

## Molekularbiologische Thrombophiliediagnostik

Ab sofort bietet das ZIMCL die Untersuchung folgender Mutationen an, die mit einem erhöhten Thrombophilierisiko assoziiert sind bzw. assoziiert sein sollen:

### **FV-Leiden (R506Q), FII-Prothrombin-Gen (G20210A), MTHFR C677T und A1298C**

**Wissenschaftlicher Hintergrund:** Angeborene oder erworbene Störungen im Hämostasesystem können das Risiko einer venösen thromboembolischen Erkrankung erhöhen. Die wichtigsten heute bekannten genetischen Risikofaktoren der Thrombophilie sind APC-Resistenz (FV-Leiden-Mutation), FII-Prothrombin-Genmutation- und MTHFR-Polymorphismus.

#### **FV-Leiden-Mutation / APC-Resistenz (OMIM-ID #188055)**

Benannt nach dem Entdeckungsort wurde die FV-Leiden-Mutation 1993 erstbeschrieben und gilt heute als häufigster erblicher Risikofaktor für Thrombophilie. Der Resistenz des Faktor V gegen aktiviertes Protein C (APC) liegt die Mutation Arg506Gln (FV-Leiden Mutation) zugrunde, wodurch Faktor Va zumindest zum Teil nicht mehr durch APC inaktiviert und proteolytisch abgebaut werden kann. In der Folge aktiviert Faktor Va als Teil des Prothrombinase-Komplex zusammen mit Faktor Xa und Phospholipiden vermehrt Prothrombin zu Thrombin, woraus eine gesteigerte Umsetzung von Fibrinogen zu Fibrin und somit Thromboseneigung resultiert.

Nativer Faktor V kann auch direkt durch APC an der Position Arg506 gespalten werden, wodurch ein anti-koagulatorisches Molekül (FVac) entsteht, welchem eine wichtige Funktion als APC- und Protein-S-CoFaktor bei der Inaktivierung von Faktor VIIIa zukommt. Durch die FV-Leiden Mutation kann keine Spaltung des Faktor V zu Vac erfolgen, was zu einer Beeinträchtigung der proteolytischen Inaktivierung von Faktor VIIIa führt.

4-6% der europäischen Bevölkerung weisen eine heterozygote FV-Leiden-Mutation auf, während die homozygote Form mit <0,5% weniger häufig vorkommt. Die heterozygote Ausprägung geht mit einem 5-10-fach erhöhten Risiko einher, das Risiko bei Homozygotie steigt auf das 30-fache. Bis zu 50% aller Thrombosepatienten weisen diese Mutation auf. Das Risiko für Thrombosebildung vervielfacht sich bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren wie Rauchen, oralen Kontrazeptiva oder Bestehen weiterer Thrombophilie auslösender Mutationen.

- *Clin Chem Lab Med* 2010 Nov 5. Diagnostic algorithm for thrombophilia screening (Review). Margetic S.
- *Thromb Haemost.* 2007;98:530-542. Coagulation factor V and thrombophilia: Background and mechanisms. Segers K, Dahlbäck B, Nicolaes GA.
- *Curr Opin Hematol.* 2004;11:176-181. Factor V Leiden: a disorder of factor V anticoagulant function. Castoldi E, Rosing J.
- *Am J Med.* 2004;117:19-25. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in two cohorts: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. Cushman M, Tsai AW, White RH, et al.
- *Adv Clin Chem.* 2009;49:121-57. Factor V Leiden and activated protein C resistance. Segers O, Castoldi E.
- *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131:866-71. Activated protein C resistance and factor V Leiden: a review. Rosendorff A, Dorfman DM.

### **FII-Prothrombin-Genmutation (OMIM-ID +176930)**

Prothrombin (Faktor II) ist die inaktive Vorstufe von Thrombin und bewirkt nach Aktivierung die proteolytische Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, wodurch ein stabiler Fibrin-Clot ausgebildet wird. Die FII-Prothrombin-Genmutation ist die zweithäufigste vererbte Thrombophilie-Ursache und bedingt durch eine Punktmutation an der Stelle 20210 von Guanin zu Adenosin. Damit sind erhöhte Prothrombin-Spiegeln assoziiert, was zu verstärkter Hyperkoagulabilität und lebenslang erhöhtem Thromboserisiko führt. Außerdem kann die Prothrombin-Mutation das Risiko für Abort und Präeklampsie erhöhen.

Die heterozygote Ausprägung der FII-Prothrombin-Genmutation kommt bei 1-3% aller Menschen vor und geht mit einem um 2-4-fach erhöhten Thromboserisiko einher. Die homozygote Mutation kommt bei 0,2% der Bevölkerung vor, das Thromboserisiko steigt dadurch auf das 6-fache. Die FII-Prothrombin-Mutation tritt häufiger bei Trägern der APC-Resistenz auf und erhöht bei doppelter heterozygoter Ausprägung das Risiko um das 20-60-fache.

- *N Engl J Med.* 1998;338:1793-7. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci PM.
- *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:511-8. Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism: prevalence and risk assessment. Salomon O, Steinberg DM, Zivelin A, Gitel S, Dardik R, Rosenberg N, Berliner S, Inbal A, Many A, Lubetsky A, Varon D, Martinowitz U, Seligsohn U.
- *Br J Haematol.* 2000;111:1223-9. The risk of venous thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Mannucci PM.

### **MTHFR C677T und A1298C-Genmutation (OMIM-ID 603174)**

Die Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) katalysiert die Synthese von 5-Methylentetrahydrofolat, einem Methylendonator für die Methioninsynthese und Vorläufer von S-Adenosyl-Methionin. Dieses Enzym ist somit essentiell für die Regeneration von Methionin aus Homocystein. Bei verminderter Umwandlung zu Methionin kann es zu erhöhten Homocystein-Serumkonzentrationen kommen, was arterielle Thrombosen und Atherosklerose begünstigen kann.

Die häufigste Mutationsvariante bei diesem Enzym ist eine Punktmutation in Position 677 (C677T), dadurch entsteht bei homozygoten Trägern eine thermolabile Variante der MTHFR mit etwa 50%igem Aktivitätsverlust. Die heterozygote Mutation ist mit einer Prävalenz von bis zu 40% der Bevölkerung sehr häufig, 5-20% sind homozygote Träger.

Eine zweite genetische Variante mit etwa der gleichen Häufigkeit bildet die Punktmutation an Position 1298 (A1298C). Auch dieser Polymorphismus der MTHFR ist mit einer verminderten Enzymaktivität assoziiert, homozygote Individuen besitzen etwa 60% der Enzymaktivität von Normalpersonen.

Heterozygote Individuen für beide Mutationen (C677T und A1298C) repräsentieren etwa 15% der Bevölkerung und weisen etwa 50–60% der Enzymaktivität von Normalpersonen auf, dies bedeutet eine niedrigere Aktivität als bei einer alleinigen heterozygoten C677T Mutation.

Ein erhöhtes venöses Thromboserisiko durch MTHFR-Mutationen ist bisher nicht eindeutig nachweisbar. Entscheidend für ein erhöhtes Risiko ist aber die Kombination mit weiteren prädisponierenden Faktoren, speziell mit einem gleichzeitigen Vitamin B12- und/oder Folsäure-Mangel. Die beiden Mutationen im MTHFR- Gen bedingen bei Individuen mit Faktor V-Leiden oder Prothrombin G20210-Mutation offenbar eine weitere Steigerung des Thromboserisikos. Beide MTHFR Mutationen sind offensichtlich auch verantwortlich dafür, dass weibliche Träger ein erhöhtes Risiko für wiederholte Aborte in der Frühschwangerschaft tragen.

Eine homozygote Mutation im MTHFR-Gen vom Typ 677T führt oft zu milden bis moderaten Erhöhungen der Homocysteinkonzentration im Plasma, speziell bei niedrigem B12- oder Folatstatus. Bei heterozygoten Trägern bleiben die Werte ohne zusätzlichen B12- und/oder Folsäure-Mangel im Referenzbereich.

Eine hetero- oder homozygote MTHFR- Mutation an Position 1298 scheint dagegen nur in Kombination mit einer hetero- oder homozygoten Mutation an Position 677 zu einer Erhöhung der Homocysteinkonzentration zu führen, wobei die Kombination homozygot 677T und heterozygot A1298C selten und die Kombination homozygot 677T und homozygot 1298C nicht auffindbar ist. Die weiteren beschriebenen Polymorphismen von Enzymen, die im Homocystein-Metabolismus beteiligt sind (wie MTR A2756G, MTRR A66G und CBS 844ins68), haben jedoch keinen oder nur einen geringen Einfluss auf den Homocysteinspiegel.

Unabhängig von der Bedeutung der MTHFR-Polymorphismen für ein erhöhtes Thromboserisiko wird rezent diskutiert, ob ein MTHFR-Polymorphismus möglicherweise auch ein Indikator einer Risikoerhöhung für das Bronchialkarzinom durch verminderte DNA-Reparatur-Mechanismen ist.

- *Genes Chromosomes Cancer. 2011;50:1-12.* Variants in folate pathway genes as modulators of genetic instability and lung cancer risk. Piskac-Collier AL, Monroy C, Lopez MS, Cortes A, Etzel CJ, Greisinger AJ, Spitz MR, El-Zein RA.
- *Clin Chem Lab Med. 2010; Nov 25.* Hyperhomocysteinemia and thrombophilia. Bozic-Mijovski M.
- *Semin Thromb Hemost. 2006;32:716-23.* Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolism. Cattaneo M.
- *Am J Hum Genet. 1988;43:414-21.* Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G.

### **Pharmakogenetische Bedeutung der MTHFR C677T und A1298C-Polymorphismen**

Die MTHFR spielt als Schlüsselenzym des Folsäurestoffwechsels auch eine wichtige Rolle im Rahmen der therapeutischen Wirkung von Folsäureantagonisten wie Methotrexat.

Bei heterozygoten oder homozygoten Punktmutationen im MTHFR-Gen an Position 677 und/oder 1298 ist die Enzymaktivität vermindert, daraus kann ein höheres Risiko für toxische Nebenwirkung durch Methotrexat folgen, speziell wenn keine Folatsupplementierung erfolgt. Die Aktivität der MTHFR ist bei alleiniger Mutation an Position 1298 deutlich weniger reduziert als bei Mutation an Position 677 oder bei kombinierter Mutation an beiden Positionen.

Ob durch Bestimmung des MTHFR-Genotyps vor einer MTX-Therapie ein entsprechendes Risiko für erhöhte Toxizität erkannt werden kann und ggf. eine individuelle Dosisanpassung vorgenommen werden soll, wird kontroversiell diskutiert. Falls keine sonstigen Mutationen im MTHFR-Gen vorliegen, kann davon ausgegangen werden, dass bei **einer homozygoten MTHFR-Mutation (Typ 677TT; Prävalenz 5-20%) die Enzymaktivität in der Regel signifikant reduziert ist (etwa 50%iger Aktivitätsverlust) und ein erhöhtes Risiko für toxische Nebenwirkungen von MTX besteht.** Bei einer heterozygoten Mutation an Position an 677 (Typ C677T) im MTHFR-Gen ist die Enzymaktivität leicht reduziert, das Risiko für eine Toxizität von MTX ist höchstens geringfügig erhöht.

Im Gegensatz dazu haben heterozygote bzw. homozygote Mutationen an Position 1298 (A1298C) trotz verminderter MTHFR-Aktivität offenbar keine signifikante Auswirkung auf die Toxizität von MTX.

- *Eur J Cancer 2009;45:1333-1351.* C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. De Mattia E, Toffoli G.
- *Rheumatology 2007;46:1520-1524.* The pharmacogenetics of methotrexate. Hider SL, Bruce IN, Thomson W.

## INDIKATIONEN:

Bei der Einschätzung des Thromboembolierisikos haben v.a. klinische Faktoren – wie Ort, Ausdehnung und Umstände bereits aufgetretener Thromboembolien – die stärkste Aussagekraft. Das Thrombophilie-Screening kann und soll eine gute klinische Einschätzung nicht ersetzen. Die Indikationen für Thrombophilie-Untersuchungen und auch die daraus zu ziehenden klinischen Konsequenzen sind unscharf definiert und daher kontroversiell. **Übereinstimmung herrscht, dass eine Patientenselektion erfolgen soll.**

## WEN TESTEN?

Patienten

- mit einer venösen Thrombose oder Embolie ohne erkennbare Ursache vor dem 50. Lebensjahr
- mit rezidivierenden, spontanen, venösen Thromboembolien
- mit unerklärlichen, atypisch lokalisierten (Portalvene, Mesenterialvenen, Nierenvenen, Sinusvenen etc.) Thrombosen
- unerklärliche, wiederholte (3-malige) Spontanaborte
- spontane venöse Thrombosen oder Embolien in der Familienanamnese
- Asymptomatische Individuen mit thrombophiler Familienanamnese (Antithrombin, Protein C-, oder Protein S-Defizienz, homozygote FV-Leiden-Mutation, homozygote FII-Prothrombin-Mutation, „Compound“ heterozygote Familienmitglieder)
- Rekurrente venöse Thromboembolien unter „adäquater“ Antikoagulation

## VORGANGSWEISE:

**Probenmaterial:** 3 ml EDTA-Blut. Bei längeren Transportzeiten (>30 min) ist die Probenanlieferung bei 4-8°C erforderlich (nicht frieren!).

**Anforderung:** Mittels speziellem Beleg „PatientInnen-Information und Einverständniserklärung“ und entsprechender Auswahl der geplanten Genanalyse – vollständig ausgefüllt und von untersuchter Person und zuweisendem Arzt unterschrieben.

Bei Rückfragen: Tel.: 81590 (BMA Werner Wohlfarter), 82549 (Prof. Dr. G. Weigel)

**Methode:** Aus der Blutprobe wird genomische DNA isoliert und der zu untersuchende Genabschnitt amplifiziert. Der Mutationsnachweis erfolgt durch Sondenhybridisierung.

**Ergebnis der Untersuchung:** 1 Woche nach Probeneingang.

Für weitere Fragen stehen wir gerne zur Verfügung



Ao. Univ. Prof. Dr. Günther Weigel



Univ. Prof. Dr. Andrea Griesmacher

Innsbruck, Januar 2011