

# **Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim leichten hereditären Faktor-VII-Mangel**

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

Georg Eugen Kaser  
aus St. Tönis, jetzt Tönisvorst  
2013

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

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Johannes Oldenburg
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dieter Lütjohann

Tag der Mündlichen Prüfung: 03.04.2013

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin (IHT),  
Universitätsklinikum Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Johannes Oldenburg

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Fragestellung und Zielsetzung	9
1.1.1 Fragestellung 1	9
1.1.2 Fragestellung 2	9
1.1.3 Fragestellung 3	9
1.1.4 Fragestellung 4	9
1.2 Grundlagen	10
1.2.1 Physiologie des Hämostasesystems	10
1.2.1.1 Aktivierung	11
1.2.1.2 Initiation	11
1.2.1.3 Amplifikation	13
1.2.1.4 Propagation	13
1.2.2 Gerinnselformung	13
1.2.2.1 Fibrinbildung	13
1.3 FVII-Gen und Protein	14
1.4 Tissue Factor, Kofaktor von FVIIa	17
1.5 Hämorrhagische Diathese	17
1.5.1 FVII-Mangel	18
1.5.2 FVII-Mangel in der Schwangerschaft	24
2 Methoden	26
2.1 Einschlusskriterien des Patientenkollektivs	26
2.2 Erhebung des klinischen Phänotyps	26
2.2.1 Qualitativer Blutungstyp	27
2.2.2 Quantitativer Blutungsscore	27
2.2.3 Abort	29
2.3 Erhebung des laborchemischen Phänotyps	29
2.3.1 Laborchemische Untersuchungen	29

2.3.1.1	Thromboplastinzeit	29
2.3.1.2	Einzelfaktor-VII-Bestimmung	31
2.4	Erhebung des Genotyps	33
2.4.1	Analyse	33
2.4.1.1	DNA-Isolation	33
2.4.1.2	Polymerase-Kettenreaktion	33
2.4.1.3	DNA-Sequenzierung	35
2.4.1.4	Gelelektrophorese	35
2.4.1.5	Nachweis genomischer Deletionen	36
2.5	Statistik	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Kollektivbeschreibung	38
3.1.1	Einteilung	38
3.1.2	Altersstruktur	38
3.1.3	Indikationen	39
3.1.4	Anamnestische Blutungssymptome	40
3.2	Laborchemischer Phänotyp	40
3.2.1	FVII-Aktivität	40
3.2.2	Thromboplastinzeit	41
3.2.3	Hämorrhagische Nebendiagnosen	41
3.3	Klinischer Phänotyp	42
3.3.1	Qualitativer Blutungstyp	42
3.3.2	Quantitativer Blutungsscore	43
3.3.3	Abort	45
3.4	Genotyp	46
3.4.1	Polymorphismen	46
3.4.2	Haplotypen	47
3.4.3	Mutationen	48
3.4.4	Mutation-Haplotyp-Kombination	50
3.4.5	Gruppierungen	51
3.5	Genotypkorrelation	53

3.5.1	Indikationen und Genotyp	53
3.5.2	Anamnestische Blutungssymptome und Genotyp	53
3.5.3	Laborchemischer Phänotyp und Genotyp	54
3.5.3.1	FVII-Aktivität und Genotyp	54
3.5.3.2	INR und Genotyp	54
3.5.3.3	Hämorrhagische Nebendiagnosen und Genotyp	55
3.5.4	Klinischer Phänotyp und Genotyp	55
3.5.4.1	Qualitativer Blutungstyp und Genotyp	55
3.5.4.2	Quantitativer Blutungsscore und Genotyp	56
3.5.4.3	Abort und Genotyp	57
3.6	Klinischer und laborchemischer Phänotyp	58
3.7	FVII und Schwangerschaft	59
4	Diskussion	60
4.1	Kollektivbeschreibung	60
4.2	Laborchemischer Phänotyp	61
4.3	Klinischer Phänotyp	62
4.4	Genotyp	66
4.5	Genotypkorrelation	69
4.6	Klinischer und laborchemischer Phänotyp	75
4.7	FVII und Schwangerschaft	76
5	Zusammenfassung	77
6	Literaturverzeichnis	79
7	Danksagung	88
8	Lebenslauf	89

## Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
DC	decreasing, reduzierend
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
EGF	Epidermal Growth Factor
FII	Prothrombin
FIIa	Thrombin
FV(a)	Faktor-V (aktiviert)
FVII(a)	Faktor-VII (aktiviert)
FVII:C	Faktor-VII-Aktivität
FVIII(a)	Faktor-VIII (aktiviert)
FIX(a)	Faktor-IX (aktiviert)
FX(a)	Faktor-X (aktiviert)
FXII(a)	Faktor-XII (aktiviert)
GP	Glykoprotein-Rezeptor
HMWK	High Molecular Weight Kininogen
HT	Haplotyp
IC	increasing, steigernd
INR	International Normalized Ratio
ISI	International Sensitivity Index
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase Chain Reaction
RBD(D)	Rare Bleeding Disorder (Database)
TF	Tissue Factor
TPZ	Thromboplastinzeit
vWF	von-Willebrand-Faktor
vWS	von-Willebrand-Syndrom
WT	wildtype, Wildtyp, neutral

## Aminosäuren:

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Aspartat
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutamat
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

## Nukleotide:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

## 1 Einleitung

Der erbliche Faktor-VII-(FVII)-Mangel ist eine seltene Gerinnungsstörung, die in der Literatur mit einer Häufigkeit von 1:350 000 bis 1:500 000 angegeben wird.

Der FVII-Mangel folgt einem autosomal rezessiven Erbgang (O'Hara et al., 1987), dessen klinische Bedeutung sehr variabel ist und oft nicht mit der in vitro gemessenen Aktivität oder Antigenkonzentration korreliert (Giansily-Blaizot et al., 2001; McVey et al., 2001; Millar et al., 2000). Dem Mangel zugrunde liegende Mutationen konnten verteilt über das gesamte FVII-Gen festgestellt werden. Homozygote oder compound-heterozygote Mutationen weisen häufig Aktivitäten unter 2 % auf und können mit schwerer Blutungsneigung einhergehen (Perry, 2002). Heterozygote Mutationen gehen aufgrund des verbliebenen funktionstüchtigen Allels meistens mit asymptomatischen oder milden Blutungssymptomen einher, da auch geringe intakte FVII-Mengen eine suffiziente Gerinnung induzieren können.

Häufige Genvarianten (Polymorphismen) haben einen steigernden und reduzierenden Effekt auf die FVII-Aktivität (FVII:C) und tragen zum breiten Normwert von 60–120 % bei. Schwere Blutungen werden durch sie nicht induziert (Wulff et al., 2008).

Während einer Schwangerschaft verschiebt sich zum Schutz vor postpartalen Blutungen die Hämostase in Richtung einer Hyperkoagulabilität (Hellgren, 2003). Auch die FVII-Antigenkonzentration steigt bei gesunden Schwangeren bis zum letzten Trimenon an. Bei homozygoten Mutationen konnte kein signifikanter Anstieg dokumentiert werden (Zaidi et al., 2010), bei heterozygoten Mutationen (Kulkarni et al., 2006) zeigt sich ein gedämpfter Anstieg. Aufgrund der geringen Datenlage sind die Kenntnisse beim FVII-Mangel über Schwangerschaftskomplikationen noch gering.

## **1.1 Fragestellung und Zielsetzung**

An 93 FVII-Mangel-Patienten der „Gerinnungsambulanz Duisburg“ sollte retrospektiv der Labor-Phänotyp mit dem Blutungs-Phänotyp und dem Genotyp verglichen und analysiert werden.

### **1.1.1 Fragestellung 1**

Der klinische Phänotyp (Blutungstyp) wurde bisher qualitativ in asymptomatisch, mild und schwer differenziert. Blutungen wurden hier zusätzlich quantitativ ermittelt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den klinischen Phänotyp mittels eines Blutungsscores quantitativ zu erfassen, mit dem quantitativen Blutungstyp zu vergleichen und dem laborchemischen Phänotyp bzw. Genotyp gegenüberzustellen.

### **1.1.2 Fragestellung 2**

Der laborchemische Phänotyp (FVII-Aktivität) korreliert aufgrund unzureichender Sensitivität oft nicht mit dem klinischen Phänotyp.

Ziel der Arbeit war es, Befundkonstellationen aufzuzeigen, zu denen die molekulargenetische Analytik eine weiterführende Diagnostik darstellt und der Genotyp wichtige Zusatzinformationen für die Diagnostik bzw. den klinischen Verlauf liefert.

### **1.1.3 Fragestellung 3**

Im Kollektiv waren 2/3 der Probanden Frauen. Sie wiesen eine hohe Abortrate auf.

Ziel der Arbeit war es, die Korrelation zwischen Abort und Genotyp bei weiblichen Probanden zu analysieren.

### **1.1.4 Fragestellung 4**

Über 1/3 der Probandinnen waren aktuell schwanger.

Ziel der Arbeit war es, die Korrelation zwischen FVII-Mangel und Genotyp bei Schwangeren zu untersuchen.

## 1.2 Grundlagen

Das Hämostase- und Fibrinolyse-System besteht aus dem engen Zusammenwirken plasmatischer Faktoren und zellulärer Blutbestandteile sowie der Gefäßwand und der Blutströmung (Kleihauer et al., 1978). Um den Organismus durch Verletzungen vor großen Blutverlusten zu schützen, sind diese Komponenten mit der Aktivierung, Inhibierung und Regulation des Gerinnungssystems miteinander eng verknüpft.

Zunächst wird der Verschluss des verletzten Gefäßabschnitts durch einen Plättchen-thrombus eingeleitet (primäre Hämostase oder Blutstillung).

Dieser wird nach Einleitung der enzymatischen Fibrinbildung stabilisiert (sekundäre Hämostase oder Blutgerinnung). Die hierfür benötigten plasmatischen Faktoren gelangen zum größten Teil aus der Leber in die Blutzirkulation, können aber auch vom Endothel synthetisiert oder inaktiviert und somit reguliert werden. Die in der Ruhephase des Endothels bestehende Synthese von vasodilatatorischen, antiinflammatorischen und antiproliferativen Mechanismen werden nach Endothelaktivierung in ihrer Funktion genau umgestellt. Der Reparaturmechanismus des verletzten Endothels wird durch Wachstumsfaktoren aus den anhaftenden Thrombozyten in Gang gesetzt.

Um eine Gerinnungsausbreitung über den verletzten Bereich zu verhindern, kommen antikoagulative Mechanismen der Thrombinbildung zum Einsatz (Antithrombin, Thrombomodulin, Protein C und S) (Preissner, 2008). Der Thrombus wird anschließend noch organisiert und schließlich durch Fibrinolyse aufgelöst. Hierzu dient das proteolytische Enzym Plasmin, das Fibrinfäden spalten kann. Plasmininhibitoren bremsen wiederum das fibrinolytische System (Barthels und Depka, 2003).

### 1.2.1 Physiologie des Hämostasesystems

Das Modell von Davie und Ratnoff der „kaskadenartigen Blutgerinnung“ hat prinzipiell noch Bestand (Davie und Ratnoff, 1964). Das „Cell Based Model“ erklärt die Hämostase durch die Koagulation auf der Zelloberfläche insbesondere auf aktivierten Thrombozyten. Es erhöht das Verständnis der Gerinnungsphysiologie in vivo und der Pathophysiologie von Gerinnungsstörungen. Der plasmatische Gerinnungsprozess wird nach der Thrombozytenaktivierung in drei verschiedene Phasen unterteilt (Hoffman, 2003): Initiation, Amplifikation und Propagation.

### 1.2.1.1 Aktivierung

Die Gerinnung wird ausgelöst durch eine Gefäßendothelverletzung (Trauma) mit Freilegung subendothelialer Gefäßwandstrukturen (Matrix). Kollagen und von-Willebrand-Faktor (vWF) treten nun in Kontakt mit Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren. Die Thrombozytenadhäsion an der Matrix subendothelialer Schichten ist der 1. Schritt in der Hämostase. Er wird durch den polymeren und hochmolekularen vWF ermöglicht. Das sehr lange vWF-Molekül bindet dabei mit dem Thrombozytenrezeptor Glykoprotein (GP) Ib/IX, hält den Thrombozyten an der Gefäßverletzung bei bestehender Blutströmung fest und startet den Aktivierungsprozess (Kehrel, 2008). Der aufgerollte vWF wird durch die Blutströmung entfaltet und die Bindungsstellen für den Thrombozyten, Kollagen und FVIII, werden freigegeben. Der vWF wird in den Endothelzellen und Megakaryozyten aus identischen translatierten Untereinheiten synthetisiert. Aus zwei Molekülen des Prä-Pro-vWF wird zunächst nach Abspaltung des Prä-Peptids ein Dimer gebildet. Im Golgi-Apparat schließlich wird aus dem Pro-vWF-Dimer dann das vWF-Multimer mit unterschiedlicher Länge von 660.000 bis 2.000.000 Dalton synthetisiert und in den Weibel-Palade-Bodies der Endothelzelle gespeichert (Pötzsch und Madlener, 2002). Durch Thrombin-, Serotonin- oder Histaminreize wird durch Endothelaktivierung der vWF ins Blut sezerniert, bindet dort den FVIII und führt diesen an die Phospholipidoberfläche des Thrombozyten. Die Bindung des GP-IV-Rezeptors mit dem subendothelialen Kollagen führt dann schließlich zur Thrombozytenaktivierung mit der Zielsetzung, den Rezeptor GP-IIb/-IIIa für Fibrin zu öffnen und die Aggregation einzuleiten (Pötzsch und Madlener, 2002).

### 1.2.1.2 Initiation

Die aggregierten (verklumpten) Thrombozyten bewirken eine Exponierung negativ geladener Phospholipide auf der Zelloberfläche, an die sich durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Brücken die aktivierten Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren über ihre negativ geladenen Gla-Domänen ankoppeln können (siehe Abb. 1).

Die Initiation geschieht durch die Aktivierung von freiem FVII zu VIIa durch den Tissue Factor (TF), der aus tiefen Zellschichten der Gefäßmatrix freigesetzt wird.

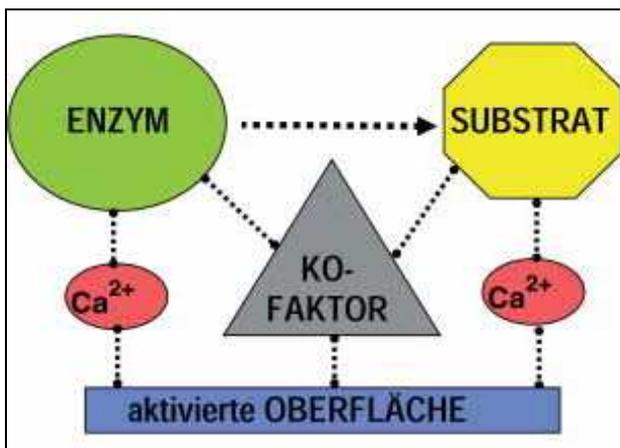
In vitro kann das extrinsische System durch die Gabe von Thromboplastin (humaner oder tierischer TF) und  $\text{Ca}^{2+}$  zu Zitratblut aktiviert werden (TPZ, siehe 2.3.1.1).

FVIIa (Enzym) bildet zusammen mit FX (Substrat) über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle auf der aktivierten Thrombozytenoberfläche den extrinsischen Tenasekomplex (oder Aktivierungskomplex), aus dem aktivierter FXa resultiert (siehe Abb. 1; Tab. 1). Der TF (Kofaktor) wird auf der Zellmembran spezifisch gebunden.

In unmittelbarer Nähe zu Substrat und Enzym wirkt der Kofaktor im Komplex beschleunigend auf die Reaktion zwischen Substrat und Enzym.

Bei höheren Konzentrationen von TF und FVIIa erfolgt parallel die extrinsische Aktivierung des endogenen Systems („Cross over“) durch Aktivierung von FIX (Substrat).

Anschließend bilden die ersten geringen FXa-Mengen den Prothrombinasekomplex: FXa fungiert jetzt als Enzym und Prothrombin (FII) als Substrat. Zusammen mit dem Kofaktor Va (FVa) auf der Oberfläche der gerinnungsaktiven Phospholipiden entstehen die ersten Mengen an Thrombin (FIIa).



**Abb. 1:** Cell Based Model (Preissner, 2008) Aktivierung der Vitamin-K-abhängigen Faktoren auf der Zelloberfläche im Multienzymkomplex.

Funktion	Komplex	Enzym	Substrat	Kofaktor	Ziel
Initiation	Extrinsische Tenase	FVIIa	FX	TF	FXa
Selbstverstärkung	Intrinsische Tenase	FIX a	FX	FVIIIa	FXa
Kontaktaktivierung	Intrinsisch	FXIIa	FIX	HMWK	FIXa
Cross over	Ex- nach Intrinsisch	FVIIa	FIX	TF	FIXa
Propagation	Prothrombinase	FXa	FII	FVa	FIIa

**Tab. 1:** Multienzymkomplex

Funktion, Aufgabe und Zielsetzung der Gerinnungsfaktoren im Multienzymkomplex.

### **1.2.1.3 Amplifikation**

Die initiale geringe Thrombinmenge aktiviert wiederum Thrombozyten an ihren „Protease-aktivierbaren Rezeptoren“ (PAR). Durch Aktivierung von FXI zu XIa und die Kofaktoren VIII und V zu FVIIIa und Va stimuliert Thrombin das endogene Gerinnungssystem sowie den FV als Kofaktor seines eigenen Proteasekomplexes (Selbstverstärkung) (Preissner, 2008).

### **1.2.1.4 Propagation**

Das nun durch Thrombin stimulierte endogene System mündet in den intrinsischen Tenasekomplex: Mit FIXa als Enzym und FVIIIa als Kofaktor kommt es jetzt nach der Amplifikation zur deutlich stärkeren FXa-Generierung als es zuvor über FVIIa möglich war. Auch der erneute „Durchlauf“ der Prothrombinase (siehe Tab. 1) ist jetzt viel effektiver und es kommt zum sogenannten „Thrombinburst“, der jetzt ausreichend Fibrin an der Gefäßverletzung bilden kann (Pötzsch und Madlener, 2002). Da die intrinsische Tenase und die Prothrombinase mit ihren Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren einschließlich ihrer Kofaktoren (siehe Abb. 1) entscheidend den Thrombinburst induzieren, kommt einer Störung innerhalb dieser Systeme eine hohe Bedeutung beim Ablauf der Gerinnungskaskade zu. Der initiale Aktivierungskomplex (extrinsische Tenase), um den es in unserer Arbeit geht, dient letztlich nur als „Zündfunke“ (Preissner, 2008).

## **1.2.2 Gerinnselbildung**

Ein Blutgerinnsel besteht aus dem Verbund von aggregierten Thrombozyten und über die Gerinnungskaskade gebildetem Fibrin. Hierbei bindet das zu Fäden polymerisierte Fibrin an seinen spezifischen Rezeptor auf dem Thrombozyt. Das Ziel ist es, den Plättchenthrombus nach der primären Hämostase (oder Blutstillung) an das umliegende Gewebe zu binden und ihn zu stabilisieren.

### **1.2.2.1 Fibrinbildung**

In der Leber wird das Fibrinogenmolekül aus drei verschiedenen Peptid-Ketten ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette) gebildet. Die ineinander verdrehten Moleküle verbinden sich an ihren Enden spiegelbildlich mit je einer weiteren Kette. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten weisen dabei an dieser kovalenten Verbindungsstelle kurze überstehende A- und B-Peptidketten auf.

Durch Thrombin werden diese aus dem Molekül herausragenden Peptide abgetrennt. Daraus resultiert eine Konformationsänderung des Moleküls und es entsteht das erste Fibrinmonomer mit seinen D-Domänen an den Enden und der E-Domäne im Zentrum des Moleküls. Die Verbindung dieser Monomere an den D-Domänen bildet die Polymerkette (Pötzsch und Madlener, 2002). Durch den FXIII erfolgen anschließend die Quervernetzung und Organisation des Fibringerüsts.

### 1.3 FVII-Gen und Protein

Das Gen für den FVII liegt auf Chromosom 13 (13q34) (O'Hara et al., 1987). Das FVII-Protein wird über die Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) in der Leber synthetisiert (Wion et al., 1985), (Hassan et al., 1990). Die mRNA umfasst acht Exone und kodiert insgesamt 406 Aminosäuren des Proteins (O'Hara et al., 1987). Seine Intron-Exon-Sequenzen ähnelt anderen Vitamin-K-abhängigen Faktoren (McVey et al., 2001):

- In der 5'-flanking-Region befindet sich der regulative Promoterbereich. Er liegt vor dem ATG-Translation-Startcodon zu Anfang der Pre-Pro-Sequenz. Hier befindet sich ca. 50 Basenpaare aufwärts das AGT-Transkriptions-Startcodon sowie verschiedene Bindungsstellen zur Regulation der Transkription. Die Signalpeptidbindungsstelle (Sp 1) liegt im Bereich -100 bis -94 und ist eine kurze ubiquitär vorkommende Transkriptions-Sequenz vieler viraler oder zellulärer Promoter-Regionen (Greenberg et al., 1995). Diese hydrophoben Peptide sind für den Transport des Proteins aus dem endoplasmatischen Retikulum verantwortlich und werden anschließend durch Signalpeptidasen vom Protein abgetrennt. Sie binden spezifische regulatorische Proteine im Promoter-Bereich, der beim FVII TATA und CAAT frei ist. TATA- und CAAT-Sequenzen sind üblicherweise Regionen im Promoterbereich, an die sich die RNA-Polymerase binden kann (Murken et al., 2003). Unweit vom Transkriptions-Startcodon liegt im Bereich von -63 bis -55 die Bindungsstelle für den „Hepatocyte nuclear factor 4“ (HNF4), der die leberspezifische Synthese des FVII beeinflusst.
- Exon 1 wird in 1a und 1b unterteilt und Exon 1b fehlt bei 90 % der mRNA (Aminosäuren -39 bis -17) oder stellt eine alternative Spleißstelle dar. Dadurch ist die Pre-Pro-Sequenz entweder 60 oder 38 Aminosäuren groß, kodiert die Aminosäuren -55 bis -17 und beinhaltet die „secretory signal sequence“, die die zelluläre Sekretion steuert (McVey et al., 2001; Perry, 2002).

- Exon 2 kodiert die hoch konservierte Pro-Sequenz von Aminosäure -17 bis -1. Sie ist wichtig für die  $\gamma$ -Carboxylierung der Gla-Domäne. Die Gla-Domäne wird ebenfalls vom Exon 2 kodiert und durch die Aminosäuren 1 bis 38 gebildet. Die Pro-Sequenz wird zusammen mit der Pre-Pro-Sequenz nach der Synthese des Proteins zwischen der Aminosäure -1 und 1 bei der Sekretion aus der Leberzelle ins Blut abgespalten (Tuddenham et al., 1995). Die Gla-Domäne mit ihren  $\gamma$ -carboxylierten Glutaminsäureresten bildet die Bindungsstelle zu den negativ geladenen Phospholipiden der Thrombozyten über  $\text{Ca}^{2+}$  (Hagen et al., 1986), (O'Hara et al., 1987). Durch die Bindung an  $\text{Ca}^{2+}$  erfolgt eine Konformationsänderung des Moleküls, die wiederum die Bindung an TF erleichtert (Wildgoose et al., 1992). Die  $\gamma$ -Carboxylierung der Glutaminsäurereste auf der Gla-Domäne ist eine posttranslationale Modifikation des FVII-Proteins, bei der Vitamin-K als Kofaktor eine entscheidende Rolle übernimmt. Aus dem Vitamin-K-Epoxidzyklus wird zunächst durch Reduktion das Vitamin-K-Hydrochinon generiert. In Anwesenheit von  $\text{O}_2$  und  $\text{CO}_2$  erfolgt dann die Carboxylierung der Glutamatreste zu  $\gamma$ -Carboxyglutamat, wodurch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsaffinität der Gla-Domäne erheblich gesteigert wird. Das Vitamin-K-Hydrochinon erfährt dabei eine Oxidation zu Vitamin-K-Epoxid. Über die Vitamin-K-Epoxidreduktase wird das Vitamin-K-Hydrochinon anschließend im Vitamin-K-Epoxidzyklus resynthetisiert. Bleibt die Carboxylierung der Glutamatreste durch einen Vitamin-K-Mangel aus, werden funktionsuntüchtige FVII-Moleküle in die Blutbahn sezerniert, sogenannte „Proteins in Vitamin-K Absence“ (PIVKA). Cumarinderivate hemmen die Epoxidreduktase, wodurch die therapeutische Wirkung der Vitamin-K-Antagonisten erklärt wird (Pötzsch und Madlener, 2002). Die zehn Glutaminsäurereste liegen auf den Positionen 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 und 35.
- Exon 3 kodiert die Aminosäuren 38 bis 46, wird als „hydrophobic aromatic stack“ (Perry, 2002) bezeichnet und ist eine konservierte, amphipathische (Molekülenden mit unterschiedlichen Eigenschaften) Helix-Struktur. Sie trennt die Gla-Domäne von der darauffolgenden Molekülstruktur (McVey et al., 2001).
- Exon 4 und 5 kodieren die Aminosäuren 46 bis 84 und 84 bis 131 und bilden die dem „Epidermal Growth Factor“ ähnlichen Domänen EGF 1 und EGF 2, die eine Tissue Factor-affine Bindungsstelle aufweisen.

- Exon 6 und 7 kodieren die Aminosäuren 131 bis 167 und 168 bis 209 und bilden die Aktivierungsdomäne, die die Spaltstelle zur Aktivierung von FVII zu FVIIa aufweist. Die katalytische Domäne wird hier bei der Aktivierung vom Rest des Proteins getrennt. FVII liegt als einziger Gerinnungsfaktor in geringen Mengen (ca. 1 %) in seiner aktivierten Form vor. FVII wird durch Spaltung an der Peptidbindungsstelle 152-153 aktiviert. Die zwei entstandenen Ketten werden anschließend durch die Aminosäuren 135 und 262 über eine Disulfidbrücke wieder miteinander verbunden (McVey et al., 2001). Seine Halbwertszeit beträgt drei bis vier Stunden. Die Aktivierung von FVII erfolgt autokatalytisch oder durch andere aktivierte Serinproteasen wie FXa, IXa, XIIa und Thrombin.
- Exon 8 kodiert die Aminosäuren 210 bis 406 der katalytischen Domäne mit ihrer katalytischen Triade His193, Asp242 und Ser344. Die katalytische Triade beinhaltet drei spezifisch angeordnete Aminosäuren im aktiven Abschnitt eines Enzyms. Serinproteasen gehören zur Familie der Peptidasen und stellen somit Enzyme dar, die Proteine und Peptide spalten; im Falle des FVIIa wird dies zur Aktivierung von FIX und X genutzt. Die Serinproteasen weisen in ihrer Triade definitionsgemäß die Aminosäure Serin auf. Zu ihnen zählen neben FVIIa, Thrombin, FXa, XIa und Plasmin auch die Verdauungsenzyme Trypsin, Chymotrypsin und Elastase. Die Triade weist zwischen ihren Aminosäureresten Histidin, Aspartat und Serin bindende Wasserstoffbrücken auf, was an der (-OH)-Gruppe des Serins zu einer starken negativen Polarisierung führt. Das negativ geladene Sauerstoffatom erhält dadurch eine starke Nukleophilie und vermag jetzt die Struktur anderer Proteine anzugreifen und deren Aktivierungspeptide abzutrennen. Nach Herausbildung des Enzym-Substratkomplexes, z. B. im Tenase- oder Prothrombinasekomplex, erfolgt ein nukleophiler Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff im Substrat, der schließlich unter Verschiebung der Wasserstoffionen zur Trennung der Peptidbindung führt und diesen aktiviert (Voet und Voet, 1994). Eine spezifische Hemmung der Serinproteasen findet durch die Serinproteaseinhibitoren, kurz Serpine, statt. Eine Verminderung der Serpine, wie z. B. beim Antithrombin-Mangel, bedingt eine starke Thrombophilie.
- In der 3'-flanking-Region befindet sich hinter dem Exon 8 der nicht translatierte Bereich des FVII-Gens.

#### 1.4 Tissue Factor, Kofaktor von FVIIa

Gewebethromboplastin („Tissue Factor“) befindet sich in Zellen des Subendothels, der Thrombozyten und Leukozyten und steht erst nach einer Gefäßverletzung in Kontakt zu strömendem Blut. Das Gen von Thromboplastin befindet sich auf dem Chromosom 1 (1p22-p21). Der Tissue Factor (TF) stellt im Aktivierungskomplex den beschleunigenden Kofaktor zu FVII(a) dar, der die Aktivierung der Proenzyme FX und IX um mehrere Zehnerpotenzen steigert (Pötzsch und Madlener, 2002). Er ist ein transmembranes Protein und besteht aus insgesamt drei Domänen (Kao et al., 1988):

- Die 1. Domäne weist 263 Aminosäuren auf, befindet sich außerhalb der Zellmembran und stellt für den FVIIa die Bindungsstelle dar. Die TF/FVIIa-Komplexbindung ist vornehmlich an der EGF-Domäne des FVIIa lokalisiert.
- Die 2. Domäne liegt mit ihren 23 Aminosäuren transmembran und stellt den Kontakt von FVIIa zu den Phospholipiden der Zelloberfläche her. Durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Bindung der Gla-Domäne auf der Phospholipidmembran verändert die katalytische Domäne des FVIIa ihre Tertiärstruktur wodurch die katalytische Triade dann ihre proteolytischen Fähigkeiten erhält (Banner et al., 1996).
- Die 3. Domäne misst 21 Aminosäuren, liegt intrazellulär und ist nicht direkt am Gerinnungsprozess beteiligt, sondern übernimmt eine rezeptorähnliche Signalfunktion für zahlreiche andere Funktionen des TF, wie z. B. der Angiogenese (Belting et al., 2004), Metastasierungen und Inflammation (Ahamed und Ruf, 2004). Diese Funktionen stehen im Fokus weiterer Forschungen (Morrissey, 2001).

#### 1.5 Hämorrhagische Diathese

Eine hämorrhagische Diathese ist eine pathologisch gesteigerte Blutungsneigung. Symptome können alle verstärkten Blutungen sein wie z. B. eine verlängerte Blutungszeit, Hämatome ohne bzw. durch geringe Gewalteinwirkung, Zahnfleisch- bzw. Nasenbluten, Blutungen im Verdauungs- bzw. Urogenitaltrakt oder Gelenkeinblutungen. Symptome der weiblichen hämorrhagischen Diathese stellen die Menorrhagie sowie bei Schwangeren die prä- bzw. postpartale Blutung dar.

Eine vermehrte Blutungsneigung resultiert vor allem aus Störungen der Blutgerinnung (plasmatische Koagulopathien). Grundsätzlich kann jeder Mangel eines Gerinnungsfaktors zu einer Blutungsneigung führen. Bei den angeborenen Koagulopathien liegen

Gendefekte der betroffenen Gerinnungsproteine zugrunde, die zu einem Mangel oder zu einer Funktionsstörung des betroffenen Gerinnungsfaktors führen. Die Hämophilie A (FVIII-Mangel) und B (FIX-Mangel) sind die häufigsten Koagulopathien und werden X-chromosomal rezessiv vererbt (Oldenburg und Barthels, 2008). Der Mangel an Fibrinogen, Prothrombin, FV, VII, X, XI, XIII hat mit 3 bis 5 % nur einen geringen Anteil an den hereditären Hämophilien. Sie werden autosomal rezessiv vererbt und ihre Prävalenz beträgt je nach Faktor etwa 1:350.000 bis 1:2.000.000 in den westlichen Ländern. Eine Datenbank zu den „Rare Bleeding Disorders“ (RBD) wird von der Universität in Milan unterhalten und ist online einsehbar (Peyvandi und Bianchi-Bonomi, 2011). Der kombinierte Mangel von Vitamin-K-abhängigen Faktoren beruht auf einer posttranslationalen Störung, verursacht durch genetische Enzymveränderungen der  $\gamma$ -Carboxylierung (Typ 1) oder des Vitamin-K-Epoxydzyklus (Typ 2) (Rost et al., 2004). Die „Vitamin-K dependent Clotting Factor Deficiency“ (VKCFD) ist sehr selten (Weston und Monahan, 2008).

### **1.5.1 FVII-Mangel**

Der FVII-Mangel bildet mit einer Häufigkeit von 1:350.000 bis 1:500.000 eine seltene Hämostasestörung, ist aber innerhalb der „Rare Bleeding Disorder Database“ (RBDD) mit ca. 36 % der häufigste Faktorenmangel (Peyvandi et al., 2010). Aufgrund der Lage des FVII-Gens liegt ein autosomal rezessiver Erbgang für den FVII-Mangel vor. Ein schwerer FVII-Mangel resultiert aus einer homozygoten oder compound-heterozygoten Mutation, also einer genetischen Veränderung auf beiden Allelen. Ein leichter FVII-Mangel ist häufig durch eine heterozygote Mutation verursacht, die mit einer Häufigkeit von 1:350 in der Normalbevölkerung angenommen wird (Wulff et al., 2008), und stellt sich phänotypisch meist asymptomatisch dar (Giansily-Blaizot, 2004). Gleiche Mutationen bei Patienten mit unterschiedlichem Phänotyp legen den Einfluss von Umwelt- oder unbekanntem Erbfaktoren nahe (Mariani und Bernardi, 2009; Mariani et al., 2005). In der „FVII Mutation Database“ des MRC Clinical Sciences Centre, London (McVey et al., 2001) werden 70 unterschiedliche Mutationen aufgeführt. Sie verteilen sich auf das gesamte Gen, beeinflussen alle Domänen des Proteins und sind zu 70 % Missense-, 10 % Deletions-, 9 % Spleißstellen-, 6 % Promoter-, 4 % Nonsense- und zu 1 % Insertions-Mutationen. Missense-Mutationen, die nur eine Veränderung der insgesamt 406 Amino-

säuren bewirken, weisen auch in der homozygoten Form oft nur milde Blutungen auf und fallen im Rahmen einer Routinediagnostik auf. Lediglich sechs der 49 (70 %) dokumentierten Missense-Mutationen weisen den schweren Blutungstyp auf. Die Missense-Mutationen auf Position 100, 242, 328 und 359 sind neben ihrer funktionellen Störung auch mit einem reduzierten FVII-Antigen assoziiert. Im Falle der Missense-Mutation auf Position 152, die an der Aktivierung von FVII zu FVIIa beteiligt ist, zeigt sich eine aufgehobene FVII-Aktivität für den schweren Blutungstyp verantwortlich. Bei der Missense-Mutation auf Position 79 (EGF-Domäne) konnte für den Funktionsverlust eine fehlende Affinität zum TF festgestellt werden. Der Funktionsverlust der Missense-Mutationen auf Position 242 und 328 begründen sich durch Veränderungen innerhalb der katalytischen Triade (siehe 1.3).

McVey gliederte den klinischen Phänotyp in drei Gruppen: Schwere Blutungen weisen 17 % und milde Blutungen 16 % in der „FVII Mutation Database“ auf. Asymptomatisch sind 28 % und werden ausschließlich durch Missense-Mutationen dargestellt. Ihr Verteilungsmuster für die FVII-Aktivität gleicht der größten Gruppe ohne klinische Angaben von 39 %, sodass der Anteil der asymptomatischen Mutationen vermutlich deutlich höher einzuschätzen ist. Patienten mit schwerem FVII-Mangel sterben oft peripartal und weisen meist eine FVII-Aktivität unter 2 % auf. Hier werden compound-heterozygote oder homozygote Mutationen gefunden, die mit einem Abbruch der Proteinsynthese einhergehen wie Promoter-, Spleißstellen- und Frameshift-Mutationen durch Deletionen. Der milde Blutungstyp ist durch eine FVII-Aktivität von unter 1 % bis 52 % beschrieben und ist oft durch compound heterozygote oder homozygote Mutationen bedingt. Die Mutationen sind hier aber fast ausschließlich Missense-Mutationen und der klinische Phänotyp korreliert nicht mit der FVII-Aktivität. Die Diskrepanz zwischen dem laborchemischen und klinischen Phänotyp erklärt sich daraus, dass noch geringste Mengen an FVII-Antigen (empirische Studien und mathematische Modelle sprechen von 0,05 %) eine ausreichende Gerinnung induzieren können, wenn hierdurch die Barriere des „Tissue Factor Pathway Inhibitor“ noch überwunden und der Prothrombinasekomplex erstmalig gestartet werden kann. Eine niedrige FVII-Aktivität vermindert nicht die Thrombingenerierung, sondern verzögert lediglich die Initiationsphase bis zur Aktivierung der Kofaktoren Va und VIIIa. Die anschließende Propagation

und Amplifikation verläuft unabhängig von der FVII-Aktivität (Jones und Mann, 1994; Lawson et al., 1994).

In die „FVII Mutation Database“ und in „RBDD“ können über das Internet mittels eines elektronischen Formulars weitere Mutationen standardisiert eingereicht werden (McVey et al., 2001; Peyvandi und Bianchi-Bonomi, 2011). Auf der Greifswalder Datenbank sind 131 unterschiedliche Mutationsarten (Herrmann et al., 2009) einschließlich Phänotyp beschrieben. Es zeigt sich auch hier eine ähnliche Mutationsverteilung wie bei der Londoner „FVII Mutation Database“ mit 65 % Missense-, 8 % Deletions-, 18 % Spleißstellen-, 13 % Promoter-, 8 % Nonsense und 2 % Insertions-Mutationen. Eine weitere Datenbank mit insgesamt 225 Mutationen lässt sich auf der Homepage der „International Society on Thrombosis & Haemostasis“ (PDF-Datei) einsehen (Zivelin und Seligsohn, 2011).

Polymorphe Varianten bzw. Polymorphismen (PM) des FVII-Gens haben normalerweise keine krankheitsinduzierende Wirkung, können aber eine Varianz der FVII- Proteinkonzentration bzw. -aktivität innerhalb einer Population bedingen (Bernardi et al., 1996). Insgesamt sind in der Greifswalder Datenbank zehn verschiedene Polymorphismen für den FVII dokumentiert (Wulff et al., 2008), die die FVII-Aktivität sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können. Ihr Einfluss auf die FVII-Aktivität tritt nur auf nicht mutierten Allelen auf. Bei homozygoten oder compound-heterozygoten Mutationen ist ihr Effekt somit von untergeordneter Bedeutung (Wulff et al., 2008). Weiterhin ließ sich in der Greifswalder Datenbank aufzeigen, dass auf fast allen Allelen mit gleicher Mutation auch die gleichen Polymorphismen gefunden wurden und somit ein gemeinsamer Ursprung angenommen wird („Founder Effect“).

Die Polymorphismen werden in sechs Haplotypen (HT) zusammengefasst, da sie in verschiedenen Gruppierungen gemeinsam vererbt werden (Kopplungsungleichgewicht oder „linkage disequilibrium“). Eine Population wird durch einen solchen Haplotypen-Block meistens ausreichend beschrieben (The International HapMap Consortium, 2003).

Bei der analytischen Sequenzierung des Desoxyribonukleinsäure-Moleküls (DNA) geht die Zuordnung der molekulargenetischen Analyse zu den Einzel-Allelen verloren. Durch eine Untersuchung von Familienangehörigen kann die Zuordnung der Allele erfolgen. In der Literatur werden bisher 16 Polymorphismen beschrieben (siehe Tab. 2):

PM	Sequenz	Variante	Triplett	AS	Alias	Relation	Effekt
1	5'-flanking	-670 A>C				0,76/0,24	IC
2	5'-flanking	-630 A>G				0,81/0,19	IC
3	5'-flanking	-402 G>A				0,71/0,29	IC
4	5'-flanking	-401 G>T				0,91/0,09	DC
5	5'-flanking	-323 [0-bp]			a1>a2	0,77/0,23	DC
6	5'-flanking	-122 T>C			p1>p2	0,91/0,09	
7	Intron 1a	74 G>A			g1>g2		
8	Exon 2	3927 G>A	CAG/CAA	Q35Q			
9	Intron 4	7728 C>A					
10	Exon 5	7882 C>T	CAC/CAT	H115H	h1>h2	0,80/0,20	
11	Intron 7	[7 bp] 5-8x			h5-h8		IC
12	Intron 7	10523 G>A			i1>i2	0,82/0,18	
13	Exon 8	10907 C>T	GCC/GCT	A330A	m3>m4	0,99/0,01	
14	Exon 8	10916 G>A	TCG/TCA	S333S	s1>s2	0,99/0,01	
15	Exon 8	10976 C>T	CGG/CAG	R353Q	m1>m2	0,80/0,20	DC
16	3'-flanking	11292 [AA]					DC

**Tab. 2:** Polymorphismen des FVII-Gens (Wulff et al., 2008), (Geisen, 2005)

Die bekannten Polymorphismen (PM 1-16) mit Häufigkeiten und Varianten, die zu Veränderungen in den Sequenzen oder Triplett-Codes führen und einen Effekt auf die FVII-Aktivitäten haben können (Literaturangaben).

IC: steigernder Effekt (increasing); DC: reduzierender Effekt (decreasing)

[ ]: Insert; bp: Basenpaare; AS: Aminosäure

Durch Expressions- und Populationsstudien konnte für viele Polymorphismen ein steigernder und reduzierender Einfluss auf die FVII-Aktivität festgestellt werden:

- Für die Polymorphismen 1, 2 und insbesondere 3 (Hooft et al., 1999) sind Veränderungen der Promotereigenschaft dokumentiert, die zu einer erhöhten Transkription und Proteinexpression mit signifikanter Erhöhung der FVII-Aktivität führen. Für den Polymorphismus 11 im Intron 7 werden FVII-Antigenerhöhungen für die Variation mit der 7- bis 8-fachen Repeatrate der 38 Basenpaare (bp) durch Beeinflussung der mRNA-Spleißung berichtet (Pinotti et al., 2000). Quantitative Untersuchungen ergaben für diesen Polymorphismus eine höhere mRNA-Expression (Perry, 2002).
- Die Polymorphismen 4, 5, 15 und 16 sind mit einer verminderten FVII-Aktivität assoziiert. Der Polymorphismus 4 zeigt eine verminderte basale Transkriptionsrate in der Leberzelle (Hooft et al., 1999). Ebenso kommt es beim Polymorphismus 5 mit seiner Decanucleotidinsertion (Kudaravalli et al., 2002; Pollak et al., 1996) durch eine Reduktion der Promoteraktivität zur Beeinflussung der Proteinsynthese. Beim Poly-

morphismus 15 resultiert aus der Codonveränderung auf dem Exon 8 eine Veränderung der Aminosäure auf Position 353 von Arginin auf Glutamin und damit eine Veränderung des Moleküls, die den intrazellulären Prozess, die Sekretion oder die FVII-Aktivität beeinflusst (Green et al., 1991).

- Die Polymorphismen 8, 10, 13, und 14 liegen ebenfalls auf Exons. Hier kommt es nur zur Veränderung des Triplett-Codes, nicht aber zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz und somit auch nicht zu einer Aktivitätsminderung des Proteins. Für die Polymorphismen 7, 9 und 12 im Intronbereich werden keine Veränderungen der FVII-Aktivität berichtet.

In der Greifswalder Datenbank (FVII-Register) wurden die Haplotypen an 199 gesunden norddeutschen Blutspendern ermittelt. Die Zuordnung der Polymorphismen zu jedem Allel erfolgte mittels Stammbaum- und Sequenzanalysen. Die Kopplungsdaten wurden auf die Polymorphismen 3, 4, 5, 6, 7, 15 und 16 reduziert und der Haplotypen-Block erhielt sechs Unterteilungen (siehe Tab. 3):

Block	Häufigkeit %	PM-3	PM-4	PM-5	PM-6	PM-7	PM-15	PM-16
HT-I	63							
HT-II	24	x						
HT-III	11		x	x	x	x	x	x
HT-IV	<1		x	x	x	x		
HT-V	<1						x	x
HT-VI	<1		x	x	x		x	x

**Tab. 3:** Haplotyp-Block (Wulff et al., 2008)

Zuordnung der Polymorphismen auf sechs Haplotypen im Haplotypen-Block und deren Allel-Häufigkeit in der Normalbevölkerung.

x: Seltene FVII:C-beeinflussende polymorphe Variante

HT: Haplotyp; PM: Polymorphismus

- Beim HT-I liegt in der Normalbevölkerung bei 63 % der Einzel-Allele der Wildtyp (WT) vor, ohne dass dies mit einer Beeinflussung der FVII-Aktivität einher geht.
- Der HT-II repräsentiert mit 24 % der Einzel-Allele in der Normalbevölkerung die seltene Variante des PM-3 und weist eine Erhöhung der FVII-Aktivität auf.
- Der HT-III ist die Kombination der die FVII-Aktivität reduzierenden Polymorphismen. Er kommt zu 11 % der Einzel-Allele in der Normalbevölkerung vor. Rechnerisch liegt

er in heterozygoter Form bei 22 % und bei 1,2 % liegt er in der Normalbevölkerung als homozygote Variation vor (Wulff et al., 2008).

- Der HT-IV bis -VI ist sehr selten. Der HT-IV und -V entstanden mutmaßlich aus einem „crossing-over“ von HT-I und -III. Bemerkenswert ist, dass der HT-V zusammen mit der häufigsten Mutation [A294V] einschließlich deren Doppelmutationen [A294V + 404delC] bzw. [A294 + L13Q] gefunden wird („Founder Effect“).

Da die Haplotypen I–III insgesamt 98 % der Normalbevölkerung beschreiben, kann der Haplotypen-Block auf diese reduziert werden und man spricht von einem neutralen HT-I (wildtype: WT-HT), einem erhöhenden HT-II (increasing: IC-HT) und einem reduzierenden HT-III (decreasing: DC-HT). Warum die Vielzahl an Polymorphismen letztlich in Deutschland auf einen Block mit drei Haplotypen reduziert werden kann, bleibt unklar. Bei Schwarzafrikanern sind sie durch eine höhere Diversität charakterisiert (Murken et al., 2003). Aufgrund des Kopplungsungleichgewichts (gemeinsame Vererbung benachbarter Gene) der einzelnen FVII-reduzierenden Polymorphismen ist es schwierig, ihren reduzierenden Anteil innerhalb des DC-HT genau zu differenzieren (Wulff et al., 2008). In Untersuchungen an polnischen Blutspendern, die eine geringere Allel-Kopplung der Polymorphismen 5 und 15 aufweisen, konnte aber ein Effekt für beide Polymorphismen aufgezeigt werden (Perry, 2002). Bei Untersuchungen in der Karibik an Patienten mit afrikanischer Herkunft wurde ein fehlender Einfluss des Polymorphismus 5 festgestellt (Temple et al., 1997). Ethnische Gesichtspunkte sollten daher bei der Haplotypanalyse unbedingt Berücksichtigung finden.

Bei Untersuchungen an FVII-Mangel-Patienten steht insbesondere der DC-HT im Vordergrund, da er sowohl bei heterozygoten Mutationsträgern des nicht betroffenen Allels als auch bei Nicht-Mutationsträgern der Normalbevölkerung zu einer Reduktion der FVII-Aktivität führt. Aufgrund der Allelhäufigkeit von 11 % sind folglich auch in der Normalbevölkerung bei 22 % heterozygote Anlageträger zu vermuten. Der laborchemische Phänotyp weist eine Reduktion von 25 % der FVII-Aktivität pro Allel auf und könnte somit zu einer Halbierung bei vermutlich 1,2 % der homozygoten DC-HT-Träger in der Normalbevölkerung führen. Die FVII-Aktivität könnte dadurch außerhalb des Normbereichs liegen. Die FVII-Aktivitätswerte sind mit denen einer heterozygoten Mutation vergleichbar und für eine pränatale Beratung kann daraus gefolgert werden, dass

Nachkommen von hetero- oder homozygoten DC-HT-Anlageträgern kein Risiko haben einen schweren FVII-Mangel zu erben. Selbst bei Nachkommen mit heterozygoter Mutation und gleichzeitigem DC-HT auf dem nicht mutierten Allel liegt die FVII-Aktivität mit 36 % noch außerhalb der Gefahr eines schweren Blutungstyps. Der heterozygote Anlageträger einer kausalen Mutation kann im ungünstigen Fall eines ebenfalls heterozygot mutierten Partners aber einen schweren FVII-Mangel vererben. Die Haplotypen sind vermutlich für den breiten Normbereich von 60–120 % verantwortlich. Im unteren Normbereich finden sich gehäuft homozygote Genotypen des DC-HT, während Werte im oberen Normbereich durch den IC-HT charakterisiert sind (Wulff et al., 2008; siehe Tab. 4).

Gruppe	Mutation	Haplotyp	FVII:C	Quelle	
a	A	M0/M0	WT/WT	neutral	(Wulff et al., 2008)(Geisen, 2005)
		M0/M0	IC/IC	>120 %	(Wulff et al., 2008)
b	A	M0/M0	IC/WT	~120 %	(Wulff et al., 2008)(Geisen, 2005)
c		M0/M0	DC/IC	keine Daten	(siehe 4.5)
d	B	M0/M0	DC/WT	75 %	(Wulff et al., 2008)
e	C	M0/M0	DC/DC	50-60 %	(Wulff et al., 2008)(Perry, 2002)
f	D	M1/M0	WT/IC	60-120 %	(Wulff et al., 2008)
g		M1/M0	WT/WT	50+/-18 %	(Wulff et al., 2008)
h	D   E	M1/M0	WT/DC	36+/-8,5 %	(Wulff et al., 2008)
i	E	M1/M0	DC/DC	keine Daten	(siehe 4.5)
j		M1/M2		<1-40 %	(Herrmann et al., 2009)
		M1/M1		<1-31 %	(Herrmann et al., 2009)

**Tab. 4:** Die FVII:C bei den Mutation-Haplotyp-Kombinationen (Gruppe, siehe Tab. 8) Der bisher bekannte Einfluss des Genotyps auf die FVII-Aktivität (Literaturangaben). M0/M0: keine Mutation; M1/M0: heterozygote Mutation M1/M2: compound-heterozygote Mutation; M1/M1: homozygote Mutation WT: Wildtyp; IC: FVII:C-steigernder Haplotyp; DC: FVII:C-reduzierender Haplotyp

### 1.5.2 FVII-Mangel in der Schwangerschaft

Bei einer normalen Schwangerschaft kommt es insbesondere gegen Ende der Schwangerschaft, als Schutz vor postpartalen Blutungen zur Herausbildung einer Hyperkoagulabilität (Hellgren, 2003; Ramanarayanan, 2011). Dabei steigt auch das FVII-Antigen auf bis das Vierfache gegen Ende der normalen Schwangerschaft an (Rott et al., 2007).

Die Daten zu allen RBD während der Schwangerschaft sind wenig aussagekräftig und das Risiko von präpartalen Komplikationen ist noch weitgehend unklar. Genetische Ver-

änderungen beeinflussen die Hämostase während der gesamten Schwangerschaft und bei einem schweren FVII-Gendefekt kann es zu postpartalen Komplikationen kommen (Kadir et al., 2009). So konnte in der Mehrzahl der Einzelfallbeschreibungen bei homozygoten Mutationen eines FVII-Mangels kein signifikanter Anstieg festgestellt werden und die Betroffenen haben insbesondere peripartal ohne Replacement-Therapie ein potentiellies Blutungsrisiko. Bei heterozygoten Schwangeren konnte in kleinen Studien ein reduzierter Anstieg der FVII-Aktivität festgestellt werden (Kulkarni et al., 2006; Rott et al., 2007).

Bei sechs Schwangerschaften mit einem heterozygoten FVII-Mangel wurde ein Anstieg von 33–42 % auf 59–84 % dokumentiert, was somit lediglich die zu erwartende Verdopplung des Ausgangswertes gegen Ende der Schwangerschaft widerspiegelt (Rott et al., 2007). Dieser gedämpfte Anstieg gegen Ende der Schwangerschaft scheint beim heterozygoten FVII-Mangel offensichtlich noch auszureichen, um die gewünschte Hyperkoagulabilität sicherzustellen. So konnte festgestellt werden, dass bei Entbindungen, die der heterozygoten Diagnosestellung vorausgingen, auch ohne Replacement-Therapie keine postpartalen Blutungen beobachtet wurden.

Andererseits sind vermutlich Komplikationen in der Frühschwangerschaft bei heterozygotem FVII-Mangel auf Blutungen zurückzuführen (Kulkarni et al., 2006). Durch zwei Einzelfallbeschreibungen in Duisburg wird angenommen, dass dies durch den zögerlichen Anstieg in der Frühschwangerschaft bedingt ist (53 % i. d. 14.–18. Woche).

Therapeutisch sollte unter einem engen multidisziplinären Monitoring eine individuelle Replacement-Therapie bei entsprechender Anamnese oder Blutungstendenzen der Patientin peripartal aber auch in der Frühschwangerschaft erwogen werden (Kulkarni et al., 2006). Rekombinant hergestellter FVIIa ist das Mittel der Wahl, da kein Risiko einer Infektion oder Thrombusbildung besteht (Zaidi et al., 2010).

## 2 Methoden

### 2.1 Einschlusskriterien des Patientenkollektivs

In der Gerinnungsambulanz „Labor MVZ Duisburg“ fielen in der Zeit von Oktober 2003 bis Juli 2010 insgesamt 204 Patienten mit einem FVII-Mangel auf, bei denen zur weiteren Abklärung eine molekulargenetische Untersuchung erfolgte. Durch eine retrospektive Studie soll an ihnen die Genotyp-Phänotyp-Korrelation untersucht werden. Die Einschlusskriterien erfüllten insgesamt 93 Index-Patienten:

- Eine im „Labor MVZ Duisburg“ erhobene Blutungsanamnese.
- Eine molekulargenetische Untersuchung des FVII-Gens im „Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin“ der Universitätsklinik Bonn.
- Eine FVII-Aktivität unterhalb des Normwertes von 60–120 %.
- Bei schwangeren Probandinnen wurden aufgrund des FVII-Anstiegs in der Schwangerschaft auch Werte im unteren Normbereich akzeptiert.

### 2.2 Erhebung des klinischen Phänotyps

Die verbreitete qualitative Klassifikation des klinischen Schweregrades eines FVII-Mangels geht auf die Einteilung von Mariani im Jahre 1998 zurück (Mariani et al., 1998). Der Blutungstyp korreliert dabei oft nicht mit der gemessenen FVII-Aktivität. Dieser Sensitivitätsverlust der In-vitro-Diagnostik – „lack of sensitivity in the assay“ (McVey et al., 2001) – stand im Vordergrund bei der Überlegung, ob eine quantitative Unterteilung des klinischen Phänotyps die Relevanz des laborchemischen Phänotyps (FVII:C) besser einschätzen lässt (Fragestellung 1; siehe 1.1.1).

Der schwere Blutungstyp wird beim FVII-Mangel meist durch Mutationen auf beiden Allelen verursacht und weist oft eine FVII-Aktivität unter 2 % auf. Die meisten Patienten mit einem asymptomatisch oder milden Blutungstyp zeigen einen leichten FVII-Mangel, der durch Missense-Mutationen oder FVII-reduzierende Polymorphismen verursacht wird. Dies führte zu der Überlegung, wann die Analyse des Genotyps eine weiterführende Diagnostik darstellt (Fragestellung 2; siehe 1.1.2).

Im Kollektiv waren 66 % der Probanden weiblich. Dieses Ungleichgewicht wird z. T. durch die weiblichen Blutungssymptome (Menorrhagie, prä- und postpartale Blutung) begründet. Ob die hohe Anzahl von Aborten (21 %), die insbesondere bei den

Schwangeren gezählt wurden, mit kausalen Mutationen oder Polymorphismen korreliert, soll durch einen dritten klinischen Phänotyp hinterfragt (Fragestellung 3; siehe 1.1.3) und mit der FVII-Aktivität in der Frühschwangerschaft verglichen werden (Fragestellung 4; siehe 1.1.4).

### 2.2.1 Qualitativer Blutungstyp

In der „FVII Mutation Database“ wird von McVey seit 2001 die Einteilung nach Mariani übernommen (McVey et al., 2001). Der Schweregrad wird in asymptomatisch, mild und schwer eingeteilt, was aus klinisch festgestellten Blutungen hervorgeht (siehe Tab. 5).

<b>Blutungstyp</b>	<b>Klinischer Phänotyp</b>
asymptomatisch	keine Blutung
Mild	Schleimhaut-, Zahn- und Nasenbluten GIT-Blutung (nicht lebensgefährlich) starke GIT-Blutung, gesichtete Läsionen Menorrhagie mit Eisenmangel perioperative Blutungen Gelenk-, Haut- und Weichteilblutungen n. Trauma
schwer	starke Schleimhautblutungen mit Transfusionsbedarf lebensbedrohliche gastrointestinale Blutung diffuse gastrointestinale Blutung ohne Läsion Gelenk-, Haut- oder Weichteilblutung ohne Trauma spontane ZNS-Blutungen oder Augeneinblutungen

**Tab. 5:** Blutungstyp (McVey et al., 2001)  
Qualitative Einteilung der Blutungstypen durch den klinischen Phänotyp.

### 2.2.2 Quantitativer Blutungsscore

Zur Quantifizierung des klinischen Blutungsgrades wurde der Score nach Rodeghiero et al. übernommen, ursprünglich eingesetzt zur Beurteilung des von-Willebrand-Syndroms (vWS) Typ I. Zehn Symptome erhielten einen Wert von 0–3, deren Summe einen Blutungsscore von maximal 30 Punkten ergeben konnte (Rodeghiero et al., 2005; siehe Tab. 6).

Symptome	Score
Epistaxis	0 = keine oder leicht 1 = vorhanden 2 = Kompression, Kauteris. 3 = Transfusion, FVII
Haut	0 = keine oder leicht 1 = Petechien, Prellung 2 = Hämatome 3 = Behandlung
Verletzung	0 = keine oder leicht 1 = vorhanden (1–5/Jahr) 2 = Behandlung 3 = OP, Transfusion
Oral	0 = keine oder leicht 1 = vorhanden 2 = Behandlung 3 = OP, Transfusion
GIT	0 = keine oder leicht 1 = vorhanden 2 = Behandlung 3 = OP, Transfusion
Muskel-Gelenk	0 = keine oder leicht 1 = vorhanden 2 = Behandlung 3 = OP, Transfusion
Zahnextraktion	0 = keine oder leicht 1 = vorhanden 2 = Revision, Kompression 3 = Transfusion
Operation	0 = keine oder leicht 1 = vorhanden 2 = Revision, Naht 3 = Transfusion
Post-Partum	0 = keine oder leicht 1 = vorhanden, Eisen 2 = Transfusion, OP, Naht 3 = Hysterektomie
Menorrhagie	0 = keine oder leicht 1 = vorhanden 2 = Behandlung, Fe, Pille 3 = OP, Transfusion, FVII

**Tab. 6:** Blutungsscore (Rodeghiero et al., 2005)  
Quantitative Einteilung des Blutungsgrades durch einen Blutungsscore (0-3).

### 2.2.3 Abort

Da jede 2. Probandin z. T. mehrere Fehlgeburten aufwies, war der Abort ein weiterer klinischer Phänotyp. Ab der 3. Fehlgeburt wurde von einem habituellen Abort gesprochen, dessen Zeitpunkt durch den Mittelwert der Schwangerschaftswochen festgelegt wurde.

## 2.3 Erhebung des laborchemischen Phänotyps

Den laborchemischen Phänotyp ergab die Einzelfaktorbestimmung (FVII-Aktivität).

### 2.3.1 Laborchemische Untersuchungen

#### 2.3.1.1 Thromboplastinzeit

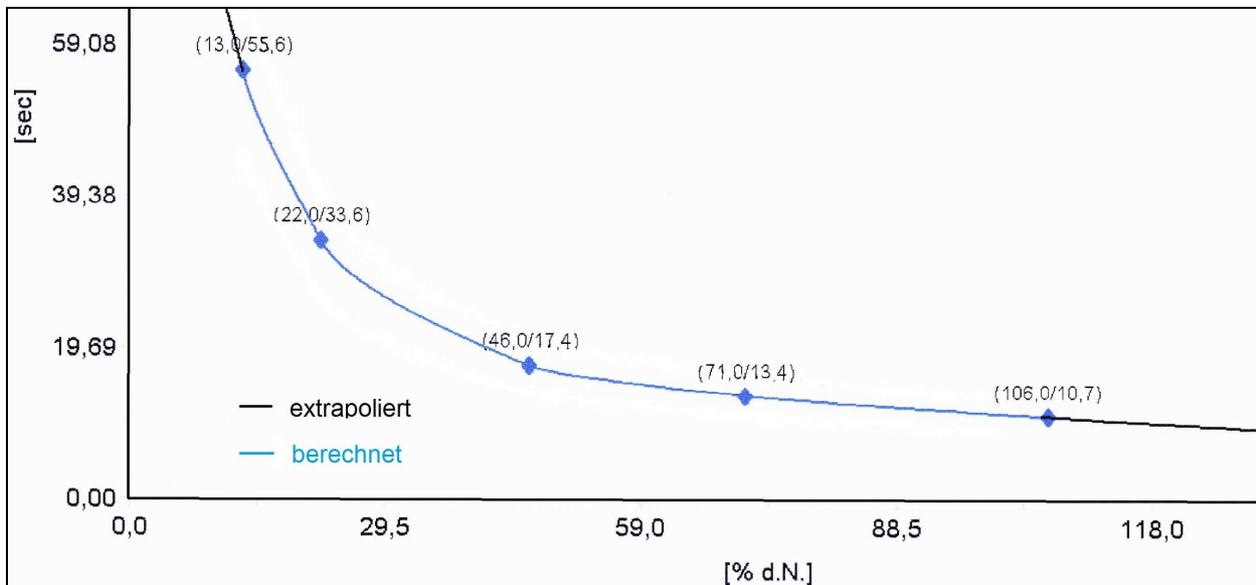
Die Thromboplastinzeit (TPZ) ist der Suchtest für Störungen des exogenen Gerinnungssystems und erfasst neben dem FVII die Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II und X sowie FV und Fibrinogen.

Das Testprinzip besteht aus der Zeitmessung bis zur Entstehung von Fibringerinnseln nach Zugabe von Tissue Factor, Phospholipiden und Calciumchlorid in plättchenarmes und mit Citrat versetztes Plasma (Antikoagulation durch Bindung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen). Das Thromboplastin (Tissue Factor-Phospholipid-Komplex) wird aus tierischen oder humanen Gewebeextrakten gewonnen bzw. rekombinant synthetisiert. Zusammen mit  $\text{Ca}^{2+}$  wird so die in vivo ablaufende plasmatische Gerinnung in vitro nachgestellt.

Die TPZ bestimmt man heute vollautomatisch auf speziellen Gerinnungsmessgeräten unterschiedlicher Hersteller. Ursprünglich stellte Armand James Quick hierzu eine Kalibrationskurve aus der Verdünnungsreihe eines Normalplasmas her. Dieses Normalplasma gewann er aus einer Plasmamischung von 20 offensichtlich gesunden männlichen Personen mit normaler Gerinnung (Ausgleich individueller Faktoren-Mängel). Der Quick-Wert spiegelt damit das Verhältnis zwischen der TPZ und der Aktivität vorhandener Gerinnungsfaktoren in der Probe wider und erhält dadurch eine prozentuale Dimension (Normalwert 70–130 %).

In unserer Arbeit kam als Analysegerät das BCS<sup>®</sup> XP-System und Thromborel<sup>®</sup> S als Thromboplastin-Reagenz der Siemens Healthcare Diagnostics GmbH zum Einsatz. Die Gerätekalibration erfolgt dabei standardisiert mit vorkalibrierten Plasmen (Bruhn et al., 2007), dem sogenannten Multikalibrator (INR-PT-Multi Cal. 5551-5555) mit fünf

verschiedenen Sollwerten zwischen 13 % und 106 % der Norm. Über deren Gerinnungszeiten wird die Kalibrationskurve errechnet, an der der Quick-Wert der zu analysierenden Proben abgelesen wurde (siehe Abb. 2).



**Abb. 2:** Kalibrationskurve TPZ

Kalibration (TPZ) d. BCS<sup>®</sup> XP-Analysators mit kommerziellem Multikalibrator.

Da die TPZ vom verwendeten Thromboplastin und Gerinnungsmessgerät abhängt, wurde zur besseren Vergleichbarkeit der TPZ für Patienten unter stabiler Antikoagulation mit einem Vitamin-K-Antagonisten die „international normalized ratio“ (INR) eingeführt; sie ist auch nur für dieses Patientenkollektiv definiert. Die INR berechnet sich aus dem Quotienten der TPZ und der MNPT („mean normal prothrombin time“), der mit dem Sensitivitätsindex des verwendeten Thromboplastins, dem „international sensitivity index“ (ISI), potenziert wird:  $INR = (PTZ/MNPT)^{ISI}$ .

Dabei ist der ISI das Aktivitätsverhältnis aus der verwendeten Thromboplastincharge und dem internationalen Referenzthromboplastin „international reference preparation“ (IRP) und wird vom Hersteller gerätespezifisch angegeben. Da die TPZ auch von der Spezies des verwendeten Thromboplastins abhängt, werden von der WHO 3 Referenz-Thromboplastine bereitgestellt (Kaninchen-, Rind- und rekombinant synthetisiertes humanes Thromboplastin). Ein empfindliches Thromboplastin bedingt einen ISI-Wert unter 1 und es wird empfohlen, möglichst Chargen nahe 1 zu verwenden. Die MNPT

wird als Durchschnittszeit an 20 Normalpatienten vom durchführenden Labor selbst ermittelt.

In unserer Arbeit wurde das venöse Blut durch fertige Abnahmesysteme (geschlossenes Blutentnahmesystem Sarstedt-Monovette®) direkt mit Citratlösung (0,11 mol/l) im Verhältnis 1/9 versetzt. Das so antikoagulierte Blut wurde anschließend 5 Minuten bei 2000 U/min (944 g) zentrifugiert und das Plasma abpipettiert. Das gewonnene Plasma wurde erneut bei 4500 U/min (4777 g) 15 Minuten zentrifugiert und konnte so anschließend nahezu plättchenfrei abpipettiert werden.

Der Inhalt des Fläschchens Thromborel® S wurde mit 10 ml Aquadest aufgelöst und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert und durch vorsichtiges Schwenken gemischt.

50 µl des Probenplasmas wurden im Analysator mit 100 µl Thromborel® S (aus humaner Plazenta gewonnenes Thromboplastin und Calcium-Chlorid, ISI-Wert 1,0–1,1) automatisch gemischt und so wurde die Gerinnungsaktivierung in vitro gestartet. Der chargenabhängige ISI-Wert und die im Labor ermittelte MNPT wurden zuvor im BCS® XP-System ins Software-Menü eingetragen, wodurch die Berechnung der INR automatisch ermöglicht wurde.

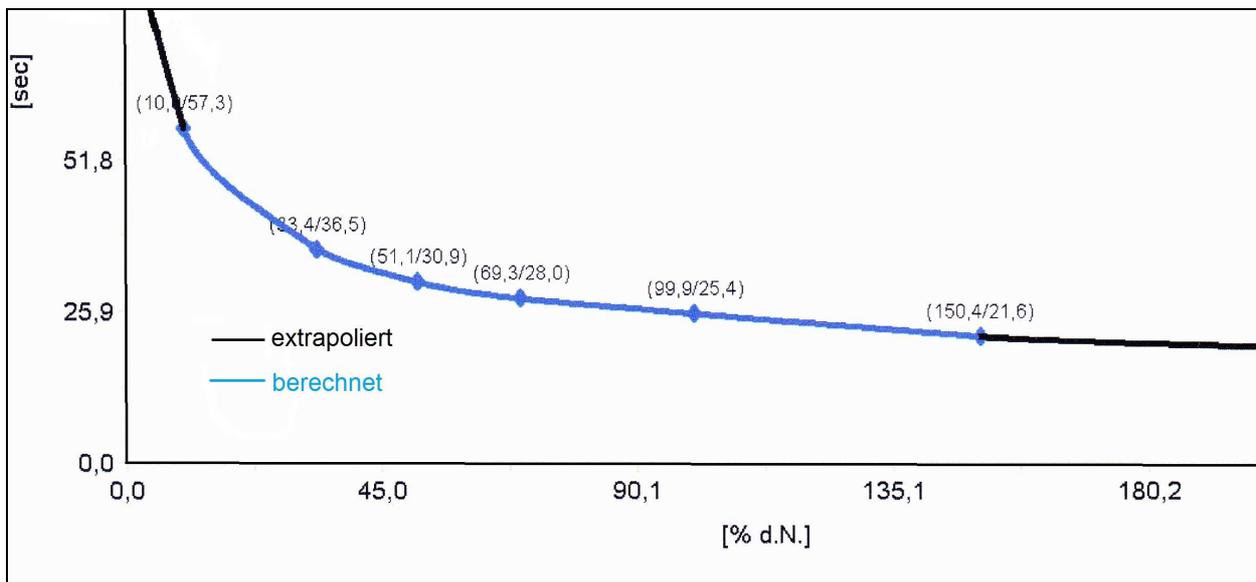
### **2.3.1.2 Einzelfaktor-VII-Bestimmung**

Die Aktivität der Gerinnungsfaktoren wird durch den sogenannten Einphasentest (Reaktionsablauf von der Initiation bis zur Fibrinbildung) bestimmt. Für den FVII (und für FII, V und X) stellt er eine Variation der TPZ (Quick) dar. Zur Aktivitätsmessung der einzelnen Faktoren wird der Test so eingestellt, dass nur der zu untersuchende Faktor die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt (Thomas, 1988). Das gelingt dadurch, dass dem Probenplasma ein Mangelplasma zugesetzt wird, das alle Gerinnungskomponenten des Tests im Überfluss enthält, bis auf den zu bestimmenden Faktor. Die Reaktion wird anschließend durch Zugabe des Thromboplastins analog zur TPZ gestartet, die ermittelte Zeit mit einer zuvor erstellten Kalibrationskurve verglichen und die FVII-Aktivität in Prozent der Norm (60–120 %) abgelesen.

Das verwendete Thromboplastin kann den funktionellen Test erheblich beeinflussen (Perry, 2002; Poggio et al., 1991) und zeigt eine deutliche Diskrepanz zwischen tierischem und humanem Ursprung. Um die Aussagefähigkeit des In-vitro-Tests zu sichern, sollten daher humane Reagenzien eingesetzt werden (McVey et al., 2001). Die

Ursache hierfür liegt in der unterschiedlichen Sensitivität der Thromboplastine gegenüber FVII oder aktivierten FVIIa (Perry, 2002). Durch rekombinant hergestelltes Thromboplastin (Tissue Factor ohne die transmembrane und intrazelluläre Domäne) kann so auch gezielt die FVIIa-Aktivität gemessen werden (Morrissey, 1996).

In unserer Arbeit kam als Kalibrator das kommerzielle Standard-Human-Plasma der Siemens Healthcare Diagnostics GmbH mit bekannter Faktorenaktivität zum Einsatz. Durch das Analysegerät BCS<sup>®</sup> XP erfolgen zur Erstellung der Kalibrationskurve mehrere Testdurchgänge einer in der Software vorgegebenen Verdünnungsreihe. Zur Verdünnung wurde eine isomolare NaCl-Lösung als vorgeschriebene Pufferlösung verwendet. Die sechs voreingestellten Konzentrationen lagen zwischen 150 % und 10 % der Norm. Zum Ablesen einer sehr niedrigen FVII-Aktivität sind Testdurchläufe des Kalibrators mit noch höheren Verdünnungen erforderlich (Bruhn et al., 2007). Die Kalibrationskurve sollte im linearen System wie die TPZ einen asymptotischen (Barthels und Depka, 2003) Verlauf zeigen (siehe Abb. 3).



**Abb. 3:** Kalibrationskurve FVII:C

Kalibration (FVII:C) d. BCS<sup>®</sup> XP-Analysators mit verdünntem Standard-Human-Plasma.

In unserer Arbeit wurde das immunabsorbierte FVII-Mangelplasma (Coagulation-Factor-VII-Deficient-Plasma) der Siemens Healthcare Diagnostics GmbH verwendet.

Der Inhalt des Fläschchens wurde mit 1 ml Aquadest aufgelöst, anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und schließlich durch vorsichtiges Schwenken gemischt.

Von dem plättchenfrei gewonnenen Probenplasma wurden 5 µl mit 30 µl Mangelplasma und 15 µl Aquadest automatisch im Analysator gemischt. Mit 150 µl Thromborel® S wurde die Gerinnungsaktivierung in vitro gestartet und die FVII-Aktivität durch den Analysator an der Kalibrationskurve abgelesen.

## **2.4 Erhebung des Genotyps**

### **2.4.1 Analyse**

Mit der molekulargenetischen Diagnostik soll der krankheitsbedingte Nachweis oder Ausschluss einer kausalen Veränderung der DNA erbracht werden.

#### **2.4.1.1 DNA-Isolation**

Die DNA-Isolierung dient dazu, DNA-Moleküle aus biologischem Material möglichst in reiner Form zu gewinnen. Die Analyse des FVII-Gens erfolgt aus Vollblut. Hierzu wird EDTA-antikoaguliertes Blut zur Lyse der Erythrozyten mit einem Puffer versetzt und die zellkernhaltigen Leukozyten werden nach Zentrifugation abpipettiert. Mittels zugegebener Proteasen und Sodiumdodecylsulfat (SDS) werden Proteine und Zellbestandteile zerstört und nach Waschung in Ethanol sichtbar ausgefällt. Anschließend wird die so gewonnene DNA in einer gepufferten Salzlösung (Elutionspuffer) konserviert. Dieses Verfahren wurde 1988 entwickelt und als „salting out“-Methode bekannt (Miller et al., 1988; Murken et al., 2003).

#### **2.4.1.2 Polymerase-Kettenreaktion**

Die DNA liegt in ihrer ursprünglichen Form als antiparalleler Doppelstrang vor. Die komplementären Nukleotidstränge werden über Wasserstoffbrücken verbunden und das DNA-Molekül erhält dadurch eine spiralförmige Tertiärstruktur. Die insgesamt vier unterschiedlichen Nukleotide bestehen an der Hybridbindung aus den zwei Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) bzw. deren komplementären Pyrimidinbasen Thymin (T) und Cytosin (C). Die Basen sind gegenüber der Hybridbindung mit dem Zucker (Pentose)

Desoxyribose verknüpft. Der Nukleotidstrang entsteht durch die Veresterung einer energiereichen Triphosphatgruppe an der C<sub>3</sub>- bzw. C<sub>5</sub>-OH-Gruppe der Pentose. Nach ihrer Syntheserichtung erhält dadurch eine DNA-Sequenz definitionsgemäß ein 5'- und 3'-Ende. Die Abfolge der vier Nukleotide bildet den genetischen Code, wobei jeweils drei Nukleotide eine Aminosäure kodieren. 64 möglichen Kodierungscodes stehen insgesamt 21 verschiedene Aminosäuren gegenüber, sodass Mehrfachkodierungen die Regel sind.

Die „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) ist eine Methode, um gewonnene isolierte DNA in vitro zu vervielfältigen und sie weiteren genetischen Analysen zuzuführen. Hierzu wird die „DNA-Polymerase“ benötigt, ein Enzym, welches in allen Organismen vorkommt und für die Verdopplung der DNA vor der Zellteilung verantwortlich ist. Die neu gebildete DNA dient in vitro als zusätzliche Matrize und induziert so in den folgenden Syntheseschritten die gewünschte exponentielle Kettenreaktion. Nur bekannte DNA-Sequenzen sind diesem Verfahren zugänglich, da zum Start der Reaktion kurze komplementäre Nukleotidsequenzen („primer“) benötigt werden. Zunächst wird der helikale Doppelstrang thermisch bei 96°C in seine Einzelstränge denaturiert („melting“). Jetzt können zugesetzter Forward- und Reverse-Primer an je einem der beiden Doppelstränge bei spezifischer Temperatur hybridisieren („annealing“) und mit ihrem 3'-Ende die zu amplifizierende Sequenz (Template) umschließen. In zwei Zyklen wird die Template-Sequenz bei 72°C nach Inkubation mit der DNA-Polymerase und den vier energiereichen Desoxyribonukleotiden (dNTP) exponentiell amplifiziert („elongation“). Ein Zyklus dauert ca. ein bis zwei Minuten, sodass nach ein bis zwei Stunden und ca. 35 Zyklen ausreichend DNA-Material zur Verfügung steht. Die PCR wird durch Abnahme der relativen Enzymkonzentration bzw. Verbrauch der dNTP limitiert (Mullis et al., 1986; Murken et al., 2003; Saiki et al., 1988). Verwendung fanden bei der FVII-Genanalyse Primer mit einer Länge von bis zu 22 Nukleotiden (siehe Tab. 7).

Domaine	Primer
P F	CCTGGTCTGGAGGCTCTC
P R	GGGGAGGACACAGGTGT
E 1aF	CTCAGCTGGGGTGTTCAGAG
E 1aR	TGGATGCTGGTTTCTAGAAGGA
E 1bF	GTGGCGTGAGGATGGCTAGT
E 1bR	CTGGAGCGGTCACCTCCTCT
E 2F	GGCGGTCTCCGAGGCACTGG
E 2R	GCGCCGCTGCGTGTTCCGCCG
E 3F	CCAGTTCATGGTGTGTCCAG
E 3R	TACACACCCCACCAGGTTGT
E 4F	CCAGTTCATGGTGTGTCCAG
E 4R	TACACACCCCACCAGGTTGT
E 5F	AGCTCATGCCACCTTCCAGGC
E 5R	TGTCATCTGGGACTGGGACATG
E 6F	CTAGTGGCACGTTTCATCCCT
E 6R	TTCAAAAGGCTTCAAGACCC
E 7F	ATGACAGCAATGTGACTTCC
E 7R	GTCTGTGGAAGTGACAGCAC
E 8.1F	GTGAGGTGGCAGGTGGTGG
E 8.1R	CCTTGCTGCCATCCGAGTAG
E 8.2F	GCACCACCAACCACGACATC
E 8.2R	TGCCCTCCTTACCCCATTA

**Tab. 7:** Primer

Verwendete Primer bei der FVII-Genanalyse.

R: reverse; F: forward; P: Promoter; E: Exon

#### 2.4.1.3 DNA-Sequenzierung

Die Analyse der einzelnen Basen einer DNA-Sequenz erfolgt durch veränderte dNTPs ohne eine 3'-OH-Gruppe. Neben den normalen Nukleotiden mit den Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin wird in vier verschiedenen PCR-Reaktionsansätzen jeweils ein verändertes Didesoxyribonukleotid (ddNTP) zugesetzt. Durch Einbindung einer komplementären ddNTP kommt es zum Syntheseabbruch des Nukleotidstrangs, da eine Veresterung der Phosphatgruppe an der fehlenden 3'-OH-Gruppe nicht mehr möglich ist. Die zuvor mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs liegen endständig an unterschiedlich langen Strängen, die durch die anschließende Gelelektrophorese differenziert werden können (Murken et al., 2003).

#### 2.4.1.4 Gelelektrophorese

DNA-Fragmente werden nach ihrer Länge mithilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt. In

die Vertiefungen eines Agarose- oder Acrylamidgels werden die negativ geladenen DNA-Fragmente gegeben, die im elektrischen Spannungsfeld zur Kathode wandern. Längere Fragmente werden durch das Gel stärker abgebremst als kurze Nukleotidsequenzen. Durch die Markierung mit fluoreszierenden Substanzen können die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und detektiert werden.

Hierfür werden planare, aromatische Kohlenwasserstoffmoleküle (Ethidiumbromid) verwendet, die sich zwischen die Basenpaare schieben (interkalieren). Das Ethidiumbromid erfährt dadurch eine Konformationsänderung, die die fluoreszierenden Eigenschaften steigert. Durch UV-Licht wird das Elektron-System des Ethidiumbromid energetisch angeregt. Nach dem Ende der Bestrahlung erfolgt der spontane Rückfall des Elektrons in den Zustand niedriger Energie und daraus resultiert die Emission von energiereichen Photonen (Murken et al., 2003; Sambrook und Russell, 2001).

#### **2.4.1.5 Nachweis genomischer Deletionen**

Der Beweis einer größeren heterozygoten Deletion, z.B. eines ganzen Exons, wird durch die PCR-Amplifikation des nicht mutierten Allels erschwert. Es sind daher quantitative Auswertungen der amplifizierten Sequenzen erforderlich. Bei der "Multiplex-Ligation-dependent-Probe-Amplifikation (MLPA) werden in einem gemeinsamen Ansatz für alle Exons spezifische Primer-Paare mit der Probe inkubiert, die unmittelbar nebeneinander liegend über das gesamte Exon hybridisieren und zu einem Oligonukleotid ligieren. Alle Primer-Paare tragen an ihren Enden identische Sequenzen, die die Exonsequenz überragen. In einem 2. Schritt hybridisiert an diesen Sequenzen ein Universal-Primer, der die Amplifikation der ligierten Oligonukleotide einleitet. Bei einer Deletion erfolgt auf dem betroffenen Allel keine Hybridisierung der Primer-Paare und somit auch keine Amplifikation der Sequenzen bzw. des Exons. Die Analyse der amplifizierten Exonsequenzen erfolgt über deren Fragmentlänge und die anschließende quantitative Analyse durch Vergleich der Signalstärke mit einer Referenz-DNA (Murken et al., 2003).

## 2.5 Statistik

Die erhobenen Daten wurden zunächst in eine Excel-Tabelle eingepflegt und dann in das statistische Analyseprogramm IBM SPSS Statistics 19 importiert. Die Ergebnisse bestehen aus einem deskriptiven Teil und den statistischen Tests zur Überprüfung relevanter Fragestellungen und Hypothesen.

Für die Deskription wurden für die nominalen Variablen die jeweiligen absoluten und relativen Häufigkeiten und bei den stetigen Variablen die Grenzwerte (Maximum und Minimum), der Durchschnitt, der Median, das 25 %- bzw. 75 %-Quantil und die Standardabweichung ermittelt.

Die jeweiligen Tests orientieren sich an der Art der Variablen:

Der Cochran-Armitage-Test gibt den Trend für zwei kategorielle Variablen an, wobei eine Variable binär sein muss, die andere hingegen beliebig viele Kategorien aufweisen kann. Der Trendtest analysiert Häufigkeitsverteilungen und analysiert Zusammenhänge zwischen den zwei Variablen. In unserem Kollektiv wurde so der Zusammenhang zwischen der Indikation bzw. den anamnestischen Blutungssymptomen und dem Genotyp ermittelt.

Die einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur (Anova) braucht eine stetige und eine kategorielle Variable und ist ein Verfahren, das Mittelwerte der stetigen Variable in den verschiedenen Gruppen untersucht. Bei signifikanten Ergebnissen können Gruppenunterschiede angenommen werden. In unserem Kollektiv wurden so die Unterschiede der FVII-Aktivität und der INR in den Genotyp-Gruppen aufgezeigt.

Der T-Test für unverbundene Stichproben braucht eine stetige Variable und eine kategorielle Variable mit zwei Kategorien. Er sucht nach Differenzen zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen. In unserem Kollektiv wurden so die Unterschiede der FVII-Aktivität in den Genotyp-Gruppen zwischen weiblichen und schwangeren Probandinnen hervorgehoben.

Für die maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit wurde ein Signifikanzniveau bei allen Statistikverfahren von  $\alpha = 5 \%$  festgelegt.

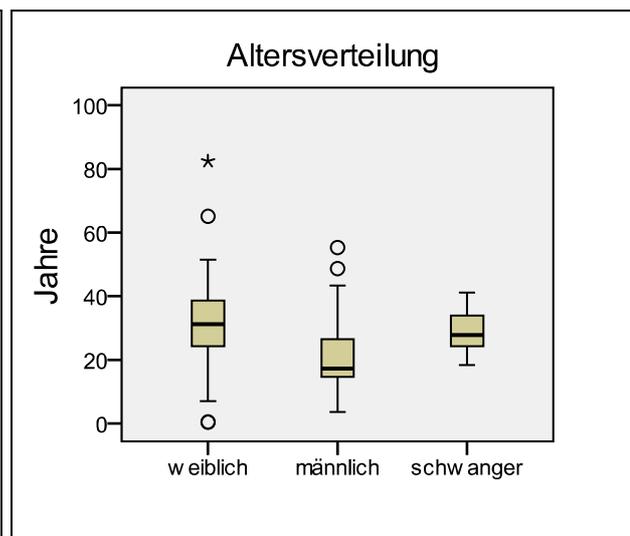
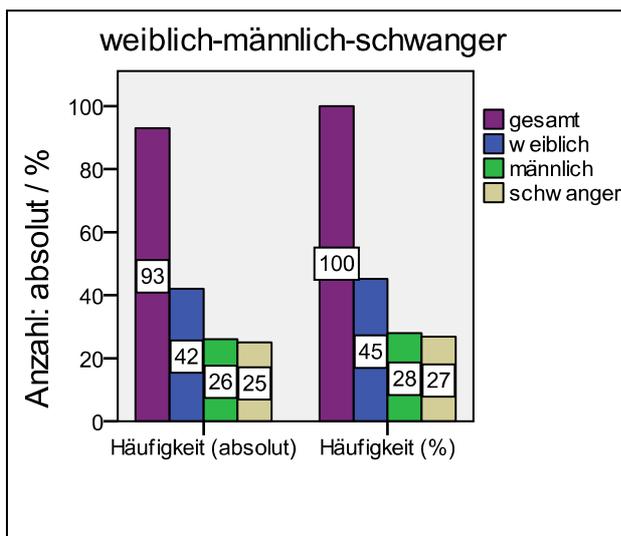
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Kollektivbeschreibung

Durch die unter Punkt 2.1. beschriebenen Einschluss- und Selektionskriterien ergaben sich für das Kollektiv folgende Charakteristika:

##### 3.1.1 Einteilung

Es lag eine ungleiche Verteilung der Geschlechter vor. Insgesamt waren 67 (72 %) der 93 Probanden Frauen, von denen aktuell 25 (27 %) schwanger waren, und 26 (28 %) Probanden Männer. Das Kollektiv wurde daher in drei Kollektivgruppen unterteilt: männlich, weiblich (nicht schwanger) und schwanger (siehe Abb. 4).



**Abb. 4:** Kollektivverteilung

**Abb. 5:** Altersstruktur

Häufigkeiten und Alter der drei Kollektivgruppen (weiblich, männlich, schwanger).  
 Boxlänge: Quartile  $Q_1 < Q_3$  mit Median; Whisker: max./min. bis 1,5-fache Boxlänge  
 (°): >1,5-fache Boxlänge: Ausreißer; (\*): >3-fache Boxlänge: Extremwerte

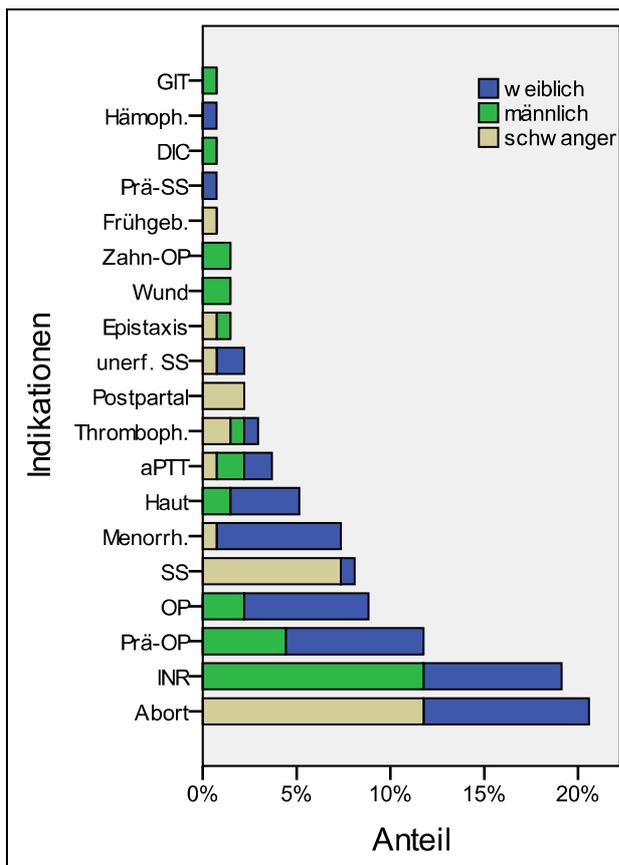
##### 3.1.2 Altersstruktur

Die schwangeren Frauen sind mit durchschnittlich 28 Jahren jünger als die weiblichen Probanden mit 31 Jahren. Die Männer waren etwa zehn Jahre jünger (siehe Abb. 5).

### 3.1.3 Indikationen

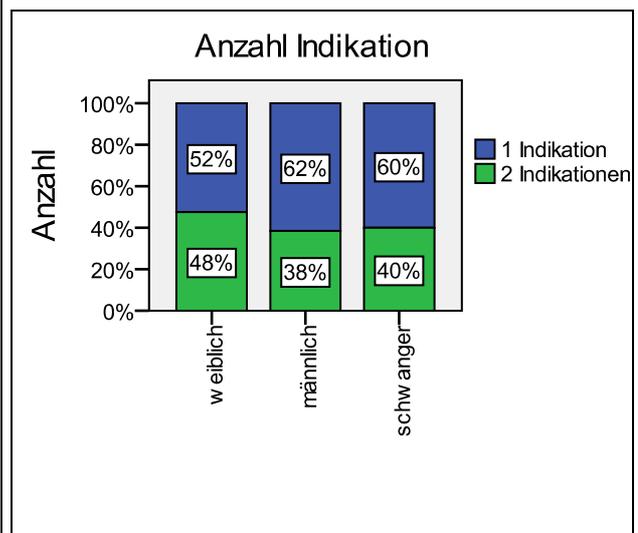
Alle Probanden wurden mit ein oder zwei Indikationen zur hämostaseologischen Abklärung ins „MVZ Labor Duisburg“ von Ärzten unterschiedlicher Fachdisziplinen überwiesen.

Die Hälfte der weiblichen Probanden wies zwei Indikationen auf, während bei 2/3 der Männer und Schwangeren die Untersuchung aus einem Grund erfolgte (siehe Abb. 6b). Insgesamt wurden 19 verschiedene Indikationen gezählt, von denen die drei Indikationen Abort, INR-Erhöhung bzw. präoperative Diagnostik über die Hälfte und gynäkologische Symptome wie die Schwangerschaftsblutung, Menorrhagie und der Abort über 1/3 aller Indikationen ausmachten. Eine INR-Erhöhung konnte man bei 1/5, Wund-, Nasen- oder Hautblutung zusammen bei 1/10 aller Indikationen feststellen (siehe Abb. 6a).



**Abb. 6a:** Verteilung Indikationen

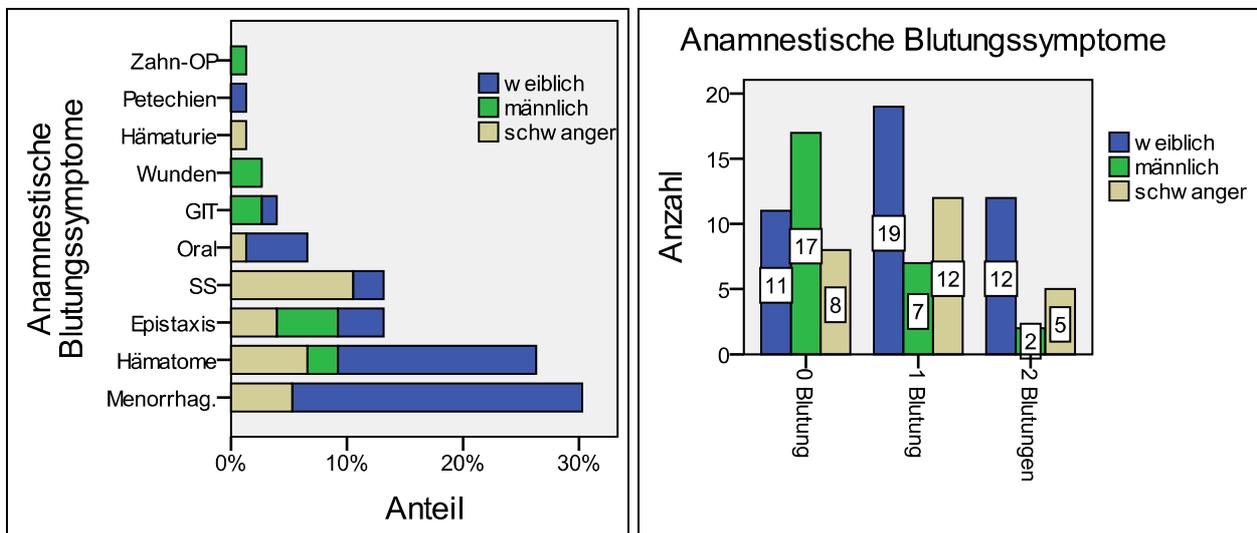
Häufigkeiten und Verteilung der Untersuchungsindikationen, die zur Gerinnungsdiagnostik führten.



**Abb. 6b:** Anzahl Indikationen

### 3.1.4 Anamnestische Blutungssymptome

Die Anamneseerhebung ergab, dass bis zu zwei Blutungssymptome im klinischen Vordergrund standen. 1/3 aller Frauen und 2/3 der Männer wiesen keine Blutungsanamnese auf. Weibliche Blutungssymptome wie die Menorrhagie oder Schwangerschaftsblutung sind am häufigsten vertreten und auch dafür verantwortlich, dass fast die Hälfte aller Frauen ein Symptom und 1/4 sogar zwei Symptome aufwies (siehe Abb. 7b). Hautblutungen wie Hämatome oder Petechien lagen deutlich unter 1/3. Schleimhautblutungen wie Epistaxis, Hämaturie, orale und gastrointestinale Blutungen kamen zusammen bei 1/4 des Kollektivs vor (siehe Abb. 7a).



**Abb. 7a:** Verteilung anamn. Blutungssympt. **Abb. 7b:** Anzahl anamn. Blutungssympt. Häufigkeiten und Verteilung der anamnestischen Blutungssymptome, die zur Gerinnungsdiagnostik führten.

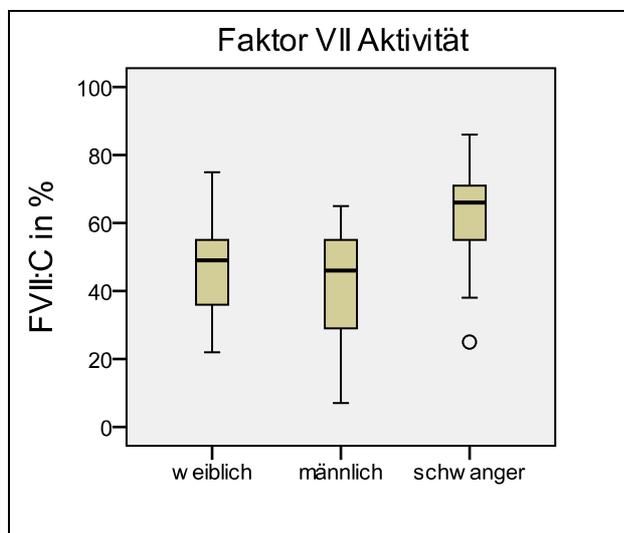
## 3.2 Laborchemischer Phänotyp

Zur Routinediagnostik einer hämorrhagischen Diathese gehörten – neben dem Blutbild und dem globalen Gerinnungstests – die Einzelfaktorenanalysen I–XIII sowie die Bestimmung des vWF.

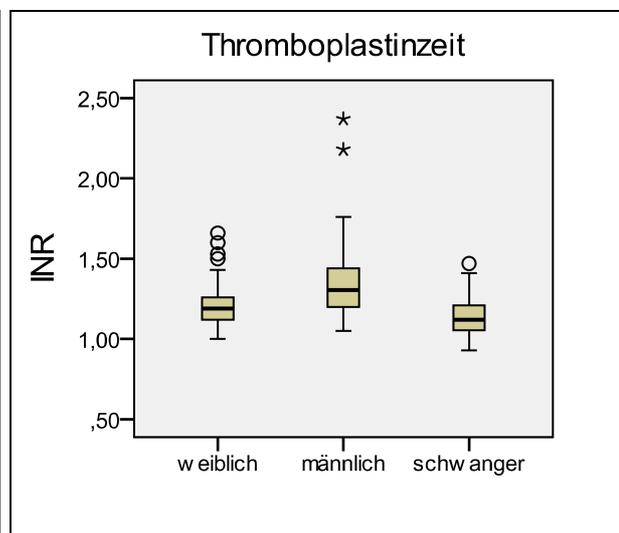
### 3.2.1 FVII-Aktivität

Die FVII-Aktivität lag bei allen Frauen mit durchschnittlich 52 % um etwa 10 % höher als bei den Männern. Hierfür zeigten sich die Schwangeren mit durchschnittlich 62 % ver-

antwortlich. Bei den weiblichen Probanden lag das Niveau mit 46 % nur leicht höher als bei den Männern mit 42 % (siehe Abb. 8).



**Abb. 8:** FVII:C im Kollektiv



**Abb. 9:** INR im Kollektiv

Laborchemischer Phänotyp (FVII:C und INR) in den drei Kollektivgruppen.

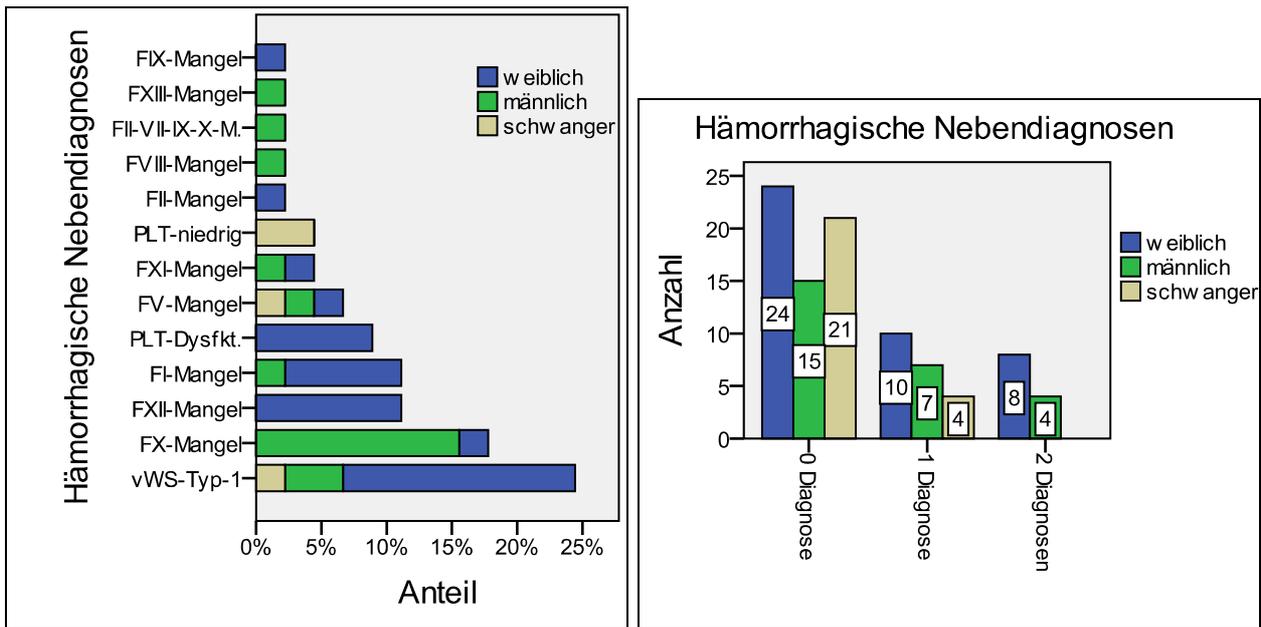
### 3.2.2 Thromboplastinzeit

Analog zu der reduzierten FVII-Aktivität zeigte sich im Kollektiv eine entsprechende INR-Erhöhung. Die Männer wiesen die höchste INR von durchschnittlich 1,38 auf während bei den Schwangeren die INR nur bei durchschnittlich 1,13 lag. Bei den weiblichen Probanden ergab sich ein durchschnittlicher Wert von 1,22; sie lagen, wie die FVII-Aktivität, zwischen den anderen Kollektivgruppen (siehe Abb. 9).

### 3.2.3 Hämorrhagische Nebendiagnosen

Neben einem FVII-Mangel fiel bei 33 Probanden (35 %) eine hämorrhagische Nebendiagnose auf. Bei 12 Probanden (13 %) wurden zwei Nebendiagnosen festgestellt (siehe Abb. 10b).

Insgesamt konnten 13 verschiedene hämorrhagische Nebendiagnosen gezählt werden, von denen das vWS mit fast 25 % am häufigsten vertreten war und im Gesamtkollektiv bei 12 % gefunden wurde. Der FX-Mangel trat mit fast 18 % bzw. 8 % im Gesamtkollektiv auf (siehe Abb. 10a).



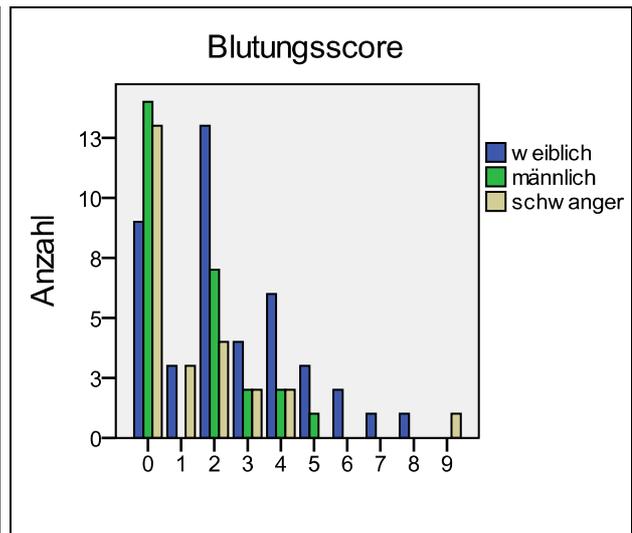
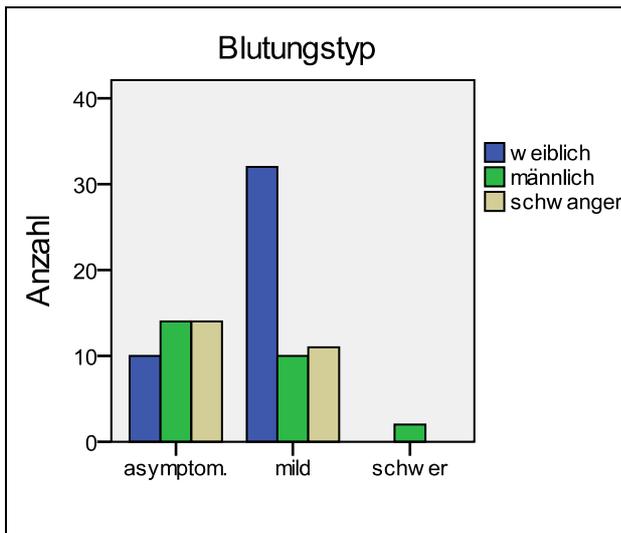
**Abb. 10a:** Nebendiagnosen Häufigkeiten und Verteilung der häorrhagischen Diagnosen, die neben dem FVII-Mangel durch die Gerinnungsdiagnostik festgestellt wurden. **Abb. 10b:** Nebendiagnosenanzahl

### 3.3 Klinischer Phänotyp

Die Erhebung des quantitativen und qualitativen klinischen Phänotyps erfolgte nach den aufgeführten Kriterien (siehe Punkt 2.2). Der Abort stellte ein weiteres Merkmal des klinischen Phänotyps dar.

#### 3.3.1 Qualitativer Blutungstyp

Beim qualitativen Blutungstyp (siehe 2.2.1) wies über die Hälfte der Probanden (57 %) den milden Blutungstyp auf. Über 40 % des Gesamtkollektivs waren klinisch asymptomatisch. Besonders bei den weiblichen Probanden zeigte sich bei 76 % ein milder Blutungstyp. Nur 2 Probanden fielen mit einer schweren Blutung auf (siehe Abb. 11).

**Abb. 11:** Blutungstyp**Abb. 12:** Blutungsscore

Klinischer Phänotyp (Blutungstyp und Blutungsscore) in den drei Kollektivgruppen.

### 3.3.2 Quantitativer Blutungsscore

Der Blutungsscore belief sich im Kollektiv auf maximal neun von 30 möglichen Punkten. Fast 40 % wiesen bei fehlenden Blutungen einen Score von 0 auf. Ein weiteres Maximum ergab sich mit insgesamt 49,5 % bei 2–5 Punkten. Der maximale Score von 9 kam im Zusammenhang mit der Menorrhagie und einer Operation vor. Weibliche Probanden wiesen den höchsten Gesamtscore von durchschnittlich etwa 2,6 auf. Männer lagen mit 1,3 und Schwangere mit 1,0 deutlich niedriger (siehe Abb. 12).

Leichte bis mäßige Hautblutungen traten gehäuft bei Frauen auf, während Muskel- oder Gelenkblutungen nicht beobachtet wurden. Blutungen des Gastrointestinaltrakts bzw. der Schleimhaut zeigten sich genauso wie die postpartale Blutung eher selten. Eine leicht- bis mittelgradige Menorrhagie wurde hauptsächlich von weiblichen und weniger von schwangeren Probanden beklagt. Operationskomplikationen ergaben sich häufiger bei weiblichen Probanden (siehe Abb. 13a–j).

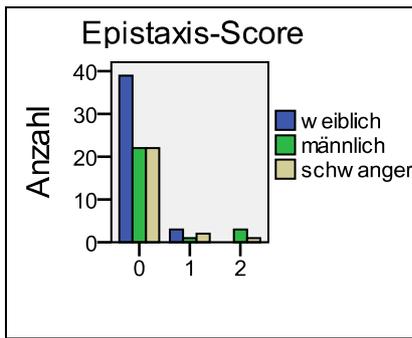


Abb. 13a: Epistaxis

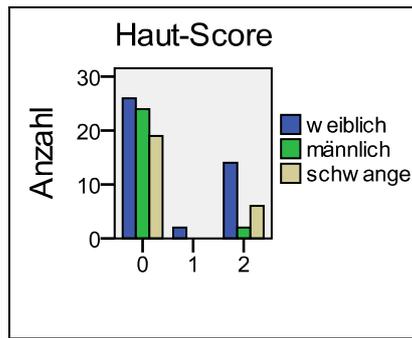


Abb. 13b: Hautblutung

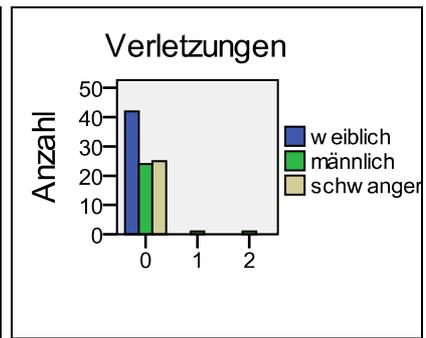


Abb. 13c: Verletzungsblutg.

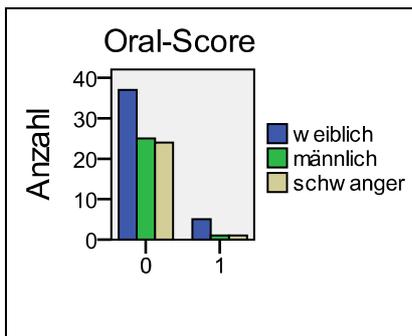


Abb. 13d: Orale Blutung

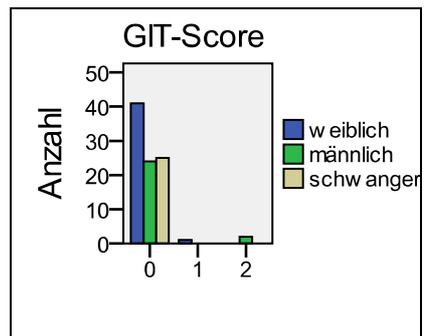


Abb. 13e: GIT-Blutung

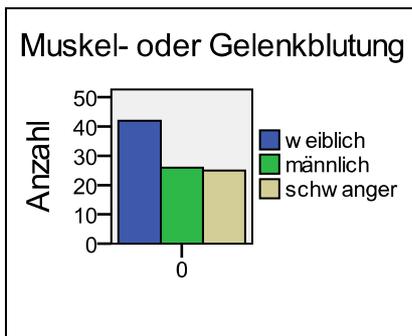


Abb. 13f: Muskel-Gelenk-B.

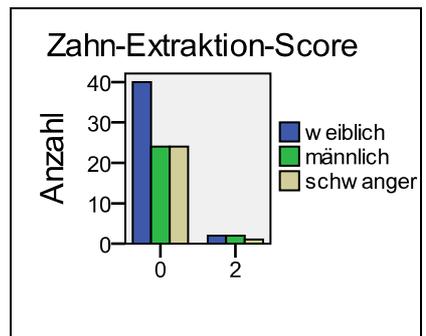


Abb. 13g: Zahnbeh.-Blutung

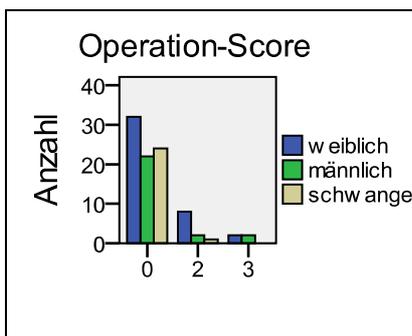


Abb. 13h: OP-Blutung

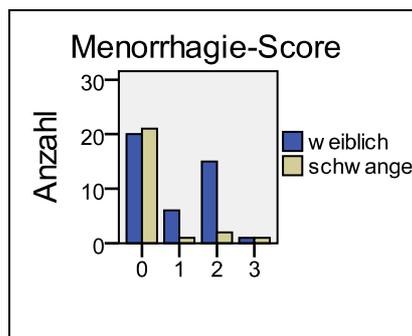


Abb. 13i: Menorrhagie

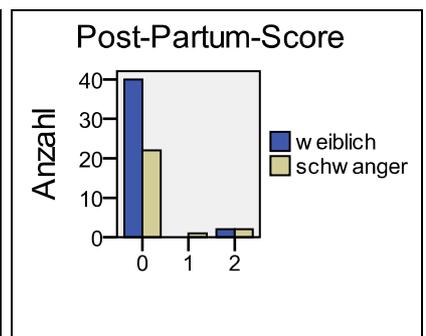
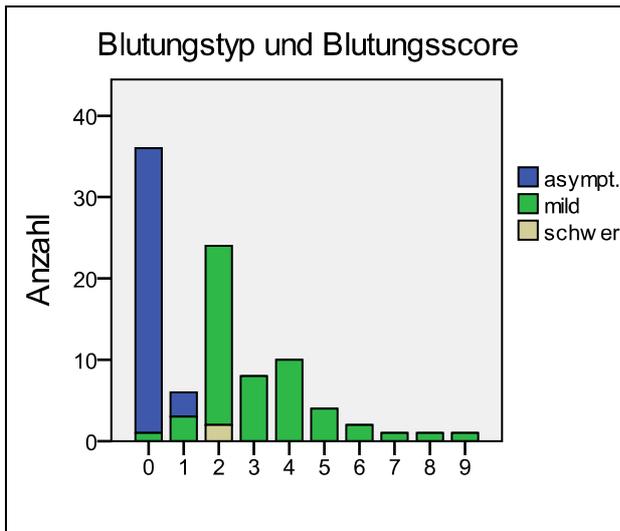


Abb. 13j: Postpart.-Blutung

Quantitativer Einzelscore (0–3) bei zehn Blutungen in drei Kollektivgruppen.

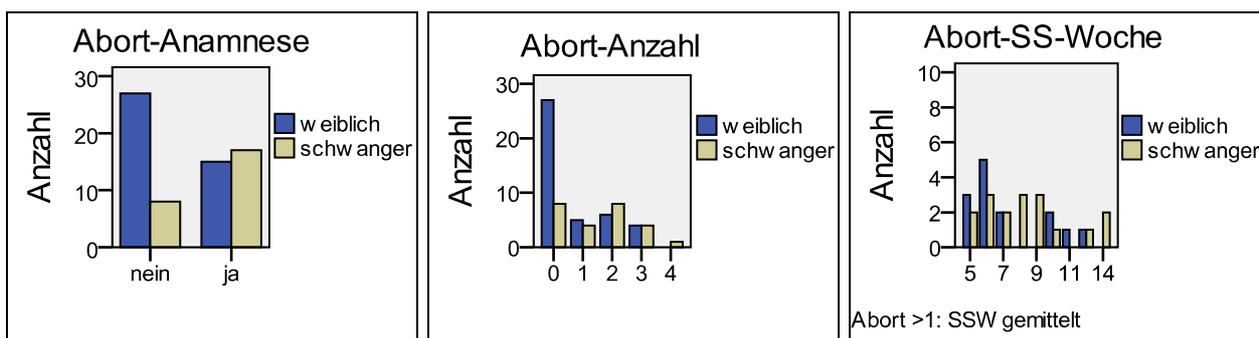
Der direkte Vergleich von Blutungstyp und Blutungsscore ließ Übereinstimmungen beim asymptomatischen und milden Blutungstyp erkennen, die sich im unteren bzw. mittleren Drittel des Blutungsscores darstellten. Der schwere Blutungstyp hingegen zeigte keine Korrelation, sondern lag im unteren Drittel des Blutungsscores, während der höchste Score (9) einem milden Blutungstyp entsprach (siehe Abb. 14).



**Abb. 14:** Blutungstyp und Blutungsscore  
Korrelation zwischen Blutungstyp und Score.

### 3.3.3 Abort

Von insgesamt 67 Frauen waren aktuell 25 Probandinnen schwanger, von denen 68 % wieder einen Abort aufwiesen. Über die Hälfte der 32 Patientinnen mit Abort wurde daher durch Schwangere repräsentiert. Die Mehrheit (72 %) wies ein bis zwei Aborte im 1. Trimenon auf. Der habituelle Abort (> 2 Aborte) war zu 28 % vertreten (siehe Abb. 15a–c).



**Abb. 15a:** Abort Häufigkeit und Zeitpunkt (Schwangerschaftswoche, SSW) des Aborts bei schwangeren und weiblichen Probanden.

### 3.4 Genotyp

Die Analyse des FVII-Gens auf Polymorphismen und Mutationen erfolgte in allen Exons einschließlich der Promoter- und angrenzenden Intronsequenzen.

#### 3.4.1 Polymorphismen

Das FVII-Gen wurde auf drei der 16 bekannten Polymorphismen untersucht:

FVII-Aktivität reduzierende (DC) Polymorphismen (siehe Tab. 2):

- -323-10bp-Insertion, (a1>a2), (Nr. 5,)
- R353Q, (m1>m2), (Nr. 15)

FVII-Aktivität steigernder (IC) Polymorphismus:

- -402G>A, (Nr. 3)

Bei den 93 Probanden des Kollektivs ließen sich auf den 186 Einzel-Allelen folgende Häufigkeitsrelationen der drei Polymorphismen aufzeigen:

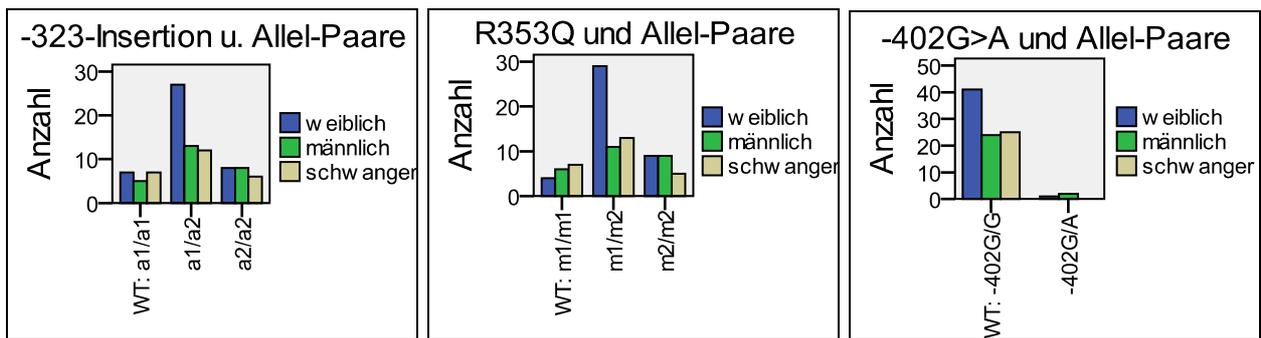
- (a1>a2): 0,48 / 0,52
- (m1>m2): 0,47 / 0,53
- (-402G>A): 0,98 / 0,02

Die FVII-Aktivität-reduzierenden polymorphen Varianten a2 und m2 zeigten aufgrund des Kopplungsungleichgewichts (siehe 1.5.1) ein ähnliches Verteilungsmuster und wurden in über der Hälfte der Einzel-Allele festgestellt. Die FVII-Aktivität-erhöhende polymorphe Variante -402A konnte im Kollektiv in knapp 2 % der Einzel-Allele

festgestellt werden. Sie wiesen somit deutliche Abweichungen zur Normalpopulation auf (siehe Tab. 2):

- (a1>a2): 0,77 / 0,23
- (m1>m2): 0,80 / 0,20
- (-402G>A): 0,71 / 0,29

Bei der Betrachtung der 93 Allel-Paare lag in über der Hälfte des Kollektivs die heterozygote (a1/a2; m1/m2) und bei ca. einem 1/4 die homozygote Variation (a2/a2; m2/m2) der FVII-reduzierenden Polymorphismen vor und zeigte auch hier aufgrund des Kopplungsungleichgewichts ein ähnliches Verteilungsmuster (siehe Abb. 16a–b). Der FVII-Aktivität-steigernde Polymorphismus konnte als heterozygote Variation (-402G/A) dreimal im Kollektiv gefunden werden, eine homozygote Variation kam nicht vor (siehe Abb. 16c).



**Abb. 16a:** a1/a2

**Abb. 16b:** m1/m2

**Abb. 16c:** -402G/A

Häufigkeiten der Polymorphismen auf den Allel-Paaren (heterozygot oder homozygot).

### 3.4.2 Haplotypen

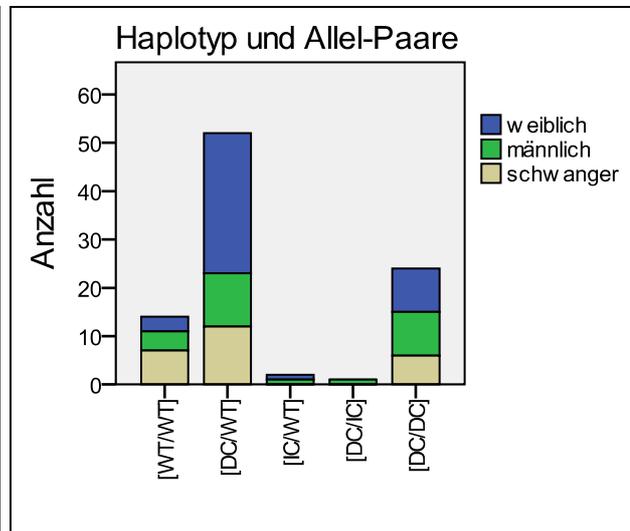
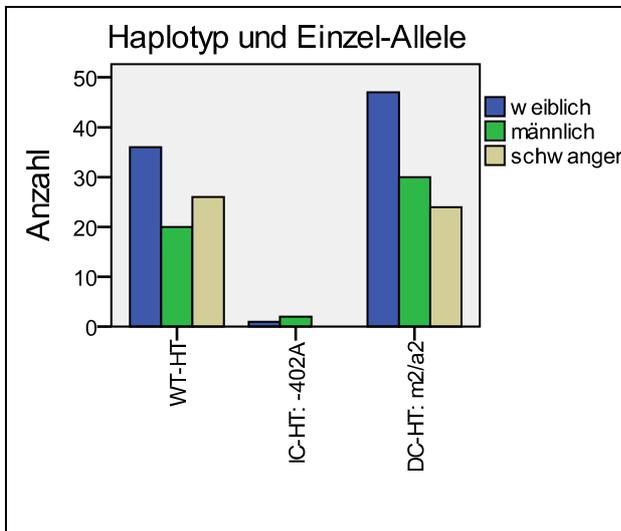
Bei der Bestimmung der Haplotypen (HT) wurde sich in unserer Arbeit auf die Haplotyp-Blöcke HT-I, HT-II und HT-III (Tab. 3) und damit auf den Wildtyp (WT-HT), auf den steigernden (IC-HT) und den reduzierenden Haplotyp (DC-HT) beschränkt.

Zur Einteilung dienten die drei Polymorphismen a2, m2 und -402A (siehe 3.4.1).

Bei den 186 Einzel-Allelen kamen der WT-HT in 44,1 %, der IC-HT in 1,6 % und der DC-HT in 54,3 % der Fälle vor (siehe Abb. 17a).

Bei der Betrachtung der 93 Allel-Paare kamen der homozygote WT-HT [WT/WT] bei 15,1 %, der heterozygote IC-HT [IC/WT] bei 2,2 %, der heterozygote DC-HT [DC/WT]

bei 55,9 % und der homozygote DC-HT [DC/DC] in 25,8 % der Fälle vor. Einmal wurde die Konstellation von DC und IC [DC/IC] auf einem Allel-Paar gezählt (siehe Abb. 17b).



**Abb. 17a:** Haplotyp und Einzel-Allele

**Abb. 17b:** Haplotyp und Allel-Paare

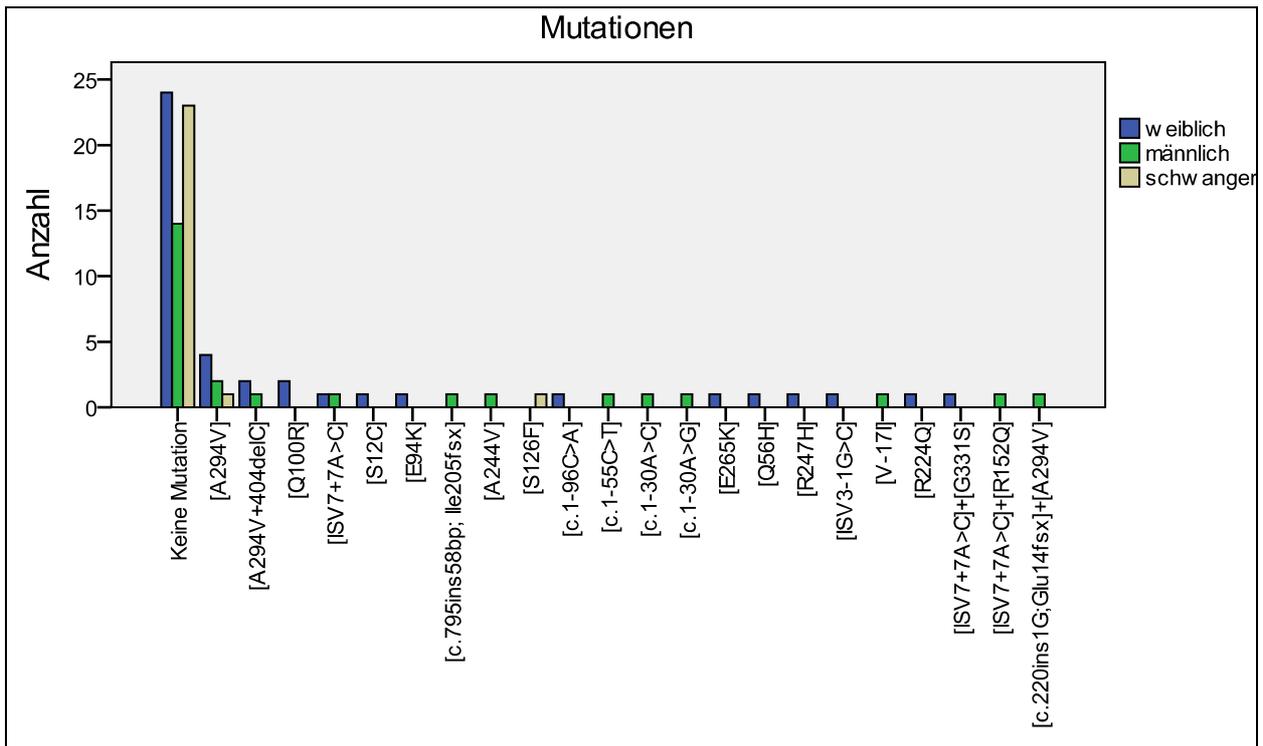
Häufigkeiten der Haplotypen auf den Einzel-Allelen und deren Kombination auf den Allel-Paaren.

### 3.4.3 Mutationen

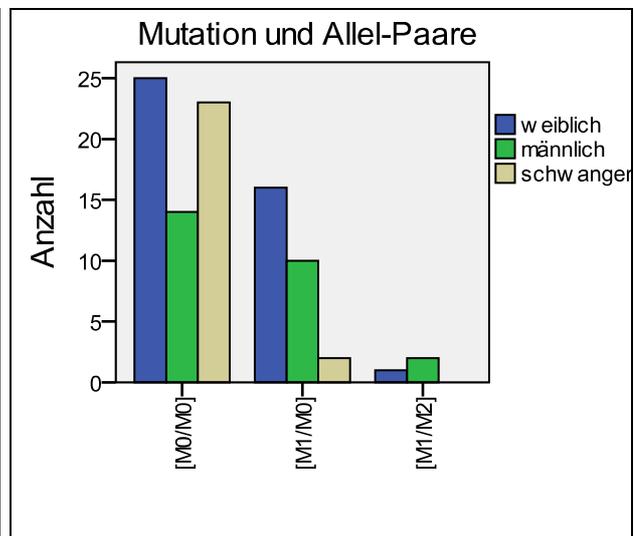
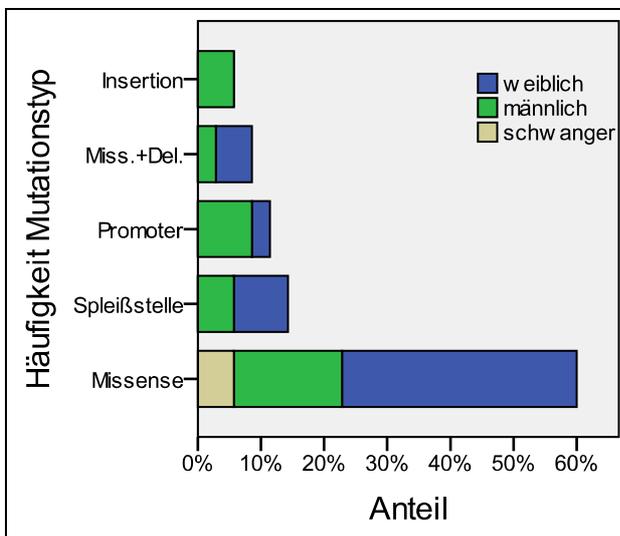
Die häufigste Mutation war die Missense-Mutation [A294V], die zusammen mit Ihrer Deletions-Variante [A294V+404delC] bei elf Probanden festgestellt wurde und somit 1/3 aller Mutationen ausmachte. Mehrfach wurden auch die Spleißstellen-Mutation [ISV7+7A>C] (12,5 %) und die Missense-Mutation [Q100R] (6,3 %) gezählt (siehe Abb. 18a).

Mit 69 % waren die Missense-Mutationen am häufigsten vertreten, während Spleißstellen- (14 %), Promoter- (11 %) und Insertions-Mutationen (6 %) seltener waren (siehe Abb. 18b).

Bei 1/3 (30,1 %) der Probanden konnte eine heterozygote Mutation [M1/M0] gefunden werden. Bei drei Probanden (3,2 %) lag eine compound-heterozygote Mutation [M1/M2] vor. Bei 2/3 (66,7 %) war keine Mutation [M0/M0] festzustellen (siehe Abb. 18c).



**Abb. 18a:** Mutationen  
Häufigkeiten der analysierten 35 Mutationen (compound-heterozygot rechts dargestellt).

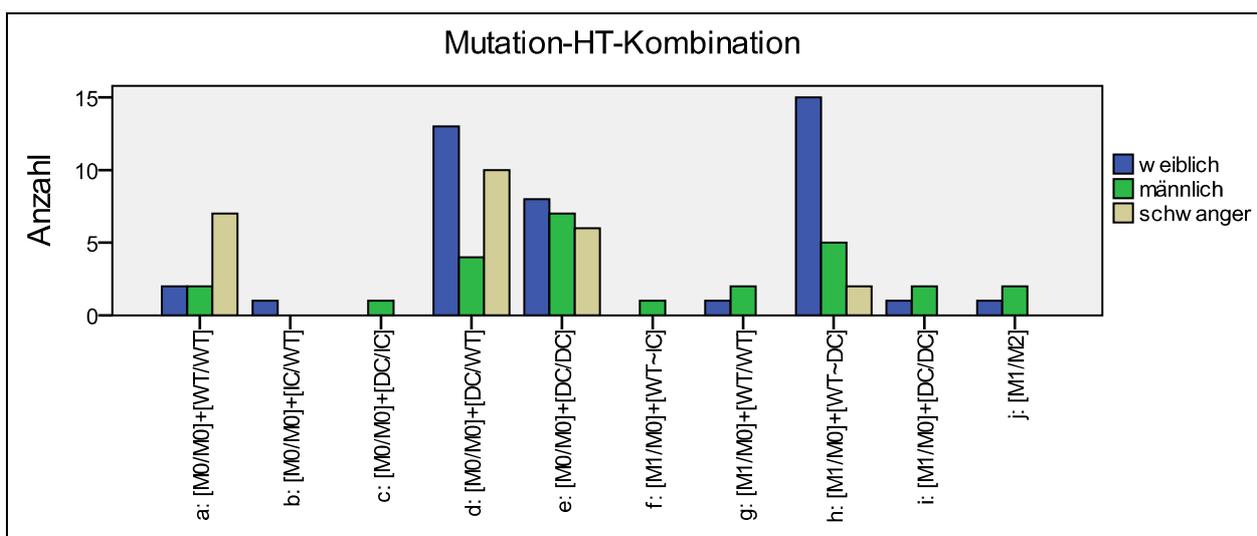


**Abb. 18b:** Mutationstyp  
Typ und Verteilung der Mutationen insgesamt und auf den Allel-Paaren (heterozygot oder compound-heterozygot).  
**Abb.18c:** Mutation und Allel-Paare  
M0/M0: keine Mutation; M1/M0: heterozygote; M1/M2: compound-heterozygote Mutation

### 3.4.4 Mutation-Haplotyp-Kombination

Im Kollektiv traten zehn verschiedene Mutation-Haplotyp-Kombinationen (a–j) auf. In 3/4 der Kombinationen kam der DC-HT vor (siehe Abb. 19). Bei jedem 8. Probanden wurde weder eine Mutation noch ein Polymorphismus nachgewiesen. Bei der compound-heterozygoten Mutation wurde auf die weitere Kombination mit Haplotypen verzichtet, da der FVII-reduzierende Effekt auf die Mutation beider Allele zurückgeht. Die genaue Allel-Zuordnung der heterozygoten Mutation-Haplotyp-Kombination (f und h) kann aufgrund einer fehlenden Familienuntersuchung nicht erfolgen und soll durch das Symbol [~] verdeutlicht werden (siehe 1.5.1):

- a: keine Mutation + homozygoter WT-HT: [M0/M0]+[WT/WT] 11,8 %
- b: keine Mutation + heterozygoter IC-HT: [M0/M0]+[IC/WT] 1,1 %
- c: keine Mutation + heterozygoter DC-HT + IC-HT: [M0/M0]+[DC/IC] 1,1 %
- d: keine Mutation + heterozygoter DC-HT: [M0/M0]+[DC/WT] 29 %
- e: keine Mutation + homozygoter DC-HT: [M0/M0]+[DC/DC] 22,6 %
- f: heterozygote Mutation + heterozygoter IC-HT: [M1/M0]+[WT~IC] 1,1 %
- g: heterozygote Mutation + homozygoter WT-HT: [M1/M0]+[WT/WT] 3,2 %
- h: heterozygote Mutation + heterozygoter DC-HT: [M1/M0]+[DC~WT] 23,7 %
- i: heterozygote Mutation + homozygoter DC-HT: [M1/M0]+[DC/DC] 3,2 %
- j: compound-heterozygote Mutationen: [M1/M2] 3,2 %



**Abb. 19:** Mutation-Haplotyp-Kombinationen  
Häufigkeiten und Verteilung der zehn Mutation-Haplotyp-Kombinationen (a–j).

### 3.4.5 Gruppierungen

Die 93 Probanden verteilten sich im Kollektiv auf zehn verschiedene Mutation-Haplotyp-Kombinationen. Die Probandenzahl der einzelnen Kombinationen unterschied sich z. T. erheblich. Die vier Kombinationen a, d, e und h erfassten zusammen 86,8 % der Probanden (siehe Abb. 19). Um eine statistische Ausarbeitung zu ermöglichen, wurden die zehn Kombinationen a–j in die fünf Gruppen A–E zusammengefasst (siehe Tab. 8):

Gruppe		Mutationen und HT
a	A	[M0/M0]+[WT/WT]
b		[M0/M0]+[IC/WT]
c		[M0/M0]+[DC/IC]
d	B	[M0/M0]+[DC/WT]
e	C	[M0/M0]+[DC/DC]
f	D	[M1/M0]+[WT~IC]
g		[M1/M0]+[WT/WT]
h		[M1/M0]+[DC/WT] FVII:C>36 %
		[M1/M0]+[WT/DC] FVII:C<36 %
I		[M1/M0]+[DC/DC]
J		[M1/M2]

**Tab. 8:** Genotyp-Gruppen

Zusammenfassung der zehn Mutation-Haplotyp-Kombinationen (a–j) in fünf Genotypen (A–E).

M0/M0: keine Mutation; M1/M0: heterozygote

M1/M2: compound-heterozygote Mutation

IC: FVII:C-steigernder Haplotyp

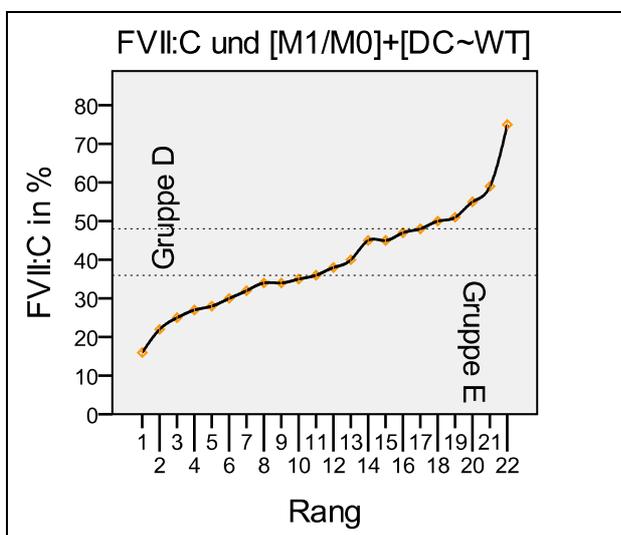
DC: FVII:C-reduzierender Haplotyp

WT: Wildtyp; [~]: Allel nicht zuzuordnen

Folgende Überlegungen standen hier im Vordergrund:

- Da die Selektion auf den FVII-Mangel gerichtet war, wurde der seltene IC-HT in die Gruppe A (Wildtyp) und D einbezogen.
- Die häufigen heterozygoten und homozygoten DC-HT ohne Mutation bildeten alleine die Gruppe B und C.
- Die seltenen compound-heterozygoten Mutationen und die heterozygoten Mutationen mit einem homozygoten DC-HT wurden in der Gruppe E (homozygote Mutation-Haplotyp-Kombination) zusammengefasst.

- Die Allelzuordnung einer heterozygoten Mutation zu einem heterozygoten DC-HT war aufgrund fehlender Familienuntersuchungen nicht möglich. In der Rangliste der 22 Probanden mit dieser Kombination zeichnete sich zwischen 36 % und 50 % ein stufenförmiger Verlauf der FVII-Aktivität ab. Aufgrund der zwei Aktivitätsniveaus wurde unterhalb von 36 % eine Mutation-Haplotyp-Kombination auf verschiedenen Allelen angenommen und in die Gruppe E aufgenommen. Höhere FVII-Aktivitäten machten die Lage auf demselben Allel (heterozygote Mutation-Haplotyp-Kombination) wahrscheinlicher (siehe Tab. 4) und verblieben in der Gruppe D (siehe Abb. 20).



**Abb. 20:** Rangliste FVII:C  
Stufiger Verlauf der FVII:C bei 22 Probanden mit der Mutation-HT-Kombination (h) [M1/M0]+[WT~DC] und der Zuordnung in die Gruppen D (>36 %) bzw. E (<36 %).  
(----) FVII:C-Mittelwert bei Veränderung auf einem oder zwei Allelen (siehe Tab. 4)

Somit ergaben sich statistisch als auswertbare Gruppenstärken:

- |                                |                                  |        |
|--------------------------------|----------------------------------|--------|
| • A: Wildtyp:                  | [M0/M0]+[WT/WT]+[IC/WT]+[DC/IC]: | 14 %   |
| • B: Heterozygoter DC-HT:      | [M0/M0]+[DC/WT]:                 | 29 %   |
| • C: Homozygoter DC-HT:        | [M0/M0]+[DC/DC]:                 | 22,6 % |
| • D: Heterozygote Mutation-HT: | [M1/M0]+[WT~IC]+[WT/WT]+[DC/WT]: | 17,2 % |
| • E: Homozygote Mutation-HT:   | [M1/M0]+[WT/DC]+[DC/DC]+[M1/M2]: | 17,2 % |

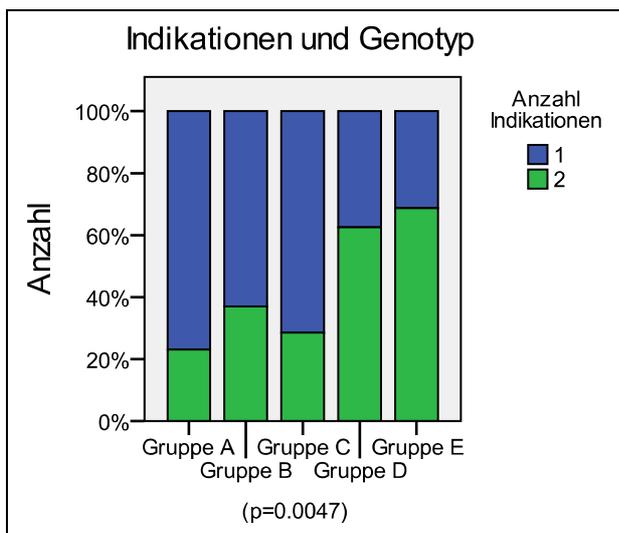
### 3.5 Genotypkorrelation

Die genetische Veränderung (Genotyp) nahm innerhalb der Gruppen von A nach E zu. Die Genotyp-Gruppen wurden auf Korrelationen untersucht mit den:

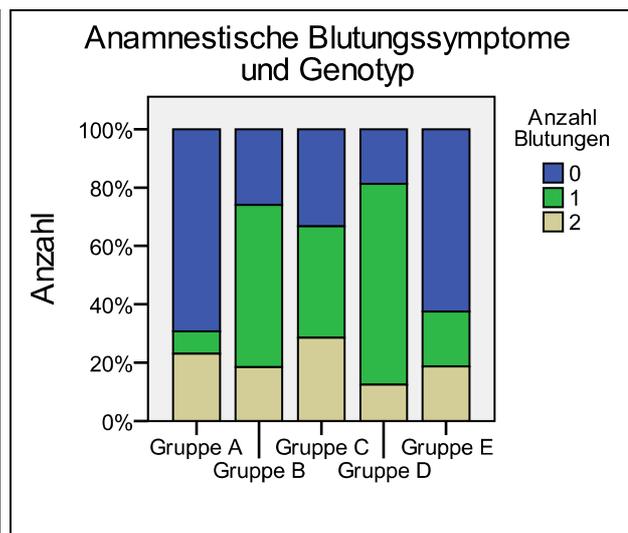
- Indikationen
- anamnestischen Blutungssymptomen
- laborchemischen Phänotypen (FVII:C, INR, hämorrhagische Nebendiagnosen)
- klinischen Phänotypen (qualitat. Blutungstyp, quantitat. Blutungsscore, Abort)

#### 3.5.1 Indikationen und Genotyp

Die Anzahl der insgesamt 19 verschiedenen Indikationen der überweisenden Ärzte wurde bei jedem Probanden durch die Anamneseerhebung festgehalten (siehe 3.1.3). Maximal zwei Indikationen wurden gezählt, die in der Trendanalyse einen Anstieg mit zunehmendem Genotyp ( $p=0.0047$ ) aufzeigten (siehe Abb. 21).



**Abb. 21:** Indikation und Genotyp  
Korrelation zwischen den anamnestischen



**Abb. 22:** Blutungssymptome und Genotyp  
Korrelation zwischen den anamnestischen Blutungssymptomen bzw. Indikationen und dem Genotyp.

#### 3.5.2 Anamnestische Blutungssymptome und Genotyp

Auch die Anzahl der anamnestischen Blutungssymptome wurde bei jedem Probanden festgehalten (siehe 3.1.4). Die maximal zwei Blutungssymptome verzeichneten bis zur Gruppe D (heterozygote Mutation-Haplotyp-Kombination) einen Anstieg. In der Gruppe

E, in der die stärksten genetischen Veränderungen vorkamen, lag aber ein Niveau wie in der Gruppe A vor, sodass die Trendanalyse negativ ausfiel (siehe Abb. 22).

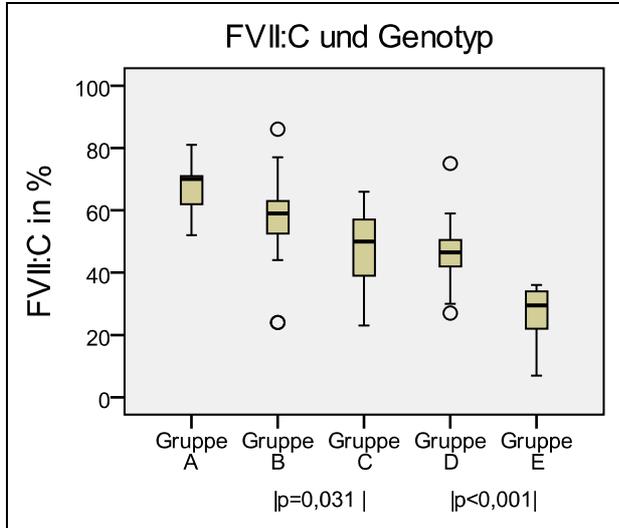
### 3.5.3 Laborchemischer Phänotyp und Genotyp

#### 3.5.3.1 FVII-Aktivität und Genotyp

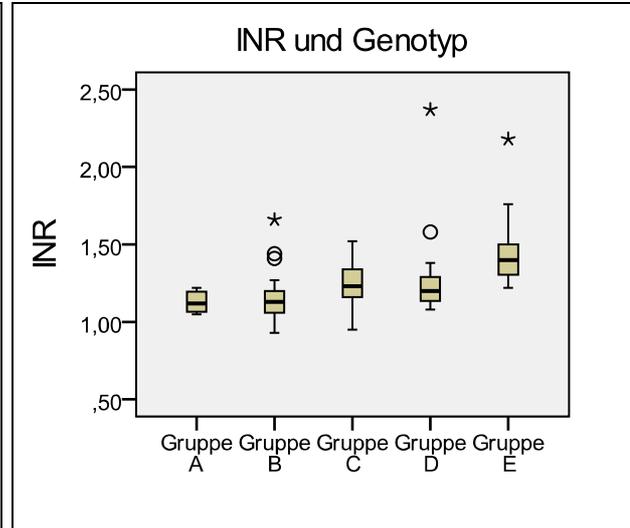
Die FVII-Aktivität (siehe Abb. 23) zeigte signifikante Unterschiede zwischen den hetero- und homozygoten DC-HT (Gruppe B und C) sowie zwischen den hetero- und homozygoten Mutation-Haplotyp-Kombinationen (Gruppe D und E).

Der Wildtyp (Gruppe A) wies mit 67 % eine Aktivität im unteren Normbereich auf.

Der heterozygote DC-HT (Gruppe B) lag mit 58 % knapp unterhalb des Normbereichs und war signifikant ( $p=0,037$ ) höher als die FVII-Aktivität des homozygoten DC-HT (Gruppe C) mit 48 %. Die heterozygote Mutation-Haplotyp-Kombination (Gruppe D) war mit 47 % signifikant ( $p>0,001$ ) höher als die homozygote Mutation-Haplotyp-Kombination (Gruppe E) mit 27 %. Die Gruppen A und B sowie C und D unterschieden sich wenig.



**Abb. 23:** FVII:C und Genotyp



**Abb. 24:** INR und Genotyp

Korrelation zwischen dem laborchemischen Phänotyp (FVII:C; INR) und dem Genotyp.

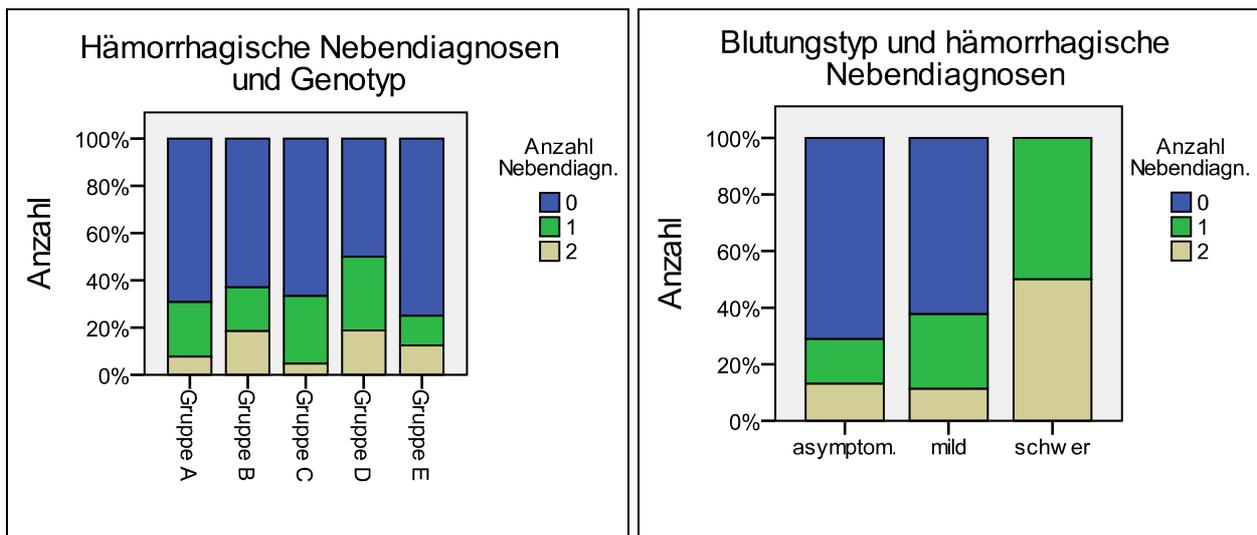
#### 3.5.3.2 INR und Genotyp

Ab dem homozygoten DC-HT (Gruppe C) zeigte sich ein Anstieg (siehe Abb. 24) der Thromboplastinzeit. Die heterozygote Mutation-Haplotyp-Kombination (Gruppe D) bot

ein ähnliches Niveau. Homozygote Mutation-Haplotyp-Kombinationen (Gruppe E) wiesen einen erneuten Anstieg auf. Signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

### 3.5.3.3 Hämorrhagische Nebendiagnosen und Genotyp

Hämorrhagische Nebendiagnosen konnten bei ca. 1/3 der Probanden festgestellt werden. Sie verteilten sich gleichmäßig über die Gruppen A–E (siehe Abb. 25a).



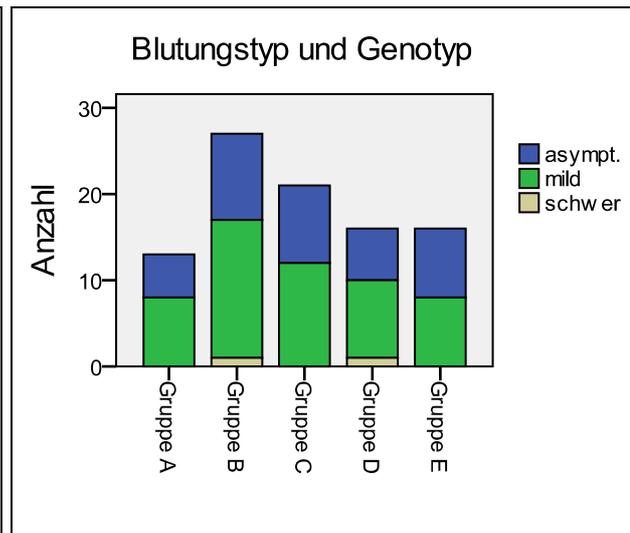
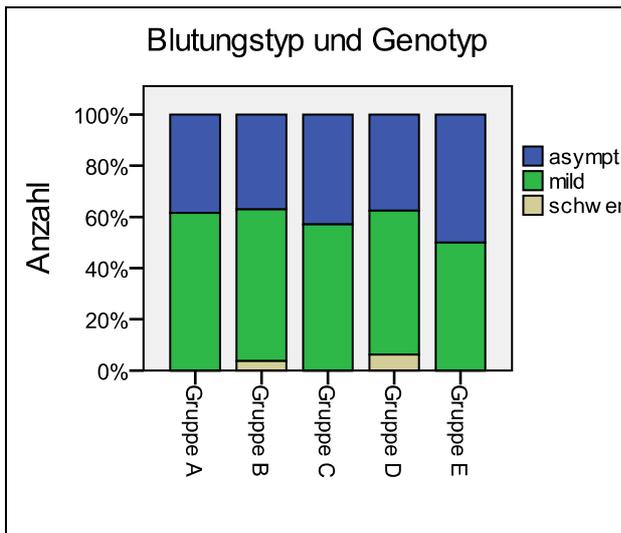
**Abb. 25a:** Nebendiagnosen und Genotyp **Abb. 25b:** Blutungstyp und Nebendiagn. Korrelation zwischen den Nebendiagnosen und Genotyp bzw. Blutungstyp (siehe 4.2).

### 3.5.4 Klinischer Phänotyp und Genotyp

#### 3.5.4.1 Qualitativer Blutungstyp und Genotyp

In der Einteilung nach Mariani (siehe 2.2.1) wies das Kollektiv mit 57 % einen milden Blutungstyp auf. Asymptomatisch waren 41 % der Probanden und in nur zwei Fällen lag ein schwerer Blutungstyp vor (siehe Abb. 11).

Der asymptomatische oder milde Blutungstyp zeigte in allen Gruppen A–E kein wesentlich unterschiedliches Verteilungsmuster (siehe Abb. 26a–b). In den zwei Fällen des schweren Blutungstyps lag ein heterozygoter DC-HT bzw. eine heterozygote Mutation-Haplotyp-Kombination vor (Gruppe B und D). Sie wurden durch Männer repräsentiert, die wegen einer INR-Erhöhung überwiesen wurden, eine schwerwiegende GIT-Blutung und einen FX-Mangel als hämorrhagische Nebendiagnose aufwiesen.



**Abb. 26a:** Blutungstyp und Genotyp

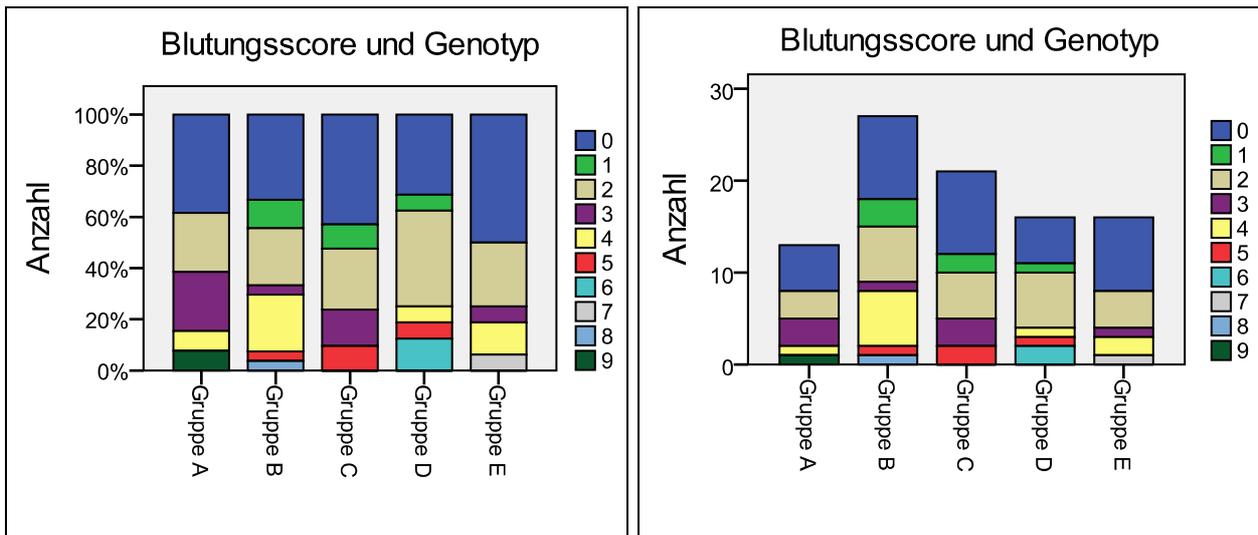
**Abb. 26b:** Blutungstyp und Genotyp

Korrelation zwischen dem qualitativen Blutungstyp und dem Genotyp.

### 3.5.4.2 Quantitativer Blutungsscore und Genotyp

Die Darstellung des Blutungsscores stellte sich durch den weiten Scorebereich unübersichtlich dar. Zusammengefasst ließ der Blutungsscore von 0–1 (45,3 %) einen Vergleich mit dem asymptomatischen Blutungstyp zu. Fast die Hälfte aller Probanden (49,5 %) lag im Scorebereich zwischen 2–5 und wies Parallelitäten zum milden Blutungstyp und damit ebenfalls kein unterschiedliches Verteilungsmuster in den Gruppen A–E auf (siehe Abb. 27a–b).

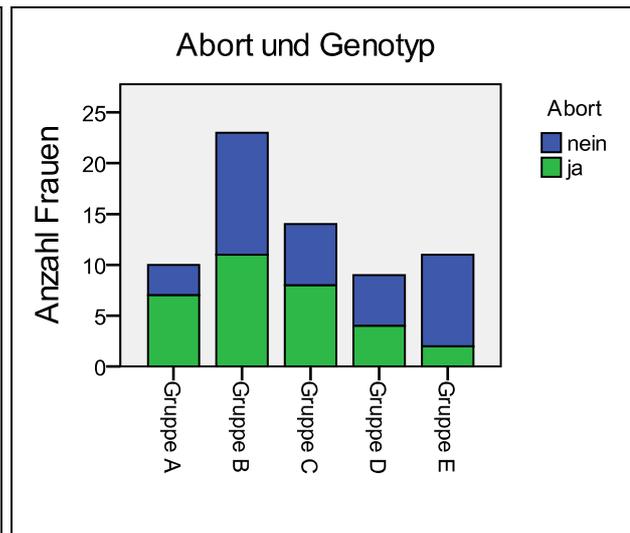
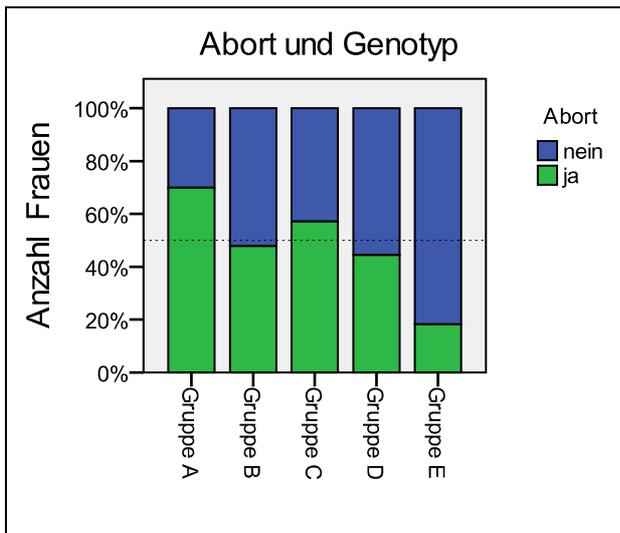
Die zwei höchsten Scores von 8–9 wurden durch Probandinnen der Gruppen B und A repräsentiert und entsprachen nicht den Probanden des schweren Blutungstyps (siehe 3.5.4.1). Sie fielen durch weibliche Blutungssymptome (postpartale Blutung und Menorrhagie) auf, wobei der höchste Score ausschließlich auf eine hämorrhagische Nebendiagnose (Thrombozytopenie) zurückgeführt werden konnte.



**Abb. 27a:** Blutungsscore und Genotyp **Abb. 27b:** Blutungsscore und Genotyp  
Korrelation zwischen dem quantitativen Blutungsscore und dem Genotyp.

### 3.5.4.3 Abort und Genotyp

- Die Gruppe A (siehe Abb. 28a–b) wies in 70 % den Abort im Kollektiv überdurchschnittlich häufig (48 %) auf. Der Anteil des habituellen Aborts belief sich auf 43 % und kam somit ebenfalls überdurchschnittlich (28 %) häufig vor.
- Die Gruppe B wies mit knapp 48 % eine durchschnittliche Häufigkeit und damit als größte Gruppe auch die meisten aller Aborte (34 %) auf. Der habituelle Abort war mit 36 % ebenfalls überdurchschnittlich vertreten.
- Die Gruppe C wies neben dem Wildtyp den Abort mit 57 % überdurchschnittlich (48 %) häufig auf. Hier kamen insgesamt 25 % aller Aborte vor. Der habituelle Abort war hier mit 25 % noch durchschnittlich (28 %) vertreten.
- Die Gruppe D wies einen Abort in 44 % von insgesamt 13 % aller Aborte auf. Habituelle Aborte kamen nicht vor (0 %).
- Die Gruppe E wies mit 18 % die niedrigste Aborthäufigkeit auf. Habituelle Aborte kamen hier ebenfalls nicht vor (0 %).

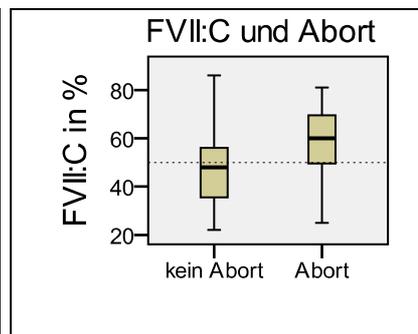
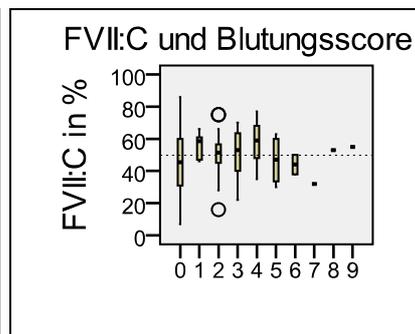
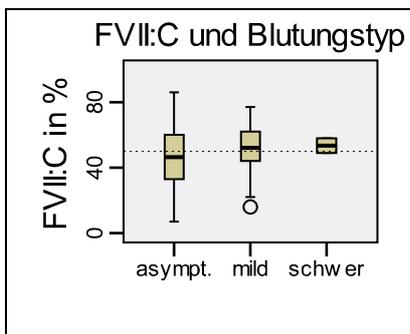
**Abb. 28a:** Abort und Genotyp**Abb. 28b:** Abort und Genotyp

Korrelation zwischen dem Abort und dem Genotyp.

(----) Abort-Mittelwert im Kollektiv

### 3.6 Klinischer und laborchemischer Phänotyp

- Der Mittelwert der FVII-Aktivität des asymptomatischen bis schweren Blutungstyp bewegte sich zwischen 47 % und 53 % und bot daher leicht ansteigende Werte um den Mittelwert (50 %) des Gesamtkollektivs (siehe Abb. 29a).
- Der Mittelwert der einzelnen Blutungsscores von 0–9 bewegte sich zwischen 32 % und 57 % und bot eher ein konstantes Bild (siehe Abb. 29b).
- Frauen mit Abort (58 %) wiesen eine höhere FVII-Aktivität als Frauen ohne Abort (47 %) auf und lagen über dem Mittelwert (52 %) aller Frauen (siehe Abb. 29c).

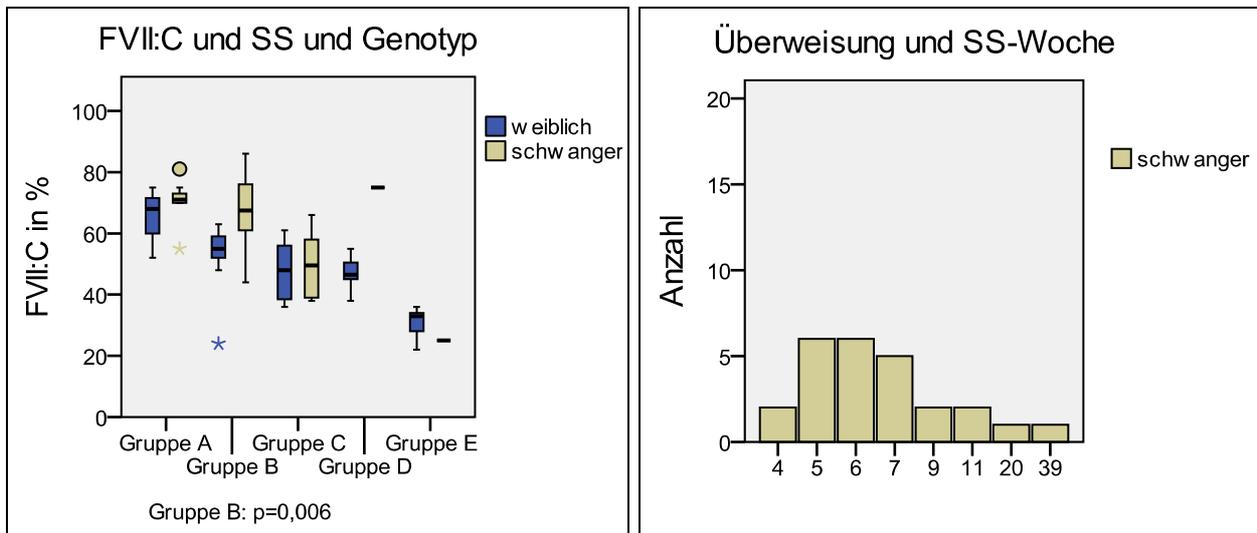
**Abb. 29a:** FVII:C und Typ**Abb. 29b:** FVII:C und Score**Abb. 29c:** FVII:C und Abort

Korrelation zwischen der FVII-Aktivität und dem klinischen Phänotyp (Blutungstyp, Blutungsscore und Abort).

(----) FVII:C Mittelwert

### 3.7 FVII und Schwangerschaft

Der direkte Vergleich mit den weiblichen Probanden zeigte in der Gruppe A (Wildtyp), Gruppe B (heterozygoter DC-HT) und in der Gruppe D (heterozygote Mutation-Haplotyp-Kombination) höhere FVII-Aktivitäten bei den Schwangeren (siehe Abb. 30a).



**Abb. 30a:** FVII und Schwangerschaft Korrelation zwischen der FVII-Aktivität und dem Genotyp bei schwangeren und weiblichen Probanden in der Frühschwangerschaft. **Abb. 30b:** Überweisung in SS-Woche

Die FVII-Aktivität war beim heterozygoten DC-HT (Gruppe B) signifikant höher ( $p=0,006$ ). Beim homozygoten DC-HT (Gruppe C) stellten sich gleiche Aktivitäten dar. Ein signifikanter Unterschied der Gruppen D und E ließ sich aufgrund der Probandenzahl nicht errechnen. In der Einzelfallanalyse konnte aber eine höhere FVII-Aktivität der Schwangeren bei der heterozygoten Mutation-Haplotyp-Kombination festgestellt werden, während sich bei den homozygoten Mutation-Haplotyp-Kombinationen keine Unterschiede zeigten.

Die Überweisung und Bestimmung der FVII-Aktivität erfolgten fast ausschließlich in der Frühschwangerschaft (siehe Abb. 30b).

## 4 Diskussion

### 4.1 Kollektivbeschreibung

Die **Einteilung** (siehe Abb. 4) des Kollektivs erfolgte in die drei Gruppen männlich, weiblich und schwanger. Schwangere Probandinnen wurden von vornherein neben den weiblichen Probanden separat erfasst, da bereits bei der Datenerhebung auffiel, dass die Indikationsstellung nicht durch einen FVII-Mangel oder ein Blutungssymptom erfolgte, sondern mit 85 % aus Schwangerschaftskomplikationen wie beispielsweise dem Abort resultierte. Auch die Ergebnisse beim klinischen und laborchemischen Phänotyp bzw. Genotyp zeigten im Vergleich zu den weiblichen Probanden Werte, die eher mit der Normalbevölkerung vergleichbar waren, und bestätigen somit auch im Nachhinein diese Einteilung.

Bei der **Altersstruktur** (siehe Abb. 5) bildeten die Männer mit durchschnittlich 21 Jahren die jüngste Kollektivgruppe. Begründet wurde der Altersunterschied dadurch, dass 61 % der Männer im Rahmen einer meist präoperativen Routineuntersuchung schon im jugendlichen Alter durch eine erhöhte INR auffielen. Die **Indikationen** (siehe Abb. 6a–b) zur gerinnungsphysiologischen Untersuchung wurden vielfach von chirurgischer Seite gestellt, um bisher unerkannte Gerinnungsstörungen zu erfassen. Der hohe Anteil der INR-Erhöhungen bei den Männern ist bemerkenswert, da in aktuellen anästhesiologischen Studien eine INR-Erhöhung im Vorfeld einer Operation je nach Studienlage nur in 0,3 % bis 6,5 % der Fälle vorkam und diese aufgrund einer fehlenden Blutungsanamnese auch nur in maximal 0,1 % der Fälle zu einer Veränderung des perioperativen Managements führte (Wappler, 2012).

Das höhere Lebensalter des weiblichen und schwangeren Kollektivs mit durchschnittlich 31 bzw. 28 Jahren erklärt sich in erster Linie dadurch, dass insbesondere der Abort, aber auch die unerfüllte Schwangerschaft, die Schwangerschaftsblutung und die postpartale Blutung die wesentlichen Untersuchungsindikationen darstellten. Das Lebensalter der Frauen entspricht demnach der demographischen Entwicklung und korreliert mit den Daten des Statistischen Bundesamts der Bundesrepublik Deutschland, die belegen, dass Erstgebärende in der Bundesrepublik Deutschland heute durchschnittlich 26 Jahre alt sind (Emmerling, 2007).

Die Ursachen eines habituellen Aborts sind vielfältig. Bisher finden sich in der Literatur aber aus hämostaseologischer Sicht nur Daten, die einen Zusammenhang lediglich mit der erworbenen (Antiphospholipid-Syndrom) oder angeborenen Thrombophilie (FV-Mutation, Prothrombin-Mutation, PS-Mangel) belegen (Hinney B, 2011).

Die **anamnestischen Blutungssymptome** (siehe Abb. 7a–b) wurden durch die weiblichen Blutungssymptome dominiert. Die Epistaxis, Hämatome und orale Blutungen kamen ebenfalls gehäuft vor. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Blutungsspektrum einer Untersuchung bei Patienten mit einer FVII-Aktivität von unter 10 %. Peyvandi et al. konnten in dieser Studie aber deutlich höhere Anteile der einzelnen Blutungssymptome verzeichnen (Peyvandi et al., 1997; Perry, 2002). Dieser Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass in unserer Arbeit das Interesse auf Patienten mit leichten FVII-Mängeln gerichtet war und die durchschnittliche FVII-Aktivität bei 50 % lag. Klinisch asymptomatisch waren daher auch 38 % des Gesamtkollektivs und Männer machten dabei fast die Hälfte aus.

#### 4.2 Laborchemischer Phänotyp

Die durchschnittliche **FVII-Aktivität** (siehe Abb. 8) der männlichen Kollektivgruppe war am niedrigsten und korreliert mit der häufigen Indikation einer INR-Erhöhung. Die **Thromboplastinzeit** (siehe Abb. 9) verhielt sich in allen drei Kollektivgruppen erwartungsgemäß konträr zur FVII-Aktivität. Die INR eignet sich somit als Indikator eines isolierten FVII-Mangels, wenn auch ein normaler INR-Wert ab einer FVII-Aktivität von 45 % vorlag. Pilger et al. zeigten in einer klinischen Studie (n=22) einen normalen Quick-Wert (70 %) bei einer FVII-Aktivität von 48 % auf (Pilger et al., 1981). Auch aus dem Therapieprotokoll eines erworbenen FVII-Mangels mit NovoSeven® (rekombinanter FVIIa) geht hervor, dass die INR bereits ab einer FVII-Aktivität von 30 % im Normbereich liegen kann (Mullighan, 2004). Hierzu sei angemerkt, dass in der Fachinformation zu NovoSeven® dieser verkürzende Effekt auf die TPZ unter Substitution erwähnt wird (Novo Nordisk, 2012) und zudem berücksichtigt werden muss, dass die verschiedenen INR-Reagenzien eine unterschiedliche Empfindlichkeit hinsichtlich eines FVII-Mangels aufweisen.

Die hohe FVII-Aktivität der schwangeren Kollektivgruppe resultierte primär aus den Einschlusskriterien. Schwangere wurden mit einer FVII-Aktivität im unteren Normbereich

akzeptiert, da bereits Hellgren eine Hyperkoagulabilität während der Schwangerschaft mit Anstieg fast aller Gerinnungsfaktoren beschrieb (Hellgren, 2003) und Rott et al. im letzten Trimenon auch bei einer heterozygoten Mutation (siehe 1.5.2) in Einzelfällen eine FVII-Aktivität von 84 % aufzeigen konnten (Rott et al., 2007).

Bei 35 % der Probanden fielen neben dem FVII-Mangel noch bis zu zwei weitere **hämorrhagische Nebendiagnosen** (siehe Abb. 10a–b) auf. Dabei stieg die Anzahl der Nebendiagnosen mit der Schwere des Blutungstyps an und verdeutlichte den hohen Stellenwert einer Differentialdiagnostik beim milden FVII-Mangel (siehe Abb. 25b).

Die häufigste Nebendiagnose war das vWS und kam im Kollektiv bei 12 % aller Probanden vor. Die Häufigkeit beträgt im Kollektiv mehr als das Zehnfache im Vergleich zur Gesamtbevölkerung. Budde et al. geben an, dass bei nahezu 1 % der Bevölkerung (800/100000) ein vWS laborchemisch nachgewiesen werden kann. Allerdings liegt der Anteil derer, die auch Blutungssymptome aufweisen, mit 1:3000 bis 1:10000 deutlich niedriger und Betroffene fallen daher oft erst durch Komplikationen bei operativen Eingriffen auf (Budde et al., 2004). Frauen werden häufig erst durch einen Menorrhagie, Frühaborte und postpartale Blutungen auffällig. Scharrer konnte dabei aufzeigen, dass bei 1/3 der Patientinnen mit Menorrhagie ein vWS vorlag bzw. bei über 2/3 der Patientinnen mit nachgewiesenem vWS eine Menorrhagie beklagt wurde (Scharrer, 2004). Es ist daher verständlich, dass in unserer Arbeit das vWS fast ausschließlich bei Frauen vorkam.

Auch der FX-Mangel wurde mit 8 % gehäuft beobachtet. Er tritt alleine sehr selten auf, kann aber beim FVII-Mangel häufiger vorkommen (siehe 1.3), da beide Gene nur ca. 2,8 Kilobasen voneinander entfernt sind (Miao et al., 1992) und somit eng benachbart auf dem Chromosom 13 (13q34) liegen (Narang et al., 2010). Allerdings wurden in dieser Studie die Probanden nicht auf große Deletionen, die eine solche Konstellation erklären würden, untersucht (siehe 2.4.1.5). Dies scheint auch verzichtbar zu sein, da nach Wulff et al. große Deletionen in der Greifswalder Datenbank nur selten gefunden wurden (Wulff et al., 2008).

### 4.3 Klinischer Phänotyp

Der **qualitative Blutungstyp** (siehe Abb. 11) ergab im Kollektiv folgende Einteilung: Bei 40,8 % ein asymptomatischer, 57 % ein milder und lediglich 2,2 % ein schwerer

Blutungstyp. Diese Einteilung wurde erstmals von Mariani beschrieben und auch von McVey bei der Erstellung der „FVII Mutation Database“ verwendet (Mariani et al., 1998; McVey et al., 2001; siehe 2.2.1).

Da in unserer Arbeit das Gesamtkollektiv auch Probanden ohne eine kausale Mutation beinhaltet, kann hier kein direkter Vergleich mit der „FVII Mutation Database“ erfolgen, in der ausschließlich Probanden mit Mutationen aufgeführt sind (siehe 1.5.1; 4.5). Aber sowohl in unserem Kollektiv (40 %) als auch in der „FVII Mutation Database“ (28–67 %) liegt der Anteil der asymptomatischen Probanden in einer vergleichbaren Größenordnung, obwohl der Mutationsanteil in unserem Kollektiv mit 33,3 % wesentlich niedriger war. Der genetische Defekt wird phänotypisch noch oft toleriert und Pilger et al. interpretierten dies als variable Expressivität der Allele (Pilger et al., 1981). So berichteten Mariani et al. über asymptomatische Patienten (FVII-Aktivität > 20 %) mit compound-heterozygoten oder homozygoten Mutationen (Mariani et al., 1998). Die Funktionsbeeinträchtigung des Proteins resultiert primär sicher aus der Lokalisation der Mutationen bzw. deren Einfluss auf die entsprechenden Domänen. Herrmann et al. berichten aber auch über eine hohe Variabilität des klinischen Phänotyps bei Probanden mit identischer Mutation und vermuten hierfür extra- oder epigenetische Effekte. Dies führte in unserer Arbeit zu der Überlegung, wann beim leichten FVII-Mangel eine molekulargenetische Untersuchung weiterführend ist (Fragestellung 2; siehe 1.1.2).

Auffallend war, dass der Anteil von milden Blutungen im Vergleich zur „FVII Mutation Database“ (16 %) deutlich höher ausfiel. Dieser Unterschied wird durch die Mehrheit der Frauen begründet, die größtenteils durch eine Menorrhagie oder Hämatome auffielen (siehe Abb. 7a). Der milde Blutungstyp wurde in der „FVII Mutation Database“ hauptsächlich bei compound-heterozygoten Missense-Mutationen (FVII:C > 2 %) gefunden, während er in unserem Kollektiv in allen Genotyp-Gruppen vorkam (siehe Abb. 26a–b). Probleme in der Einschätzung des klinischen Phänotyps sind auch bei vorliegenden Laborwerten durchaus vorhanden. Bereits McVey wies hierzu auf den Mangel an systematischen Studien hin und merkte das Fehlen einer einheitlichen Blutungsklassifikation an (McVey et al., 2001). In unserer Arbeit begründete sich somit die Überlegung, den bisherigen qualitativen Blutungstyp durch einen quantitativen Score zu ergänzen (Fragestellung 1; siehe 1.1.1).

Der deutlich höhere Anteil schwerer Blutungen (17 %) in der „FVII Mutation Database“ ließ sich auf eine höhere Anzahl schwerer FVII-Mängel (< 2 %) zurückführen, die laut McVey nur bei gravierenden Mutationen (große Deletionen, Promoter-, Spleißstellen- und Stopp-Mutationen) beider Allele vorkamen und einen fast vollständigen Syntheseabbruch des Proteins nach sich zogen. In unserem Kollektiv kamen lediglich drei Probanden mit einer compound-heterozygoten Mutation vor, die aber auf je einem Allel Missense-Mutationen (oder Mutationen, für die nur ein milder Effekt auf das FVII-Protein bekannt ist, siehe 4.4) aufwies und deren FVII-Aktivität zwischen 7 % und 22 % lag. Klinisch waren sie alle asymptomatisch, sodass auch hier gezeigt werden konnte, dass es eines schwerwiegenden Defekts auf beiden Allelen bedarf, um klinisch bedeutsam zu werden (Fragestellung 2; siehe 1.1.2).

Auch der **quantitative Blutungsscore** (siehe Abb. 12; 13a–j) spiegelt den hohen Anteil weiblicher Probanden mit einer Menorrhagie und Hautblutungen wider. Beim durchschnittlichen Blutungsscore lagen die weiblichen Probanden aufgrund ihrer zusätzlichen Blutungssymptome mit 2,6 doppelt so hoch wie die Männer mit 1,3. Der klinische Schweregrad, wie er beim qualitativen Blutungstyp im Vordergrund steht, wird durch den Blutungsscore nicht erfasst (siehe Abb. 14).

Um Blutungen in Studien zukünftig einheitlich bewerten zu können, wurde 2010 der Blutungsscore von der „International Society on Thrombosis and Haemostasis“ (ISTH) überarbeitet (Rodeghiero et al., 2010) und kann als „Bleeding Assessment Tool“ (BAT) im Internet heruntergeladen werden ([www.gzrr.de](http://www.gzrr.de); letzter Zugriff: 12.01.2012). Die Anzahl der verschiedenen Blutungen bzw. der Einzelscores beeinflusst aber weiterhin den Gesamtscore. Es sollte daher diskutiert werden, ob der summarische Blutungsscore zukünftig durch einen Blutungsindex ersetzt wird (Fragestellung 1; siehe 1.1.1), der das Verhältnis von Blutungsscore und der Anzahl von Blutungen berücksichtigt:

(Index = Blutungsscore / Anzahl der Blutungen).

Dies hätte folgende Vorteile:

- Geschlechtsspezifischen Blutungen bleiben weitgehend neutral.
- Eine hohe Anzahl diverser leichter Blutungen hebt den Scoreindex nicht an.
- Die statistische Auswertung einer dimensionslosen Skalierung von 0–3 ist möglich.
- Zukünftige Ergänzungen (Hämaturie, intrakranielle, präpartale Blutung) sind möglich.

Von 67 Frauen wiesen im Kollektiv 48 % einen **Abort** (siehe Abb. 15a–c) auf. Fast alle Frauen mit Abortanamnese (88 %) stellten sich deshalb auch zur hämostaseologischen Abklärung vor und begründeten so den hohen Abortanteil der Indikationen von 21 % im Gesamtkollektiv (siehe Abb. 6a). Bei 50 % der Frauen war es sogar ausschließlich der Abort, der zur Überweisung in die Gerinnungsambulanz führte. Obwohl die Schwangeren nur einen Anteil von 37 % aller Frauen ausmachten, waren sie doch für 53 % aller Abortanamnesen verantwortlich. Schwangere und weibliche Probanden unterschieden sich hinsichtlich der Abortanzahl und des Abortzeitpunkts nur unwesentlich und die Überweisung geschah unabhängig von der Abortanzahl.

Warburton und Fraser geben die Spontanabortrate klinisch erkannter Schwangerschaften bei Frauen zwischen 25 und 35 Jahren mit ca. 10–15 % an (Warburton und Fraser, 1964) und erklären in diesem gynäkologisch vorselektierten Kollektiv den hohen Anteil der Frauen mit ein oder zwei Aborten. Von einem habituellen Abort wird definitionsgemäß ab der 3. Fehlgeburt gesprochen; dieser kommt lediglich bei ca. 1–3 % aller Paare mit Kinderwunsch vor, sodass der Anteil von 28 % innerhalb des Abortkollektivs bzw. 13 % aller Frauen in unserer Arbeit als hoch anzusehen ist.

Hinney berichtet über eine exponentielle Zunahme der Abortrate mit dem Alter der Mutter; so steigt die Inzidenz auf 35 % bis zum 40. Lebensjahr an. Der habituelle Abort wird hauptsächlich auf Chromosomenanomalien (Fragestellung 3; siehe 1.1.3) des Feten, uterine bzw. endokrine Störungen, aber auch auf eine Thrombophilie der Mutter zurückgeführt, die in unserem Kollektiv aber nur in Einzelfällen (und daher nicht dargestellt) nachgewiesen werden konnte (Hinney B, 2011). Da das durchschnittliche Alter der weiblichen Probanden und schwangeren Probandinnen bei 31 bzw. 28 Jahren lag, ist hier der Einfluss des Lebensalters für die hohe Abortrate nicht verantwortlich. Nawroth et al. kritisieren bereits die Zunahme einer unselektiven und meist erfolglosen Diagnostik und fordern, die Abortabklärung nicht nur aus Kostengründen evidenzbasiert zu rationalisieren, sondern auch, um so eine unnötige Verunsicherung der betroffenen Paare zu vermeiden (Nawroth et al., 2006).

#### 4.4 Genotyp

In unserer Arbeit ließ sich feststellen, dass die Ergebnisse der Haplotypen und Mutationen sich durch die Vorselektion des Kollektivs hinsichtlich der reduzierten FVII-Aktivität erklären lassen:

In unserem Kollektiv wurde sich bei der Untersuchung der 186 Einzel-Allele bzw. der 93 Allel-Paare auf die FVII-reduzierenden (DC) **Polymorphismen** (Abb. 16a–c) -323-10bp-Insertion (a1>a2) bzw. R353Q (m1>m2) und den FVII-steigernden (IC) Polymorphismus -402 G>A beschränkt, da sie die wichtigen Haplotypen I–III ausreichend definieren (siehe Tab. 3). Aufgrund des Kopplungsungleichgewichts (siehe 1.5.1) konnte auch in unserer Arbeit eine nahezu identische Allelhäufigkeit der reduzierenden Polymorphismen a2 und m2 mit 52 % bzw. 53 % festgehalten werden. Der Anteil der reduzierenden Polymorphismen liegt höher als im Vergleich zur Normalbevölkerung, den Geisen beim a2 mit maximal 23 % und beim m2 mit 20 % (siehe Tab. 2) der Einzel-Allele durch repräsentative Untersuchungen an gesunden Blutspendern angibt (Geisen, 2005).

Auch die **Haplotypen** (siehe Abb. 17a–b) zeigten wie die Polymorphismen die entsprechenden Veränderungen im Vergleich zur Normalbevölkerung auf. Der Wildtyp bzw. WT-Haplotyp (HT-I) war erwartungsgemäß mit 44 % der 186 Einzel-Allele im Vergleich zur Normalbevölkerung (fast 63 %) erniedrigt. Der IC-Haplotyp (HT-II) konnte lediglich bei 1,6 % der Allel-Paare gefunden werden, während sein Anteil in der Normalbevölkerung bei 24 % liegt. Der DC-Haplotyp (HT-III) lag mit 54,3 % der Einzel-Allele deutlich höher als in der Normalbevölkerung, der hier in knapp 11 % der Allele vorkommt (Geisen, 2005).

Fast identische Daten gehen aus der Greifswalder Datenbank durch Untersuchungen der nicht mutierten Allele an heterozygoten Mutationsträgern hervor. Das Kollektiv war ebenfalls durch einen FVII-Mangel vorselektiert und der Anteil des WT-HT lag bei 45 %, des IC-HT bei 3 % und des DC-HT bei 41 %; sie unterschieden sich somit ebenfalls signifikant gegenüber der Normalbevölkerung. Den auffallend geringen Anteil des IC-HT erklären Wulff et al. damit, dass der steigernde Polymorphismus sogar bei heterozygoten Mutationsträgern auf dem anderen Allel einen FVII-Mangel ausgleichen kann (Wulff et al., 2008).

Bei der Betrachtung der Allel-Paare kam der heterozygote DC-HT bei 55,9 % der Probanden vor und ist damit doppelt so hoch wie in der Normalbevölkerung (siehe Tab. 3). Bei ca. 2/3 aller weiblichen Probanden lag überdurchschnittlich häufig die heterozygote Konstellation vor, obwohl hierdurch allein ihr hoher Anteil an milden Blutungen (76 %) nicht erklärbar war. Plausibel wird dieser Phänotyp dadurch, dass über die Hälfte dieser Probandinnen auch eine Mutation aufwies (siehe Abb. 19).

Der homozygote DC-HT macht in unserem Kollektiv einen Anteil von 25,8 % aus und ist somit wesentlich höher als in der Normalbevölkerung; hier dürfte er rechnerisch in der Größenordnung von 1,2 % liegen (Wulff et al., 2008).

Die schwangeren Probandinnen wiesen zu 28 % den homozygoten WT-HT auf und näherten sich somit der Normalbevölkerung an; rechnerisch dürfte er (63 % der Einzel-Allele) unter 40 % liegen.

Bei insgesamt 35 (19 %) der untersuchten 186 Allele ließ sich im Kollektiv eine Mutation nachweisen. Fast alle **Mutationen** (siehe Abb. 18a–c) traten nur vereinzelt auf. Auffallend häufig waren aber die Mutation [A294V] mit 23 % und deren Deletions-Variante [A294V+404delC] mit 8,6 % vertreten. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in der Greifswalder Datenbank mit 15 % bzw. 20 % wider, in der Herrmann et al. den Genotyp an 717 Mutationsträgern analysierten (Herrmann et al., 2009). Sie wurde bereits von Bernardi et al. beschrieben und scheint in Europa die häufigste Mutation zu sein (Bernardi, 1994; Herrmann, 2000).

Bei der Betrachtung der Allel-Paare lag bei fast 1/3 des Gesamtkollektivs (30,1 %) eine heterozygote Mutation vor, die nach Wulff et al. in der Normalbevölkerung schätzungsweise bei 1/350 anzunehmen ist (Wulff et al., 2008). Bei einer 2/3-Mehrheit wurde keine kausale Mutation gefunden. Hierfür ließ sich zum einen die schwangere Kollektivgruppe verantwortlich machen (siehe Abb. 18c), zum anderen begründet auch der überproportional vorkommende homozygote DC-HT die durchschnittliche FVII-Aktivität von 50 % im Gesamtkollektiv (siehe Tab. 4).

Im Kollektiv verteilten sich die Mutationen zu 5,7 % auf Insertions-, zu 11,4 % auf Promoter-, zu 14,3 % auf Spleißstellen- und zu 68,6 % auf Missense-Mutationen einschließlich ihrer Deletions-Variante (siehe Abb. 18b). Die Häufigkeit der einzelnen Mutationsarten war somit, insbesondere bei den Missense-Mutationen, mit der Londoner „FVII Mutation Database“ vergleichbar, deren Anteil hier etwas höher, bei 80 %, lag

(McVey et al., 2001). Größere und nur selten (Wulff et al., 2008) vorkommende Deletionen wurden nicht gefunden, da in unserem Kollektiv hierzu keine Analyse durchgeführt wurde (siehe 2.4.1.5).

Das Kollektiv verteilte sich auf insgesamt zehn verschiedene **Mutation-Haplotyp-Kombinationen** (siehe Abb. 19). Der heterozygote DC-HT ohne Mutation (d) stellte erwartungsgemäß mit 29,0 % den häufigsten Genotyp dar, da er in der Normalbevölkerung bereits bei 22 % anzutreffen ist. Der homozygote DC-HT ohne Mutation (e) war mit 22,6 % auffallend stark vertreten und erklärt sich durch den überwiegenden Anteil leichter FVII-Mängel im Kollektiv. Bei 11,8 % ließ sich weder eine Mutation noch ein Polymorphismus nachweisen (a). Wie schon aus der Analyse der Haplotypen und Mutationen hervorging, war hierfür mit 64 % hauptsächlich die schwangere Kollektivgruppe verantwortlich. Lediglich bei drei Probanden wurde eine compound-heterozygote Mutation (j) festgestellt, von denen zwei die Spleißstellen-Mutation [ISV7+7A>C] auf einem Allel aufwiesen. Sie wurde auch in der Greifswalder Datenbank gehäuft als compound-heterozygote Mutation festgestellt. Die FVII-Aktivität bzw. die Blutungssymptome stellten sich aber je nach Mutation des anderen Allels unterschiedlich dar. Herrmann et al. schlussfolgerten hieraus, dass die Mutation [ISV7+7A>C] nur einen milden Einfluss auf die FVII-Aktivität haben kann (Herrmann et al., 2009). Die dritte compound-heterozygote Mutation in unserem Kollektiv wies auf einem Allel die Missense-Mutation [A294V] auf, für deren Deletions-Variante [A294V+404delC] in der Greifswalder Datenbank stärkere Blutungssymptome oder FVII-Mängel unter 1 % bei homozygoten Mutationsträgern beschrieben wurden und die somit zu den Mutationen mit starkem Einfluss auf die FVII-Aktivität zählen (Herrmann et al., 2009).

Das Wissen gerade um die häufigen Mutationen wird m. E. zukünftig von besonderer Bedeutung sein. Durch sie ließe sich der Einfluss anderer Mutationen auf den klinischen bzw. laborchemischen Phänotyp besser abschätzen, wenn sie zusammen als compound-heterozygote Mutation vorliegen. So schafft die Mutation [A294V+404delC] durch den vollständigen Funktionsverlust des sich ergebenden Proteins optimale Bedingungen, um den Einfluss der zweiten Mutation auf die FVII-Aktivität aufzuzeigen. Bei heterozygoten Mutationen (f–i) ist der Einfluss auf die FVII-Aktivität durch das unveränderte Allel überlagert und erklärt auch den uneinheitlichen klinischen Phänotyp.

Daher scheint es wichtig zu sein, moderne Datenbanken aufzubauen. In der Literatur sind bisher zahlreiche Einzelfallbeschreibungen zum Phänotyp beim hereditären FVII-Mangel veröffentlicht worden. Zusammen mit größeren Studien, die sich auf Mutationen (Herrmann et al., 2009) oder Haplotypen (Wulff et al., 2008) beziehen, wurden sie in multizentrischen Datenbanken zusammengeführt. In die „FVII Mutation Database“ (McVey et al., 2001, z. Zt. kein Online-Zugriff möglich), in der online einsehbaren PDF-Datei der ISTH (Zivelin und Seligsohn, 2011) oder in den veröffentlichten Tabellen der Greifswalder Datenbank (Herrmann et al., 2009) erfolgt zwar die Eingabe sowohl der Mutationen als auch teilweise der Haplotypen bzw. Phänotypen, die eigentliche Datenpflege liegt aber zum Teil nur in Textform vor oder sie ist wie die „RBD-Database“ (Peyvandi et al., 2011) nur registrierten Studienteilnehmern online zugänglich. Es sollte diskutiert werden, die Informationen in diesen multizentrisch angelegten Datenbanken durch eine einheitlich kodierte Datei zu ergänzen. Wie in unserer Arbeit geschehen, ließen sich dadurch variable **Gruppierungen** (siehe Tab. 8) des Geno- bzw. Phänotyps erstellen und eine statistische Auswertung bzw. der Vergleich mit zukünftigen Studien wäre direkt möglich.

#### 4.5 Genotypkorrelation

Die einzelnen **Indikationen** (siehe Abb. 21) und **anamnestischen Blutungssymptome** (siehe Abb. 22) wiesen zu den Genotyp-Gruppen keine eigenständigen Korrelationen auf. Bei Betrachtung ihrer Häufigkeiten zeichnete sich aber ein signifikanter Anstieg der Indikationen mit Zunahme der genetischen Veränderung ab, während bei den anamnestischen Blutungssymptomen kein Anstieg auftrat.

In der Literatur konnten keine Angaben zur Indikationsstellung der überweisenden Ärzte gefunden werden. In unserer Arbeit scheint aber die Anamnese einen wichtigen Hinweis auf eine molekulargenetische Veränderung beim leichten FVII-Mangel zu erbringen. Nicht die Blutungssymptome allein, sondern die Kombination insbesondere mit einer INR-Erhöhung (Indikationen) deuten im Vorfeld auf einen hereditären FVII-Mangel hin (Fragestellung 2; siehe 1.1.2).

In den Genotyp-Gruppen lag die durchschnittliche **FVII-Aktivität** (siehe Abb. 23) beim Wildtyp (Gruppe A) mit 67 % noch im Normbereich und beim heterozygoten DC-HT (Gruppe B) mit 58 % bereits unterhalb davon. Als ursächlich ist hierfür in erster Linie das

vorselektierte Kollektiv (Blutungssymptome und INR-Erhöhung) anzusehen und ein Zusammenhang mit Umwelteinflüssen, unbekanntem Erbfaktoren (Mariani und Bernardi, 2009; Mariani et al., 2005), aber auch mit den hämorrhagischen Nebendiagnosen liegt nahe (Fragestellung 2; siehe 1.1.2).

Aufgrund der niedrigen FVII-Aktivität der Gruppe A konnte die gemäß Wulff et al. zu erwartende Reduktion um 25 % je DC-HT Allel in unserer Arbeit nicht aufgezeigt werden, da sich die Greifswalder Datenbank an der Normalbevölkerung orientierte. In diesem vor-selektierten Kollektiv lag sie daher beim heterozygoten DC-HT (Gruppe B) nur bei 16 % und beim homozygoten DC-HT (Gruppe C) nur bei 40 %.

Veränderungen auf beiden Allelen (Gruppe C und E) zeigten signifikant eine verminderte FVII-Aktivität im Vergleich zu den entsprechenden Veränderungen, wenn sie nur auf einem Allel (Gruppe B und D) vorkamen. Der Mittelwert der FVII-Aktivität lag bei den Gruppen C (48 %) und D (47 %) leicht unterhalb des Normwertes und zeigte erwartungsgemäß auch in unserer Arbeit keinen signifikanten Unterschied zwischen den homozygoten DC-HT (Gruppe C) und den heterozygoten Mutation-Haplotyp-Kombinationen (Gruppe D) (Wulff et al., 2008; siehe Tab. 4; siehe 1.5.1).

Die Gruppe E wurde aus homozygoten Mutation-Haplotyp-Kombinationen und compound-heterozygoten Mutationen gebildet und kann daher nicht direkt mit Erfahrungswerten von Herrmann et al. aus der Greifswalder Datenbank verglichen werden. Dennoch zeigte sich der Mittelwert von 27 % im Erwartungsbereich (Herrmann et al., 2009; siehe Tab. 4).

Eine FVII-Aktivität im Norm- oder Grenzbereich macht das Vorliegen einer Mutation also eher unwahrscheinlich. Bereits bei einer Aktivität von unter 50 % wurde aber eine Mutation in 66 % (Gruppe D und E) und ein homozygoter DC-HT (Gruppe C) in 26 % der Fälle vorgefunden (Fragestellung 2; siehe 1.1.2).

Die niedrigste FVII-Aktivität von 7 % zeigte sich erwartungsgemäß bei einer der compound-heterozygoten Mutationen [A294V]+[c.220ins1G; Glu14fsx]. Hauptverantwortlich für die niedrige Aktivität war vermutlich die zu einem Frameshift führende Insertion, aus der ein Translationsabbruch des Proteins resultierte. Die Missense-Mutation [A294V] scheint noch die gemessene Restaktivität zu ermöglichen und zeigte auch in unserem Kollektiv, dass schwere FVII-Mängel (< 2 %) nur in wenigen Fällen durch Missense-Mutationen ausgelöst werden (McVey et al., 2001). In der Greifswalder Datenbank

konnte an einer homozygoten Konstellation der Mutation [A294V] eine FVII-Aktivität noch von 3,4 % festgestellt werden (Herrmann et al., 2000). Sie lag damit über 2 % und wurde nur durch eine Menorrhagie symptomatisch. Hierdurch ließ sie sich als Mutation mit moderatem Einfluss auf die FVII-Aktivität identifizieren und bei einer compound-heterozygoten Konstellation können so auch hier Rückschlüsse auf andere Mutationen gezogen werden. Die zwei übrigen compound-heterozygoten Mutationen [ISV7+7A>C]+[R152Q] und [ISV7+7A>C]+[G331S] wiesen die gleiche FVII-Aktivität (22 %) und Spleißstellen-Mutation auf, die nach Herrmann et al. eher als milde Mutation gilt (siehe 4.4). Die Missense-Mutation [R152Q], die an der Peptidbindungsstelle 152 maßgeblich an der Aktivierung des FVII beteiligt ist, stellt eine der seltenen Missense-Mutationen dar, für die eine deutliche Minderung der FVII-Aktivität beschrieben wurde (McVey et al., 2001). Die Mutation [G331S] wird zwar in der Greifswalder Datenbank aufgeführt, eine Phänotypbeschreibung liegt aber nicht vor. Für die eng benachbarte Mutation [F328S] wurde aufgrund ihrer Lage in der katalytischen Triade (His193, Asp242 und Ser344; siehe 1.3) von McVey et al. ein starker Einfluss auf die FVII-Aktivität beschrieben, der auf die sich ergebende Unfähigkeit zurückgeführt wurde, den FX zu aktivieren. Da bei beiden compound-heterozygoten Mutationen die gleiche FVII-Aktivität gemessen wurde, scheint im Vergleich zur Mutation [R152Q] auch die Mutation [G331S] einen starken Einfluss auf die FVII-Aktivität zu haben, vermutlich ebenfalls durch Beeinflussung der katalytischen Triade.

In der Literatur konnten keine Angaben zu der Mutation-Haplotyp-Kombination der Gruppe c und i gefunden werden (siehe Tab. 4): Die Kombination aus DC-HT und IC-HT (Gruppe c) wurde im Kollektiv einmal gefunden und wies eine FVII-Aktivität von 65 % auf. In diesem Einzelfall scheint ein ausgleichender Effekt zu bestehen, wenn auch der reduzierende Einfluss etwas stärker ist. Die Kombination aus heterozygoter Mutation und homozygotem DC-HT (Gruppe i) wurde im Kollektiv dreimal gefunden und wies eine durchschnittliche FVII-Aktivität von 32 % auf. Die Aktivität lag hier also im Größenbereich einer Mutation-Haplotyp-Kombination auf unterschiedlichen Allelen und unterstreicht den von Wulff et al. festgestellten Effekt, dass der DC-HT auf dem mutierten Allel in den Hintergrund tritt (Wulff et al., 2008).

Die **INR** (siehe Abb. 24) verhielt sich konträr zu den FVII-Aktivitäten, allerdings differenziert sie den Genotyp schlechter als die FVII-Aktivität. Dies ist möglicherweise be-

dingt durch die Vielzahl der Reagenzien, die eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber der FVII-Aktivität haben. Dennoch dürfte bereits der homozygote DC-HT (Gruppe C) bei einer Routineuntersuchung der PTZ (durchschnittliche INR 1,4) auffällig werden und ihr kommt somit eine wichtige Bedeutung als Screening-Test für den FVII-Mangel vor einer molekulargenetischen Diagnostik zu (Fragestellung 2; siehe 1.1.2).

Weder die einzelnen noch die Anzahl der **hämorrhagischen Nebendiagnosen** (siehe Abb. 25a) wiesen in den Genotyp-Gruppen eine Häufigkeitskorrelation auf. Insbesondere der seltene FX-Mangel trat nur in drei von insgesamt acht Fällen im Zusammenhang mit einer Mutation auf, die im Bereich der Promoter oder Pre-Pro-Sequenz gefunden wurden. Sie stellen somit keine größeren Gendefekte dar, wie sie beim sehr seltenen kombinierten FVII- und FX-Mangel vorkommen. Auch wenn das Kollektiv nicht auf größere Deletionen untersucht wurde (siehe 2.4.1.5), dürften hier eher unabhängige Defekte oder andere Einflussfaktoren vorliegen (Girolami et al., 2008).

Eine Korrelation zwischen dem **qualitativen Blutungstyp** (siehe Abb. 26a–b) und Genotyp konnte beim leichten FVII-Mangel nicht aufgezeigt werden. Der Anteil der asymptomatischen und milden Blutungstypen blieb über alle Gruppen einschließlich des Wildtyps eher konstant. Damit bestätigen die Ergebnisse unserer Arbeit die der „FVII Mutation Database“, in der heterozygote Mutationen oder der DC-HT selbst in der Kombination (siehe 2.2) eher selten einen schweren Blutungstyp verursachen (McVey et al., 2001).

Der schwere Blutungstyp kann aufgrund der niedrigen Probandenzahl (n=2) nicht beurteilt werden. Trotzdem zeigte sich bei der Einzelfallanalyse, dass beide Probanden zusätzlich einen FX-Mangel aufwiesen und sich nur bei einem Probanden eine FVII-Mutation zeigte. Der Einfluss hämorrhagischer Nebendiagnosen auf den Blutungstyp sollte daher beim leichten FVII-Mangel unbedingt Berücksichtigung finden und unterstreicht den Stellenwert einer Differentialdiagnostik (siehe 4.2; siehe Abb. 25a–b).

Bei der isolierten Betrachtung der Mutation-Haplotyp-Kombinationen (Gruppen D–E) waren 44 % der Probanden asymptomatisch, 53 % wiesen den milden und nur 3 % den schweren Blutungstyp auf. Im Vergleich zur „FVII Mutation Database“ (McVey et al., 2001), die mit 16 % milde und mit 17 % schwere Blutungen aufweist, zeigten sich hier deutliche Unterschiede. Der geringere Anteil schwerer Blutungen resultiert daraus, dass in unserem Kollektiv homozygote bzw. compound-heterozygote Mutationen (n=3) nur

vereinzelt nachgewiesen wurden, bei denen zudem auf einem Allel eine Mutation vorlag, für die kein starker Einfluss auf die FVII-Aktivität bekannt ist (siehe 4.4). Der höhere Anteil der milden Blutungen resultiert eher aus der Selektion des Kollektivs hinsichtlich der weiblichen Blutungssymptome und damit weniger aus dem Anteil der Mutationen, während in der „FVII Mutation Database“ hierfür eher compound-heterozygote Missense-Mutationen verantwortlich gemacht werden.

Auch eine Korrelation zwischen dem **quantitativen Blutungsscore** (siehe Abb. 27a–b) und Genotyp ließ sich nicht aufzeigen, da eine Zunahme des Blutungsscores mit zunehmendem Genotyp beim leichten FVII-Mangel nicht festgestellt werden konnte.

Wie bereits durch Wulff et al. in der Greifswalder Datenbank aufgezeigt werden konnte, liefert die molekulargenetische Analytik mit dem Genotyp, einschließlich der Kombinationen aus heterozygoten Mutationen und Haplotypen, aufgrund der guten Korrelation zum FVII-Mangel ein geeignetes Erklärungsmodell für die gemessene Aktivitätsminderung (Wulff et al., 2008). Eine klinische Relevanz mit der Möglichkeit zur Einschätzung des Blutungsrisikos ließ sich aber für den leichten FVII-Mangel in unserer Arbeit und in der „FVII Mutation Database“ nicht erkennen. Trotzdem bestätigt der im Vergleich zur Normalbevölkerung hohe Anteil von Haplotypen und Mutationen die Vorselektion des Kollektivs durch den klinischen und laborchemischen Phänotyp und begründet damit auch die Indikationsstellung zur genetischen Untersuchung (Fragestellung 1; siehe 1.1.1).

Prognostisch kann festgehalten werden (Fragestellung 2; siehe 1.1.2):

- Der Genotyp wird abgesehen von einer Mutation-Haplotyp-Kombination auf beiden Allelen klinisch oft toleriert und schwere Blutungen sind nicht zu erwarten, wenn auf einem Allel eine Mutation vorliegt, für die kein starker Einfluss auf die FVII-Aktivität bekannt ist. Dies trifft u. a. auf die meisten Missense-Mutationen zu (McVey et al., 2001).
- Eine klinische Differenzierung beim leichten FVII-Mangel ist durch den Genotyp allein nicht eindeutig möglich. Daten aus der Anamneseerhebung, aber auch die Diagnostik im Hinblick auf weitere Nebendiagnosen sind hier weiterführend.
- Für das Auftreten schwerer Blutungen sind fast ausschließlich homozygote oder compound-heterozygote Kombinationen größerer Gendefekte verantwortlich (Deletionen, Promotor-, Spleißstellen- und Stopp-Mutationen), die einen starken Einfluss auf die FVII-Aktivität (< 2 %) haben (McVey et al., 2001).

In der Gruppe A kamen 22 % aller **Aborte** (siehe Abb. 28a–b) und 33 % aller habituellen Aborte vor; sie wurden damit nicht durch einen hereditären FVII-Mangel verursacht. In der Gruppe B, deren (leichte) genetische Variation in der Normalbevölkerung mit einer Häufigkeit von 22 % anzutreffen ist, kamen mit 34 % aller Aborte und mit 46 % aller habituellen Aborte die meisten Fehlgeburten vor. In der Gruppe C traten 25 % aller Aborte und 21 % aller habituellen Aborte auf. Auffallend war, dass der Abort nur in dieser Gruppe mit 57 % im Vergleich zum Gesamtkollektiv überdurchschnittlich häufig vorkam, und da der homozygote DC-HT auch nur in 1,2 % der Normalbevölkerung auftritt (siehe Tab. 3), ist hier ein Zusammenhang zwischen Abort und homozygotem DC-HT nicht auszuschließen. Aborte kamen bei den Mutation-Haplotyp-Kombinationen deutlich seltener vor. In der Einzelfallanalyse zeigte sich zudem, dass bei zwei von insgesamt vier Probandinnen in der Gruppe E eine hämorrhagische Nebendiagnose bzw. ein Antiphospholipid-Syndrom vorlag.

Die Häufigkeit der Aborte nahm somit in unserem Kollektiv mit zunehmendem Schweregrad des Genotyps ab. Betont werden sollte, dass die Fallzahl der Probanden mit Abort insbesondere bei den Mutation-HT-Kombinationen sehr klein ausfiel und eine statistische Analyse daher nicht möglich war.

Ein Vergleich zu Literaturangaben lässt sich kaum durchführen, da nur wenige Einzelfallberichte über Schwangerschaftskomplikationen beim hereditären FVII-Mangel existieren. Sie wurden von Kulkarni et al. retrospektiv analysiert (n=11) und es wurde festgehalten, dass Probandinnen mit schwerem FVII-Mangel keinen Anstieg des FVII-Antigens bis zum letzten Trimenon aufwiesen, aber unter Replacement-Therapie peripartale Blutungen abgewendet werden konnten (Kulkarni et al., 2006). Dieses Ergebnis wurde von Kulkarni et al. auch in einer eigenen Studie (n=14) beobachtet und nur bei Probandinnen mit leichtem FVII-Mangel kam es zu einem Anstieg des FVII-Antigens. Leider wurde der Genotyp nicht mit aufgeführt; hier dürften aber eher heterozygote Mutationen vorgelegen haben, da Rott et al. hier noch eine Verdoppelung der FVII-Aktivität bis zum Ende der Schwangerschaft nachweisen konnten, nicht aber bei homozygoten oder compound-heterozygoten Konstellationen (Rott et al., 2007, siehe 1.5.2). In der Studie von Kulkarni et al. wurde bei zwei Probandinnen in der Frühschwangerschaft bei Blutungskomplikationen ein Schwangerschaftsabbruch durchgeführt. Eine Probandin wies einen schweren FVII-Mangel auf, während bei der zweiten

Probandin ein leichter FVII-Mangel vorlag, wie er in unserer Arbeit z. B. auch beim homozygoten DC-HT oder bei der Mutation-Haplotyp-Kombination vorkommen könnte, und Kulkarni et al. vermuteten hierfür einen insuffizienten Anstieg der FVII-Aktivität in der Frühschwangerschaft.

#### 4.6 Klinischer und laborchemischer Phänotyp

Der von McVey et al. beschriebene „lack of sensitivity in the assay“ (siehe 2.2; McVey et al., 2001) ließ sich auch in unserem Kollektiv beim leichten FVII-Mangel erkennen, da vom asymptomatischen bis zum schweren **Blutungstyp** (siehe Abb. 29a) eher eine Stagnation der FVII-Aktivität festgestellt wurde. Der klinische Phänotyp korreliert somit auch in unserer Arbeit wie in der „FVII Mutation Database“ nicht mit dem laborchemischen Phänotyp, vorausgesetzt die FVII-Aktivität liegt nicht unter 2 %, da hier je nach Genotyp schwere bis lebensbedrohliche Blutungen festgestellt wurden.

Der Sensitivitätsverlust ließ sich auch durch den **Blutungsscore** (siehe Abb. 29b) nicht verbessern (Fragestellung 1; siehe 1.1.1), da über die Gesamtbreite des Scorebereichs eher konstante FVII-Aktivitäten gemessen wurden und sich somit ein ähnliches Bild wie beim Blutungstyp darstellte. Ob ein Blutungsindex (Index=Score/Symptome) zu einer Verbesserung der Sensitivität führt, bleibt fraglich (siehe 4.3), da die Ursache der fehlenden Sensitivität nicht nur in der Einschätzung der Klinik, sondern auch bei der FVII-Aktivität selbst liegt, die gerade beim leichten FVII-Mangel als Laborparameter nicht ausreichend geeignet ist, die klinische Relevanz vollständig beschreiben zu können. In unserer Arbeit zeigte sich, dass beim leichten FVII-Mangel die FVII-Aktivität daher erst mit dem Genotyp und der Anamnese die Möglichkeit liefert, das Blutungsrisiko eines milden FVII-Mangels näher einschätzen zu können (Fragestellung 2; siehe 1.1.2).

Eine Korrelation zwischen FVII-Aktivität und **Abort** (siehe Abb. 29c) ließ sich in unserer Arbeit ebenfalls nicht erkennen, wird aber durch die schwangeren Probandinnen verzerrt, die hier einen Anteil von 53 % hatten. Im Kollektiv näherten sie sich der Normalbevölkerung an, da sie die höchste FVII-Aktivität (siehe 3.2.1) und gleichzeitig die geringste genetische Veränderung aufwiesen (siehe Abb. 19). Eine Analyse zwischen durchschnittlicher FVII-Aktivität und Abort erscheint hier daher nicht aussagekräftig zu sein.

#### 4.7 FVII und Schwangerschaft

Die höhere durchschnittliche FVII-Aktivität bei Schwangeren (siehe Abb. 8) ließ sich in im Vergleich zu den anderen Kollektivgruppen hauptsächlich durch den geringer veränderten Genotyp erklären. Fast 1/3 aller Schwangeren hatte keine genetische Veränderung und 2/3 waren im Bereich des DC-HT (heterozygot 40 %; homozygot 24 %) zu finden. Nur zwei Probandinnen (8 %) wiesen eine Mutation auf (siehe Abb. 19). Hierfür waren die Einschlusskriterien verantwortlich, da bei Schwangeren mit einer FVII-Aktivität auch im unteren Normbereich eine molekulargenetische Analyse durchgeführt wurde. Im Zentrum der Überlegung stand dabei, dass bei einer schwangerschaftsbedingten Hyperkoagulabilität sogar bei heterozygoten Mutationen (siehe 1.5.2) im letzten Trimenon noch normale FVII-Aktivitäten vorliegen können. Dabei wird aber im 1. Trimenon zunächst ein zögerlicher Aktivitätsanstieg beobachtet (Kulkarni et al., 2006; Rott et al., 2007).

Die Mehrheit der Schwangeren (88 %) wurde zur Abortabklärung im 1. Trimenon überwiesen (siehe Abb. 30b). Obwohl zu diesem Zeitpunkt die oben erwähnte Hyperkoagulabilität noch nicht im vollen Umfang vorliegen konnte, zeigte sich in unserem Kollektiv beim Wildtyp (Gruppe A) und heterozygoten DC-HT (Gruppe B,  $p=0,006$ ) und im Einzelfall bei der heterozygoten Mutation-Haplotyp-Kombination (Gruppe D) bereits eine Zunahme der FVII-Aktivität gegenüber den weiblichen Probanden (siehe Abb. 30a). Eine Zunahme der Aktivität konnte dagegen beim homozygoten DC-HT (Gruppe C) und im Einzelfall bei der homozygoten Mutation-Haplotyp-Kombination (Gruppe E) nicht festgestellt werden. Der in der Literatur bei der homozygoten oder compound-heterozygoten Mutation beschriebene fehlende Aktivitätsanstieg (siehe 1.5.2; Kulkarni et al., 2006) ließ sich hier also auch beim homozygoten DC-Haplotyp ablesen.

In unserer Arbeit stellt sich somit die Frage, ob der Anstieg der FVII-Aktivität während der (frühen) Schwangerschaft nicht nur von der genetischen Veränderung selbst (Mutation oder Haplotyp), sondern auch von der Anzahl der Allele (heterozygot oder homozygot) abhängt (Fragestellung 4; siehe 1.1.4).

Bei den beobachteten Komplikationen in der Frühschwangerschaft, die in der Literatur mit heterozygoten Mutationen in Zusammenhang gebracht wurden (Kulkarni et al., 2006; Rott et al., 2007), finden die Polymorphismen bisher keine Erwähnung. Der Bezug auf eine Mutation-Haplotyp-Kombination könnte möglicherweise neue Erkenntnisse liefern.

## 5 Zusammenfassung

An 93 FVII-Mangel-Patienten wurde retrospektiv der klinische und laborchemische Phänotyp auf Korrelationen mit dem Genotyp untersucht. Aufgrund der weiblichen Blutungssymptome waren Frauen mehrheitlich vertreten und verantwortlich für eine Vorselektion des Kollektivs. Männer fielen eher durch eine INR-Erhöhung bei präoperativen Routineuntersuchungen auf. Schwangere Probandinnen bildeten eine weitere Kollektivgruppe, da sie klinisch meistens asymptomatisch waren, die höchste FVII-Aktivität aufwiesen und sich fast ausschließlich zur Abortabklärung vorstellten.

- Fragestellung 1 (siehe 1.1.1): Die etablierte qualitative Einteilung des Blutungstyps nach Mariani in asymptomatisch, mild und schwer (klinischer Phänotyp) ließ keine Korrelation mit der FVII-Aktivität (laborchemischer Phänotyp) erkennen. Der hier erstmalig verwendete quantitative Blutungsscore nach Rodeghiero et al. (2010) wies ebenfalls keine Korrelation mit der FVII-Aktivität auf. Damit zeigt sich bei einem leichten FVII-Mangel zwar ein erhöhter Blutungsscore, der aber innerhalb der Spannbreite der FVII-Aktivitäten in den Kohorten dieser Studie keine zusätzliche Differenzierung hinsichtlich des Blutungsrisikos erlaubte.
- Fragestellung 2 (siehe 1.1.2): Die analysierten Mutationen und Haplotypen (Genotyp) wurden mit zunehmender genetischer Veränderung in fünf Gruppen zusammengefasst, die eine hohe Korrelation mit dem Abfall der FVII-Aktivität aufwiesen. Wie bei der FVII-Aktivität zeigte sich auch hier keine Korrelation mit dem Blutungstyp oder dem Blutungsscore. Schwere homozygote oder compound-heterozygote Mutationen (große Deletionen, Promoter-, Spleißstellen- und Stopp-Mutationen auf beiden Allelen), die zu einem seltenen, fast vollständigen Funktionsverlust des Proteins führen (FVII:C < 2 %) und einen entsprechend schweren Blutungsphänotyp aufweisen, wurden in unserem Kollektiv nicht gefunden. Der im Vergleich zur Normalbevölkerung gefundene hohe Anteil von Haplotypen, welche die FVII-Aktivität reduzieren, oder kausaler Mutationen bestätigt die Vorselektion des Kollektivs durch den Phänotyp und auch die Indikationsstellung zur molekulargenetischen Untersuchung. Heterozygote Mutationen oder homozygote Haplotypen treten gehäuft bei einer FVII-Aktivität von unter 50 % auf. Sie sind wahrscheinlicher, wenn im Vorfeld neben Blutungssymptomen auch eine INR-Erhöhung (> 1,4) zur Untersuchung führte,

was die Bedeutung der Anamneseerhebung unterstreicht. Hämorrhagische Nebendiagnosen verteilten sich gleichmäßig über alle Genotypen, wiesen aber mit ansteigendem Blutungstyp eine zunehmende Häufigkeit auf und heben die Relevanz der Differentialdiagnostik beim leichten FVII-Mangel hervor.

- Fragestellung 3 (siehe 1.1.3): Die überwiegende Mehrheit der Probandinnen mit Abortneigung und habituellem Abort fand sich beim Wildtyp bzw. heterozygoten (die FVII-Aktivität-reduzierenden) Haplotyp, also bei den leicht verminderten bzw. im unteren Normbereich liegenden FVII-Aktivitäten. Auch beim homozygoten Haplotyp kam der Abort überdurchschnittlich häufig vor, eine Korrelation zwischen Abort und Genotyp bzw. FVII-Aktivität konnte aber nicht aufgezeigt werden. Damit relativiert sich die Bedeutung des leichten FVII-Mangels für die Abortneigung.
- Fragestellung 4 (siehe 1.1.4): Die relativ hohe FVII-Aktivität der schwangeren Probandinnen konnte primär auf den hohen Wildtyp-Anteil bzw. heterozygoten (die FVII-Aktivität-reduzierenden) Haplotyp zurückgeführt werden. Die Erklärung hierfür war, dass aufgrund einer schwangerschaftsbedingten Hyperkoagulabilität auch molekular-genetische Analysen bei FVII-Aktivitäten im unteren Normbereich durchgeführt wurden. In der Literatur wurde bei heterozygoten Mutationen ein gedämpfter Anstieg der FVII-Aktivität beschrieben, der bei Mutationen auf beiden Allelen ausblieb. In unserer Arbeit zeigte sich für den Wildtyp, den heterozygoten (die FVII-Aktivität-reduzierenden) Haplotyp und für die heterozygoten Mutationen im Vergleich mit nicht schwangeren Probandinnen ein Anstieg der FVII-Aktivität während für den (die FVII-Aktivität-reduzierenden) Haplotyp auf beiden Allelen ein Anstieg ausblieb.

## 6 Literaturverzeichnis

Ahamed J, Ruf W. Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 2004; 279: 23038–23044

Banner DW, D'Arcy A, Chène C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchhofer D. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* 1996; 380: 41–46

Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, Carmeliet P, Mueller BM, Friedlander M, Ruf W. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med* 2004; 10: 502–509

Bernardi F, Castaman G, Redaelli R. Topologically equivalent mutations causing dysfunctional coagulation factors VII (Ala294Val) and X (Ser334Pro). *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1175–1177

Bernardi F, Marchetti G, Pinotti M, Arcieri P, Baroncini C, Papacchini M, Zeponi E, Ursicino N, Chiarotti F, Mariani G. Factor VII gene polymorphisms contribute about one third of the factor VII level variation in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 72–76

Bruhn HD, Schambeck CM, Hach-Wunderle V. *Hämostaseologie für die Praxis*. Stuttgart: Schattauer Verlag, 2007

Budde U, Drewke E, Will K, Schneppenheim R. Diagnostic standards of von Willebrand disease. *Hämostaseologie* 2004; 24: 12–26

Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964; 145: 1319–1312

Emmerling D, Pressemitteilung Statistisches Bundesamt Deutschland, Nr. 511 18.12.2007: Frauen werden heute im Durchschnitt mit 26 Jahren Mutter. <http://www.destatis.de> (Zugriffsdatum 04.01.2012)

Geisen C, Molekulargenetische Untersuchungen zu Mutationen und Polymorphismen im FVII-Gen bei Familien mit hereditärem FVII-Mangel und in der Normalbevölkerung. Med. Dissertationsschrift, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie 2005

Giansily-Blaizot M, Aguilar-Martinez P, Biron-Andreani C, Jeanjean P, Inguál H, Schved JF. Analysis of genotypes and phenotypes of 37 unrelated patients with inherited factor VII deficiency. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 105–112

Giansily-Blaizot. Inherited factor VII deficiency. *Orphanet Encyclopedia* 2004; 6: 1–5

Girolami A, Ruzzon E, Tezza F, Scandellari R, Scapin M, Scarparo P. Congenital FX deficiency combined with other clotting defects or with other abnormalities: a critical evaluation of the literature. *Haemophilia*. 2008; 14: 323–328

Green F, Kelleher C, Wilkes H, Temple A, Meade T, Humphries S. A common genetic polymorphism associated with lower coagulation factor VII levels in healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991; 11: 540–546

Greenberg D, Miao CH, Ho WT, Chung DW, Davie EW. Liver-specific expression of the human factor VII gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry* 1995; 92: 12347–12351

Hagen FS, Gray CL, O'Hara PJ, Grant FJ, Saari GC, Woodbury RG, Hart CE, Insley M, Kisiel W, Kurachi K, et al. Characterization of a cDNA coding for human factor VII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 2412–2416

Hassan HJ, Leonardi A, Chelucci C, Mattia G, Macioce G, Guerriero R, Russo G, Mannucci PM, Peschle C. Blood coagulation factors in human embryonic fetal

development: Preferential expression of the FVII/tissue factor pathway. *Blood* 1990; 76: 1158–1164

Hellgren M. Hemostasis during normal pregnancy and puerperium. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 125–130

Herrmann FH, Wulff K, Auberger K, Aumann V, Bergmann F, Bergmann K, Bratanoff E, Franke D, Grundeis M, Kreuz W, Lenk H, Losonczy H, Maak B, Marx G, Mauz-Körholz C, Pollmann H, Serban M, Sutor A, Syrbe G, Vogel G, Weinstock N, Wenzel E, Wolf K. Molecular biology and clinical manifestation of hereditary factor VII deficiency. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 393-400

Herrmann FH, Wulff K, Auerswald G, Schulmann S, Astermark J, Batorova A, Kreuz W, Pollmann H, Ruiz-Saez A, De Bosch N, Salazar Sanchez L. For the Greifswald FVII deficiency study, factor VII deficiency: clinical manifestation of 717 subjects from Europe and Latin America with mutations in the factor7 gene. *Haemophilia* 2009; 15: 267–280

Hinney B. Habituelle Aborte. In: Beckmann MW, Jud S, Costa SD, Emons G, Stepan H, Kölbl H, Ludwig M, Ortman O, Wallwiener D, HRSG. *Frauenheilkunde up2date*. Thieme, 2011: 381–393

Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. Available online *Reviews* 2003; 17: 1–5

Hooft FM van't, Silveira A, Tornvall P, Iliadou A, Ehrenborg E, Eriksson P. Two common functional polymorphisms in the promoter region of the coagulation factor VII gene determining plasma factor VII activity and mass concentration. *Hamsten ABlood* 1999; 93: 3432–3441

Jones KC, Mann KG. A model for the tissue factor pathway to thrombin. II. An empirical study. *J Biol Chem* 1994; 269: 23367–23373

Kadir R, Chi C, Bolton-Maggs P. Pregnancy and rare bleeding disorders. *Haemophilia* 2009; 15: 990–1005

Kao FT, Hartz J, Horton R, Nemerson Y, Carson SD. Regional assignment of human tissue factor gene (F3) to chromosome 1p21-p22. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 1988; 14: 407–410

Kleihauer E, Kone E, Rasche H. *Die Hämostase: Physiologie-Pathologie-Klinik*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1978

Kudaravalli R, Tidd T, Pinotti M, Ratti A, Santacroce R, Margaglione M, Dallapiccola B, Bernardi F, Fortina P, Devoto M, Pollak ES. Polymorphic changes in the 5'-flanking region of factor VII have a combined effect on promoter strength. *Thromb Haemost*. 2002; 88: 763–767

Kulkarni AA, Lee CA, Kadir RA. Haemophilia Centre and Haemostasis Unit, Royal Free Hospital, London. Pregnancy in women with congenital factor VII deficiency. *Haemophilia* 2006; 12: 413–416

Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J Biol Chem* 1994; 269: 23357–23366

Mariani G, Lo Coco L, Bernardi F, Pinotti M. Molecular and clinical aspects of factor VII deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998; 9: 83–88

Mariani G, Herrmann FH, Dolce A, Batorova A, Etro D, Peyvandi F, Wulff K, Schved JF, Auerswald G, Ingerslev J, Bernardi F. Clinical phenotypes and factor VII genotype in congenital factor VII deficiency. *Thromb Haemost* 2005; 93: 481–487

Mariani G, Bernardi F. Factor VII deficiency. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35: 400–406

McVey JH, Boswell E, Mumford AD, Kemball-Cook G, Tuddenham EG. Factor VII deficiency and the FVII mutation database. <http://hadb.org.uk/WebPages/Main/links.htm>, (kein Zugang z. Zt. möglich, Zugriffsdatum 08.02.2013). *Hum Mutat* 2001; 17: 3–17

Miao CH, Leytus SP, Chung DW, Davie EW. Liver specific expression of the gene coding for human factor X, a blood coagulation factor. *J Biol Chem* 1992; 267: 7395–7401

Millar DS, Kemball-Cook G, McVey JH, Tuddenham EG, Mumford AD, Attock GB, Reverter JC, Lanir N, Parapia LA, Reynaud J, Meili E, von Felton A, Martinowitz U, Prangnell DR, Krawczak M, Cooper DN. Molecular analysis of the genotype-phenotype relationship in factor VII deficiency. *Hum Genet* 2000; 107: 327–342

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cel. *Nucleic Acids Research* 1988; 16: 1215

Morrissey JH. Tissue factor: An enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 2001; 86: 66–74

Morrissey JH. Plasma factor VIIa: Measurement and potential clinical significance. *Haemostasis* 1996; 1: 66–71

Mullighan CG, Rischbieth A, Duncan EM, Lloyd JV. Acquired isolated factor VII deficiency associated with severe bleeding and successful treatment with recombinant FVIIa (NovoSeven). *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2004; 15: 347–351

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51: 263–273

Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E. *Humangenetik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2003

Narang GS, Arora S, Pahwa JS. Combined Factor VII and X Deficiency. Online J Health Allied Scs. 2010; 9: 17

Nawroth F, Strehler E, Sterzik K, Ludwig M. Habituelle Aborte –Diagnostik und Therapie. Frauenarzt 2006; 47: 300-304

Novo Nordisk Pharma GmbH, Online Fachinformation zu NovoSeven® 2012. [www.novonordisk.de/prodocs/Fachinfo/NovoSeven.pdf](http://www.novonordisk.de/prodocs/Fachinfo/NovoSeven.pdf) (Zugriffsdatum 12.01.2013)

O'Hara PJ, Grant FJ, Haldemann BA, Cray CL, Insley MY, Hagen FS, Murray MJ. Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 5158–5162

Oldenburg J, Barthels M. Angeborene Koagulopathien am Beispiel der Hämophilie A und B, Hemmkörperhämophilie; Hämostaseologie 2008; 28: 353–347

Perry DJ, Haemophilia Centre and Haemostasis Unit, Royal Free and University College Medical School, London. Factor VII deficiency: Review. Br. J. Haematol. 2002; 118: 689–700

Peyvandi F, Palla R, Menegatti M, Molosio S, Universität Mailand, 2010: Rare Bleeding Disorders. <http://www.rbdd.org/image/books/German.pdf> (Zugriffsdatum 30.08.2011)

Peyvandi F, Bianchi-Bonomi A, Luigi Villa Foundation, IRCSS Maggiore Hospital, Mangiagalli and Regina Elena Foundation, University of Milan, Hemophilia and Thrombosis Centre, 2011: Rare bleeding disorders database. <http://www.rbdd.org> (Zugriffsdatum 30.08.2011)

Peyvandi F, Mannucci PM, Asti D, Abdoullahi M, Di Rocco N und Perry DJ (1997) Clinical manifestations in 28 Italian and Iranian patients with severe Factor VII deficiency. Haemophilia 1997; 3: 242–246

Pilger E, Schenk, Haralambus J, Sailer S. Klinische Studien bei familiären hereditärem Faktor-VII-Mangel. *Blut* 1981; 42: 297–306

Pinotti M, Toso R, Girelli D, Bindini D, Frraresi P, Papa ML, Corrocher R, Marchetti G, Bernardi F. Modulation of factor VII levels by intron 7 polymorphisms: population and in-vitro studies. *Blood* 2000; 95: 3423–3428

Pötzsch B, Madlener K. Gerinnungskonsil. Stuttgart New-York: Georg Thieme Verlag KG, 2002

Poggio M, Tripodi A, Mariani G, Mannucci PM. Factor VII clotting assay: Influence of different thromboplastins and factor VII-deficient plasmas. *Thromb Haemost* 1991; 65:160–164

Pollak ES, Hung HL, Godin W, Overton GC, High KA. Functional characterization of the human factor VII 5'-flanking region. *J Biol Chem* 1996; 271: 1738-1747

Preissner KT. Physiologie der Blutgerinnung und Fibrinolyse. *Hämostaseologie* 2008; 28: 259–271

Ramanarayanan J, Institute eMedicine, 2011: Factor VII. <http://emedicine.medscape.com/article/209585-overview> (Zugriffsdatum 03.09.2011)

Rodeghiero F, Castaman G, Tosetto A, Batlle J, Baudo F, Cappelletti A, Casana P, De Bosch N, Eikenboom JCJ, Federici AB, Lethagen S, Linari S, Srivastava A. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of von Willebrand disease type 1, an international multicenter study. *J Thromb Haemost*, 2005; 12: 2619–2626

Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Collier B, James P, Neunert C, Lillicrap D, ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2063–2065

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

Rott H, Kappert G, Halimeh S, Trobisch H, 2007: Normal values for factor VII activity in normal pregnancy and in pregnancy of women with congenital factor VII-deficiency. [http://www.gzrr.de/assets/files/Publikationen/Publikationen%202007/2007\\_07PostVISSNWgenfrott.pdf](http://www.gzrr.de/assets/files/Publikationen/Publikationen%202007/2007_07PostVISSNWgenfrott.pdf) (Zugriffsdatum 30.08.2011)

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase: *Science* 1988; 239: 487–491

Sambrook J, Russell DW. Detection of DNA in agarose gels; adapted protocol. In: *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor, 2001

Scharrer I. Women with von Willebrand disease. *Hämostaseologie* 2004; 24: 44–9

The International HapMap Consortium: The International HapMap Project. In: *Nature Publishing Group* 2003; 426: 789–796

Temple A, Luong LA, Cruickshank K, Humphries SE. The 10-base-pair insertion in the promoter of the factor VII gene is not associated with lower levels of factor VIIc in Afrocaribbeans. *Thromb Haemost.* 1997; 77: 213–214

Thomas L. Labor und Diagnose, Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. Marburg: Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg, 1988

Tuddenham EGD, Pemberton S, Cooper DN. Inherited factor VII deficiency: genetics and molecular pathology. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 74: 313–321

Voet D, Voet JG. Biochemie. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 1994

Wappler F. Die neuen Empfehlungen zur präoperativen anästhesiologischen Evaluierung – wie konkret anwenden? In: Deutsche Akademie f. Anästhesiologische Fortbildung HRSG. Refresher Course 38/2012, Aktuelles Wissen für Anästhesisten. Aktiv Druck & Verlag GmbH, 2012: 59–71

Warburton D, Fraser FC. Spontaneous abortion risk in man: Data from reproductive histories collected in a medical genetics unit. *Am J Hum* 1964; 16: 1–9

Weston BW, Monahan PE. Familial deficiency of vitamin K-dependent clotting factors. *Haemophilia* 2008; 14: 1209–1213

Wildgoose P, Jørgensen T, Komiyama Y, Nakagaki T, Pedersen A, Kisiel W. The role of phospholipids and the factor VII Gla-domain in the interaction of factor VII with tissue factor. *Thromb Haemost* 1992; 67: 679–685

Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature* 1985; 317: 726–729

Wulff K, Schuster G, Herrmann FH. Bedeutung und Einfluss von FVII-Polymorphismen bei der genomischen Diagnostik von erblich bedingtem FVII-Mangel. In: Herrmann FH, HRSG. *Haemophilia and rare bleeding disorders, molecular genetics, molecular pathology and clinical manifestation* 2008. Lengerich: Pabst Science, 2008: 51–74

Zaidi SM, Qureshi RN, Adil SH. Factor VII deficiency and pregnancy: a case report and review of literature. *J Pak Med Assoc.* 2010; 60: 136–138

Zivelin A, Seligsohn U, International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011: Genotypes of patients with factor VII deficiency. <http://www.isth.org/default/assets/File/mutationDatabase/FVII%20mutations-2011.pdf> (Zugriffsdatum 30.08.2011)

## **7 Danksagung**

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Johannes Oldenburg für die ausgezeichnete Betreuung und Übertragung dieser Dissertationsarbeit.

Ich danke Frau Dr. Hannelore Rott, Frau Dr. Susan Halimeh und Herrn Dr. Günther Kappert für die Anregungen und regelmäßige Unterstützung.

Herzlichen Dank auch an die Mitarbeiter des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn, Frau Dr. Anna Pavlova und Dr. Julia Driesen, für die gute Kooperation.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn, Frau Jennifer Nadal und Herrn Dr. Rolf Fimmers, für die geduldige und inspirierende Zusammenarbeit bei der statistischen Auswertung.