

Genotypische Variation bei *Borrelia burgdorferi*: Konsequenzen für die molekularbiologische Diagnostik

Genotypic variation of *Borrelia burgdorferi*: Consequences for diagnosis in molecular biology

R. Wallich¹, Claudia Helmes¹, U. E. Schaible², M. M. Simon², Sabine E. Moter³ und M. D. Kramer³

¹ Angewandte Immunologie (FS 0440), Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280, W-6900 Heidelberg

² Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Stübeweg 51, W-7800 Freiburg

³ Institut für Immunologie und Serologie der Universität Heidelberg

Zusammenfassung:

In dem vorliegenden Übersichtsartikel werden Untersuchungen zur genotypischen und phänotypischen Heterogenität von *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose, vorgestellt. Diese Analysen sind eine Voraussetzung für die Entwicklung standardisierter und die gesamte Art umfassender diagnostischer Testsysteme. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper mit Spezifität für *Borrelia-burgdorferi*-Antigene wurden die Gene aus bakteriellen Expressionsbanken isoliert und sequenziert. Die entschlüsselten Genstrukturen bilden die Grundlage für verschiedene molekularbiologische Analysemethoden. Darüber hinaus wurden rekombinante Antigene von den klonierten *Borrelia-burgdorferi*-Genen in *Escherichia coli* exprimiert und gereinigt. Durch immunologische Untersuchungen im Tiermodell konnte ein rekombinantes *Borrelia-burgdorferi*-Antigen (*OspA*) als potentieller Kandidat für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen die Lyme Borreliose identifiziert werden. Es wird deutlich, daß sich aus der Gesamtheit der erzielten Ergebnisse richtungweisende Ansätze für die molekularbiologische Diagnostik der *Borrelia-burgdorferi*-Infektion und die Impfstoffentwicklung ergeben.

Schlüsselwörter:

Borrelia-burgdorferi-Infektion – antigenische Variation und Heterogenität – rekombinante Proteine – Genklonierung – Molekularbiologie – Impfstoff – Übersicht

Summary:

In this review the analysis of genotypic and phenotypic heterogeneity among the species *Borrelia burgdorferi*, the causative agent of Lyme borreliosis, is presented. Understanding antigenic heterogeneity is a prerequisite for the development of standardized and species-specific diagnostic assay systems. By using monoclonal antibodies directed against *Borrelia burgdorferi*-associated antigens the respective genes were isolated from bacterial expression libraries and analyzed by DNA sequencing. The availability of sequence information is the basis for several molecular assay systems, e.g. the polymerase chain reaction. Furthermore, recombinant *Borrelia burgdorferi* proteins have been hyperexpressed in *Escherichia coli*. One recombinant *Borrelia burgdorferi* antigen (*OspA*) induced a protective immune response in an experimental animal and is thus a candidate for the development of a vaccine against Lyme disease. Taken together, our studies disclosed new aspects for the molecular diagnosis of the *Borrelia burgdorferi* infection and for vaccine development.

Keywords:

Borrelia burgdorferi infection – antigenic variation and heterogeneity – recombinant proteins – gene cloning – molecular biology – vaccine – review

Einleitung

Die Lyme-Borreliose ist die wichtigste durch Arthropoden übertragene Infektionskrankheit in den gemäßigten Brei-

ten (1). Die durch die Spirochäte *Borrelia burgdorferi* verursachte Erkrankung verläuft in Stadien (2). Die Diagnose einer *Borrelia-burgdorferi*-Infektion erfolgt in erster Linie aufgrund klinischer Kriterien, die bei klar definierten Mani-

Übersicht

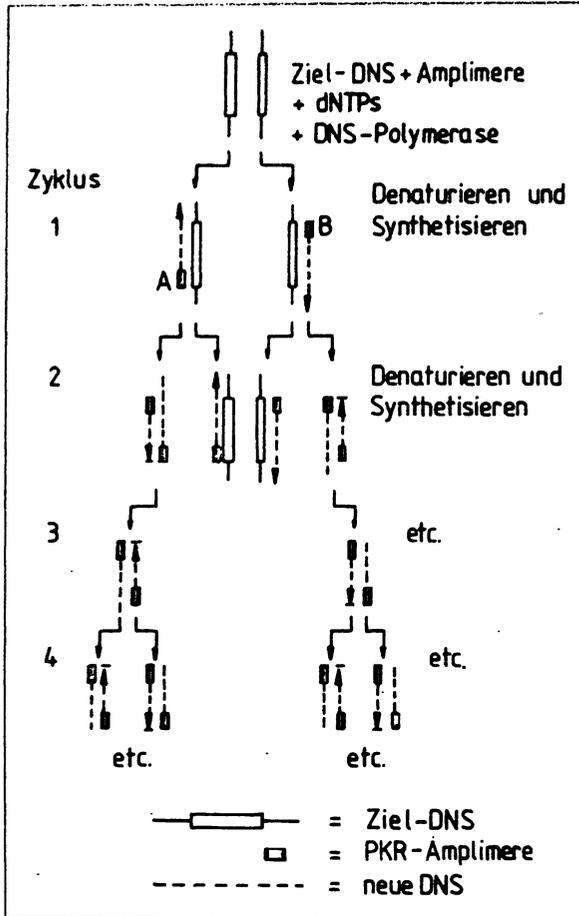


Abb. 1: Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion besteht in der zyklischen Wiederholung der drei Teilschritte Denaturierung der DNS, Anlagerung von Oligonukleotidprimern als Startermolekül für die DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus* und Synthese des neuen Stranges.

festationsformen, z.B. Erythema chronicum migrans, möglicherweise auch in Verbindung mit einer Zeckenbiß-Anamnese, kaum Probleme bereitet (3, 4). Bei eher uncharakteristischer klinischer Symptomatik, wie sie bei systemischen Manifestationsformen der Infektion, z.B. Karditis, Neuritis, Arthritis gefunden wird, ist für den Kliniker eine Unterstützung durch laboratoriumsdiagnostische Befunde notwendig.

In Analogie zu anderen Infektionskrankheiten ist auch bei der Lyme-Borreliose die Erhärtung oder das Verwerfen einer klinischen Verdachtsdiagnose das Ziel einer laboratoriumsdiagnostischen Maßnahme. Gegenwärtig gibt es zwei grundsätzliche Ansätze zum Nachweis einer *B. burgdorferi*-Infektion: den „direkten“ Erregernachweis, z.B. Anzucht, Immunhistologie und den „indirekten“ Erregernachweis, z.B. über spezifische Antikörperantwort gegen *B. burgdorferi*, Nachweis erregerspezifische DNS über die sog. Polymerase-Kettenreaktion/PCR. Die momentane Routine-Diagnose der *B. burgdorferi*-Infektion erfolgt

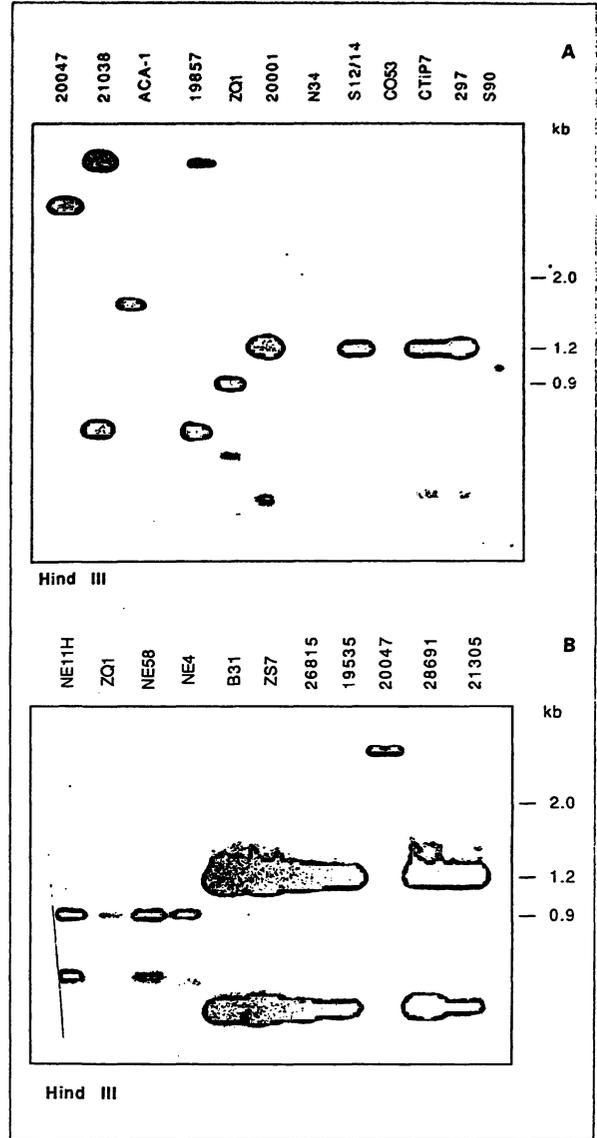


Abb. 2: Bandenmuster nach Verdauung von *B. burgdorferi*-Gesamt-DNS mit dem angezeigten Restriktionsenzym und anschließender Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Gen-Sonde: A = *OspA*; B = *fla*.

durch Nachweis von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* im ELISA. Allerdings mangelt es zur Zeit an standardisierten Testsystemen mit hoher Spezifität und Sensitivität (5, 6).

Im folgenden werden Untersuchungen zur genotypischen Heterogenität innerhalb der Art *B. burgdorferi* vorgestellt und die Konsequenzen für die Weiterentwicklung der diagnostischen Methoden, z.B. über rekombinante Proteiné, DNS-Sonden, PCR-Primer, bewertet diskutiert. Einzelheiten finden sich in der angegebenen Literatur.

Tab. 1: ECM, Erythema chronicum migrans; ACA, Acrodermatitis chronica atrophicans; AD, Atrophodermie; CSF, Liquor; n.d., nicht durchgeführt; fla, Flagellin Gen; HSP60, Hitze-Schock-Protein 60 kDa; HSP70, Hitze-Schock-Protein 70 kDa; OspA, Outer surface protein A.

B.-burgdorferi-Isolat	Biologischer Ursprung	Geografischer Ursprung	Genotyp Chromosomale Gene (fla/HSP60/Hsp70)	Genotyp Plasmid-Gen (OspA)	Genotyp Chromosomales Gen (IpLA7)
B31	Zecke (I. dammini)	USA	AAA	I	1
ZS7	Zecke (I. ricinus)	Deutschland	AAA	I	1
Z37	Zecke (I. ricinus)	Deutschland	AAA	I	n.d.
GeHo	Haut (ECM)	Deutschland	AAA	I	n.d.
B1	Haut (ECM)	Deutschland	AAA	I	n.d.
B2	Haut (ECM)	Deutschland	AAA	I	n.d.
B3	Haut (AD)	Deutschland	AAA	I	n.d.
20004	Zecke (I. ricinus)	Frankreich	AAA	I	n.d.
19535	Weißfußmaus (Peromyscus)	USA	AAA	I	1
26816	Wühlmaus (Microtus)	USA	AAA	I	n.d.
28691	Zecke (I. dammini)	USA	AAA	I	1
21305	Weißfußmaus (Peromyscus)	USA	AAA	I	1
21343	Weißfußmaus (Peromyscus)	USA	AAA	I	n.d.
26815	Hörnchen (Tamias)	USA	AAA	I	1
297	CSF	USA	AAA	I	n.d.
Mac3	Haut	USA	AAA	I	n.d.
20001	Zecke (I. ricinus)	Frankreich	AAA	I	n.d.
CTIP7	Hunde Zecke	USA	AAA	I	n.d.
SH-2-82	Zecke (I. dammini)	USA	AAA	I	n.d.
CA-2-87	Zecke (I. pacificus)	USA	AAA	I	n.d.
S12/14	Zecke (I. ricinus)	Deutschland	AAA	I	n.d.
IP1	CSF	Frankreich	AAA	I	1
NE2	Zecke (I. ricinus)	Schweiz	AAA	I	n.d.
R7NE4	Zecke (I. ricinus)	Schweiz	AAA	I	n.d.
LW2	Haut	Deutschland	AAA	I	n.d.
LW2.4	Haut	Deutschland	AAA	I	n.d.
ZQ1	Zecke (I. ricinus)	Deutschland	BBB	II	2
NE4	Zecke (I. ricinus)	Schweiz	BBB	II	2
NE58	Zecke (I. ricinus)	Schweiz	BBB	II	2
NE11H	Zecke (I. ricinus)	Schweiz	BBB	II	2
IP3	CSF	Frankreich	BBB	II	2
R3NE2	Zecke (I. ricinus)	Schweiz	BBB	II	n.d.
N34	Zecke (I. ricinus)	Deutschland	BBB	II	n.d.
20047	Zecke (I. ricinus)	Frankreich	BBB	V	5
S90	Zecke (I. ricinus)	Deutschland	BBB	VI	6
19857	Kaninchen Niere	USA	B(A/B)A	III	3
21038	Larve (I. dentatus)	USA	B(A/B)A	III	3
ACA-1	Haut (ACA)	Schweden	BBA	IV	4
Bo23	Haut (ECM)	Deutschland	BBA	IV	4
So2	Zecke (I. ricinus)	England	BBA	IV	4

Methoden

DNS-Extraktion aus Spirochäten und Southern blot-Hybridisierung

Gesamt-DNS wurde aus 10^{10} Zellen verschiedener *B.-burgdorferi*-Isolate gewonnen. Nach Waschen in PBS wurde die Organismen in 10 ml TE-Puffer resuspendiert und für 15 min bei 30°C mit Lysozym (5 mg/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml SDS-Lösung (20%) lysiert und die gelöste DNS präzipitiert. Nach Auflösen der DNS in TE-Puffer wurden 5 µg DNS mit 100 U der angegebenen Restriktionsendonuklease über Nacht verdaut. Die verdauten DNS-Proben wur-

den in 0,7%igen Agarose-Gelen nach Molekulargewicht aufgetrennt. Zur alkalischen Denaturierung der DNS wurde das Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel für 1 h in 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH eingelegt und kurz mit Aqua dest. abgespült. Zur Neutralisierung wurde das Gel anschließend für 1 h in 1 M Tris-HCl pH 8/1,5 M NaCl inkubiert. Danach erfolgte ein Transfer der DNS-Fragmente auf Nylon-Membranen (Hybond-N; Amersham) und die DNS wurde durch UV-Bestrahlung kovalent an die Membran gebunden. Die Membranen wurden mit radioaktiven Sonden hybridisiert. Entweder wurde eine [32 P]-markierte OspA-, fla-, IpLA7-, HSP60- oder HSP70-Sonde über Nacht bei 65°C mit den Membranen inkubiert. Nach Waschen in 40 mM NaHPO₄ pH 7,2, 1% SDS für 30 min bei Raumtem-

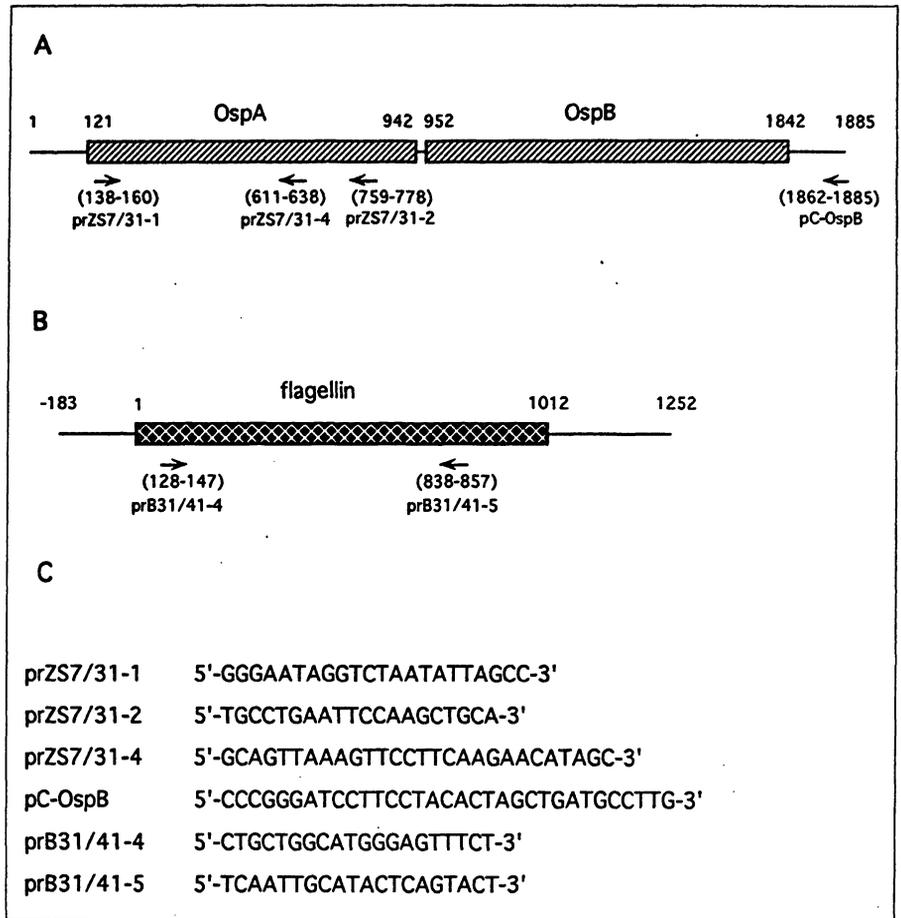


Abb. 3: Schematische Darstellung des Osp-Operons (A) und des fla-Gens (B) von *B. burgdorferi* mit Lokalisation der verwendeten Oligonukleotid-Primer. Gezeigt sind die Positionen (Nukleotidsequenz) und die Orientierung (Pfeile) der individuellen Primer. Die Nukleotidsequenz des OspA/OspB-Operons vom *B.-burgdorferi*-Stamm ZS7, und die Sequenz des fla-Gens vom *B.-burgdorferi*-Stamm B31 wurden zugrunde gelegt. Die proteinkodierenden Regionen sind hervorgehoben. (C) Nukleotidsequenzen der benutzten Oligonukleotid-Primer.

peratur wurde die Membran mit einem Kodak XAR-5-Film bei -80°C für 1 bis 12 h autoradiografiert. Anschließend konnten die radioaktiv markierten Sonden durch Waschen in 300 ml TE + 1% SDS bei 95°C von den Membranen entfernt werden und so zur erneuten Hybridisierung verwendet werden (7).

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird mittels einer thermostabilen DNS-Polymerase eine DNS-Sequenz in vitro amplifiziert. Die Enden der Sequenz werden durch zwei zur DNS-Matrize komplementäre Oligonukleotidprimer bestimmt. Die zyklische Wiederholung der drei Reaktionsschritte, Denaturierung des DNS-Doppelstranges, Anlagerung der Oligonukleotide als Startermoleküle der Reaktion und Synthese des neuen DNS-Stranges führen zu einer im Idealfall exponentiellen Zunahme der Kopienzahl der DNS-Zielsequenz (Abb. 1). Die Reaktionsansätze wurden in einem elektronisch gesteuerten PCR-Gerät mit integriertem Wasserbad (Thermocycler 60, Biomed) inkubiert. Ein PCR-Ansatz wird in der Regel mit 10 ng Gesamt-DNS in einem Volumen von 100 μl durchgeführt. Im Normalfall wurden 35 Zyklen nach folgendem Schema durchgeführt: 1,5 min bei 94°C , 1 min bei 45°C ; 2 min bei 74°C .

Jeder Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 800 mM dNTP's, 2,5 U Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim), 1,5 mM MgCl_2 , 0,5 M KCl, 0,1 M Tris pH 8,3 und 0,5 mM Oligonukleotid-Primer. Die Nukleotidsequenz der Primer ist in Abb. 3 dargestellt. Jeweils 10 ml des Reaktionsansatzes wurden am Ende des Zyklus in einem 1,5%igen Agarose-Gel analysiert (8).

Ergebnisse

Nachweis genotypischer Heterogenität mit Hilfe des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

In der vorliegenden Arbeit wurden vier chromosomal lokalisierte Gene (*fla*, HSP60, HSP70, *lplA7*) sowie ein Plasmid-assoziiertes Gen (*OspA*) mit Hilfe der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse untersucht (9-11). Auf Grund der Bandenmuster, die nach Verdau von *B.-burgdorferi*-DNS mit dem Restriktionsenzym HindIII und anschließender Hybridisierung mit einer flaspezifischen Gen-Sonde erzielt wurden, konnten alle getesteten *B.-burgdorferi*-Isolate zwei Gruppen zugeordnet werden: Isolate der ersten Gruppe mit dem Referenzstamm ZS7 (Genotyp A) werden durch eine Bande mit der

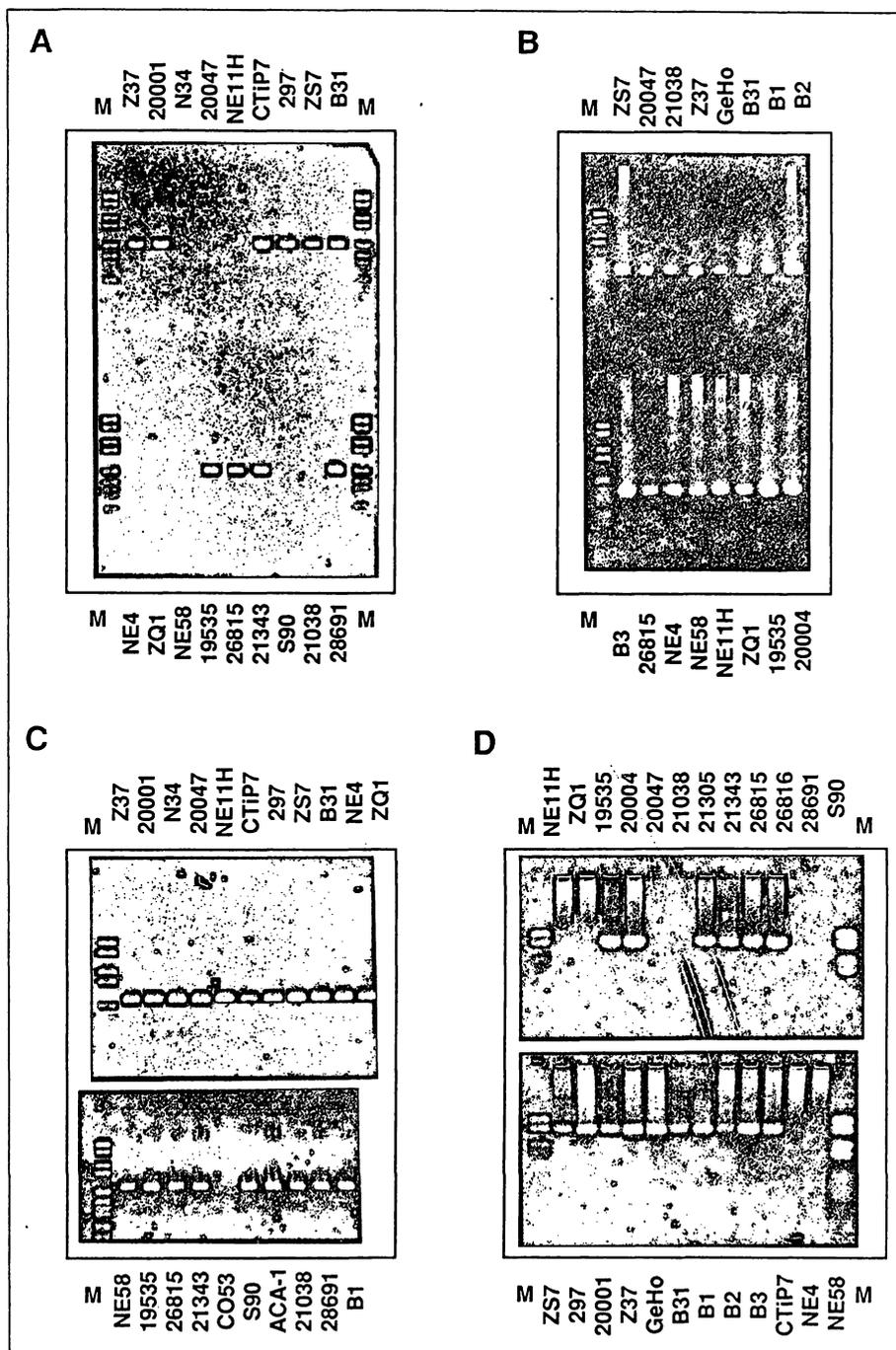


Abb. 4: PCR-Amplifikation von *B. burgdorferi*-Gen-Segmenten. Die DNS der individuellen Stämme ist an der Ober- und Unterseite der Abbildungen angeführt. 10% des Reaktionsvolumens wurden in jeder Spur aufgetragen. Die Agarose-Gele wurden nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt. Folgende Primer-Paare wurden benutzt: (A) prZS7/31-1 + prZS7/31-2; (B) prZS7/31-1 + prZS7/31-4; (C) prB31/41-4 + prB31/41-5; (D) prZS7/31-1 + pC-OspB. Die Spur mit den Molekulargewichtsmarkern ist durch ein M gekennzeichnet und die einzelnen DNS-Fragmente haben folgende Längen: 2,2, 1,8, 1,2, 1,0, 0,65, 0,5, 0,45, 0,4, 0,3, 0,2 und 0,15 kb (von oben).

Größe von 1,5 kb ausgezeichnet; die zweite Gruppe (Genotyp B – Referenzstamm ZQ1) weist zwei Banden mit einer Größe von 1,2 und 0,3 kb auf. Andere immunologisch relevante Strukturen von *B. burgdorferi*, die durch chromosomale Gene kodiert werden, die Hitzeschock-Proteine HSP60 und HSP70, wurden ebenfalls mittels Hybridisierungs-Sonden im Southern blot untersucht (9). Auch für die HSP60- und HSP70-Gene wurden zwei unabhän-

gige Hybridisierungsmuster erhalten (Genotyp A oder Genotyp B). Eine Kombination der Hybridisierungsmuster, die mit den drei Gen-Sonden fla, HSP60 und HSP70 erzielt wurden, ergab vier verschiedene Genotypen (in der Reihenfolge fla/HSP60/HSP70): Gruppe AAA (typische Vertreter Stämme ZS7 und B31), Gruppe B(A/B)A (Stamm 19857), Gruppe BBA (Stamm ACA-1), und Gruppe BBB (Stamm ZQ1) (Tab. 1).

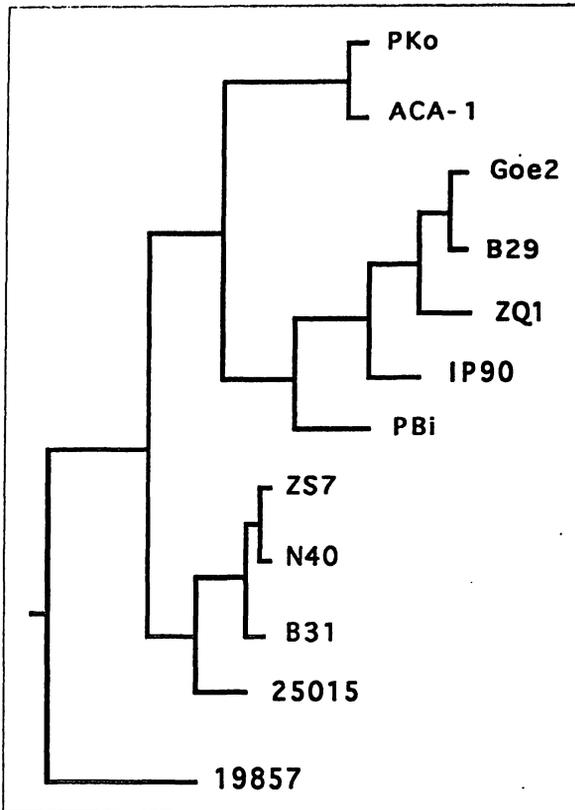


Abb. 5: Phylogenetischer Stammbaum für 12 OspA-Proteine individueller *B.-burgdorferi*-Isolaten. Die OspA-Aminosäuresequenzen wurden unter Verwendung der HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) Software gegeneinander ausgerechnet.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen eingeschränkten Reaktionsmustern, die nach Hybridisierung mit den Gen-Sonden fla/HSP60/HSP70 auftraten, wurden unter gleichen Ansatzbedingungen mit den Sonden für OspA bzw. lplA7 mindestens sechs verschiedene Reaktionsmuster beobachtet. In Abb. 2 sind die Bandenmuster einiger repräsentativer *B.-burgdorferi*-Isolate nach Hybridisierung mit der OspA-Gen-Sonde dargestellt. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse mit allen in dieser Arbeit benutzten Gen-Sonden ist in Tab. 1 wiedergegeben. Es wird deutlich, daß fast alle amerikanischen *B.-burgdorferi*-Isolate, mit der Ausnahme der beiden Stämme 19857 und 21038, einem Genotyp angehören (AAA, OspA-I). Die europäischen Isolate weisen im Gegensatz dazu eine wesentlich größere Heterogenität auf (Tab. 1). Die mittels RFLP-Analyse gefundene genotypische Variabilität für den OspA-Locus wurde in weiterführenden Studien durch die Sequenzierung repräsentativer OspA-Gene bestätigt (9). Die von zwölf individuellen *B.-burgdorferi*-Isolaten abgeleitete Aminosäure-Sequenzen des OspA ergaben nach progressiver Ausrichtung einen „phylogenetischen Stammbaum“, der die genotypische Einteilung bezüglich der RFLP-Analyse eindrucksvoll bestätigte (Abb. 5) (12).

Nachweis genotypischer Heterogenität mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, daß die PCR eine hochsensitive Nachweismethode für *B.-burgdorferi*-DNS darstellt. In dieser Arbeit sollte der Einsatz der PCR zur molekulargenetischen Analyse der genotypischen Variabilität innerhalb der Art *B. burgdorferi* betont werden. Insgesamt wurden vier verschiedene Standardprotokolle für die OspA- und fla-PCR angewendet (11). In Versuchsreihen mit den fla-spezifischen Primern prB31/41-4 und prB31/41-5 (fla-PCR Universal) wurde in allen Isolaten ein Fragment der erwarteten Größe vom 730 bp nachgewiesen (Abb. 3B und 4C; Tab. 2). Unter vergleichbaren Versuchsbedingungen wurden jedoch keine Amplifikationsprodukte mit der DNS von Organismen anderer Arten aus der Gattung *Borrelia*, wie *B. coriaceae* CO53, *B. parkeri*, *B. turicatae*, *B. hermsii* sowie aus der Gattung *Treponema*, die Spezies *T. pallidum* gefunden (Abb. 4C; Tab. 2). Die hier verwendeten Oligonukleotid-Primer sind damit spezifisch und universell anwendbar für die DNS aller untersuchten *B.-burgdorferi*-Isolate (Tab. 2). In weiteren Experimenten wurde die DNS der individuellen *B.-burgdorferi*-Isolate mit OspA- bzw. OspA/OspB-spezifischen Primer-Paaren analysiert: drei verschiedene Primer-Kombinationen, die unterschiedliche Bereiche des Osp-Operons umfassen, wurden getestet. Das Primer-Paar prZS7/31-1 und prZS7/31-4 (OspA-PCR Standard I), das ein 500 bp Fragment am N-terminalen Ende des OspA Gens umfaßt, reagierte mit allen *B.-burgdorferi*-Isolaten mit Ausnahme des Stammes ACA-1 (Abb. 3A und 4B; Tab. 2). Das Primer-Paar prZS7/31-1 und prZS7/31-2 (OspA-PCR Standard II) aus dem 5'-terminalen Bereich des OspA-Gens amplifizierte ein 640-bp-Fragment nur mit der DNS einiger *B.-burgdorferi*-Isolate (Abb. 3A und 4A; Tab. 2). Das Primer-Paar prZS7/31-1 und pC-OspB (Osp-PCR Standard III), mit dem der gesamte Bereich des Osp-Operon amplifiziert wird, zeigte ein ähnliches Reaktionsmuster wie das OspA-PCR-Standard II Primer-Paar, allerdings mit dem Unterschied, daß auch die DNS der *B.-burgdorferi*-Isolate 21038 und 19857 ein Signal ergaben (Abb. 3A und 4D; Tab. 2). Keines der drei Osp-spezifischen Primer-Paare erzeugte Amplifikationsprodukte bei Verwendung von aus verwandten Borrelien oder Treponemen isolierter DNS (Tab. 2).

Die untersuchten *B.-burgdorferi*-Isolate können hinsichtlich der Amplifikation mit verschiedenen Osp-Primer-Paaren in vier Gruppen eingeteilt werden: i) Isolate, die mit allen Primerkombinationen reagieren (B31/ZS7 Gruppe); ii) Isolate, die mit zwei der drei Kombinationen reagieren (19857 Gruppe); iii) Isolate, die mit einem Primer-Paar reagieren (ZQ1 Gruppe, 20047 und S90) sowie iv) Isolate, die mit keinem der drei Primerkombinationen ein Signal ergeben (ACA-1 Gruppe) (Tab. 2). Für den Nachweis von *B. burgdorferi* mittels PCR in natürlich infizierten Proben folgt aus diesen Ergebnissen, daß mit Primern für variable Sequenzen nur ein Teil des tatsächlich infizierten Probenmaterials identifiziert würde. Ziel für den Nachweis von *B. burgdorferi* mittels PCR muß deshalb sein, möglichst alle in der Natur vorkommenden Isolate mit einer universellen Primerkombination, z.B. fla-PCR Universal, zu erkennen.

Tab. 2: Ergebnisse der PCR-Versuche zur Charakterisierung der genetischen Heterogenität von *B. burgdorferi*. Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Amplifikation eines spezifischen DNS-Segments mit den Oligonukleotidprimern prZS7/31-1 und prZS7/31-4 (OspA-PCR-Standard I), prZS7/31-1 und prZS7/31-2 (OspA-PCR-Standard II), prZS7/3-1 und pC-OspB (OspA/B-PCR-Standard III), prB31/41-4 und prB31/41-5 (fla-PCR Universal); +: deutliches Signal; ±: sehr schwaches Signal; -: kein Signal. ECM, Erythema chronicum migrans; ACA, Acrodermatitis chronica atrophicans; AD, Atrophodermie; CSF, Liquor; n. d., nicht durchgeführt.

B.-burgdorferi-Stamm	Ursprung	Isolat aus	Polymerase-Kettenreaktion			
			prZS7/31-1 prZS7/31-4	prZS7/31-1 prZS7/31-2	prB31/31-1 pC-OspB	prB31/41-4 prB31/41-5
B31	USA	Ixodes dammini	+	+	+	+
ZS7	Deutschland	I. ricinus	+	+	+	+
Z37	Deutschland	I. ricinus	+	+	+	+
GeHo	Deutschland	Hautbiopsie (ECM)	+	+	+	+
B2	Deutschland	Hautbiopsie (ECM)	+	+	+	+
B3	Deutschland	Hautbiopsie (AD)	+	+	+	+
20004	Frankreich	I. ricinus	+	+	+	+
19535	USA	Weißfußmaus	+	+	+	+
26816	USA	Wühlmaus	+	+	+	+
28691	USA	I. dammini	+	+	+	+
21305	USA	Weißfußmaus	+	+	+	+
21343	USA	Weißfußmaus	+	+	+	+
26815	USA	Tamias striatus	+	+	+	+
297	USA	CSF	+	+	+	+
20001	Frankreich	I. ricinus	+	+	+	+
CTIP7	USA	Hundezecke	+	+	+	+
S12/14	Deutschland	I. ricinus	+	+	+	+
ZQ1	Deutschland	I. ricinus	+	-	-	+
NE4	Schweiz	I. ricinus	+	-	-	+
NE58	Schweiz	I. ricinus	+	-	-	+
NE11H	Schweiz	I. ricinus	+	-	-	+
N34 (A)	Deutschland	I. ricinus	+	-	-	+
20047	Frankreich	I. ricinus	+	-	-	+
S90	Deutschland	I. ricinus	+	-	-	+
19857	USA	Hasenjiere	+	-	+	+
21038	USA	I. dentatus	+	-	±	+
ACA-1	Schweden	Hautbiopsie (ACA)	-	-	-	+
B. coriaceae Co53	ATCC 43381		-	-	-	-
B. hermsii	ATCC 35209		-	-	-	±
B. parkeri			-	-	-	-
B. turicatae			-	-	-	-
T. pallidum			-	-	-	-

Diskussion

Die Analyse der genotypischen und phänotypischen Heterogenität innerhalb der Art *B. burgdorferi* ist eine Voraussetzung für die Entwicklung standardisierter und die gesamte Art umfassender diagnostischer Testsysteme. Durch die ständig zunehmende Zahl neuer *B.-burgdorferi*-Isolate verschiedenster geographischer und biologischer Herkunft, die Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper gegen immundominante *B.-burgdorferi*-Strukturen sowie die Klonierung immunologisch und pathophysiologisch wichtiger *B.-burgdorferi*-Gene wurde offensichtlich, daß die immunologische und genetische Variabilität zwischen einzelnen Isolaten wesentlich größer ist als ursprünglich angenommen. Die hier dargelegten Befunde über die eingeschränkte genotypische Heterogenität chromosomal lokalisierter Gene, wie fla, HSP60 und HSP70 auf der einen Seite, und die ausgeprägte genetische Variabilität von OspA/B und lpLA7 andererseits, wurden auch phänotypisch durch Immunoblot-Analysen von *B.-burgdorferi*-

Isolaten mit Hilfe monoklonaler Antikörper bestätigt (9, 11).

Die molekulargenetischen Untersuchungen (RFLP-Analyse, PCR) führte zu einer Klassifizierung von *B. burgdorferi* in vier Hauptgruppen, von denen die Isolate einer Gruppe (Isolate 19857 und 21038) möglicherweise einem enzootischen Transmissions-Zyklus angehören, der für den Menschen irrelevant ist (13). Eine Einteilung von *B.-burgdorferi*-Isolaten in zwei oder drei Hauptgruppen ist auch von anderen Arbeitsgruppen mit Hilfe ähnlicher molekularbiologischer Methoden gefunden worden (14-16). Von einer weiteren Arbeitsgruppe wurde die Spezies *B. burgdorferi* auf Grund molekulargenetischer Studien sogar in drei neue individuelle Spezies aufgeteilt; allerdings ist diese neue taxonomische Einteilung noch umstritten (16, 17).

Die beschriebene genotypische und phänotypische Variabilität von *B.-burgdorferi*-Isolaten hat in jedem Fall weit-

reichende Konsequenzen für die Entwicklung zuverlässiger diagnostischer Nachweisverfahren. Bei den gegenwärtigen, meist serologischen Nachweismethoden, dem ELISA und dem indirekten Immunfluoreszenz-Test (IIFT) wird bisher im allgemeinen das Gesamtlysat, bzw. die lebenden Bakterien eines individuellen *B.-burgdorferi*-Stammes eingesetzt. Abgeleitet von den vorgestellten Untersuchungsergebnissen wäre zu fordern, daß zur Erfassung des gesamten Spektrums der natürlich vorkommenden Antigenvariationen eine Mischung von *B.-burgdorferi*-Lysaten aus den genotypisch unterschiedlichen Gruppen verwendet wird. Bezüglich der Spezifität wäre es hilfreich, wenn aus der Kenntnis über konservierte und variable Bereiche von immundominanten *B.-burgdorferi*-Antigenen, nur die nicht kreuzreaktive Teilstrukturen als „Screening-Antigen“ verwendet würden (18).

Für die molekularbiologische Diagnostik könnten z.B. von geeigneten Genabschnitten Reagenzien abgeleitet werden, die als Hybridisierungsproben oder PCR-Primer auch für epidemiologische und phylogenetische Untersuchungen eingesetzt werden können.

Die in dieser Arbeit beschriebene Heterogenität der OspA-Gene ist auch von Bedeutung für die Entwicklung eines möglichen Impfstoffes. Es konnte in früheren Studien gezeigt werden, daß sowohl passive Immunisierung mit OspA-spezifischen Antikörpern als auch die aktive Immunisierung mit rekombinanten OspA-Proteinen in der Maus Schutz gegen eine nachfolgende *B.-burgdorferi*-Infektion vermitteln (19, 20). Allerdings haben Experimente gezeigt, daß polyklonale OspA-spezifische Antikörper einen optimalen Schutz nur gegen homologe *B.-burgdorferi*-Isolate vermitteln können (21). Offensichtlich muß ein Impfstoff gegen *B.-burgdorferi* OspA-Proteine aller (genotypisch und phänotypisch distinkter) Spirochäten-Gruppen enthalten, um einen umfassenden Schutz gegen den Erreger zu gewährleisten.

Literatur:

1. Steere, A. C., Grodzicki, R. L., Kornblatt, A. N., Craft, J. E., Barbour, A. G., Burgdorfer, W., Schmid, G. P., Johnson, E., Malawista, S. E. (1983) The spirochetal etiology of Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* **308**, 733-740.
2. Steere, A. C. (1989) Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* **321**, 586-596.
3. Kramer, M. D., Wallich, R., Schaible, U. E., Zimmer, G., Simon, M. M. (1990) Die Borrelia-burgdorferi-Infektion - I. Aspekte der Grundlagenforschung, neue Ansätze für Diagnostik und Therapie. *Hautarzt* **41**, 648-657.
4. Kramer, M. D., Simon, M. M., Schaible, U. E., Moter, S. E., Wallich, R. (1991) Die Borrelia-burgdorferi-Infektion - II. Aspekte der Grundlagenforschung, neue Ansätze für Diagnostik und Therapie. *Hautarzt* **42**, 63-71.
5. Rahn, D. W., Malawista, S. E. (1991) Lyme disease: recommendations for diagnosis and treatment. *Ann. Intern. Med.* **114**, 472-481.
6. Starke, F., Hofmann, H., Wallich, R., Fuchs, D., Schröter, R., Simon, M. M., Kramer, M. D. (1992) Untersuchungen zur Kreuzreaktivität von Borrelia-burgdorferi-Antigenen mit Serumantikörpern gegen *Treponema pallidum*. In: *Infection - Fortschritte der Infektiologie: Lyme Borreliose* (Hassler, D., ed.), MMV Medizin Verlag München, Germany. pp. 24-36.
7. Wallich, R., Moter, S. E., Simon, M. M., Ebnert, K., Heiberger, A., Kramer, M. D. (1990) The Borrelia burgdorferi Flagellum-Associated 41-Kilodalton Antigen (Flagellin): Molecular Cloning, Expression, and Amplification of the Gene. *Infect. Immun.* **58**, 1711-1719.
8. Moter, S. E., Wallich, R., Simon, M. M., Kramer, M. D. (1992) Nachweis von Borrelia-burgdorferi-DNS mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in läsionaler Haut von Erythema chronicum migrans und Acrodermatitis chronica atrophicans. In: *Infection - Fortschritte der Infektiologie: Lyme-Borreliose* (Hassler, D., ed.), MMV Medizin Verlag München, Germany. pp. 58-70.
9. Wallich, R., Helmes, C., Schaible, U. E., Lobet, Y., Moter, S. E., Kramer, M. D., Simon, M. M. (1992) Evaluation of Genetic Divergence among Borrelia

- burgdorferi Isolates by Use of OspA, fla, HSP60, and HSP70 Gene Probes. *Infect. Immun.* **60**, 4856-4866.
10. Wallich, R., Schaible, U. E., Simon, M. M., Heiberger, A., Kramer, M. D. (1989) Cloning and sequencing of the gene encoding the outer surface protein A (OspA) of an European Borrelia burgdorferi isolate. *Nucleic Acid Res.* **17**, 8864.
11. Wallich, R., Moter, S. E., Kramer, M. D., Gern, L., Hofmann, H., Schaible, U. E., Simon, M. M. (1992) Untersuchungen zur genotypischen und phänotypischen Heterogenität von Borrelia burgdorferi, dem Erreger der Lyme-Borreliose. In: *Infection - Fortschritte der Infektiologie: Lyme-Borreliose* (Hassler, D., ed.), MMV Medizin Verlag München, Germany. pp. 176-190.
12. Feng, D.-F., Doolittle, R. F. (1987) Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.* **25**, 351-360.
13. Brown, R. N., Lane, R. S. (1992) Lyme disease in California: a novel enzootic transmission cycle of Borrelia burgdorferi. *Science* **256**, 1439-1442.
14. Wilske, B., Preac-Mursic, V., Schierz, G., Kühbeck, R., Barbour, A., Kramer, M. D. (1988) Antigenic variability of Borrelia burgdorferi. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **539**, 126-143.
15. Wilske, B., Barbour, A. G., Bergström, S., Burman, N., Restrepo, B. I., Rosa, P. A., Schwann, T., Soutschek, E., Wallich, R. (1992) Antigenic variation and strain heterogeneity in Borrelia spp. *Res. Microbiol.* **143**, 583-596.
16. Adam, T., Gassmann, G. S., Rasiyah, C., Göbel, U. B. (1991) Phenotypic and genotypic analysis of Borrelia burgdorferi isolates from various sources. *Infect. Immun.* **59**, 2579-2585.
17. Baranton, G., Postic, D., Saint-Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.-C., Assou, M., Grimont, P. A. D. (1992) Delineation of Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia garinii sp. nov., and group VS461 associated with Lyme Borreliosis. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **42**, 378-383.
18. Kramer, M. D., Moter, S. E., Starke, F., Hofmann, H., Simon, M. M., Wallich, R. (1993) Laboratoriumsdiagnostik bei der Borrelia-burgdorferi-Infektion des Menschen („Lyme-Borreliose“). *Dtsch. Med. Wschr.*, im Druck.
19. Simon, M. M., Schaible, U. E., Kramer, M. D., Eckerskorn, C., Müller-Hermelink, H. K., Wallich, R. (1991) Recombinant outer surface protein A from Borrelia burgdorferi induces antibodies protective against spirochetal infection in mice. *J. Infect. Dis.* **164**, 123-132.
20. Simon, M. M., Schaible, U. E., Wallich, R., Kramer, M. D. (1991) A mouse model for Borrelia burgdorferi infection: Approach to a vaccine against Lyme disease. *Immunol. Today* **12**, 11-16.
21. Schaible, U. E., Wallich, R., Kramer, M. D., Gern, L., Anderson, J. F., Musseteau, C., Simon, M. M. (1993) Immune sera to individual Borrelia burgdorferi isolates or recombinant OspA thereof protect SCID mice against infection with homologous strains but only partially or not at all against those of different OspA/OspB genotype. eingereicht.

Anschriften aller Autoren:

Dr. Reinhard Wallich
Angewandte Immunologie (FS 0440)
Deutsches Krebsforschungszentrum
Im Neuenheimer Feld 280
6900 Heidelberg

Claudia Helmes
Angewandte Immunologie (FS 0440)
Deutsches Krebsforschungszentrum
Im Neuenheimer Feld 280
6900 Heidelberg

Dr. Ulrich E. Schaible
Max-Planck-Institut für Immunbiologie
Stübeweg 51
7800 Freiburg

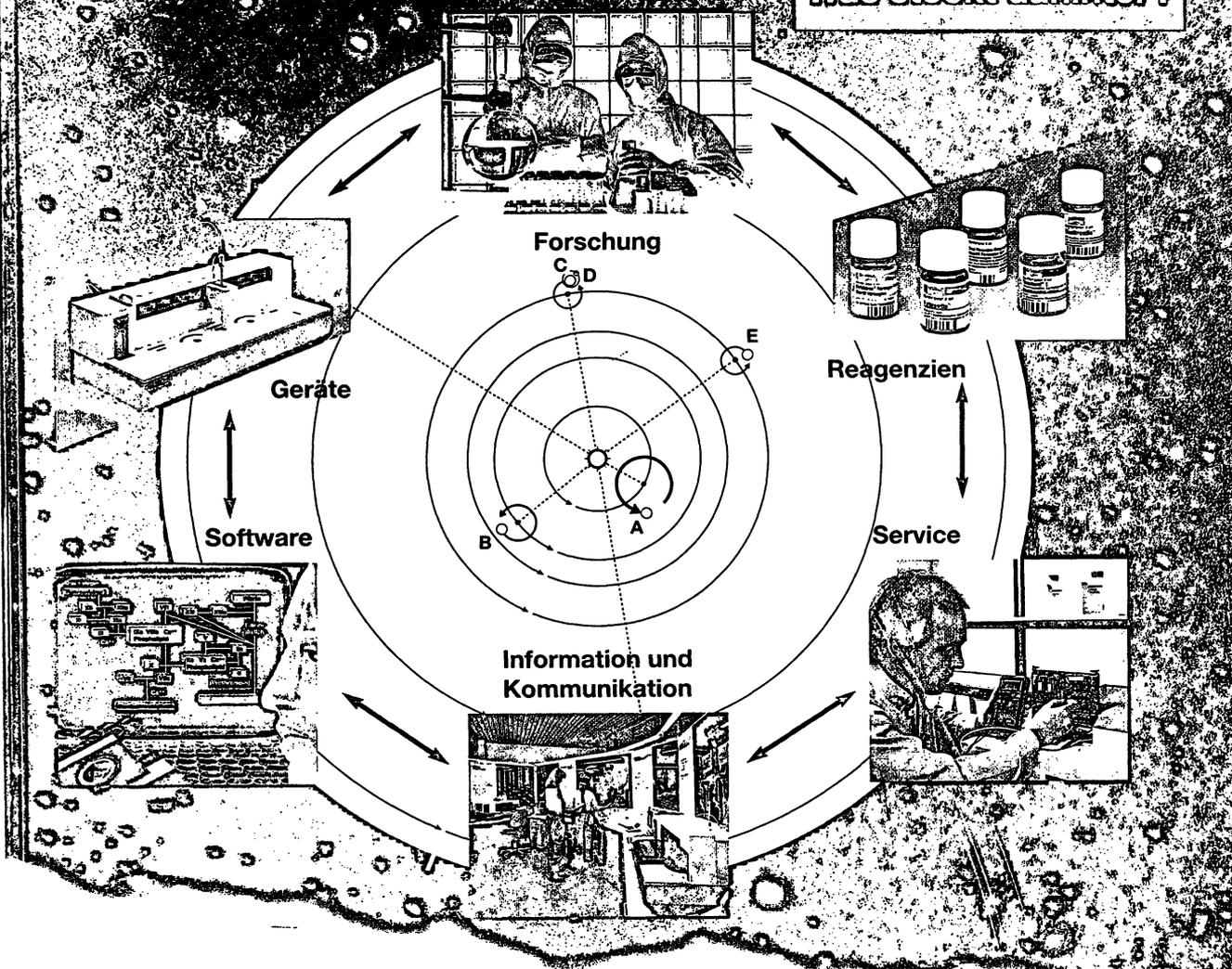
Dr. Markus M. Simon
Max-Planck-Institut für Immunbiologie
Stübeweg 51
7800 Freiburg

Sabine E. Moter
Institut für Immunologie und Serologie
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 280
6900 Heidelberg

Dr. Michael D. Kramer
Institut für Immunologie und Serologie
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 280
6900 Heidelberg

Das Gerinnungsdiagnostik-System von Behring

Was steckt dahinter?



Ein synergistisches System zur Problemlösung diagnostischer Fragen bestehend aus:

Forschung

neue Produkte für bessere Diagnosen und Prognosen

Geräte

neuester Technologie für schnelle und bequeme Laborpraxis

Service

damit die Routine immer weiterläuft

Reagenzien

hoher Qualität für zuverlässige Analysen

Software

für den schnellen und gesicherten Datentransfer von der Anforderung bis zum Befund

Information und Kommunikation

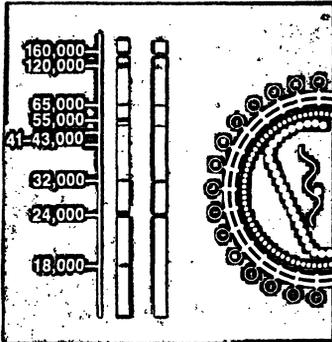
für Weiterbildung und Erfahrungsaustausch

Behringwerke AG,
Postfach 11 40, 3550 Marburg/Lahn

Behringwerke AG
Med. Information und Verkauf
Postfach 12 12
6237 Liederbach/Ts. 1

BEHRING
Behring

HIV-Bestätigung schnell und spezifisch



NOVAPATH Immunoblot Assay zum Nachweis von Antikörper gegen HIV-1

(PEI Zul.-Nr. 11a/86)

- Eindeutige Ergebnisse in weniger als 3 Stunden (vorgeblottete Teststreifen; gebrauchsfertige Reagenzien)
- Klare Erkennung der virus-spezifischen Banden, v. a. der wichtigen Banden gp 120 und gp 160
- Einfache Testdurchführung (keine Geräte erforderlich; Inkubation bei Raumtemperatur)



BIO-RAD Laboratories GmbH
Klinische Diagnostik
Heidemannstraße 164
D-8000 München 45
Telefon (089) 3 1884-149
Telefax (089) 3 1884-100

Klaus Peter
Ratzmann

Diese Broschüre vermittelt in übersichtlicher Form gesichertes Wissen über den Diabetes mellitus. Zugunsten praxisrelevanter Aspekte werden Gebiete wie Epidemiologie, Ätiopathogenese usw. nur kurz dargestellt. Die engen Beziehungen diabetischer Folgeschäden zu anderen Fachdisziplinen finden umfassende Berücksichtigung.

Diabetologische Praxis

Leitfaden
für den
nieder-
gelassenen
Arzt

Verlag
Kirchheim
Mainz

Beim Typ-I-Diabetes mellitus stehen die therapeutischen Bemühungen um eine Normalisierung des Glukosestoffwechsels mit dem Ziel einer Prävention diabetischer Folgeschäden im Mittelpunkt. Schnell findet der interessierte Leser alle erforderlichen Informationen über den aktuellen Entwicklungsstand. Beim Typ-II-Diabetes mellitus, dem Gros der Patienten, geht es darum, durch eine problemorientierte Wissensvermittlung zu langfristigen Verhaltensänderungen zu motivieren. Viele Typ-II-Diabetiker werden im Verlauf ihrer Krankheit auf Insulin umgestellt.

Insulin-Pens, Insulin-Fertigspritzen und ein breites Spektrum von Kombinationsinsulinen haben die Therapie für den Diabetiker einfacher gemacht. Ein tabellarischer Anhang gestattet eine schnelle und aktuelle Orientierung.

Verlag Kirchheim, Postfach 2524, 6500 Mainz 1
Bitte senden Sie mir Expl. Ratzmann: "Diabetologische Praxis", 116
Seiten mit farbigen Abbildungen, ISBN 3-87409-064-7, zum Preis von DM
32,- an folgende Anschrift:

Name:
Straße:
PLZ/Ort:
Datum/Unterschrift:

Lab.med. 6/93

Die klinische Bedeutung des Antithrombin III-, Protein C- und Protein S-Mangels*

The clinical significance of a deficiency in antithrombin III, protein C or protein S

P. Hopmeier

Zentrallaboratorium der Krankenanstalt Rudolfstiftung Wien

Zusammenfassung:

Die Rolle von Antithrombin III, Protein C und Protein S als wichtige Inhibitoren des plasmatischen Gerinnungssystems ist heute unbestritten. Für alle drei Proteine sind angeborene Funktionsdefizite bekannt, die ihre Ursache entweder in einer Verminderung des Normalmoleküls (Typ I) oder in verschiedenen molekularen Strukturdefekten (Typ II, Typ III) haben. Weiters sind bei allen drei Proteinen eine Reihe von Ursachen für erworbene Mangelzustände bekannt. Alle diese Funktionseinschränkungen sind vielfach mit einem erhöhten Thromboembolierisiko verbunden. Durch die Messung von Aktivierungsmarkern der plasmatischen Gerinnung kann versucht werden, das individuelle Thromboembolierisiko bei derartigen Mangelzuständen zu erfassen. Beim Antithrombin III-Mangel sind allerdings die Bedingungen für eine sichere Gerinnungshemmung im Rahmen der Blutabnahme noch nicht ausreichend definiert. Weiters ist keineswegs gesichert, ob und wie eng eine Erhöhung der Aktivierungsmarker im Einzelfall tatsächlich mit dem persönlichen Thromboembolierisiko korreliert ist.

Schlüsselwörter:

Antithrombin III – Protein C – Protein S – Aktivierungsmarker – Fibrinopeptid A (FPA) – Prothrombinfragment F₁₊₂.

Summary:

Antithrombin III, protein C and protein S are well-established inhibitors of plasmatic coagulation. For all three proteins, congenital functional defects have been described, which are either due to a decrease in the concentration of the normal molecule (type I) or due to various molecular defects (type II or type III). Furthermore, for all three proteins a number of conditions with acquired deficiencies have been reported. All functional defects in these inhibitors are frequently associated with an increased risk of thromboembolism. To assess the individual risk of thromboembolism, quantitating the activation markers of plasmatic coagulation can be considered. However, for the antithrombin III deficiency, it is not yet established what the conditions for blood sampling must be to completely avoid activation of the coagulation system. Moreover, at present there is no conclusive evidence whether and to what extent an increase in activation markers is really correlated to an increased individual risk of thromboembolism.

Keywords:

Antithrombin III – protein C – protein S – activation markers – fibrinopeptide A (FPA) – prothrombin fragment F₁₊₂.

1. Einleitung

Antithrombin III, Protein C und Protein S sind wichtige Inhibitoren der plasmatischen Gerinnung. Angriffspunkt und Wirkung innerhalb des Gerinnungssystems sind im einzelnen aufgeklärt. Für alle drei Proteine sind angeborene und erworbene Mangelzustände bekannt, und ein Zusammenhang zwischen herabgesetzter Aktivität und er-

höhtem Thromboembolierisiko ist gesichert. Trotzdem sind bezüglich der klinischen Wertigkeit eines diagnostizierten Mangelzustandes viele Fragen offen. Dies betrifft einerseits die Bedeutung der diversen Subtypen beim kongenitalen Mangel und andererseits die Frage nach der Rolle noch ungeklärter, auslösender Cofaktoren. In dieser Situation erscheint die Möglichkeit vielversprechend, das individuelle Thromboembolierisiko über Quantifizierung von im Plasma zirkulierenden Aktivierungsmarkern direkt zu erfassen.

2. Antithrombin III

Antithrombin III (AT III) ist ein einkettiges Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 58200 (1). Das AT III-Gen ist am Chromosom 1 (1q22-q25) lokalisiert und enthält insgesamt 7 Exons (2, 3). In der Zirkulation ist AT III in der Lage, eine Reihe aktivierter Serinesterasen – insbesondere Thrombin und Faktor Xa – und weiters die Faktoren XIIa, XIa, IXa, VIIIa, Kallikrein und Plasmin durch Bildung eines kovalenten 1:1-Komplexes zu neutralisieren (4, 5). Mit Heparin geht AT III eine Bindung ein (6), die eine Konformationsänderung des AT III-Moleküls bewirkt, welche zu einer Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit mit aktivierten Gerinnungsfaktoren bis zum 1000fachen führt (7).

2.1. Antithrombin III-Mangel

AT III-Mangelzustände und -Defekte werden im allgemeinen durch eine Kombination funktioneller und immunologischer Messungen charakterisiert. Danach werden klinisch folgende Typen unterschieden (8):

Angeborener AT III-Mangel vom

Typ I: Verminderung der Meßwerte von Aktivität und Immunogen bedingt durch

Ia: verminderte Konzentration des normalen Moleküls („klassischer Mangel“),

Ib: verminderte Konzentration des normalen Moleküls in Kombination mit einer pathologischen, niedrig konzentrierten Variante.

Typ II: Verminderte Aktivitäts- und normale Immunogenwerte bedingt durch einen Molekulardefekt, der

IIa: sowohl das aktive Zentrum als auch die Heparinbindungsstelle betrifft,

IIb: das aktive Zentrum betrifft,

IIc: die Heparinbindungsstelle betrifft.

Die Häufigkeit derartiger Mangelzustände in der Gesamtbevölkerung wird in der Literatur mit ca. 1:2000 bis 1:5000 angegeben, bei Patienten mit Spontanthrombosen vor dem 50. Lebensjahr wird ein positiver Befund in

rund 2%–5% der Fälle erhoben (8–10). Der Erbgang ist autosomal dominant.

Auf DNA-Ebene sind die AT III-Mangelzustände äußerst heterogen. Insgesamt sind zur Zeit etwa 50 Varianten bekannt. Beim Typ I-Mangel liegen zumeist kleine Insertionen, Deletionen oder Punktmutationen vor (8, 11), größere Deletionen sind selten (12, 13), ein völliges Fehlen des entsprechenden Allels wurde bisher nur ein einziges Mal beobachtet (14). Der Typ I-Mangel findet sich bei Patienten in heterozygoter Form, selten auch in Kombination mit einer Variante eines anderen Typs (12), und die funktionelle Aktivität liegt um die 50%. Ein homozygoter klassischer Typ I-Mangel wurde bisher nicht beschrieben und führt möglicherweise zu einem frühen intrauterinen Fruchttod (9).

Der Typ II-Mangel wird überwiegend durch singuläre Punktmutationen verursacht und wurde mehrfach auch in homozygoter Form beschrieben (15, 16).

2.2. Klinik

Klinisch äußert sich der angeborene AT III-Mangel, besonders vom Typ I, vorwiegend in Form tiefer Venenthrombosen oder Lungenembolien mit Erstmanifestation meist innerhalb weniger Jahre nach der Pubertät. Vereinzelt gibt es auch Berichte über arterielle Thrombosen bei Erwachsenen (9, 17). Mindestens 50% der betroffenen Personen haben schon vor dem 40. Lebensjahr thromboembolische Komplikationen (18). Ein Teil der Merkmalsträger bleibt allerdings lebenslang symptomfrei (19).

Der AT III-Mangel vom Typ III hat klinisch geringere Relevanz, allerdings ist eine erhöhte Thromboseneigung auch bei heterozygoter Anlage nicht völlig auszuschließen (20, 23–25), und beim homozygoten Typ III-Mangel kann eine starke Thromboseneigung bestehen (15).

Für erworbene AT III-Mangelzustände sind eine Reihe von Ursachen bekannt (Tab. 2).

Ein wichtiges Entscheidungskriterium, ob bei erworbenen Mangelzuständen eine Antikoagulation notwendig ist, ist

Tab. 1.

	Anti-thrombin III	Protein C	Protein S
M	58200	62000	70000
Synthese	hepatal	hepatal	hepatal Endothel Megakaryozyten Osteoblasten (?) Vit K-abh.
	nicht Vit K-abh.	Vit K-abh.	
Konz. im Plasma	14–39 mg/dl	4,8 ± 1,0 mg/l	ca. 22 mg/l davon ca. 60% an C4b-binding protein gebunden
Hauptfunktion	Hemmung von F IIa u. F Xa	Hemmung von F Va u. F VIIIa	Cofaktor für aktiviertes PC

Tab. 2. Erworbene Antithrombin III-Verminderung oder verringerte Antithrombin III-Wirkung

Ursache	Ref.
• Lebererkrankungen	
• Disseminierte intravaskuläre Gerinnung	
• Sepsis	
• Acidose	18
• Neonatalperiode	18, 117
• Proteinverlust:	
• Nephrotisches Syndrom	118
• Exsudative Gastroenteropathie	18
• Iatrogen:	
• Heparin	119, 120
• Östrogene	121
• L-Asparaginase	122

AKTIVIERUNG UND WIRKUNG VON PROTEIN C

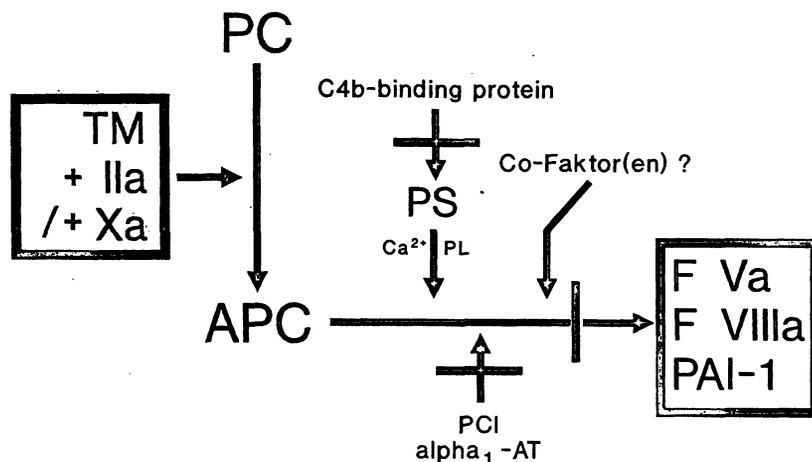


Abb. 1: Aktivierung: →; Hemmung: ⊕; PC, Protein C; APC, aktiviertes Protein C; PS, Protein S; TM, Thrombomodulin; PAI-1, Plasminogenaktivator-Inhibitor 1; PCI, Protein C-Inhibitor; PL, Phospholipid; alpha₁-AT, alpha₁-Antitrypsin.

die Frage, ob die AT III-Verminderung im Vergleich zum Spiegel der prokoagulatorisch wirksamen Gerinnungsfaktoren überproportional ausgeprägt ist, denn eine solche Konstellation spricht für eine Verschiebung des hämostatischen Gleichgewichts in Richtung Hyperkoagulämie.

3. Protein C und Protein S

Protein C (PC) ist ein zweikettiges Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 62000, das als inaktive Vorstufe im Plasma zirkuliert (26). Das PC-Gen ist am Chromosom 2 lokalisiert (2q13-q14) (27), die Proteinsynthese ist Vitamin K-abhängig. Die Aktivierung erfolgt durch Spaltung der schweren Kette des PC durch Thrombin, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit nach Bindung des Thrombin an einen endothelständigen Rezeptor, das Thrombomodulin,

um das 20000–30000fache erhöht wird (28, 29); auch thrombomodulingebundener Faktor Xa kann PC aktivieren (30, 31).

In aktivierter Form wirkt PC antikoagulatorisch und profibrinolytisch, indem es die Faktoren Va und VIIIa (32) sowie den Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 hemmt (33, 34). Aktiviertes PC ist in der Zirkulation nachweisbar (35) und benötigt zur Entfaltung seiner vollen Wirkung einen Cofaktor, das Protein S (PS). Dieses ist ein einkettiges Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 69000. Das PS-Gen ist am Chromosom 3 lokalisiert (36), die Proteinsynthese ist Vitamin K-abhängig. PS zirkuliert im Plasma normalerweise zu etwa 60% an C4b-binding protein gebunden; nur etwa 40% liegen in freier Form vor, und nur diesem ungebundenen PS-Anteil kommt Cofaktor-Funktion zu (37–39). Aktiviertes PC kann durch 2 Plasmaproteine, den PC-Inhibitor (40–42) und alpha₁-Antitrypsin (43; 44) in spezifischer Weise gehemmt werden (Abb. 1).

Tab. 3. Erworbene Protein C-Verminderung oder verringerte Protein C-Wirkung

Ursache	Ref.
• Lebererkrankungen	
• Orale Antikoagulation mit Vitamin K-Antagonisten	
• Disseminierte intravaskuläre Gerinnung	
• Sepsis	
• Nephrotisches Syndrom	87, 88
• Insulinpflichtiger Diabetes mellitus.	85, 86
• Neonatalperiode	101, 102, 103, 104
• Colitis ulcerosa	97, 105
• Lupus-Antikoagulans	106, 107
• Urämie/Hämodialyse	108, 109, 110, 111
• Chemotherapie	112, 113
• Autologe Knochenmarkstransplantation	114
• Sichelzellerkrankung	115
• Homocysteinurie (?)	116

3.1. Protein C- und Protein S-Mangel

Ähnlich wie für AT III ist für das PC/PS-System eine Schutzfunktion gegen eine überschießende prokoagulatorische Aktivität gesichert. Sowohl für PC als auch für PS sind angeborene Mangelzustände mit vermindertem Plasmaspiegel des normalen Proteins (Typ I) und abnorme Moleküle mit unterschiedlichen strukturellen Defekten (Typ II) beschrieben (45–50). Beim PC-Molekül können dabei verschiedene funktionelle Domänen betroffen sein, für die zum Teil entsprechende genetische Defekte auch bereits auf DNA-Ebene charakterisiert wurden (51). Insgesamt sind an die 100 Mutationen bekannt.

Weiters ist nach neuen Untersuchungen für die Menge des frei zirkulierenden PS nicht einfach die Gesamtmenge an PS und C4b-binding protein ausschlaggebend, sondern der Aufbau und die Zusammensetzung des C4b-bin-

ding protein; dieses besteht aus α - und β -Ketten in unterschiedlich oligomerer Zusammensetzung ($\alpha_7\beta$, $\alpha_6\beta$, α_7), wobei nur die β -Ketten die PS-Bindungsdomäne tragen (52, 53) und dementsprechend frei zirkulierendes PS binden können. Inwieweit sich der Anteil der α - und β -Ketten bei Einzelpersonen unterscheidet und ob es im Rahmen der C4b-binding protein-Synthese zu relevanten Verschiebungen im Verhältnis der Ketten zueinander kommen kann, ist zur Zeit ungeklärt. Neben dem C4b-binding protein wird die Menge des antikoagulatorisch wirksamen PS möglicherweise auch über den Plasma-Prothrombinspiegel reguliert (54).

Neben dem kongenitalen Mangel sind sowohl für PC als auch für PS eine Reihe von Ursachen für erworbene Mangelzustände bekannt (Tab. 3 u. 4).

3.2. Klinik

Die Häufigkeit angeborener heterozygoter Mangelzustände in der Gesamtbevölkerung ist für PC sehr hoch und wird mit etwa 1:200–300 angegeben (55). Thromboembolische Komplikationen, die mit einem PC-Mangel assoziiert sind, kommen allerdings nur mit einer Frequenz von etwa 1:16000 vor (56), wobei auch innerhalb einer betroffenen Familie nicht alle Merkmalsträger Symptome entwickeln müssen (57). Dabei dürften neben der Art des genetischen Defekts auch bisher ungeklärte Cofaktoren eine Rolle spielen (57, 58).

Möglicherweise kann der PS-Mangel auch in der Pathogenese von osteopenischen Zuständen Bedeutung haben (59, 60).

Bei Spontanthrombosen und Embolien findet sich ein PC- oder PS-Mangel jeweils in etwa 5% der Fälle. Sowohl beim PC- (61, 62), besonders aber beim PS-Mangel (63–70), findet man neben venösen Thromboembolien auch häufig arterielle Verschlüsse unterschiedlicher Lokalisation. Weiters wird bei beiden Mangelzuständen das gehäufte Auftreten von Hautnekrosen beschrieben; diese werden besonders in der Initialphase einer oralen Antikoagulantientherapie ohne simultanen Heparinschutz, aber auch in anderem Zusammenhang beobachtet (46, 71–73).

Der homozygote PC- und PS-Mangel kann beim Neugeborenen mit purpura fulminans oder anderen schwersten thromboembolischen Komplikationen verbunden sein (74–77). Durch Gabe entsprechender Konzentrate ist das primäre Überleben heute möglich (78, 79); es sind allerdings auch homozygote Mangelzustände mit milder bis mittlerer Symptomatik (80) oder mit Erstmanifestation erst im Erwachsenenalter (81, 82) sowie symptomfreie Fälle (83) dokumentiert.

4. Aktivierungsmarker zur Diagnose des thromboembolischen Risikos

Die Diagnose eines prokoagulatorischen Zustandes kann heute mit Hilfe einer Reihe von Aktivierungsmarkern gestellt werden. Ob es allerdings möglich ist, durch Verwendung solcher Marker bei Patienten mit Inhibitormängeln

Tab. 4. Erworbene Protein S-Verminderung oder verringerte Protein S-Wirkung

Ursache	Ref.
• Lebererkrankungen	
• Orale Antikoagulation mit Vitamin K-Antagonisten	
• Disseminierte intravaskuläre Gerinnung	
• Nephrotisches Syndrom	87
• Insulinpflichtiger Diabetes mellitus	89
• Schwangerschaft und Präeklampsie	90, 91
• Neonatalperiode	90, 92
• Anstieg des C4b-binding proteins	89, 93
• HIV-Infektion	94, 95
• Rauchen bei Männern	96
• Colitis ulcerosa	97, 98
• Lupus-Antikoagulans	99
• Peritonealdialyse	100

das individuelle Thromboembolierisiko zu erfassen und daran Therapie und Prophylaxe zu orientieren, ist zur Zeit fraglich. Die Literaturangaben über erhöhte Aktivierungsmarker (FPA, F_{1+2}) bei zur Zeit der Untersuchung asymptomatischen Personen mit AT III-Mangel sind divergierend (19–22), doch besteht Übereinstimmung, daß eine Gerinnungsaktivierung weder in allen Fällen nachgewiesen werden kann, noch daß ein positiver Befund mit einer anamnesticen Thromboseneigung korrelieren muß (20–22).

Technisch ist beim AT III-Mangel nicht ausreichend geklärt, welches Antikoagulans in den Blutabnehmeröhrchen einen sicheren Schutz vor In-vitro-Aktivierung bietet; so finden sich in der Literatur bei Verwendung unterschiedlicher Blutabnahme- und Testsysteme teils erhebliche Meßwertdifferenzen bei vergleichbaren Patientenkollektiven (20, 84).

Davon abgesehen ergeben sich für Kollektive mit Inhibitormängeln im Vergleich zu Normalpersonen im Mittel zwar zum Teil signifikant erhöhte Spiegel an Aktivierungsmarkern, doch liegt die Mehrzahl der Meßergebnisse im Normalbereich, und zwischen den Werten von Patienten, die thromboembolische Komplikationen hatten und Merkmalsträgern mit unauffälliger Anamnese besteht kein signifikanter Unterschied (20, 22).

Die Frage, ob es sich unabhängig von der Anamnese – bei jenen Personen, die erhöhte Aktivierungsmarker aufweisen, um ein Subkollektiv mit erhöhtem Thromboembolierisiko handelt und ob dieser Zustand konstant oder passager ist, ist zur Zeit offen.

Nach der heute überwiegenden Meinung ist es jedenfalls nicht gerechtfertigt, asymptomatische Personen ohne positive Anamnese oder Familienanamnese nur aufgrund eines diagnostizierten Inhibitormangels einer Langzeitprophylaxe mit oralen Antikoagulantien zu unterziehen. Hingegen ist die Indikation für eine Antikoagulation bereits in Situationen mit geringfügig erhöhtem Thromboembolierisiko zu stellen.

Literatur:

1. Prochownik, E. V., Markham, A. F., Orkin, S. H. (1983) Isolation of a cDNA clone for human antithrombin III. *J. Biol. Chem.* 258, 8389.

2. Bock, S. C., Harris, J. F., Balazs, I., Trent, J. M. (1985) Assignment of the human antithrombin III structural gene to chromosome 1q 23-25. *Cytogenet. Cell Genet.* 39, 67.
3. Bock, S. C., Marrinan, J. A., Radziejewska, E. (1988) Antithrombin III Utah: proline 407 to leucine mutation in a highly conserved region near the inhibitor reactive site. *Biochemistry* 27, 6171.
4. Rosenberg, R. D., Damus, P. S. (1973) The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* 248, 6490.
5. Witzke, G. (1981) Das hämostatische Gleichgewicht: Gerinnung, Fibrinolyse und Inhibitoren. *Lab. med.* 5, 191.
6. Smith, J. W., Knauer, D. J. (1987) A heparin binding site in antithrombin III. *J. Biol. Chem.* 262, 11964.
7. Jordan, R. E., Oosta, G. M., Gardner, W. T., Rosenberg, R. D. (1980) The kinetics of hemostatic enzyme-antithrombin interactions in the presence of low-molecular-weight heparin. *J. Biol. Chem.* 255, 10081.
8. Lane, D. A., Ireland R., Olds J., Thein, S. L., Perry, D. J., Aiach, M. (1991) Antithrombin III: a database of mutations. *Thromb. Haemost.* 66, 657.
9. Abildgaard, U., Ødegaard, O. R. (1992) Klinische Bedeutung des angeborenen Antithrombin-Mangels. *Die Gelben Hefte XXXII*, 57.
10. Tait, R. C., Walker, I. D., Perry, D. J., Carrell, R. W., Islam, S. I. A., McCall, F., Mitchell, R., Davidson, J. F. (1991) Prevalence of antithrombin III deficiency subtypes in 4000 healthy blood donors. *Thromb. Haemost.* 65, 839 (Abstr.).
11. Tomonari, A., Iwahana, H., Yoshimoto, K., Shigekiyo, T., Saito, S., Itakura, M. (1992) Two new nonsense mutations in type I antithrombin III deficiency at Leu 140 and Arg 197. *Thromb. Haemost.* 68, 455.
12. Vidaud, D., Sirieix, M. E., Alhenc-Gelas, M., Chadeuf, G., Aillaud, M. F., Juhan-Vague, I., Aiach, M. (1991) A double heterozygosity in 2 brothers with antithrombin (AT III) deficiency due to the association of an Arg 47 to His mutation with a 9 base pair (bp) deletion in exon VI. *Thromb. Haemost.* 65, 838 (Abstr.).
13. Fernandez-Rachubinski, F., Rachubinski, R. A., Blajchman, M. A. (1992) Partial deletion of an antithrombin III allele in a kindred with a type I deficiency. *Blood* 80, 1476.
14. Prochowik, E. V., Antonarakis, S., Bauer, K. A., Rosenberg, R. D., Fearon, E. R., Orkin, S. H. (1983) Molecular heterogeneity of inherited antithrombin III deficiency. *N. Engl. J. Med.* 308, 1549.
15. Koide, T., Odani, S., Takahashi, K., Ono, T., Sakuragawa, N. (1984) Antithrombin III Toyama: replacement of arginine 47 by cysteine in hereditary abnormal antithrombin III that lacks heparin-binding ability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 289.
16. Brunel, F., Duchange, N., Fischer, A. M., Cohen, G. N., Zakin, M. M. (1987) Antithrombin III Alger: a new case of Arg 47-Cys mutation. *Am. J. Hematol.* 25, 223.
17. Imamura, T., Yoshida, T., Yamadori, A., Matsuo, T. (1991) Congenital antithrombin III abnormality and cerebral arterial thrombosis (letter). *Stroke* 22, 1090.
18. Thomas, L., Trobisch, H. (1992) Blutstillung und Fibrinolyse. In: Thomas L. Labor und Diagnose, 4. Auflage, Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg.
19. Teitel, J. M., Bauer, K. A., Lau, H. K., Rosenberg, R. D. (1982) Studies of the prothrombin activation pathway utilizing radioimmunoassays for the F₂/F₁₊₂ fragment and thrombin-antithrombin complex. *Blood* 59, 1086.
20. Mannucci, P. M., Tripodi, A., Bottasso, B., Baudo, F., Finazzi, G., De Stefano, V., Palareti, G., Manotti, C., Mazzucconi, M. G., Castaman, G. (1992) Markers of procoagulant imbalance in patients with inherited thrombophilic syndromes. *Thromb. Haemost.* 67, 200.
21. Bauer, K. A., Goodman, T. L., Kass, B. L., Rosenberg, R. D. (1985) Elevated factor Xa activity in the blood of asymptomatic patients with congenital antithrombin deficiency. *J. Clin. Invest.* 76, 826.
22. Demers, C., Ginsberg, J. S., Henderson, P., Ofosu, F. A., Weitz, J. I., Blajchman, M. A. (1992) Measurement of markers of activated coagulation in antithrombin III deficient subjects. *Thromb. Haemost.* 67, 542.
23. Sas, G., Blasko, G., Banhegyi, D., Jako, J., Palos, A. L. (1974) Abnormal antithrombin III (antithrombin III Budapest) as a cause of a familial thrombophilia. *Thromb. Diath. Haemorr.* 32, 105.
24. Tran, T. H., Bounameaux, H., Bondeli, C., Honkanen, H., Marbet, G. A., Duckert, F. (1980) Purification and partial characterization of a hereditary abnormal antithrombin III fraction of a patient with recurrent thrombophlebitis. *Thromb. Haemost.* 44, 87.
25. Sørensen, P. J., Sas, G., Peto, I., Blasko, G., Kremmer, T., Samu, A. (1982) Distinction of two pathologic antithrombin III molecules: antithrombin III „Aalborg“ and antithrombin III „Budapest“. *Thromb. Res.* 26, 211.
26. Clouse, L. H., Comp, P. C. (1986) The regulation of hemostasis: the protein C system. *N. Engl. J. Med.* 314, 1298.
27. Patrachini, P., Aiello, V., Palazzi, P., Calzolari, E., Bernardi, F. (1989) Sublocalization of the human protein C gene on chromosome 2q13-q14. *Hum. Genet.* 81 (2), 191.
28. Esmon, C. T., Owen, W. G. (1981) Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2249.
29. Esmon, N. L., Owen, W. G., Esmon, C. T. (1982) Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J. Biol. Chem.* 257, 859.
30. Haley, P. E., Doyle, M. F., Mann, K. G. (1989) The activation of bovine protein C by factor Xa. *J. Biol. Chem.* 264, 16303.
31. Freyssinet, J. M., Wiesel, M. L., Grunebaum, L., Pereillo, J. M., Gauchy, J., Schuher, S., Freund, G., Cazenave, J. P. (1989) Activation of human protein C by blood coagulation factor Xa in the presence of anionic phospholipids. Enhancement by sulphated polysaccharides. *Biochem. J.* 267, 341.
32. Marlar, R. A., Kleiss, A. J., Griffin, J. H. (1982) Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. *Blood* 59, 1067.
33. van Hinsbergh, V. W. M., Bertina, R. M., van Wijngaarden, A., van Tilburg, N. H., Emeis, J. J., Haverkate, F. (1985) Activated protein C decreases plasminogen activator-inhibitor activity in endothelial cell-conditioned medium. *Blood* 65, 444.
34. Okajima, K., Koga, S., Kaji, M., Inoue, M., Nakagaki, T., Funatsu, A., Okabe, H., Takatsuki, K., Aoki, N. (1990) Effect of protein C and activated protein C on coagulation and fibrinolysis in normal human subjects. *Thromb. Haemost.* 63, 48.
35. Gruber, A., Griffin, J. H. (1992) Direct detection of activated protein C in blood from human subjects. *Blood* 79, 2340.
36. Ploos van Amstel, H. K., Reitsma, P. H., Bertina, R. M. (1988) The human protein S locus: identification of the PS alpha gene as a site of liver protein S messenger RNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157 (3), 1033.
37. Dahlbäck, B. (1986) Inhibition of protein C cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J. Biol. Chem.* 261, 12022.
38. Walker, F. J. (1981) Regulation of activated protein C by protein S: the role of phospholipid in factor Va inactivation. *J. Biol. Chem.* 256, 11128.
39. Walker, J. F., Chavin, S. I., Fay, P. J. (1987) Inactivation of factor VIII by activated protein C and protein S. *Arch. Biochem. Biophys.* 252, 322.
40. Suzuki, K., Nishioka, J., Hashimoto, S. (1983) Protein C inhibitor. Purification from human plasma and characterization. *J. Biol. Chem.* 258, 163.
41. Espana, F., Berrettini, M., Griffin, J. H. (1989) Purification and characterization of plasma protein C inhibitor. *Thromb. Res.* 55, 369.
42. Pratt, C. W., Macik, B. G., Church, F. C. (1989) Protein C inhibitor: purification and proteinase reactivity. *Thromb. Res.* 53, 595.
43. van der Meer, F. J. M., van Tilburg, N. H., van Wijngaarden, A., van der Linden, I. K., Briët, E., Bertina, R. M. (1989) A second plasma inhibitor of activated protein C: α_2 -Antitrypsin. *Thromb. Haemost.* 62, 756.
44. Heeb, M. J., Griffin, J. H. (1988) Physiologic inhibition of human activated protein C by alpha 1-antitrypsin. *J. Biol. Chem.* 263, 11613.
45. Chafa, O., Fischer, A. M., Meriane, F., Chellali, F., Rahal, S., Sternberg, C., Benabadi, M. (1989) A new case of „type II“ inherited protein S deficiency. *Br. J. Haematol.* 73, 501.
46. Conlan, M. G., Bridges, A., Williams, E., Marlar, R. (1988) Familial type II protein C deficiency associated with warfarin-induced skin necrosis and bilateral adrenal hemorrhage. *Am. J. Hematol.* 29, 226.
47. Tsakiris, D. A., Marbet, G. A., Zbinden, B., Duckert, F., Biland, L. (1988) Thrombose bei einem wahrscheinlich doppelt-heterozygoten jungen Mann aus einer asymptomatischen Familie mit Protein C-Mangel und Protein-C-Dysfunktion. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 118, 1583.
48. Ploos van Amstel, H. K., Huisman, M. V., Reitsma, P. H., Wouter ten Cate, J., Bertina, R. M. (1989) Partial protein S gene deletion in a family with hereditary thrombophilia. *Blood* 73, 479.
49. Schwarz, H. P., Heeb, M. J., Lottenberg, R., Roberts, H., Griffin, J. H. (1989) Familial protein S deficiency with a variant protein S molecule in plasma and platelets. *Blood* 74, 213.
50. Ploos van Amstel, H. K., Reitsma, P. H., Hamulyak, K., de Die-Smulders, C. E., Mannucci, P. M., Bertina, R. M. (1989) A mutation in the protein S pseudogen is linked to protein S deficiency in a thrombophilic family. *Thromb. Haemost.* 62, 897.
51. Marlar, R. A., Adcock, D. M., Madden, R. M. (1990) Hereditary dysfunctional protein C molecules (type II): assay characterization and proposed classification. *Thromb. Haemost.* 63, 375.
52. Hillarp, A., Helsing, M., Dahlbäck, B. (1989) Protein S binding in relation to the subunit composition of human C4b-binding protein. *FEBS Lett.* 259, 53.
53. Griffin, J. H., Gruber, A., Fernandez, J. A. (1992) Reevaluation of total, free, and bound protein S and C4b-binding protein levels in plasma anticoagulated with citrate or hirudin. *Blood* 79, 3203.
54. Mitchell, C. A., Jane, S. M., Salem, H. H. (1988) Inhibition of the anticoagulant activity of protein S by prothrombin. *J. Clin. Invest.* 82, 2142.
55. Miletic, J., Sherman, L., Broze, G. (1987) Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N. Engl. J. Med.* 317, 991.
56. Broekman, A. W., van der Linden, J. K., Veltkamp, J. J., Bertina, R. M. (1983) Prevalence of isolated protein C deficiency in patients with venous thrombotic disease in the population. (Abstr.). *Thromb. Haemost.* 50, 350.
57. Bovill, E. G., Bauer, K. A., Dickerman, J. D., Callas, P., West, B. (1989) The clinical spectrum of heterozygous protein C deficiency in a large New England kindred. *Blood* 73, 712.
58. Dahlbäck, B., Carlsson, M., Svensson, P. J. (1993) Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to mineral activated protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 1004.
59. Pan, E. Y., Gomperts, E. D., Millen, R., Gilsanz, V. (1990) Bone mineral density and its association with inherited protein S deficiency. *Thromb. Res.* 58, 221.
60. Maillard, C., Berruyer, M., Serre, C. M., Dechavanne, M., Delmas, P. D. (1992) Protein S, a vitamin K-dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts. *Endocrinology* 130, 1599.
61. Nelson, M. E., Talbot, J. F., Preston, F. E. (1989) Recurrent multiple-branched retinal arteriolar occlusions in a patient with protein C deficiency. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 27, 443.
62. Kohler, J., Kasper, J., Witt, I., von Reutern, G. M. (1990) Ischemic stroke due to protein C deficiency. *Stroke* 21, 1077.
63. Taheri, P. A., Eigel, B. A., Karamanoukian, H., Hoover, E. L., Logue, G. (1992) Functional heredity protein S deficiency with arterial thrombosis. *Am. Surg.* 58, 496.

64. Girolami, A., Simioni, P., Lazzaro, A. R., Cordiano, I. (1989) Severe arterial thrombosis in a patient with protein S deficiency (moderately reduced total and markedly reduced free protein S): a family study. *Thromb. Haemost.* 61, 144.
65. Cros, D., Comp, P. C., Beltran, G., Gum, G. (1990) Superior sagittal sinus thrombosis in a patient with protein S deficiency. *Stroke* 21, 633.
66. Allaart, C. F., Aronson, D. C., Ruys, T., Rosendaal, F. R., van Bockel, J. H., Bertina R. M., Briot E. (1990) Hereditary protein S deficiency in young adults with arterial occlusive disease. *Thromb. Haemost.* 64, 206.
67. Sacco, R. L., Owen, J., Mohr, J. P., Tatemichi, T. K., Grossman, B. A. (1989) Free protein S deficiency: a possible association with cerebrovascular occlusion. *Stroke* 20, 1657.
68. Green, D., Otoy, J., Oriba, H., Rovner, R. (1992) Protein S deficiency in middle-aged women with stroke. *Neurology* 42, 1029.
69. Heistering, M., Rumpel, E., Illiasch, H., Turck, H., Kyrle, P. A., Lechner, K., Pabinger, I. (1992) Cerebral sinus thrombosis in a patient with hereditary protein S deficiency: case report and review of the literature. *Ann. Hematol.* 64, 105.
70. Schaefer, H. P., von Felten, A. (1989) Protein-S-Mangel bei jungen Patienten mit thrombotischen Hirninfarkten. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 119, 489.
71. Wagner, T., Schwieder, G., Wiedemann, G. (1987) Kumarinnekrose und Protein C. *Med. Welt* 38, 491.
72. Berkompas, D. C. (1991) Coumadin skin necrosis in a patient with a free protein S deficiency: case report and literature review. *Indiana Med.* 84, 788.
73. Mehta, R. L., Scott, G., Sloand, J. A., Francis, C. W. (1990) Skin necrosis associated with acquired protein C deficiency in patients with renal failure and calciphylaxis. *Am. J. Med.* 88, 252.
74. Pegelow, C. H., Curless, R., Bradford, B. (1988) Severe protein C deficiency in a newborn. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 10, 326.
75. Marlar, R. A., Montgomery, R. R., Broekmans, A. W. (1989) Diagnosis and treatment of homozygous protein C deficiency. Report of the Working Party on Homozygous Protein C Deficiency of the Subcommittee on Protein C and Protein S, International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *J. Pediatr.* 114, 528.
76. Marlar, R. A., Neumann, A. (1990) Neonatal purpura fulminans due to homozygous protein C or protein S deficiencies. *Semin. Thromb. Hemost.* 16, 299.
77. Mahasandana, C., Suvatte, V., Chuansumrit, A., Marlar, R. A., Manco-Johnson, M. J., Jacobson, L. J., Hathaway, W. E. (1990) Homozygous protein S deficiency in an infant with purpura fulminans. *J. Pediatr.* 117, 750.
78. Vukovich, T., Auberger, K., Weil, J., Engelmann, H., Knoeb, P., Hadorn, H. B. (1988) Replacement therapy for a homozygous protein C deficiency using a concentrate of human protein C and S. *Br. J. Haematol.* 70, 435.
79. Dreyfus, M., Magny, J. F., Bridey, F., Schwarz, H. P., Planché, C., Dehan, M., Tchernia, G. (1991) Treatment of homozygous protein C deficiency and neonatal purpura fulminans with a purified protein C concentrate. *N. Engl. J. Med.* 325, 1565.
80. Tuddenham, E. G., Takase, T., Thomas, A. E., Awidi, A. S., Madanat, F. F., Abu Hajir, M. M., Kernoff, P. B., Hoffbrand, A. V. (1989) Homozygous protein C deficiency with delayed onset of symptoms at 7 to 10 months. *Thromb. Res.* 53, 475.
81. Melissari, E., Kakkar, V. V. (1989) Congenital severe protein C deficiency in adults. *Br. J. Haematol.* 72, 222.
82. Sharon, C., Tirindelli, M. C., Mannucci, P. M., Tripodi, A., Mariani, G., Bianchi, A. (1986) Homozygous protein C deficiency with moderately severe clinical symptoms. *Thromb. Res.* 47, 483.
83. Tripodi, A., Franchi, F., Krachmalnicoff, A., Mannucci, P. M. (1990) Asymptomatic homozygous protein C deficiency. *Acta Haematol. (Basel)* 83, 152.
84. Bauer, K. A., Barzegar, S., Rosenberg, R. D. (1991) Influence of anticoagulants used for blood collection on plasma prothrombin fragment F₁₊₂ measurements. *Thromb. Res.* 63, 617.
85. Ceriello, A., Quatraro, A., Russo, P. D., Marchi, E., Barbanti, M., Milani, M. R., Giugliano, D. (1990) Protein C deficiency in insulin-dependent diabetes: a hyperglycemia-related phenomenon. *Thromb. Haemost.* 64, 104.
86. Vukovich, T. C., Schernthaner, G. (1986) Decreased protein C levels in patients with insulin-dependent type I diabetes mellitus. *Diabetes* 35, 617.
87. Allon, M., Soffer, O., Evatt, B. L., Hixon, G., Wideman, C. S. (1989) Protein S and C antigen levels in proteinuric patients: dependence on type of glomerular pathology. *Am. J. Hematol.* 31, 96.
88. Tribisch, H., Wüst, T., Rustige, H. (1986) Möglichkeiten der Isolierung und Charakterisierung des menschlichen Antithrombin III. *Behring Inst. Mitt.* 79, 177.
89. Ceriello, A., Giugliano, D., Quatraro, A., Marchi, E., Barbanti, M., Lefebvre, P. (1990) Possible role for increased C4b-binding-protein level in acquired protein S deficiency in type I diabetes. *Diabetes* 39, 447.
90. Fernandez, J. A., Estelles, A., Gilibert, J., Espana, F., Aznar, J. (1989) Functional and immunologic protein S in normal pregnant women and in full-term newborns. *Thromb. Haemost.* 61, 474.
91. Hopmeier, P., Halbmayer, M., Schwarz, H. P., Heuss, F., Fischer, M. (1987) Protein C and protein S in mild and moderate preeclampsia. *Thromb. Haemost.* 58, 794.
92. Sthoeger, D., Nardi, M., Karpatkin, M. (1989) Protein S in the first year of life. *Br. J. Haematol.* 72, 424.
93. Odegaard, O. R., Lindahl, A. K., Try, K., Kvalheim, G., Sorbo, J. H. (1992) Recurrent venous thrombosis during warfarin treatment related to acquired protein S deficiency. *Thromb. Res.* 66, 729.
94. Schved, J. F., Gris, J. C., Michaud, A., Amiral, J., Quincat, D., Arnaud, A., Martinez, P. (1992) Study of the protein S system in HIV-infected patients: acquired protein S deficiency or unsuitable assays? *Blood Coagul. Fibrinolysis* 3, 295.
95. Bissuel, F., Berruyer, M., Causse, X., Dechavanne, M., Trepo, C. (1992) Acquired protein S deficiency: correlation with advanced disease in HIV-1 infected patients. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 5, 484.
96. Scott, B. D., Esmon, C. T., Comp, P. C. (1991) The natural anticoagulant protein S is decreased in male smokers. *Am. Heart. J.* 122 (1, Pt 1), 76.
97. Jorens, P. G., Hermans, C. R., Haber, I., Knockx, M. M., Vermynen, J., Parize, G. A. (1990) Acquired protein C and S deficiency, inflammatory bowel disease and cerebral arterial thrombosis. *Blut.* 61, 307.
98. Wyshock, E., Caldwell, M., Crowley, J. P. (1988) Deep venous thrombosis, inflammatory bowel disease, and protein S deficiency. *Am. J. Clin. Pathol.* 90, 633.
99. Rossi, E., Gatti, L., Guarneri, D., Finotto, E., Lombardi, A., Preda, L. (1992) Functional protein S in women with lupus anticoagulant inhibitor. *Thromb. Res.* 65, 253.
100. Kant, K. S., Glueck, H. I., Coots, M. C., Tonne, V. A., Brubaker, R., Penn, I. (1992) Protein S deficiency and skin necrosis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am. J. Kidney. Dis.* 19, 264.
101. Greffe, B. S., Marlar, R. A., Manco-Johnson, M. J. (1989) Neonatal protein C: molecular composition and distribution in normal term infants. *Thromb. Res.* 56, 91.
102. Takamiya, O., Kinoshita, S., Niinomi, K., Yoshioka, K. (1989) Protein C in the neonatal period. *Haemostasis* 19, 45.
103. Bennhagen, R., Holmberg, L. (1989) Protein C activity and antigen in premature and fullterm newborn infants. *Acta Paediatr. Scand.* 78, 34.
104. Manco-Johnson, M. J., Marlar, R. A., Jacobson, L. J., Hays, T., Warady, B. A. (1988) Severe protein C deficiency in newborn infants. *J. Pediatr.* 113, 359.
105. Tromm, A., Huppe, D., May, B. (1992) Protein-C-Mangel bei Colitis ulcerosa. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 117, 1130.
106. Cariou, R., Tobelem, G., Bellucci, S., Soria, J., Soria, C., Maclouf, J., Caen, J. (1988) Effect of lupus anticoagulant on antithrombotic properties of endothelial cells - inhibition of thrombomodulin-dependent protein C activation. *Thromb. Haemost.* 60, 54.
107. Marciniak, E., Romond, E. H. (1989) Impaired catalytic function of activated protein C: a new in vitro manifestation of lupus anticoagulant. *Blood* 74, 2426.
108. Sørensen, P. J., Nielsen, A. H., Knudsen, F., Dyerberg, J. (1989) Further investigations of the defective protein C in hemodialysis, hemofiltration and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Blood Purif.* 7, 218.
109. Sørensen, P. J., Knudsen, F., Nielsen, A. H., Dyerberg, J. (1989) Protein C assays in uremia. *Thromb. Res.* 54, 301.
110. Sørensen, P. J., Knudsen, F., Nielsen, A. H., Dyerberg, J. (1988) Protein C in acute renal failure. *Acta Med. Scand.* 224, 375.
111. Aunsholt, N. A., Schmidt, E. B., Stoffersen, E. (1989) 1-Deamino-8-D-arginine vasopressin lowers protein C activity in uremics. *Nephron* 53, 6.
112. Kaufmann, P. A., Jones, R. B., Greenberg, C. S., Peters, W. P. (1990) Autologous bone marrow transplantation and factor XII, factor VII, and protein C deficiencies. Report of a new association and its possible relationship to endothelial cell injury. *Cancer* 66, 515.
113. Feffer, S. E., Carmona, L. S., Fox, R. L. (1989) Acquired protein C deficiency in patients with breast cancer receiving cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Cancer* 63, 1307.
114. Gordon, B., Haire, W., Kessinger, A., Duggan, M., Armitage, J. (1991) High frequency of antithrombin 3 and protein C deficiency following autologous bone marrow transplantation for lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 8, 497.
115. Karayalcin, G., Lanzkowsky, P. (1989) Plasma protein C levels in children with sickle cell disease. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 11, 320.
116. Rodgers, G. M., Conn, M. T. (1990) Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 75, 895.
117. v. Kries, R., Schweickert, M., Gunzelmann, K. H., Göbel, U. (1984) Antithrombin III-Aktivität und Konzentration bei gesunden und kranken Neugeborenen. *Labor-Medizin* 5, 353.
118. Thaler, E., Balzar, E., Kopsa, H., Pinerra, W. F. (1978) Acquired antithrombin III deficiency in patients with glomerular proteinuria. *Haemost.* 7, 257.
119. Marciniak, E. (1981) Thrombin-induced proteolysis of human antithrombin III: an outstanding contribution of heparin. *Br. J. Haematol.* 48, 325.
120. Andersson, G., Fagrell, B., Holmgren, K., Johnsson, H., Ljungberg, B., Wilhelmsson, S. (1984) Antithrombin III in patients with acute deep vein thrombosis during heparin treatment (subcutaneous and intravenous) and during and after treatment with oral coumarins. *Thromb. Res.* 34, 333.
121. Burkman, R. T., Bell, W. R., Zacc, H. A., Kimball, A. W. (1991) Oral contraceptives and antithrombin III: variations by dosage and ABO blood group. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 164 (6 Pt 1), 1453.
122. Legnani, C., Palareti, G., Pession, A. (1988) Intravascular coagulation phenomena associated with prevalent fall in fibrinogen and plasminogen during L-asparaginase treatment in leukemic children. *Haemost.* 78, 179.

Anschrift des Verfassers:

Univ.-Doz. Dr. P. Hopmeier
 Zentrallaboratorium
 Krankenhaus Rudolfstiftung
 Juchgasse 25
 1030 Wien

CAP

a-IgE

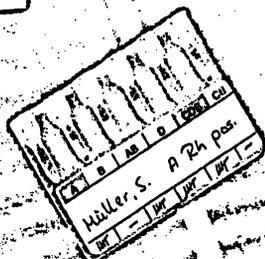
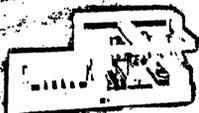
Werte
entscheiden.

Quantitative Allergiediagnostik. Monitoring der Entzündungsaktivität mit ECP.



Kabi Pharmacia
Diagnostics

**Sprechen Sie mit uns
über Automation
in der Immunhämatologie**



DiaMed
Micro Typing System

Die Technik der Zukunft - heute!



Serologisch-Chemisches Institut
Dr. E. Cohnen,
Wilhelm-Levison-Straße 5
5300 Bonn 1
Telefon (02 28) 21 53 06

41 Jahre Blutgruppen-Testseren
„Problemlose Blutgruppentestung
mit der SERCO-Spezial-Tüpfelplatte“

Anti-A/B/AB/A₁/H/A_{HP}/D/C/c/E/e
C^W/M/N/S/s/K/k/P/Fy^a/Fy^b/Jk^a/
Jk^b/Le^a/Le^b/Lu^a/Lu^b/G^c/Gm¹/Gm²
Gm³/Gm⁵/Gm¹⁷/Gm²¹/Km¹/Km³

Der Werte wegen...

Enzymimmunoassays

Syphilis*
H. pylori (IgA, IgG)
Chlamydia trachomatis (IgG)
Rubella* (IgG, IgM)
EBV (IgG, IgM)
HSV 1 und 2 (IgG, IgM)
Varizella Zoster Virus (IgG, IgM)
CMV (IgG)
Masern (IgG, IgM)
Mumps (IgG, IgM)
FSME (IgG, IgM)
Toxoplasmose (IgG, IgM, IgA)

Rekombinanter Blot
B. burgdorferi

Hämagglutination

Syphilis
B. burgdorferi
Rubella

Immunfluoreszenz

Syphilis
B. burgdorferi
Chlamydia trachomatis
HIV 1+2
Toxoplasmose

Schnelltests

H. pylori
Rubella
Adenovirus
Rotavirus
IM (Heterophile Ak)

*zur Zulassung eingereicht

BAG · Biologische Arbeitsgemeinschaft GmbH

Artsgerichtsstr. 1 - 5 · 6302 Lich · Tel. 06404/2026 · Fax 06404/62554 · Telex 4821786 bag d



Eicosanoide und Gerinnung *

Eicosanoids and coagulation

H. Sinzinger

Wilhelm Auerswald Atheroskleroseforschungsgruppe, Wien

Zusammenfassung:

Eicosanoide stammen von verschiedenen Vorstufenfettsäuren ab, von denen die Arachidonsäure die beim Menschen bedeutendste ist. Das qualitative und quantitative Syntheseprofil der Eicosanoide spielt in der Hämostaseregulation eine Schlüsselrolle. Die Modulation der Synthesekapazität und des Abbaus ebenso wie die Rezeptorregulation und Interaktion mit anderen Mediatoren sind bedeutende Mechanismen, die die lokal verfügbare Menge biologisch aktiver Substanzen regulieren. Die klinische Bedeutung des Eicosanoidsystems wird durch beobachtete Defekte im System untermauert, die mit einem Hämostaseungleichgewicht assoziiert sind. Methodologische Probleme im Nachweis der geringen Mengen der verschiedenen Substanzen limitieren bis heute das Wissen um die komplexe Rolle der Eicosanoide in der Hämostase.

Schlüsselwörter:

Eicosanoide – Prostaglandine – Cyclooxygenase – Vorstufenfettsäuren – Thrombose – Mediatoren

Summary:

Eicosanoids are derived from various precursor fatty acids, the most important one in men being arachidonic acid. The qualitative and quantitative synthetic profile of eicosanoids is of key importance for the regulation of hemostasis. Modulation of synthesis, stability and degradation as well as receptor regulation and interaction with other mediators are important mechanisms regulating the locally available amount of biologically active substances. The clinical relevance of the eicosanoid system is underlined by defects discovered in the system which are associated with hemostatic imbalance. Methodological problems in detecting the minimal amounts of the various compounds are still limiting knowledge on the complex role of eicosanoids in hemostasis.

Keywords:

Eicosanoids – prostaglandins – cyclooxygenase – precursor fatty acids – thrombosis – mediators

Einleitung

„Eicosanoide“ ist ein von Corey (1) erstmals eingeführter Sammelbegriff für alle Fettsäurenabkömmlinge mit 20 C-Atomen, von denen einige Prostaglandine (PG) und Thromboxane (TX) in der Gerinnung eine besondere Rolle spielen. Diese Gruppe von Substanzen ist charakterisiert durch ihre lokale Bildung, ihre kurze aber sehr hohe biologische Aktivität, gefolgt von einer raschen Metabolisierung, die zu einer Inaktivierung führt. In Ausnahmefällen (Abbildung 1) – wie am Beispiel von PGE₂, gezeigt – ist, offensichtlich in-vivo, eine Umwandlung zu einer anderen biologisch aktiven Substanz möglich.

Trotz der zahlreichen bisher mitgeteilten Befunde bleiben noch viele Fragen, vor allem in-vivo, ungelöst. Die Vielzahl

der an der Synthese beteiligten Zellen mit charakteristischem qualitativem aber unterschiedlich quantitativem Synthesemuster, haben der Meßbarkeit der Eicosanoide und damit der Interpretierbarkeit zahlreicher Daten betreffend in-vivo-Relevanz Grenzen gesetzt. Interessant ist die Beobachtung, daß die Transformation einer Zelle, z. B. eines Makrophagen in eine Schaumzelle oder eines Monozyten in eine Endothelzelle, zu einer qualitativen wie auch quantitativen Änderung des Synthesemusters Anlaß gibt, so daß sich die Zellen in wenigen Wochen funktionell an die neue Umgebung vollständig anpassen.

Vorstufen

Dihomogammalinolensäure (20:3), Arachidonsäure (20:4) und Eicosapentaensäure (20:5) bilden die Vorstufe der Prostaglandine der 1er-, 2er- bzw. 3er-Serie, benannt nach der Zahl ihrer Doppelbindungen (Abbildung 2). Die Sub-

Übersicht

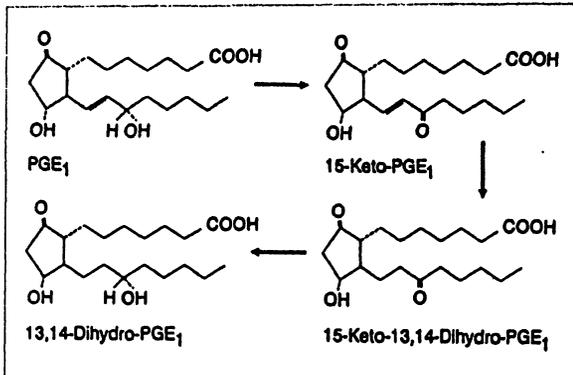


Abb. 1: Metabolismus von PGE₁.

stanzen können einerseits direkt entstehen oder aber auch aus den essentiellen Fettsäuren Linol- bzw. Linolensäure durch Kettenverlängerung bzw. Desaturierung umgewandelt werden. Da die Zahl der Doppelbindungen die biologische Aktivität der entsprechenden Substanz deutlich beeinflusst, ist bei einer ausgeprägteren Änderung des Vorstufenangebotes mit beträchtlichen Änderungen der durch Eicosanoide mediierten Signale zu rechnen. Hinsichtlich der Gerinnung ist bekannt, daß eine vermehrte Zufuhr von Omega 3-Fettsäuren zu einer Inaktivierung der Hämostase führt, da TXA₂ eine biologisch geringere Aktivität als TXA₂ aufweist, während PGI₂ bzw. PGI₃ vergleichbare Aktivitäten aufweisen. Darüber hinaus kommt es zu einer verlängerten Blutungszeit, die auch mit einer verminderten Prävalenz an degenerativen Gefäßveränderungen in Zusammenhang gebracht wurde.

Vorstufenfreisetzung

Eine unspezifische Schädigung der Zellmembran, z. B. mechanisch, entzündlich, toxisch oder durch Strahlung, führt – abhängig von Art und Dauer des einwirkenden Agens, ebenso wie Aktivatoren der Phospholipase (Peptide, Angiotensin, Bradykinin, Katecholamine, Thrombin, Cytokine, Wachstumsfaktoren) – zu einer Verfügbarkeit von freier Vorstufenfettsäure und damit einem Ingangsetzen des Metabolismus (Abbildung 2). Darüber hinaus ist dieser Prozeß Ca²⁺-abhängig. Eine Phase gesteigerter

Bildung ist meist von einer länger anhaltenden Periode verminderter Synthese gefolgt.

Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase ist ein membranständiger Multi-enzymkomplex der ubiquitär (Ausnahmen: Erythrozyten, Lymphozyten) die Umwandlung der Vorstufenfettsäuren katalysiert. Die Metabolisierung von PGH₂ ist abhängig vom Substratangebot, zellspezifisch, substratspezifisch sowie von der Gegenwart von Cofaktoren abhängig, die die Umwandlung steigern aber auch zu Verschiebungen der Synthese führen können.

Eicosanoide in der Gerinnung

Die für die Interaktion Blutstrom/Gefäßwand bedeutendsten Substanzen sind PGI, TXA, PGE, PGD, HHT und MDA. Ihre biologische Verfügbarkeit resultiert aus der Synthesemenge, der Stabilität der biologisch aktiven Substanz sowie dem Abbau (Hydrolyse oder enzymatischer Abbau).

Lokalisationsunterschiede

Während PGI₂ bei den großen Gefäßen von Säugern eine wesentliche Rolle in der Hämostaseregulation ausübt, scheint PGD₂ in der zerebralen Strombahn von höherer Bedeutung, was sich in einer entsprechend höheren Syntheserate der zerebralen Gefäße für PGD₂ bzw. einer pathologischen Veränderung der PGD₂-Rezeptoren vor allem bei zerebrovaskulären Gefäßerkrankungen manifestiert. Eine Persistenz der positiven Wirkungen weit über den Zeitraum der Nachweisbarkeit der Beeinflussung eines Mediators hinaus, hat zu dem Terminus „Zytoprotektion“ geführt und dieses Phänomen ist in der Hämostase insofern von Bedeutung, als mit bestimmten Eicosanoiden (PGI₂, PGE₁) vorhandene Gefäßabschnitte thromboresistent werden (2), d. h. die Anlagerung von Plättchen signifikant vermindert ist.

Am Beispiel von PGI₂, einem Vasodilatator und Hemmer der Thrombozytenaktivität, läßt sich zeigen, daß eine vermehrte Synthese und verlängerte biologische Halbwertszeit bei klinischen Konstellationen auftreten, die mit einer verstärkten Blutungsneigung einhergehen, wie z. B. Urämie, terminale Leberinsuffizienz, hämolytisch-urämi-

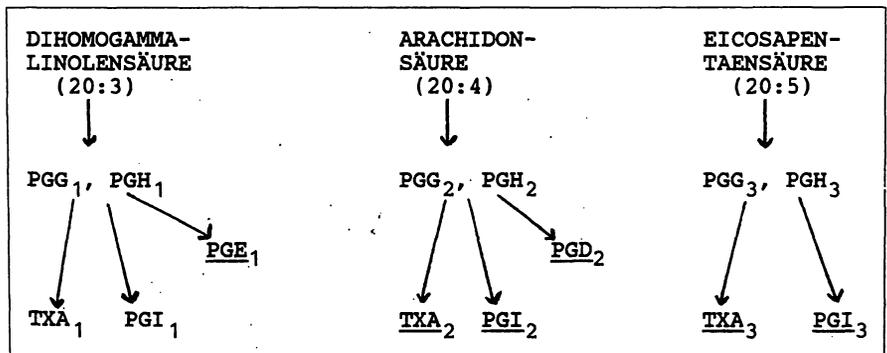


Abb. 2: Umwandlung aus den verschiedenen Vorstufenfettsäuren zu den unterschiedlichen Prostaglandinen. Abkürzungen: PG (G, H, E, D) = Prostaglandine, PGI = Prostacyclin, TXA = Thromboxan

schies Syndrom, Purpura Schönlein-Henoch, u. a., während andererseits Situationen einer deutlichen Aktivierung des Hämostasesystems wie Herzinfarkt, Schock, Malaria, AIDS mit einer ausgeprägten Verkürzung der Halbwertszeit assoziiert sind. Interessanterweise lassen sich diese Veränderungen nicht nur erworben temporär, sondern auch angeboren persistierend nachweisen.

Signaltransduktion

Körperzellen verfügen ihrer Aufgabe entsprechend über eine limitierte Menge spezifischer hochaffiner sowie eine große Zahl unspezifischer niederaffiner Bindungsstellen für Prostaglandine. Die weitere Signalübertragung erfolgt über das intrazelluläre zyklische AMP. Auf diese Weise vermag die Zelle bei wechselndem Substanzangebot die Transduktion durch Regulation und durch Sensitisierung bzw. Desensitisierung der Rezeptoren zu modulieren. So kann z. B. die Wirkung exogen zugeführter Eicosanoide durch vorangegangene endogene Synthesehemmung dieser Substanz verstärkt werden, während eine kontinuierliche Infusion (z. B. PGI₂, PGE₁) ebenso wie der synthetischen Analoga (z. B. Iloprost) zu einer Desensitisierung, also einer Verminderung der Wirksamkeit bei gleichbleibender Dosierung, führen. Für die drei genannten Substanzen existieren mittlerweile Doppelblindstudien, die signifikant positiv verliefen (4).

Interaktion mit anderen Mediatoren

Eine komplexe Interaktion, die im Rahmen der Gerinnung von Bedeutung ist, zeigen Prostaglandine z. B. mit Lipiden und Lipoproteinen. Während Eicosanoide einerseits die Struktur der Lipoproteine beeinflussen, den LDL-Rezeptor regulieren und den Einstrom von LDL in die Gefäßwand vermindern, verursachen LDL andererseits bei geänderter Nahrungszusammensetzung eine Änderung des Synthesemusters, sie beeinflussen den Prostaglandinrezeptor und die Prostaglandinsynthese. Diese letzteren aus der Sicht des Hämostasegleichgewichtes ungünstigen Wirkungen werden durch HDL verringert bzw. zum Teil aufgehoben. PGE₁, wie auch PGI₂ zeigen mit dem endothelium-derived relaxing factor (EDRF/NO) einen Synergismus (Abbildung 3). Der von der Gefäßwand freigesetzte t-PA führt ebenfalls noch zu einer Wirkungsverstärkung.

Defekte im Prostaglandinsystem

Die Tatsache, daß eine Vielzahl von verschiedenen Defekten im Eicosanoidsystem bei Patienten entdeckt wurde, die – meist – in sehr jungen Jahren sich klinisch bemerkbar machten und die auch vererbbar sind, spricht für die Bedeutung des Systems (6). Andererseits muß darauf hingewiesen werden, daß z. B. die Thromboxansynthese für die Plättchen zwar wichtig ist aber nicht essentiell, wie z. B. die Störung des ADP-Systems (Morbus Glanzmann) unter Beweis stellt.

Speziesunterschiede

Während bei Säugern PGI₂ eine zentrale Rolle in der Hämostaseregulation ausübt, ist diese Substanz bei ande-

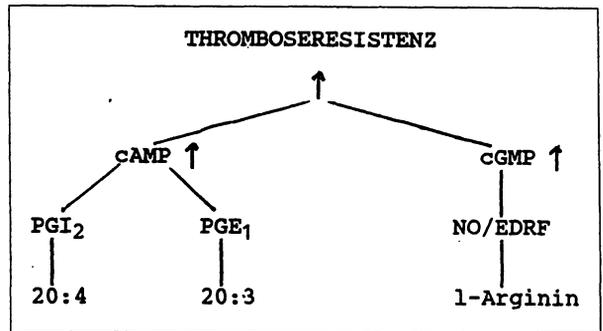


Abb. 3. Synergismus von PGE₁ und PGI₂ mit dem endothelium derived relaxing factor (NO/EDRF).

ren Spezies, wie z. B. bei Vögeln von untergeordneter Bedeutung. Ihre Funktion wird dort offensichtlich von PGE₂ übernommen.

Medikamente, die die Eicosanoid-synthese beeinflussen

- Arachidonsäurefreisetzung: unspezifisch durch Stabilisierung der Zellmembran, spezifisch durch Cyclooxygenasehemmung, reversibel (nicht-steroidale Antirheumatika), irreversibel (Acetylsalicylsäure),
- Thromboxansynthesehemmung: Pyridin- bzw. Nikotinsäurederivative, Imidazolderivative
- Strukturanaloga: Leukotriene, strukturanaloge Fettsäuren.
- Darüber hinaus beeinflussen eine Vielzahl der in der kardiovaskulären Medizin verwendeten Medikamente die PG-Synthese. Dazu gehören u. a. Ca-Antagonisten, ACE-Hemmer, sie entfalten Teile ihrer Wirkung über das Prostaglandinsystem (5).

Zu beachten ist, daß im Eicosanoidsystem eine Synthesehemmung mit einem Shift zu anderen Produkten des Syntheseweges zu erwarten ist, so daß eine Hemmung einer negativ wirkenden Substanz (Thromboxan A₂) nicht nur zu einer Steigerung der PGI₂-Synthese, sondern auch zu einer Akkumulation der proaggregatorisch wirksamen Endoperoxyde führt und damit experimentell wie auch klinisch die Erwartungen nicht erfüllt.

Nachweismethoden

Zum Nachweis der biologischen Wirksamkeit eignen sich Bioassays, die allerdings durch ihre Unspezifität und Interferenzen limitiert sind. Da die biologisch aktiven Eicosanoide sehr rasch abgebaut werden, ist man meist auf den Nachweis mittels Immunoassays angewiesen, die nur durch das meist geringe Problem der Kreuzreaktion beeinträchtigt werden. Viel größer ist hier die Problematik, daß es nicht gelingt, die abgebaute Substanz einer bestimmten Zelle, sondern nur einer Vielzahl verschiedener Zellen im Verband eines Gewebes zu erfassen, so daß die qualitative wie auch quantitative Einzelleistung meist nur

schwer abschätzbar bleibt. Immunhisto- und cytochemische Untersuchungen haben hier erste Informationen geliefert. Die hochspezifische Strukturaufklärung mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie muß wegen ihrer Aufwendigkeit, der nötigen Derivatisierung und der dadurch bedingten Kapazitätsgrenzen beschränkten wissenschaftlichen Fragestellungen auch weiterhin vorbehalten werden.

Zur praktischen Durchführung des Immunoassays ist die Aufarbeitung des Materials von essentieller Bedeutung (3). Dazu nur einige kurze und unvollständige Hinweise: Sie ist in den käuflich erhältlichen Kits meist nicht oder falsch generalisiert angegeben. Die Vorlage von EDTA und einer Cyclooxygenasehemmung ist essentiell. Eine Extraktion ist aufwendig und unnütz. Die Trennung von freiem und gebundenem Antigen muß in Gegenwart von Eiweiß mit einem Doppelantikörper, keinesfalls aber mit Kohle, erfolgen. Darüber hinaus führt eine Aufbewahrung für mehr als 2 Wochen bei weniger als -70°C zu einer Verfälschung der erhobenen Werte.

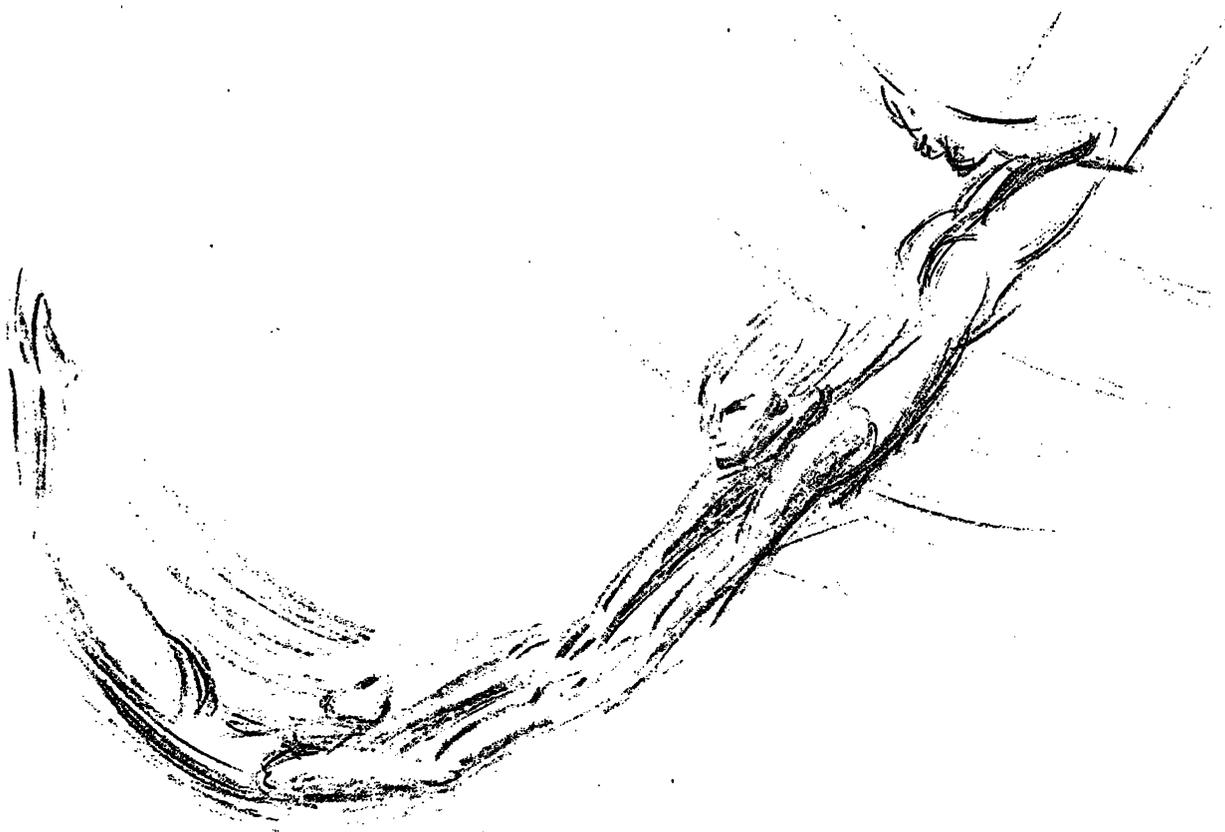
Literatur:

1. Corey, E. J., Niwa, H., Folck, J. R., Mioskowski, C., Arai, Y., Marfat, A. (1980) Recent studies on the chemical synthesis of eicosanoids. *Adv. Prostagl. Thrombox. Res.* 6, 19–33.
2. Sinzinger, H., Fitscha, P. (1983) Radioisotopic techniques for diagnosis of atherosclerosis. *Giorn. Arterioscl.* 2, 31.
3. Sinzinger, H., Reiter, S., Peskar, B. A. (1985) Removal, preparation and storage of human plasma for radioimmunological detection of prostaglandins. In: Schrör, K. (ed.) Prostaglandins and other Eicosanoids in the Cardiovascular System. Basel: Karger, pp 62–67.
4. Sinzinger, H., Rogatti, W. (1991) Prostaglandin E₂ in der Therapie der peripheren arteriellen Durchblutungsstörung. *Wk. klin. Wschr.* 103, 558–565.
5. Sinzinger, H., Virgolini, I., Gazso, A., O'Grady, J. (1991) Eicosanoids in atherosclerosis. *Exp. Pathol.* 43, 2–19.
6. Virgolini, I., O'Grady, J., Peskar, B. A., Sinzinger, H. (1990) Defects in the prostaglandin system – heredity, prevalence and vascular risk analysis. *Prostaglandins Leukotr. Med.* 40, 227–237.

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. Helmut Sinzinger
Wilhelm Auerswald Atheroskleroseforschungsgruppe
Nadlergasse 1
A-1090 Wien

Perfektion in Vollendung



Das vollkommene Analysenteam von Behring! Hepatitis-B-Reagenzien und ELISA-Prozessoren.

BD 096330

Das Analysenteam bietet:

- Die vollständige Hepatitis-B-Palette, Enzygnost® HB_s Ag monoclonal, Anti-HB_s micro, Anti-HBc monoclonal, Anti-HBc IgM, HBe, Anti-HBe in bewährter Behring Qualität und höchster Präzision.
- Flexibilität in der Anpassung an das Labor durch unterschiedliche Analyser für alle Serienlängen.
- Enorme Sicherheitsvorteile durch Barcode-Identifizierung von Mikrotitrationsplatten, Einzelriegeln und Reagenzien.
- Vereinfachtes Handling durch weitgehende Automatisierung und geringe Zahl an Arbeitsschritten.

Behringwerke AG
Postfach 11 40, 3550 Marburg/Lahn

Behringwerke AG
Med. Information und Verkauf
Postfach 1212
6237 Liederbach 1



Realtime-Barcode-Etiketten mit Spezimen-Kennung als organisatorisches Hilfsmittel im Krankenhauslabor

Realtime-barcode labels with specimen identification as an organizational aid in the hospital laboratory

K. Bauer

Zentrallabor Donauespital, Wien

Zusammenfassung:

Thermotransfer-Barcode-Etikettendrucker haben sich in vielen Bereichen der Wirtschaft und des Handels bewährt, wo aktuell erstellte Informationen, z. B. Gewicht einer Ware, rasch maschinenlesbar, z. B. an der Kasse des Supermarktes, gemacht werden soll. Wir haben uns im neueröffneten Zentrallabor des Donauespitals in Wien dieses Prinzip zu nutze gemacht, um nicht nur Tagesnummern, sondern auch Monatstag, Spezimenkennung und Patientennamen plus Station auf das Barcode-Etikett aufzubringen. Alle Etiketten werden aktuell bei der Übernahme der Proben gedruckt, und sofort zum Bekleben der Spezimen benutzt. Nach einem Jahr Routinebetrieb kann festgestellt werden, daß sich das System hervorragend bewährt hat.

Schlüsselwörter:

Realtime-Barcode-Etiketten – Labororganisation – Spezimenkennung

Summary:

Thermotransfer printers for barcode labels are of great use in many areas of business, economy and trade, especially when information generated on the spot (e. g., weight of goods) is to be made rapidly machine-readable (e. g., at the counter of a supermarket). We took advantage of this principle in the recently opened central laboratory of the Donauespital in Vienna: not only laboratory numbers, but also the date, specimen identification and the patients name plus ward are printed onto the barcode label. All labels are printed on the spot upon receipt of the specimen and are immediately applied onto the specimen tubes. After one year in routine service the system has been proved a marked success.

Keywords:

Realtime barcode label – laboratory organisation – specimen identification

Einleitung

Der Einsatz von Primärröhrchen in den verschiedensten Analysensystemen hat sich weitgehend durchgesetzt, weil dadurch die Risiken von Probenverwechslungen, Verschleppungen und Laborinfektionen minimiert werden können. Viele moderne Analysensysteme bieten darüber hinaus auch die Möglichkeit, das Primärröhrchen über einen Barcode-Etikettenleser im Gerät selbst zu identifizieren. Durch das Zusammenspiel von Primärröhrchen, Barcode-Etikettenleser im Gerät und bidirektionaler Schnittstelle zu einer laboreigenen Datenverarbeitung kann eine, nach heutiger Sicht, optimale Konfiguration bezüglich Datenfluß und Verwechslungssicherheit erreicht werden.

Diese organisatorische Kette hatte allerdings bisher einen entscheidenden Schwachpunkt insofern, als die Barcode-Etiketten im Vorrat gedruckt werden mußten (1).

Dazu gibt es zwei logistische Ansätze:

1. In die Anforderungsbögen ist ein entsprechender Satz vornumerierter Barcode-Etiketten für die Markierung der Röhrchen integriert. Diese werden nach Bedarf abgelöst und auf die Röhrchen geklebt.
2. Die Proben werden im Labor aus einem Vorrat an Barcode-Etiketten markiert. Der Nummerkreis kann theoretisch einen Tag bis ein Jahr umfassen, meist wird es ein Tag sein (2, 3).

Ad 1: Das System hat mehrere gravierende Nachteile:

Übersicht

1.1. Um das Risiko einer Nummernwiederholung möglichst gering zu halten, sind sehr große Nummernkreise (6 bis 7 Stellen) notwendig.

Dennoch ist die Möglichkeit, zwei gleiche Nummern am selben Tag von verschiedenen Patienten im Labor zu haben auf Dauer nicht mit Sicherheit auszuschließen.

1.2. Die Nummern kommen von verschiedenen Einsendern gemischt, es gibt im Labor kein numerisches Ordnungsprinzip bei den Proben. Bei größeren Probenzahlen wird dadurch das Aufsuchen einer bestimmten Probe praktisch unmöglich.

1.3. Bei Verwendung mehrerer Anforderungsbögen für Spezialanalysen hat eine Einsendung verschiedene Labornummern. Das erschwert die Erstellung eines Gesamtbefundes.

1.4. Die Anforderungsbögen sind sehr teuer.

1.5. Ein großer Teil der auf dem Bogen im Vorrat befindlichen Barcode-Etiketten wird nicht gebraucht und daher verworfen.

Ad 2: Auch dieses System ist unbefriedigend:

Will man alle Spezimen einer Anforderung mit derselben Nummer versehen, müssen entsprechende Zahlen an parallelen Nummern vorrätig sein. Alle nicht benutzten Etiketten sind jedes Mal zu verwerfen.

„Realtime“-Barcode-Etikettendruck

Durch den Einsatz von handelsüblichen Thermotransfer-Etikettendruckern mit entsprechender Steuerungssoftware ist es möglich geworden, im Labor selbst bei der Probenannahme einen patientenspezifischen Satz an Barcode-Etiketten zu generieren. Dabei muß allerdings der Druck der Etiketten so rasch erfolgen, daß diese bei der Probenannahme direkt verfügbar sind. In Anlehnung an einen Fachausdruck aus der EDV-Branche bezeichnen wir diesen Vorgang als Druck von „Realtime“-Barcode-Etiketten („RB“-Etiketten).

Soft- und Hardware

Das Donauespital besitzt ein elektronisches Krankenhausinformationssystem „KIS“, das von der gemeindeeigenen EDV-Abteilung (MD-ADV) entwickelt und implementiert wurde.

In der Planungsphase des Zentrallabors im hiesigen Krankenhaus war nach einer Marktanalyse klar, daß es für die vorgegebene Hardware der Fa. Digital Equipment Corp. keine passende fertige Software für den Laborbetrieb gab. In der Folge wurde daher ein detailliertes Pflichtenheft erstellt.

Die wesentlichen Teile der Laborsoftware wurden in ca. 5 Monaten entwickelt, implementiert und für die Produktion übergeben. Laborsoftware „LDS“ von proMumps in Graz, Österreich.

Im Donauespital sind zur Zeit vier Anforderungsbelege in Gebrauch:

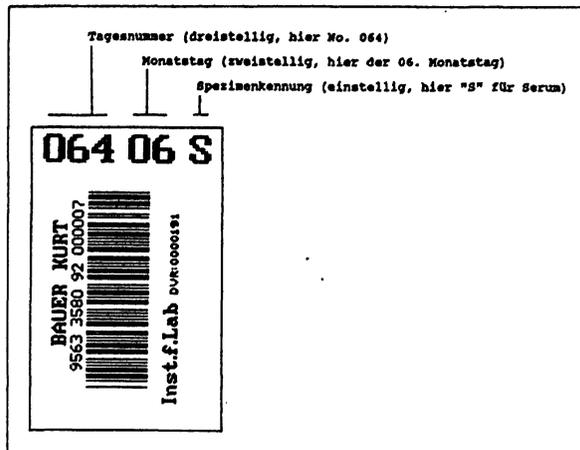


Abb. 1. Aufbau des Realtime-Barcode-Etiketts. Das Etikett enthält sämtliche relevanten Patientendaten in Klarschrift: Familienname, Vorname, Station, Aufnahmezahl (hier als 16stellige Langform), Tagesnummer, Monatstag, Spezimenkennung. Die letzten drei Daten auch als Barcode verschlüsselt.

1. Notfallanalysen

Klinische Chemie aus Serum oder Plasma, Gerinnung, Hämatologie, Harn, Liquor, Toxikologie, Drug monitoring, Blutgase.

2. Routineanalysen

Klinische Chemie, Hämatologie, Blutsenkung, Gerinnung, Liquor, Harn, Stuhl.

3. Spezialanalysen I

Isoenzyme, Spezialhämatologie, div. Proteine quantitativ, Serum- und Liquorimmunologie.

4. Spezialanalysen II

Drug monitoring, Tumormarker, Spurenelemente, Infektionserologie.

Die Belege sind für die maschinelle Einlesung ausgelegt, die Anforderung der einzelnen Analysen erfolgt durch Bleistiftmarkierung in einem definierten Feld.

Alle Belege und Etiketten von Fa. Moore-Paragon, Wien.

Hardware

Hauptrechner:

Digital-Equipment VAX 3100 Model 80

Arbeitsspeicher 72 MB

Hauptspeicher 4 Festplatten zu je 770 MB

(Digital Equipment Corp. Wien)

DecNet (Digital Equipment Corp. Wien)

17 Discless PC 386SX20 4 MB RAM (P. C. T. Computer, Taiwan)

11 Laserdrucker (HP LaserJet III, Hewlett-Packard GmbH, Wien)

1 Protokolldrucker mit Endlospapier H-12 (Hermes, Yverdon, Schweiz)

2 Belegkartenleser Axiome AXM 926 (V.24 Data Wien)

3 Barcode-Scanner Metrologic MS 700 (Metrologic Instruments, Inc., Blackwood, New Jersey, USA)
2 Bar Code Printer Formula 21 S (V.24 Data Wien)

Patientenadministration

Grundsätzlich wird jeder Patient, der ambulant oder stationär im Donauespital behandelt wird, mit Hilfe des hauseigenen Krankenhausinformationssystems „KIS“ administriert. Dabei werden sämtliche relevanten Stammdaten des Patienten entweder in der Aufnahmekanzlei oder am Ambulanzschalter für die Verwaltung erfaßt. Unmittelbar nach der Patientenerfassung wird für den Patienten ein Satz Barcode-Etiketten ausgedruckt, der für die Identifikation sämtlicher administrativen Schritte im Krankenhaus zu verwenden ist (Labor-, Röntgen-, Essen-, Apothekenanforderungen etc.). Im Barcode verschlüsselt ist ein 9stelliger alphanumerischer Kenncode „MAC“, der für jeden Patienten, seine Station oder Ambulanz, und den aktuellen Aufenthaltszeitraum spezifisch ist. (Grundlage für den 9stelligen alphanumerischen Code ist eine 16stellige Langform, die allerdings nicht Barcode-lesbar ist.)

Laboranforderungen und Spezimen sind von der anfordernden Stelle grundsätzlich mit dem „MAC“-Etikett des Patienten zu kennzeichnen. (In Ausnahme- und Notfällen kann das Zentrallabor selbst den Patienten ebenfalls administrieren). Aufgrund der scheinbar regellosen alphanumerischen Datenstruktur sind diese „MAC“-Etiketten allerdings als Ordnungsprinzip im Labor ungeeignet.

Grundsätzliche Logistik der laborinternen Probenidentifikation

Wir haben uns daher entschlossen, als Ordnungsprinzip im hiesigen Zentrallabor generell eine 3stellige Tagesnummer einzusetzen. Erweiterung auf vier Stellen ist möglich und vorgesehen. Für Routineproben beginnt der Nummernkreis jeden Tag um 00.00 Uhr mit „001“, für Notfallproben mit „701“. Beide Nummernkreise werden bei jeweiliger Probenannahme kontinuierlich hochgezählt. Zur genaueren Identifikation wird nach der Tagesnummer auch noch der Monatstag mitgeführt, um Probenverwechslungen mit den Vortagen zu vermeiden.

In einem großen Krankenhauslabor werden Analyte aus den unterschiedlichsten Spezimen bestimmt. Wird eine Laboranforderung mit verschiedenen Spezimen unter einer Labornummer administriert, so muß zu der Labornummer auch noch eine Spezimenkennung zugefügt werden, ansonsten könnte es zu Verwechslungen kommen (z. B. Harn und Ascites). Darüber hinaus bietet die Spezimenkennung noch die Möglichkeit, jeder Probe die richtigen Referenzwerte zuzuordnen, und Irrtümer bei der Probenbestückung der Geräte (Harn statt Serum) zu vermeiden. Es wird daher jedem Spezimen ein Buchstabe zugeordnet, der den Ordnungsbegriff ergänzt.

Der komplette laborinterne Barcode enthält daher

1. die dreistellige Tagesnummer
2. den zweistelligen Monatstag
3. den Buchstaben zur Spezimenkennung.

Der vollständige Aufbau des Realtime-Barcode-Etiketts ist in Abb. 1 gezeigt.

Alle Analysen, die unter derselben Tagesnummer am selben Montagstag administriert wurden, können am selben Befund für den Patienten ausgedruckt werden.

Aus datenpolitischen Überlegungen wurde in der Planungsphase des ZL festgelegt, daß die Nummernvergabe für die Patientenproben und die anschließende Einlesung der Anforderungsbelege im „KIS“ erfolgt, und erst dann der komplette Datensatz in das laboreigene EDV-System „LDS“ übertragen wird.

Ablaufschema der Probenübernahme im Labor

1. Anforderungsbelege tragen Strichmarkierungen für alle tatsächlichen Anforderungen und das „MAC“-Etikett. Alle Spezimen tragen ebenfalls das „MAC“-Etikett.
2. Bei der Probenübernahme wird ein „MAC“-Etikett des Patienten, egal ob auf Beleg oder auf Röhrchen über einen Barcode-Scanner eingelesen.
3. Auf dem zugehörigen Terminal erscheinen die Stammdaten des betreffenden Patienten, und ein Eingabefeld für die Spezimenkennung. Die Spezimenkennung wird mit einem Einzelbuchstaben („B“ für Blutbild, „S“ für Serum, „P“ für Plasma usw.) auf der Tastatur eingegeben, und abschließend mit „TAB“ quittiert. Mit dem „TAB“ wird automatisch auch ein „RB“-Etikett ohne Spezimenkennung für den Anforderungsbeleg generiert. Letzterer Vorgang läßt sich bei Vorliegen von mehreren Spezialanforderungsbelegen auch multiplizieren.
4. Unmittelbar nach dem Quittieren der Eingabe wie oben beschrieben, werden automatisch nacheinander die entsprechenden Etiketten auf einem Thermotransfer-Etikettendrucker am Übernahmeplatz ausgedruckt. Die „MAC“-Etiketten auf den Röhrchen werden mit dem jeweils passenden „RB“-Etikett überklebt, und auch die Anforderungsbelege entsprechend markiert.
5. Die Spezimen gehen anschließend an die einzelnen Arbeitsplätze. Die Anforderungsbelege werden über einen Einzelblatt-Belegleser eingelesen. Dabei sind Kontrollen und Korrekturen über ein zugeordnetes Terminal jederzeit leicht möglich.
6. Notfälle werden an einem eigenen Übernahmeplatz administriert. An diesem Platz beginnt die Nummernausgabe täglich mit „701“. Dadurch sind die Notfälle schon von der Nummer her eindeutig identifiziert, und können mit entsprechender Priorität zum Großteil dennoch an den Routinearbeitsplätzen abgearbeitet werden. Dadurch entfällt viel von einer sonst eventuell notwendigen, parallelen Routine laufenden eigenen Notfall-Labororganisation.

Diskussion

Nach einem Jahr Routinebetrieb hat sich das System bestens bewährt. Eine Laborhilfskraft kann an einem Übernahmeplatz ca. 100 Patienten pro Stunde bearbeiten. Dies wurde allerdings nur möglich, weil bei der Entwick-

lung jede einzelne Manipulation und jeder Tastendruck am Übernahmeplatz zeitmäßig und organisatorisch optimiert wurden.

Das gesamte System ist naturgemäß sehr komplex. Dennoch wird es vom medizinisch-technischen Personal uneingeschränkt akzeptiert und benutzt, da es enorme organisatorische Erleichterungen im Arbeitsablauf bringt. Das klare Konzept kann von jeder MTA an ihrem Arbeitsplatz überblickt und nachvollzogen werden, was wesentlich zur allgemeinen Akzeptanz beiträgt.

Vorteile des Realtime-Barcode-Etiketts bei der Labororganisation

1. Sämtliche Arbeitsplätze können die Proben leicht überschaubar ordnen und archivieren.
2. Alle Spezimen einer Laboranforderung haben dieselbe Nummer, sie sind daher leicht zusammenzuführen. Das erleichtert Kontrollen und Spezimenaustausch unter den Arbeitsplätzen.
3. Alle Resultate einer Laboreinsendung, auch wenn sie auf unterschiedlichen Spezialanforderungen erfolgten, lassen sich routinemäßig zu einem Gesamtbefund zusammenführen. Dies erleichtert die Validierung des gesamten Befundes.
4. Geräte mit internem Barcode-Leser akzeptieren nur passende Spezimen. So kann Gesamteiweiß z. B. aus

Plasma am Hitachi 717 nicht bestimmt werden, weil diese Analyse für das Spezimen nicht angelegt ist. Dieselbe Analyse kann aber aus Serum desselben Patienten am selben Gerät selbstverständlich durchgeführt werden. Ähnliches gilt für Analysen von Harn, Liquor, Ascites etc.

5. Die Labor-EDV gibt zu jedem Spezimen automatisch die richtigen Referenzwerte der einzelnen Analysen an.

6. Notfälle werden mit Priorität soweit als möglich in der Routine abgearbeitet. Sie sind aber dennoch sowohl vom medizinisch-technischen Personal am Arbeitsplatz, als auch vom ärztlichen Personal am Validierungsbildschirm jederzeit identifizierbar. Das erspart teure und wenig effiziente Parallelorganisationen.

Literatur:

1. Haeckel, R. (1979) Rationalisierung des medizinischen Laboratoriums. G-I-T Verlag, Darmstadt, p. 352
2. Keller, H. (1991) Klinisch-chemische Labordiagnostik für die Praxis. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, p. 66
3. Hanne, W. (1985) Markierungsbelege – (immer noch) aktuelle Unterstützung bei der Labororganisation. Labor-Medizin 2/85, 96–98

Anschrift des Verfassers:

Univ.-Doz. Dr. Kurt Bauer
Zentrallabor
Donauspital
Langobardenstrasse 122
A-1220 Wien