

Sebastian Dübgen*, Andrea Dick, Christoph Marschall und Michael Spannagl

Gerinnungsphysiologische und genetische Diagnostik bei hereditärem Protein S-Mangel

Coagulation testing and genetic diagnostics in hereditary protein S deficiency

Zusammenfassung: Thrombophilie, die Neigung zu rezidivierenden, idiopathischen Thromboembolien, wird heute als multifaktorielle Erkrankung im Sinne einer Dysbalance des komplex regulierten Hämostasesystems verstanden. Trotz intensiver Abklärung bleibt der genaue Defekt einer erblichen Thromboseneigung oft unbekannt. Eine anerkannte Ursache, welche bei etwa 1 bis 2% der Betroffenen identifiziert werden kann, ist ein Mangel an Protein S, welches indirekt als Kofaktor von aktiviertem Protein C die Thrombinbildung limitiert. Die Einschätzung der pathogenetischen Relevanz verminderter Protein S-Spiegel ist jedoch aufgrund der sehr viel häufiger vorkommenden erworbenen Protein S-Erniedrigung unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen (z.B. Einnahme einer hormonellen Kontrazeption oder systemische Inflammation) schwierig. Diese Arbeit eröffnet durch Hinzufügen aggregierter genetischer Daten von 136 Patienten 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.

Schlüsselwörter: Aktivität; freies Antigen; Genetik; MLPA; PROS1; Protein S; Thrombophilie; Vitamin K-Antagonist.

Abstract: Thrombophilia is the disposition for recurrent idiopathic thromboembolism and is currently seen as a multifactorial disease caused by a disbalance of complex regulated hemostasis. Despite intensive diagnostics the exact defect remains unknown in most cases. An established cause that can be diagnosed in 1–2% of affected individuals is a deficiency of protein S which limits thrombin formation as a cofactor of activated protein C. However, the evaluation of pathogenetic relevance of decreased protein S levels is difficult due to the much more often occurring acquired protein S deficiency under certain physiological or pathological circumstances, for example,

intake of hormonal contraceptives or systemic inflammation. By adding aggregated genetic data of 136 patients, this publication gives a new perspective on protein S diagnostics and indicates under which circumstances a real, genetic defined deficiency can be postulated with higher probability.

Keywords: activity; free antigen; genetics; multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA); PROS1; protein S; thrombophilia; vitamin K antagonist.

***Korrespondenz: Sebastian Dübgen,** Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapie und Hämostaseologie-Klinik für Anästhesiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München Ziemssenstr. 1, 80336 München, Deutschland, Tel.: +089-5160 7696, Fax: +089-5160 2556, E-Mail: sebastian.duebgen@googlemail.com

Andrea Dick and Michael Spannagl: Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapie und Hämostaseologie-Klinik für Anästhesiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Deutschland

Christoph Marschall: Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin, Dr. Klein, Dr. Rost und Kollegen, Martinsried, Deutschland

Einleitung

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 γ -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.

Material und Methoden

Von 2005 bis 2011 wurde in der Thrombophilieprechstunde der Gerinnungsambulanz des Klinikums der Universität München am Standort Innenstadt bei fast 6000 Patienten freies Protein S und Protein S-Aktivität bestimmt. Den Patienten wurde durch Venenpunktion Blut entnommen, welches für die Gerinnungsanalytik mit 1 auf 10 Volumenanteilen 0,109 M 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.

Die Patienten wurden entweder aufgrund eigener thromboembolischer Erkrankung, familiärer Thrombose-neigung oder aufgrund pathologischer Befunde in einem auswärtigen Labor in die Gerinnungsambulanz der Universität München überwiesen. Der Verdacht eines erblich bedingten Protein S-Mangels wurde aus klinischen

Gründen in 170 Fällen erhoben. Von den 170 Patienten, welche alle kaukasischer Abstammung waren, konnte bei 136 Patienten eine genetische Diagnostik bei schriftlich vorliegendem Einverständnis durchgeführt werden. Die Datenanalyse wurde retrospektiv durchgeführt.

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, Italien zum Einsatz [1]. Für die Aktivitätsmessung wurde das STA Protein S Clotting-Verfahren von Diagnostica Stago (Asnières, Frankreich) benutzt [2], welches die Protein S-Wirkung als Verstärkung der Protein C-Aktivität in einem Faktor Va-angereicherten Gerinnungssystem detektiert. Die Analysen wurden auf Geräten der Baureihe ACL-Top von Instrumentation Laboratory durchgeführt.

Molekulargenetische Untersuchung des PROS1-Gens

Entsprechend dem von Ten Kate et al. [3] vorgeschlagenen Protokoll mit den von Reitsma et al. ermittelten Primersequenzen [4] wurden alle 15 Exone des PROS1-Gens durch direkte doppelsträngige Sequenzierung auf Sequenzvarianten untersucht. Die Nummerierung der Nucleotide und Aminosäuren entspricht der konventionellen Nomenklatur [5]. Zum Vergleich der Sequenz mit dem Wildtyp wurde die PROS1 cDNA GenBank (RefSeq NM_000313.1) als Referenz herangezogen. 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 [6]. 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.

Ergebnisse

Phäno- und Genotyp des untersuchten Patientenkollektivs

Tabelle 1 stellt den klinischen und laboranalytischen Phänotyp des untersuchten Kollektivs einander gegenüber. Hieraus 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.

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 2 wieder. Insgesamt wurden 11 bekannte und 17 noch nicht beschriebene Mutationen gefunden.

Laboranalytischer Phänotyp des Protein S-Mangels

Die Bewertung erniedrigter Protein S-Werte ist nicht ohne weiteres möglich, da einige nur durch die Anamnese zu erfahrenen Faktoren zu einer erworbenen Protein

S-Erniedrigung führen können. Hierzu zählen die Einnahme hormoneller Kontrazeptiva, Schwangerschaft, systemische Inflammationszustände, Einschränkung der Leberfunktion oder Restwirkung eines Vitamin K-Antagonisten. Die genetische Untersuchung des PROS1-Gens stellt somit einen Goldstandard dar, welcher die Bewertung des Laborphänotyps erlaubt. Die nachfolgende Analyse erfolgt unter Ausschluss von Patienten unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten. Eine Übersicht über die aggregierten Daten der verbleibenden 105 Patienten zeigt Abbildung 1 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.

Die normalerweise verwendeten unteren Grenzwerte der Referenzbereiche von ca. 60% für die Aktivitätsmessung und 70% für das freie Antigen sind als gestrichelte Linien in Abbildung 1 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. Das Ergebnis der PROS1-Genetik ist farblich unterlegt und es ist ersichtlich, dass unterhalb der normalerweise angegebenen Grenzwerte eine größere Gruppe mit unauffälliger PROS1-Genetik anzutreffen ist und dass erst ab Protein S-Werten kleiner

Tabelle 1 Überblick des untersuchten Kollektivs im Hinblick auf laboranalytischen und klinischen Phänotyp angegeben als Absolutzahl der gefundenen Mutationen/untersuchten Patienten (anteilig in %).

Klinischer Phänotyp	Laboranalytischer Phänotyp			
	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	Gesamt
Eigenes VTE	28/47	7/27	1/12	36/86 (42%)
VTE in Familienanamnese	10/23	0/0	0/8	10/31 (32%)
Schlaganfall/TIA	1/5	0/4	0/0	1/9 (11%)
Abortneigung	0/0	0/0	0/1	0/1 (0%)
Gesund, keine Familienanamnese	1/8	0/0	1/1	2/9 (22%)
Gesamt	40/83 (49%)	7/31 (23%)	2/22 (9%)	49/136 (36%)

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

Tabelle 2 Laboranalytische, klinische und molekulargenetische Befund bei Patienten mit PROS1-Mutation.

Anzahl an Patienten ^a	Protein S		Klinische Manifestation	VTE in Familienanamnese	Mutationstyp	Exon	Basenaustausch ^b	Peptidsequenz ^b	In HGMD geführt
	Aktivität, %	Freies Antigen, %							
1	1	46	asymptomatisch	Ja	Missense	2	c.121C>T	p.Arg41Cys	Nein
2	2	30–52	TVT	Ja	Missense	2	c.122G>A	p.Arg41His	Ja [7]
3	1	31	TVT	Nein	Missense	2	c.200A>C	p.Glu67Ala	Ja [7]
4	3+1	38–53	TVT/LAE	Ja	Missense	2	c.233C>T	p.Thr78Met	Ja [7]
5	1+1	39	TVT	Nein	Missense	6	c.556T>C	p.Cys186Arg	Nein
6	1	39	TVT	Ja	Missense	6	c.557G>A	p.Cys186Tyr	Ja [8]
7	1	36	TVT/LAE	Nein	Missense	7	c.701A>G	p.Tyr234Cys	Ja [9]
8	1	38	TVT	Ja	Missense	7	c.727G>C	p.Asp243His	Ja [10]
9	1	79	TVT	Ja	Missense	10	c.1016T>A	p.Leu339Gln	Nein
10	2	41	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	asymptomatisch	Nein	Missense	11	c.1252A>T	p.Asn418Tyr	Nein
13	1+1	34–59	asymptomatisch	Ja	Missense	13	c.1501T>C	p.Ser501Pro	Ja [11]
14	3+3	29–39	TVT/LAE/SVT	Ja	Missense	13	c.1543C>T	p.Arg515Cys	Ja [12]
15	2	46–49	TVT	Ja	Missense	14	c.1676T>C	p.Ile559Thr	Nein
16	1	28	TVT	Nein	Nonsense	2	c.100C>T	p.Gln34X	Nein
17	1	VKA	TVT/LAE/SVT	Nein	Nonsense	2	c.150-152delA	p.Lys50A ^{snfs} X77	Nein
18	1	VKA	TVT	Nein	Nonsense	Intron 9	c.965+1delG	p.IVS9+1delG	Nein
19	1	VKA	TVT/LAE	Ja	Nonsense	Intron 9	c.965+4A>G	p.IVS9+4A>G	Nein
20	1	25	TVT	Ja	Nonsense	Intron 10	c.1155+1G>A	p.IVS10+1G>A	Nein
21	1	18	TVT	Nein	Nonsense	Intron 10	c.1155+5G>A	p.IVS10+5G>A	Ja [13]
22	1	29	TVT	Ja	Nonsense	11	c.1168G>T	p.Glu390X	Nein
23	1	VKA	LAE	Ja	Nonsense	11	c.1244dupA	p.Pro416Ala ^{fs} X22	Nein
24	2+1	13–25	TVT/LAE	Ja	Nonsense	12	c.1351C>T	p.Arg451X	Ja [14]
25	1	32	TVT/LAE	Ja	Nonsense	Intron 13	c.1645-1G>A	p.IVS13-1G>A	Nein
26	3	27	TVT	Ja	Nonsense	14	c.1570delC	p.Leu524 ^{fs} X525	Nein
27	1+1+2	13–27	TVT/LAE	Ja	Große Deletion	gesamtes Gen	delPROS1	delPROS1	Ja [15]
28	2	33–41	TVT/LAE	Ja	Große Deletion	9	c.891-?_965+?del	ex9del	Nein

^aPatienten aus unterschiedlichen Familien durch + getrennt; ^bNomenklatur gemäß der Human Genome Variation Society. VKA, Einnahme von Vitamin K-Antagonisten; TVT, tiefe Venenthrombose; LAE, Lungenarterienembolie; SVT, Sinusvenenthrombose.

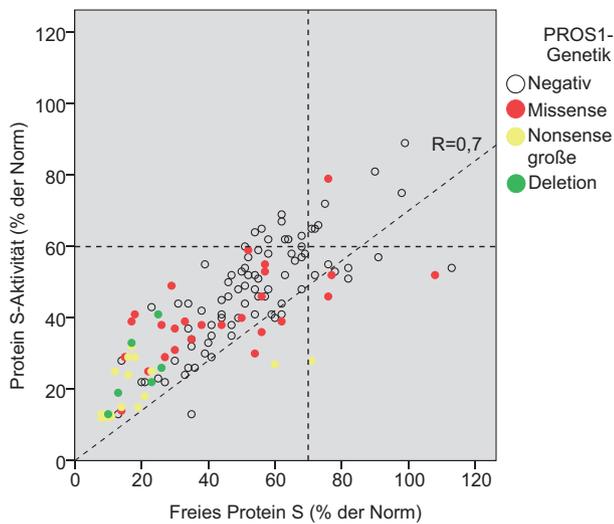


Abbildung 1 Korrelation von freiem Antigen und Aktivität von Protein S sowie des Ergebnisses der PROS1-Genetik im untersuchten Kollektiv unter Ausschluss von Patienten mit Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten (n=105). Durch gestrichelte Linien kenntlich gemacht sind die üblicherweise verwendeten unteren Grenzwerte des Referenzbereichs und eine Ratio von 0,7 als häufig verwendetes Kriterium für qualitative Defekte.

als 45% regelhaft mit einer durch Mutationen im Protein S-Gen definierten Erkrankung zu rechnen ist. Unter Annahme, dass die PROS1-Genetik inklusive der Deletionsdiagnostik 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.

Die Sensitivität und Spezifität von Aktivität und freiem Antigen für das Vorliegen einer PROS1-Mutation in den verwendeten Testsystemen wird in Tabelle 3 dargestellt. Die Cut-off-Werte an der zweifachen Standardabweichung eines Normalkollektivs (in den hier verwendeten Systemen ca. 60% bzw. 70% der Norm) bieten zwar eine hohe Sensitivität, jedoch nur geringe Spezifität. Die ROC-Analyse (Tabelle 4, Abbildung 2) der verwendeten Testsysteme Protein S-Aktivität und Protein S-freies Antigen, weist diese aber mit hoher Signifikanz ($p < 0,001$) als valide Instrumente zum Nachweis einer PROS1-Mutation aus. Die Verwendung niedrigerer Cut-off-Stellen erhöht die Spezifität, ohne die Sensitivität zu stark zu kompromittieren.

Bei 83 von 136 Patienten war neben Ausschluss einer Restwirkung eines Vitamin K-Antagonisten auch kein störender Einfluss durch hormonelle Kontrazeption oder Schwangerschaft anzunehmen. Abbildung 3 zeigt bei diesen die Protein S-Aktivität aufgliedert entsprechend des molekulargenetischen Ergebnisses. Zwischen den

Tabelle 3 Sensitivität und Spezifität für das Vorliegen einer PROS1-Mutation an verschiedenen Cut-off-Stellen für die Protein S-Aktivität und Protein S-freies Antigen. In Fettdruck stehen die von den Herstellern angegebenen unteren Grenzen des Referenzbereichs eines Normalkollektivs.

Cut-off, %	Protein S-Aktivität		Protein S-freies Antigen	
	Sensitivität, %	Spezifität, %	Sensitivität, %	Spezifität, %
35	50	98	58	95
40	68	98	58	95
45	76	86	63	91
50	84	74	63	81
55	92	48	71	67
60	97	29	82	50
65	97	17	87	43
70	97	7	87	31

Tabelle 4 Kenndaten der ROC-Analyse.

	Fläche unter der Kurve	p-Wert ^a
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

^aWahrscheinlichkeit für die Nullhypothese, dass die wahre Fläche gleich 0,5 ist.

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

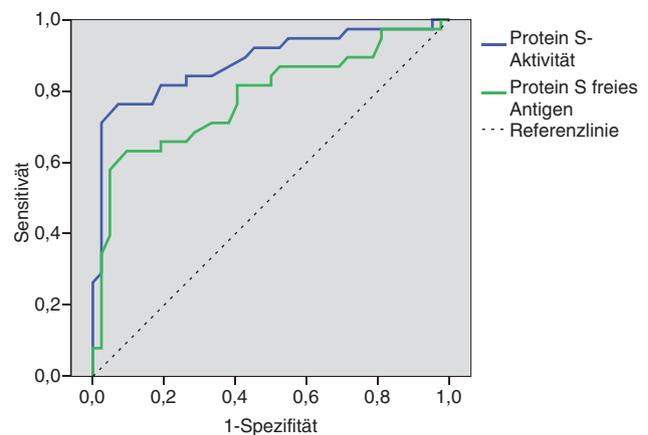


Abbildung 2 ROC-Kurven für Protein S-Aktivität und freies Antigen als Indikatoren für das Vorliegen einer PROS1-Mutation. Patienten unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten, hormoneller Kontrazeption oder bei Vorliegen einer Schwangerschaft waren ausgeschlossen.

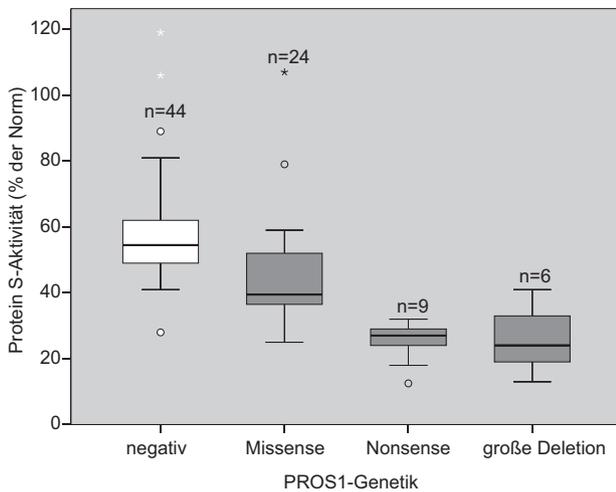


Abbildung 3 Darstellung der Protein S-Aktivität nach Mutationstyp als Boxplot-Diagramm.

Patienten unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten, unter hormoneller Kontrazeption oder Schwangerschaft sind ausgeschlossen.

erstgradigen Verwandten ebenfalls ein Protein S-Mangel beschrieben war, eine Deletion der nicht untersuchten Exone 3, 8 oder 14 vorliegt, bleibt spekulativ.

Eine entsprechende Betrachtung der Konzentrationen des freien Antigens (Tabelle 5) 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. 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.

Tabelle 5 Mittelwerte μ und Standardabweichungen σ der Protein S-Aktivität in% der Norm kategorisiert nach Mutationstyp.

Mutationstyp	Protein S-Aktivität		Freies Protein S-Antigen	
	n (Patienten)	$\mu \pm \sigma$, %	n (Patienten)	$\mu \pm \sigma$, %
keine Mutation	44	58 ± 16	42	63 ± 19
Missense	24	45 ± 18	23	47 ± 24
Nonsense	9	$25 \pm 6,1$	9	29 ± 22
große Deletion	6	26 ± 10	6	$19 \pm 6,7$

Ebenfalls signifikant ist der Unterschied zwischen Missense-Mutationen und Nonsensemutationen bzw. großen Deletionen ($p<0,05$ jeweils für beide Testverfahren), während Nonsensemutationen und große Deletionen nicht in Aktivität oder freiem Antigen unterschieden werden können.

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 4 und 5 exemplarisch für die Protein S-Aktivität dargestellt sind. Diese 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

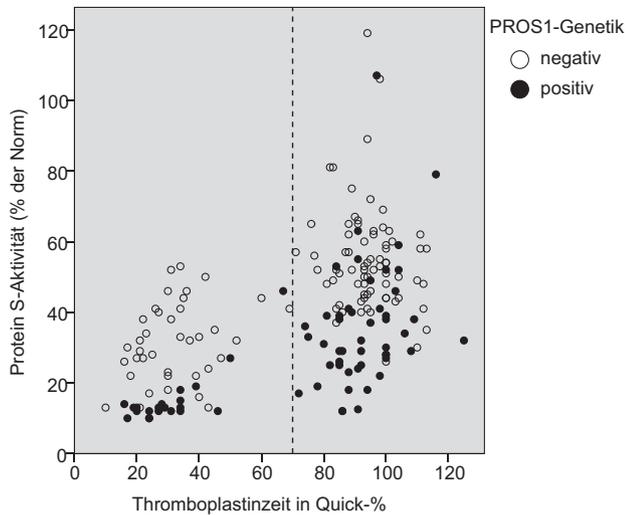


Abbildung 4 Streudiagramm mit Darstellung der Protein S-Aktivität in Abhängigkeit von der zeitgleich ermittelten Thromboplastinzeit und Kennzeichnung des molekulargenetischen Ergebnisses für Mutationen im PROS1-Gen. Markierung der unteren Grenze des Referenzbereichs der Thromboplastinzeit bei 70 Quick-% als gestrichelte Linie.

an der Nachweisgrenze. Mittels eines veränderten Cut-offs 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 6, Tabelle 6) kennzeichnet Aktivitäts- und freies Antigen-Messung als hochwertige Verfahren auch unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten.

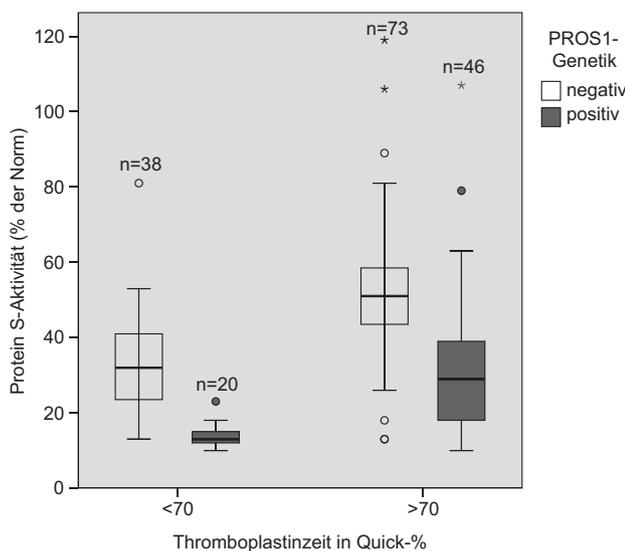


Abbildung 5 Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Protein S-Aktivität kategorisiert nach der Thromboplastinzeit mit Annahme der Wirksamkeit eines Vitamin K-Antagonisten bei Werten <70 Quick-%.

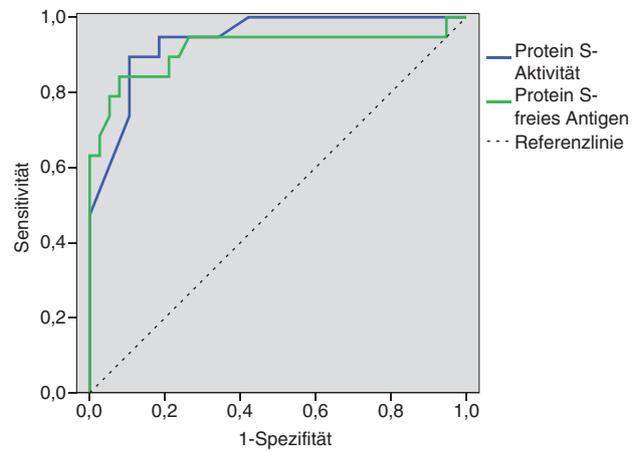


Abbildung 6 ROC-Kurven für Protein S-Aktivität und freies Antigen als Testvariablen für das Vorliegen einer PROS1-Mutation unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten (Einschlusskriterium Thromboplastinzeit <70 Quick-%).

Diskussion

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. 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.

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 Gausman [16] 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

Tabelle 6 Kenndaten der ROC-Analyse unter Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten.

	Fläche unter der Kurve	p-Wert ^a
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

^aWahrscheinlichkeit für die Nullhypothese, dass die wahre Fläche gleich 0,5 ist.

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. [17], 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 Cut-off-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%, was angesichts der sehr häufigen erworbenen Protein S-Erniedrigung völlig unbrauchbar erscheint. Über 90%ige Spezifitäten waren in beiden Testsystemen erst unterhalb eines Cut-offs von 45% zu erheben.

Lange Zeit gab die Beobachtung von konsistent niedrigen Protein S-Werten bei Patienten ohne pathologischen Befund in der PROS1-Sequenzanalyse den Experten Rätsel auf. Dennoch wurde in Kopplungsanalysen eine eindeutige Verbindung mit dem Genlocus von PROS1 gezeigt [18]. Johansson et al. beschrieben daraufhin große Deletionen, die mittels einer quantitativen PCR in 3 von 8 untersuchten Familien gefunden wurden [15]. 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 [6]. 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 molekulargenetische 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 [19, 20]. 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 molekulargenetische 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 heranreichende 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 [21]. Für einen als Typ III beschriebenen Phänotyp mit erniedrigter Aktivität und niedrigem freiem Protein S bei normalem totalen Antigengehalt konnte bislang kein kausaler Zusammenhang mit thromboembolischen Ereignissen hergestellt werden [22]. 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 Varianzkoeffizienten 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 dekompensiert.

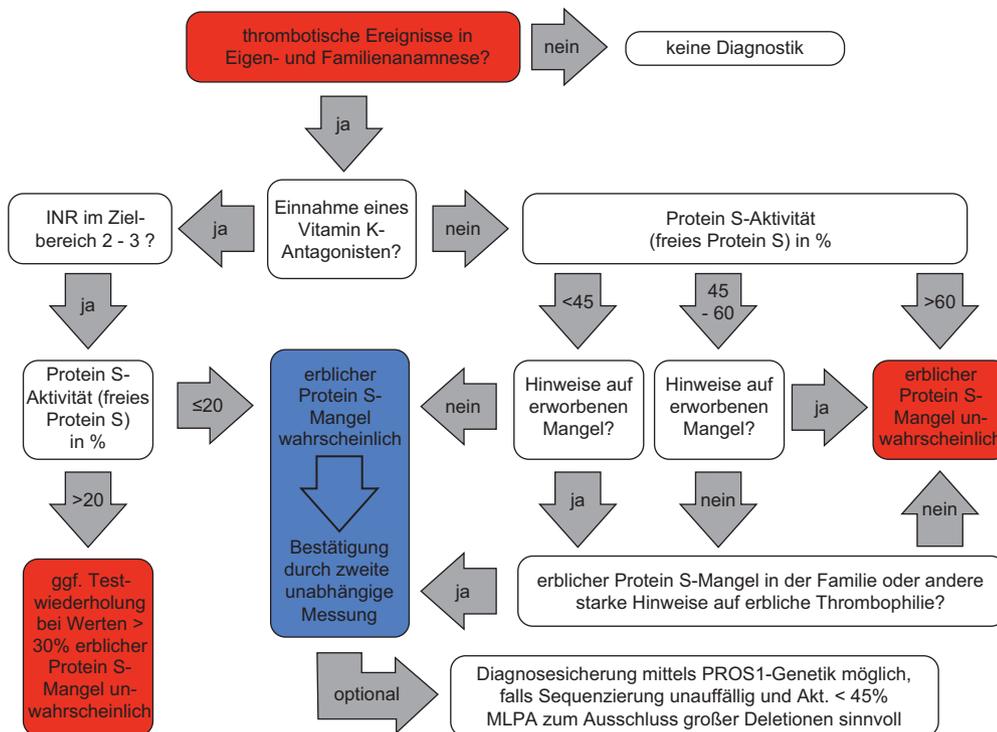


Abbildung 7 Algorithmus der Protein S-Diagnostik als Konsequenz aus den vorgestellten Daten. Die vorgegebenen Zahlen sind ungefähre Richtwerte, welche aus dem hier verwendeten Testsystem resultieren und ggf. einer individuellen Anpassung bedürfen.

Eine einfache Angabe der laborphänotypischen Parameter mag aufgrund dieser Überlegungen sinnvoll 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 dieser Arbeit belegt. Während Protein S-Aktivitätswerte zwischen 60 und 45% 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.

Die Schlussfolgerungen, die sich für die Protein S-Diagnostik im Alltag hieraus ergeben wurden in Abbildung 7 nochmals graphisch dargestellt. Dieser vorgeschlagene Algorithmus für die Protein S-Diagnostik kann Hilfestellung sein, bedarf aber möglicherweise bei Verwendung anderer Testsysteme eine entsprechende Korrektur.

Interessenkonflikt: Die Autoren erklären, dass keine wirtschaftlichen oder persönlichen Interessenkonflikte bestehen.

Literatur

- Serra J, Sales M, Chitolie A, Domenech P, Rossi E, Borrell M, et al. Multicentre evaluation of IL test free PS: a fully automated assay to quantify free protein S. *Thromb Haemost* 2002;88: 975–83.
- Wolf M, Boyer-Neumann C, Martinoli JL, Leroy-Matheron C, Amiral J, Meyer D, et al. A new functional assay for human protein S activity using activated factor V as substrate. *Thromb Haemost* 1989;62:1144–5.
- Ten Kate MK, Platteel M, Mulder R, Terpstra P, Nicolaes GA, Reitsma PH, et al. PROS1 analysis in 87 pedigrees with hereditary protein S deficiency demonstrates striking genotype-phenotype associations. *Hum Mutat* 2008;29: 939–47.
- Reitsma PH, Ploos van Amstel HK, Bertina RM. Three novel mutations in five unrelated subjects with hereditary protein S deficiency type I. *J Clin Invest* 1994;93:486–92.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 2000;15:7–12.
- Pintao MC, Garcia AA, Borgel D, Alhenc-Gelas M, Spek CA, de Visser MC, et al. Gross deletions/duplications in PROS1 are relatively common in point mutation-negative hereditary protein S deficiency. *Hum Genet* 2009;126:449–56.
- Gandrille S, Borgel D, Eschwege-Gufflet V, Aillaud M, Dreyfus M, Matheron C, 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: 130–8.
- Beauchamp NJ, Daly ME, Cooper PC, Makris M, Preston FE, Peake IR. Molecular basis of protein S deficiency in three families also showing independent inheritance of factor V leiden. *Blood* 1996;88:1700–7.
- Fischer D, Porto L, Stoll H, Geisen C, Schloesser RL. Intracerebral mass bleeding in a term neonate: manifestation of hereditary protein S deficiency with a new mutation in the PROS1 gene. *Neonatology* 2010;98:337–40.
- Iwaki T, Mastushita T, Kobayashi T, Yamamoto Y, Nomura Y, Kagami K, et al. DNA sequence analysis of protein S deficiency – identification of four point mutations in twelve Japanese subjects. *Semin Thromb Hemost* 2001;27:155–60.
- Duchemin J, Gandrille S, Borgel D, Feurgard P, Alhenc-Gelas M, Matheron C, 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: 3436–43.
- Yamazaki T, Katsumi A, Kagami K, Okamoto Y, Sugiura I, Hamaguchi M, et al. Molecular basis of a hereditary type I protein S deficiency caused by a substitution of Cys for Arg474. *Blood* 1996;87:4643–50.
- Mustafa S, Pabinger I, Mannhalter C. A frequent mutation in the protein S gene results in cryptic splicing. *Br J Haematol* 1997;97:555–7.
- Mustafa S, Pabinger I, Mannhalter C. Protein S deficiency type I: identification of point mutations in 9 of 10 families. *Blood* 1995;86:3444–51.
- Johansson AM, Hillarp A, Sall T, Zoller B, Dahlback B, Hallden C. Large deletions of the PROS1 gene in a large fraction of mutation-negative patients with protein S deficiency. *Thromb Haemost* 2005;94:951–7.
- Marlar RA, Gausman JN. Protein S abnormalities: a diagnostic nightmare. *Am J Hematol* 2011;86:418–21.
- Mulder R, Ten Kate MK, Kluin-Nelemans HC, Mulder AB. Low cut-off values increase diagnostic performance of protein S assays. *Thromb Haemost* 2010;104:618–25.
- Lanke E, Johansson AM, Hillarp A, Lethagen S, Zoller B, Dahlback B, et al. Co-segregation of the PROS1 locus and protein S deficiency in families having no detectable mutations in PROS1. *J Thromb Haemost* 2004;2:1918–23.
- Marlar RA, Potts RM, Welsh CH. A systems biology approach to the diagnosis of venous thrombosis risk. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007;18:215–7.
- Marlar RA, Fink L, Miller J. Laboratory approach to thrombotic risk. In: McPherson R, Pincus MR, editors. *Henry's clinical*

- diagnosis and management by laboratory methods. 22 edition. New York: Saunders, 2011:770–7.
21. Garcia de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost* 2007;98: 543–56.
 22. Libourel EJ, Bank I, Veeger NJ, Hamulyak K, Middeldorp S, Prins MH, 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;16:135–40.