermix für die Faktor XIII Taqman-PCR, pro Probe wird folgender Ansatz benötigt:

Ansatz	Angegeben in $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	5,85
10 x Puffer	2,5
MgCl <sub>2</sub>	5,5
dNTP	3,0
F XIII Taq forward Primer	1,5
F XIII Taq reverse Primer	1,5
FAM MU	1,0
TET WT	1,0
Glycerin	0,25
Taq-Gold-Polymerase	0,15
+	
DNA	2,5 $\mu\text{l}$

Für die Bestückung einer Platte (96 Proben) wird folgender Ansatz pipettiert:

H <sub>2</sub> O	573 $\mu\text{l}$
10 x Puffer	245 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub>	539 $\mu\text{l}$
DNTP	294 $\mu\text{l}$
FXIII Taq f	147 $\mu\text{l}$
FXIII Taq r	147 $\mu\text{l}$
FAM MU	98 $\mu\text{l}$
TET WT	98 $\mu\text{l}$
AmpErase	24,5 $\mu\text{l}$
Glycerin	24,5 $\mu\text{l}$
Taq-Gold-Polymerase	14,7 $\mu\text{l}$

Sequenzen der Primer für die Taqman PCR Faktor XIII:

Taqman Faktor XIII f: 5`GAA GAT GAC CTG CCC ACA GTG 3`

Taqman Faktor XIII r: 5`ATG CTC ATA CCT TGC AGG TGG A 3`

FAM (MU-Sonde): FAM- AGC TTC AGG GCT TGG TGC CC – TAMRA

TET (WT-Sonde): TET- TCA GGG CGT GGT GCC CC – TAMRA

Pipettierschema für den Mastermix für die Faktor V Taqman-PCR, pro Probe wird folgender Ansatz benötigt:

Ansatz	Angegeben in $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	6,9
10 x Puffer	2,5
MgCl <sub>2</sub>	5,5
DNTP	2,0
APC forward Primer	1,5
APC reverse Primer	1,5
FAM WT	1,0
TET MU	1,0
UNG	0,25
Glycerin	0,25
Hot Gold	0,125
+	
DNA	2,5 $\mu$ l



Für die Bestückung einer Platte (96 Proben) wird folgender Ansatz pipettiert:

H <sub>2</sub> O	676µl
10 x Puffer	245µl
MgCl <sub>2</sub>	539µl
DNTP	196µl
APC f	147µl
APC r	147µl
FAM WT	98µl
TET MU	98µl
UNG	24,5µl
Glycerin	24,5µl
Hot Gold	12.3µl

Sequenzen der Primer für die Taqman PCR Faktor V:

APC f: 5`AGA CAT CGC CTC TGG GCT AA 3`

APC r: 5`TTT CTG AAA GGT TAC TTC AAG GAC AA 3`

FAM (WT-Sonde): FAM- CCT GTA TTC CTC GCC TGT CCA GG -TAMRA

TET (MU-Sonde): TET- CCT GTA TTC CTT GCC TGT CCA GGG -TAMRA

Pipettierschema für den Mastermix für die Prothrombin Taqman PCR, pro Probe wird folgender Ansatz benötigt:

Ansatz	Angegeben in µl
H <sub>2</sub> O	5,3
10 x Puffer	2,5
MgCl <sub>2</sub>	5,5
DNTP	2,0
ProTaq forward Primer	1,5
ProTaq reverse Primer	1,5
FAM MU	1,25
TET WT	1,25
Amperase	0,25
Glycerin	0,25
Taq Gold	0,15
+	
DNA	2,5 µl

Für die Bestückung einer Platte (96 Proben) wird folgender Ansatz pipettiert:

H <sub>2</sub> O	519µl
10 x Puffer	245µl
MgCl <sub>2</sub>	539µl
DNTP	294µl
ProTaq f	147µl
ProTaq r	147µl
FAM MU	122,5µl
TET WT	122,5µl
Amperase	24,5µl
Glycerin	24,5µl
Taq Gold	14,7µl

Sequenzen der Primer für die Taqman PCR Prothrombin:

Protaq 5: TTC TAA AAC TAT GGT TCC CAA TAA A

Protaq 3: GCT GCC CAT GAA TAG CAC T

TET (WT-Sonde): TET- TGA CTC TCA GCG AGC CTC AAT G –TAMRA

FAM (MU-Sonde): FAM- TGA CTC TCA GCA AGC CTC AAT GC –TAMRA

Nun wird die Platte folgendermaßen bestückt:

Tabelle 4:

Bestückung der Platte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Homo I	WT I	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	NTC I
B	Homo II	WT II	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	NTC II
C	Homo III	WT III	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	NTC III
D	Homo IV	WT IV	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	NTC IV
E	Homo V	WT V	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	NTC V
F	Homo VI	WT VI	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	NTC VI
G	Homo VII	WT VII	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	NTC VII
H	Homo VIII	WT VIII	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	NTC VIII

Homo = Homozygote WT = Heterozygote NTC = Kontrollen (Wasser)

Von dem zuvor erstellten Mastermix werden je 22,5 µl in die Eppendorfgefäße pipettiert und schließlich 2,5 µl DNA hinzugegeben, wobei die DNA im Reaktionsgefäß durch kurzes Schütteln auf dem Vortex mit dem Mastermix vermischt wird. Am Ende der Platte befinden sich die Kontrollen (NTC), die zum Schluss pipettiert werden.

Jetzt wird die Platte „geschwenkt“, um den gesamten Inhalt, auch die am Rande befindlichen Tröpfchen, auf den Boden zu bringen. Als letztes werden die Eppendorfgefäße verschlossen und der Taqman PCR durchgeführt.

Programm Taqman:                    50°C 2 Minuten  
    95°C 10 Minuten  
    94°C 20 Sekunden  
    67°C 1 Minute

Anzahl der Zyklen: 35

Wenn das Programm beendet ist, werden die Ergebnisse computergesteuert berechnet, ausgewertet und gespeichert. Ein Beispiel für die Darstellung der Ergebnisse wird in Tabelle 5 abgebildet.

Tabelle 5:

Beispiel für einen Ergebnisausdruck

Well	Sample	Call	Probe
A01	AL2	2	Homo.I
B01	AL2	2	Homo.II
C01	AL2	2	Homo.III
D01	AL2	2	Homo.IV
E01	AL2	2	Homo.V
F01	AL2	2	Homo.VI
G01	AL2	2	Homo.VII
H01	AL2	2	Homo.VIII
A02	AL1	1	WT.I
B02	AL1	1	WT.II
C02	AL1	1	WT.III
D02	AL1	1	WT.IV
E02	AL1	1	WT.V
F02	AL1	1	WT.VI
G02	AL1	1	WT.VII
H02	AL1	1	WT.VIII
A03	UNKN	1	5
B03	UNKN	1	30
C03	UNKN	1	41
D03	UNKN	1 and 2	48
E03	UNKN	1 and 2	54
F03	UNKN	1	62
G03	UNKN	1 and 2	68
H03	UNKN	1	70
A04	UNKN	1	74
B04	UNKN	1	80
C04	UNKN	1	88
D04	UNKN	1 and 2	89
E04	UNKN	1 and 2	90
F04	UNKN	1	93
G04	UNKN	1 and 2	95
H04	UNKN	1	104
A05	UNKN	1	106
B05	UNKN	1	108
C05	UNKN	2	109
D05	UNKN	1	110
E05	UNKN	1	112
F05	UNKN	1	113
G05	UNKN	1	114
H05	UNKN	1	117
A06	UNKN	1	119
B06	UNKN	1	120
C06	UNKN	1 and 2	125
D06	UNKN	1	126
E06	UNKN	1	127
F06	UNKN	1	128
G06	UNKN	1	131
H06	UNKN	2	132

A07	UNKN	1	137
B07	UNKN	1 and 2	140
C07	UNKN	1	146
D07	UNKN	1 and 2	148
E07	UNKN	1	149
F07	UNKN	1	153
G07	UNKN	1 and 2	156
H07	UNKN	1 and 2	158
A08	UNKN	1	161
B08	UNKN	2	168
C08	UNKN	1	173
D08	UNKN	1	177
E08	UNKN	1	180
F08	UNKN	1 and 2	183
G08	UNKN	1 and 2	186
H08	UNKN	1 and 2	194
A09	UNKN	1	196
B09	UNKN	1 and 2	201
C09	UNKN	1 and 2	216
D09	UNKN	1 and 2	220
E09	UNKN	1	232
F09	UNKN	1	258
G09	UNKN	1	260
H09	UNKN	1 and 2	262
A10	UNKN	2	263
B10	UNKN	1	265
C10	UNKN	1 and 2	267
D10	UNKN	1	270
E10	UNKN	1 and 2	271
F10	UNKN	1 and 2	278
G10	UNKN	1	281
H10	UNKN	1 and 2	283
A11	UNKN	2	285
B11	UNKN	1	294
C11	UNKN	1	305
D11	UNKN	1	306
E11	UNKN	1	316
F11	UNKN	1 and 2	321
G11	UNKN	1	335
H11	UNKN	1 and 2	336
A12	NTC	No Amp	NTC.I
B12	NTC	No Amp	NTC.II
C12	NTC	No Amp	NTC.III
D12	NTC	No Amp	NTC.IV
E12	NTC	No Amp	NTC.V
F12	NTC	No Amp	NTC.VI
G12	NTC	No Amp	NTC.VII
H12	NTC	No Amp	NTC.VIII

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Beschreibung des Kollektivs

Insgesamt wurden 182 Patienten entsprechend der oben genannten Einschlusskriterien (Kapitel 2.1.1) für die vorliegende Arbeit genotypisiert. 113 (62%) der Patienten waren männlich, 69 (38%) weiblich. Das Durchschnittsalter (arithmetisches Mittel) der Patienten zum Zeitpunkt der zerebralen Ischämie betrug 55,5 Jahre +/- 16,0 Jahre Standardabweichung. Unter den 500 genotypisierten Kontrollprobanden befanden sich 354 Männer (71%) und 146 Frauen (29%). Das mittlere Alter der Kontrollen betrug 33,4 Jahre +/- 11,2 Jahre (Tabellen 6 und 7).

Tabelle 6:

Geschlechterverteilung von Kontrollen und Patienten

		Kollektiv		Gesamt
		Kontrollen	Patienten	
Geschlecht	Weiblich	146 (29%)	69 (38%)	215
	Männlich	354 (71%)	113 (62%)	467
Gesamt		500	182	682

Tabelle 7:

Altersverteilung von Kontrollen und Patienten

	N	Mittelwert	SD	95%-CI für den Mittelwert	Min	Max
Kontrollen	500	33,4	11,2	32,4 – 34,4	18	64
Patienten	169*	55,5	16,0	53,0 – 57,9	18	88
Gesamt	669	39,0	15,8	37,8 – 40,2	18	88

N = Fallzahl

\* von 13 Patienten ist das Alter unbekannt

SD = Standardabweichung

CI = Konfidenzintervall

### **3.2 Genotypisierung der Kontrollprobanden**

Die Genotypenverteilung des Prothrombin-Polymorphismus in der Kontrollgruppe stellte sich folgendermaßen dar: 490 (98%) Wildtyp, 10 (2%) Heterozygote und kein (0%) Homozygoter. In der Genotypenverteilungen der Faktor-V-Leiden-Mutation hatten 470 der Kontrollen (94%) den Wildtyp-Genotyp, 29 (5,8%) waren heterozygot und einer (0,2%) homozygot. Die Untersuchung der Genotypenverteilung des Faktor-XIII-Polymorphismus ergab 280 (56%) Personen mit Wildtyp-Genotyp, 190 (38%) Heterozygote und 30 (6%) Homozygote. Der Vergleich der Genotypen bei männlichen und weiblichen Kontrollprobanden erbrachte erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede (nicht dargestellt).

### **3.3 Vergleiche der Genotypen in der Schlaganfallgesamtgruppe mit Kontrollprobanden**

Zunächst wurde die Gesamtgruppe der Schlaganfallpatienten den Kontrollen gegenübergestellt, berechnet mit der multivariaten multiplen Regression über zwei Freiheitsgrade für jede Variante (drei Genotypen) und mit Alter und Geschlecht als Co-Variablen (Tabelle 6). Im Vergleich zum Kontrollkollektiv fanden sich in der Gruppe der Patienten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der untersuchten Polymorphismen. Die Power für den Faktor-V-Polymorphismus war mit 0,21 zu gering für valide Aussagen, während die Power für den Prothrombin-Polymorphismus immerhin 0,76 und für den Faktor-XIII-Polymorphismus, der mit dieser Arbeit insbesondere beurteilt werden sollte, 0,88 betrug.

Tabelle 8:

Vergleich der Genotypen zwischen Schlaganfallgesamtgruppe und Kontrollprobanden

	<b>Patienten</b>	<b>Probanden</b>	<b>Chi-Quadrat <math>\chi^2</math></b>	<b>Signifikanz p</b>	<b>Power</b>
<b>Faktor II</b>			0,023	0,878	0,76
Wildtyp	174 (95,6%)	490 (98%)			
Heterozygot	8 (4,4%)	10 (2%)			
Homozygot	0 (0%)	0 (0%)			
<b>Faktor V</b>			2,079	0,354	0,21
Wildtyp	171 (94%)	470 (94%)			
Heterozygot	10 (5,5%)	29 (5,8%)			
Homozygot	1 (0,5%)	1 (0,2%)			
<b>Faktor XIII</b>			2,399	0,301	0,88
Wildtyp	91 (50%)	280 (56%)			
Heterozygot	78 (42,9%)	190 (38%)			
Homozygot	13 (7,1%)	30 (6%)			

### 3.4 Abhängigkeit der Schlaganfallätiologie von Alter und Geschlecht

Unter den 182 Patienten mit ischämischem zerebralen Insult befanden sich entsprechend der TOAST-Klassifikation (Kapitel 2.3) 61 mit einer Atherosklerose der großen hirnersorgenden Gefäße, 47 mit einer kardialen Schlaganfallursache, 27 mit einem lakunären Schlaganfall, zwölf mit spezifischen anderen Schlaganfallursachen (Moya-Moya-Syndrom, Sneddon-Syndrom, Antiphospholipidsyndrom) und 34 ohne erkennbare Schlaganfallursache. Dabei unterschied sich das Alter der Patienten zwischen den fünf Untersuchungsgruppen nicht signifikant (ANOVA). Bezüglich der Geschlechterverteilung zeigte sich ein erhöhter Anteil männlicher Patienten in der

Gruppe der Patienten mit einer makroangiopathischen und mikroangiopathischen Schlaganfallursache, während bei Patienten mit kardialen Schlaganfallursachen ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis bestand.

Die klinischen Daten dieser Patientengruppe werden in Tabelle 9 und 10 wiedergegeben.

Tabelle 9:

TOAST-Klassifikation und Geschlecht (Toast Gruppe 0 = Kontrollen)

		TOAST-Klassifikation						Gesamt
		0	1	2	3	4	5	
Geschlecht	Männlich	354	46	23	21	5	18	467
	Weiblich	146	15	24	7	7	16	215
Gesamt		500	61	47	28	12	34	682

Tabelle 10:

TOAST-Klassifikation und Alter (Toast Gruppe 0 = Kontrollen)

	N	Mittelwert	SD	95%-CI für den Mittelwert	Min	Max
0	500	33	11	32-34	18	64
1	60	57	13	54-61	30	80
2	47	55	18	50-61	18	82
3	26	64	10	60-67	46	88
4	10	48	19	35-61	22	77
5	26	46	18	39-53	18	84
Gesamt	669*	39	16	38-40	18	88

N = Fallzahl

\* von 13 Patienten ist das Alter unbekannt

SD = Standardabweichung

CI = Konfidenzintervall



### 3.5 Darstellung der vaskulären Risikofaktoren und ihr Bezug zur Schlaganfallätiologie

Die Gesamtpatientengruppe wies ein ausgeprägtes vaskuläres Risikoprofil auf. Hierbei fanden sich ein Nikotinabusus bei 43% der Patienten, eine arterielle Hypertonie bei 61%, eine Hypercholesterinämie bei 54% und ein Diabetes mellitus bei 19%.

In einer explorativen Analyse zeigte sich, dass die verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren in den einzelnen Toast-Gruppen eine unterschiedliche Prävalenz hatten. So betrieben signifikant mehr Patienten mit makroangiopathischem Schlaganfall einen Nikotinabusus als in der Gruppe der Patienten mit kardioembolischem Insult (58 vs. 31%,  $p=0,027$ ). Ebenso wurden die arterielle Hypertonie (79 vs. 53%,  $p=0,02$ ) und der Diabetes mellitus (34 vs. 14%,  $p=0,037$ ) signifikant häufiger bei Patienten mit mikroangiopathischem als mit kardioembolischem Schlaganfall festgestellt. Auch hatten mehr Patienten mit makroangiopathischem als Patienten mit kardioembolischem Infarkt eine arterielle Hypertonie (61 vs. 53%), einen Diabetes mellitus (23 vs. 14%) und eine Hypercholesterinämie (60 vs. 51%), diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die klinischen Daten dieser Patientengruppe werden in Tabelle 11 wiedergegeben.

Tabelle 11:

Risikofaktoren und TOAST-Kriterien

	<u>Gesamtgruppe</u>	<u>TOAST 1</u>	<u>TOAST 2</u>	<u>TOAST 3</u>	<u>TOAST 4</u>	<u>TOAST 5</u>
Anzahl der Patienten (%)	184 (100%)	66 (35,8%)	49 (26,6%)	29 (15,7%)	12 (6,5%)	29 (15,7%)
<b>Risikofaktoren:</b>						
Nikotinmissbrauch	79 (43%)	38 (58%)	18 (37%)	9 (31%)	5 (42%)	9 (31%)
Hypertonie	113 (61%)	40 (61%)	26 (53%)	23 (79%)	8 (67%)	16 (55%)
Hypercholesterinämie	100 (54%)	39 (60%)	25 (51%)	16 (55%)	6 (50%)	14 (48%)
Diabetes mellitus	35 (19%)	15 (23%)	7 (14%)	10 (34%)	1 (8%)	2 (7%)

### 3.6 Vergleich der Polymorphismen der Faktoren II, V, und XIII und ihr Vorkommen in Abhängigkeit von der Schlaganfallätiologie

Die Verteilung der Polymorphismen in den einzelnen Subgruppen der TOAST-Klassifikation wurde explorativ analysiert und wird in den Tabellen 12 bis 16 wiedergegeben.

Tabelle 12:

Subgruppe atherothrombotische Insulte vs. Kontrollen

	TOAST 1	Kontrollen	Chi-Quadrat $\chi^2$	Signifikanz p
<b>Faktor II</b>			<b>0,367</b>	<b>0,545</b>
Wildtyp	57 (96,6%)	490 (98%)		
Heterozygot	2 (3,4%)	10 (2,0%)		
Homozygot	0 (0%)	0 (0%)		
<b>Faktor V</b>			<b>0,815</b>	<b>0,665</b>
Wildtyp	56 (94,9%)	470 (94%)		
Heterozygot	3 (5,1%)	29 (5,8%)		
Homozygot	0 (0%)	1 (0,2%)		
<b>Faktor XIII</b>			<b>1,661</b>	<b>0,436</b>
Wildtyp	32 (54,2%)	279 (55,8%)		
Heterozygot	24 (40,6%)	191 (38,2%)		
Homozygot	3 (5,1%)	30 (6%)		

Für die Gruppe der Patienten mit atherothrombotischen Insulten im Vergleich zu den Kontrollprobanden fand sich kein signifikanter Unterschied des Prothrombin-Polymorphismus, der Faktor-V-Leiden-Mutation und des Faktor-XIII-Polymorphismus.

Tabelle 13:

Subgruppe kardiogene Insulte vs. Kontrollen

	TOAST 2	Kontrollen	Chi-Quadrat $\chi^2$	Signifikanz p
<b>Faktor II</b>			0,220	0,639
Wildtyp	45 (95,7%)	490 (98%)		
Heterozygot	2 (4,2%)	10 (2%)		
Homozygot	0 (0%)	0 (0%)		
<b>Faktor V</b>			5,076	0,079
Wildtyp	45 (95,7%)	470 (94%)		
Heterozygot	1 (2,1%)	29 (5,8%)		
Homozygot	1 (2,1%)	1 (0,2%)		
<b>Faktor XIII</b>			1,022	0,600
Wildtyp	23 (48,9%)	280 (56%)		
Heterozygot	20 (42,5%)	190 (38%)		
Homozygot	4 (8,5%)	30 (6%)		

Für die Gruppe der Patienten mit kardiogenen Insulten im Vergleich zu den Kontrollprobanden fand sich kein signifikanter Unterschied des Prothrombin-Polymorphismus und des Faktor-XIII-Polymorphismus. Auch bei der Faktor-V-Leiden-Mutation wurde eine Signifikanz knapp verfehlt.

Tabelle 14:

Subgruppe lakunäre Insulte vs. Kontrollen

	TOAST 3	Kontrollen	Chi-Quadrat $\chi^2$	Signifikanz p
<b>Faktor II</b>			<b>0,861</b>	<b>0,353</b>
Wildtyp	23 (92%)	490 (98%)		
Heterozygot	2 (8%)	10 (2%)		
Homozygot	0 (0%)	0 (0%)		
<b>Faktor V</b>			<b>0,035</b>	<b>0,982</b>
Wildtyp	22 (88%)	470 (94%)		
Heterozygot	3 (12%)	29 (5,8%)		
Homozygot	0 (0%)	1 (0,2%)		
<b>Faktor XIII</b>			<b>2,933</b>	<b>0,231</b>
Wildtyp	12 (48%)	280 (56%)		
Heterozygot	11 (44%)	190 (38%)		
Homozygot	2 (8%)	30 (6%)		

Für die Gruppe der Patienten mit lakunären Insulten im Vergleich zu den Kontrollprobanden fand sich kein signifikanter Unterschied der Häufigkeitsverteilung der drei untersuchten Polymorphismen.

Tabelle 15:

Subgruppe zerebrale Insulte anderer Ätiologie vs. Kontrollen

	TOAST 4	Kontrollen	Chi-Quadrat $\chi^2$	Signifikanz p
<b>Faktor II</b>			<b>1,442</b>	<b>0,230</b>
Wildtyp	9 (90%)	490 (98%)		
Heterozygot	1 (10%)	10 (2%)		
Homozygot	0 (0%)	0 (0%)		
<b>Faktor V</b>			<b>0,050</b>	<b>0,975</b>
Wildtyp	9 (90%)	470 (94%)		
Heterozygot	1 (10%)	29 (5,8%)		
Homozygot	0 (0%)	1 (0,2%)		
<b>Faktor XIII</b>			<b>1,111</b>	<b>0,574</b>
Wildtyp	4 (40%)	280 (56%)		
Heterozygot	5 (50%)	190 (38%)		
Homozygot	1 (10%)	30 (6%)		

Für die Gruppe der Patienten mit zerebralen Insulten anderer Ätiologie im Vergleich zu den Kontrollprobanden fand sich kein signifikanter Unterschied der Häufigkeit der untersuchten Polymorphismen.

Tabelle 16:

Subgruppe zerebrale Ischämie unbestimmbarer Ätiologie vs. Kontrollen

	TOAST 5	Kontrollen	Chi-Quadrat $\chi^2$	Signifikanz p
<b>Faktor II</b>			<b>1,268</b>	<b>0,260</b>
Wildtyp	26 (100%)	490 (98%)		
Heterozygot	0 (0%)	10 (2%)		
Homozygot	0 (0%)	0 (0%)		
<b>Faktor V</b>			<b>0,046</b>	<b>0,977</b>
Wildtyp	24 (92,3%)	470 (94%)		
Heterozygot	2 (7,7%)	29 (5,8%)		
Homozygot	0 (0%)	1 (0,2%)		
<b>Faktor XIII</b>			<b>1,838</b>	<b>0,399</b>
Wildtyp	12 (46,1%)	280 (56%)		
Heterozygot	13 (50%)	190 (38%)		
Homozygot	1 (3,8%)	30 (6%)		

Für die Gruppe der Patienten mit zerebralen Insulten ungeklärter Ätiologie im Vergleich zu den Kontrollprobanden fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Genotypenverteilung des Prothrombin-Polymorphismus, der Faktor-V-Leiden-Mutation und des Faktor-XIII-Polymorphismus.

### 3.7 Vergleich der Polymorphismen der Faktoren II, V, und XIII bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit vom Geschlecht

Weiterhin wurde die Häufigkeitsverteilung des Prothrombin-Polymorphismus, der Faktor-V-Leiden-Mutation und des Faktor-XIII-Polymorphismus bei Patienten und Kontrollen getrennt nach Geschlechtern untersucht. Auch die separate Analyse der Gruppen der Männer und Frauen ergab keine unterschiedliche Häufigkeitsverteilung der drei Polymorphismen zwischen den Patienten und den Kontrollen. Die Ergebnisse werden in den Tabellen 17 und 18 dargestellt.

Tabelle 17:

Vergleich Polymorphismen - Männer

Männer	Patienten	Kontrollen	Chi-Quadrat $\chi^2$	Signifikanz p
<b>Faktor II</b>			<b>0,041</b>	<b>0,839</b>
Wildtyp	103 (96,3%)	346 (97,7%)		
Heterozygot	4 (3,7%)	8 (2,3%)		
Homozygot	0 (0%)	0 (0%)		
<b>Faktor V</b>			<b>3,754</b>	<b>0,153</b>
Wildtyp	103 (96,3%)	339 (95,8%)		
Heterozygot	5 (4,6%)	15 (4,2%)		
Homozygot	1 (0,9%)	0 (0%)		
<b>Faktor XIII</b>			<b>2,507</b>	<b>0,286</b>
Wildtyp	53 (49,5%)	203 (57,3%)		
Heterozygot	47 (43,9%)	131 (37%)		
Homozygot	7 (6,5%)	20 (5,6%)		

Tabelle 18:

Vergleich Polymorphismen - Frauen

Frauen	Patienten	Kontrollen	Chi-Quadrat $\chi^2$	Signifikanz p
<b>Faktor II</b>			0,344	0,557
Wildtyp	59 (95,1%)	144 (98,6%)		
Heterozygot	3 (4,8%)	2 (1,4%)		
Homozygot	0 (0%)	0 (0%)		
<b>Faktor V</b>			0,172	0,918
Wildtyp	57 (91,9%)	131 (90%)		
Heterozygot	5 (8,1%)	14 (9,6%)		
Homozygot	0 (0%)	1 (0,7%)		
<b>Faktor XIII</b>			0,141	0,932
Wildtyp	31 (50%)	77 (52,7%)		
Heterozygot	27 (43,5%)	59 (40,4%)		
Homozygot	4 (6,5%)	10 (6,8%)		

### 3.8 Vergleich der Polymorphismen der Faktoren II, V, und XIII bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit vom Alter

Da gerade bei jüngeren Schlaganfallpatienten häufiger erbliche Ursachen der Erkrankung zugrunde liegen, wurde schließlich explorativ eine Subgruppenanalyse der jüngeren Patienten (jünger als 60, 50 bzw. 40 Jahre) durchgeführt (Tabellen 19-21). Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen bezüglich der Genotypverteilung der drei untersuchten Polymorphismen. Der Vergleich von Patienten unterschiedlicher Altersgruppen miteinander zeigte ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse (nicht dargestellt).



Tabelle 19:

Vergleich der Häufigkeiten des Prothrombin-Polymorphismus, Faktor-V-Leiden-Mutation und Faktor-XIII-Polymorphismus bei Patienten und Kontrollen unter 60 Jahren

Alter unter 60	Patienten	Kontrollen	Chi-Quadrat X <sup>2</sup>	Signifikanz p
Sex ♂/♀	♂/♀	♂/♀		
Faktor II			0,017	0,896
Wildtyp	53(56,9%)/37(39,8%)	334(68,8%)/142(29,3%)		
Heterozygot	1(1,1%)/1(1,1%)	7(1,4%)/2(0,4%)		
Homozygot	0(0%)/0(0%)	0(0%)/0(0%)		
Faktor V			2,052	0,358
Wildtyp	53(56,9%)/35(37,6%)	328(67,6%)/129(26,6%)		
Heterozygot	1(1,1%)/3(3,2%)	13(2,7%)/14(2,9%)		
Homozygot	1(1,1%)/0(0%)	0(0%)/1(0,2%)		
Faktor XIII			1,597	0,450
Wildtyp	28(30,4%)/19(20,7%)	194(40,0%)/76(15,7%)		
Heterozygot	22(23,9%)/17(18,5%)	128(26,4%)/58(11,9%)		
Homozygot	4(4,3%)/2(2,2%)	19(3,9%)/10(2%)		

Tabelle 20:

Vergleich der Häufigkeiten des Prothrombin-Polymorphismus, Faktor-V-Leiden-Mutation und Faktor-XIII-Polymorphismus bei Patienten und Kontrollen unter 50 Jahren

Alter unter 50	Patienten	Kontrollen	Chi-Quadrat X <sup>2</sup>	Signifikanz p
Sex ♂/♀	♂/♀	♂/♀		
<b>Faktor II</b>			<b>0,348</b>	<b>0,555</b>
Wildtyp	30(54,5%)/24(43,6%)	305(68,7%)/132(29,7%)		
Heterozygot	0(0%)/1(1,8%)	6(1,4%)/1(0,2%)		
Homozygot	0(0%)/0(0%)	0(0%)/0(0%)		
<b>Faktor V</b>			<b>1,904</b>	<b>0,386</b>
Wildtyp	28(50,9%)/23(41,8%)	300(67,6%)/118(26,6%)		
Heterozygot	1(1,8%)/2(3,6%)	11(2,5%)/14(3,2%)		
Homozygot	1(1,8%)/0(0%)	0(0%)/1(0,2%)		
<b>Faktor XIII</b>			<b>0,222</b>	<b>0,895</b>
Wildtyp	15(27,7%)/12(22,2%)	173(38,9%)/69(15,5%)		
Heterozygot	11(20,4%)/12(22,2%)	120(27%)/54(12,2%)		
Homozygot	3(5,5%)/1(1,9%)	18(4,1%)/10(2,3%)		

Tabelle 21:

Vergleich der Häufigkeiten des Prothrombin-Polymorphismus, der Faktor-V-Leiden-Mutation und des Faktor-XIII-Polymorphismus bei Patienten und Kontrollen unter 40 Jahren

Alter unter 40	Patienten	Kontrollen	Chi-Quadrat X <sup>2</sup>	Signifikanz p
Sex ♂/♀	♂/♀	♂/♀		
<b>Faktor II</b>			<b>0,472</b>	<b>0,492</b>
Wildtyp	13(41,9%)/17(54,8%)	250(68,1%)/111(30,2%)		
Heterozygot	0(0%)/1(3,2%)	5(1,4%)/1(0,3%)		
Homozygot	0(0%)/0(0%)	0(0%)/0(0%)		
<b>Faktor V</b>			<b>0,455</b>	<b>0,797</b>
Wildtyp	12(38,7%)/16(51,6%)	246(76,0%)/101(27,5%)		
Heterozygot	1(3,2%)/2(6,5%)	9(2,5%)/10(2,7%)		
Homozygot	0(0%)/0(0%)	0(0%)/1(0,3%)		
<b>Faktor XIII</b>			<b>0,806</b>	<b>0,668</b>
Wildtyp	5(16%)/11(35,5%)	143(38,9%)/60(16,3%)		
Heterozygot	6(19,4%)/6(19,4%)	100(27,2%)/44(11,9%)		
Homozygot	2(6,5%)/1(3,2%)	12(3,2%)/8(2,2%)		

## 4 Diskussion

Diese Studie untersuchte die Häufigkeit verschiedener, die Gerinnungskaskade betreffender Polymorphismen, die Faktor-V-Leiden-Mutation, den Prothrombin-g.20210G>A-Polymorphismus und den Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus, in einem Kollektiv von Patienten mit ischämischem Schlaganfall im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation. Der Prothrombin-Polymorphismus und die Faktor-V-Leiden-Mutation sind bekanntermaßen mit einem erhöhten Risiko für venöse Thrombosen verbunden, für den Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus wird eine Assoziation mit Herzinfarkt und zerebrovaskulären Geschehen diskutiert. Für keinen dieser Polymorphismen fand sich in der vorliegenden Studie eine Assoziation hinsichtlich der Manifestation eines ischämischen zerebralen Insults. Die Power für die Assoziation des Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus mit zerebralen Ischämien in dem Gesamtkollektiv war hierbei mit 0,88 recht robust.

Auch bei den explorativen Subgruppen-Analysen von Patienten mit makroangiopathischen, kardiogenen, mikroangiopathischen und ätiologisch ungeklärten zerebralen Insulten zeigte sich keine signifikante Assoziation der Polymorphismen mit den zerebralen Ischämien.

Diese Befunde stehen im Gegensatz zur Untersuchung von Elbaz et al. (2000), die einen protektiven Effekt des Val34-Allels auf die Manifestation zerebraler Ischämien gefunden hatten. Diese Arbeit nahm ebenfalls eine Subgruppen-Analyse des Phänotyps ischämischer zerebraler Insulte entsprechend der Ätiologie vor. Hierbei zeigte sich, dass der protektive Effekt des Val34 insbesondere bei Patienten mit lakunären zerebralen Ischämien nachzuweisen war. Allerdings ließ sich der protektive Effekt des Leu34-Allels auch bei Schlaganfällen mit kardiogener Ätiologie und als Trend auch bei atherothrombotischen Schlaganfällen nachweisen. Demgegenüber stehen die Befunde der vorliegenden Untersuchungen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Catto et al. (1998), Corral et al. (2000) und Endler et al. (2003), die ebenfalls keinen protektiven Effekt des Leu34-Allels auf die Manifestation ischämischer zerebraler Insulte feststellen konnten.

Es konnte weiterhin keine Assoziation zwischen den ebenfalls immer noch kontrovers diskutierten Risikofaktoren, der Faktor-V-Leiden-Mutation und dem Prothrombin-

g.20210G>A-Polymorphismus, und dem Auftreten zerebraler ischämischer Insulte gefunden werden. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit den Feststellungen vieler vorhergehender Studien, wie z. B. Lalouschek et al. (1999); Longstreth et al. (1997); Lopaciuk et al. (2001); Cushman et al (1998); Szolnoki et al. (2003), Ridker et al. (1999); Ridker et al. (1995) und Kontula et al. (1995).

Nur wenige Studien konnten Hinweise auf eine Prädisposition zu zerebralen Insulten bei Trägern des Prothrombin-g.20210G>A-Polymorphismus finden, wie de Stefano et al. (1998). Andere Studien konnten lediglich einen Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Ereignissen und dem Prothrombin-g.20210G>A-Polymorphismus aufzeigen (z.B. Rosendaal et al., 1997 und Doggen et al., 1998). In Bezug auf die vorliegende Arbeit und einige der veröffentlichten Studien ist kritisch anzumerken, dass die Untersuchungen aufgrund der geringen Allel-Frequenz dieses Polymorphismus deutlich unterpower sind. Dennoch ist festzuhalten, dass dieser Polymorphismus in einer Population der Größe der vorliegenden Studie keinen signifikanten Effekt hatte, sodass die epidemiologische Bedeutung limitiert scheint.

In Bezug auf die Faktor-V-Leiden-Mutation konnten Zenz et al. (1998) und Albucher et al. (1996) zwar Hinweise auf eine mögliche Rolle hinsichtlich eines erhöhten Schlaganfall-Risikos aufzeigen, jedoch nur in selektierten Schlaganfall-Gruppen und ohne Ergebnisse mit statistischer Relevanz.

Eine große Metaanalyse von genetischen Studien über ischämische Schlaganfälle von Casas et al. (2004) zeigte in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen keine signifikante Assoziation des Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus mit ischämischem Schlaganfall, jedoch eine signifikante Assoziation für die Faktor-V-Leiden-Mutation und den Prothrombin-Polymorphismus hinsichtlich ischämischer Schlaganfälle. In dieser Metaanalyse wurden annähernd 18.000 Patienten und 58.000 Kontrollen untersucht, jedoch waren nur kaukasische Patienten eingeschlossen.

Die Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse von Studien zu dieser Thematik sind vielfältig. So ist als wichtigste Ursache insbesondere für falsch positive Studienergebnisse die Möglichkeit von Ergebnis-orientiertem Bias der Publikationen, populationsgenetischen Effekten bei heterogener Zusammensetzung von Kontroll- und Patientenpopulationen zu nennen. Demgegenüber können falsch-negative Ergebnisse durch eine nicht ausreichende Zahl untersuchter Probanden bei vergleichsweise

schwachen Geneffekten erklärt werden. Weiterhin sind insbesondere bei komplexen genetischen Erkrankungen wie der zerebralen Ischämien heterogene Einflüsse der Gen-Umgebungswechselwirkungen zu bedenken. In gleicher Weise müssen heterogene Einflüsse bedingt durch Interaktionen verschiedener Gen-Orte in Betracht gezogen werden.

#### **4.1 Populationsgenetische Effekte**

Grundsätzlich nicht auszuschließen ist die Möglichkeit populationsgenetischer Artefakte. So wurden sowohl in der vorliegenden Untersuchung als auch in den Studien von Elbaz et al. (2000), Corral et al. (2000), Catto et al. (1998) und Endler et al. (2003) ein grundsätzlich heterogenes Kollektiv kaukasischer Patienten und Kontrollen untersucht. Keine dieser Untersuchungen kann damit die Möglichkeit populationsgenetischer Artefakte ausschließen, und insbesondere die positiven Befunde der Arbeitsgruppe um Elbaz et al. (2000) bedürfen der Bestätigung durch Untersuchungen mit einem methodischen Design, welches entweder durch die Verwendung familienbasierter Kontrollen, oder durch genetische Kontrollen die Möglichkeit populationsgenetischer Artefakte ausschließt.

#### **4.2 Studienumfang**

Die vorliegende Untersuchung basiert zum Beispiel im Vergleich zu der Untersuchung von Elbaz et al. (2000), in der 456 Patienten mit zerebralen Ischämien untersucht wurden, auf einem deutlich kleineren Patientenkollektiv von 182 betroffenen Patienten, sodass durch die geringere Power falsch negative Befunde in der vorliegenden Arbeit wahrscheinlicher als in der großen Studie von Elbaz et al. sind.

### 4.3 Gen-Umgebungseffekte

Bereits in den Untersuchungen zum Einfluss des Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus auf die Manifestation myokardialer Ischämien wurden vielfältige Genumgebungseffekte beschrieben. So fand sich entsprechend der Befundlage zu zerebralen Ischämien in mehreren Untersuchungen zwar eine positive Assoziation des Polymorphismus mit myokardialen Ischämien im Sinne eines protektiven Effektes des Leu-Allels (Kohler et al., 1998; Franco et al., 2000; Gemmati et al. 2001; Reiner et al., 2002), in vier weiteren Untersuchungen zum gleichen Thema konnte dieser Befund allerdings nicht repliziert werden (Canavy et al., 2000; Aleksic et al., 2002; Corral et al., 2000; Warner et al., 2001). Dabei konnte die Arbeitsgruppe um Kohler et al. (1999) zeigen, dass der protektive Effekt des Leu34-Allels bei Patienten mit deutlicher Insulinresistenz nicht mehr nachweisbar war, was auf die Relevanz von Umgebungsfaktoren für die Bedeutung des Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus bei Patienten mit arteriellen Ischämien hinweist.

Einen modifizierenden Effekt von Umgebungsfaktoren auf die klinische Bedeutung des Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus konnte ebenfalls in der Untersuchung von Elbaz et al. (2000) nachgewiesen werden. Bei Trägern des Leu34-Allels wurde hier im Vergleich zu Personen mit dem Val/Val-Genotyp eine deutlichere Risikoerhöhung für zerebrale Ischämien durch einen Nikotinabusus demonstriert.

Darüber hinaus zeigte eine explorative Analyse bezüglich der Häufigkeit der einzelnen etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren zwischen den TOAST-Gruppen, dass Patienten mit mikroangiopathischem Schlaganfall signifikant häufiger an einer Hypertonie oder einem Diabetes mellitus litten. Ebenso waren signifikant mehr Patienten mit makroangiopathischem Schlaganfall als mit kardioembolischem Schlaganfall Raucher. Die Häufigkeiten von Hypertonie, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie unterschieden sich bei Patienten mit makroangiopathischem im Vergleich zum mikroangiopathischen Schlaganfall zwar nicht signifikant, was am ehesten auf die relativ kleinen Fallzahlen innerhalb der einzelnen Gruppen zurückzuführen ist, diese Risikofaktoren waren jedoch ebenfalls in der Makroangiopathie-Gruppe deutlich überrepräsentiert.

Dieser Befund steht im Einklang mit den Daten aus der umfangreichen Literatur bezüglich der kardiovaskulären Risikofaktoren und ist ein Hinweis, dass das vorliegende Kollektiv eine gewisse Repräsentativität für die Gesamtbevölkerung aufweist. Üblicherweise ist die Atherosklerose ein Prozess, der sich über lange Jahre und gefördert durch die genannten Risikofaktoren entwickelt, ein makroangiopathischer Schlaganfall entsteht dann als relativ zufälliges Ereignis im Rahmen beispielsweise eines plötzlichen Blutdruckabfalls oder beim Ablösen eines atherosklerotischen Plaques. In der Studie von Endler et al. (2003) fiel auf, dass das mittlere Alter der Patienten mit 63 Jahren im Vergleich zu dem mittleren Alter der Patienten in der Studie von Elbaz et al. (2000) mit 69 Jahren sechs Jahre niedriger war. Es ließ sich hierbei kein altersabhängiger Effekt des Val34Leu-Polymorphismus nachweisen. So auch in der vorliegenden Untersuchung: Hier erlitten die Patienten im durchschnittlichen Alter von 57,5 Jahren einen Schlaganfall, wobei in der durchgeführten Subgruppenanalyse der jüngeren Patienten (< 60, < 50 bzw. < 40 Jahre) ebenfalls kein Hinweis auf einen altersabhängigen Effekt der genetischen Polymorphismen festzustellen war.

#### **4.4 Interaktion verschiedener Gen-Orte**

Potenzielle Ursachen für die fehlende Assoziation des Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus mit dem Phänotyp zerebraler ischämischer Insulte bestehen darüber hinaus in einer möglichen Interaktion verschiedener Gen-Orte, die auf die intrinsische Gerinnung einen Einfluss haben. So hatten Kohler et al. 1998 nachgewiesen, dass erhöhte Spiegel des fibrinolytischen Inhibitors Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) den protektiven Effekt des Leu34-Allels bei Patienten mit myokardialen Ischämien möglicherweise aufheben (Kohler et al., 1998). Erhöhte Spiegel des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors-1 wurden wiederum bei Patienten mit einem Polymorphismus im Promotor des PAI-1-Gens beschrieben (PAI-1 4G-5G-Polymorphismus, Wartiovaara et al., 1999). Dementsprechend erschien es möglich, dass eine Interaktion des PAI-1 4G-5G-Polymorphismus mit dem Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus für den fehlenden protektiven Effekt des Leu34-Allels bei einzelnen Patienten verantwortlich ist. Allerdings fand die Arbeit in der Gruppe von Wartiovaara et al. (1999) im Kollektiv von Patienten



mit Myokardinfarkten keine entsprechende Interaktion dieser beiden Gen-Orte, wobei der protektive Effekt des Leu34-Allels in dieser Untersuchung bestätigt werden konnte. Ebenfalls wurde keine signifikante Interaktion des PAI-1 4G-5G-Polymorphismus mit dem Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus in der oben bereits ausführlich geschilderten Untersuchung von Elbaz et al. (2000) bei Patienten mit zerebralen Ischämien nachgewiesen.

In einer Untersuchung von Carter et al. (2000) wurde demgegenüber beschrieben, dass ein häufiger Polymorphismus im Fibrinogen A $\alpha$ -Gen (Thr312Ala) den protektiven Effekt des Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus bei Patienten mit venösen Thrombosen aufhebt. Dabei hatten Studien bei Patienten mit embolischen Geschehen gezeigt, dass das Ala312-Allel mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit Vorhofflimmern bezüglich der Manifestation rezidivierender zerebraler Ischämien assoziiert ist, so dass diesem Polymorphismus offensichtlich auch ein Einfluss auf arterielle Gefäßverschlüsse zukommt (Carter et al., 1999). Der Beobachtung von Carter et al. (2000) kommt deswegen besondere Bedeutung zu, da die Position 312 in der A $\alpha$ -Fibrinogen-Kette ausgesprochen nahe an der Bindungsstelle des Faktor XIII und zur Bindungsstelle des  $\alpha$ -2-Antiplasmins liegt. Eine weitere Ursache für die heterogene Studienlage bezüglich des Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus könnte darin bestehen, dass dieser Polymorphismus im Kopplungsungleichgewicht mit anderen Polymorphismen des Gens der Faktor-XIII-A-Untereinheit steht, und der co-segregierende Marker könnte populationsspezifischen Effekten unterliegen. Daher untersuchten Kohler et al. (1999) mögliche Assoziationen weiterer Faktor-XIII-Polymorphismen mit der Manifestation myokardialer Ischämien. Allerdings konnte diese Untersuchung entsprechende Assoziation für den Pro564Leu, den Val650Ile und den Glu651Gln-Polymorphismus des Faktor-XIII-Gens nicht nachweisen (Kohler et al., 1999).

Vor dem gleichen Hintergrund untersuchten Reiner et al. (2002) mögliche Assoziationen verschiedene Polymorphismen des Faktor-XIII-Gens (Val34Leu, Tyr204Phe und Pro564Leu) in Bezug auf die Manifestation zerebraler Ischämien bei jungen Frauen mit einem Glycoprotein-Ia-C807T-Polymorphismus im Kollagenrezeptor der Plättchen. Diese Gruppe konnte keinen signifikanten Effekt des Leu34-Allels im Sinne einer Protektion gegenüber zerebralen ischämischen Ereignissen nachweisen.

## 4.5 Fazit

In der vorliegenden Studie wurde keine Assoziation der Polymorphismen Val34Leu-im Faktor-XIII-Gen, Faktor-V-Leiden und Prothrombin-g.20210G>A mit zerebralen Ischämien festgestellt. Explorative Analysen zeigten keinen Effekt für Subgruppen, die durch Art des ischämischen Schlaganfalls, Alter oder Geschlecht definiert waren. Diese Ergebnisse werden durch die teils geringe Power in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Angesichts dieser negativen Befunde in einem Kollektiv von immerhin 182 Patienten bieten diese Ergebnisse jedoch kein Argument, den Polymorphismus Val34Leu des Faktors XIII in die Routine-Diagnostik bei Schlaganfall-Patienten aufzunehmen. Vielmehr ist sogar kritisch zu diskutieren, ob eine Analyse der bei Schlaganfallpatienten aktuell häufig untersuchten Polymorphismen Faktor-V-Leiden und Prothrombin g.20210G>A gerechtfertigt ist.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden drei häufige Polymorphismen des Gerinnungssystems, der Val34Leu-Polymorphismus im Faktor-XIII-Gen, die Faktor-V-Leiden-Mutation und der Prothrombin-g.20210G>A-Polymorphismus bei 182 Patienten mit zerebraler Ischämie (38% weiblich, mittleres Alter 55,5 +/- 16,0 Jahre) und bei 500 Kontrollpersonen (29% weiblich, 33,4 +/- 11,2 Jahre) untersucht. Keiner der Polymorphismen war signifikant mit zerebralen Ischämien assoziiert (multinominale Regression). Explorativ erfolgten Subgruppenanalysen. Hierzu wurden die Patienten hinsichtlich der Ätiologie des Schlaganfalls (makroangiopatisch, kardioembolisch, mikroangiopathisch, andere Ursachen, ungeklärte Ursache) sowie nach Geschlecht und nach Alter gruppiert. Auch in diesen Subgruppen war keiner der Polymorphismen mit dem Auftreten von zerebralen Ischämien assoziiert. Zwischen den nach Ätiologie des Schlaganfalls definierten Subgruppen fanden sich erwartete signifikante Unterschiede hinsichtlich des Vorhandenseins der jeweiligen entsprechenden Risikofaktoren, was für die Repräsentativität des Kollektivs spricht. Zusammenfassend liefert diese Studie kein Argument dafür, die Analyse des Val34Leu-Polymorphismus im Faktor-XIII-Gen in die Diagnostik der zerebralen Ischämie aufzunehmen. Darüber hinaus ist den hier erhobenen Daten zu Folge auch die klinisch-epidemiologische Relevanz der etablierten genetischen vaskulären Risikofaktoren Faktor-V-Leiden-Mutation und Prothrombin-g.20210G>A-Polymorphismus für Patienten mit zerebraler Ischämie in Frage zu stellen.

## **6 Anhang**

### **6.1 Danksagung**

Ich danke Herrn PD Dr. Christoph Pohl und Frau Dr. Ursula Harbrecht sowohl für die initialen Anstöße zu dieser Arbeit als auch für die regelmäßige Unterstützung mit Rat und Tat in deren weiterem Verlauf.

Recht herzlich bedanke ich mich auch bei den Mitarbeitern des PCR-Labors des Hämatologischen Instituts der Universitätsklinik Bonn für die sehr nette Aufnahme und die geduldige Vermittlung der nötigen Kenntnisse in der Laborarbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Betreuern Dr. Michael Linnebank und Dr. Susanna Moskau-Hartmann von der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsklinik Bonn für die intensive Beratung, den fachlichen Beistand sowie die weiterführenden Korrekturhinweise.

Zusätzlich möchte ich mich noch einmal ganz speziell und recht herzlich bei Dr. Michael Linnebank für die Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanken!

Und nicht zuletzt danke ich meinem Ehemann Ben, ohne dessen entscheidende Einflussnahme ich diese Arbeit nie zum Abschluss gebracht hätte.

## 6.2 Votum der Ethikkommission



### Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität

Medizinische Einrichtungen  
**E t h i k - K o m m i s s i o n**

Ethik-Kommission, Med. Einrichtungen Bonn  
 Sigmund-Freud-Straße 25, 53105 Bonn

persönlich / vertraulich

Herrn

Dr. C. Pohl

Neurologische Klinik und Poliklinik

53105 Bonn, 14.07.00

Sigmund-Freud-Str. 25

Telefon: 2 87 - 0

Durchwahl: 2 87 - 63 60

Telefax: 2 87 - 60 94

(Vorwahl national: 02 28-;

international: + 49 -2 28- )

e-mail: ethik@uni-bonn.de

KvB/Z

#### DURCH BOTEN

**Lfd. Nr.: 122/00**

Bitte stets angeben!

**Betr.: Ihr Antrag an die Ethik-Kommission  
 „Genetik des cerebralen Insultes“**

Sehr geehrter Herr Kollege Pohl,

die Ethik-Kommission für klinische Versuche am Menschen und epidemiologische Forschung mit personenbezogenen Daten der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn hat Ihren o.g. Antrag auf ihrer Sitzung am 13.07.2000 beraten. Sie ist aufgrund der vorgelegten Unterlagen zu dem Beschluß gekommen, gegen die geplante Studie keine berufsethischen oder berufsrechtlichen Bedenken zu erheben.

Die Ethik-Kommission weist jedoch darauf hin, daß

1. nur einwilligungsfähige Patienten in die Studie eingeschlossen werden können.
2. der Studientitel einheitlich geführt werden sollte.
3. der Datenschutzpassus von Seite 15 in die Einwilligungserklärung eingefügt werden sollte.
4. die Patienten über alle genetischen Untersuchungen, die während der Studie durchgeführt werden, patientengerecht aufgeklärt werden sollten und ihr schriftliches Einverständnis dazu geben müssen.
5. Zusätzlich empfiehlt die Ethik-Kommission den Einwilligungsbogen Ja/Nein von den Patienten unterschreiben zu lassen.

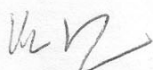
Änderungen im Prüfplan müssen der Ethik-Kommission mitgeteilt werden und bedürfen der erneuten Beratung.

Ethik-Kommission

14.07.2000

Seite 2

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. K. von Bergmann  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Nachfolgend sind die Mitglieder der Ethik-Kommission aufgeführt, die in der Sitzung am 13. Juli 2000 die o.g. Studie beraten haben:

Herr Prof. Dr. von Bergmann, Arzt für Klinische Pharmakologie, Innere Medizin  
Herr Prof. Dr. Karzel, Arzt für Pharmakologie und Toxikologie  
Frau Prof. Dr. Knöpfle, Ärztin für Kinderheilkunde und Kinderpathologie  
Herr Prof. Dr. Paeffgen, Jurist  
Herr Dr. Kühn, Arzt für Psychiatrie  
Frau Saatweber, studentische Vertreterin

## 6.3 Patienteninformation/Einverständniserklärung

### 4 Patienteninformation/Einverständniserklärung

zur Studie:

23.06.99

#### Beurteilung genetischer Risikofaktoren bei der Entstehung von Schlaganfällen

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Da Sie am .../... einen Schlaganfall erlitten haben möchten wir Sie hiermit bitten an einer Untersuchung zur Beurteilung genetischer Risikofaktoren bei der Entstehung von Schlaganfällen teilzunehmen. Ziel der Untersuchung ist die Bewertung verschiedener genetisch bedingter Veränderungen des Gerinnungssystems, bei denen nachgewiesen werden konnte, daß Sie das Risiko ein Blutgerinnsel (Thrombose) im Bereich der großen Körpervenen oder der Herzkranzgefäße zu erleiden, erhöhen. Für die Entstehung von Schlaganfällen ist der Beitrag dieser vermutlich bei einem höheren Prozentsatz aller Menschen vorkommenden genetischen Veränderungen allerdings ungeklärt und soll hier untersucht werden. Da für die Untersuchung ausschließlich eine übliche Blutabnahme aus einer Ellenbeugenvene nötig ist werden Sie durch ihre Teilnahme an der Studie keinem besonderem Risiko ausgesetzt. Ihr Blut wird für keine andere als die genannte wissenschaftliche Fragestellung verwendet. Über die bei Ihnen gefundenen Veränderungen und eventuelle therapeutische Konsequenzen werden Sie natürlich informieren.

Die bei dieser Untersuchung gewonnenen Daten unterliegen dem **Datenschutzgesetz**. Dies bedeutet, daß die Ergebnisse absolut vertraulich behandelt werden. Falls die Ergebnisse der Untersuchung in einer medizinischen Fachzeitschrift publiziert werden, wird Ihr Name ohne vorherige Zustimmung nicht genannt.

Die Untersuchung wird durchgeführt in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki, 1964 (Hongkong-Admandment 1989) und wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn als unbedenklich gewertet.

Mit der Unterzeichnung willigen Sie ein, daß die genannten Untersuchungen bei Ihnen durchgeführt werden dürfen und bestätigen, über Sinn und Hintergrund der Untersuchung informiert worden zu sein.

Eine **Kopie dieser Information** steht Ihnen zur Mitnahme zur Verfügung.

**Proband:**

**Datum:**

**Zeuge:**

**Datum:**

(darf nicht an der Untersuchung beteiligt sein)

**Untersucher:**

**Datum:**

## 7 Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u>	S. 14
Assoziation des Leu-Allels des Faktor-XIII-Val34Leu-Polymorphismus mit Gefäß-Erkrankungen	
<u>Tabelle 2:</u>	S. 20
TOAST-Klassifikation: Kardiale Hochrisiko- und Niedrigrisiko-Emboliequellen	
<u>Tabelle 3:</u>	S. 30
Arbeitsblatt für die Taqman PCR	
<u>Tabelle 4:</u>	S. 34
Bestückung der Platte	
<u>Tabelle 5:</u>	S. 36
Beispiel für einen Ergebnisausdruck	
<u>Tabelle 6:</u>	S. 37
Geschlechterverteilung von Kontrollen und Patienten	
<u>Tabelle 7:</u>	S. 37
Altersverteilung von Kontrollen und Patienten	
<u>Tabelle 8:</u>	S. 39
Vergleich der Genotypen zwischen Schlaganfallgesamtgruppe und Kontrollprobanden	
<u>Tabelle 9:</u>	S. 40
TOAST-Klassifikation und Geschlecht	
<u>Tabelle 10:</u>	S. 40
TOAST-Klassifikation und Alter	
<u>Tabelle 11:</u>	S. 41
Risikofaktoren und TOAST-Kriterien	
<u>Tabelle 12:</u>	S. 42
Subgruppe atherothrombotische Insulte vs. Kontrollen	
<u>Tabelle 13:</u>	S. 43
Subgruppe kardiogene Insulte vs. Kontrollen	
<u>Tabelle 14:</u>	S. 44
Subgruppe lakunäre Insulte vs. Kontrollen	
<u>Tabelle 15:</u>	S. 45
Subgruppe zerebrale Insulte anderer Ätiologie vs. Kontrollen	
<u>Tabelle 16:</u>	S. 46
Subgruppe zerebrale Ischämie unbestimmbarer Ätiologie vs. Kontrollen	



<u>Tabelle 17:</u>	S. 47
Vergleich Polymorphismen - Männer	
<u>Tabelle 18:</u>	S. 48
Vergleich Polymorphismen - Frauen	
<u>Tabelle 19:</u>	S. 49
Vergleich der Häufigkeiten des Prothrombin-Polymorphismus, Faktor-V-Leiden-Mutation und Faktor-XIII-Polymorphismus bei Patienten und Kontrollen unter 60 Jahren	
<u>Tabelle 20:</u>	S. 50
Vergleich der Häufigkeiten des Prothrombin-Polymorphismus, Faktor-V-Leiden-Mutation und Faktor-XIII-Polymorphismus bei Patienten und Kontrollen unter 50 Jahren	
<u>Tabelle 21:</u>	S. 51
Vergleich der Häufigkeiten des Prothrombin-Polymorphismus, Faktor-V-Leiden-Mutation und Faktor-XIII-Polymorphismus bei Patienten und Kontrollen unter 40 Jahren	

## 8 Literaturverzeichnis

Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Stroke 1993; 24: 35-41.

Albucher JF, Guiraud Chaumeil B, Chollet F, Cadroy Y, Sie P. Frequency of resistance to activated protein C due to factor V mutation in young patients with ischaemic stroke. Stroke 1996; 27: 766-768.

Aleksic N, Ahn C, Wang YW, Juneja H, Folsom AR, Boerwinkle E, Wu KK. Factor XIII Val34Leu polymorphism does not predict risk of coronary artery disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. Atheroscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 348-352.

Ardissio D, Peyvandi F, Merlini PA, Colombi E, Mannucci PM: Factor V (arg<sup>506</sup> → Gln) mutation in young survivors of myocardial infarction. Thromb Haemost 1996; 75: 701-702.

Ariëns RAS, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. Blood 2000; 96: 988-995.

Ariëns RAS, Thung-Shenq Lai, John W. Weisel, Charles S. Greenberg, Peter J. Grant. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. Blood 2002; 100: 743-754.

Bale MD, Westrick LG, Mosher DF. Incorporation of thrombospondin into fibrin clots. J Biol Chem 1985; 260: 7502-7508.

Balogh I, Szôke G, Kárpáti L. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood* 2000; 96: 2479-2486.

Barkan G, Gaspar A. Zur Frage der Reversibilität der Fibringerinnung. *Biochem Z* 1923; 139: 291-301.

Bentolila S, Ripoll L, Drouet L, Mazoyer E, Woimant F. Thrombophilia due to 20210 G → A prothrombin polymorphism and cerebral ischemia in the young. *Stroke* 1997; 28: 1846-1847.

Bertina RM, van Tilburg NH, de Fouw NJ, Haverkate F. Thrombin, a link between coagulation activation and fibrinolysis. *Ann NY Acad Sci* 1992; 667: 239.

Bertina RM, Koeleman RPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, Ronde H de, Van der Velden PA, Reitsma PH: Mutation in blood coagulation factor V associated to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64.

Brass LM, Issacsohn JL, Merkangas KR, Ribinette CD. A study of twins and stroke. *Stroke* 1992; 23: 221-223.

Brass LM, Hartigan PM, Page WF, Concato J. Importance of cerebrovascular disease in studies of myocardial infarction. *Stroke* 1996; 27: 1173-1176.

Canavy I, Henry M, Morange PE, Tiret L, Poirier O, Ebagosti A, Bory M, Juhan-Vague I. Genetic polymorphism and coronary artery disease in the South of France. *Thromb Haemost* 2000; 83: 212-216.

Carter AM, Catto AJ, Grant PJ. The association of the  $\alpha$ -fibrinogen Thr312Ala polymorphism with post-stroke mortality in subjects with atrial fibrillation. *Circulation*. 1999; 99: 2423-2426.

Carter AM, Catto AJ, Kohler HP, Ariëns RAS, Stickland MH, Grant PJ.  $\alpha$ -Fibrinogen Thr312Ala polymorphism and venous thromboembolism. *Blood* 2000; 96: 1177-1179.

Catto AJ, Kohler HP, Coore J, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood* 1999; 93: 906-908.

Catto AJ, Kohler HP, Bannan S, Stickland MH, Carter A, Grant PJ. Factor XIII Val34Leu: a novel association with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998; 29: 813-816.

Casas JP, Hingorani AC, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. *Arch Neurol* 2004; 61: 1652-1661.

Cohen I, Young-Bandala L, Blankenberg TA, Siefiring GE Jr, Bruner-Lorand J. Fibrinolytic-catalyzed cross-linking of myosin from platelet and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 1979; 192: 100-111.

Corral J, Gonzales-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Heras I, Vicente V. The venous thrombosis risk factor 20210 A allele of the prothrombin gene is not a major risk factor for arterial thrombotic disease. *Br J Haematol* 1997; 99: 304-307.

Corral J, González-Conejero R, Iniesta JA, Riviera J, Martínez C, Vicente V. The factor XIII Val34Leu polymorphism in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica* 2000; 85: 293-297.

Cottrell BA, Strong DD, Watt KW, Doolittle RF. Amino acid sequence studies on the  $\alpha$  chain of human fibrinogen: exact location of cross-linking acceptor sites. *Biochemistry* 1979; 18: 5405-5410.

Cumming AM, Keeney S, Salden A, Bhavnani M, Shwe KH, Hay CR. The prothrombin gene g.20210G>A variant: prevalence in a U.K anticoagulant clinic population. *Br J Haematol* 1997; 98: 353-355.

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

Degen SJF, Schaefer LA, Jamison CS, Grant SG, Fitzgibbon JJ, Pai J-A, Chapman VM, Elliott RW. Characterization of the cDNA coding for mouse prothrombin and localization of the gene on mouse chromosom 2. *DNA Cell Biol* 1990; 9: 487-498.

Degen SJF, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* 1987; 26: 6165-6177.

De Faire U, Friberg L, Lundman T. Concordance for mortality with special reference to ischaemic heart disease and cerebrovascular disease. A study on the Swedish Twin Registry. *Prev Med* 1975; 4: 509-517.

De Lucia D, Cerbone AM, Belli A, Di Mauro C, Renis V, Conte MM, Rocino A, Papa ML, di Biasi R. Resistance to activated protein C in adults with a history of juvenile transient ischaemic attacks. *Thromb Haemost* 1996; 76: 627-631.

De Stefano VM, Chiusolo P, Paciaroni K, Casorelli I, Rossi E, Molinari M, Servidei S, Tonali PA, Leone G. Prothrombin g.20210G>A mutant genotype is a risk factor for cerebrovascular ischemic disease in young patients. *Blood* 1998; 91: 3562-3565.

Doggen CJM, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR: Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210G-A. *Circulation* 1998; 97: 1037-1041.

Elbaz A, Poirier O, Canaple S, Chédru F, Cambien F, Amareno P. The association between the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene and brain infarction. *Blood* 2000; 95: 586-591.

Emmerich J, Poirier O, Evans A, Marques-Vidal P, Arveiler D, Luc G, Aiach M, Cambien F. Myocardial infarction, Arg506 to Gln factor V mutation, and activated protein C resistance. *Lancet* 1995; 345: 321.

Endler G, Funk M, Haering D, Lalouschek W, Lang W, Mirafzal M, Wagner O, Mannhalter C. Is the factor XIII 34Val/Leu polymorphism a protective factor for cerebrovascular disease? *Br J Haematol* 2003; 120: 310-314.

Egbring R, Seitz R, Gürten GV, Köther M, Barthels M, Fuchs G, Lerch L, Kröninger A. Bleeding complications in heterozygotes with congenital factor XIII deficiency. In: Mosesson MW, Amrani DL, Siebenlist KR, Diorio JP (eds). *Fibrinogen 3*. Elsevier Science pp 1998; 341-446.

Faul F, Erdfelder E. GPOWER: A priori, post-hoc, and compromise power analysis for MS-DOS [Computer program]. Bonn, FRG: Bonn University, Dept. Psychology, 1992.

Franco RF, Reitsma PH, Lourenço D, Maffei FH, Morelli V, Tavella MH, Araújo AG, Piccinato CE, Zago MA. Factor XIII Val34Leu is a genetic factor involved in the aetiology of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 81: 676-679.

Gemmati D, Serino ML, Ongaro A, Tognazzo S, Moratelli S, Resca R, Moretti M, Scapoli GL. A common mutation in the gene for coagulation factor XIII-A (Val34Leu): a risk factor for primary intracerebral hemorrhage is protective against arterothrombotic diseases. *Am J Haematol* 2001; 67: 183-188.

Greenberg CS, Miraglia CC, Rickless FR, Shuman MA. Cleavage of blood coagulation factor XIII and fibrinogen by thrombin during in vitro clotting. *J Clin Invest* 1985; 75: 1463-1470.

Greenberg CS, Achyuthan KE, Fenton JW. Factor XIIIa formation promoted by complexing of alpha-thrombin, fibrin and plasma factor XIII. *Blood* 1987; 69: 867-871.

Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez GA, Griffin JH, Evatt B: Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 1994; 343: 1362.

Hada M, Kaminski M, Bockenstedt P, Mc Donagh J. Covalent cross-linking of von Willebrand factor to fibrin. *Blood* 1986; 68: 95-101.

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

Happich D, Madlener K, Schwaab R, Hanfland P, Pötzsch B. Application of the TaqMan-PCR for genotyping of the prothrombin g.20210G>A mutation and of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Thromb Haemost* 2000; 84: 144-145.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 7276-7280.

Holm J, Zöller B, Svensson PJ, Berntorp E, Erhardt L, Dahlbäck B. Myocardial infarction associated with homozygous resistance to activated protein C. *Lancet* 1994; 344: 952.

Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for the a subunit of human factor XIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 5829-33.

Janus TJ, Lewis SD, Lorand L, Shafer JA. Promotion of thrombin-catalyzed activation of factor XIII by fibrinogen. *Biochemistry* 1983; 22: 6269-6272.

Jenny RJ, Pittman DD, Toole JJ, Kriz RW, Aldape RA, Hewick RM, Kaufmann RJ, Mann KG. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4846-4850.

Kane WH, Ichinose A, Hagen FS, Davie EW. Cloning of cDNAs coding for the heavy chain region and connecting region of human factor V, a blood coagulation factor with four types of internal repeats. *Biochemistry* 1987; 26: 6508-6514.

Karttunen V, Hiltunen L, Rasi V, Vahtera E, Hillbom M. Factor V Leiden and prothrombin gene mutation may predispose to paradoxical embolism in subjects with patent foramen ovale. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 261-268.

Kiely DK, Wolf PA, Cupples LA, Beiser AS, Meyers RH: Familial aggregation of stroke. The Framingham Study. *Stroke* 1993; 24: 1366-1371.

Kimura S, Aoki N. Cross-linking site in fibrinogen for alpha 2-plamin inhibitor. *J Biol Chem* 1986; 261: 15591-15595.

Kohler HP, Ariëns RAS, Whitaker P, Grant PJ. A common coding polymorphism in the factor XIII A-subunit gene (FXIIIVal34Leu) affects cross-linking activity [letter]. *Thromb Haemost* 1998; 80: 704.

Kohler HP, Stickland MH, Ossei-Geming N, Carter A, Mikkola H, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1998; 79: 8-13.

Kohler HP, Mansfield MW, Clark PS, Grant PJ. Interaction between insulin resistance and factor XIII Val34Leu in patients with coronary artery disease [letter]. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1202-1203.



Kohler HP, Futers TS, Grant PJ. Prevalence of three common polymorphisms in the A-subunit gene of factor XIII in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1999; 81: 511-515.

Kohler HP, Grant PJ. Clustering of haemostatic risk factor with FXIIIVal34Leu in patients with myocardial infarction [letter]. *Thromb Haemost* 1998; 80: 862.

Kohler HP, Schröder V. Die Rolle von Faktor XIII bei kardio- und zerebrovaskulären Erkrankungen. *Hämostaseologie* 2002; 22: 39-44.

Kontula K, Ylikorkala A, Miettinen H, Vuorio A, Kauppinen Makelin R, Hamalainen L, Palomaki H, Kaste M. Arg506Gln factor V mutation (factor V Leiden) in patients with ischaemic cerebrovascular disease and survivors of myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1995; 73: 558-560.

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

Kraus JA, Stüper BK, Müller J, Nahser HC, Klockgether T, Berlit P, Harbrecht U. Molecular analysis of thrombophilic risk factors in patients with dural arteriovenous fistulas. *J Neurol* 2002; 249: 680-682.

Lalouschek W, Aull S, Serles W, Schnider P, Mannhalter C, Papinger-Fasching I, Deecke L, Zeiler K. C677T MTHFR mutation and factor V Leiden mutation in patients with TIA/minor stroke: A case control study. *Thrombosis Research* 1999; 93: 61-69.

Landi G, Cella E, Martinelli I, Tagliabue L, Mannuci PM, Zerbi D. Arg506Gln factor V mutation and cerebral ischemia in the young. *Stroke* 1996; 27: 1697-1698.

Lewis SD, Janus TJ, Lorand L, Shafer JA. Regulation of formation of factor XIIIa by its fibrin substrates. *Biochemistry* 1985; 24: 6772-6777.

Lichy C, Reuner KH, Buggle F, Litfin F, Rickmann H, Kunze A, Brandt T, Grau A. Prothrombin g.20210G>A mutation, but not factor V Leiden, is a risk factor in patients with persistent foramen ovale and otherwise unexplained cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis* 2003; 16: 83-87.

Longstreth Jr WT, Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Koepsell TD, Reitsma PH. Risk of stroke in young women and two prothrombotic mutations: Factor V Leiden and prothrombin gene variant (g.20210G>A). *Stroke* 1998; 29: 577-580.

Lorand L. Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936: 291-311.

Margaglione M, Bossone A, Brancaccio V, Ciampa A, Di Minno G. Factor XIII Val34Leu polymorphism and risk of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 2000; 84: 1118-1119.

Markus HS, Zhang Y, Jeffery S. Screening for the factor-V Arg 506 Gln mutation in patients with TIA and stroke. *Cerebrovas Dis* 1996; 6: 360-362.

März W, Seydewitz H, Winkelmann B, Chen M, Nauck M, Witt I. Mutation in coagulation factor V associated with resistance to activated protein C in patients with coronary artery disease. *Lancet* 1995; 345: 526.

McDonagh J, McDonagh RP Jr, Delage JM, Wagner RH. Factor XIII in human plasma and platelets. *J Clin Invest* 1969; 48: 940-946.

Mikkola H, Syrjälä M, Rasi V, Vahtera E, Hämäläinen E, Peltonen L, Palotie A. Deficiency in the A-subunit of coagulation factor XIII: two novel point mutations demonstrate different effects on transcript levels. *Blood* 1994; 84: 517-25.

Mosher DF, Schad PE, Vann JM. Cross-linking of collagen and fibronectin by factor XIIIa. Localization of participating glutamyl residues to a tryptic fragment of fibronectin. *J Biol Chem* 1980; 255: 1181-1188.

Mui PT, Ganguly P. Cross-linking of actin and fibrin by fibrin-stabilizing factor. *Am J Physiol* 1977; 233: H346-H349.

Nagy JA, Kradin RL, McDonagh J. Biosynthesis of factor XIII A and B subunits. *Adv Exp Med Biol* 1988; 231: 29-49.

Naski MC, Lorand L, Shafer JA. Characterization of the kinetic pathway for fibrin promotion of alpha-thrombin-catalyzed activation of factor XIII of plasma factor XIII. *Biochemistry* 1991; 30: 934-941.

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-3703.

Prohaska W, Schmidt M, Mannebach H, Gleichmann U, Kleesiek K. The prevalence of the prothrombin 20210G>A mutation is not increased with angiographically confirmed coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1999; 81: 161-162.

Reiner AP, Frank MB, Schwartz SM, Linenberger ML, Longstreth WT, Teramura G, Rosendaal FR, Psaty BM, Siscovick DS. Coagulation factor XIII polymorphisms and the risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women. *Br J Haematol* 2002; 116: 376-382.

Renner W, Köppel H, Hoffmann C, Schallmoser K, Stanger O, Toplak H, Wascher TC, Pilger E. Prothrombin g.20210G>A, factor V Leiden and factor XIII Val34Leu: common mutations of blood coagulation factors and deep vein thrombosis in Austria. *Thromb Res* 2000; 99: 35-39.

Ridker PM, Hennekens CH, Lindpainter K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP: Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995; 332: 912.

Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. g.20210G>A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation* 1999; 99: 999-1004.

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

Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Beverly RK, Psaty BM, Longstreth Jr WT, Raghunathan TE, Koepsell TD, Reitsma PH. Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; 89: 2817-2821.

Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Vos HL. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; 90: 1747-1750.

Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RTA, Hamerton JL. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Mol Genet* 1987; 13: 285-292.

Sadasivan C, Yee VC. Interaction of the factor XIII activation peptide with  $\alpha$ -thrombin: crystal structure of its enzyme-substrate analog complex. *J Biol Chem* 2000; 275: 36942-36948.

Sanchez J, Roman J, de la Torre MJ, Velasco F, Torres A. Low prevalence of the factor V Leiden among patients with ischemic stroke. *Haemostasis* 1997; 27: 9-15.

Sane DC, Moser TL, Phippen AM, Parker CJ, Achyuthan KE, Greenberg CS. Vitronectin is a substrate for transglutaminases. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 115-120.

Sakata Y, Aoki N. Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *J Clin Invest* 1980; 65: 290-297.

Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, McKee PA. Human factor XIII from plasma and platelets: molecular weights, subunit structures, proteolytic activation, and cross-linking of fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem* 1973; 248: 1395-1407.

Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW. Plasma factor XIII binds specifically to fibrinogen molecules containing gamma chains. *Biochemistry* 1996; 35: 10448-10453.

Spraggon G, Everse SJ, Doolittle RF. Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature* 1997; 389: 455-462.

Trumbo TA, Maurer MC. Examining thrombin hydrolysis of the factor XIII activation peptide segment leads to a proposal for explaining the cardioprotective effects observed with the factor XIII V34L mutation. *J Biol Chem* 2000; 275: 20627-20631.

Trumbo TA, Maurer MC. Thrombin hydrolysis of V29F and V34L mutants of factor XIII (28-41) reveals roles of the P9 and P4 positions in factor XIII activation. *Biochemistry* 2002; 41: 2859-2868.

Van Bockxmeer FM, Baker RI, Taylor RR. Premature ischaemic heart disease and the gene for coagulation factor V. *Nat Med* 1995; 1: 185.

Warner D, Mansfield M, Grant PJ. Coagulation factor XIII and cardiovascular disease in UK Asian patients undergoing coronary angioplasty. *Thromb Haemost* 2001; 85: 408-411.

Wartiovaara U, Mikkola H, Szôke G, Haramura G, Kárpáti L, Balogh I, Lassila R, Muszbek L, Palotie A. Effect of Val34Leu polymorphism on the activation of coagulation factor XIII-A. *Thromb Haemost* 2000; 84: 595-600.

Wartiovaara U, Perola M, Mikkola H, Tötterman K, Savolainen V, Penttilä A, Grant PJ, Tikkanen MJ, Vartiainen E, Karhunen PJ, Peltonen L, Palotie A. Association of FXIII Val34Leu with decreased risk of myocardial infarction in Finnish males. *Atherosclerosis* 1999; 142: 295-300.

Webb GC, Coggan M, Ichinose A, Board PG. Localization of the coagulation factor XIII B subunit gene (F13B) to chromosome bands 1q31-32.1 and restriction fragment length polymorphism at the locus. *Hum Genet* 1989; 81: 157-160.

Weisberg LJ, Shiu DT, Conkling PR, Shuman MA. Identification of normal human peripheral blood monocytes and liver as sites of synthesis of coagulation factor XIII a-chain. *Blood* 1987; 70: 579-582.

Weisel JW, Francis CW, Nagaswami C, Marder VJ. Determination of the topology of factor XIIIa-induced fibrin gamma-chain cross-links by electron microscopy of ligated fragments. *J Biol Chem* 1993; 268: 26618-26624.

Zehnder JL, Hiraki DD, Jones CD, Gross N, Grumet FC. Familial coagulation factor V deficiency caused by a novel 4 base pair insertion in the factor V gene: factor V Stanford. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1097-1099.

Zenz W, Bodo Z, Plotho J, Streif W, Male C, Bernert G, Rauter L, Ebetsberger G, Kaltenbrunner K, Kurnik P, Lischka A, Paky F, Ploiee R, Hofler G, Mannhalter C, Muntean W. Factor V Leiden and prothrombin gene G 20210 A variant in children with ischemic stroke. *Thromb Haemost* 1998; 80: 763-766.

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