

Aus der Klinik für Anästhesiologie
Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapie und Hämostaseologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Prof. Dr. med. Reinhard Henschler

Laboranalytischer und klinischer Phänotyp des hereditären Protein S-Mangels in Korrelation zum Genotyp

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sebastian Dübgen
aus Augsburg

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Spannagl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernd Engelmann
Priv.-Doz. Dr. Martin Weisser

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2012

Meinen Eltern in großer Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	5
2. Hintergrund	6
2.1. Physiologische Bedeutung des Protein S	6
2.2. Bestimmungsmethoden für Protein S	6
2.3. Molekularbiologische Grundlage - PROS1-Genetik	8
2.4. Klinischer Phänotyp und Epidemiologie des hereditären Protein S-Mangels .	10
3. Material und Methoden	11
3.1. Patienten und Probenaufbereitung	11
3.2. Laboranalytische Testverfahren für die Protein S-Bestimmung	11
3.3. Molekulargenetische Untersuchung des PROS1-Gens	12
3.4. Statistische Auswertung	12
4. Ergebnisse	13
4.1. Klinischer Phänotyp des genetisch untersuchten Patientenkollektivs	13
4.2. Laboranalytischer Phänotyp des Protein S-Mangels	14
4.2.1. Grenzwertanalysen für die Messung von Aktivität und freiem Antigen bei Kenntnis des Genotyps	15
4.2.2. Vergleich von Aktivitätsmessung und freiem Antigen mittels ROC-Analyse .	18
4.2.3. Vergleichende Analyse des laboranalytischen Phänotyps des Protein S- Mangels bei Kenntnis des PROS1-Genotyps	19
4.2.4. Phänotyp des Protein S-Mangels unter Einnahme eines Vitamin K-Anta- gonisten	24
4.3. Genetischer Hintergrund des Protein S-Mangels	27
5. Diskussion	29
6. Zusammenfassung	33
7. Abkürzungsverzeichnis	35
8. Danksagung	36
9. Literaturverzeichnis	37

1. Einführung

Thrombophilie, die Neigung zu rezidivierenden, idiopathischen Thromboembolien, wird heute als multifaktorielle Erkrankung im Sinne einer Dysbalance eines komplex regulierten Systems verstanden. Bislang sind nur die Grundzüge dieser heterogenen Erkrankung erkannt und in vielen Fällen bleibt trotz klarer familiärer Anamnese die genetische Ätiologie ungeklärt. Pathophysiologisch liegt der Thrombophilie eine unverhältnismäßige Generierung von Thrombin und damit pathologische Fibrinbildung zu Grunde. Ursachen hierfür sind zum einen in einer gesteigerten Stimulation von Koagulationsprozessen durch Inflammation oder Verletzung, des Weiteren in begünstigenden Faktoren wie Stase des Blutflusses durch Immobilisation oder Verlust der antikoagulatorischen Wirkung des Gefäßendothels sowie in einem Versagen der inhibitorischen Mechanismen der Gerinnung zu suchen. Zu Letzterem gehört der Mangel an Protein S, welches indirekt als Kofaktor von aktiviertem Protein C und vermutlich weitere direkte Interaktionen mit der Thrombinbildung interferiert. Als Plasmabestandteil ist es leicht analytischen Methoden zugänglich und mit der für einige Gerinnungsfaktoren typischen Struktur gamma-carboxylierter Glutamatreste war es von seiner Entdeckung an mit Gerinnungsprozessen in Verbindung gebracht worden. Die Einschätzung der pathogenetischen Relevanz verminderter Protein S-Spiegel bleibt aber auch heute schwierig und die sichere Diagnose eines Protein S-Mangels ist oft nur unter Einbeziehen der genetischen Ebene durch molekularbiologische Verfahren möglich. Gründe hierfür liegen zum einen in der schwierigen laboranalytischen Bewertung der Kofaktorfunktion und zum anderen in der Tatsache, dass Protein S zu großen Teilen gebunden an ein Komplementprotein zirkuliert. Wichtiger erscheint aber noch, dass die phänotypische Ebene mit Messung von Aktivität und Antigen als Momentaufnahme eines mehr oder minder in Dysbalance befindlichen Systems nicht im Stande ist, die genetisch definierte Erkrankung zweifelsohne nachzuweisen. Unter anderem liefert die vorliegende Arbeit, welche den Protein S-Phänotyp eines genetisch definierten Kollektivs von 136 Patienten vorstellt, hierfür Belege. Ausgehend von dem Thrombosekollektiv einer auf die Abklärung von Gerinnungsstörungen spezialisierten universitären Ambulanz, wurden über einen Zeitraum von 5 Jahren Patienten mit erniedrigten Protein S-Spiegeln genetisch auf Sequenzvarianten oder Deletionen im Protein S-Gen untersucht und der Genotyp mit der phänotypischen Ebene korreliert.

Diese Arbeit eröffnet durch Hinzufügen aggregierter genetischer Daten einen neuen Blick auf die Protein S-Diagnostik im klinischen Alltag und liefert Hinweise in welcher Konstellation mit größerer Wahrscheinlichkeit von einem echten (genetisch definierten) Mangel ausgegangen werden kann.

2. Hintergrund

2.1. Physiologische Bedeutung des Protein S

Protein S (Gensymbol PROS1; GeneID 5627; MIM Nr. 176880) ist ähnlich anderer wichtiger Proteine des Gerinnungssystems ein γ -carboxyliertes Glykoprotein, welches 1979 erstmals von DiScipio und Davie¹ beschrieben wurde. Im Gegensatz zu den anderen Vitamin K-abhängigen Faktoren enthält Protein S, welches nach dem Ort seiner Entdeckung Seattle, Washington, benannt wurde, keine eigene Serinproteasenaktivität. Seine Bedeutung kommt ihm, wie weitere Studien zeigen konnten², durch seine Kofaktorfunktion für aktiviertes Protein C zu. Vielfach wurden auch die APC-unabhängigen antikoagulativen Eigenschaften von Protein S diskutiert³. Die Annahme, dass neben der Kofaktorfunktion auch eine direkte Interferenz mit den prokoagulatorischen Vorgängen eine Rolle spielen könnte, beruhte auf der Tatsache, dass auch in Abwesenheit von Protein C eine verminderte Bildung von Faktor Xa durch Protein S beobachtet werden konnte. Die Annahme, dass dies durch eine kompetitive Interferenz von Protein S mit der Bildung des Faktor VIIIa/IXa-Komplexes bedingt sein könnte⁴, wurde durch den Nachweis einer potenziellen Protein S-Bindungsstelle am Faktor VIII bestärkt⁵. Die Bedeutung dieser Beobachtungen für die antithrombotische Wirksamkeit von Protein S sind unklar. Dem Anschein nach spielt Protein S auch eine Rolle bei der Fibrinolyse, der Komplementregulation und weiteren Abwehrprozessen.^{6 7} Embryologische Beobachtungen bei PROS1-Knockout-Mäusen ließen eine Bedeutung für die Angiogenese⁸ vermuten.

Als die hauptsächlichen Produktionsorte des Protein S im Körper konnten Hepatozyten und Megakaryozyten gezeigt werden. Unter Normalbedingungen liegen mehr als 60% des Protein S gebunden an den Komplementfaktor C4b-Bindungsprotein vor⁹, so dass nur ungebundenes, freies Protein S für gerinnungsaktive Prozesse zur Verfügung steht. Der Komplex mit Protein C unter Anwesenheit von Phospholipiden und Calcium-Ionen inaktiviert irreversibel die Faktoren Va und VIIIa und interferiert daher sowohl mit dem Prothrombinase- als auch dem intrinsischen Tenasekomplex auf prokoagulatorischen Oberflächen. Die Inaktivierung von Protein S geschieht durch thrombinabhängige proteolytische Spaltung.

2.2. Laboranalytische Bestimmungsmethoden

Aufgrund der Tatsache, dass Protein S keine eigene enzymatische Aktivität besitzt, sondern als Kofaktor fungiert, gestaltet sich die Beurteilung des laboranalytischen Phänotyps entsprechend schwierig. Die Aktivitätsmessung bedient sich der Bestimmung der Protein S-vermittelten Verstärkung der antikoagulierenden Eigenschaften von aktiviertem Protein

C und ist damit immer eine indirekte Nachweismethode. Das Prinzip der Aktivitätsbestimmung beruht auf der Messung der Verlängerung der Gerinnungszeit in einem mit aktiviertem Protein C und Faktor Va angereicherten Ansatz, in den ein Mangelplasma vorgelegt wird, welches frei von Protein S ist und in den das (verdünnte) Testplasma des Patienten eingebracht wird. Der Vergleich mit einem Standardplasma liefert eine Ratio, welches als Prozentsatz der Norm angegeben wird.¹⁰

Neben der funktionellen Aktivitätsmessung zur Bestimmung des freien Antigens werden üblicherweise latexgebundene Immunoassays herangezogen, bei denen verschiedene Latexkomponenten zur Agglutination gebracht werden und aus der Trübungszunahme unter Annahme einer direkten Proportionalität auf die Protein S-Antigen Konzentration geschlossen wird. Durch Zugabe von latexgebundenem C4b-Bindungsprotein im Überschuss und Calcium-Ionen wird der Großteil des nicht durch endogenes C4b gebundenen Protein S auf der Latexoberfläche immobilisiert. In einem zweiten Schritt wird ein ebenfalls an Latexpartikel gebundener monoklonaler Antikörper gegen ein gut zugängliches Protein S-Epitop hinzugefügt, so dass es zur Vernetzung der Latexpartikel kommt.¹¹

Die Güte dieser Labormethoden hängt dabei nicht nur von chargenspezifischen Schwankungen ab, sondern kann im selben Labor auch durch tagesabhängige Einflüsse beeinträchtigt werden.¹²

Sehr viel häufiger als angeborene Mangelzustände an Protein S gibt es physiologische und pathologische Situationen, die zu verminderten Protein S-Spiegeln führen.¹³ Dies sind beispielsweise der Einfluss von Schwangerschaft oder Verwendung einer hormonellen Kontrazeption sowie chronische Inflammation mit Erhöhung des C4b-Bindungsproteins und damit erniedrigtem freien Protein S. Auch bei Lebererkrankungen wie Hepatitis und Zirrhose oder durch den Einfluss von Vitamin K-Antagonisten kommt es zu erniedrigten Werten in Antigenmessung und Aktivität.¹⁴

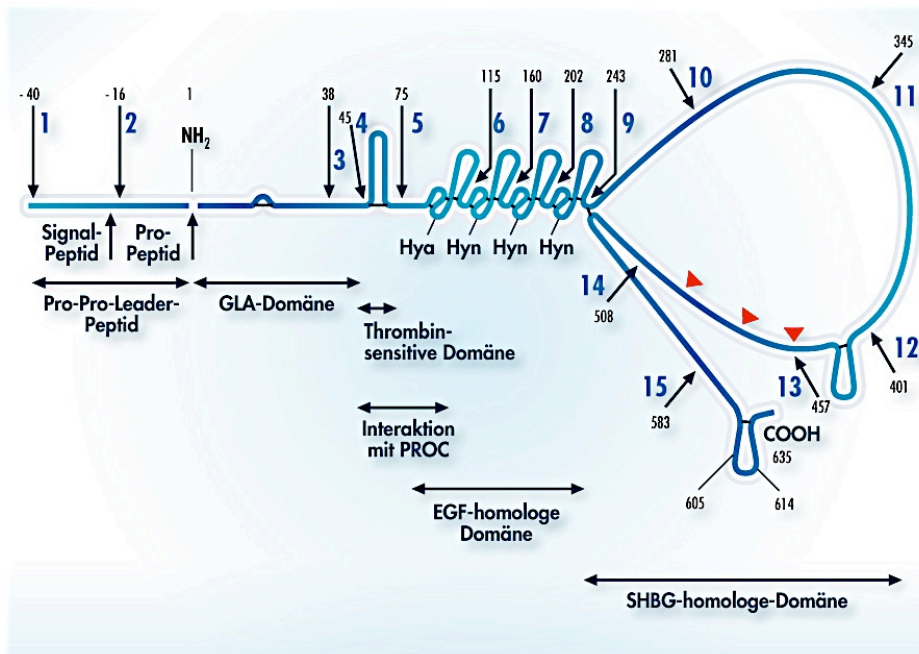


Abbildung 1: Proteinstruktur des Protein S mit Domänen und Angabe der kodierenden Exonabschnitte ¹⁵

2.3. Molekularbiologische Grundlage - PROS1-Genetik

Der Locus für das Protein S-kodierende Gen konnte auf Chromosom 3 nahe der Centromerregion bei 3p11.1-3q11.2 bestimmt werden. Hier liegt das 101Kb umfassende aktive (kodierende) Gen PROS1 (Gen-ID 5627) sowie das transskriptionell inaktive Pseudogen PROSP (Gen-ID 5628) mit einer Größe von 34Kb. Die Übereinstimmung der beiden Gene beträgt ca. 95%, wobei PROSP jedoch Exon 1 fehlt und zahlreiche schädliche Mutationen enthalten sind. ¹⁶ Die 15 Exone von PROS1 kodieren für ein 676 Aminosäuren umfassendes Präkursorprotein mit 8 Faltungsmodulen. Eine Übersicht über die einzelnen Exone und die kodierten Proteindomänen gibt Abbildung 1 und Tabelle 1.

Schwierigkeiten bereitet neben der Existenz des Pseudogens und damit eingeschränkter Wahl der Startsequenzen für die Amplifikation die Existenz von großen Deletionen, welche nur über quantitative PCR-Methoden detektiert werden können. Hier hat sich die MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) als Detektionsmethode etabliert. Im Gegensatz zur Sequenzierung richtet sich die MLPA auf Änderungen in der Kopienzahl der Zielsequenz. Vor der exponentiellen Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden dabei vorgelegte Startsequenzen an benachbarten DNA-Abschnitte durch eine thermostabile Ligase verknüpft. Nach Amplifikation dieser künstlich erzeugten Abschnitte werden die relativen Mengen an Kopien mittels Elektrophorese verglichen und ei-

ne heterozygote Deletion angenommen, wenn die relative Signalintensität um 35 bis 50% reduziert ist. Die Referenz wird dabei durch Amplifikation verschiedener konservierter autosomaler DNA-Abschnitte geliefert.

Tabelle 1: Übersicht über die Exone des PROS1-Gens und die kodierte Proteinstruktur

Exon 1	Translationsstartseite und Signalpeptid	proteolytische Abtrennung vor Sekretion
Exon 2	Propeptid mit Erkennungssequenz für die Vitamin K-abhängige Gamma-Carboxylase	
Exon 3	Gla-Domäne mit 11 gamma-Carboxyglutamatresten für die Interaktion mit negativ geladenen Phospholipidoberflächen via Calcium-Ionen	reifes Protein S, 635 Aminosäuren, molare Masse 75kDa
Exon 4	thumb loop; Bindung von Protein C, Inaktivierung durch Thrombin (thrombinsensitive Region) und membrangebundenen Faktor Xa	
Exon 5	EGF(endothelial growth factor)-ähnliche Domäne	
Exon 6	EGF(endothelial growth factor)-ähnliche Domäne	
Exon 7	EGF(endothelial growth factor)-ähnliche Domäne	
Exon 8	EGF(endothelial growth factor)-ähnliche Domäne	
Exon 9	SHBG(sexual hormone binding globulin)-homologe Domäne mit hoher Affinität zum C4b-Bindungsprotein	
Exon 10		
Exon 11		
Exon 12		
Exon 13		
Exon 14		
Exon 15		

2.4. Klinischer Phänotyp und Epidemiologie des hereditären Protein S-Mangels

Der erbliche Mangel an Protein S ist ein Risikofaktor für venöse Thrombosen und damit assoziierte embolische Ereignisse, wobei die Penetranz dieses Merkmals sehr unterschiedlich ist. In einer prospektiven Kohortenstudie von Sanson et al.¹⁷ mit 70 asymptomatischen Trägern eines Protein S-Mangels lag die Inzidenz eines ersten thromboembolischen Ereignisses bei 0,4% pro Jahr. In der gleichen Studie untersuchte Patienten mit einem Antithrombin- oder Protein C-Mangel zeigten ein vergleichsweise höheres Risiko mit Inzidenzen von 1,6 bzw. 1,0% pro Jahr. Patienten mit Protein S-Mangel und venöser Thromboembolie werden in etwa der Hälfte der Fälle durch ein idiopathisches Ereignis ohne adäquaten Auslöser symptomatisch.¹⁸

In einer Kohortenstudie von Lijfering et al.¹⁹ mit 1143 Verwandten von Patienten mit Thrombophilie und niedrigem Protein S hatte die Erniedrigung von freiem Protein S bei den Verwandten einen prognostischen Wert. Dabei war das Risiko für den Eintritt einer venösen Thromboembolie ab Werten unterhalb der 5. Perzentile (<41%) mit einem Hazard Ratio(HR) von 5,6 (95%-Konfidenzintervall(CI) 2,7 bis 11,5) signifikant gegenüber der oberen Quartile (>91%) erhöht. Patienten unterhalb der 2,5. Perzentile (<33%) zeigten sogar ein HR von 11,3 (95%-CI 5,4-23,6). Eine weitere prospektive Kohortenstudie mit 382 Verwandten von Mahmoodi et al.²⁰ fand eine jährliche Inzidenz venöser Thrombosen bei 1,53% (95% CI, 1,00-2,34) bei Betroffenen versus 0,29% (0,13-0,64) bei nicht betroffenen Verwandten, was einem HR von 7,0 (95% CI, 2,7-18,0) entspricht. Idiopathische Ereignisse besaßen mit 0,95% vs. 0,05% sogar eine HR von 22.3 (P = 0,003), während getriggerte Thrombosen mit 0,58% vs. 0,24% nur einem HR von 2,8 (P = 0,08) entsprachen.

Die Prävalenz des hereditären Protein S-Mangels wurde in einer schottischen Studie mit 3.788 gesunden Freiwilligen zwischen 0,03 und 0,13% geschätzt.²¹ Andere Untersuchungen geben höhere Schätzwerte mit einem Anteil von 0,7%²² bis 2%²³ in der Normalbevölkerung an, wobei letzteres sicherlich zu hoch erscheint und vermutlich asymptotische Träger eines erworbenen Protein S-Mangels teils miteinschließt. Im Thrombosekollektiv wird der Anteil von Patienten mit einem Protein S-Mangel zwischen 1%²⁴ und 2%²⁵ angegeben. Unter den jüngeren Patienten unter 70 Jahren wurde der Anteil sogar bis auf 7,6% geschätzt.²⁶ Familienstudien zeigten im Vergleich zu nicht betroffenen Angehörigen ein 5- bis 11,5-fach erhöhtes Risiko^{27,28,29} für venöse Thromboembolien bei Trägern eines hereditären Protein S-Mangels. In diesen symptomatischen Familien entwickelten 19 bis 57% der Betroffenen thromboembolische Ereignisse.

Für die Assoziation eines Protein S-Mangels mit arteriellen Thrombosen besteht über kausistische Hinweise hinaus bislang keine Evidenz. Selbst in Fällen mit eines persistierend

offenen Foramen ovale konnte keine Assoziation nachgewiesen werden.^{30 31 32} In Falldarstellungen wurde die Assoziation eines Mangels an Protein S mit Warfarinnekrosen nahegelegt.³³

3. Material und Methoden

3.1. Patienten und Probenaufbereitung

Von 2005 bis 2011 wurde in der Gerinnungsambulanz des Klinikums der Universität München am Standort Innenstadt bei 5851 Patienten freies Protein S und Protein S-Aktivität bestimmt. Diese Patienten wurden entweder aufgrund eigener thromboembolischer Erkrankung, familiärer Thromboseneigung oder aufgrund pathologischer Befunde in einem auswärtigen Labor hierhin überwiesen. Der Verdacht eines erblich bedingten Protein S-Mangels wurde darunter in 170 Fällen erhoben. Diese Patienten wurden in einer Datenbank gesammelt, welche neben der Konzentration des freien Antigens und der Protein S-Aktivität auch weitere laboranalytische Charakteristika wie Thromboplastinzeit und andere erklärende thrombophile Faktoren wie die Varianten Faktor V Leiden oder Prothrombin G20210A sowie Lupusantikoagulans und Antiphospholipid-Antikörper erfasste. Daneben wurden Eigen- und Familienanamnese standardisiert erfasst und die Einnahme gerinnungswirksamer Medikation oder Hormonpräparate dokumentiert. Außerdem wurden die Einflussfaktoren einer bestehenden Schwangerschaft oder einer chronisch entzündlichen Erkrankung festgehalten.

Von den 170 Patienten, welche alle kaukasischer Abstammung waren, konnte bei 136 Patienten eine genetische Diagnostik bei schriftlich vorliegendem Einverständnis durchgeführt werden.

Den in der Gerinnungsambulanz vorstelligen Patienten wurde durch Venenpunktion Blut entnommen, welches für die Gerinnungsanalytik mit 1 auf 10 Volumenanteilen 0,109M Natriumcitrat antikoaguliert und unmittelbar danach zentrifugiert wurde. Der aliquotierte Plasmaüberstand wurde bis zu der innerhalb einer Woche erfolgenden Analytik auf -30°C gelagert. Gleichzeitig wurde für den Fall einer geforderten genetischen Abklärung eine EDTA-antikoagulierte Rückstellprobe asserviert.

3.2. Laboranalytische Testverfahren für die Protein S-Bestimmung

Als Nachweisverfahren für Protein S wurde die Bestimmung des freien Antigens und der Aktivität angewendet. Für die Quantifizierung des freien Antigens kam der latexgebundene Immunoassay HemosIL® Free Protein S von Instrumentation Laboratory SpA, Milano, Ita-

lien zum Einsatz.³⁴ Für die Aktivitätsmessung wurde das STA Protein S Clotting-Verfahren von Diagnostica Stago, Asnières, Frankreich benutzt³⁵, welches die Protein S-Wirkung als Verstärkung der Protein C-Aktivität in einem Faktor Va-angereichertem Gerinnungssystem detektiert. Die Analysen wurden auf Geräten der Baureihe ACL-Top von Beckman Coulter Inc. durchgeführt. Die Verfahren sind unter Punkt 2.2. „Bestimmungsmethoden für Protein S“ beschrieben.

3.3. Molekulargenetische Untersuchung des PROS1-Gens

Entsprechend dem von Ten Kate et al.³⁶ vorgeschlagenen Protokoll mit den von Reitsma et al. ermittelten Primersequenzen³⁷ wurden alle 15 Exone des PROS1-Gens durch direkte doppelsträngige Sequenzierung auf Sequenzvarianten untersucht. Die Nummerierung der Nucleotide und Aminosäuren entspricht der konventionellen Nomenklatur³⁸. Zum Vergleich der Sequenz mit dem Wildtyp wurde die PROS1 cDNA GenBank (RefSeq NM_000313.1) als Referenz herangezogen. Die Durchführung der molekulargenetischen Untersuchungen fand im Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin, Dr. Klein und Dr. Rost, Martinsried, durch Herrn Dr. Christoph Marschall statt. Falls bei Patienten mit unauffälliger Sequenzierung aufgrund wiederholt niedriger Protein S-Werte oder aufgrund grenzwertiger Befunde und Familienanamnese für einen Protein S-Mangel dennoch der Verdacht einer PROS1-Mutation bestand, wurde eine Deletionsdiagnostik mittels MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) durchgeführt. Hierzu wurde das kommerziell erhältliche Verfahren SALSA KIT P112 PROS1 von MRC-Holland, Amsterdam, Niederlande verwendet.³⁹ Eine Einschränkung des verwendeten Systems besteht darin, dass nur 12 von 15 Exone auf Deletionen untersucht werden und Deletionen der einzelnen Exone 3, 8 und 14 nicht nachgewiesen werden können. Die Ursache hierfür liegt in der Schwierigkeit passende Primersequenzen zu finden, welche nicht mit dem Pseudogen reagieren und einen stabilen Amplifikationsprozess ermöglichen.

3.4. Statistische Auswertung

Die Erfassung und Auswertung der Daten erfolgte mittels der Statistik-Software SPSS von IBM Inc., Versionen 18.0 bis 20.0. Die in der Phänotyp-Genotyp-Korrelation ermittelten Unterschiede zwischen definierten Gruppen wurden mit Hilfe des Student's T-Test für skalierte Variablen verglichen. Ein zweiseitiger p-Wert von <0,05 gibt dabei eine statistische Signifikanz an.

4. Ergebnisse

4.1. Klinischer Phänotyp des genetisch untersuchten Patientenkollektivs

Die molekulargenetische Untersuchung des PROS1-Gens wurde bei 136 Patienten mit dem Verdacht eines erblich bedingten Protein S-Mangels durchgeführt (Tabelle 2). Darunter hatten 85 Patienten (62%) selbst thromboembolische Ereignisse erlitten. Unter diesen befand sich die Plasmaaktivität von Protein S bei 46 unterhalb 60% und Mutationen wurden unter diesen bei 28 Personen gefunden (17 nicht verwandte und 4 Paare verwandter Patienten sowie eine Familie mit drei Mitgliedern). Die übrigen 39 Patienten mit venös thromboembolischen Ereignissen erhielten entweder Vitamin K-Antagonisten und waren daher nicht zu bewerten oder hatten einen grenzwertigen laboranalytischen Phänotyp (27 Patienten) oder die Familienanamnese ließ einen erblichen Protein S-Mangel nicht ausschließen (12 Patienten). Von diesen 39 Patienten fanden sich bei 8 Mutationen im PROS1-Gen. 31 Patienten (23%) ohne eigene Anamnese für thromboembolische Erkrankungen jedoch positiver Familienanamnese wurden untersucht. Hierunter wurde bei insgesamt 10 Patienten (2 nicht verwandte und 4 Paare verwandter Personen) PROS1-Mutationen gefunden.

In einer Gruppe von 9 Patienten (6,7%), welche anamnestisch cerebrovaskuläre Infarkte oder rezidivierende transiente ischämische Attacken aufwies, wurde bei einem Patienten mit niedrigen Protein S-Spiegeln eine Mutation gefunden. Eine Patientin mit rezidivierenden Aborten und grenzwertigen Protein S-Spiegeln wurde genetisch untersucht, jedoch fand sich keine korrespondierende Mutation. 2 aus einer Gruppe von 9 Patienten (6,7%) ohne eigen- oder familienanamnestischen Hinweisen auf eine Thromboseneigung, welche uns mit der Verdachtsdiagnose eines hereditären Protein S-Mangels zugewiesen wurden, hatten Mutationen im PROS1-Gen.

Aus Tabelle 2 wird deutlich, dass venös thromboembolische Ereignisse in der Eigen- oder Familienanamnese neben niedrigen Protein S-Spiegeln das wesentliche Kriterium für die Höhe der Vortestwahrscheinlichkeit, mit der eine PROS1-Mutation gefunden werden kann, darstellt. In der Gruppe mit eigener venösen Thromboembolie und niedrigen Protein S-Spiegeln fand sich eine Positivenrate über 60%. Bei Patienten mit Familienanamnese und niedrigen Protein S-Spiegeln fanden sich bei über 40% Mutationen.

Tabelle 2 - Überblick des untersuchten Kollektivs im Hinblick auf laboranalytischen und klinischen Phänotyp angegeben als Absolutzahl der gefundenen Mutationen/untersuchten Patienten (anteilig in %)

	laboranalytischer Phänotyp			Gesamt
	pathologische Protein S-Aktivität < 60%	durch Einnahme von Vitamin K-Antagonisten eingeschränkte Beurteilbarkeit von Protein S, jedoch (familien-) anamnestisch begründeter Verdacht eines Protein S-Mangels	normale Protein S-Aktivität, jedoch früher berichteter Mangelzustand oder Familienanamnese mit erblichem Protein S-Mangel	
klinischer Phänotyp				
eigene VTE	28/46 (61)	7/27 (26)	1/12 (8)	36/85 (42)
VTE in Familienanamnese	10/23 (43)	0/0 (0)	0/8 (0)	10/31 (32)
Schlaganfall/TIA	1/5 (20)	0/4 (0)	0/0 (0)	1/9 (11)
Abortneigung	0/0 (0)	0/0 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)
gesund, keine Familienanamnese	1/8 (13)	0/0 (0)	1/1 (100)	2/9 (22)
Gesamt	41/83 (49)	7/31 (23)	2/22 (9)	49/136 (36)

Abkürzungen: TIA, transiente ischämische Attacke; VTE, venös thromboembolisches Ereignis.

4.2. Laboranalytischer Phänotyp des Protein S-Mangels

Die nachfolgende phänotypische Analyse erfolgt unter Ausschluss von Patienten unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten. Eine Übersicht über die aggregierten Daten der verbleibenden 102 Patienten zeigt Abbildung 2 als Streudiagramm mit Korrelation von Aktivität und freiem Antigen. Alle dargestellten Patienten erhielten eine molekulargenetische Untersuchung des PROS1-Gens. In einigen Fällen wurde diese auch bei im Normbereich befindlichen Protein S-Spiegeln aufgrund einer positiven Eigen- und Familienanamnese durchgeführt.

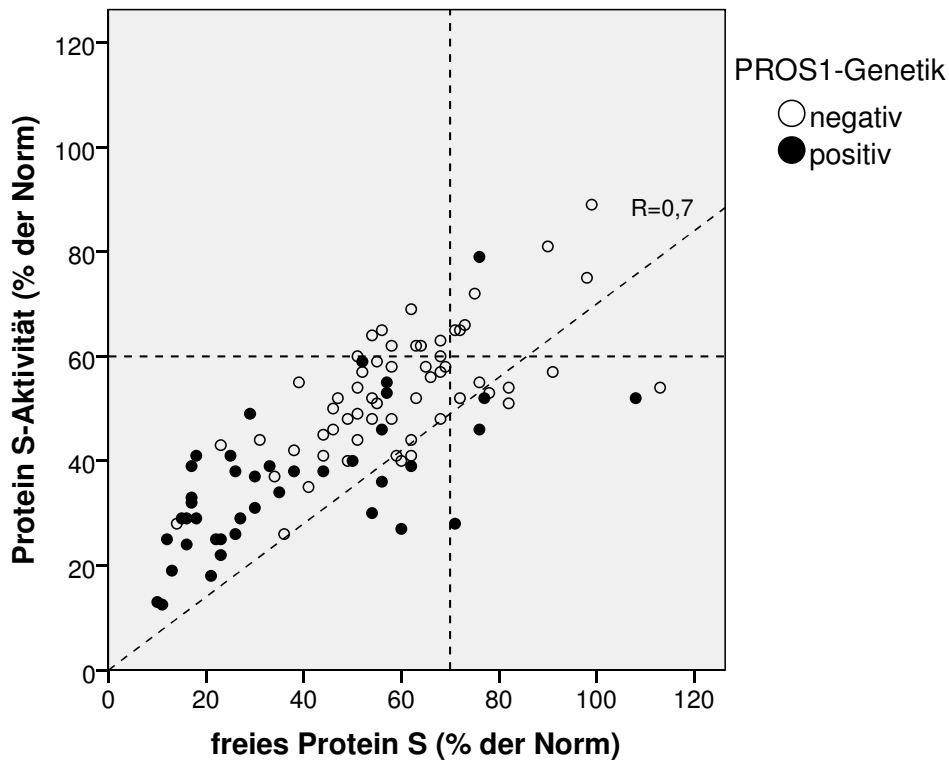


Abbildung 2 - Korrelation von freiem Antigen und Aktivität von Protein S im untersuchten Kollektiv unter Ausschluss von Patienten mit Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten (N=102); durch gestrichelte Linien kenntlich gemacht sind die üblicherweise verwendeten unteren Grenzwerte des Referenzbereichs und eine Ratio von 0,7 als häufig verwendetes Kriterium für qualitative Defekte

4.2.1. Grenzwertanalysen für die Messung von Aktivität und freiem Antigen bei Kenntnis des Genotyps

Die normalerweise verwendeten unteren Grenzwerte der Referenzbereiche von ca. 60% für die Aktivitätsmessung und 70% für das freie Antigen sind als gestrichelte Linien in Abb. 2 wiedergegeben. Die Angabe dieser Grenzwerte erfolgt ungeachtet der Physiologie des Proteins und beschreibt die zweifache Standardabweichung vom Mittelwert eines Normalkollektivs, so dass die Diagnose eines Protein S-Mangels in Unkenntnis des genetischen Hintergrunds bislang aufgrund dieser Abweichung vom Mittelwert gestellt wurde. Patienten mit einer Mutation im PROS1-Gen sind in Abb. 2 schwarz hinterlegt und es ist ersichtlich, dass unterhalb der normalerweise angegebenen Grenzwerte eine größere Gruppe mit unauffälliger PROS1-Genetik anzutreffen ist und dass erst ab einer Protein S-Aktivität kleiner als 45% regelhaft mit einer durch Mutationen im Protein S-Gen definierten Erkrankung zu rechnen ist. Für die Messung des freien Antigens ist die Angabe eines klaren Grenzwertes augenscheinlich schwieriger. Unter Annahme, dass die PROS1-Genetik inklusive der De-

letionsdiagnostik als der Goldstandard der Protein S-Diagnostik eine Unterscheidung der echt positiven und falsch negativen Ergebnisse von den falsch positiven und richtig negativen ermöglicht, lässt sich eine neue Bewertung der klassischen laborphänotypischen Parameter vornehmen.

Eine Veranschaulichung der Grenzwertproblematik anhand der Protein S-Aktivität zeigt Abbildung 3, in der bei Verschieben des Cutoffs die Anteile an den falsch Negativen und richtig Negativen im Kollektiv angegeben sind.

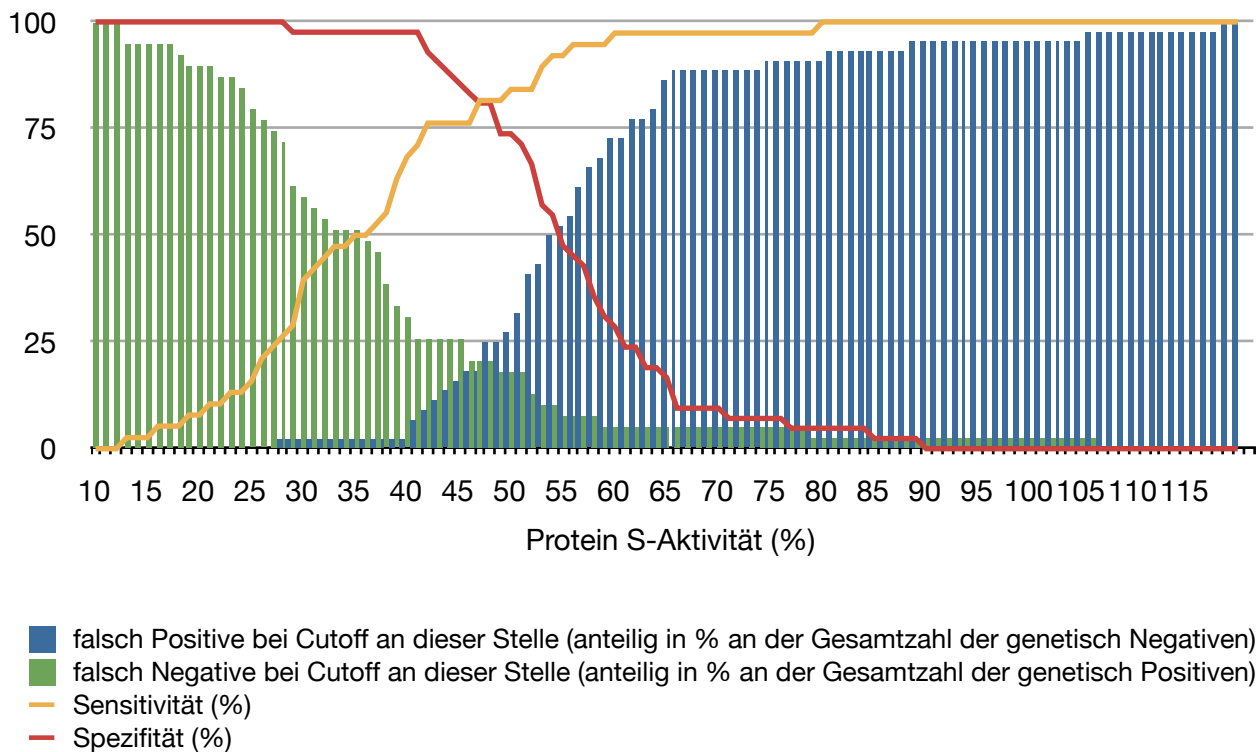
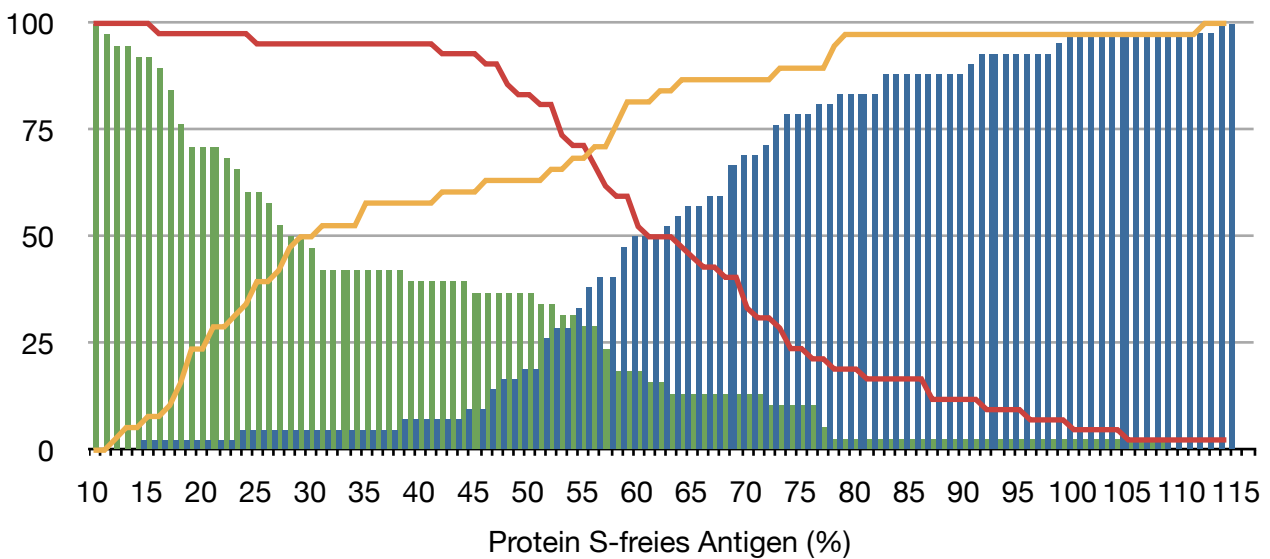


Abbildung 3 - Falsch positive und falsch negative Diagnostik bei unterschiedlichem Cutoff für die Protein S-Aktivität (Patienten unter Einnahme von Vitamin K-Antagonisten, hormonellen Kontrazeptiva und während der Schwangerschaft sind ausgeschlossen)

Der geringste diagnostische Fehler für eine korrekte Diagnose aufgrund der Protein S-Aktivität scheint im untersuchten Kollektiv mit einem Cutoff von ca. 45% erreichbar zu sein. Hier war die Diagnose im untersuchten Kollektiv mit einer Sensitivität von 76% und einer Spezifität von 86% möglich. Sensitivität gibt die Rate an richtig positiven an der der Gesamtheit der positiven an. Spezifität bezeichnet den Anteil der richtig negativen an der Gesamtheit der in Wirklichkeit negativen. Eine hohe Sensitivität ist ab einem Cutoff von größer 60%, eine hohe Spezifität bei Cutoff kleiner 40% der Protein S-Aktivität gegeben.

Tabelle 3 - Sensitivität und Spezifität für das Vorliegen einer PROS1-Mutation an verschiedenen Cutoff-Stellen für die **Protein S-Aktivität**

Cutoff der Protein S-Aktivität	Sensitivität	Spezifität
35 %	50 %	98 %
40 %	68 %	98 %
45 %	76 %	86 %
50 %	84 %	74 %
55 %	92 %	48 %
60 %	97 %	29 %



- falsch Positive bei Cutoff an dieser Stelle (anteilig in % an der Gesamtzahl der genetisch Negativen)
- falsch Negative bei Cutoff an dieser Stelle (anteilig in % an der Gesamtzahl der genetisch Positiven)
- Sensitivität (%)
- Spezifität (%)

Abbildung 4 - Falsch positive und falsch negative Diagnostik bei unterschiedlichem Cutoff für Protein S-freies Antigen (Patienten unter Einnahme von Vitamin K-Antagonisten, hormonellen Kontrazeptiva und während der Schwangerschaft sind ausgeschlossen)

Freies Antigen scheint etwas weniger exakt in der Lage zu sein, die genetisch definierten Gruppen zu unterscheiden. Insgesamt handelt es sich aber auch um ein hochwertiges Instrument in dieser Fragestellung (vgl. 4.2.2.). Der optimale Cutoff im hier untersuchten Kollektiv liegt bei ca. 55% der Norm.

Tabelle 4 - Sensitivität und Spezifität für das Vorliegen einer PROS1-Mutation an verschiedenen Cutoff-Stellen für das **Protein S-freie Antigen**

Cutoff des Protein S-freien Antigens	Sensitivität	Spezifität
35 %	58 %	95 %
40 %	58 %	95 %
45 %	63 %	91 %
50 %	63 %	81 %
55 %	71 %	67 %
60 %	82 %	50 %
65 %	87 %	43 %
70 %	87 %	31 %

4.2.2. Vergleich von Aktivitätsmessung und freiem Antigen mittels ROC-Analyse

Die Analyse von ROC-Kurven ist eine aus der Informationstechnologie stammende Methode, welche die Güte eines Sender-Empfänger-Systems darstellt und mit dem das Rauschen eines Übertragungsprozesses quantifiziert wird. Übertragen auf laboranalytische Testsysteme bedeutet es ein Auftragen der Sensitivität gegenüber der Spezifität eines Verfahrens. Die Fläche unterhalb der Kurven dient als Gütemaß, mit dem unterschiedliche Methoden verglichen werden können. Die Fläche eines idealen Systems strebt gegen 1, während eine Fläche von 0,5 bedeutet, dass es sich um einen Zufallsprozess ohne Zusammenhang mit der Testvariable handelt.

Tabelle 5 - Kenndaten der ROC-Analyse

	Fläche unter der Kurve	p-Wert*
Protein S-Aktivität	0,882 (95%-CI: 0,802-0,961)	<0,001
Protein S-freies Antigen	0,783 (95%-CI: 0,678-0,888)	<0,001

*Wahrscheinlichkeit für die Nullhypothese, dass die wahre Fläche gleich 0,5 ist.

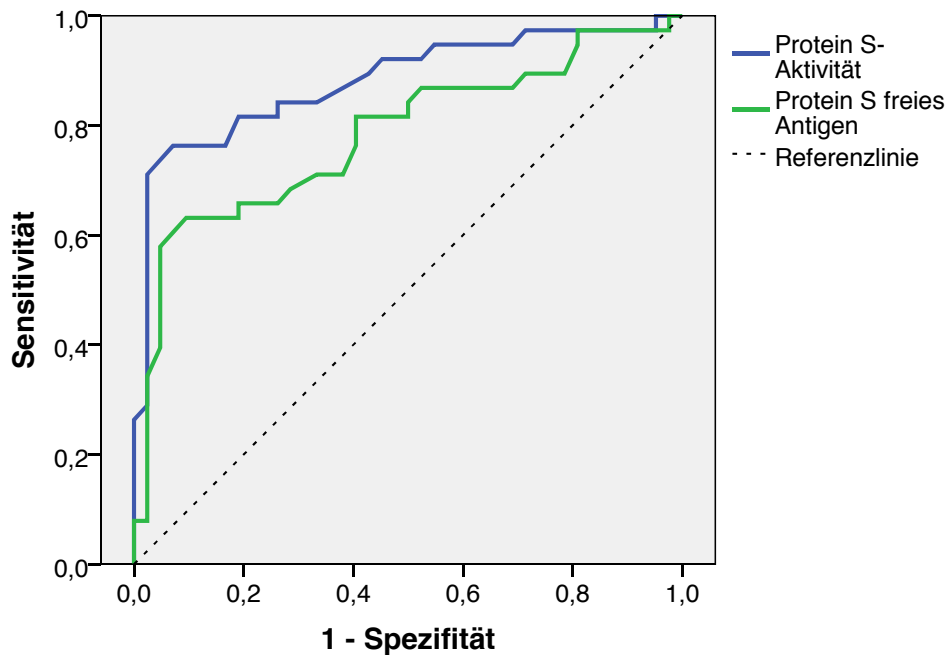


Abbildung 5 - ROC-Kurven für Protein S-Aktivität und freies Antigen als Indikatoren für das Vorliegen einer PROS1-Mutation; Patienten unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten, hormoneller Kontrazeption oder bei Vorliegen einer Schwangerschaft waren ausgeschlossen.

Die ROC-Analyse der verwendeten Testsysteme Protein S-Aktivität und Protein S-freies Antigen, weist diese mit hoher Signifikanz ($p < 0,001$) (Tabelle 5) als valide Instrumente zum Nachweis einer PROS1-Mutation aus. Dabei erscheint die Aktivitätsmessung als das leistungsfähigere Verfahren in dieser Fragestellung (Abbildung 5, Tabelle 5).

4.2.3. Vergleichende Analyse des laboranalytischen Phänotyps des Protein S-Mangels bei Kenntnis des PROS1-Genotyps

Die klassischerweise verwendete Einteilung des Protein S-Mangels in einen quantitativen Mangel Typ I und einem qualitativen Mangel Typ II erfolgt anhand der Korrelation von Aktivität und freiem Antigen (Abb. 6). Während bei einem Typ I-Mangel Protein S-Aktivität und freies Antigen in gleichem Maße erniedrigt sind, soll bei einem Typ II-Mangel eine normale Konzentration an freiem Antigen vorliegen und die Aktivität pathologisch erniedrigt sein. Diese aufgrund theoretischer Überlegungen postulierte Klassifikation folgt dem Gedanken, dass Missense-Mutationen sich eher als Typ II ausdrücken könnten. Aus Abbildung 6 ist ersichtlich, dass nur ein sehr geringer Teil der Patienten einem Typ II zugeordnet werden könnten. Auch die Veranschaulichung einer Ratio von 0,7 als oft verwendetes Kriterium eines qualitativen Defekts lässt keine exakt definierte Gruppe kenntlich werden. Der Gedanke, dass die Klassifikation in einen Typ II einer Missensemutation entspricht, lässt sich anhand der in Abbildung 6 dargestellten Daten nicht nachvollziehen.

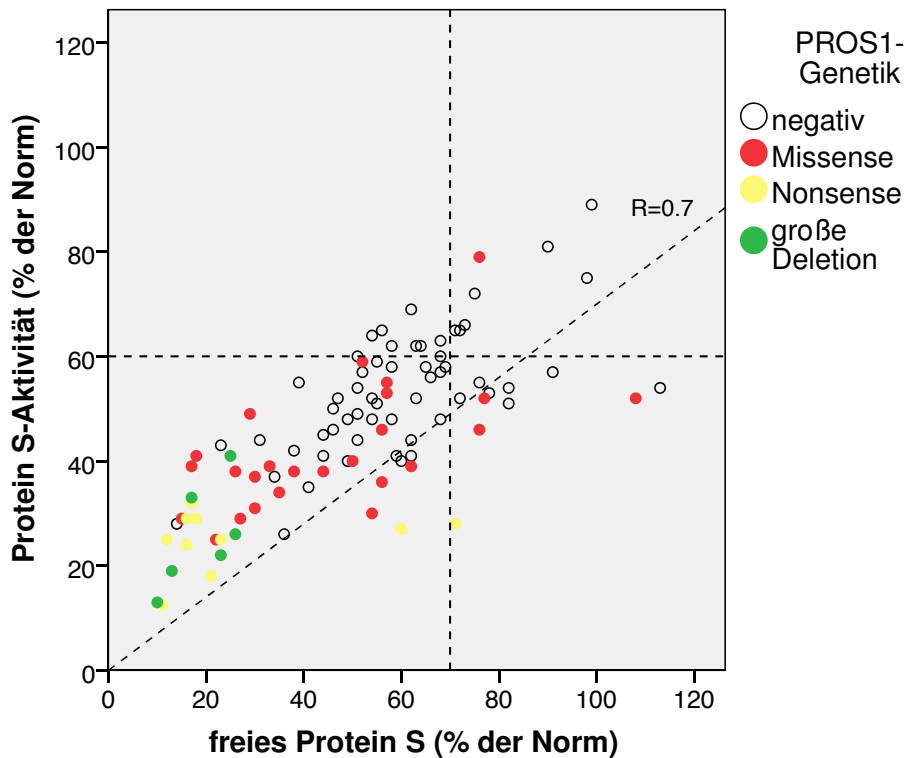


Abbildung 6 - Korrelation von freiem Antigen und Aktivität des Protein S mit Darstellung der unterschiedlichen Mutationstypen. (Patienten unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten ausgeschlossen)

Die nachfolgende Phänotyp-Genotyp-Korrelation erfolgt unter Ausschluss von Patienten mit anzunehmend erworbenem Mangelzustand. Hierunter fallen neben solchen mit Einnahme von Vitamin K-Antagonisten auch Patientinnen in Schwangerschaft oder unter hormoneller Kontrazeption. Patienten mit Hepatitis oder Leberzirrhose und niedrigen Protein S-Werten traten im untersuchten Kollektiv nicht auf. 3 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hatten nur grenzwertig auffällige Protein S-Spiegel und unauffällige PROS1-Sequenzanalysen.

Bei 83 von 136 Patienten war kein störender Einfluss der oben genannten Faktoren anzunehmen. Abbildungen 7 und 8 zeigen die Protein S-Aktivität entsprechend des molekulargenetischen Ergebnisses. Zwischen den genetisch definierten Untergruppen zeigen sich signifikante Unterschiede in der Restaktivität. Patienten ohne Mutation in PROS1 im verwendeten Testsystem haben typischerweise Protein S-Aktivitätswerte über 40%. Nur in einem Fall ohne erkennbare Mutation oder Deletion in PROS1 waren die Aktivitätswerte wiederholt unterhalb dieser Grenze. Ob bei diesem Patienten, unter dessen erstgradigen Verwandten ebenfalls ein Protein S-Mangel beschrieben war, eine Deletion der nicht untersuchten Exone 3, 8 oder 14 vorliegt, bleibt spekulativ.

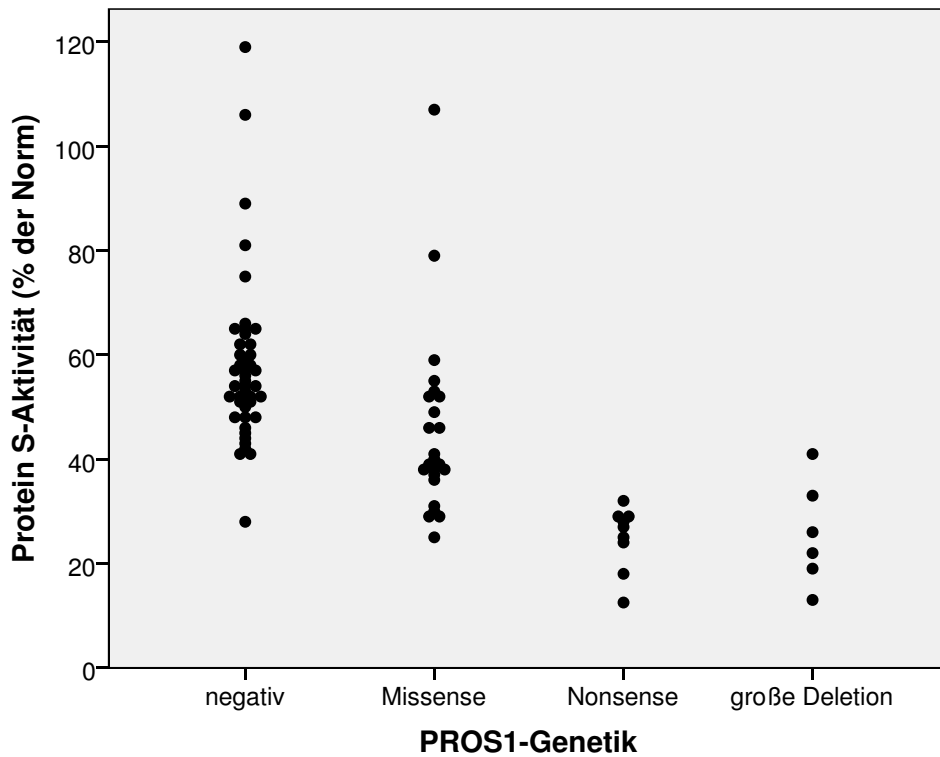


Abbildung 7 - Darstellung der Protein S-Aktivität nach Mutationstyp als Punktdiagramm (Patienten unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten, unter hormoneller Kontrazeption oder Schwangerschaft sind ausgeschlossen)

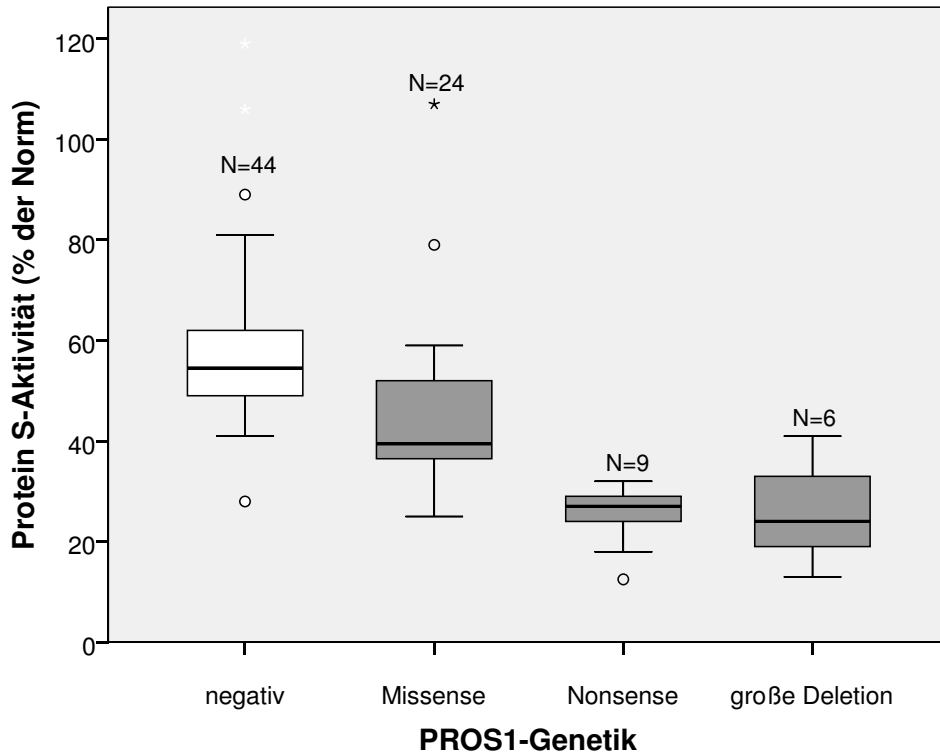


Abbildung 8 - Darstellung der Protein S-Aktivität nach Mutationstyp als Boxplot-Diagramm (Patienten unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten, unter hormoneller Kontrazeption oder Schwangerschaft sind ausgeschlossen)

Bei den zwei Missense-Mutationen mit normalen Aktivitätswerten handelt es sich um die bislang unbekanntenen Polymorphismen c.1016T>A und c.1138A>C. Die der Gruppierung entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen werden in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6

Mittelwerte μ und Standardabweichungen σ der Protein S-Aktivität in % der Norm kategorisiert nach Mutationstyp

Mutationstyp	N (Patienten)	Protein S-Aktivität (%)
		$\mu \pm \sigma$
keine Mutation	44	58 \pm 16
Missense-Mutation	24	45 \pm 18
Nonsense-Mutation	9	25 \pm 6,1
große Deletion	6	26 \pm 10

Eine entsprechende Betrachtung der Konzentrationen des freien Antigens (Abbildungen 9 und 10) kommt zu einem ähnlichen Ergebnis. Auch hier unterscheiden sich die Mittelwerte entsprechend des vorliegenden molekulargenetischen Befunds. Ähnlich der Aktivität sind Nonsense-Mutationen und große Deletionen mit der stärksten Reduktion der freien Antigen-Spiegel verbunden (Tabelle 7).

Tabelle 7

Mittelwerte μ und Standardabweichungen σ der Konzentration von Protein S-freies Antigen in % der Norm kategorisiert nach Mutationstyp

Mutationstyp	N (Patienten)	freies Protein S-Antigen (%)
		$\mu \pm \sigma$
keine Mutation	42	63 \pm 19
Missense-Mutation	23	47 \pm 24
Nonsense-Mutation	9	29 \pm 22
große Deletion	6	19 \pm 6,7

Die Unterschiede der Mittelwerte zwischen genetisch unauffälligen und Patienten mit Missensemutation sind statistisch signifikant (Protein S-Aktivität: $p=0,006$, Protein S-freies Antigen: $p=0,008$ ohne Annahme gleicher Varianzen). Nonsensemutationen und große Deletionen unterscheiden sich in ihren Mittelwerten für beide Verfahren mit hoher Signifikanz ($p<0,001$) vom genetisch unauffälligen Kollektiv. Ebenfalls signifikant ist der Unterschied zwischen Missense-Mutationen und Nonsensemutationen bzw. großen Deletionen ($p<0,05$ jeweils für beide Testverfahren), während sich Nonsensemutationen und große Deletionen nicht in Aktivität oder freiem Antigen unterschieden werden können.

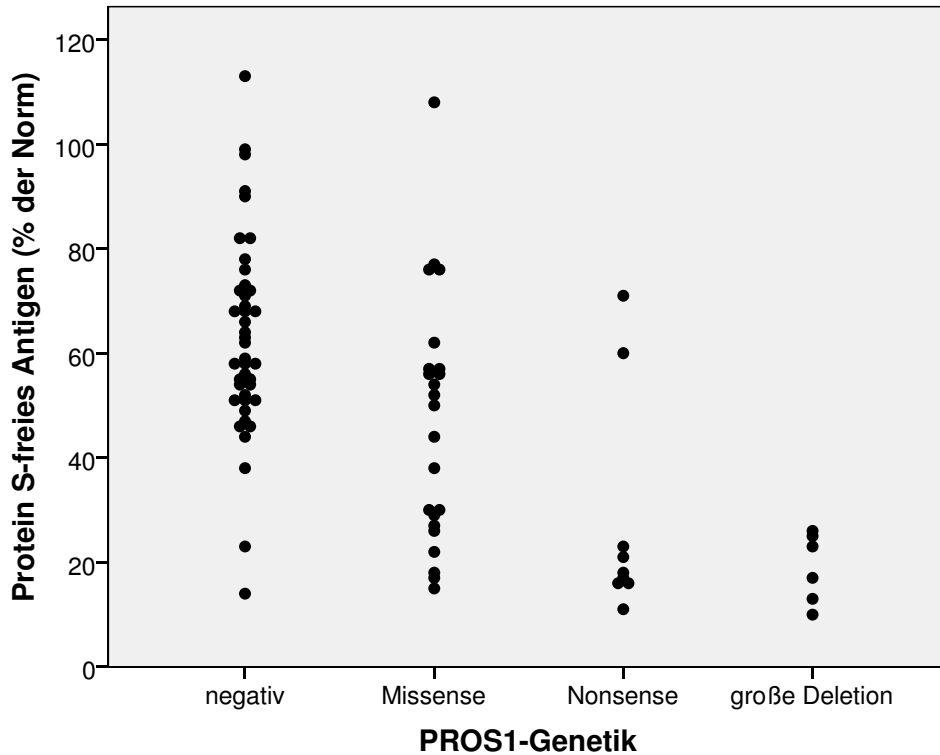


Abbildung 9 - Darstellung von Protein S-freies Antigen nach Mutationstyp als Punktdiagramm (Patienten unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten, unter hormoneller Kontrazeption oder Schwangerschaft sind ausgeschlossen)

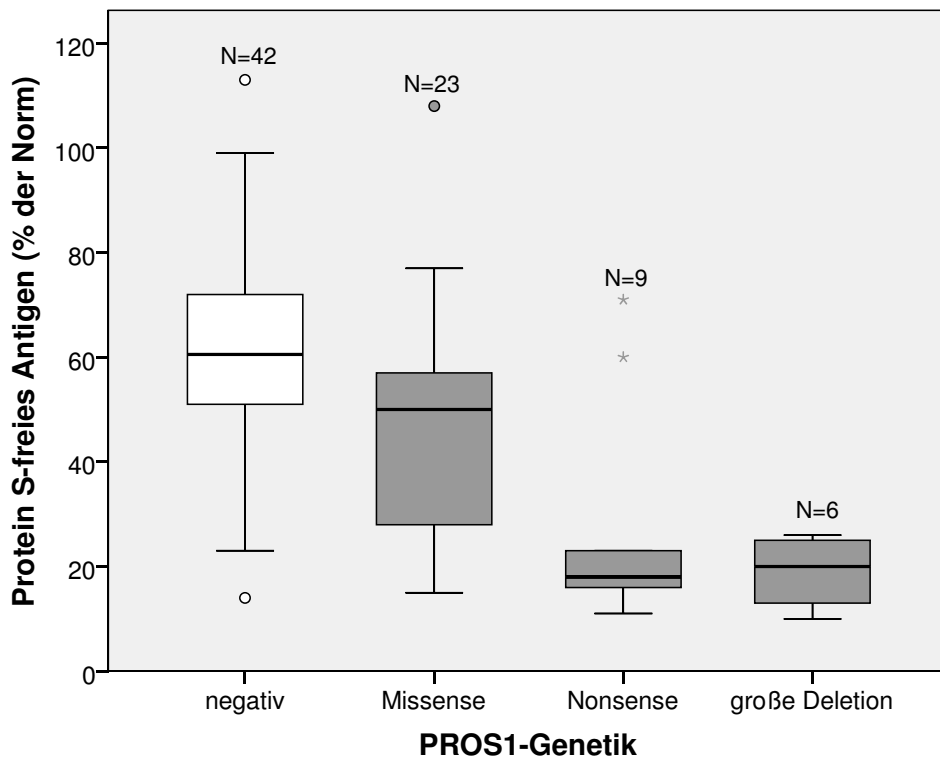


Abbildung 10 - Darstellung von Protein S-freies Antigen nach Mutationstyp als Boxplot-Diagramm (Patienten unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten, unter hormoneller Kontrazeption oder Schwangerschaft sind ausgeschlossen)

4.2.4. Phänotyp des Protein S-Mangels unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten

Eine im klinischen Alltag häufig auftretende Fragestellung ist, ob die Untersuchung auf thrombophile Risikomarker unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten sinnvoll ist. Unter Einnahme von Phenprocoumon, Warfarin oder ähnlichen Substanzen sind Proteine mit Vitamin K-abhängiger Synthese wie Protein C und Protein S in verminderter Aktivität und Konzentration messbar, so dass in der Regel von einer Bestimmung abgeraten wird. Zur Überwachung des antikoagulativen Effekts von Vitamin K-Antagonisten wird die Thromboplastinzeit umgerechnet als Quick-% oder INR-Wert herangezogen. Um die Auswirkung der Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten auf die Protein S-Bestimmung zu untersuchen, wurden die in dem genetisch definierten Kollektiv erhobenen Befunde in Korrelation zur Thromboplastinzeit gesetzt. Da Patienten mit Verdacht auf einen erblichen Protein S-Mangel in einigen Fällen mehrmals, einmal mit und einmal ohne Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten vorstellig wurden, liegen von den 136 genetisch untersuchten Patienten insgesamt 179 Untersuchungsdaten vor, welche in den Abbildungen 11 bis 14 dargestellt sind.

Die Abbildungen 11 bis 14 veranschaulichen deutlich, dass auch unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den genetisch definierten Gruppen mit oder ohne Mutation im PROS1-Gen auszumachen ist. Tatsächlich scheinen Protein S-Aktivität und Protein S-freies Antigen hier noch präziser zwischen genetisch kranken Patienten und solchen mit erworbenem Mangelzustand unterscheiden zu können. Während die Patienten mit negativen molekulargenetischem Ergebnis für Sequenzvarianten oder Deletionen im PROS1-Gen im nativen Zustand schlechter von den Patienten mit familiärem Protein S-Mangel zu unterscheiden waren, zeigen sie doch unter Einfluss eines Vitamin K-Antagonisten ein größeres Potenzial eine gewisse Restaktivität an funktionellem Protein aufrecht zu erhalten. Patienten mit nachgewiesener Mutation im PROS1-Gen können unter dem exogenen Stressfaktor eines Vitamin K-Antagonisten keine relevanten Mengen mehr an funktionierendem Protein S bilden und liegen in der Aktivität an der Nachweisgrenze. Mittels eines veränderten Cutoffs unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten wäre also in vielen Fällen der Ausschluss eines hereditären Protein S-Mangels als Ursache einer Thromboseneigung mit hoher Sicherheit möglich. Die ROC-Analyse (Abbildung 15, Tabelle 8) kennzeichnet Aktivitäts- und freies Antigen-Messung als hochwertige Verfahren auch unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten.

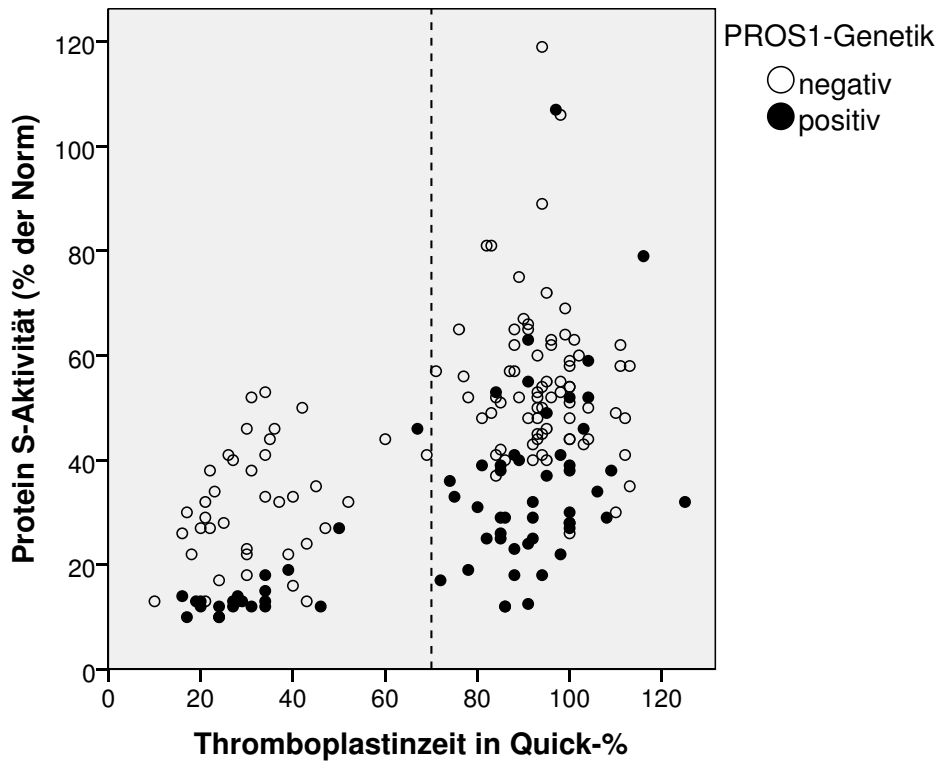


Abbildung 11 - Streudiagramm mit Darstellung der Protein S-Aktivität in Abhängigkeit von der zeitgleich ermittelten Thromboplastinzeit und Kennzeichnung des molekulargenetischen Ergebnisses für Mutationen im PROS1-Gen; Markierung der unteren Grenze des Referenzbereichs der Thromboplastinzeit bei 70 Quick-% als gestrichelte Linie

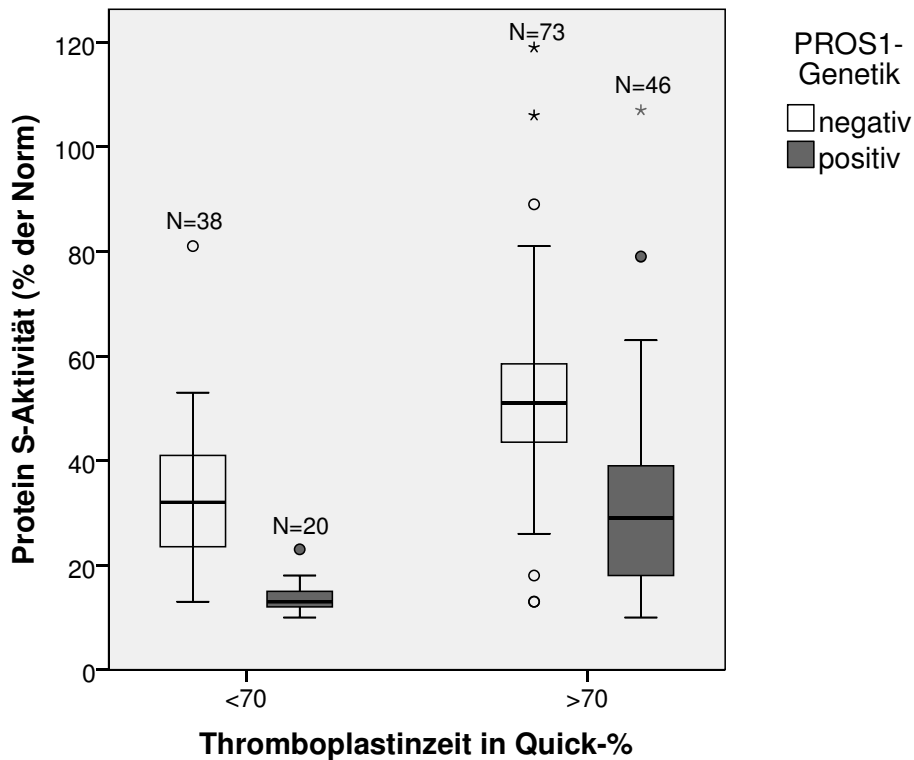


Abbildung 12 - Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Protein S-Aktivität kategorisiert nach der Thromboplastinzeit mit Annahme der Wirksamkeit eines Vitamin K-Antagonisten bei Werten <70 Quick-%

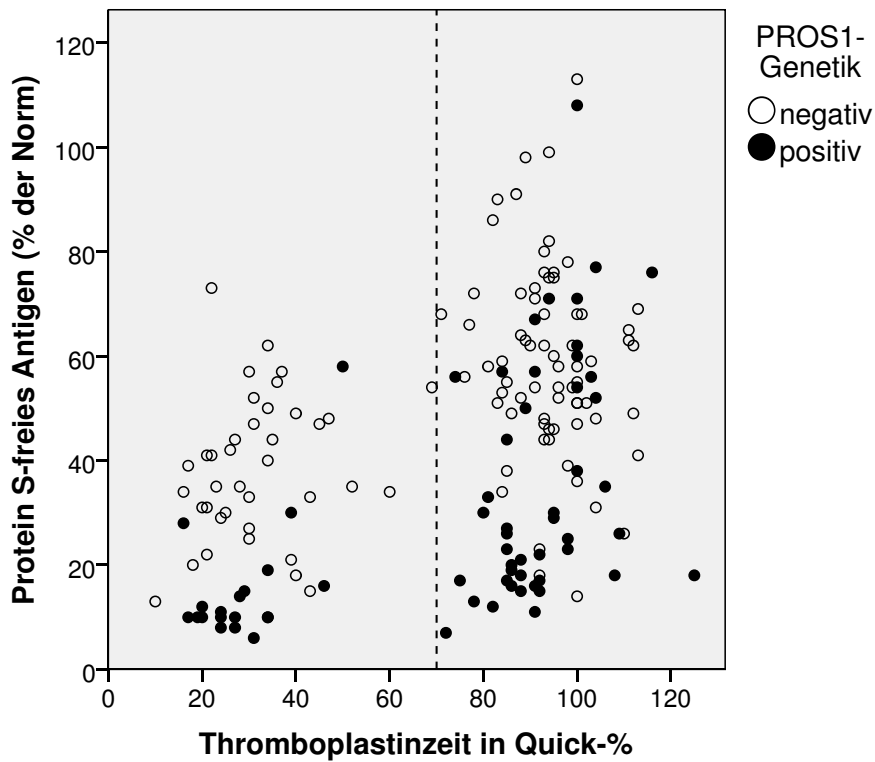


Abbildung 13 - Streudiagramm mit Darstellung von Protein S-freies Antigen in Abhängigkeit von der zeitgleich ermittelten Thromboplastinzeit und Kennzeichnung des molekulargenetischen Ergebnisses für Mutationen im PROS1-Gen; Markierung der unteren Grenze des Referenzbereichs der Thromboplastinzeit bei 70 Quick-% als gestrichelte Linie

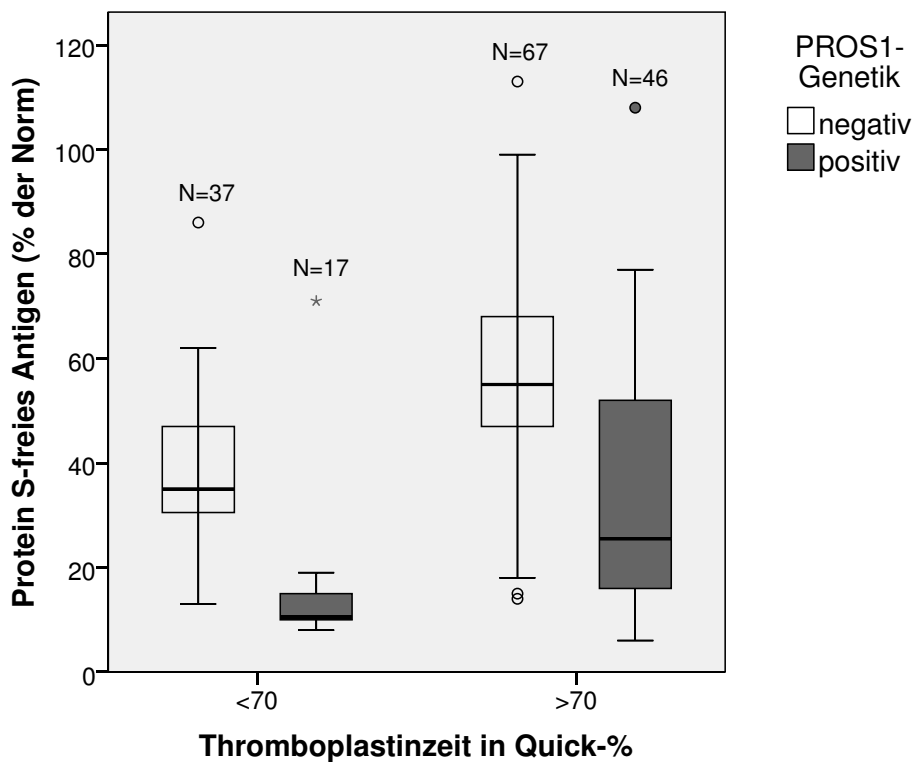


Abbildung 14 - Boxplot-Diagramm mit Darstellung von Protein S-freies Antigen kategorisiert nach der Thromboplastinzeit mit Annahme der Wirksamkeit eines Vitamin K-Antagonisten bei Werten <70 Quick-%

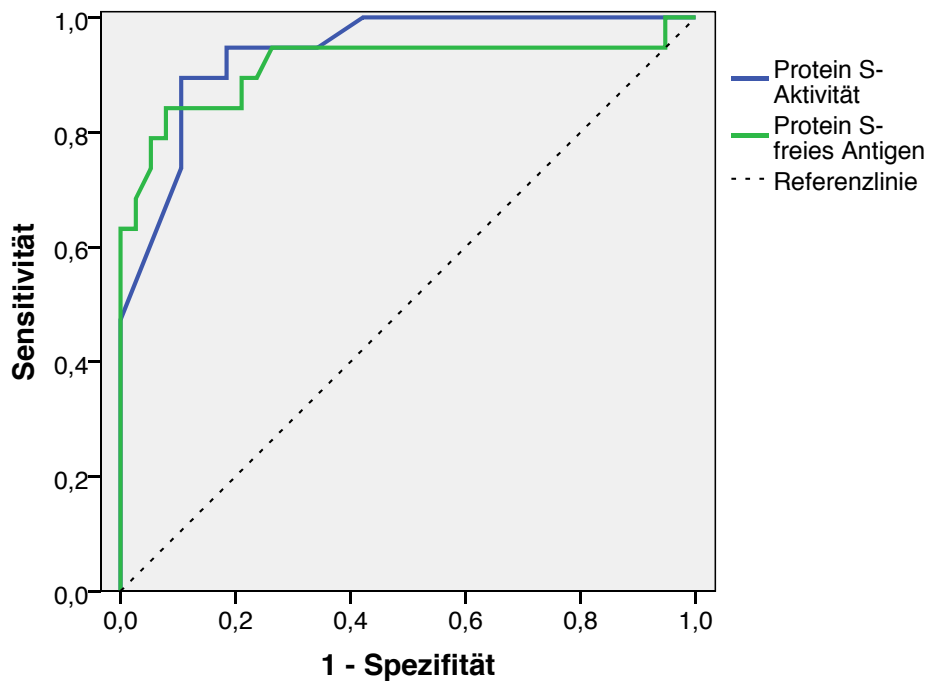


Abbildung 15 - ROC-Kurven für Protein S-Aktivität und freies Antigen als Testvariablen für das Vorliegen einer PROS1-Mutation unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten (Einschlusskriterium Thromboplastinzeit < 70 Quick-%)

Tabelle 8 - Kenndaten der ROC-Analyse unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten

	Fläche unter der Kurve	p-Wert*
Protein S-Aktivität	0,940 (95%-CI: 0,881-0,998)	<0,001
Protein S-freies Antigen	0,916 (95%-CI: 0,815-1,000)	<0,001

*Wahrscheinlichkeit für die Nullhypothese, dass die wahre Fläche gleich 0,5 ist.

4.3. Genetischer Hintergrund des Protein S-Mangels

Mit Hilfe direkter Sequenzierung und MLPA konnten in dem untersuchten Kollektiv bei 49 Patienten aus 35 Familien Mutationen im Protein S-Gen gefunden werden.

Eine Auflistung der pathologischen molekulargenetischen Ergebnisse gibt Tabelle 9 wieder. Insgesamt wurden 11 bekannte und 17 noch nicht beschriebene Mutationen gefunden. Auf die einzelnen Mutationstypen bezogen, handelt es sich um 7 neue und 8 bekannte Missensemutationen mit einem Aminosäureaustausch in der Peptidsequenz, 2 neue und 1 bekannten Basenaustausch, welcher in ein Stoppcodon resultiert, 3 unbekannte Leserahmenverschiebungen durch Deletion oder Insertion sowie 4 neue und 1 bekannte Spleißmutation. Große Deletionen wurden mittels MLPA in 4 Familien identifiziert. In einer Familie konnte die bis dahin noch nicht beschriebene Deletion des einzelnen Exons 9 sowie angrenzender Intronregionen ermittelt werden.

Tabelle 9 - Laboranalytische, klinische und molekulargenetischer Befund bei Patienten mit PROS1-Mutation

Fall Nr.	Anzahl an Patienten [*]	Protein S		Klinische Manifestation	VTE in Familienanamnese	Mutationstyp	Exon	Basenaustausch [†]	Peptidsequenz [†]	in HGMD geführt
		Aktivität (%)	Freies Antigen (%)							
1	1	46	56	asymptomatisch	Ja	Missense	2	c.121C>T	p.Arg41Cys	Nein
2	2	30-52	54-108	TVT	Ja	Missense	2	c.122G>A	p.Arg41His	Ja ^a
3	1	31	30	TVT	Nein	Missense	2	c.200A>C	p.Glu67Ala	Ja ^a
4	3 + 1	38-53	44-77	TVT/LAE	Ja	Missense	2	c.233C>T	p.Thr78Met	Ja ^a
5	1 + 1	39	62	TVT	Nein	Missense	6	c.556T>C	p.Cys186Arg	Nein
6	1	39	33	TVT	Ja	Missense	6	c.557G>A	p.Cys186Tyr	Ja ^b
7	1	36	56	TVT/LAE	Nein	Missense	7	c.701A>G	p.Tyr234Cys	Ja ^c
8	1	38	38	TVT	Ja	Missense	7	c.727G>C	p.Asp243His	Ja ^d
9	1	79	76	TVT	Ja	Missense	10	c.1016T>A	p.Leu339Gln	Nein
10	2	41	18	TVT	Ja	Missense	10	c.1085A>G	p.Gln362Arg	Nein
11	1	107	-	asymptomatisch	Nein	Missense	10	c.1138A>C	p.Asn380His	Nein
12	1	55	57	asymptomatisch	Nein	Missense	11	c.1252A>T	p.Asn418Tyr	Nein
13	1 + 1	34-59	35-52	asymptomatisch	Ja	Missense	13	c.1501T>C	p.Ser501Pro	Ja ^e
14	3 + 3	29-39	15-30	TVT/LAE/SVT	Ja	Missense	13	c.1543C>T	p.Arg515Cys	Ja ^f
15	2	46-49	29-76	TVT	Ja	Missense	14	c.1676T>C	p.Ile559Thr	Nein
16	1	28	71	TVT	Nein	Nonsense	2	c.100C>T	p.Gln34X	Nein
17	1	VKA	VKA	TVT/LAE/SVT	Nein	Nonsense	2	c.150-152delA	p.Lys50AsnfsX77	Nein
18	1	VKA	VKA	TVT	Nein	Nonsense	Intron 9	c.965+1delG	p.IVS9+1delG	Nein
19	1	VKA	VKA	TVT/LAE	Ja	Nonsense	Intron 9	c.965+4A>G	p.IVS9+4A>G	Nein
20	1	25	23	TVT	Ja	Nonsense	Intron 10	c.1155+1G>A	p.IVS10+1G>A	Nein
21	1	18	21	TVT	Nein	Nonsense	Intron 10	c.1155+5G>A	p.IVS10+5G>A	Ja ^g
22	1	29	16	TVT	Ja	Nonsense	11	c.1168G>T	p.Glu390X	Nein
23	1	VKA	VKA	LAE	Ja	Nonsense	11	c.1244dupA	p.Pro416AlafsX22	Nein
24	2 + 1	13-25	11-16	TVT/LAE	Ja	Nonsense	12	c.1351C>T	p.Arg451X	Ja ^h
25	1	32	17	TVT/LAE	Ja	Nonsense	Intron 13	c.1645-1G>A	p.IVS13-1G>A	Nein
26	3	27	60	TVT	Ja	Nonsense	14	c.1570delC	p.Leu524fsX525	Nein
27	1 + 1 + 2	13-27	10-26	TVT/LAE	Ja	Große Deletion	gesamtes Gen	delPROS1	delPROS1	Ja ⁱ
28	2	33-41	17-25	TVT/LAE	Ja	Große Deletion	9	c.891-?_965+?del	ex9del	Nein

* Patienten aus unterschiedlichen Familien durch + getrennt; † Nomenklatur gemäß der Human Genome Variation Society; VKA=Einnahme von Vitamin K-Antagonisten, TVT=tiefe Venenthrombose, LAE=Lungenarterienembolie, SVT=Sinusvenenthrombose

Literaturangaben in Tabelle 4: a⁴⁰, b⁴¹, c⁴², d⁴³, e⁴⁴, f⁴⁵, g⁴⁶, h⁴⁷, i⁴⁸

5. Diskussion

Ziel dieser Untersuchung war es, hereditäre Formen des Protein S-Mangels in einem größeren Kollektiv zu identifizieren und auf laborphänotypischer, klinischer und genetischer Ebene zu beschreiben. Zwischen 2005 und 2011 wurde in der Hämostaseologischen Ambulanz an der Medizinischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München bei fast 6000 Patienten eine Untersuchung auf hereditäre Thrombophilien durchgeführt. Grund der Vorstellung waren entweder thromboembolische Ereignisse in der Eigen- oder Familienanamnese oder mit thrombophilen Gerinnungsstörungen in Verbindung gebrachte Symptome, wie z.B. eine Abortneigung. Bei allen diesen Patienten wurde die Aktivität und das freie Antigen von Protein S bestimmt. Eine Schwierigkeit stellte die in diesem Kollektiv weit verbreitete Einnahme von Vitamin K-Antagonisten und dadurch artifiziell erniedrigte Protein S-Werte dar, weswegen anzunehmen ist, dass eine unbekannte Anzahl an Patienten mit erblichem Protein S-Mangel nicht erkannt wurde. Zudem handelt es sich um ein hochgradig vorselektioniertes Kollektiv, weshalb epidemiologische Daten nur mit Vorsicht aus den vorliegenden Zahlen abgeleitet werden können. Insgesamt wurde bei 170 Patienten der Verdacht auf einen erblich bedingten Mangel an Protein S erhoben. Hiervon wurden 136 Patienten, die in die molekulargenetische Diagnostik einwilligten, auf genetischer Ebene untersucht und in 49 Fällen eine Mutation im PROS1-Gen gefunden.

Da venös thromboembolische Ereignisse in der Eigen- oder Familienanamnese typischerweise der Grund sind, warum sich Patienten in einer hämostaseologischen Spezialambulanz vorstellen, ist von einem Selektionsbias auszugehen, wenn verschiedene Gruppen innerhalb dieses Kollektivs verglichen werden. Es ließe sich z.B. nicht ohne weiteres feststellen, in welchem Maß Patienten mit einer nachgewiesenen Mutation auch ein höheres Risiko für venöse Thromboembolien haben als Patienten mit niedrigen Protein S-Werten ohne nachweisbarem Defekt im PROS1-Gen, da letztere möglicherweise andere Risikofaktoren aufweisen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen aber, dass venöse Thromboembolien in der Anamnese das charakterisierende Merkmal des hereditären Protein S-Mangels sind. Gerade bei grenzwertigen Befunden ist die Anamnese entscheidend für die Vortestwahrscheinlichkeit der molekulargenetischen Untersuchung auf PROS1-Mutationen. Aufgrund der Schwierigkeiten, die die Diagnose eines Protein S-Mangels als Ursache einer Thromboseneigung mit sich bringt, wurde von Marlar und Gausman⁴⁹ ein diagnostischer Algorithmus vorgeschlagen, um abnormale Protein S-Werte abzuklären. Wichtigstes Kriterium für die Bewertung von Protein S-Laborparametern war auch hier die Einschätzung der Vortestwahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Protein S-Mangels, d.h. Klärung ob überhaupt eine Thrombophilie in Eigen- oder Familienanamnese vorliegt.

Nach Auswertung der Daten aller 136 Patienten, welche bei Verdacht auf einen erblichen Protein S-Mangel einer Gendiagnostik zugestimmt hatten, blieb unter Ausschluss der Patienten mit bekannten Ursachen für eine erworbene Protein S-Verminderung wie Schwangerschaft und hormoneller Kontrazeption nur noch ein Fall übrig, bei dem Protein S-Aktivitäten unter 40% auffielen und keine Sequenzvarianten oder Deletionen in dem von uns verwendeten Testsystem nachweisbar waren. Ob in diesem Fall mit einer eindeutig familiär vorhandenen Protein S-Erniedrigung und Thromboseneigung eine isolierte große Deletion in den nicht untersuchten Exonen 3, 8 oder 14 vorlag, oder ob in seltenen Fällen andere Gendefekte diesen Phänotyp auslösen können, ist unklar. Diese Ergebnisse unterstützen daher die Beobachtung von Mulder et al.⁵⁰, dass ein niedrigerer Cut-Off die diagnostische Leistungsfähigkeit der verfügbaren Protein S-Bestimmungsmethoden verbessern kann.

Auf der Grundlage der Kenntnis des PROS1-Genotyps wurde in dieser Arbeit eine Grenzwertoptimierung für das Auffinden geeigneter Cutoff-Werte für Aktivität und freies Antigen des Protein S durchgeführt. An den den Herstellerangaben zu entnehmenden, vorgeschlagenen Grenzen der Referenzbereiche von ca. 60% für Aktivität und 70% für freies Antigen sind demzufolge zwar hohe Sensitivitäten von 97% bzw. 87% zu erwarten, die Spezifität der so verwendeten Testsysteme liegt aber nur bei ca. 30%. Über 90%ige Spezifitäten waren in beiden Testsystemen erst unterhalb eines Cutoffs von 45% zu erheben.

Lange Zeit gab die Beobachtung von konsistent niedrigen Protein S-Werten bei Patienten ohne pathologischem Befund in der PROS1-Sequenzanalyse den Experten Rätsel auf. Dennoch wurde in Kopplungsanalysen eine eindeutige Verbindung mit dem Genlocus von PROS1 gezeigt.⁵¹ Johansson et al. beschrieben daraufhin große Deletionen, die mittels einer quantitativen PCR in 3 von 8 untersuchten Familien gefunden wurden.⁵² Die Einführung der MLPA vereinfachte die Detektion großer Deletionen innerhalb des Genoms und in einer weiteren Arbeit beschrieben Pintao et al. große Deletionen im PROS1-Gen bei 6 von 18 Patienten mit niedrigen Protein S-Werten und unauffälliger Sequenzierung.⁵³ Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv wies große Deletionen bei 6 Patienten aus 4 unterschiedlichen Familien auf und nach Ausschluss von Patienten unter hormoneller Kontrazeption und während der Schwangerschaft verblieb nur ein Fall einer Patientin mit Protein S-Aktivitäten unter 40% und vorbeschriebenem familiärem Protein S-Mangel, bei dem keine schädigende Veränderung des PROS1-Gens nachgewiesen wurde.

Diese Beobachtungen geben Grund zur Annahme, dass hereditäre Mangelzustände an Protein S nahezu immer mit einer Mutation im Bereich des PROS1-Gens in Verbindung stehen und hierin auch die thrombophile Neigung begründet ist. Somit wäre die moleku-

largenetische Untersuchung der Goldstandard der Protein S-Diagnostik, welcher die Diagnose einer Thrombophilie bei Protein S-Mangel sichern kann.

Ob niedrige erworbene Protein S-Spiegel selbst thromboseauslösend sein können oder nur ein Hämostasesystem mit verändertem Equilibrium zwischen thrombosefördernden und -verhindernden Faktoren darstellen, ist eine interessante Fragestellung, welche von Marlar et al. wiederholt diskutiert wurde.^{54 55} Diesbezüglich liefert die hier vorliegende Arbeit weitere Hinweise, in dem sie bei Kenntnis der PROS1-Genetik die Auswirkungen der Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten auf den Laborphänotyp untersucht. Patienten welche aufgrund grenzwertiger Protein S-Spiegel eine molekulargenetischen Diagnostik erhielten und darin unauffällig waren, haben unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten ein höheres Potenzial, diesen exogenen Stressfaktor auszugleichen und noch eine gewisse Menge an funktionellem Protein S zu bilden. Patienten mit Nachweis einer PROS1-Mutation zeigen unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten Protein S-Spiegel die an der Nachweisgrenze der verwendeten Testsysteme liegen. Aus der Beobachtung, dass sich das laboranalytische Bild unter Einwirkung eines exogenen Stressoren der Vitamin K-abhängigen Synthese besser differenziert, lassen sich interessante Überlegungen ableiten. Bei der Bestimmung der Protein S-Spiegel unter nativen Bedingungen handelt es sich um eine Momentaufnahme eines mehr oder minder im Gleichgewicht befindlichen Systems aus thromboseauslösenden und -verhindernden Faktoren. Entsprechend weit erstreckt sich der Bereich der messbaren Werte auch bei genetisch gesunden ohne Problem im Protein C/S-System auch über die klassischerweise verwendete Grenze der zweifachen Standardabweichung vom Mittelwert eines Referenzkollektivs hinaus. Umgekehrt haben Patienten mit heterozygot vorliegenden schädlichen Mutationen im PROS1-Gen durch Hochregulation der Transkription vom verbleibenden Gen die Möglichkeit an den Normalbereich heranreichenden Plasmaspiegel an funktionellem Protein S zu bilden. Auf diese Weise entsteht der weite Bereich über den sich genetisch Gesunde und Kranke im Protein S-System laborphänotypisch überlappen. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht darin, dass genetisch Gesunde das Potenzial haben bei erhöhtem Bedarf an Protein S, also bei verstärkter Thrombin- und Fibrinbildung durch thrombotische Prozesse, die Produktion anzuheben und damit adäquat zu reagieren, während Patienten mit heterozygoten Defektvarianten oder Deletionen bereits unter Normalbedingungen eine hochregulierte Protein S-Synthese haben und die Gefahr besteht, dass bei erhöhtem Bedarf das System entgleist und es zum thrombotischen Ereignis kommt.

Die konventionelle Klassifikation des Protein S-Mangels in einen von drei Typen geschieht auf der Grundlage des Laborphänotyps. Eine kongruente Erniedrigung von Aktivität und freiem Antigen wird als Typ I klassifiziert, während die Aktivitätsminderung bei normalem Antigennachweis als Typ II beschrieben wird und nach der Theorie ein dysfunktionelles Protein aufgrund einer Missensemutation darstellen soll.⁵⁶ Für einen als Typ III beschriebenen Phänotyp mit erniedrigter Aktivität und niedrigem freiem Protein S bei normalem totalem Antigengehalt konnte bislang kein kausaler Zusammenhang mit thromboembolischen Ereignissen hergestellt werden.⁵⁷ Auch die Beobachtung, dass der Wechsel von einem Typ zum anderen nicht nur bei Patienten mit der gleichen Mutation sondern auch bei ein und demselben Individuum zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufzutreten scheint, lässt die Frage aufkommen, wie sinnvoll diese Klassifikation ist. Dabei scheint die Überschätzung der Leistungsfähigkeit hämostaseologischer Labormethoden mit hohen Varianzkoefizienten aufgrund test-, chargen- und tagesspezifischer Faktoren nur ein Grund hierfür zu sein. Neben der Heterogenität der Mutationen im Protein S-Gen, die der Vorstellung eines eindeutig klassifizierbaren Mangelzustands widerspricht, scheint wie oben stehend ausgeführt auch der einmalig bestimmte Phänotyp im Sinne einer Momentaufnahme an sich nicht genügend aussagekräftig zu sein, um einen Schluss auf eine tatsächliche (genetisch) vorliegende Erkrankung im Sinne eines Mangelzustands zuzulassen. Es muss vielmehr angenommen werden, dass die laborchemischen Phänotypen von Menschen mit einem Defekt im Protein S-System und Normalpersonen sich weitgehend überlappen und die eigentliche Erkrankung erst bei Hinzukommen eines prothrombotischen Stressfaktors zum Ausdruck kommt, wenn der heterozygote Mangelzustand mit einer hochregulierten Genexpression dekompenziert.

Eine einfache Angabe der laborphänotypischen Parameter mag aufgrund dieser Überlegungen sinnvoller erscheinen als eine Klassifizierung in die Typen I bis III und deckt sich besser mit dem genetischen Befund, wie die vergleichende Analyse des Phänotyps bei Kenntnis des PROS1-Genotyps (Kap. 4.2.3.) dieser Arbeit belegt. Während Protein S-Aktivitätswerte zwischen 60 und 40% der Norm häufig erworbenen Zuständen zugeschrieben werden können oder durch Missense-Mutationen verursacht sind, sprechen konsistent unter 40% messbare Aktivitäten stark für das Vorliegen einer Mutation im PROS1-Gen und neben Nonsense-Mutationen müssen dann auch große Deletionen in Betracht gezogen werden, die nur mit Durchführung einer MLPA oder ähnlicher Verfahren überprüft werden können.

6. Zusammenfassung

Diese Arbeit liefert erstmals eine Phänotyp-Genotyp-Korrelation des Protein S-Mangels in einem größeren Kollektiv mit 136 molekulargenetisch auf Sequenzvarianten oder Deletionen im PROS1-Gen überprüften Patienten. Bezüglich des klinischen Phänotyps waren wegen der Auswahl der Patienten aus einem vorselektierten Thrombosekollektiv nur beschränkt Aussagen zu erwarten. Es zeigte sich jedoch, dass ein venös thromboembolisches Ereignis in der Eigen- oder Familienanamnese das entscheidende Kriterium für die Vortestwahrscheinlichkeit einer positiven PROS1-Genetik darstellt.

Die molekulargenetische Untersuchung des PROS1-Gens bezüglich Sequenzvarianten oder Deletionen konnte nahezu alle starken Verminderungen der Protein S-Aktivität und des freien Antigens auf eine ursächliche Mutation in diesem Gen zurückführen.

Bei der Analyse des laboranalytischen Phänotyps konnte der sinnvolle Einsatz der konventionellen Klassifikation nicht nachvollzogen werden. Die Klassifikation in einen Typ III mit normalem Gesamtprotein aber erniedrigtem freiem Protein wurde bereits von anderen Autoren als wenig aussagekräftig eingeschätzt. In dem hier untersuchten Kollektiv lieferte auch die Klassifikation in Typ I und II aufgrund der Korrelation von Aktivität und freiem Antigen in den verwendeten Testsystemen weder auf laboranalytischer noch genetischer Ebene unterscheidbare Gruppen. Eine eindeutige, hochsignifikante Korrelation bestand jedoch für das Ausmaß der Verminderung an Aktivität und freiem Antigen und dem molekulargenetischen Ergebnis. Große Deletionen und Nonsense-Mutationen zeigten die niedrigsten Restaktivitäten und freie Antigenspiegel. Es wird daher vorgeschlagen auf die Klassifikation in einen Subtyp zu verzichten und stattdessen lediglich die Aktivität und das freie Antigen als quantifizierbares Ausmaß des auf genetischer Ebene angenommenen Defekts anzugeben. Von einem Protein S-Mangel im Sinne einer Diagnose sollte nur bei wiederholt niedrigen Werten und thrombophiler Eigen- oder Familienanamnese gesprochen werden.

Die den Herstellerangaben zu entnehmenden unteren Grenzwerte der Referenzbereiche für Protein S-Aktivität und freies Antigen sollten als diagnostischer Cutoff nur unter Vorbehalt herangezogen werden. Diese Werte ergeben sich in der Regel aus der zweifachen Standardabweichung vom Mittelwert eines Kontrollkollektivs und bieten als Grenzwert zwar eine hohe Sensitivität, die aber mit einer hohen Rate an falsch Positiven erkaufft wird. Spezifitäten über 90% waren in den in dieser Arbeit angewandten Testsystemen erst unterhalb eines Cutoffs von 45% der Norm für Aktivität und freies Antigen gegeben.

Bei Betrachtung des laboranalytischen Phänotyps unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten zeigte sich, dass Patienten mit PROS1-Mutation Aktivitäten und freie Antigenwerte an der unteren Nachweisgrenze der Testsysteme aufwiesen, während genetisch unauffällige Patienten höhere Spiegel an funktionellem Protein S aufrecht erhalten konnten. Neben der praktischen Aussage, dass auch unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten erhobene Protein S-Werte diagnostische Hinweise liefern können, führt diese interessante Beobachtung zurück zu der eingangs erwähnten Perspektive auf hereditäre Thrombophilien als erbliche Defekte in einem komplex regulierten System. Die thrombophile Diathese der betroffenen Patienten kann über Jahre stumm verlaufen und selbst laboranalytisch nahezu unauffällig sein, da der heterozygote Defektzustand unter Normalbedingungen durch Hochregulation der Proteinsynthese und redundante antithrombotische Mechanismen ausgeglichen wird. Unter dem Einfluss eines Stressfaktors der Proteinsynthese (Vitamin K-Antagonist) oder bei erhöhtem Verbrauch (thrombogene Prozesse) gerät das System jedoch an seine Grenzen. Kommt es bei letzterem auch zum Versagen der Kompensationsmechanismen, kann sich die genetische Veranlagung als Thrombose manifestieren.

7. Abkürzungsverzeichnis

CI	Konfidenzintervall
HGMD	Human Genome Mutation Database
HR	Hazard Ratio
INR	International Normalized Ratio (standardisiertes Maß der Thromboplastinzeit)
LAE	Lungenarterienembolie
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PROS1	Symbol des Protein S-Gens
SVT	Sinusvenenthrombose
TPZ	Thromboplastinzeit
TIA	transiente ischämische Attacke
TVT	tiefe Venenthrombose
VKA	Vitamin K-Antagonist
VTE	venöse Thromboembolie oder venös thromboembolisches Ereignis

8. Danksagung

Für ihre Mithilfe bei der Etablierung des genetisch untersuchten Patientenkollektivs möchte ich den Kolleginnen und Kollegen der Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapie und Hämostaseologie des Klinikums der Universität München danken. Allen voran gilt der Dank Dr. Teresa Kauke, die vor mir mit der Erfassung der PROS1-Genetik bei den Patienten der Gerinnungsambulanz in einer Datenbank begonnen hatte. Meinen herzlichen Dank möchte ich ferner Dr. Christoph Marschall vom Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Martinsried für die Durchführung der molekulargenetischen Untersuchungen und Beratungen zu Fragen der Humangenetik sowie den medizinisch-technischen Assistentinnen der Gerinnungsambulanz Janet Abraham, Susanne Felsmann, Gabriele Gärtner, Mareen Kutsch und Michaela Müller, welche durch ihre jahrzehntelange Erfahrung auf dem Gebiet des hämostaseologischen Labors die hohe Qualität der Analysen garantierten, aussprechen. Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Spannagl als dem Betreuer dieser Arbeit für die Zuweisung dieses interessanten Themengebiets und die immer wieder beratende Unterstützung.

9. Literaturverzeichnis

- ¹ DiScipio RG, Davie EW. Characterization of protein S, a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma. *Biochemistry*. 1979;18:899-904.
- ² Walker FJ. Regulation of activated Protein C by a new protein. A possible function for bovine Protein S. *J Biol Chem* 1980; 255: 5521-5524.
- ³ Koenen RR, Tans G, van Oerle R et al. The APC-independent anticoagulant activity of protein S in plasma is decreased by elevated prothrombin levels due to the prothrombin G20210A mutation. *Blood*. 2003 Sep 1;102(5):1686-92.
- ⁴ Takeyama M, Nogami K, Saenko EL, Nishiya K, Ogiwara K, Shima M. Identification of a protein S-interactive site within the A2 domain of the factor VIII heavy chain. *Thromb Haemost*. 2009 Oct;102(4):645-55.
- ⁵ Takeyama M, Nogami K, Saenko EL, Soeda T, Nishiya K, Ogiwara K, Yoshioka A, Shima M. Protein S down-regulates factor Xase activity independent of activated protein C: specific binding of factor VIII(a) to protein S inhibits interactions with factor IXa. *Br J Haematol*. 2008 Nov;143(3):409-20.
- ⁶ Dahlback B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett*. 2005; 579:3310-3316.
- ⁷ Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood*. 2004 Feb 15;103(4):1192-201.
- ⁸ Burstyn-Cohen T, Heeb MJ, Lemke G. Lack of protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. *J Clin Invest*. 2009 Oct;119(10):2942-53.
- ⁹ Dahlbäck B. Purification of human C4b-binding protein and formation of its complex with vitamin K-dependent protein S. *Biochem. J*. 1983; 209: 847-856.
- ¹⁰ Wolf M, Boyer-Neumann C, Martinoli IL et al. A new functional assay for human protein S activity using activated factor Va as a substrate. *Thromb Haemostasis* 1989; 62:1144-1145.
- ¹¹ Serra J, Sales M, Chitolie A, et al. Multicentre evaluation of IL Test Free PS: a fully automated assay to quantify free protein S. *Thromb Haemost*. 2002;88:975-983.
- ¹² Van Cott EM, Ledford-Kraemer M, Meijer P, et al. Protein S assays: an analysis of North American Specialized Coagulation Laboratory Association proficiency testing. *Am J Clin Pathol*. 2005; 778-785.
- ¹³ Dykes AC, Walker ID, McMahon et al. A study of Protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol*. 2001; 113: 636-641.
- ¹⁴ Koenen RR, Thomassen MC, Tans G. Effect of oral contraceptives on the anticoagulant activity of protein S in plasma. *Thromb Haemost*. 2005;93:853-859.
- ¹⁵ Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Heiner Trobisch; <http://www.forschungslaboratorien-trobisch.de/publikationen/protein-s/>
- ¹⁶ García de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, et al. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost*. 2007;98:543-556.
- ¹⁷ Sanson BJ, Simioni P, Tormene D, et al. The incidence of venous thromboembolism in asymptomatic carriers of a deficiency of antithrombin, protein C, or protein S: a prospective cohort study. *Blood*. 1999;94:3702-3706.
- ¹⁸ ten Kate MK, van der Meer J. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia*. 2008;14:1222-1228.
- ¹⁹ Lijfering WM, Mulder R, ten Kate MK et al. Clinical relevance of decreased free protein S levels: results from a retrospective family cohort study involving 1143 relatives. *Blood*. 2009 Feb 5;113(6):1225-30.
- ²⁰ Mahmoodi BK, Brouwer JL, Ten Kate MK et al. A prospective cohort study on the absolute risks of venous thromboembolism and predictive value of screening asymptomatic relatives of patients with hereditary deficiencies of protein S, protein C or antithrombin. *J Thromb Haemost*. 2010 Jun;8(6):1193-200.

- ²¹ Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, et al. A study of protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol*. 2001;113:636-641.
- ²² Rodeghiero F, Tosetto A. The epidemiology of inherited thrombophilia: the VITA project. *Thromb Haemost*. 1997;78:636-640.
- ²³ Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, et al. Inherited thrombophilia, part 1. *Thromb Haemost*. 1996;76:651-662.
- ²⁴ Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med*. 2001;344:1222-1231.
- ²⁵ Heijboer H, Brandjes DPM, Buller HR, et al. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *N Engl J Med*. 1990;323:1512-1516.
- ²⁶ Melissari E, Monte G, Lindo VS, et al. Congenital thrombophilia among patients with venous thromboembolism. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1992;3:749-758.
- ²⁷ Simmonds RE, Ireland H, Lane DA, et al. Clarification of the risk for venous thrombosis associated with hereditary protein S deficiency by investigation of a large kindred with a characterized gene defect. *Ann Intern Med*. 1998;128:8-14.
- ²⁸ Makris M, Leach M, Beauchamp NJ, et al. Genetic analysis, phenotypic diagnosis, and risk of venous thrombosis in families with inherited deficiencies of protein S. *Blood*. 2000;95:1935-1941.
- ²⁹ Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, et al. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood*. 1998;92:2353-2358.
- ³⁰ Offelli P, Zanchetta M, Pedon L, et al. Thrombophilia in young patients with cryptogenic stroke and patent foramen ovale (PFO). *Thromb Haemost*. 2007;98:906-907.
- ³¹ Belvis R, Santamaria A, Marti-Fabregas J, et al. Patent foramen ovale and prothrombotic markers in young stroke patients. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2007;18:537-542.
- ³² Carod-Artal FJ, Vilela Nunes S, Portugal D. Thrombophilia and patent foramen ovale in young stroke patients. *Neurologia*. 2006;21:710-716.
- ³³ Sallah S, Abdallah JM, Gagnon GA. Recurrent warfarin-induced skin necrosis in kindreds with protein S deficiency. *Haemostasis*. 1998;28:25-30.
- ³⁴ Serra J, Sales M, Chitolie A, et al. Multicentre evaluation of IL Test Free PS: a fully automated assay to quantify free protein S. *Thromb Haemost*. 2002;88:975-983.
- ³⁵ Wolf M, Boyer-Neumann C, Martinoli JL, et al. A new functional assay for human protein S activity using activated factor V as substrate [letter]. *Thromb Haemost*. 1989;62:1144-1145.
- ³⁶ Ten Kate MK, Platteel M, Mulder R. PROS1 analysis in 87 pedigrees with hereditary protein S deficiency demonstrates striking genotype-phenotype associations. *Hum Mutat*. 2008;29:939-947.
- ³⁷ Reitsma PH, Ploos van Amstel HK, Bertina RM. 1994. Three novel mutations in five unrelated subjects with hereditary protein S deficiency type I. *J Clin Invest* 93:486-492.
- ³⁸ den Dunnen JT, Antonarakis SE. 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15:7-12.
- ³⁹ Pintao MC, Garcia AA, Borgel D, et al. Gross deletions/duplications in PROS1 are relatively common in point mutation-negative hereditary protein S deficiency. *Hum Genet*. 2009;126:449-456.
- ⁴⁰ Gandrille S, Borgel D, Eschwege-Gufflet V, et al. Identification of 15 different candidate causal point mutations and three polymorphisms in 19 patients with protein S deficiency using a scanning method for the analysis of the protein S active gene. *Blood*. 1995;85:130-138.
- ⁴¹ Beauchamp NJ, Daly ME, Cooper PC, et al. Molecular basis of protein S deficiency in three families also showing independent inheritance of factor V Leiden. *Blood*. 1996;88:1700-1707.
- ⁴² Fischer D, Porto L, Stoll H, et al. Intracerebral mass bleeding in a term neonate: manifestation of hereditary protein S deficiency with a new mutation in the PROS1 gene. *Neonatology*. 2010;98:337-340.

- ⁴³ Iwaki T, Mastushita T, Kobayashi T, et al. DNA sequence analysis of protein S deficiency: identification of four point mutations in twelve Japanese subjects. *Semin Thromb Hemost.* 2001;27:155-160.
- ⁴⁴ Duchemin J, Gandrille S, Borgel D, et al. The Ser 460 to Pro substitution of the protein S alpha (PROS1) gene is a frequent mutation associated with free protein S (type IIa) deficiency. *Blood.* 1995;86:3436-3443.
- ⁴⁵ Yamazaki T, Katsumi A, Kagami K, et al. Molecular basis of a hereditary type I protein S deficiency caused by a substitution of Cys for Arg474. *Blood.* 1996;87:4643-4650.
- ⁴⁶ Mustafa S, Pabinger I, Mannhalter C. A frequent mutation in the protein S gene results in cryptic splicing. *Br J Haematol.* 1997;97:555-557.
- ⁴⁷ Mustafa S, Pabinger I, Mannhalter C. Protein S deficiency type I: identification of point mutations in 9 of 10 families. *Blood.* 1995;86:3444-3451.
- ⁴⁸ Johansson AM, Hillarp A, Sall T, et al. Large deletions of the PROS1 gene in a large fraction of mutation negative patients with protein S deficiency. *Thromb Haemost.* 2005;94:951-957.
- ⁴⁹ Marlar RA, Gausman JN. Protein S abnormalities: a diagnostic nightmare. *Am J Hematol.* 2011;86:418-421.
- ⁵⁰ Mulder R, Ten Kate MK, Kluin-Nelemans HC, et al. Low cut-off values increase diagnostic performance of protein S assays. *Thromb Haemost.* 2010;104:618-625.
- ⁵¹ Lanke E, Johansson AM, Hillarp A, et al. Co-segregation of the PROS1 locus and protein S deficiency in families having no detectable mutations in PROS1. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1918-1923.
- ⁵² Johansson AM, Hillarp A, Sall T, et al. Large deletions of the PROS1 gene in a large fraction of mutation negative patients with protein S deficiency. *Thromb Haemost.* 2005;94:951-957.
- ⁵³ Pintao MC, Garcia AA, Borgel D, et al. Gross deletions/duplications in PROS1 are relatively common in point mutation–negative hereditary protein S deficiency. *Hum Genet.* 2009;126:449-456.
- ⁵⁴ Marlar RA, Potts RM, Welsh CW. A systems biology approach to the diagnosis of venous thrombosis risk. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2007; 18:215-216
- ⁵⁵ Marlar RA, Fink L, Miller J. Laboratory approach to thrombotic risk. In: McPherson RA, Pincus MR, eds. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* 22nd ed. New York, NY: Saunders; 2011: chap 41.
- ⁵⁶ García de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, et al. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost.* 2007;98:543-556.
- ⁵⁷ Libourel EJ, Bank I, Veeger NJ, et al. Protein S type III deficiency is no risk factor for venous and arterial thromboembolism in 168 thrombophilic families: a retrospective study. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005;16:135-140.