

**Faktor VII- aktivierende Protease  
(FSAP)  
während der normalen  
Schwangerschaft**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Prickartz, Isabella  
aus Aachen**

**Gießen, 2007**

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, kardiologisches Labor, Medizinische Klinik I der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Tillmanns

Betreuer: Prof. Dr. Hölschermann

Gutachter: PD Dr. Kanse  
Prüfungsvorsitz : Prof. Dr. Linn  
Prüfungsmittglied: Prof. Dr. Weißmann

Tag der Disputation: 15.02.2008

# **I. Inhaltsverzeichnis**

---

## **I. Inhaltsverzeichnis**

## **II. Abbildungsverzeichnis**

## **III. Tabellenverzeichnis**

## **IV. Abkürzungsverzeichnis**

### **1. Einleitung**

- 1.1. Hämostaseologisches Gleichgewicht: Gerinnung und Fibrinolyse
- 1.2. Gerinnung und Thrombose in der Schwangerschaft und im Wochenbett
  - 1.2.1. Veränderung der Gerinnung
  - 1.2.2. Thrombose
- 1.3. Faktor VII aktivierende Protease (FSAP)
- 1.4. Zielstellung der Studie

### **2. Material und Methoden**

- 2.1. Studienpopulation
- 2.2. Kontrollgruppe
- 2.3. Gewinnung der Blutproben
- 2.4. Bestimmung der Parameter
  - 2.4.1. Quick, PTT, Fibrinogen
  - 2.4.2. FSAP-Isolierung aus dem Plasma
  - 2.4.3. FSAP-Antigen
  - 2.4.4. FSAP-Aktivität
  - 2.4.5. DNA-Analyse
- 2.5. Immunhistochemie
- 2.6. Statistische Methoden

### **3. Ergebnisse**

- 3.1. Ergebnisse der DNA-Analyse
- 3.2. Veränderungen gerinnungsphysiologischer Parameter
  - 3.2.1. Quick
  - 3.2.2. PTT
  - 3.2.3. Fibrinogen
- 3.3. Veränderungen von FSAP

- 3.3.1. FSAP-Antigen
- 3.3.2. FSAP-Aktivität
- 3.3.3. Aktivitäts/ Antigen -Ratio
- 3.4. Mutterpassauswertung
- 3.5. Immunhistochemie

#### **4. Diskussion**

- 4.1. Studienergebnisse
- 4.2. Grund der Studiendurchführung
- 4.3. Ergebnisse im Einzelnen
  - 4.3.1. DNA-Analyse
  - 4.3.2. Quick, PTT, Fibrinogen
  - 4.3.3. FSAP-Antigen
  - 4.3.4. FSAP-Aktivität
  - 4.3.5. Aktivitäts/ Antigen -Ratio
  - 4.3.6. Immunhistochemie
- 4.4. Zusammenfassung und Ausblick
- 4.5. summary

#### **5. Literaturverzeichnis**

#### **6. Anhang**

- 6.1. Abschlussbrief an die gynäkologischen Praxen (Muster)
- 6.2. Aufklärungsbrief an die Probandinnen

#### **7. Eidesstattliche Erklärung**

#### **8. Danksagung**

#### **9. Lebenslauf**

## II. Abbildungsverzeichnis

---

- ❖ **Abbildung 1:** Das neue Modell der Blutgerinnung (aus 37).
- ❖ **Abbildung 2:** Struktur von FSAP mit Marburg I (Gly511Glu, ►) und Marburg II (Glu370Gln, ►). Das aktive Zentrum (His-Asp-Ser) des Enzyms ist mit (\*) gekennzeichnet. Spaltungsstellen sind mit ( ➡ ) gekennzeichnet.
- ❖ **Abbildung 3 :** Die Rolle von FSAP in der Gerinnung
- ❖ **Abbildung 4:** Mutationsfrequenz
- ❖ **Abbildung 5:** Quick im Verlauf der Schwangerschaft
- ❖ **Abbildung 6:** aPTT im Verlauf der Schwangerschaft
- ❖ **Abbildung 7:** Fibrinogen im Verlauf der Schwangerschaft
- ❖ **Abbildung 8:** FSAP Antigen im Plasma gesunder Schwangerer
- ❖ **Abbildung 9:** FSAP Antigen: Wildtyp versus Marburg I
- ❖ **Abbildung 10:** FSAP Aktivität im Plasma gesunder Schwangerer
- ❖ **Abbildung 11:** FSAP Aktivität: Wildtyp versus Marburg I
- ❖ **Abbildung 12:** FSAP Aktivität/Antigen-Ratio, Wildtyp versus Marburg I
- ❖ **Abbildung 13:** FSAP in der Plazenta
- ❖ **Abbildung 14:** FSAP in den Eihäuten

### III. Tabellenverzeichnis

---

- ❖ **Tabelle 1:** Veränderungen der Gerinnung und Fibrinolyse in SS und Wochenbett (modifiziert übernommen aus 40).
- ❖ **Tabelle 2:** Kontrollgruppe
- ❖ **Tabelle 3:** Zusammenfassung aller Studienergebnisse
- ❖ **Tabelle 4:** Missed abortion im Vergleich zu restlichen Schwangeren
- ❖ **Tabelle 5:** Ergebnisse der Mutterpassauswertung
- ❖ **Tabelle 6:** Färbeintensität verschiedener Gewebe mit zwei mABs gegen FSAP

## IV. Abkürzungsverzeichnis

---

aPTT	aktivierte partielle Thrombinzeit
AT III	Antithrombin III
EGF	Epidermal growth factor
FSAP	Factor seven activating protease
HABP2	Hyaluronsäurebindungsprotein 2
HGFA	Hepatocyte growth factor activator
IUGR	Intrauterine growth restriction
LMWH	Low molecular weight heparine
MAPK	Mitogen activated Proeinkinase
MW	Mittelwert
PAI	Plasminogenaktivatorinhibitor
PAI	Plasminogenaktivatorinhibitor
PDGF-BB	Platelet derived growth factor BB
PHBP	Plasma- Hyaluron-Binding Protein
PT	Prothrombinzeit
SD	Standardabweichung
SIH	Schwangerschaftsinduzierter Hypertonus
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SS	Schwangerschaft
SSW	Schwangerschaftswoche
TAFI	Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor
TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor Pathway inhibitor
t-PA	tissue-Plasminogenaktivator
u-PA	Urokinase-Plasminogenaktivator
uPAR	Urokinase-Plasminogenaktivatorrezeptor
VSMC	Vascular smooth muscle cell

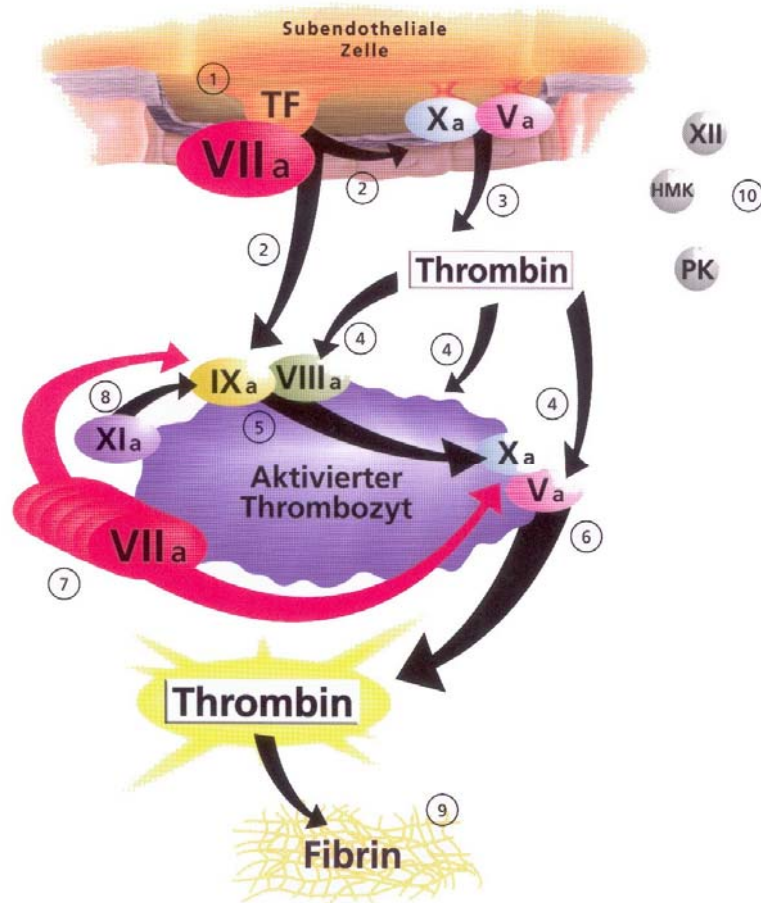
## 1. Einleitung

### 1.1. Hämostaseologisches Gleichgewicht: Gerinnung und Fibrinolyse

Nach einer Gefäßverletzung kommt es zu einem komplexen und fein regulierten Zusammenspiel verschiedener Systeme, die als Gerinnung und Fibrinolyse sowohl eine dauerhafte Blutstillung, als auch einen ungehinderten Blutfluss sichern. Dabei sind die im Rahmen der primären Hämostase ablaufenden Prozesse, wie Vasokonstriktion und Thrombozytenadhäsion, wichtiger Ausgangspunkt für die plasmatische Gerinnung als sekundäre Hämostase.

Die plasmatische Gerinnung vollzieht sich als Enzymkaskade über mehrere Schritte. 1964 wurde erstmalig von Mac Farlane und Davie et al. ein Gerinnungsmodell postuliert, das aus einer Wasserfallsequenz einzelner Gerinnungsenzyme bestand, und zur Thrombinbildung führt (20,27). Dieses Modell hat bis heute Aktualität. Die Gerinnungsfaktoren sind größtenteils Serinproteasen, die im Plasma als inaktive Zymogene zirkulieren und durch Spaltung aktiviert werden. Sie werden mit römischen Ziffern bezeichnet, ein nachgestelltes „a“ zeigt den aktiven Faktor an. Klassischerweise wurde zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen Weg der Blutgerinnung unterschieden. Der Ausgangspunkt des extrinsischen Weges ist die Bindung des plasmatischen Faktors VIIa an subendotheliales Gewebsthromboplastin (Tissue factor), was zur Bildung des FVIIa-TF-Komplexes führt, der die Proenzyme Faktor IX und Faktor X aktiviert (11). Aktiver Faktor X spaltet geringe Mengen von Faktor II zu Thrombin, welches zur Aktivierung von Plättchen und der Kofaktoren Faktor V und VIII führt. Der intrinsische Weg wird auf einer Membranoberfläche durch Aktivierung des Faktor XII gestartet, was über Spaltung des Faktor XI zur Bildung des Faktor VIIIa- Faktor IXa-Komplexes führt, welcher nun seinerseits Faktor X aktiviert. Die Aktivierung des Faktor X ist gemeinsame Endstrecke der beiden Gerinnungswege. Faktor X bildet mit dem Kofaktor Va und Calciumionen den Prothrombinasekomplex, der zur Bildung von Thrombin (Faktor IIa) führt. Thrombin verstärkt seine eigene Bildung durch Aktivierung von Faktor XI, Plättchen und der Kofaktoren V und VIII. Thrombin wandelt im letzten Teil des Gerinnungsweges Fibrinogen zu Fibrin und führt unter Einfluss von Faktor XIIIa zur Bildung des stabilen quervernetzten Fibringerinnsels. In einem moderneren Gerinnungsmodell wird nicht mehr zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg unterschieden, vielmehr geht





**Abbildung 1: Das neue Modell der Blutgerinnung (aus 37).**

1. Nach Gewebsverletzung bindet TF FVII 2. TF-/VII-Komplex aktiviert FIX und FX 3. FVa/Xa-Komplex aktiviert Prothrombin 4. Thrombin aktiviert FV, VIII und Thrombozyten 5. FVa/VIIIa/IXa –Komplex aktiviert FX. 6. FVa/Xa-Komplex katalysiert den Thrombin-Burst 7. supraphysiologischer F VIIa bindet direkt an aktivierte Thrombozyten 8. Aktivierung von FXI durch Thrombin 9. Fibrinogen wird zu Fibrin und bildet stabiles Gerinnsel 10. FXII, HMW-Kininogen und Plasmapräkallikrein spielen keine hämostaseologisch relevante Rolle.

man von einem parallelen Wirken der beiden Systeme auf Zelloberflächen aus (37, 38,71). Auch in diesem Modell startet die Gerinnung durch Bindung von Faktor VIIa an TF (Initiationsphase), dieser Komplex aktiviert geringe Mengen der Faktoren IX und X. Der aktive Faktor X bildet mit Faktor Va den Prothrombinasekomplex auf TF-exprimierenden Zellen. Dieser Komplex bildet zunächst nur geringe Thrombinmengen, die zur Aktivierung der Kofaktoren V und VIII, des Faktors XI und der Plättchen führen (Amplifikationsphase). Im nächsten Schritt, der Propagationsphase, werden auf der Oberfläche aktivierter Plättchen der Tenasekomplex aus den Faktoren IXa, VIIIa und Calciumionen und der

Prothrombinasekomplex gebildet. Dies führt zu einer sekundären, stärkeren Ausschüttung (burst) von Thrombin. Die oben beschriebenen Modelle münden in der Bildung von Thrombin aus Faktor II. Thrombin kann sich nun von der Phospholipidoberfläche lösen und seine wichtigste Aufgabe in der Hämostase erfüllen: die Umwandlung von Fibrinogen (Faktor I) in Fibrin und damit zur Bildung eines stabilen Gerinnsels, dabei wirken Faktor XIIIa und Calciumionen als Kofaktoren. Schon während der Bildung des Fibringerinnsels am Ort der Gefäßverletzung, wird der Gerinnungsprozess durch verschiedene Inhibitoren reguliert und auf den Ort der Verletzung begrenzt. So wird die Aktivität von Faktor Xa und Faktor VIIa durch TFPI und Antithrombin gehemmt. Ein weiterer wichtiger Gerinnungsinhibitor ist das Protein C-Protein S-System. Gebildetes Thrombin kann an intaktem Endothel an einen spezifischen Rezeptor, das Thrombomodulin, binden und so Protein C aktivieren. Aktiviertes Protein C inhibiert nun mit Hilfe des Kofaktors Protein S die Faktoren V, VIII und fördert durch Inaktivierung von PAI-1 direkt die Fibrinolyse.

Zusätzlich zu den genannten Inhibitoren der Gerinnung existiert ein fibrinolytisches System, das den Organismus vor unkontrollierter Fibrinbildung schützt. Die Fibringerinnsel müssen nach erfolgreicher Abdichtung der Gefäßverletzung so rasch wie möglich abgebaut werden, sonst droht ein thrombotischer Gefäßverschluss. Das Hauptabbauenzym ist Plasmin, das den Fibrinthrombus zu Fibrinospaltprodukten abbaut. Plasmin wird durch zwei Plasminogenaktivatoren, Urokinase-Plasminogenaktivator (u-PA) und Gewebs-Plasminogenaktivator (t-PA), aus seinem Zymogen Plasminogen gebildet. Proenzyme der Gerinnung und Fibrinolyse zirkulieren in niedriger Konzentration im Plasma und benötigen die Konzentrierung auf Zelloberflächen zur Entfaltung ihrer Funktion. Dies wird unter anderem durch Protease activatable receptors (PARs) gewährleistet (67). U-PAR wird auf vielen Zelltypen exprimiert, wie Blutleukozyten, endothelialen und vaskulären glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Knochenmarkszellen und neoplastischen Zellen. Die Liganden für u-PAR sind u-PA, Vitronectin und Kininogen. Aktives u-PA stimuliert die Zellmotilität (Chemotaxis, Migration) und die Plasminbildung, was im Folgenden zum Abbau von ECM-Proteinen und proteolytischen Veränderungen von Zelloberflächenkomponenten führt (68). So gibt es zahlreiche Verbindungen zwischen den Prozessen der Gerinnung, Fibrinolyse und Zellfunktionen. Der fibrinolytische Prozess lässt sich in zwei Phasen unterteilen: In der ersten Phase spaltet eine kleine Menge, im Gerinnsel gebundenes, Plasmin Fibrin. Die dabei

entstehenden Lysinreste sind bevorzugte Bindungsstellen für weiteres im Plasma vorhandenes Plasminogen. Die zweite Phase mit verstärktem Fibrinabbau beginnt. Die Fibrinolyse wird durch Inhibitoren reguliert, dazu gehören Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) bis PAI-4,  $\alpha$ 2-Antiplasmin und  $\alpha$ 2-Makroglobulin (9). t-PA und u-PA unterliegen der Kontrolle durch PAI-1 (42).  $\alpha$ 2-AP und  $\alpha$ 2-Makroglobulin hemmen die Plasminwirkung (3). Auch Fibrin selbst greift regulatorisch in den Prozess des eigenen Abbaus ein, indem es die Konversion von Plasminogen zu Plasmin beschleunigt. Thrombin-activatable-fibrinolysis-inhibitor (TAFI), als wichtiges Verbindungsstück zwischen Fibrinolyse und Gerinnung, wird durch Thrombin aktiviert und hemmt die Bindung von Plasminogen an Fibrinreste (4). Eine abgeschwächte fibrinolytische Aktivität ist mit der Entstehung einer Thrombose assoziiert. Solch eine Reduktion tritt unter anderem in der frühen postoperativen Phase, während der Einnahme oraler Kontrazeptiva und im letzten Schwangerschaftstrimester auf (91).

## **1.2. Gerinnung und Thrombose in der Schwangerschaft und im Wochenbett**

### **1.2.1. Veränderung der Gerinnung**

Der Verlauf der Schwangerschaft wird von einer Vielzahl von Veränderungen der Hämostase und der Fibrinolyse begleitet. Diese betreffen neben den plasmatischen Gerinnungsfaktoren, die Fibrinolyse, die Thrombozytenfunktion, das Gefäßsystem, sowie rheologische Faktoren. Die Veränderungen sind als Vorbereitung des Körpers auf die Geburt zu sehen, bei welcher es zum Zeitpunkt der Plazentalösung rasch zum Erliegen eines fast 700 ml/Minute umfassenden Blutstromes kommen muss, um unter anderem das Leben der Mutter zu schützen (69). Andererseits ist im Verlauf der Schwangerschaft die Entwicklung des Embryos durch einen kontinuierlichen Blutfluss in der utero-plazentaren Einheit zu gewährleisten. Thromboembolische Erkrankungen haben in der Schwangerschaft und im Wochenbett auf Grund ihrer hohen mütterlichen Letalität eine große Bedeutung und sind eine der Hauptursachen der mütterlichen Mortalität (5,31,65). Ihre Pathogenese ist bisher nur teilweise geklärt. Im Verlauf der Schwangerschaft kommt es zur Ausbildung der utero-plazentaren Einheit, welche für das Überleben sowohl der Mutter, als auch des sich entwickelnden Kindes von entscheidender Bedeutung ist. Sie besteht aus einem dualen Gefäßsystem, wobei die fetalen villösen Trophoblastgefäße von Blut aus

mütterlichen Dezidualarterien umspült werden. Auf der Oberfläche der kindlichen Gefäße werden große Mengen an Annexin V exprimiert, ein potentes Antikoagulant. Das mütterliche Blut ist reich an Prokoagulantien. Lokale Faktoren halten dieses Gleichgewicht aufrecht, da eine Thrombosierung des intervillösen Raumes eine Minderversorgung des Feten nachsichziehen würde (70). Nach der Implantation ist ein kontinuierlicher Blut- und Nährstofffluss in Richtung der Amnionhöhle zu sichern, dies geschieht unter anderem durch strukturelle Veränderungen der Spiralarterien, welche den Ersatz der glatten Muskelzellen und elastischen Fasern durch eine Matrix aus Fibrin und Trophoblast beinhalten, um einen ansteigenden Blutfluss zur uteroplazentaren Einheit zu sichern (88). Das sensible Gleichgewicht dieser Veränderungen wird durch verschiedene pathologische Zustände gefährdet. So kommt es z.B. bei Präeklampsie zu einer erhöhten Fibrinablagerung in der Plazenta und dadurch zu einem vermindertem utero-plazentaren Blutfluss (36).

Mit fortschreitender SS kommt es durch Anstieg mehrerer Gerinnungsfaktoren einerseits und durch Verminderung des antikoagulatorischen Potentials andererseits zu einem hyperkoagulablen Zustand (10,56,82). Diese Imbalance ist multifaktoriell bedingt. Es kommt zu einem Anstieg der Plasmakonzentration einiger Gerinnungsfaktoren. Dazu gehören Fibrinogen und die Faktoren I, II, V, VII, VIII:C, vWF und geringer ausgeprägt auch die Faktoren IX, X, XII und XIII (11,36,50,51,82,83). Die Konzentration der ersten Gruppe erreicht im Verlauf der Schwangerschaft Werte von bis zu 376% der Norm. Lediglich für den Faktor XI werden leicht sinkende Konzentrationen beschrieben (35). Faktor VII steigt auf 2- bis 3-fache Konzentrationen an, wobei der Anstieg unter anderem durch Bildung eines Komplexes aus FVII und Phospholipiden verursacht wird, der nur in der Schwangerschaft existiert und der möglicherweise durch hohe Thromboplastinmengen in der Plazenta generiert wird. Nach der Entbindung fällt die Konzentration von FVII rasch auf Normalniveau ab (18,19). Die erhöhte Aktivität von Faktor VII nimmt als Ausgangspunkt des extrinsischen Gerinnungsweges eine wichtige Position im allgemeinen hyperkoagulablen Zustand ein. Es kommt nicht nur zu einem Anstieg der Konzentrationen der Gerinnungsfaktoren, sondern auch zu einer Gerinnungsaktivierung. Daher sind erhöhte Konzentrationen der Prothrombinfragmente F1 + F2, der Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT) (95), der Fibrinmonomere und von Fibrinopeptid A im Verlauf der Schwangerschaft nachweisbar (36,65,66). Zusätzlich kommt es zu einer Reduktion bestimmter natürlicher Antikoagulantien, wie Antithrombin und Protein S, während Protein C

unverändert bleibt (10). Darüber hinaus entwickelt sich im Verlauf der normalen Schwangerschaft eine wahrscheinlich hormonell bedingte Resistenz gegen Aktiviertes Protein C (APC-Resistenz), das heißt eine APC Sensitivitäts Ratio unterhalb des unteren Limits nicht schwangerer Frauen (17,86). Kjelberg et al. fanden keine Erklärung für die erworbene APC-Resistenz, es bestand keine Korrelation zwischen der Veränderung der klassischen APC-Ratio und der Veränderung von F VIII, Fibrinogen oder Protein S (52). Andererseits steigt auch der „extrinsic pathway inhibitor“ (EPI) bzw. „tissue factor pathway inhibitor“ (TFPI) im Verlauf der Schwangerschaft auf ca. 125% der Norm an (4,6). Antithrombin III bleibt unverändert.

Zu den Veränderungen des fibrinolytischen Systems werden kontroverse Meinungen vertreten. Es wird über den Abfall fibrinolytischer Faktoren bis zur Entbindung berichtet (95,97). Der Großteil der Arbeitsgruppen beobachtet jedoch ein Ansteigen von Plasminogen, t-PA, u-PA und dem fibrinolytischen Parameter D-Dimer (6,35,51), so dass von einer allgemeinen Aktivierung des Fibrinolyse-Systems ausgegangen werden kann. Die D-Dimerspiegel erreichen während der Geburt Maximalwerte und kehren innerhalb von ca. 5 bis 10 Wochen postpartum zu Normalwerten zurück (66). Gegenätzlich erscheinen die Veränderungen der Fibrinolyseinhibitoren. Es kommt zu einem starken Anstieg der Plasminogenaktivatorinhibitoren PAI-1 und PAI-2, wobei der progrediente Anstieg von PAI-1 innerhalb des Referenzbereiches bleibt und der von PAI-2 weit über den Werten nichtschwangerer Frauen liegt, was sich durch die PAI-2-Produktion in der Plazenta erklären lässt. Ausgehend von 0-2 ng/ml wird das Maximum im 3. Trimester mit 100 ng/ml erreicht, postpartal fällt PAI-1 rasch und PAI-2 langsam ab, um ca. 3 bis 5 Wochen postpartal normale Werte zu erreichen (6,55). Aktives PAI-2 hemmt die zweikettigen Formen von uPA und tPA und ist gemeinsam mit u-PA hauptsächlich im Zytosol von Trophoblast- und Syncytiotrophoblastzellen nachweisbar. T-PA und PAI-1 sind hauptsächlich im Endothel und Myometrium vorhanden. Anhand dieser Verteilung ist von folgendem Modell auszugehen: Der Gewebsplasminogenaktivator schützt, unter Regulation durch PAI-1, die fetoplazentare Zirkulation vor übermäßigen Fibrinablagerungen. Aktive Urokinase bindet an uPAR, auf Cytotrophoblastzellen und aktiviert so Plasmin. Plasmin aktiviert Prometalloproteasen, die die Extrazellulärmatrix abbauen. PAI-2 reguliert diese Vorgänge. Auf diesem Wege beeinflusst die uPA-Kaskade Gewebsumbau, Trophoblastmigration und daher die Entwicklung von Plazenta und Fetus (64,93). Insgesamt führen die Veränderungen in der SS wahrscheinlich sowohl

zu einer Aktivierung der Gerinnung, als auch der Fibrinolyse. Die Aktivität des fibrinolytischen Systems dürfte jedoch auf den systemischen Kreislauf begrenzt sein, während sie in der Plazenta durch erhöhte Konzentrationen an Inhibitoren erniedrigt ist.

---

## **Veränderungen des Gerinnungssystems in der Schwangerschaft**

---

F XIII	steigt in der frühen SS an, ab 3. Trimester wieder normwertig
F XII, X, IX, VIII, VII,V	steigen in der SS an
F XI	fällt in der SS
vWF, Fibrinogen	steigen in der SS an
F II	steigt in der frühen SS an, normwertig ab 3. Trimester
löslicher TF	keine Veränderung
monozytärer TF	fällt in der SS, normwertig ab dem 3. postpartalen Tag
Antithrombin III	keine Veränderung
Heparin Kofaktor II	erhöhte Level in der SS
Alpha1-Antitrypsin	erhöhte Level in der SS
TFPI	unklar, evtl. erniedrigt in der SS
Thrombomodulin	steigt im Verlauf der SS an
Protein C	keine Veränderung
Protein S	fällt leicht im Verlauf der SS
APC-Resistenz	steigt im Verlauf der SS an
Prothrombinfragmente	steigen stetig an im Verlauf der SS
D-dimere	steigen stark an im Verlauf der SS
Fibrinopeptid A	erhöhte Level in der SS
TAT	steigt stetig an im Verlauf der SS
PAI-1	steigt im letzten Trimester an
PAI-2	steigt während der SS an, fällt postpartal rasch ab
t-PA	Antigen steigt an, Aktivität fällt leicht ab
Alpha2-Antiplasmin	erniedrigte Level
Plasminogen	erhöhte Level

---

**Tabelle 1: Veränderungen der Gerinnung und Fibrinolyse in SS und Wochenbett** (modifiziert übernommen aus 39).

Diese komplexen Zusammenhänge dienen durch eine kompensierte, akzelerierte intravasale Gerinnung u.a. dem Erhalt der utero-plazentaren Einheit (6,88).

Die Auswirkung dieser Veränderungen auf die globalen Gerinnungstests zeigt sich in einer Verkürzung der PT, die INR ist im 3. Trimester  $<0.9$ , eine unveränderte oder leicht verkürzte aPTT und einer Verlängerung der „Euglobulin Clot Lysis time“ (ECLT) (83,87,95,97). In jeder normalen Schwangerschaft kommt es zudem zu weitreichenden Veränderungen des Blut- und Gefäßsystems. Als Folge einer erhöhten NO-Aktivität und eines erhöhten Progesteronspiegels sinkt der systemische Gefäßwiderstand vom 1. Trimester kontinuierlich ab. Die Vasodilatation, und damit die venöse Stase, erreicht im letzten Trimenon um 47% gesteigerte Werte gegenüber nicht schwangerer Frauen (22). Der arterielle Blutdruck fällt progredient vom Beginn der Schwangerschaft, wohingegen der kardiale Auswurf ansteigt. In der späten Schwangerschaft kommt es zu einer benignen gestationsbedingten Thrombozytopenie, die Thrombozytenzahlen sinken jedoch nicht unter  $80 \times 10^9 /l$  (84). Möglicherweise kommt es durch erhöhte Thrombozytenaktivierung, messbar an Hand erhöhter Werte für Plättchenfaktor- 4 und  $\beta$  -Thromboglobulin, zu gesteigertem Verbrauch und dadurch zu einem Abfall der Blutplättchen (51). Der Hämoglobinwert sinkt während der Schwangerschaft leicht ab (87), was hauptsächlich durch eine physiologische Hämodilution bedingt ist. Als Ausdruck einer möglichen Endothelschädigung steigen die Werte für die lösliche Form von Thrombomodulin bis zur Entbindung an und normalisierten sich postpartal wieder (21). Die Ursache dieser gravierenden Veränderungen im mütterlichen Organismus ist bis dato noch nicht vollständig geklärt und wahrscheinlich multifaktorieller Genese. Auf Grund bekannter Zusammenhänge zwischen der Einnahme östrogenhaltiger Kontrazeptiva und der Erhöhung sowohl der Konzentrationen von Gerinnungsfaktoren, als auch der Inzidenz venöser Thrombosen (82,83), wird auch in der Schwangerschaft eine hormonelle Ursache der beschriebenen Veränderungen angenommen. Die Konzentrationen von Östrogenen und Gestagenen erreichen in der Schwangerschaft außergewöhnlich hohe Werte. Zudem steigen im Verlauf der SS Triglyceride, Cholesterol und Östradiol stark an. Von Sattar wurde eine hohe Korrelation zwischen dem Anstieg von FVII, PAI, t-PA, D-Dimer und dem Anstieg von Oestradiol und Triglyceriden beobachtet (83). Daher ist eine östradiol-induzierte Hypertriglyceridämie als Grund für die gesteigerte Aktivität von FVII, PAI, t-PA und D-Dimeren anzunehmen. Zusätzlich könnte eine gesteigerte Synthese oder Aktivierung der Gerinnungsfaktoren zur Erhöhung derselben führen. Die gesteigerte Aktivierung

des mütterlichen Gerinnungssystemes könnte als Antwort auf „Fremdmaterial“ in Form des Fötus und anderer Produkte der Konzeption auftreten. Die Plazenta ist zudem reich an Thromboplastin und könnte so die Bildung von F VII-Phospholipid-Komplexen fördern und so den extrinsischen Gerinnungsweg aktivieren.

### **1.2.2. Thrombose**

In der Schwangerschaft ist sowohl das Risiko einer Blutung, als auch das eines thromboembolischen Ereignisses erhöht und schwangerschaftsassozierte Thrombosen sind ein Hauptgrund für die weltweite mütterliche Morbidität und Mortalität (5,31,65,82). Die Inzidenz der tiefen Beinvenenthrombose beträgt während der Schwangerschaft ca. 1:1000 bis 1:2000 Schwangerschaften (82) und ist damit ca. fünffach gegenüber dem Risiko nicht schwangerer Frauen gleichen Alters erhöht. 30% der Patientinnen mit einer tiefen Venenthrombose in der Schwangerschaft haben eine hereditäre Thrombophilie, 28% der schwangerschaftsassozierten Thrombosen sind weder mit einem bekannten klinischen Risikofaktor, noch mit einem thrombophilen Defekt assoziiert, es sind bisher unbekannte Risikofaktoren beteiligt (39). Die Mortalität der schwangerschaftsassozierten Thromboembolie beträgt 1-2%, und liegt damit 12fach höher als bei Thromboembolien nichtschwangerer Frauen gleichen Alters.

Ältere Studien zeigten eine Häufung der Thromboseinzidenz postpartum (1), wohingegen neuere Studienergebnisse eine ausgeglichene Verteilung der Ereignisse während der Schwangerschaft und im Wochenbett darstellen (8,92). In der größten Studie mit ca. 170.000 Frauen traten dabei 75% der TVT antepartum auf und 66% der pulmonalen Embolien postpartum (82). Faktoren, die das Risiko einer schwangerschaftsassozierten Thromboembolie signifikant steigern sind unter anderem, Entbindung per Kaiserschnitt, erhöhtes mütterliches Alter, Adipositas, Immobilität, postphlebitisches Syndrom und angeborene oder erworbene Hyperkoagulopathien (31,61,91). Während der Schwangerschaft kommt es zur Ausprägung aller Faktoren der Virchow Trias, die der Entstehung einer venösen Thrombose zugrunde liegen: Hyperkoagulabilität, Stase und Gefäßschaden. Es kommt zu der beschriebenen Aktivierung der Gerinnung unter Anstieg der meisten Gerinnungsfaktoren und der erworbenen APC-Resistenz, sowie dem Abfall an Protein S. Am Ende des 1. Trimesters ist bereits eine erhöhte venöse Stase



nachweisbar, die sich im Verlauf der Schwangerschaft durch Größenzunahme des graviden Uterus und zunehmende Gefäßdilataion steigert. Während der Entbindung ist das Auftreten einer Gefäßverletzung wahrscheinlich und bereits während der Schwangerschaft ist ein erhöhtes Thrombomodulin Ausdruck eines möglichen Endothelschadens (22, 31). Die physiologische prothrombotische Imbalance bleibt bei normal verlaufender unkomplizierter Schwangerschaft ohne nachteilige Folgen und normalisiert sich in der Regel 6-8 Wochen postpartal. Erhöhte Gefahr einer Thromboseentwicklung besteht jedoch bei Bestehen anderer prädisponierender Risikofaktoren oder Auftreten zusätzlicher exogener prothrombotischer Risikofaktoren. Zu den prädisponierenden Risikofaktoren zählen angeborene und erworbene Thrombophilien und konstitutionelle Risikofaktoren. Die häufigsten hereditären Thrombophilien sind Antithrombinmangel, Protein-C- oder S-Mangel, APC-Resistenz, Hyperhomocysteinämie und Prothrombinmutation. Diese Erkrankungen erhöhen das Thromboserisiko in unterschiedlichem Ausmaß zusätzlich. Zu den erworbenen Thrombophilien gehören das Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom und die im Rahmen von Erkrankungen auftretenden Antithrombin-, Protein-C- und Protein-S-Mangelzustände, die ebenfalls das thrombotische Risiko in der Schwangerschaft weiter erhöhen. Die konstitutionellen Risikofaktoren umfassen folgende Eigenschaften der Schwangeren: Maternales Alter > 35 Jahre (57) mit einem zwei- bis vierfach erhöhten Thromboserisiko, Adipositas (30), Multipara, Präeklampsie oder schwere Grunderkrankungen (16), Zustand nach durchgemachter Thromboembolie und positive Thromboemboliefamilienanamnese. Zu den exogenen Risikofaktoren, die zeitlich begrenzt das Risiko im Sinne von Triggerfaktoren erhöhen, gehören Immobilisation, Infektion, Operation, Sectio caesarea mit einem bis zu 26fach erhöhten Risiko (30), Traumata und Exsikkose (85). Zur routinemäßig in europäischen Ländern durchgeführten Schwangerschaftsbetreuung und -vorsorge gehört das Erfassen bestimmter familiärer und eigenanamnestischer Risikofaktoren im Mutterpass. Dieser enthält unter anderem Informationen über stattgehabte Aborte, Thrombosen, Blutungen und eigene schwere Erkrankungen. Darüberhinaus werden im Verlauf der Schwangerschaft regelmäßig Parameter erfasst, wie der arterielle Blutdruck, der Hämoglobinwert, das Vorhandensein von Ödemen, Varikosis und Proteinurie. Zu der Betreuung nach Entbindung des Kindes gehört eine Versorgung durch eine ambulante Hebamme, die Mutter und Kind im Wochenbett betreut. Trotz dieser umfassenden Betreuung sind tiefe Beinvenenthrombosen und Lungenembolien

weiterhin ein großes Problem. Angeborene oder erworbene Hyperkoagulopathien werden durch die Routineuntersuchungen meist nicht aufgedeckt und Frauen mit einem höheren Thromboserisiko nur selten herausgefiltert.

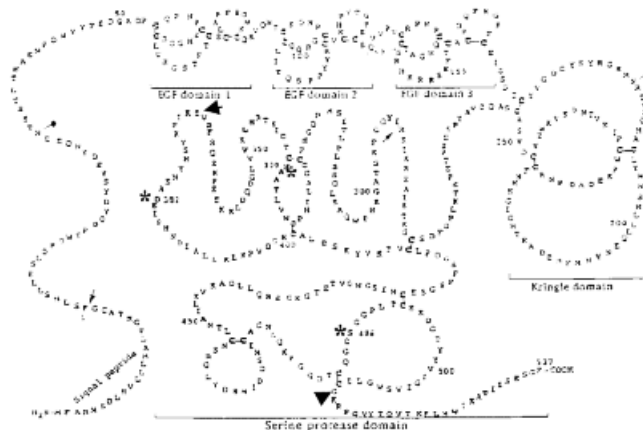
Möglicherweise liegt die Zukunft der optimalen individualmedizinischen Schwangerenbetreuung auch in einer Screeningmethode, die ein erhöhtes Thromboserisiko rechtzeitig erfasst und eine gezielte Prophylaxe ermöglicht. Das genaue Wissen um die Veränderungen im Körper einer Schwangeren ist Voraussetzung für eine effektive Therapie möglicher Komplikationen. Kürzlich wurde eine neue plasmatische Serinprotease entdeckt, die als Bestandteil sowohl des koagulatorischen, als auch des fibrinolytischen Systems fungiert. Diese Faktor VII-aktivierende Protease spielt eine wichtige Schlüsselrolle in der Initiierung der Gerinnung und der Fibrinolyse. Das Verhalten von FSAP in der Schwangerschaft ist bisher nicht untersucht worden.

### **1.3. Faktor VII aktivierende Protease (FSAP)**

1996 wurde von Choi-Miura et al. durch Affinitätschromatographie mit an Hyaluronsäure konjugierter Sepharose eine neue Serinprotease aus humanem Plasma isoliert und entsprechend seiner Fähigkeit an Hyaluronsäure zu binden als „Plasma-Hyaluronsäure-Bindungsprotein“ (PHBP) bezeichnet (15,94). Während der Isolierung Vitamin K-abhängiger Gerinnungsfaktoren beobachtete eine andere Forschungsgruppe eine „Thrombin-ähnliche“ Aktivität, die sich auf Thrombin-spezifische chromogene Substrate richtete. Da diese Aktivität durch Hirudin, einem klassischen Thrombininhibitor, nicht hemmbar war, konnte die Substratspaltung nicht durch Thrombin hervorgerufen worden sein. Es wurde die Anwesenheit einer bisher unbekannt Protease im Untersuchungsmaterial vermutet. Aprotinin erwies sich als potenter Inhibitor der amidolytischen Aktivität und mit Hilfe dieser Substanz wurde die Protease aus dem Konzentrat isoliert und charakterisiert (43,44,45). Die aminoterminal Sequenzierung der Proteinfragmente der unbekannt Protease zeigte die Übereinstimmung der Molekülstruktur mit der des von Choi-Miura beschriebenen PHBP's. Römisch et al. beschrieben 1999 eine neuartige Protease, deren Aktivität in Anwesenheit von Calcium-Ionen und Glykosaminoglykanen verstärkt wurde und die sowohl den Gerinnungsfaktor VII, als auch die Plasminogenaktivatoren scuPA und sctPA aktiviert (26,72,73,74). Entsprechend dieser Fähigkeiten wurde die Protease

als „Faktor VII aktivierende Protease“ (FSAP) bezeichnet, die sich als identisch mit dem PHBP und der Protease mit Thrombin-ähnlicher Aktivität erwies. Zwei Arbeitsgruppen isolierten das humane Gen des PHBP und führten eine Aminosäuresequenzanalyse durch. Diese zeigte signifikante Homologien von PHBP zu der Struktur von „Hepatocyte-growth-factor-activator“, (HGFA), einer bekannten Serinprotease. PHBP ist eine trypsinähnliche Protease aus 537 Aminosäuren in seiner Proenzymform. Beginnend im amino-terminalen Bereich des Enzyms finden sich drei „Epidermal growth factor like“ Domänen, eine Kringle-Domäne und eine typische Serinproteasendomäne am C-terminalen Ende (90). Das Protein hat somit strukturelle Regionen, die homolog sind zu denen von HGFA, es fehlen jedoch die Fibronectin Typ I und II Domänen von HGFA (90). Die genannten Bestandteile der Protease sind häufig bei Serinproteasen zu finden, die spezielle Anordnung der einzelnen Elemente ist jedoch für PHBP einzigartig. Das humane PHBP-Gen liegt auf Chromosom 10q25-q26 (HABP2) und erstreckt sich über 35 kb mit 13 Exons und 12 Introns. Obwohl die Exonanzahl im PHBP-Gen höher ist, als die anderer Serinproteasen, zeigen sich signifikante Ähnlichkeiten zu den Genen von Faktor XII, tPA und uPA. Die Tatsache, daß sowohl das Urokinase-Gen, als auch das PHBP-Gen auf Chromosom 10 zu finden sind, 4 Introns an fast identischen Stellen aufweisen, die Zahl der für die Kringle-Domäne kodierenden Exons übereinstimmt und daß beide Gene über wenigstens eine EGF-like Domäne verfügen, lässt eine engere Verwandtschaft dieser beiden Gene innerhalb der Familie der Serinproteasen vermuten (90). Von der Leber sezerniert zirkuliert FSAP im Plasma als einkettiges Proenzym mit einem Molekulargewicht von 64 kDa und einer Konzentration von 12 µg/ml (49). Die spontane Aktivierung des Enzyms ist eine intermolekulare Spaltungsreaktion an einer inneren Arg<sub>290</sub>-Ile Brücke und wird durch katalytische Mengen an aktivem FSAP beschleunigt (25). Es entsteht die aktive Enzymform, bestehend aus einer schweren (40 kDa) und einer leichten (30 kDa) Kette (15, 25, 26). Die beiden Untereinheiten sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden und sind jeweils am N-, bzw. C-terminalen Ende des Prekursors lokalisiert. Die schwere Kette beinhaltet die drei EGF-like Domänen und die Kringle-Domäne, während die leichte Kette das katalytische Serinproteasenzentrum enthält (33). Diese Struktur gleicht vielen bekannten Serinproteasen und HGFA, die Organisation des zugehörigen Gens (HABP2) ist dem von Urokinase besonders ähnlich (90). Die Protease ist ein Glykoprotein, wobei die schwere Kette an zwei verschiedenen

Stellen glykosyliert ist, was ca. 5% des Gesamtmolekulargewichtes ausmacht. Der isoelektrische Punkt des nativen Proenzym liegt in dem pH-Bereich von 4,9 bis 5,5,

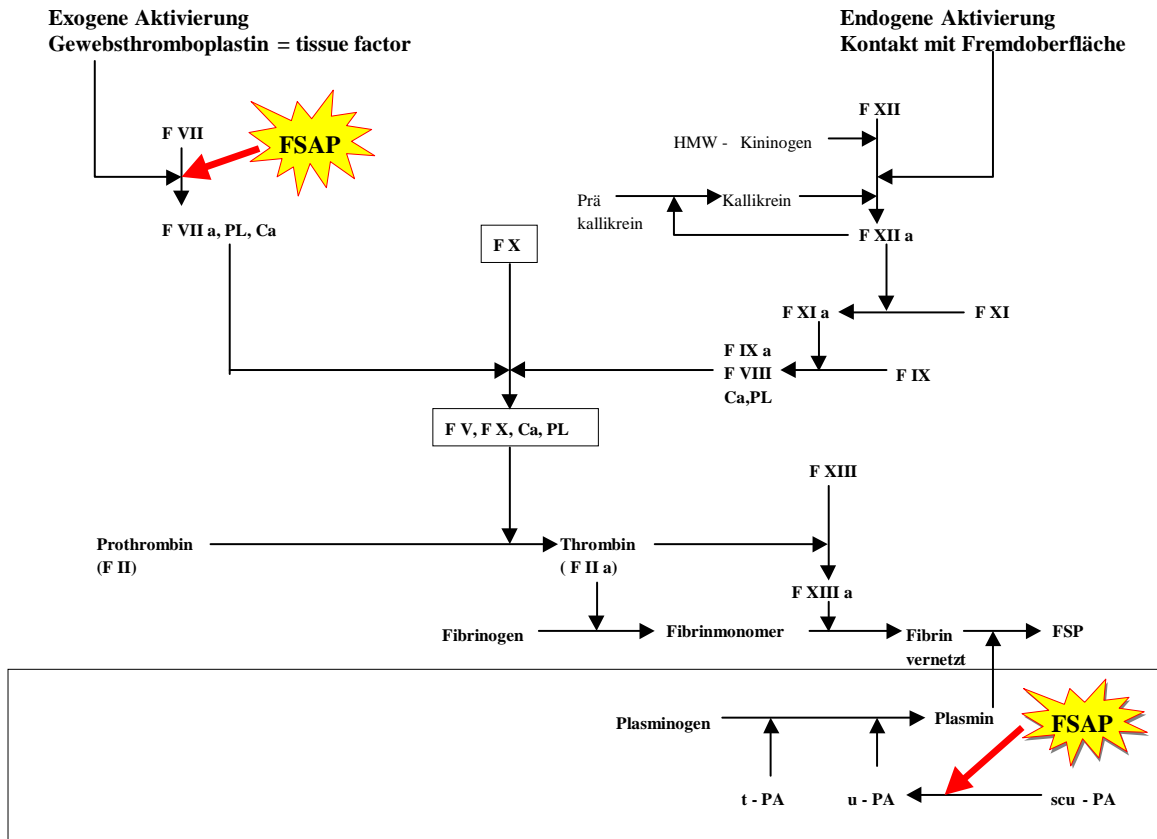


## Abbildung 2 : Struktur von FSAP

mit Marburg I ( Gly511Glu, ➤) und Marburg II (Glu370Gln, ➤). Das aktive Zentrum (His-Asp-Ser) des Enzyms ist mit (\*) gekennzeichnet. Spaltungsstellen sind mit (➤) gekennzeichnet.

,die Varianz begründet sich in Mikroheterogenitäten, evtl. durch heterogene Glykosylierung (14, 59).

Die intrinsische Aktivierung von FSAP läuft unter bestimmten Bedingungen beschleunigt ab. Dazu zählen ein neutraler bis basischer pH-Wert und die Anwesenheit von Polyanionen bzw. Polykationen. Sowohl Heparin, Dextransulfat als auch Phosphatidylethanolamin beschleunigen die Autoaktivierung des Proenzym (13,14). Auch Poly-L-Lysin verkürzt als Polykation die Halbwertszeit der einkettigen Form von normalerweise ca. 2-3 Stunden deutlich . Autoaktivierende Mechanismen wurden für verschiedene Plasmaserinproteasen beschrieben, üblicherweise induziert durch geladene Oberflächen oder andere Kofaktoren. Im Vergleich zu anderen Gerinnungsfaktoren, zum Beispiel Faktor VII, dessen Autoaktivierung stark von positiv geladenen Oberflächen oder von Tissue Factor als Kofaktor abhängt, läuft die Autoaktivierung von PHBP auch ohne die Anwesenheit geladener Moleküle schnell und effektiv ab . Neben Heparin und geladenen Oberflächen beschleunigen auch Calcium- und in geringerem Ausmaß Magnesium-Ionen die Aktivität von PHBP, dabei stabilisieren die Calcium-Ionen sowohl die einkettige, als auch die aktive zweikettige Form (14,25). Im Sinne einer positiven Verstärkerschleife aktiviert FSAP



**Abbildung 3: Die Rolle von FSAP in der Gerinnung**

die Proenzymform des Plasminogenaktivators Urokinase, welche wiederum FSAP aktiviert (73,74). Untersuchungen mit Zellkulturen von humanen umbilikalen Endothelzellen (HUVEC) zeigten eine bis zu vierfach gesteigerte Autoaktivierungspotenz der FSAP Proenzymform, im Vergleich zur Aktivierungsrate ohne Zellkulturen (63). Neueste Studien ergaben neben der bereits bekannten Affinität von FSAP zu Hyaluronsäure, Dextransulfat und Heparin ein starkes Bindungsvermögen des Enzyms an extrazelluläre RNA. Dabei dient die RNA ebenfalls als negativ geladene Oberfläche und fördert so die Autoaktivierung von FSAP (62). Experimente lassen vermuten, dass RNA und Heparin an die selbe oder an überlappende Stellen binden. Nach Proteolyse des Enzyms konnte die Polyanionenbindungsstelle identifiziert werden. Die EGF ähnlichen Domänen EGF2 und EGF3 von FSAP sind die Hauptinteraktionsdomänen für RNA, dabei sind die Aminosäuren Arg170, Arg171, Ser172 und Lys173 in der EGF3 Domäne essentiell für diese Bindung. Diese Stelle ist zudem die Region mit der stärksten positiven Ladung im Protein und ist höchstwahrscheinlich in einer exponierten Schleife

lokalisiert. Zerstörung von Disulfidbrücken führt zu einem Verlust der RNA und Heparinbindung, was vermuten lässt, dass die dreidimensionale Struktur der EGF3 Domäne essentiell ist für die Bindung an negativ geladenes Heparin oder RNA (2). Die Aktivität von PHBSP wird durch Plasmainhibitoren vom Serpin- (alpha2-Antiplasmin) und Kunitztyp (Inter-alpha-Inhibitor, Aprotinin) reguliert (14,49). Es werden nahezu irreversible Komplexe mit den Inhibitoren gebildet. Ein Inhibitormangel korreliert mit einer FSAP-abhängigen beschleunigten Gerinnung (25). Antithrombin bewirkt nur in Verbindung mit Heparin eine starke Hemmung durch irreversible Komplexbildung mit FSAP. Außer dem  $\alpha_1$ -Proteaseninhibitor führen alle getesteten Inhibitoren über eine feste Komplexbildung mit FSAP zu einer kompetitiven und irreversiblen Hemmung (14). In geringerem Ausmaß hemmen auch physiologische Konzentrationen an Zink-Ionen die Autoaktivierung von FSAP (23). Im Laufe der letzten Jahre wurde eine Reihe von Substraten des zunächst unbekanntem PHBP entdeckt und dem Enzym eine physiologische Schlüsselrolle im hämostatischen und fibrinolytischen Regelkreis zugeordnet. Prokoagulatorische Fähigkeiten entfaltet das Enzym über die zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung des Gerinnungsfaktors VII und wird daher auch Faktor VII aktivierende Protease (FSAP) genannt (14,73). Diese Aktivierung ist unabhängig von Tissue factor und stärker als die Faktor VII-Aktivierung durch Faktor XIIa. Durch Untersuchungen mit Antikörpern gegen TF, wurde deutlich, dass FSAP eine „TF-bypassing“ Aktivität aufweist und daher als Initiator des extrinsischen Gerinnungsweges zu betrachten ist. Darüberhinaus zeigt FSAP inaktivierende Potenz gegenüber den Gerinnungsfaktoren VIII, V und dem Transkriptionsfaktor von Amyloid  $\beta$ -Protein Prekursor (72,73,80). Die Auswirkung dieser Eigenschaften auf globale Gerinnungstests zeigen eine Verkürzung der Rekalzifizierungszeit und der Prothrombinzeit. Die aktivierte partielle Thrombinzeit wird nur bei sehr hohen Konzentrationen von FSAP leicht verkürzt. Als profibrinolytische Fähigkeit des Enzyms ist vor allem die Fähigkeit Plasminogenaktivatoren zu aktivieren zu nennen. Zeit- und konzentrationsabhängig werden die Proenzymform der Urokinase und etwas schwächer auch die des Gewebe-Plasminogenaktivators in die aktive Zweikettenform überführt (49,72,73,74,75). Im Thrombelastogramm bewirkte die Zugabe von FSAP und scuPA einen beschleunigten Beginn der Gerinnung (verkürzte r-Zeit) und eine beschleunigte Lyse des gebildeten Gerinnsels (74,75). Damit werden einige Ähnlichkeiten mit Plasmakallikrein deutlich, wie die Inhibierung durch C<sub>1</sub>-Inhibitor und Aprotinin, die Fähigkeit zur Autoaktivierung und die,

Prourokinase zu aktivieren. Neuere in vitro Studien zeigten weitere interessante Funktionen von FSAP. So bindet das Enzym über spezielle Spaltungsstellen an die D5<sub>H</sub>-Domäne von HMW-Kininogen und spaltet das Molekül. Als Spaltungsprodukte finden sich Bradykinin und aktiviertes Kininogen. Diese Einbeziehung in das Kallikrein/Kinin-system legt eine Rolle von FSAP in Prozessen der Gerinnung, Fibrinolyse, Angiogenese und Entzündung nahe (24). Der beobachtete antiadhäsive Effekt der Protease auf humane umbilikale Endothelzellen könnte über die beschriebene Aktivierung von Kininogen vermittelt werden. Zudem werden Proteine der Extrazellulärmatrix von PHBP gespalten, darunter Vitronektin, Fibronektin und Fibrinogen, und dadurch inaktiviert (54). Dabei werden die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Kette von Fibrinogen und Fibronektin gespalten. Außerdem sind antiproliferative Eigenschaften von FSAP beschrieben worden. Die aktive Form von FSAP hemmt konzentrationsabhängig die durch PDGF- (oder IGF-) vermittelte Proliferation und Migration humaner vaskulärer glatter Muskelzellen. Der genaue Hemmmechanismus ist bislang unbekannt, es wird eine Heparin-vermittelte Komplexbildung mit dem Wachstumsfaktor vermutet, die die Bindung von PDGF an die glatten Muskelzellen unterbindet. Es findet kein Abbau des Wachstumsfaktors oder seines Rezeptors statt (47,48). FSAP verfügt zudem über die Fähigkeit, Zellen direkt zu stimulieren. Das zeigt sich an der Förderung der Phosphorylierung von p42/p44 MAPK durch FSAP (54) und an der Aktivierung von Endothelzellen über Freisetzung von intrazellulärem Calcium, der genaue Mechanismus ist unklar, bekannte Proteaserezeptoren scheinen aber keine Rolle zu spielen (89). Inwieweit die beschriebenen Fähigkeiten physiologischen Funktionen von FSAP entsprechen und ob die Rolle des Enzyms mehr in Richtung Gerinnungsaktivierung oder Fibrinolyse tendiert, muß in weiteren Studien geklärt werden. Möglicherweise hat es unter anderem eine Rolle als endogener Inhibitor der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen in der erkrankten Gefäßwand. (48). Ob dabei zusätzlich die prokoagulatorische oder profibrinolytische Potenz des Enzyms überwiegt, wird von lokalen Inhibitoren reguliert. Tierexperimentell zeigte sich eine spezifische Aktivierung von PHBP bei Leberschaden. Über Aktivierung der Urokinase entfaltet FSAP durch Abbau von Extrazellulärmatrix im Rahmen des Gewebsumbaus bei einem Leberschaden seine Wirkung (12).

Die Synthese des Proenzym von FSAP findet, wie die der meisten Plasmaproteine, in der Leber statt. Über Sekretion gelangt es in den Kreislauf und in die verschiedenen Organgewebe (13,53). Mit Hilfe immunhistochemischer

Untersuchungen zeigte sich, daß FSAP in vielen Geweben und Organen vor allem in Assoziation mit dem Endo-oder Epithel zu finden ist und das Antigen hauptsächlich intrazellulär lokalisiert ist. Eine besonders starke Expression von FSAP fand sich in den Ductusepithelien von Urothel, Dünndarm, Ösophagus, Pankreas, Samenblase, Hoden und Plazenta (53). Darüberhinaus findet sich FSAP in der Neointima und Media atherosklerotischer oder beschädigter Arterien, jedoch nicht in unveränderten humanen Arterien (48). Das Enzym wird wahrscheinlich lokal synthetisiert oder auf Grund erhöhter Gefäßpermeabilität mit dem Blutstrom importiert und reagiert dann mit der Extrazellulärmatrix oder Glykosamnioglykanen (48,54).

Die Untersuchung des Enzyms im Plasma von Probanden war zunächst aufwändig und schwierig. Die Entwicklung eines speziellen ELISA zur Antigenbestimmung von FSAP und eines Aktivierungsassay durch die Arbeitsgruppe um J. Römisch erleichterte die bis dahin schwierige Quantifizierung von FSAP im Plasma. Es wurden Plasmaproben von 189 gesunden Spendern untersucht und erstmals konnten Aussagen über den Antigengehalt und die Aktivität des Enzyms im Plasma getroffen werden. Es zeigten sich altersunabhängige, geschlechtsspezifische Eigenschaften des Enzyms im Plasma. Die Charakterisierung erfolgte mit Hilfe der Bestimmung des Antigengehaltes im Plasma (mPEU/ml) und der Aktivität bezüglich Faktor VII und scuPA (mPEU/ml). Männer zeigten signifikant niedrigere Antigenlevel (Mittelwert 10,51 µg/ml,  $p=0.07$ ) und Aktivitätslevel (Mittelwert 841 mPEU/ml,  $p=0.0005$ ). Sowohl der Antigengehalt (Mittelwert 11,15 µg/ml), als auch die Aktivität (955 mPEU/ml) lagen bei den Frauen deutlich höher (76,77). Das Alter hatte keinen Effekt. Die Enzymaktivität wird ausgedrückt als U, das definiert ist als die Aktivität, die 1 µmol Substrat pro Minute spaltet. Römisch et al. wählten einen Plasmapool als Standard, der per definitionem 1 Plasma äquivalente Aktivitätseinheit von FSAP pro Milliliter und 1 PEU/ml Antigen äquivalent zu 12 µg/ml enthalten sollte. Mit Hilfe der 189 Spender erarbeiteten sie einen SHP (Standard Human Plasma) Standard. In der Thrombelastographie zeigte sich bei Zugabe von scuPA und FSAP zu Citratblut ein schnellerer Gerinnungsbeginn und eine raschere Lyse des Gerinnsels. Die PTT und PT sind nach Zugabe der Protease verkürzt (72,73). In vivo wird wahrscheinlich je nach lokaler Konzentration an Faktor VII, scuPA und Inhibitoren die fibrinolytische oder koagulatorische Potenz verstärkt.

In dieser Studie zeigten 10%, sowohl Frauen, als auch Männer, mindestens um 50% erniedrigte Aktivitätslevel, wobei die Fähigkeit der Plasmaproben scuPA zu aktivieren betroffen war und die Faktor VII-Aktivierung unbeeinträchtigt war. Da die



Antigenlevel dieser Spender normal waren, erreichte der Quotient aus Aktivität und Antigen Werte unter 0.5 (76,77,78). Nachfolgende Studien dieser Spender mit erniedrigter scuPA-Aktivität und normaler Fähigkeit Faktor VII zu aktivieren, wiesen einen identischen SNP in Position 1601 im Exon 13 bei allen Probanden nach. Dieser Polymorphismus führt zu einem Gly511Glu Aminosäureaustausch nahe dem aktiven Zentrum im reifen FSAP Protein und wurde Marburg I Mutation genannt. Die Hälfte der SNP 1601 positiven Spender zeigte zusätzlich einen SNP in Position 1177, der zu einem Glu370Gln Aminosäureaustausch führt und Marburg II Mutation genannt wurde (78,81). Es ließ sich jedoch kein Unterschied im Ausmaß der Reduzierung der FSAP vermittelten scuPA-Aktivierung zwischen den Marburg I und II Mutanten nachweisen. Da bei den Plasmen der Mutationsträgern die Rate der Amidolyse eines LMW chromogenen Substrates nicht reduziert ist (78), ist eine vollständige Zerstörung des aktiven Zentrums von FSAP durch die Mutation unwahrscheinlich. Vielmehr führt die Marburg I Mutation zu einem Aminoäureaustausch nahe der aktiven Serinstelle (S486) auf der leichten Kette von FSAP, was zu einer Schwächung des Bindungsvermögens von scuPA führen könnte, dessen Interaktionsstelle ebenfalls auf der leichten Kette von FSAP nahe dem Carboxyende lokalisiert ist (78,81). Die klinischen Auswirkungen dieser Mutation sind bislang nicht vollständig geklärt, auf Grund der relativ niedrigen Prävalenz von ca. 5 -10% der Marburg I Mutation sind grossangelegte Studien notwendig. Zudem wurden bisher nur heterozygote Träger identifiziert. In der Bruneck-Studie zu Risikofaktoren der Karotisstenose zeigte sich, dass die Marburg I Mutation ein starker und unabhängiger Risikofaktor für die fortgeschrittene Atherogenese ist (Odds Ratio 6.6 (95% KI)). Die Marburg II Mutation war nicht mit der Entwicklung von Atherogenese assoziiert (58,96). Im Rahmen der „Northwick Park Heart Study II“ wurde ein interaktiver Effekt, bezüglich des Risikos eine koronare Herzerkrankung zu entwickeln, zwischen der Marburg I Mutation und erhöhten Werten für Cholesterol und Triglyzeriden gefunden. Diese Ergebnisse unterstützen die Aussage, dass das FSAP 511E Allel Atherosklerose oder seinen klinischen Verlauf exazerbiert. Das Risiko der KHK war bei Patienten mit dem 511E-Allel und erhöhten Leveln für Cholesterol, Triglyceriden und Fibrinogen 5-fach erhöht. Die Studie lässt ein Exzazerbation der Atherosklerose durch Marburg I bei solchen Patienten vermuten, die schon etablierte kardiovaskuläre Risikofaktoren besitzen (46). Guellesserian führte eine große Studie mit über 800 Patienten durch und fand lediglich ein gering erhöhtes Risiko innerhalb der Gruppe der Marburg I Träger ein Rezidiv einer tiefen

Venenthrombose zu erleiden (relatives Risiko eines Rezidivs unter den Trägern 1.3 (95% KI, 0.6-2.8,  $p=0.5$ ) (32). Hoppe et al. fanden bei geringerer Prävalenz der Marburg I Mutation in der Kontrollgruppe eine starke unabhängige Assoziation der Mutation mit einer tiefen Venenthrombose (ODDS ratio 3.5; 95% CI, 1.2-10.0). Betrachtet man nur die Patienten mit idiopathischen Venenthrombosen, ist die unabhängige Assoziation mit der Marburg I Mutation noch stärker als für die gesamte Studienpopulation (ODDS ratio 6.5, 95% CI, 2.0-18.9) (40,41). Die Ergebnisse dieser Studie werden kontrovers diskutiert, die Arbeitsgruppen Minkelen et al. und Franchi et al. behaupten, dass die Marburg I Mutation nicht mit einem erhöhten Risiko venöser Thrombosen assoziiert ist (28,60). Inwieweit die FSAP-Mutation weitere Auswirkungen auf das Gleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse hat und welche zellulären Vorgänge lokal von dem intakten Enzym moduliert werden, bleibt zu untersuchen. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, um den genauen Einfluss der Marburg I Mutation auf Gerinnung, Thromboseentstehung und Atherogenese zu klären.

#### **1.4. Zielstellung der Studie**

Die Ursachen der beschriebenen Veränderungen des hämostaseologischen Gleichgewichtes in der Schwangerschaft und der erhöhten Inzidenz thromboembolischer Ereignisse während dieser Zeit sind bisher nur teilweise geklärt. Kürzlich wurde eine neue plasmatische Serinprotease, genannt Faktor VII-aktivierende Protease (FSAP), als potenter Aktivator der Prourokinase-gesteuerten Fibrinolyse und des Gerinnungsfaktors VII identifiziert. Das Verhalten dieser Protease während der normalen Schwangerschaft wurde bisher noch nicht untersucht. Es war Ziel der Studie, die Veränderungen von FSAP in den einzelnen Trimestern der normalen Schwangerschaft zu erfassen und „Referenzwerte“ gesunder schwangerer Frauen im Vergleich zu denen nicht schwangerer Frauen zu ermitteln. Darüberhinaus sollte die Studie Daten zur Prävalenz der Marburg I Mutation bei schwangeren Frauen liefern. Des Weiteren wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem erhobenen DNA-Status der Probandinnen und klinischen Ereignissen während der Schwangerschaft besteht. Schließlich wurde die Expression von FSAP in der humanen Plazenta analysiert.

## **2. Methoden**

### **2.1. Studienpopulation**

In der Studie wurden 101 gesunde schwangere Frauen untersucht. Im Verlauf der Schwangerschaft und im Wochenbett wurden der Antigengehalt und die Aktivität von FSAP untersucht, eine DNA-Analyse auf das Vorhandensein einer Mutation im FSAP-Gen durchgeführt und allgemeine Gerinnungsparameter (Quick, aPTT, Fibrinogen) bestimmt.

Im Zeitraum Januar 2001 bis Januar 2002 wurden 101 gesunde schwangere Frauen im Verlauf des ersten Trimenons per Zufallsauswahl rekrutiert und in einer prospektiven longitudinalen Beobachtungsstudie erfasst. Alle Frauen wurden über die Studie aufgeklärt und bekamen ein spezielles Informationsschreiben (im Anhang), alle Probandinnen stimmten freiwillig der Teilnahme an der Studie zu. Das durchschnittliche Alter der Probandinnen betrug 29 Jahre (SD 5). Das mittlere Gestationsalter zum Zeitpunkt der Entbindung betrug 39,6 Schwangerschaftswochen (33-42 Wochen). Das mittlere Geburtsgewicht der Kinder betrug 3,4 kg (1.8-4.8 kg). Alle Frauen waren zu Beginn der Studie gesund und hatten keine Komplikationen während der Schwangerschaft, keine der Probandinnen entwickelte Bluthochdruck, Diabetes mellitus oder andere Krankheiten. Vier der Schwangeren verloren durch einen Abort in der Frühschwangerschaft ihr Kind und schieden somit aus der weiteren Studie aus. Bei jeder Probandin wurden ausgewählte globale Gerinnungsparameter: Quick (INR), aPTT und Fibrinogen und zur Charakterisierung von FSAP die FSAP-Aktivität, das FSAP-Antigen und die Marburg I Mutation bestimmt. Die Blutentnahmen erfolgten im ersten Trimester (5.-21. Schwangerschaftswoche), im zweiten Trimester (19.-38. SSW), im dritten Trimester (25.-39. SSW, nach der Entbindung (innerhalb von 24 h postpartal) und im Wochenbett (> 24 h bis 52 Tage postpartal).

Neben den oben beschriebenen quantitativen Parametern, wurden zudem bei jeder Schwangeren eine Reihe von qualitativen Merkmalen mit Hilfe der Daten aus dem Mutterpass erhoben. Dies umfasste alle Angaben zur Eigen- und Familienanamnese der Frauen, wie familiäre Belastung, frühere eigene schwere Erkrankungen, Blutungs- und Thromboseneigung, Allergien, frühere Bluttransfusionen, besondere psychische und soziale Belastung, Rhesus-Inkompatibilität in vorherigen Schwangerschaften, Diabetes mellitus, Adipositas, Kleinwuchs, Skelettanomalien, Vielgebärende (mehr als 4 Kinder), Zustand nach Sterilitätsbehandlung, Zustand

nach Frühgeburt (vor Ende der 37.SSW), Zustand nach Mangelgeburt, Zustand nach 2 oder mehr Fehlgeburten/Abbrüchen, totes/geschädigtes Kind in der Anamnese, Komplikationen bei vorherigen Entbindungen oder post partum, Zustand nach Sectio, Zustand nach anderen Uterusoperationen und rasche Schwangerschaftsfolge (< 1 Jahr). Darüberhinaus wurden neben Alter und Gewicht der Schwangeren noch sämtliche besonderen Befunde der aktuellen Schwangerschaft, wie das Vorhandensein behandlungsbedürftiger Allgemeinerkrankungen, der Bedarf einer Dauermedikation, Medikamenten- oder Suchtmittelabusus, besondere aktuelle psychische und soziale Belastungen, Blutungen, Placenta praevia, das Vorliegen einer Mehrlingsschwangerschaft, Hydramnion, Oligohydramnion, Plazenta-Insuffizienz, Isthmozervikale Insuffizienz, vorzeitige Wehentätigkeit, Anämie, Harnwegsinfekt, indirekter Coombstest positiv, Hypertonie, Proteinurie > 1 %, Ödeme, Hypotonie und Gestationsdiabetes erfasst.

Von besonderem Interesse waren dabei die Anzahl vorheriger Entbindungen, die Art der vorherigen Entbindungen, die genaue Anzahl vorheriger Aborte oder Fälle von intrauterinem Fruchttod, der niedrigste Hämoglobinwert im Verlauf der Schwangerschaft, das Auftreten von Varikosis, der Bedarf eines stationären Aufenthaltes in der Schwangerschaft aufgrund von SIH, HELLP-Syndrom, EPH-Gestose, vorzeitiger Wehen, Diabetes, Wachstumsretardierung oder Infektion, das Auftreten einer Nachblutung oder unvollständigen Plazentalösung, das Auftreten von pathologischem Fruchtwasser und die Anzahl von missed abortion. Bezüglich der Entbindung wurde der Entbindungszeitpunkt (in SSW), der Geburtsmodus, das Geschlecht des Kindes und das Kindsgewicht erfasst.

## **2.2. Kontrollgruppe**

Die Kontrollgruppe war Teil einer zuvor durchgeführten Studie der Arbeitsgruppe Römisch (77), die ermittelten Werte wurden als nicht schwangeres Referenzkollektiv verwendet. Die Kontrollgruppe bestand aus insgesamt 189 Probanden, davon waren 49 nicht schwanger, gesund und weiblich, mit einem mittleren Alter von 37 Jahren (Standardabweichung 11.4 Jahre). Dieser Frauenanteil wurde als Kontrollgruppe der Schwangerengruppe genutzt. Es zeigte sich, dass das Alter keinen Effekt auf FSAP-Antigen und Aktivität hat, aber sehr wohl das Geschlecht. Frauen hatten signifikant höhere Werte für Antigen und Aktivität, als Männer. In der Gruppe der 49 Frauen

fanden sich 5 Trägerinnen der Marburg I Mutation, mit signifikant niedrigeren Aktivitätsleveln. Durch dieses Referenzkollektiv konnte ein direkter Vergleich zwischen den FSAP-Werten schwangerer und nichtschwangerer Frauen gezogen werden.

Parameter	Frauen (n=49)	
	Wildtyp	Marburg I
<b>FSAP-Antigen</b> (mPEU/ml) in MW +/- SD	955 +/- 170	701 +/- 254
<b>FSAP-Aktivität</b> (mPEU/ml) in MW +/- SD	1032 +/- 178	269 +/- 144.

## **Tabelle 2: Kontrollgruppe (77)**

Den Frauen der Kontrollgruppe wurde einmalig Blut entnommen und die Werte für FSAP-Antigen und Aktivität mit den Ergebnissen der Schwangerengruppe statistisch verglichen und ausgewertet. Als Vergleich für die in der Schwangerschaft ermittelten Werte für Quick, aPTT und Fibrinogen dienten die Referenzwerte des ermittelnden Labors (JLU Giessen, hämatologisches Labor) dieser Parameter.

### **2.3. Gewinnung der Blutproben**

Den Schwangeren wurden in jedem Trimester und nach der Entbindung per Venenpunktion (Vena cubitalis) je 10 ml Blut entnommen und in Natriumzitat-Monovetten mit je 1ml Natrium-Zitrat (0.13 M) aufgefangen. Die Proben wurden sofort in der Zentrifuge weiterverarbeitet (1,500 g, 20 Min, 20 °C) und das Plasma und die Blutzellen bei -80°C tiefgefroren. Frühere Studien hatten gezeigt, dass sowohl der FSAP-Antigengehalt, als auch die Aktivität nicht durch das Tieffrieren beeinflusst werden. (15). Im Plasma wurden im hämatologischen Labor der JLU Gießen die PTT, der Quick und der Fibrinogengehalt jeder Probe bestimmt. Im Institut der Aventis Behring GmbH in Marburg wurden ebenso in jeder Probe die FSAP Aktivität, der Antigengehalt und die DNA-Analyse durchgeführt.

## **2.4. Bestimmung der Parameter**

### **2.4.1. Quick, PTT, Fibrinogen**

Die Prothrombinzeit (PT; Thromborel® S, Dade Behring), die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT; Pathromtin\*\* SL, Dade Behring) und Fibrinogen (Multifibren® U, Dade Behring) wurden mit kommerziellen kits nach Angaben des Herstellers ermittelt.

### **2.4.2. FSAP-Isolierung aus dem Plasma**

Der FVII-Aktivator wurde durch Anionenaustausch-Verfahren und anschließender Adsorption an gebundenes Heparin, an das FSAP mit hoher Affinität bindet, aus Gefrierplasma isoliert. Alternativ kann die amidolytische Aktivität der Protease zum Nachweis des Enzyms genutzt werden, unter Verwendung des chromogenen Substrates S 2288. Dabei wird nach Zugabe der chromogenen Substrate zu dem FVII-Aktivator die Änderung der Absorption bei 405 nm gemessen. Diese Verfahren wurden von der Firma Aventis etabliert und in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben (26,45,72,73,76). In unserer Studie wurde auf diese Standardverfahren zur Isolierung des Enzyms aus den Blutproben zurückgegriffen.

### **2.4.3. FSAP-Antigen**

Um die FSAP Antigenlevel im Plasma zu quantifizieren, wurde ein speziell etablierter Screening ELISA (Avetnis Behring, Deutschland) mit gebundenen polyklonalen und gekennzeichneten monoklonalen (mAb) Antikörpern gegen FSAP, verwendet. Innerhalb einer Stunde nach Abnahme wurden unsere Blutproben zentrifugiert und das so gewonnene Plasma tiefgefroren. Die Präparation des Enzyms erfolgte mittels monoklonaler Antikörper. Danach kam der etablierte und spezifische FSAP ELISA zum Einsatz. Ein Pool von über 100 Citratplasmaproben (Standard Human Plasma (SHP), lot 502571; Dade Behring GmbH, Marburg) diente zum Erstellen einer Standardkurve. Der Proteasenanteil dieses Plasmapools wurde als 1 Plasma äquivalente Einheit pro Milliliter (PEU/ml) bzw. 12 ug/ml definiert. Im Einzelnen

wurden 96-well Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno Maxisorb, Nunc, Deutschland) mit 10 ug/ml polyklonalem Antikörper aus Kaninchenserum beschichtet. Nach Inkubation für 16 h bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal mit einer Pufferlösung (Beschichtungspuffer: 0.05 mol/l NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.3) gewaschen. Anschließend wurde die Plasmaproben in Pufferlösung (0.05 mol/l Tris, 0.15 mol/l NaCl, 1% Rinderserumalbumin, 0.1% Tween 20, pH 7.2, ELISApuffer) von 1:500 bis 1:32000, entsprechend 2 bis 0.03 mPEU/ml, verdünnt. Jedes well wurde nun mit 0.05 ml verdünnter Probe gefüllt und mit 0.05 ELISA Puffer gemischt. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37 Grad, wurden die wells dreimal mit 50 mmol/l Phosphatsalzpuffer gewaschen und 0.02% Tween 20 (pH 7.4, Waschpuffer) hinzugefügt. Danach wurde in jedes well 100 ul POD versehene monoklonale Antikörper gegeben und 100 ul 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Substrat (Dade Behring GmbH) hinzugefügt. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Änderung der optischen Dichte bei 405 nm (OD 405) mittels eines Tecan Photometers gemessen. Die FSAP Konzentrationen der Plasmaproben wurden mittels einer Standardkurve, basierend auf der jeweiligen Probenverdünnung, quantifiziert. Der Antigengehalt der Proben wird in PEU/ml angegeben und ist proportional zur FSAP Konzentration.

#### **2.4.4. FSAP-Aktivität**

Das Vermögen von FSAP Pro-Urokinase zu Urokinase zu aktivieren dient als Grundlage des Aktivitätsassay. Der Assay besteht aus einer "Isolierungsphase" aus dem Plasma mittels immobilisierten mAb, gefolgt von einer Inkubation mit scuPA in einem calcium- und heparinhaltigem Puffer.

Im Einzelnen wird der monoklonale Antikörper durch Inkubation für 16 Stunden bei Raumtemperatur gemeinsam mit dem oben beschriebenen Beschichtungspuffer an die Mikrotiterplatten gebunden. Nach dem Waschen der Platte wird 0.02 mol/l Natriumcitrat, 0.15 mol/l NaCl, 2% Rinderderumalbumin, 0.1 mol/l Arginin (pH 6.0, Blockierungspuffer) hinzugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 Grad, wird der Puffer entfernt. Die Plasmaproben werden von 1:10 bis 1:200 mit 0.02 mol/l Natriumcitrat, 0.15 mol/l NaCl, 1% Rinderserumalbumin, 0.1% Tween 80 und 100 IE/ml Heparin (pH 6.0, Verdünnungspuffer) verdünnt. Dann werden in jedes well je 50 ul Probe und 50 ul Verdünnungspuffer gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 Grad wird die Lösung entfernt und die Platten dreimal mit Waschpuffer (siehe

oben) gewaschen. Dann wird in jedes well je 50 ul recombinantes scu-PA , 50 ul Versuchspuffer I ( 0.05 mol/l Tris, 0.15 mol/l NaCl, 0.2 % Tween 80 (pH 7.2) und 0.03 mol/l CaCl<sub>2</sub>, 100 IE/ml Heparin gegeben. Nach Inkubation für 2 Minuten bei Raumtemperatur werden 100 ul verdünntes S-2444 (Chromogenix AB, Mölndal, Schweden) hinzugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 Grad, wird die Reaktion durch Zugabe von 50 ul einer 50 % igen Essigsäure gestoppt und die Änderung der optischen Dichte bei 405 nm gemessen. Das Substrat wird durch die entstandene Urokinase propotional zum FSAP-Gehalt der Probe gespalten. Das Standardhumanplasma wurde als Referenz verwendet. Die Aktivität wurde in Plasma äquivalenten Einheiten angegeben (PEU).

Alle Versuche und Nachweismethoden wurden in vorherigen Studien validiert und mit FSAP-defizientem Plasma gegengetestet.

#### **2.4.5. DNA-Analyse**

Bei jeder Probandin wurde, unabhängig vom FSAP Aktivitätslevel die Genstruktur des FSAP-Gens bestimmt. Diese Struktur wurde in (90) ausführlich beschrieben und basierend auf der Gensequenz wurden passende Primer hergestellt. Die DNA wurde aus gefrorenem Vollblut anhand des GenomicPrep Blut DNA Isolierungs-kit (Amersham Pharmacia Biotech) vorbereitet. Wie bereits beschrieben, existieren zwei unterschiedliche Polymorphismen des Gens, einmal an Posititon Gly511Glu und an Posititon Glu370Gln. Zunächst folgt die Beschreibung der PCR-Methodik des **Marburg I Polymorphismus (Gly511Glu):**

5 µl DNA wurde in 1x TaqGold Reaktionspuffer, bestehend aus 50 pmol eines Vorwärtsprimers (5'GTGTCCATTGTTGGCCATGA3') und eines Rückwärtsprimers (5'CAGATGTCTCTGGTTCACGAGG3'), 2.5 pmol einer Wildtypspezifischen Sonde (5'Fam-CTGGAGTGTG GGAAGAAGGC-Tamra3') und einer Mutantspezifischen Sonde (5'Tet-CTGGAGTGGGTGAGAAGAGGC-Tamra3'), 3 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 200 µmol/l Deoxynucleosid Triphosphat, und 1.25 U TaqGold DNA Polymerase ( Perkin Elmer) in einem Gesamtvolumen von 50 µl amplifiziert. Es folgten zunächst eine Denaturierung ( 10 Minuten bei 95°C), dann 50 Zyklen einer kombinierten Denaturierung (1 Minute bei 95°C) und einer kombinierten „Härtung, Ausglühung“ und Elongation (1 Minute bei 63°C) in einer Perking Elmer 7700 Real-time PCR



Maschine. Die Methodik des zweiten Polymorphismus, des **Marburg II Polymorphismus (Glu370Gln)** beinhaltet folgende Schritte:

Das Arbeitsprotokoll wurde bereits unter Marburg I Polymorphismus beschrieben, es wurde allerdings wie folgt modifiziert: 22.5 pmol eines Vorwärtsprimers (5'AATCTCATCTCTTTCAGTTGTAGTGGC3') und eines Reversen Primers (5'GGACCAGGACCTGAAGAAAGAAG3'), 5 pmol einer Wildtypspezifischen Sonde (5'Fam-ATATCTTCTCCACCCTAAA-minor groove-binding Protein [mgb] 3') und einer Mutantspezifischen Sonde (5'Vic-TATCTTCTGCACCCTAAA-mgb3') und 0.63 U TaqGold DNA Polymerase in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Zunächst erfolgte dann eine Denaturierung für 10 Minuten bei 95°C, danach abwechselnd Denaturierung für 15 Minuten bei 92°C und „Annealing“ und Elongation für 1 Minute bei 60°C. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte im Vergleich zu geklonten Wildtypen und Fragmenten des Mutantentyps in jeweils äquimolaren Mischungen.

## **2.5. Immunhistochemie**

In den immunhistologischen Untersuchungen der Plazenta wurden zwei monoklonale Antikörper eingesetzt. mAK 677 ist gegen das C-terminale Ende und mAK gegen das aminoternale Ende von FSAP gerichtet. Zur Verwendung kamen verschieden adulte Gewebe, für uns von Interesse waren Präparate der Plazenta und der Eihäute. Zur Darstellung von FSAP wurde die alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode angewendet, die so hergestellten Präparate wurden anschließend am Mikroskop semiquantitativ ausgewertet. Die Färbereaktionen wurden als + gewertet, wenn eine Anfärbung der Zellen zu beobachten war (1+ bis 3+. je nach Intensität).

## **2.6. Statistische Methoden**

Zur Beschreibung der Daten wurden hauptsächlich deskriptive Methoden verwendet, wie Mittelwert (arithmetisches Mittel), Standardabweichung, graphische Darstellung und Rängen.

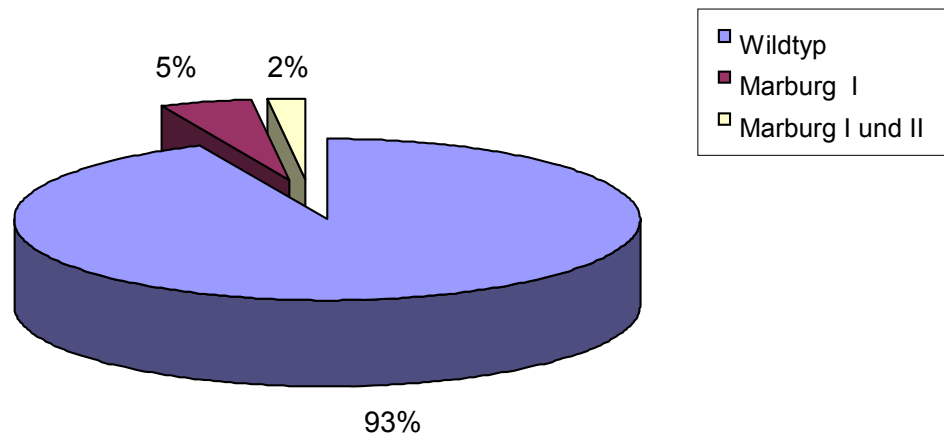
Der t-Test für unabhängige Stichproben wurde zur Berechnung der Signifikanz zwischen FSAP Antigen und Aktivität der 4 Schwangeren mit missed abortion und

jener mit normaler Schwangerschaft verwendet. Der zeitliche Effekt der einzelnen Parameter im Verlauf der Schwangerschaft wurde anhand der Friedman-Two-Way-ANOVA berechnet. Der Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen (Kontrollgruppe, Schwangere, Wochenbett) wurde mit Hilfe des Man-Whitney Wilcoxon-Tests durchgeführt. Sämtliche Berechnungen wurden mit der Software PC SPSS (Version 6.1.3.) durchgeführt. Die statistische Auswertung des Datenmaterials erfolgte in Übereinkunft und Zusammenarbeit mit dem Institut für Statistik der JLU Gießen, Dr. Pabst.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ergebnisse der DNA-Analyse

##### Mutationsfrequenz der Mutationen *Marburg I und II* in der Studienpopulation



#### Abbildung 4: Mutationsfrequenz

Bei jeder Probandin wurde mittels der beschriebenen PCR die Genstruktur des FSAP Gens analysiert und auf das Vorhandensein der Marburg I (Gly511Glu, Position 1601) oder Marburg II (Glu370Gln, Position 1177) Mutation untersucht. In der Studienpopulation von 101 schwangeren Frauen wiesen 5 Frauen den Marburg I Polymorphismus auf. Daraus ergibt sich eine Mutationsfrequenz von 4.95 %, die mit der aus vorherigen Studien ermittelten, für die kaukasische Rasse, übereinstimmt. Alle diese 5 Frauen zeigten deutlich und signifikant reduzierte proUK Aktivitätslevel im Verlauf der Schwangerschaft, während die Antigenlevel von FSAP nur leicht erniedrigt waren. Nur 2 der 5 Trägerinnen der Mutation an Position 1601 zeigten zusätzlich die Marburg II Mutation, ein SNP an Position 1177, die zu einem E 370 Aminosäureaustausch führt. Es konnte kein Unterschied der FSAP-Aktivität zwischen Trägerinnen beider Mutationen und denen lediglich mit der Marburg I Mutation festgestellt werden. Eine Frau zeigte eine reduzierte Aktivität bei normalen Antigenwerten ohne jedoch die Marburg I Mutation aufzuweisen. Es konnte keine Korrelation zwischen der Mutation und den erfassten Besonderheiten in der

Schwangerschaft festgestellt wurden. In der Gruppe der Schwangeren mit der Mutation fand sich keine Häufung von missed abortion, intrauterinem Fruchttod, Varikosis, Blutungs- oder Thromboseneigung oder anderen Auffälligkeiten in der Schwangerschaft.

### **3.2. Veränderungen gerinnungsphysiologischer Parameter**

Quick, aPTT und Fibrinogen wurden an folgenden Zeitpunkten bestimmt:

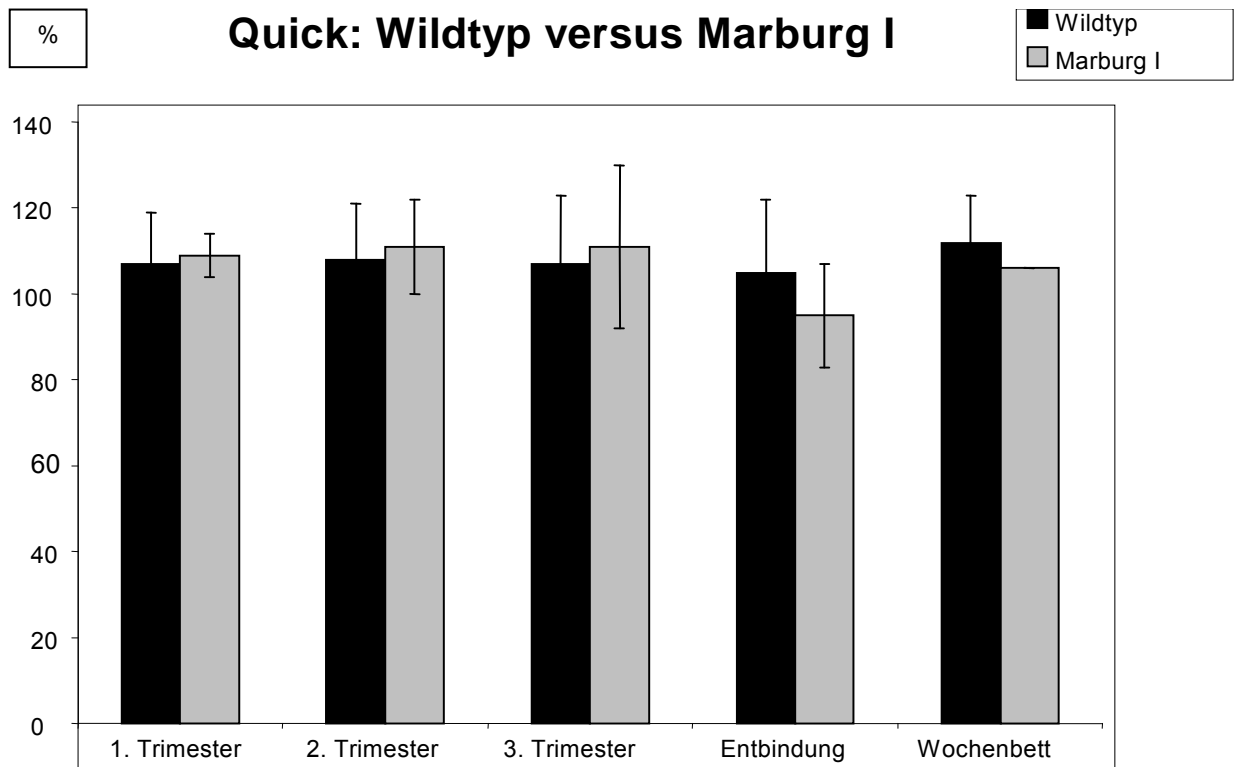
1. Abnahme 5. bis 21. SSW, 2. Abnahme 19. bis 38. SSW, 3. Abnahme 25. bis 39. SSW, 4. Abnahme Entbindung und bis zu 24 Stunden postpartal, 5. Abnahme über 24 Stunden und bis zu 52 Tage postpartal. Sowohl die Entwicklung dieser Parameter im Verlauf der Schwangerschaft, als auch der Vergleich zwischen Kontroll- und Probandinnengruppe und zwischen Mutant- und Wildtypprobandinnen soll im folgenden beschrieben werden.

#### **3.2.1. Quick (Thromboplastinzeit)**

Die Thromboplastinzeit zeigte im Verlauf der Schwangerschaft keine signifikante Veränderung im Vergleich zu den Werten nicht schwangerer Frauen. Zugrundeliegender Normbereich 70-130%. In der gesamten Studienpopulation zeigte sich lediglich ein leichter Anstieg des Quickwertes bis zum Zeitpunkt der Entbindung. Postpartal fielen die Werte ab. Alle Werte lagen innerhalb des Normbereichs. Betrachtet man innerhalb der Schwangerengruppe die Quickwerte der Wildtypgruppe und die der Mutationsgruppe separat voneinander, ergeben sich folgende Ergebnisse, Angaben als Mittelwerte:

Wildtypgruppe: Ausgehend von einem Mittelwert von 107 % in der 11. SSW steigt der Quickwert bis zur 27. SSW leicht an und beträgt dann 108 %. In der frühen postpartalen Phase fällt ein leichter Rückgang der Werte bis auf 105 % auf. In der späten postpartalen Probe steigt der Quickwert auf 112 %. Ausgehend von den oben angegebenen Normalwerten, liegen alle unsere Probenwerte innerhalb des Normalbereiches nicht schwangerer Frauen.

Mutationsgruppe: Insgesamt liegen die Werte für den ermittelten Quick der Mutationsplasmen in der Schwangerschaft nichtsignifikant (Mann-Whitney U – Wilcoxon – Test) über denen der Wildtypgruppe. Nach der Entbindung fallen sie auch stärker ab. Auch innerhalb dieser Gruppe fanden sich keine Über- oder Unterschreitungen der Normwerte für Nichtschwangere.



**Abbildung 5: Quick im Verlauf der Schwangerschaft**

### 3.2.2. aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit)

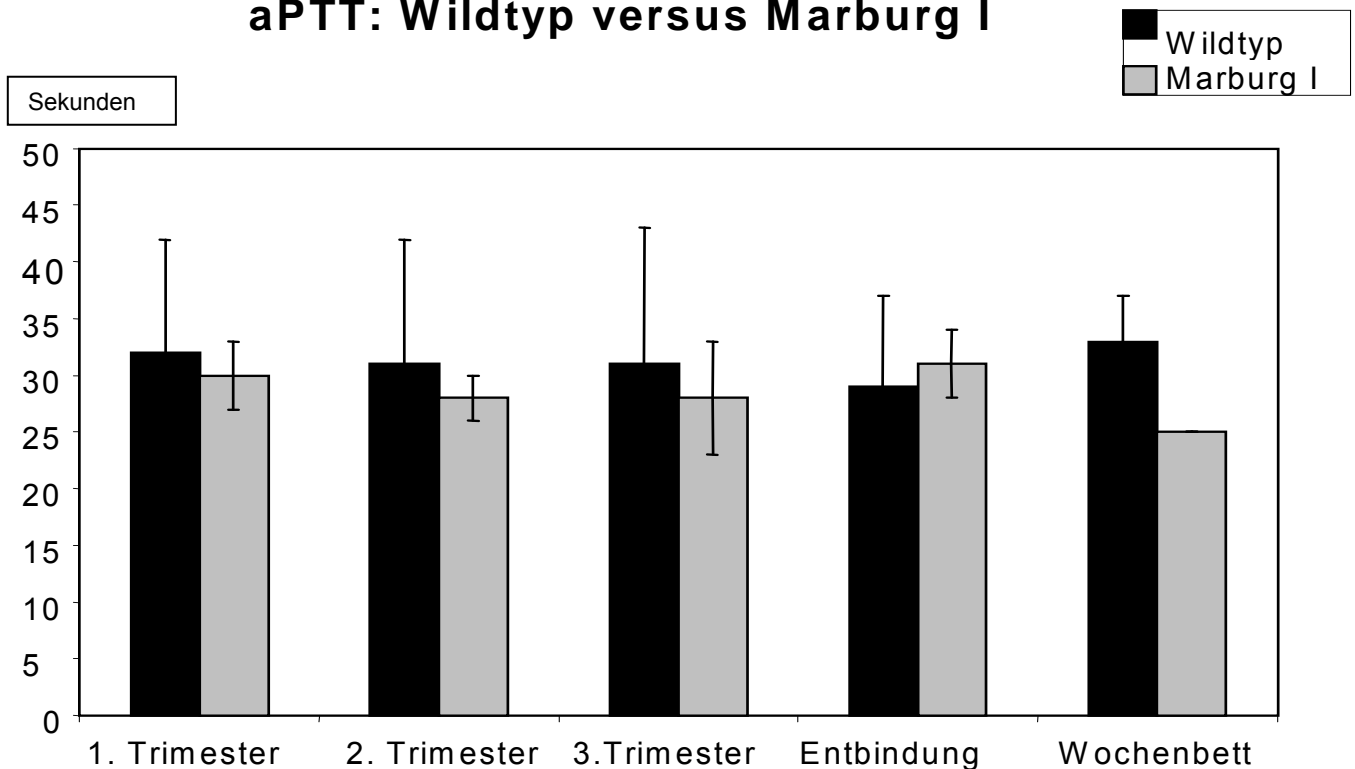
Zugrundegelegter Normbereich 25 bis 36 Sekunden.

In der Gruppe aller Schwangeren fiel die PTT im Verlauf der Schwangerschaft bis zur Entbindung deutlich ab, die Signifikanz lag bei  $p=0.006$  (Friedman Two-Way Anova). Alle Ergebnisse lagen im Normbereich Nichtschwangerer. Betrachtet man innerhalb der Schwangerengruppe die Werte der PTT der Wildtypgruppe und die der Mutationsgruppe separat voneinander, ergeben sich folgende Ergebnisse, Angaben als Mittelwerte:

Wildtypgruppe: Ausgehend von 32 Sekunden im ersten Trimester, fällt die PTT bis zur frühen postpartalen Probe auf 29 Sekunden ab. In der späten postpartalen Probe steigen die Werte auf 33 Sekunden an.

Mutationsgruppe: Vergleicht man innerhalb der Gruppe aller Schwangeren die Werte der Mutationsträgerinnen und der Wildtypgruppe getrennt, so fällt eine deutlichere Abnahme der PTT im Schwangerschaftsverlauf im Plasma der Mutationsträgerinnen auf. In dieser Gruppe fällt die partielle Thromboplastinzeit vom ersten zum zweiten Trimester von 30 Sekunden auf 28 Sekunden. Die niedrigsten Werte werden mit 25 Sekunden in der späten postpartalen Probe erreicht. Die Unterschiede zur Wildtypgruppe sind jedoch nicht signifikant (Mann-Whithney U – Wilcoxon – Test).

### aPTT: Wildtyp versus Marburg I



**Abbildung 6: aPTT im Verlauf der Schwangerschaft**

#### 3.2.3. Fibrinogen

Zugrundegelegter Normbereich 2.5 bis 4 g/l.

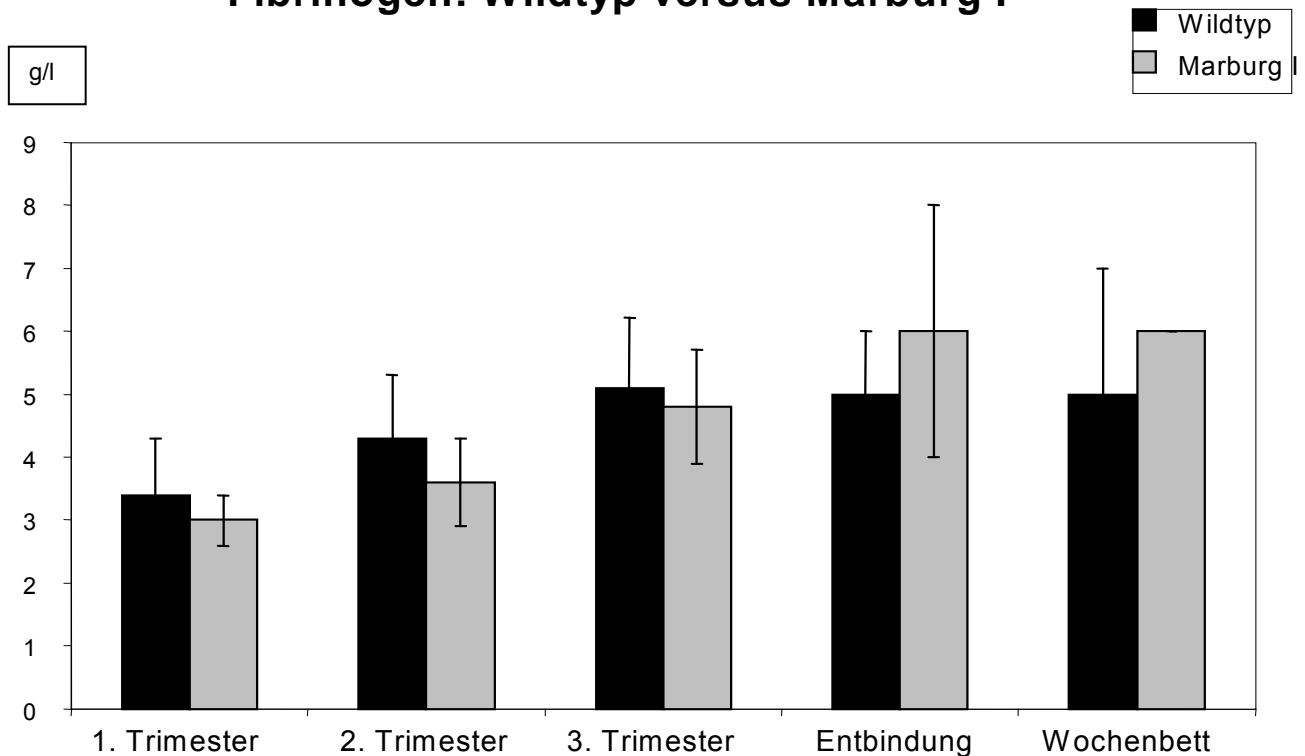
Die Fibrinogenwerte stiegen im Verlauf der Schwangerschaft signifikant und kontinuierlich an ( $p < 0.0001$ , Friedman Two-Way Anova) und lagen auch postpartal

noch deutlich über den Normalwerten Nichtschwangerer. Betrachtet man innerhalb der Schwangerengruppe die Fibrinogenwerte der Wildtypgruppe und die der Mutationsgruppe separat voneinander, ergeben sich folgende Ergebnisse, Angaben als Mittelwerte:

Wildtypgruppe: Zu Beginn der Schwangerschaft lagen die Mittelwerte bei 3.4 g/l. Zum Zeitpunkt der zweiten Abnahme lagen die Werte bei 4.3 g/l, zum Zeitpunkt der dritten Probe bei 5.1 g/l. Nach der Entbindung lagen die Werte in der frühen postpartalen Probe bei 5.0 g/l und blieben bis zur zweiten Abnahme im Wochenbett konstant. Betrachtet man diese Werte in Relation zu den Normalwerten, so liegen die von uns ermittelten Werte ab dem zweiten Trimester außerhalb dieses Normbereiches, im zweiten Trimester 7.5 % über der Norm, im 3. Trimester 27.5 % über der Norm und postpartal 50% über der Norm.

Mutationsgruppe: Es zeigt sich ein schwächerer Anstieg der Fibrinogenwerte im Plasma der Mutanten, als in der Wildtypgruppe. Dort lagen die Werte erst ab dem dritten Trimester mit 4.8 g/l 20% über dem Normbereich und erreichten nach der Entbindung Maximalwerte von 6 g/l. Diese Unterschiede zur Wildtypgruppe waren nicht signifikant ( Mann-Whithney U – Wilcoxon – Test).

### Fibrinogen: Wildtyp versus Marburg I



**Abbildung 7: Fibrinogen im Verlauf der Schwangerschaft**

### 3.3. Veränderungen von FSAP

Bei allen Probandinnen wurde zu den oben genannten Zeitpunkten der FSAP-Antigengehalt, die FSAP-Aktivität und das Verhältnis von FSAP-Aktivität und FSAP-Antigen (Ak/Ag-Ratio) im Plasma bestimmt. Dabei wurde einerseits zwischen den Werten der Kontrollgruppe und denen der Schwangerengruppe verglichen. Es zeigten sich bei den Schwangeren signifikant höhere Werte für FSAP-Antigen und -Aktivität im gesamten Schwangerschaftsverlauf. Die Aktivitätswerte erreichten dabei im Einzelfall bis zu 4fach höhere Werte. Das Maximum der Werte lag zwischen dem 2. und 3. Trimester. Der Anstieg im Schwangerschaftsverlauf war signifikant. Nach der Entbindung fielen die Werte beider Parameter langsam ab und näherten sich denen der Kontrollgruppe. Eine Normalisierung der Werte bis zur 6. bis 8. postpartalen Woche ist anzunehmen. Es wurde zwischen den Werten der Schwangeren mit Marburg I Mutation und denen ohne Mutation im FSAP-Gen verglichen. Dabei zeigte sich in der gesamten Schwangerschaft und postpartal eine signifikant niedrigere Aktivität im Plasma der Schwangeren mit Mutation, als bei der Wildtypgruppe. Der Antigengehalt war annähernd gleich in beiden Gruppen. Die Ergebnisse der Studie liegen weit außerhalb des in der Kontrollgruppe ermittelten Referenzbereiches für FSAP-Aktivität und Antigen.

#### 3.3.1. FSAP- Antigen

Die FSAP-Antigenlevel stiegen im Verlauf der Schwangerschaft kontinuierlich und signifikant ( $p < 0.0001$ , Friedman-Two-Way-Anova) an und erreichten im dritten Trimester Maximalwerte. Nach der Entbindung blieben sie noch deutlich über den Werten der Kontrollgruppe erhöht. Betrachtet man innerhalb der Schwangerengruppe die FSAP-Antigenwerte der Wildtypgruppe und die der Mutationsgruppe separat voneinander, ergeben sich folgende Ergebnisse:

Wildtypgruppe: Ausgehend von einem Plasmawert von 1422 mPEU/ml in der 5. bis 21. SSW, steigen die Antigenlevel im Verlauf der Schwangerschaft kontinuierlich und signifikant an ( $p < 0.0001$ , Friedman-Two-Way-Anova). Die Maximalwerte von 2002 mPEU/ml werden im dritten Trimester erreicht. Nach der Entbindung fallen die Werte langsam ab und liegen in der späten postpartalen Probe bei 1552 mPEU/ml und damit signifikant niedriger als in der frühen postpartalen Probe. Im Vergleich zu den



Werten der Wildtypkontrollgruppe liegen die Antigenwerte zu jedem Zeitpunkt der Schwangerschaft und des Wochenbettes signifikant über denen nicht schwangerer Frauen (Mann-Whithney U – Wilcoxon – Test).

Mutationsgruppe: Die Antigenwerte für FSAP der Gruppe mit nachgewiesener Marburg I Mutation liegen im gesamten Untersuchungszeitraum niedriger als die der Wildtypgruppe. Ebenso wie die Werte der Wildtypgruppe, steigen die Antigenwerte der Mutationsträgerinnen im Verlauf der Schwangerschaft an. Ausgehend von 1086 mPEU/ml im ersten Trimester erreichen die Werte im dritten Trimester mit 1588 mPEU/ml ihr Maximum. Nach der Entbindung fallen die Werte kontinuierlich ab. Unsere zweite postpartal durchgeführte Probe besteht im Falle der Mutanten lediglich aus einer Probandin, so dass der ermittelte Wert von 1943 mPEU/ml vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl als untypischer Ausreißerwert gedeutet werden sollte. Trotz insgesamt niedrigerer Werte als in der Wildtypgruppe, liegen auch die FSAP-Antigenlevel der Mutantengruppe im gesamten Untersuchungszeitraum über denen der Mutationskontrollgruppe (Mann-Whithney U-Wilcoxontest).

## FSAP Antigen im Plasma gesunder Schwangerer

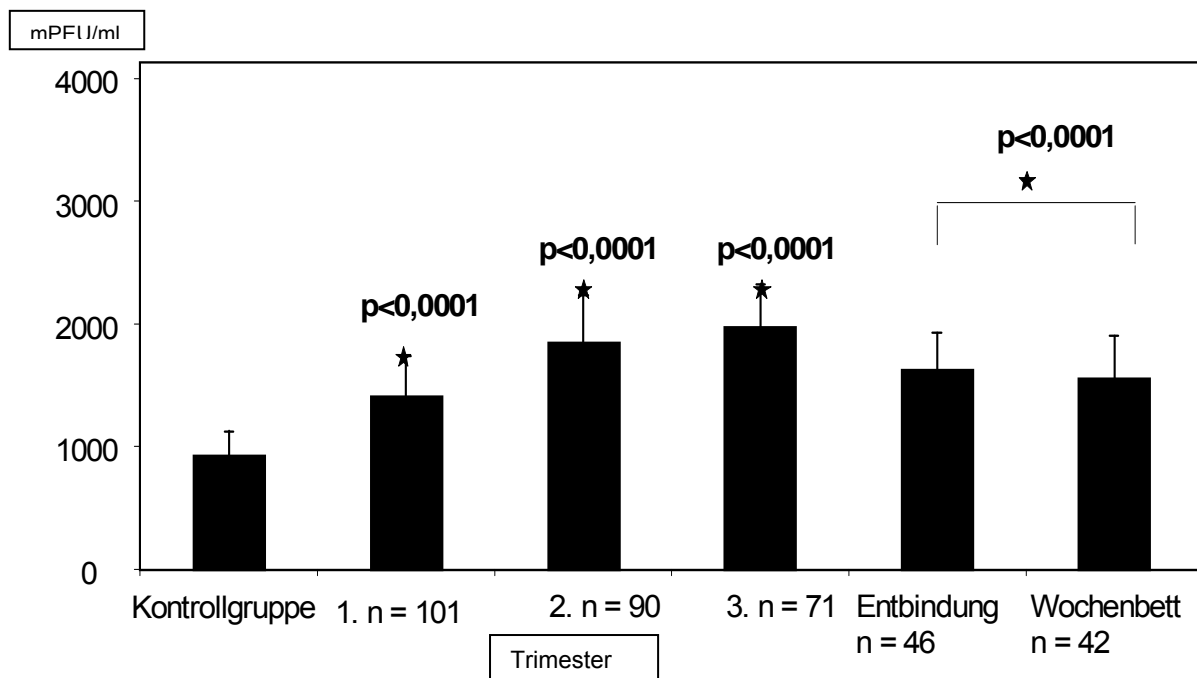
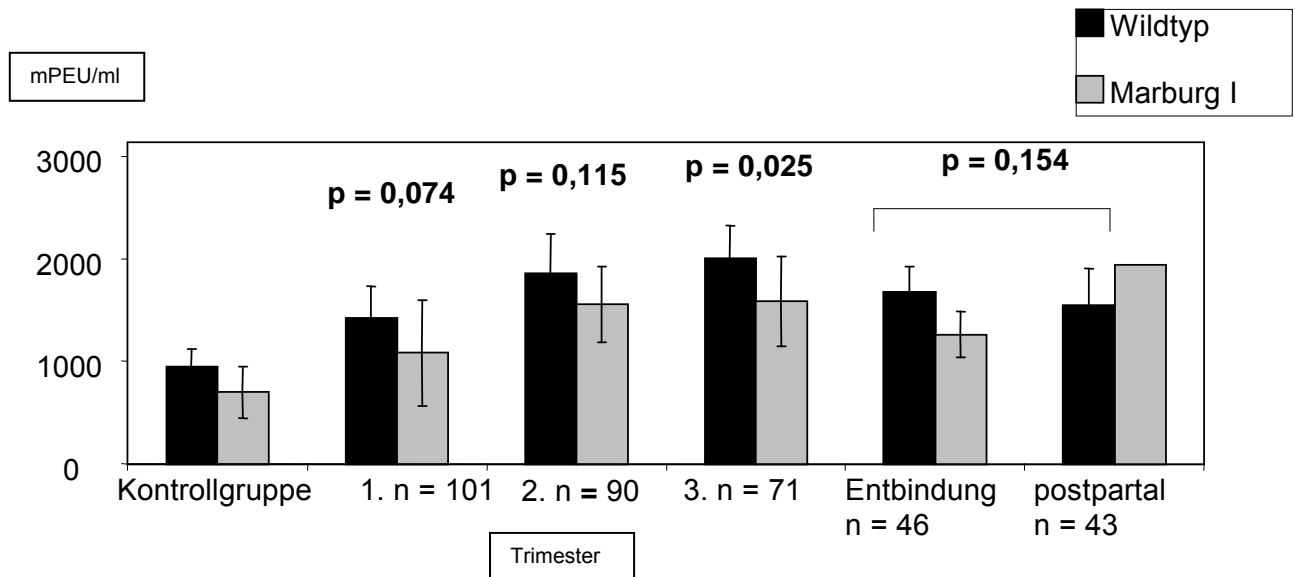


Abbildung 8: FSAP Antigen im Plasma gesunder Schwangerer

# FSAP Antigen: Wildtyp versus Marburg I



**Abbildung 9: FSAP Antigen: Wildtyp versus Marburg I**

## 3.3.2. FSAP-Aktivität

Die gemessene Aktivität stieg in der gesamten Studienpopulation im Verlauf der Schwangerschaft auf dreifach erhöhte Werte gegenüber der Kontrollgruppe signifikant an. Der Unterschied zwischen den Werten der Wildtypgruppe und denen der Mutationsgruppe erreichte ebenfalls für alle Messzeitpunkte hohe Signifikanz (Mann-Whithney-U-Wilcoxon-Test). Betrachtet man innerhalb der Schwangerengruppe die FSAP-Aktivität der Wildtypgruppe und die der Mutationsgruppe separat voneinander, ergeben sich folgende Ergebnisse:

Wildtypgruppe: Zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme lagen die Aktivitätslevel bereits bei 1626 mPEU/ml und damit 594 mPEU/ml über denen der Wildtypkontrollgruppe. Im zweiten Trimester erreichte die Aktivität mit 3249 mPEU/ml ihr Maximum. Die Messung im dritten Trimester ergab Werte von 2789 mPEU/ml und dieser stete Abfall der Aktivitätslevel setzte sich bis in die Wochenbettphase fort. Die erste postpartale Messung zeigte noch 2489 mPEU/ml, bis zur zweiten Probenentnahme waren die Werte dann signifikant auf 2032 mPEU/ml gefallen und

lagen damit immer noch weit über denen nicht schwangerer Frauen. (Mann-Whitney-U-Wilcoxon-Test).

Mutationsgruppe: Die Aktivitätslevel der Probandinnen mit nachgewiesener Marburg I Mutation lagen ebenfalls weit über denen der Kontrollgruppe mit derselben Mutation. Die Messung im ersten Trimester zeigte Werte von 542 mPEU/ml. Damit waren sie ca. doppelt so hoch, wie die der entsprechenden Kontrollgruppe, erreichten jedoch nur ein Drittel der Werte der Wildtypgruppe im ersten Trimester. Im zweiten Trimester erreichten die Werte mit 1233 mPEU/ml ihr Maximum, um zum dritten Trimester auf 959 mPEU/ml abzusinken. Nach der Entbindung stiegen die Werte leicht an, wobei die letzte postpartale Probe (n=1) erneut kritisch zu bewerten ist. Insgesamt lagen die Aktivitätslevel der Mutationsträgerinnen in der gesamten Schwangerschaft und postpartal signifikant unter denen der Wildtypgruppe. Im ersten Trimester erreichte dabei die Signifikanz mit  $p=0,0002$  (Mann-Whitney-U-Wilcoxon-Test).

### FSAP Aktivität im Plasma gesunder Schwangerer

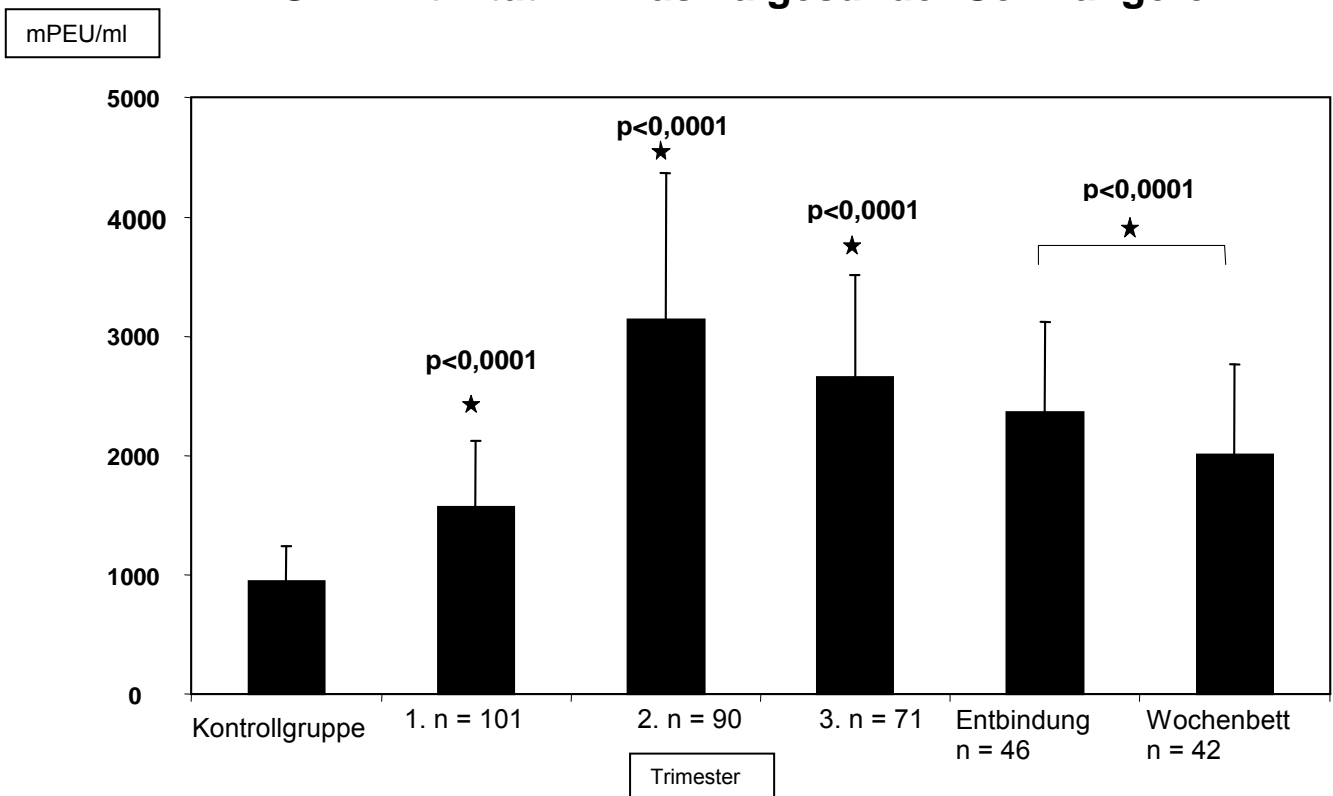
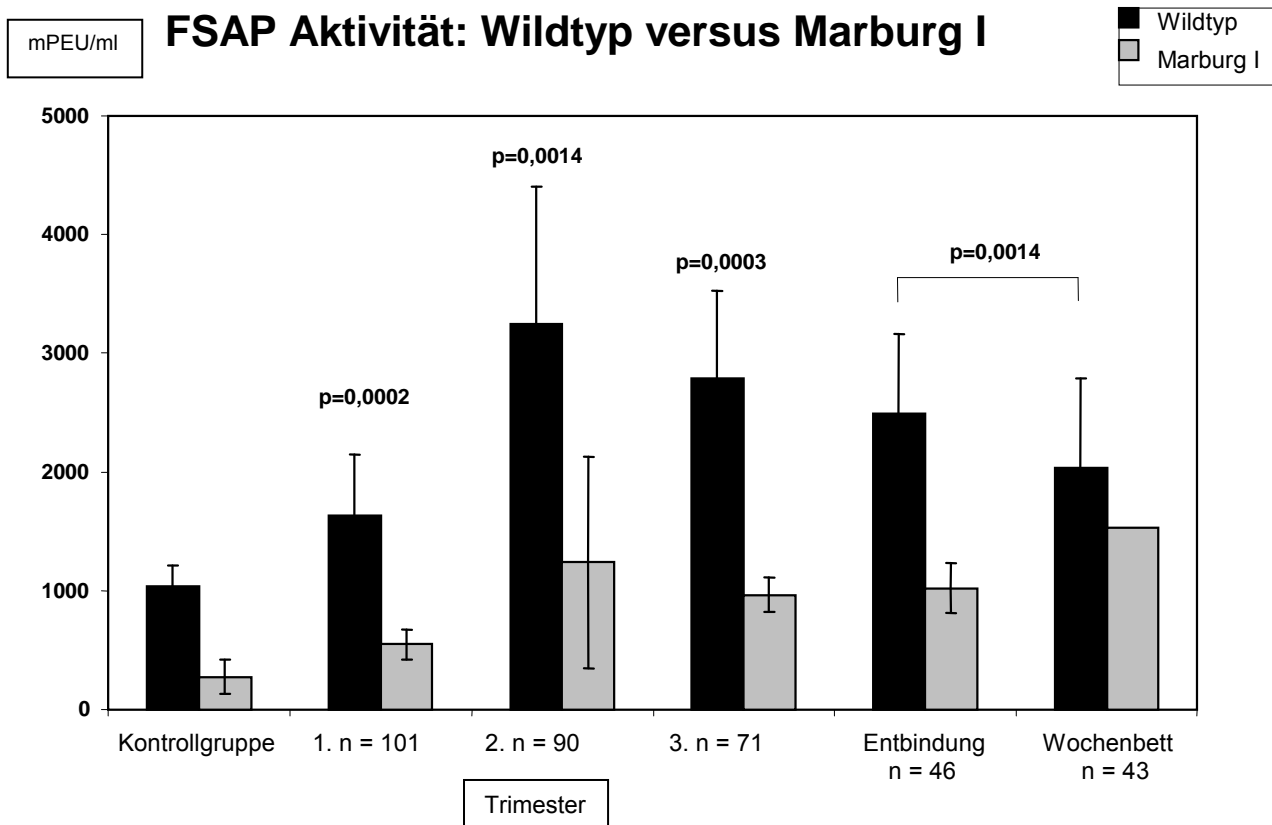


Abbildung 10: FSAP Aktivität im Plasma gesunder Schwangerer



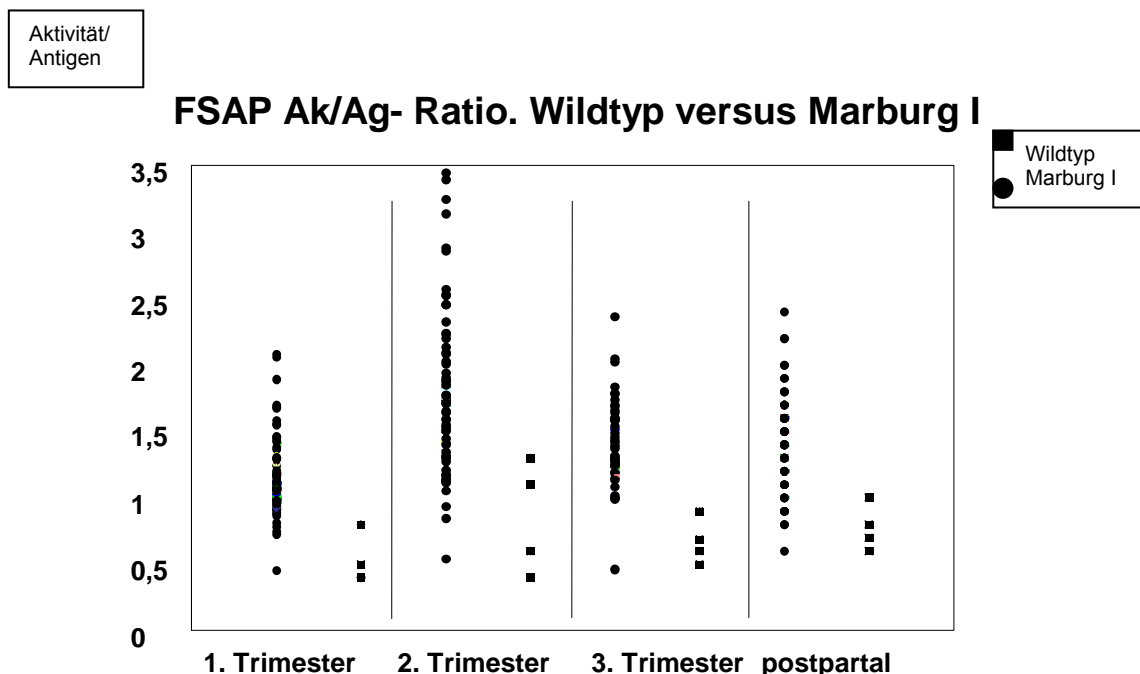
**Abbildung 11: FSAP Aktivität: Wildtyp versus Marburg I**

### 3.3.3. Aktivität/ Antigen- Ratio

Zusätzlich zu FSAP-Aktivität und Antigenspiegel, ist der Quotient aus FSAP-Aktivität und Antigen ein hilfreiches rechnerisches Konstrukt, mit Hilfe dessen man das unterschiedliche Verhalten von FSAP- Antigen und Aktivität im Verlauf der Schwangerschaft verdeutlichen kann. Für die gesamte Studienpopulation zeigte sich eine signifikante ( $p < 0.0001$ , Friedman Two-Way Anova) Veränderung vom Beginn der Schwangerschaft bis zum Wochenbett. Ausgehend von einem Verhältnis von 1,64 im ersten Trimester, steigt das Verhältnis zum zweiten Trimester rasch bis auf 3,14. Im weiteren Verlauf sinken die Werte auf 2,58 bzw 2,64 zum letzten Abnahmezeitpunkt ab. Dies zeigt deutlich, dass die Aktivität in höherem Ausmaß ansteigt, als der Antigengehalt des Enzymes. Betrachtet man Wildtyp- und Mutantengruppe getrennt voneinander, so ergibt sich folgendes Bild.

Wildtypgruppe: Ausgehend von einem nahezu ausgeglichenen Verhältnis von Aktivität und Antigen in der Wildtypkontrollgruppe (1,1), liegen die Werte des ersten Trimester mit 1,2 noch nahe bei diesen. Im zweiten Trimester steigt die Aktivität stärker als das Antigen, was die Ratio von 1,8 verdeutlicht. Die Werte des dritten Trimesters und der frühen postpartalen Probe liegen mit 1,4 und 1,5 darunter. Zur zweiten Wochenbettprobe fielen die Werte weiter bis auf 1,3, entsprechend eines sich wieder einstellenden Gleichgewichtes.

Mutationsgruppe: Mit einem Verhältnis von 0,6 liegen die Werte in dieser Gruppe bereits im ersten Trimester weit unter denen der Wildtypgruppe, passend zu einer signifikant erniedrigten Aktivität in der Mutationsgruppe bei relativ normalem Antigengehalt. Zum zweiten Trimester steigt die Ratio leicht bis auf 0,8 an, da auch die Aktivitätswerte zu diesem Zeitpunkt ihr Maximum erreichen. Im dritten Trimester sinkt der Wert erneut auf 0,6 und bleibt dann in den letzten beiden Proben bei 0,8. Im Vergleich zu dem Wert der nicht schwangeren Frauen mit der Marburg I Mutation von 0,4, lag somit das Verhältnis aus Aktivität und Antigengehalt des Plasmas der Schwangeren stets über dem der Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U-Wilcoxon-Test).



**Abbildung 12: FSAP Aktivität/Antigen-Ratio, Wildtyp versus Marburg I**

Zur besseren Übersicht aller in der Studie erhobenen quantitativen Parameter im Folgenden eine Tabelle mit Darstellung der Ergebnisse.

	Kontrollgruppe		Studienpopulation											
			Schwangerschaftsverlauf						Entbindung		Wochenbett			
			5. - 21. SSW		19. - 38. SSW		25. - 39. SSW		(<24h postpartal)		(>24h-52 Tage)			
Mutations status	Wildtyp	Marburg I	Wildtyp	Marburg I	Wildtyp	Marburg I	Wildtyp	Marburg I	Wildtyp	Marburg I	Wildtyp	Marburg I	Wildtyp	Marburg I
Anzahl (n)	(n=44)	(n=5)	(n=96)	(n=5)	(n=85)	(n=5)	(n=66)	(n=5)	(n=42)	(n=4)	(n=42)	(n=1)		
Variablen (Mittelwert +/- SD)	FSAP Antigen (mPEU/ml)	955 +/- 170	701 +/- 254	1422 +/- 315	1086 +/- 515	1861 +/- 379	1557 +/- 371	2002 +/- 323	1588 +/- 435	1681 +/- 241	1263 +/- 227	1552 +/- 351	1943	
	FSAP Aktivität (mPEU/ml)	1032 +/- 178	269 +/- 144	1626 +/- 515	542 +/- 129	3249 +/- 1157	1233 +/- 892	2789 +/- 734	959 +/- 145	2489 +/- 676	1014 +/- 209	2032 +/- 755	1524	
	Ak/Ag-ratio	1,1 +/- 0,2	0,4 +/- 0,1	1,2 +/- 0,3	0,6 +/- 0,2	1,8 +/- 0,6	0,8 +/- 0,4	1,4 +/- 0,3	0,6 +/- 0,2	1,5 +/- 0,4	0,8 +/- 0,2	1,3 +/- 0,3	0,8	
	PT (%)	-	-	107 +/- 12	109 +/- 5	108 +/- 13	111 +/- 11	107 +/- 16	111 +/- 19	105 +/- 17	95 +/- 12	112 +/- 11	106	
	aPTT (sec.)	-	-	32 +/- 10	30 +/- 3	31 +/- 11	28 +/- 2	31 +/- 12	28 +/- 5	29 +/- 8	31 +/- 3	33 +/- 4	25	
	Fibrinogen (g/l)	-	-	3,4 +/- 0,9	3 +/- 0,4	4,3 +/- 1	3,6 +/- 0,7	5,1 +/- 1,1	4,8 +/- 0,9	5 +/- 1	6 +/- 2	5 +/- 2	6	

**Tabelle 3: Zusammenfassung aller Studienergebnisse**

### 3.4. Mutterpassauswertung

Zur Interpretation der Mutterpassbefunde wurde die Studiengruppe in eine Mutanten- und eine Wildtypgruppe eingeteilt. Es traten jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der erhobenen Daten zwischen diesen beiden Gruppen auf.

Die Werte der Wildtypgruppe zeigen aufgrund der größeren Probandinnenanzahl insgesamt eine größere Varianz. Im Einzelnen wurden folgende Befunde erfasst. Die Blutgruppenverteilung zeigte in der Wildtypgruppe eine deutliche Dominanz der Blutgruppe A Rhesus positiv (49%), während in der Mutantengruppe 60% der Frauen 0 Rhesus positiv aufwiesen. Alter und Gewicht zu Beginn der Schwangerschaft unterschieden sich in beiden Gruppen nicht wesentlich voneinander, das mittlere Gewicht lag in der Wildtypgruppe mit 62.5 kg etwas höher als in der Mutantengruppe (47.5 kg). Der im Verlauf der gesamten Schwangerschaft ermittelte niedrigste Hämoglobinwert lag mit 8.8 g/dl in der Mutantengruppe unter dem der Wildtypgruppe von 10.2 g/dl, die Werte liegen damit leicht unter der Grenze von 11 g/dl und sind als Anämie zu werten. Keine der Frauen erhielt eine spezifische Anämietherapie. 13.7% der Wildtypfrauen zeigten in der Schwangerschaft Symptome einer Varikosis, in der Mutantengruppe trat diese Erkrankung nicht auf. Im Mutterpass wurden eine Reihe von standardisierten Fragen und deren Antworten erhoben, dazu gehören Krankheiten oder Auffälligkeiten in der Eigen- und Familienanamnese der Schwangeren, die auf ein mögliches Risiko für das ungeborene Kind hindeuten könnten. In der Wildtypgruppe gaben 25% der Frauen an, an einer Allergie zu leiden, in der Mutationsgruppe waren es 40%. Die genaue Allergie wurde nicht angegeben. 60% der Mutationsträgerinnen war in dieser Schwangerschaft älter als 35 Jahre und somit einem statistisch höheren Risiko von Problemen ausgesetzt, in der Wildtypgruppe waren dies 17.5%. 24% der Wildtypfrauen gab eine erhöhte familiäre Belastung an, womit Diabetes, Hypertonie, Missbildungen, genetische und psychische Krankheiten gemeint sind, eine Differenzierung fand nicht statt. In der Gruppe der Marburg I Mutationsträgerinnen, gab keine Frau diese Risikounummer an. Wohingegen 20% dieser Frauen ein totes oder geschädigtes Kind in der Anamnese angaben, in der Wildtypgruppe waren es lediglich 5%, ein Grund für das Versterben wurde nicht erfasst. An weiteren Risikobefunden in der Wildtypgruppe sind noch zu nennen die Blutungs- oder Thromboseneigung bei 2.5%, zwei oder mehr stattgehabte Aborte oder Fehlgeburten bei 3.75% und bei ebenfalls 3.75% der Frauen eine Adipositas zu nennen. Die genaue Auflistung dieser Verteilungen ist der Tabelle 5 zu entnehmen. In der Wildtypgruppe hatten bereits 4.88% 2 und 9.76% 1 vorherigen Abort erlitten, in der Mutationsgruppe gab keine der Frauen diesen Punkt an. In der Wildtypgruppe erlitten 4 der von uns betreuten Schwangeren einen missed abortion und schieden somit ab diesem Zeitpunkt aus der Studie aus. Bei Vergleich der Gruppe der Frauen mit erlittenem missed abortion und der restlichen

Studienpopulation, um mögliche Korrelationen mit abnormen FSAP-Werten oder anderen Auffälligkeiten zu ermitteln, ergeben sich keine Auffälligkeiten. Es wurden FSAP-Aktivität, FSAP-Antigen, Aktivitäts-Antigen-Quotient, Quick, PTT und Fibrinogen im Plasma der Frauen mit normal verlaufener Schwangerschaft und denen mit missed abortion jeweils zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme verglichen. Für keines der Merkmale konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (t-Test für unabhängige Stichproben). Ebenso zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Verlauf von FSAP-Antigen und Aktivität in der Schwangerschaft und dem Verhalten von Quick, PTT, Fibrinogen und den erhobenen qualitativen Merkmalen.

	<b>Mittelwert +/- SD</b>
<b>FSAP-Antigen</b> (mPEU/ml)	
Missed abortion	1412.0 +/- 335.6
Schwangere (1. Trimester)	1405.1 +/- 333.3
<b>FSAP-Aktivität</b> (mPEU/ml)	
Missed abortion	1866.9 +/- 484.2
Schwangere (1. Trimester)	1560.2 +/- 556.8
<b>Aktivität/Antigen-Ratio</b>	
missed abortion	1.3 +/- 0.2
Schwangere (1. Trimester)	1.1 +/- 0.3

**Tabelle 4: Missed abortion im Vergleich zu restlichen Schwangeren**

Auch die schwangeren Frauen mit bekannter Blutungs- oder Thromboseneigung oder Varikosis in der Schwangerschaft zeigten keine auffälligen Werte für FSAP-Antigen oder -Aktivität. Ebenfalls zeigte sich kein Zusammenhang zwischen stattgehabten oder aktuellen missed abortions, intrauterinen Fruchttoden und anderen Problemen in der Schwangerschaft und abnormen Blutwerten für FSAP.

Im Rahmen der postpartalen Blutentnahme wurden die Daten der im Rahmen unserer Studie geborenen Kinder erhoben und verglichen. Es zeigte sich in der Mutationsgruppe mit 60% eine Knabenwendigkeit, in der Wildtypgruppe waren



46.3% der Kinder Jungen. Dies entspricht der normalen Verteilung. Das Geburtsgewicht lag in der Wildtypgruppe bei im Mittel 3180 g, die Entbindung erfolgte bei 82% der Frauen spontan in der 39. SSW. In der Mutationsgruppe wogen die Kinder mit im Mittel 2737g etwas weniger und kamen in der 32. SSW in 80% spontan zur Welt. Der Großteil der untersuchten Schwangeren hatte weder in der Schwangerschaft, noch unter der Geburt schwerwiegende Probleme. 6.3% der Wildtypgruppe wurden stationär bei schwangerschaftsinduzierter Hypertonie oder HELLP-Syndrom aufgenommen, 2.1% zeigen eine intrauterine Wachstumsretardierung und 2.1% pathologisch gefärbtes Fruchtwasser. Dies war in der Mutationsgruppe die einzige Auffälligkeit mit 20% der Frauen.

Insgesamt ist eine aussagekräftige Interpretation der erhobenen Befunde und der ermittelten FSAP-Werte in der Gruppe der Mutationsträgerinnen auf Grund der geringen Fallzahl kaum möglich. Bei den beobachteten schwangerschaftsabhängigen Problemen, insbesondere Blutungen, Thrombose und Fehlgeburten konnte kein eindeutiger Zusammenhang zu hohen oder niedrigen FSAP-Werten gefunden werden. In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Ergebnisse der Mutterpassauswertung zusammengefasst.

	<b>Mutationsstatus</b>	
	<b>Wildtyp</b> (n=96)	<b>Marburg I</b> (n=5)
<b>Alter</b> (in Jahren ,MW +- SD)	28 +/- 1	32.4 +/- 6.2
<b>Blutgruppe</b>	43% ARh+, 6.3% ARh- 19% BRh+, 2.5% BRh- 17.5% 0Rh+, 7.5%0Rh- 5% ABRh+	60% 0Rh+ 40% BRh+
<b>Gewicht der Mutter</b> vor SS-Beginn (in kg, MW +- SD)	62.5 +/- 12.5	47.5 +/- 10.3
<b>Hämoglobin</b> (niedrigster Wert im SS-Verlauf in g/dl, MW+- SD)	10.72 +/- 1.04	8.8 +/- 0.9
<b>Varikosis</b> in dieser SS	13.7 %	0%
<b>Besonderheiten in der Anamnese</b>	25% Allergie 24% Familiäre Belastung 17.5% Schwangere > 35 Jahre 12.5% Z.n.Sectio 11.3% Frühere eigene schwere Erkrankung 5% Totes/geschädigtes Kind in der Anamnese 3.75% Adipositas 3.75% Z.n. 2 oder mehr Fehlgeburten/Aborten 3.75% Komplikationen bei vorherigen SS 2.5% Blutungs-/ Thromboseneigung 2.5% Diabetes mellitus	40% Allergie 60% Schwangere > 35 Jahre 20% Totes/geschädigtes Kind in der Eigenanamnese
<b>Anzahl voriger Entbindungen</b>	47.5% 0 36.3% 1 15% 2 3.8% 3 oder mehr	100% 1

<b>Art voriger Entbindungen</b>	87.8% spontan 9.8% Sectio 2.4% Beides	100% spontan
<b>Anzahl voriger Aborte</b>	85.4% 0 9.8% 1 4.9% 2	100% 0
<b>Geburtsmodus</b>	82% spontan 18% Sectio	80% spontan 20% Sectio
<b>Geburtsgewicht</b> (in g, MW +/- SD)	3180 +/- 531.9	2737 +/- 283
<b>Geburtsalter</b> (SSW, MW +/- SD)	39.6 +/- 1.6	32 +/- 0.9
<b>Kindsgeschlecht</b>	46.3% männlich	60% männlich
<b>Probleme in SS und Geburt</b>	6.3% SIH/HELLP 2.1% IUGR 2.1% pathologisches FW 1.1% vorzeitige Wehen 1.1% vorz. Plazentalösung 1.1% Diabetes mellitus 85% ohne Probleme	20% pathologisches FW 80% ohne Probleme

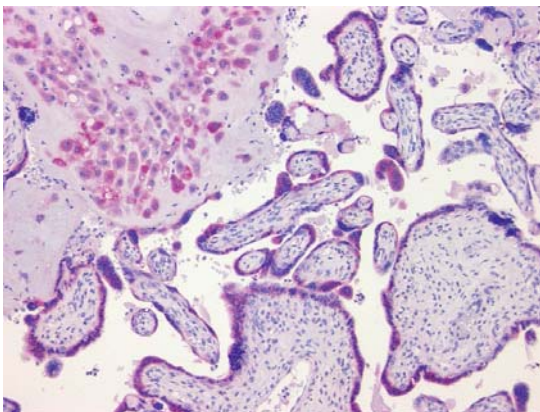
**Tabelle 5: Ergebnisse der Mutterpassauswertung**

### **3.5. Immunhistochemie**

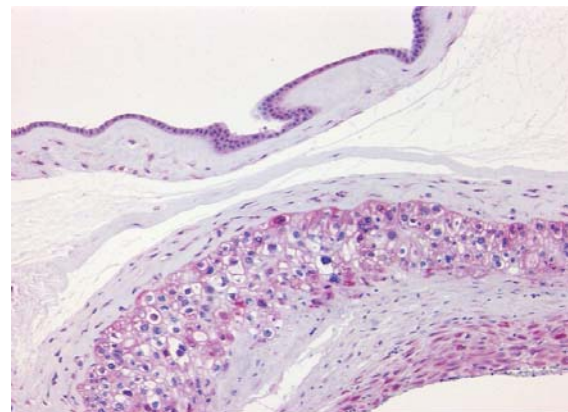
Eine positive intrazytoplasmatische Reaktion gegen FSAP zeigte sich vor allem in Epithelien. Die Reaktion der meisten mesenchymalen Stromazellen in komplexen Geweben war negativ. Eine besonders stark positive Reaktion zeigten die Deziduazellen, Zyto- und Synzytiotrophoblastzellen der Plazenta, sowie das Chorionepithel und die Fibroblasten der Eihäute.

<b>Plazenta</b>	<b>mAK 1189</b>	<b>mAK 677</b>
Chorionepithel	3+	2+
Amnionepithel	2+	2+
Deziduazellen	2+ - 3+	2+
Stromazellen	0	nicht eindeutig positiv
Gefäßendothel	1+	1+
<b>Eihäute</b>		
Amnionepithel	3+	2+
Deziduazellen	3+	1+
Fibroblasten	3+	1+ - 2+
<b>Endometrium</b>		
Drüsenepithel	3+	2+
Stromazellen	0	1+
Myometrium	1+	1+
Gefäßendothel	1+	2+

**Tabelle 6: Färbeintensität verschiedener Gewebe mit zwei mAKs gegen FSAP**



**Abbildung 13: FSAP in der Plazenta**



**Abbildung 14: FSAP in den Eihäuten**

Im Endometrium des Uterus war eine verstärkt apikale Färbung des Drüsenkörperepithels zu erkennen. Vergleichbar starke Reaktionen zeigten sich

außerdem in den Epithelien des Dünndarms, des Pankreas, des Ductus zysticus, des Hodens, der Mamma und in den elastischen Fasern der Lunge (53).

## **4. Diskussion**

### **4.1. Studienergebnisse**

Die vorliegende Studie hat das Verhalten von FSAP, mit seiner multifunktionalen Rolle in Hämostase, Gerinnung und Zellinvasion in der Schwangerschaft und im Wochenbett untersucht. Der Antigengehalt von FSAP zeigte von Beginn des ersten Untersuchungszeitpunktes (5.-21.SSW) eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur nichtschwangeren Kontrollgruppe. Im Verlauf stieg der Antigengehalt bis auf ein Maximum von ca. 2000 mPEU/ml im 3. Trimester an, das entspricht einer Verdopplung der Werte der Kontrollgruppe. Nach Entbindung fielen die Werte langsam bis zur 4. postpartalen Woche auf Normalniveau ab. Die Aktivität von FSAP verhält sich im Verlauf der Schwangerschaft gleichsinnig, zeigt aber insgesamt eine ausgeprägtere Steigerung. Ausgehend von einer präpartalen Aktivität von ca. 1000 mPEU/ml steigt die Aktivität bis auf über 3000 mPEU/ml im 2. Trimester an, postpartal zeigt sich ein langsamer Abfall der Werte. Die Steigerung des Antigengehaltes und der Aktivität war zu jedem Zeitpunkt signifikant gegenüber den Werten der Kontrollgruppe. Die Werte der 5 Probanden mit nachgewiesener Marburg I Mutation (Mutationsfrequenz 4.95%) zeigten bei gleichsinnigem Anstieg des Antigengehaltes und der Enzymaktivität im Verlauf der Schwangerschaft insgesamt signifikant niedrigere Werte. Der Antigengehalt der Mutationsgruppe stieg auf maximal ca. 1500 mPEU/ml im 3. Trimester und lag damit ca. 500 mPEU/ml niedriger, als die Werte der Wildtypgruppe zum gleichen Zeitpunkt. Die Aktivität der Mutationsträgerinnen stieg auf maximal ca. 1200 mPEU/ml im 2. Trimester an und lag damit bei weniger als 50% der entsprechenden Wildtypwerte. Die Frauen mit nachgewiesener Marburg I Mutation wiesen keine klinischen Ereignisse in der Schwangerschaft oder unter der Geburt auf. Es konnte keine Korrelation zwischen Pathologien wie Abort, Präeklampsie oder Thrombose und der Mutation nachgewiesen werden. Bei 2 der 5 Frauen mit Marburg I Mutation lag zusätzlich die Marburg II Mutation vor. Die Aktivitätslevel waren gegenüber denen der Marburg I Trägerinnen nicht verändert. Auch in dieser Gruppe war keine klinische Pathologie nachweisbar. Die globalen Gerinnungstests waren in der Wildtyp- und

Mutationsgruppe nicht signifikant unterschiedlich. Es kam insgesamt zu einem Anstieg der Fibrinogenwerte auf maximal 5 g/l, die aktivierte partielle Thromboplastinzeit zeigte im Verlauf der Schwangerschaft eine leichte Verkürzung, die Thromboplastinzeit blieb im Verlauf weitestgehend konstant. Die beschriebenen Veränderungen von FSAP korrelierten also mit keiner messbaren Änderung von Quick, PTT oder Fibrinogen. Zusammenfassend zeigt FSAP ein ähnliches, wahrscheinlich hormoninduziertes, Verhalten in der SS wie viele andere Gerinnungsenzyme auch.

## **4.2. Grund der Studiendurchführung**

Als physiologisch thrombophiler Zustand ist die Schwangerschaft ein einzigartige Möglichkeit die Veränderungen der Gerinnung, Fibrinolyse und des Gefäßsystems im Rahmen einer sich entwickelnden Hyperkoagulabilität zu untersuchen. Zum einen muss ein kontinuierlicher Blut- und Versorgungsstrom zur sich entwickelnden utero-plazentaren Einheit sichergestellt sein, zum anderen ist ein plötzliches Stoppen dieses Blutflusses zum Zeitpunkt der Entbindung lebensnotwendig für Mutter und Kind. Es kommt zu einem Anstieg der meisten Gerinnungsfaktoren und zu einer Gerinnungsaktivierung. Zudem sichert eine ebenso aktivierte Fibrinolyse den ungestörten systemischen Blutfluss, wohingegen in der Plazenta erhöht vorliegende Fibrinolyseinhibitoren die Integrität der Schwangerschaft sichern. Trotz der Kenntnisse dieser Vorgänge macht eine nachwievor hohe mütterliche Mortalität auf Grund venöser Thrombosen und Lungenembolien weitere Studien notwendig, um diese Zahl vermeidbarer perinataler Todesfälle zu minimieren.

FSAP ist ein kürzlich entdecktes, im humanen Plasma als Prekursor zirkulierendes Enzym, das zur Familie der Serinproteasen gehört. Es wird durch Glykosaminoglykane, mRNA und Autokatalyse aktiviert und entfaltet über Aktivierung des Gerinnungsfaktors VII, scu-PA und Hemmung der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen seine vielschichtigen Funktionen. Das Verhalten von FSAP in der Schwangerschaft wurde bisher nicht untersucht, es existieren keine Normalwerte für Schwangere. Die vorliegende Studie erfasste bei einer Studienpopulation von 101 gesunden schwangeren Frauen den Antigengehalt, die Aktivität und den DNA-Status von FSAP im Verlauf der Schwangerschaft und nach der Entbindung, sowie

allgemeine Gerinnungsanalysen und klinische Ereignisse (wie Abort, Thrombose oder Eklampsie).

Die individuelle Einschätzung des Thromboserisikos einer Schwangeren ist umfangreich, kostenaufwändig und ohne klare Zielsetzung ineffizient. Daher ist eine Aufdeckung aller zur Wahrung des Gleichgewichts zwischen Gerinnung und Fibrinolyse in der Schwangerschaft beitragenden Faktoren wichtig und muss durch Studien vorangetrieben werden. Im Rahmen der optimalen und individuellen Risikostratifizierung jeder schwangeren Frau, ist ein detailliertes Verständnis der Veränderungen des Gerinnungssystems notwendig. Das in der vorliegenden Studie untersuchte Verhalten von FSAP in der Schwangerschaft ist ein weiterer Baustein zur Vervollständigung dieses Bildes und wurde bislang nicht untersucht.

### **4.3. Ergebnisse im Einzelnen**

#### **4.3.1. DNA-Analyse**

Die durchgeführte Studie ergab in der Studienpopulation von 101 Schwangeren eine Häufigkeit der Marburg I Mutation von 4.95%. Die Mutationsfrequenz stimmte mit der aus anderen Studien überein. Es wurden nur heterozygote Trägerinnen identifiziert. Die Enzymaktivität der Mutationsproben zeigte die typische um 50-80% reduzierte Fähigkeit scuPA zu aktivieren, während die Antigenlevel nicht signifikant erniedrigt waren. 0.4% der Marburg I Trägerinnen wiesen zusätzlich die Marburg II Mutation auf. Die Enzymaktivität dieser Plasmaproben war nicht zusätzlich erniedrigt. Vor dem Hintergrund der bekannten klinischen Auswirkungen der Marburg I Mutation, wie Exazerbation fortgeschrittener Atherogenese (46,96) und Erhöhung des Risikos einer tiefen Venenthrombose (32,40,41), wurden die Mutterpässe der Probandinnen auf mögliche klinische Zusammenhänge untersucht. Die 5 Mutationsträgerinnen zeigten keinerlei gerinnungsassoziierte klinische Probleme wie Thrombose, Lungenembolie oder Aborte. Jedoch hatten 20% der Marburg I Trägerinnen ein totes oder geschädigtes Kind in der Eigenanamnese, eine genaue Differenzierung der Schädigung wurde nicht durchgeführt. Im Einzelnen dominierte in der Gruppe der Mutanten die Blutgruppe 0 Rhesus positiv (60%), in der Wildtypgruppe A Rhesus positiv (43%). Alter und Gewicht zu Beginn der Schwangerschaft unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. Der niedrigste Hämoglobinwert im Schwangerschaftsverlauf lag mit 8.8 g/dl in der Mutantengruppe unter dem der

Wildtypgruppe. Als typische Auswirkung der schwangerschaftsinduzierten Hypervolämie ist dies kaum als spezifische Mutationsauswirkung zu werten. Obwohl 60% der Mutanten älter als 35 Jahre waren und somit ein generell höheres Risiko schwangerschaftsassoziierter Probleme hat, traten keine Zwischenfälle auf. Das Fehlen signifikanter Zusammenhänge zwischen Vorliegen der Mutation und dem Auftreten klinischer Symptome ist bei der niedrigen Fallzahl äußerst kritisch zu sehen und ist kaum verwertbar. Zusammenfassend hatte die zu einem Amnosäureaustausch, nahe dem aktiven Enzymzentrum, führende Mutation Marburg I keine erfassten Auswirkungen auf die Schwangerschaft, die Entbindung, das Neugeborene und das Wochenbett. Die verminderte Fähigkeit scuPA zu aktivieren scheint daher zumindest keine schwerwiegenden klinischen Folgen zu haben. Die 2 Frauen mit zusätzlicher Marburg II Mutation hatten ebenfalls keinerlei Probleme. In der Bruneckstudie zeigte sich die Marburg I Mutation als ein unabhängiger Risikofaktor für fortgeschrittene Atherogenese (96). Dagegen ist die Marburg I Mutation bisher nicht sicher mit einem erhöhten venösen Thromboserisiko vergesellschaftet (32), was einen in vivo eher profibrinolytischen Schwerpunkt des Enzyms vermuten lässt. Zur Zeit ist es nicht möglich eine sichere Aussage zu den Auswirkungen der Mutation für den Träger zu treffen. Man kann beim Auftreten der Mutation, trotz deutlicher Verminderung des fibrinolytischen Potentials, bisher nicht von einer hereditären Thrombophilie wie der Prothrombinmutation oder APC-Resistenz sprechen. Möglicherweise kommt es erst bei homozygoter Ausprägung der Mutation zu relevanten klinischen Auswirkungen.

#### **4.3.2. Quick, PTT, Fibrinogen**

Die Thromboplastinzeit als Test des klassischen Extrinsic-Systems misst vor allem die Aktivität der Faktoren II, VII und X. Weniger empfindlich erfasst er auch Faktor V und Fibrinogen. Im Verlauf der Schwangerschaft zeigte dieser Test keine signifikante Veränderungen. Es kam lediglich zu einem leichten Anstieg mit einem Maximum von 112% in der Wildtypgruppe im Wochenbett. Alle Werte lagen innerhalb des zugrunde gelegten Normbereiches von 70-130% . Die Werte der Wildtypgruppe lagen leicht unter denen der Mutationsgruppe, die Unterschiede waren nicht signifikant. Die Marburg I Mutation schwächt hauptsächlich die Fähigkeit scuPA zu aktivieren, die



F VII-Aktivierungspotenz bleibt normal. Andere Arbeitsgruppen berichten über eine Verkürzung der Prothrombinzeit bei Zugabe von FSAP zu Plasma. Daher lassen sich die etwas höheren Quickwerte in der Mutationsgruppe durchaus erklären. Die meisten Arbeitsgruppen berichten ebenfalls über einen leichten Anstieg des Quickwertes im Verlauf der Schwangerschaft, was sich durch erhöhte Spiegel der Gerinnungsfaktoren erklären lässt (87). Zudem bewirkte die Zugabe des intakten Enzyms im Thrombelastogramm einen beschleunigten Beginn der Gerinnung (erhöhter Quick, verkürzte aPTT, erhöhtes Fibrinogen) und eine beschleunigte Clotlyse, hauptsächlich durch scuPA-Aktivierung durch FSAP (74,75). Die Beobachtungen fügen sich also in die bisherigen Literaturangaben ein.

Als zweiter Standardtest der Globalgerinnung wurde die aktivierte partielle Thromboplastinzeit bestimmt. Sie ist in erster Linie abhängig von den Faktoren VIII, IX, XI und XII. Es konnte eine signifikante Verkürzung der aPTT im Verlauf der SS beobachtet werden. Trotzdem lagen alle Werte im Normbereich Nichtschwangerer von 25 bis 36 Sekunden. Die Unterschiede zwischen Wildtyp- und Mutantengruppe waren nicht signifikant. In der Wildtypgruppe fielen die Werte von 32 Sekunden im 1. Trimester bis auf 29 Sekunden direkt postpartal ab. In der Mutationsgruppe fällt die aPTT vom 1. zum 2. Trimester um 2 Sek., im Wochenbett erreichen sie mit 25 Sek. den niedrigsten Wert. Diese Veränderungen stimmen mit denen der Literatur entnommen überein (87) und zeugen von einer Zunahme der Faktoren V, VIII, X und XII.

Die Fibrinogenkonzentration bestimmt die Plasmaviskosität, die mit steigenden Fibrinogenkonzentrationen zunimmt. Zudem ist das Glykoprotein ein Akute-Phasen-Protein. Die gemessenen Fibrinogenwerte stiegen im Verlauf der SS kontinuierlich an und lagen teilweise deutlich über dem Normbereich von 2.5 bis 4 g/l Nichtschwangerer. Die Unterschiede zwischen Wildtyp- und Mutationsgruppe waren nicht signifikant. In der Wildtypgruppe stieg die Konzentration vom 1. zum 3. Trimester um 1.7 g/l an und blieb bis zur Wochenbettentnahme konstant bei 5 g/l. Damit lagen die Werte postpartal um 50% über der Norm. In der Mutationsgruppe lagen die Konzentrationen erst ab dem 3. Trimester 20% über der Norm. Mehrere Arbeitsgruppen beobachteten ebenfalls ansteigende Fibrinogenkonzentrationen in der SS und erklären dies teilweise mit der durch erhöhte Östrogenspiegel induzierten gesteigerten Fibrinogensyntheserate von Leberparenchymzellen (10,51,52,88). Diese Steigerung ist physiologisch und ohne pathologische Auswirkungen.

### 4.3.3. FSAP-Antigen

Die FSAP-Antigenlevel im Plasma sind Ausdruck der Enzymproduktion in der Leber und abhängig vom Verbrauch und der Verteilung des Proteins in der Peripherie. Im Verlauf der Schwangerschaft kam es in beiden Gruppen zu einem kontinuierlichen und signifikanten ( $p < 0.0001$ ) Anstieg der Antigenkonzentrationen. Die immunhistochemisch nachgewiesene FSAP-Produktion in der Plazenta (53) ist eine mögliche Erklärung hierfür. Alle Werte lagen deutlich über denen der weiblichen Kontrollgruppe. Auch nach Entbindung näherten sich die Werte nur langsam den Normalwerten und lagen zum Zeitpunkt der späten Wochenbettphase noch darüber. Zudem lagen die Werte der Wildtypgruppe signifikant über denen der Mutationsgruppe. In der Wildtypgruppe stieg der Antigenlevel ausgehend von 1422 mPEU/ml im 1. Trimester auf maximal 2002 mPEU/ml im 3. Trimester. In der Mutationsgruppe folgten die Werte derselben Dynamik im Schwangerschaftsverlauf, liegen aber insgesamt über denen der Mutationskontrollgruppe, jedoch unter denen der Wildtypgruppe. Ausgehend von 1086 mPEU/ml im 1. Trimester steigen die Werte auf maximal 1588 mPEU/ml im 3. Trimester. Nach Entbindung nähern sich die Werte langsam den Normalwerten an. Diese Ergebnisse widersprechen denen der Arbeitsgruppe Römisch (76,77,78), dort waren die Antigenlevel der Träger der Marburg I Mutation gegenüber der Wildtypgruppe nicht erniedrigt. Da unsere Mutationsgruppe trotzdem den typischen Anstieg im Verlauf der SS und Abfall postpartal zeigte, dürfte der hormonelle Regelkreis zur Enzyminduktion intakt sein. Aber das Ausmaß fällt möglicherweise auf Grund der Mutation geringer aus, es kommt zu erniedrigten Antigenleveln. FSAP zeigt also in der Schwangerschaft und im Wochenbett einen ähnlichen Verlauf wie viele andere Gerinnungsenzyme. Daher liegt eine hormonelle Induktion der FSAP-Syntheserate in der Leber nahe, wobei dies bisher nicht bewiesen ist. Die verminderten Antigenlevel in der Gruppe mit Marburg I Mutation lassen sich durch verminderte Synthese oder gesteigerten Verbrauch des Enzyms erklären. Möglicherweise wird das Protein auch primär als fehlerhaft in der Struktur erkannt und „aussortiert“. Oder das zugehörige, veränderte Gen kodiert für eine niedrigere Proteinsyntheserate, was niedrigere Antigenpiegel zur Folge hat. Die nicht nachweisbaren signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen der Mutation und messbaren Auswirkungen auf Globalgerinnungstests lässt sich einerseits durch die geringe Fallzahl erklären. Andererseits liegt eine

funktionierende komplexe Kompensierung des Gendefekts durch andere Regelkreisläufe der Gerinnung und Fibrinolyse nahe, die klinische Auswirkungen verhindert.

#### **4.3.4. FSAP Aktivität**

Im Verlauf der SS kam es zu einem signifikanten, bis zu dreifachen Anstieg der Aktivitätslevel im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem waren die Werte der Mutationsgruppe signifikant niedriger als die der Wildtypgruppe, im 1. Trimester erreichte die Signifikanz dabei  $p=0.0002$ . In der Wildtypgruppe stiegen die Werte ausgehend von 1626 mPEU/ml auf ein Maximum von 3249 mPEU/ml im 2. Trimester. Die Werte der Wildtypkontrollgruppe liegen mit  $1032 \pm 178$  mPEU/ml weit darunter. Auch zum Zeitpunkt der späten Wochenbettentnahme lagen die Werte mit 2032 mPEU/ml noch weit über denen nichtschwangerer Frauen. In der Mutationsgruppe zeigten die Werte eine ähnliche Dynamik, lagen aber insgesamt signifikant unter denen der Wildtypgruppe. Ausgehend von 542 mPEU/ml stiegen sie auf maximal 1233 mPEU/ml im 2. Trimester. Die Enzymaktivität lag im gesamten Untersuchungszeitraum deutlich über den Werten nichtschwangerer Frauen. Die Gründe dieser gesteigerten Aktivität während der SS sind nicht geklärt. Östrogen und Progesteron könnten ebenso wie das allgemeine Gerinnungssystem zur Aktivierung von FSAP beitragen. Dies erklärt auch die allgemein höheren FSAP-Antigen- und Aktivitätslevel bei Frauen (77). Ebenso wie der Fibrinolyseinhibitor PAI-2, dessen Enzymlevel nur in der Schwangerschaft messbare Konzentrationen erreichen, könnte die gesteigerte FSAP-Synthese eine Anpassung an die aktivierte Gerinnung während der Schwangerschaft sein. PAI-2 gehört ebenso wie FSAP zur Familie der Serinproteasen und steigt von 0-2 ng/ml zu Beginn der Schwangerschaft auf über 100 ng/ml am Termin an. Das Enzym wird ausschließlich in der Plazenta produziert (3,64). PAI-2 trägt höchstwahrscheinlich zur Aufrechterhaltung der veränderten Gerinnungshomöostase in der SS bei. Die spezielle Rolle von FSAP in diesem Gleichgewicht ist noch unklar. Das Enzym unterliegt einer sehr effizienten Autoaktivierung (25), welche z.B. durch Hyaluronsäure, Dextransulfate und extrazelluläre RNA beschleunigt werden kann (13,14, 62). Möglicherweise kommt es mit fortschreitender Schwangerschaft zu zunehmenden Gefäßmikrotraumata, was sich an erhöhten Thrombomodulinspiegeln erkennen lässt (21). Dies führt evtl. zur

RNA-Freisetzung und so zu einer gesteigerten FSAP-Aktivierung. Die Bindungsstellen für RNA sind die EGF2- und EGF3-Domänen des Enzyms (2). Die Marburg I Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch nahe dem aktiven Zentrum und dürfte die RNA-Bindung daher nicht beeinflussen. Allerdings ist die dreidimensionale Struktur der EGF3-Domäne essentiell für die RNA-Bindung (2) und diese wird durch die Mutation möglicherweise zerstört. Dies ist ein möglicher Erklärungsansatz für die verminderte FSAP-Aktivität bei schwangeren Mutationsträgerinnen.

#### **4.3.5. Aktivität/ Antigen-Ratio**

Das Verhältnis von FSAP-Aktivität (mPEU/ml) zu FSAP-Antigen (mPEU/ml) veranschaulicht das unterschiedliche Verhalten dieser beiden ermittelten Werte. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg ( $p < 0.0001$ ) der Ratio im Verlauf der SS. Dabei steigt die Aktivität in stärkerem Ausmaß, als das Antigen. In der Wildtypgruppe zeugen die Werte im 1. Trimester von einem fast ausgeglichenen Verhältnis von Enzymproduktion zu -aktivität, die Ratio liegt bei 1.1. Das Maximum der Aktivität wird im 2. Trimester erreicht, wobei das Antigen in geringerem Ausmaß ansteigt. Daher ist zu dem Zeitpunkt der Unterschied am ausgeprägtesten, die Ratio liegt bei 1.8. Zum Ende des Wochenbetts ist das Verhältnis wieder nahezu ausgeglichen, die Aktivität ist stark gesunken, die Ratio beträgt 1.3. Die Mutantengruppe zeichnet sich durch eine stark supprimierte Aktivität bei fast normalem Antigengehalt aus. Die Ratio verdeutlicht das. Ausgehend von 0.6 im 1. Trimester erreicht sie maximal 0.8 im 2. Trimester. Der Regelkreis der gesteigerten Enzymproduktion scheint also trotz Mutation zu funktionieren. Aber die normalen Antigenlevel führen durch Veränderung des aktiven Zentrums nicht annähernd zu einer derart gesteigerten Aktivität, wie in der schwangeren Wildtypgruppe.

#### **4.3.6. Mutterpassauswertung**

Die im Mutterpass erfassten Parameter und Merkmale zeigten keine außergewöhnlichen Häufigkeitsverteilungen in der Studienpopulation. Bezüglich der

erhobenen Merkmale konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wildtyp- und der Mutationsgruppe festgestellt werden. Frauen mit gerinnungsassoziierten Auffälligkeiten wie Abort, Blutungs- oder Thromboseneigung zeigten keine Korrelation zur Marburg I Mutation oder abnormen FSAP-Werten. In der Gruppe der Mutanten ließ sich keine Häufung von Aborten oder Thrombosen nachweisen. Dieser fehlende rechnerische Zusammenhang muss vor dem Hintergrund der niedrigen Fallzahl mit Zurückhaltung interpretiert werden. Bei 4 Frauen (3.9%), alles Wildtypen, trat ein intrauteriner Fruchttod auf, sie schieden daher nach der 1. Blutentnahme aus der Studie aus. Die Häufigkeit der intrauterinen Fruchttode wird in gängigen gynäkologischen Lehrbüchern mit bis zu 1% angegeben. Die Häufung in der Studienpopulation ist zufällig. Vergleicht man die im 1. Trimester erhobenen Daten der Gruppe mit stattgehabtem missed abortion und der ohne Probleme, so ergeben sich keine signifikanten Auffälligkeiten. Insbesondere keine Korrelation zu abnormen FSAP-Werten. FSAP-Antigen und –Aktivität der missed abortion-Gruppe lagen nur leicht über den Werten der restlichen 97 Schwangeren. Über den weiteren Enzymverlauf lässt sich leider keine Aussage treffen. Es sind eine Reihe hereditärer Blutgerinnungsdefekte bekannt, die zu einer erhöhten Abortneigung führen. Dazu gehören u.a. die Faktor-V-Leiden-Mutation, der Protein-C- oder S-Mangel und die Prothrombinmutationen. Alle diese Defekte führen zu einer Hyperkoagulabilität und somit zu einem gestörten Gleichgewicht in der utero-plazentaren Einheit, was letztendlich zum Absterben des Kindes führen kann. Ob FSAP bzw. seine mutierte Form auf diese Vorgänge einen entscheidenden Einfluss hat, ist bisher nicht sicher bewiesen, aber auf Grund seiner Eigenschaften wahrscheinlich. Eingehende Studien mit gezielt ausgewählten Risikoschwangeren sind notwendig, um das Verhalten und den Stellenwert von FSAP sicher beurteilen zu können.

#### **4.3.7. Immunhistochemie**

In den immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich vor allem eine positive intrazytoplasmatische Reaktion der FSAP-spezifischen Antikörper. Dies kann durch denovo Synthese von FSAP in den betreffenden Organen, oder durch Ablagerung des zirkulierenden Enzyms bedingt sein. Von besonderem Interesse, vor dem Hintergrund des unklaren FSAP-Anstiegs in der SS, waren die

Gewebeuntersuchungen von Plazenta und Eihäuten. Dort zeigte sich im Chorionepithel und den Deziduazellen die stärkste Reaktion. Ebenso in allen Anteilen der Eihäute. Diese Ergebnisse lassen eine zusätzliche Enzymproduktion in der Plazenta vermuten und erklären die gesteigerten Antigenlevel in der SS. Das Enzym wird möglicherweise lokal produziert und steuert in der utero-plazentaren Einheit das sensible Gerinnungsgleichgewicht zum Erhalt der Schwangerschaft. Auf Grund der hohen Affinität des Enzyms zu geladenen Oberflächen, ist eine lokale, zellulär gebundene Funktion anzunehmen. So zeigte eine immunhistochemische Untersuchung eine starke Expression von FSAP in der Neointima und Media beschädigter oder atherosklerotischer Arterien. Das Enzym entfaltet dort möglicherweise seine antiproliferative Wirkung auf proatherogene glatte Muskelzellen (48). Die dort in hoher Konzentration vorliegende RNA ist ein effizienter Kofaktor der Autokatalyse von FSAP (62). So könnten lokale Faktoren das Enzym an den Ort wo seine Funktion benötigt wird locken und so durch Interaktion mit der Umgebung seine prokoagulatorischen oder –fibrinolytischen Eigenschaften je nach Bedarf steuern. Da FSAP über Aktivierung von u-PA und Proteinen der Extrazellulärmatrix in die Vorgänge des Gewebsumbaus und der Migration eingreift, spielt es vielleicht eine ebenso bedeutende Rolle in der plazentaren Entwicklung wie die durch PAI-2 gesteuerte u-PA-Kaskade.

#### **4.4. Zusammenfassung und Ausblick**

Die erste Studie zum Verhalten von FSAP in der SS ergab signifikant höhere Werte für FSAP-Antigen und Aktivität im Vergleich zur nichtschwangeren Kontrollgruppe, die Aktivitätslevel waren dabei stärker erhöht. Zudem kam es im Verlauf der Schwangerschaft zu einem signifikanten Anstieg der Werte für FSAP-Antigen und Aktivität, mit einem Maximum im 3. Trimester. Nach der Entbindung zeigte sich eine Normalisierung der Werte innerhalb von 4 Wochen postpartal. Dies ist ein ähnliches Enzymverhalten, wie das der meisten anderen Gerinnungsenzyme in der SS. Die Frequenz der Marburg I Mutation in der Studienpopulation lag mit 4.95% innerhalb der für die Kontrollgruppe ermittelten Häufigkeitsverteilung. Die schwangeren Mutationsträgerinnen zeigten ebenso wie die Kontrollgruppe eine bis zu 50% reduzierte Enzymaktivität, bezogen auf die scu-PA-Aktivierung. Keine der 5 Mutationsträgerinnen wies eine klinisch erfasste Pathologie während der

Schwangerschaft oder im Wochenbett auf. Es konnte keine Korrelation zwischen der Mutation und der Abortrate, Thromboseinzidenz oder anderen Problemen festgestellt werden.

Die Erklärungen für diese Beobachtungen sind bisher nur teilweise gesichert. Eine zusätzliche Produktion des Enzyms in der Plazenta erscheint angesichts der nachgewiesenen plazentaren Expression von FSAP wahrscheinlich und erklärt die gesteigerten Antigenlevel. Im Rahmen des in der Schwangerschaft herrschenden prokoagulatorischen Zustandes kommt es möglicherweise zu einer physiologischen Aktivitätssteigerung des Enzyms. Zur Regulation der Funktion von FSAP tragen höchstwahrscheinlich vaskuläre Proteaserezeptoren entscheidend bei. FSAP entfaltet in der Schwangerschaft, getriggert durch lokale Umgebungseinflüsse wie freie RNA, negativ geladene Oberflächen, Inhibitoren und hohe Konzentrationen an prokoagulatorischen Enzymen in der Schwangerschaft eine hauptsächlich profibrinolytische Funktion. Die Unterstützung der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, ohne blutungsbedingte Abstoßung und Auflösung von Gewebsverbänden, durch FSAP scheint vor dem Hintergrund der gesteigerten Enzymaktivität plausibel. Die hohen Enzymkonzentrationen in der Plazenta sichern per Aktivierung der uPA-Kaskade die durch Zellinvasion und Gefäßentwicklung gekennzeichnete Entwicklung der utero-plazentaren Einheit. Nach Entbindung fallen sowohl Antigen-, als auch Aktivitätslevel von FSAP wieder auf das Niveau der nichtschwangeren Frauen ab, die zusätzliche Synthese der Plazenta fällt nun weg. Möglicherweise entfaltet das Enzym in der Schwangerschaft auf Grund veränderter Konzentration, Aktivität und Umgebungsbedingungen zudem eine anders gewichtete Funktion, als im Plasma nichtschwangerer Frauen und Männer. Die Fähigkeit von FSAP FVII unabhängig von Tissue factor zu aktivieren, wird evtl. nur bei niedrigen TF-Konzentrationen getriggert, um die zelluläre Gerinnung zu unterstützen. Möglicherweise zirkuliert auch ein spezifischer FSAP-Inhibitor, zum Beispiel C1-Inhibitor der die Funktionen des Enzyms je nach lokalem Bedarf steuert. Ob die zur beeinträchtigten Fibrinolyse führende Marburg I Mutation dieses Gleichgewicht nachhaltig stört, bleibt zu untersuchen. Möglicherweise treten erst bei homozygoter Ausprägung der Marburg I Mutation ernsthafte klinische Probleme bei den Trägern auf. Auf Grund der relativ niedrigen Prävalenz ist eine großangelegte Studie notwendig. Die Mutation könnte sich durch negative Auswirkungen auf die Plazentaentwicklung als ein Risikofaktor für rezidivierende Aborte herausstellen und

eine Therapie mit antikoagulativen Medikamenten oder rekombinatem FSAP während der Schwangerschaft notwendig machen.

Das pränatale Screening zur Erfassung des mütterlichen Risikos eine schwangerschaftsassozierte Thrombose zu erleiden sollte in Zukunft klarer strukturiert und standardisiert werden, um alle relevanten prothrombotischen Marker zu erfassen und so die Mortalität effektiv senken zu können. Alle Schwangeren sollten daher idealerweise zu Beginn der Schwangerschaft einer thrombophilen Risikoeinschätzung unterzogen werden. Der Versuch die mütterliche schwangerschaftsassozierte Mortalität zu senken, beinhaltet bereits die Formulierung von Richtlinien zur Risikostratifizierung und Therapiempfehlung durch die RCOG (Royal College of Obstetricians and Gynaecologists) 2003. Danach sollen Frauen mit 3 oder mehr Risikofaktoren antenatal prophylaktisch LMWH bis zum 3. postpartalen Tag bekommen (22). Ebenso sollten Frauen mit rezidivierenden SS-Verlusten, Fehlgeburten und intrauterinem Fruchttod, rezidivierender Präeklampsie und IUGR gescreent werden (31). Für hereditäre Thrombophilien, wie Protein C oder S Defizit, Faktor V Leiden, Prothrombinmutation und Antiphospholipid-Antikörpersyndrom existieren genaue Zahlen des Thromboembolierisikos in Schwangerschaft und Wochenbett. Diese müssen für die Marburg I Mutation in weiteren klinischen Studien definiert werden, um sie in die Vorsorge integrieren zu können.

#### **4.5. Summary**

Normal pregnancy is associated with profound physiological changes in the hemostatic system. Recently, a novel plasmatic serine protease, named factor seven activating protease (FSAP), has been recognized as a novel potent activator of pro-urokinase-dependent fibrinolysis. The primary purpose of the present study was to determine the changes in FSAP in each of the trimesters of normal pregnancy and to establish normal "reference values" in healthy pregnant women by comparison with a nonpregnant population. The secondary objective was to evaluate the prevalence of the Marburg I polymorphism in healthy pregnant women, a polymorphism in the FSAP gene known to exhibit reduced activity in pro-urokinase activation. Finally we performed immunostaining of FSAP to elucidate whether FSAP occurs in normal placenta.



We found that both FSAP antigen and FSAP activity plasma levels markedly increase during pregnancy, attaining peak plasma levels in the 3<sup>rd</sup> trimester. After delivery, FSAP levels decline but remain above the level of non-pregnant women for several weeks in the puerperium. In the study cohort of 101 pregnant women we found 5 women heterozygous for the FSAP Marburg I polymorphism. Therewith, the FSAP polymorphism carriage rate observed in pregnant women is in the range of the recently assumed frequency of 5-10% in caucasians. Pregnant Marburg I carriers were shown to exhibit a substantially diminished pro-urokinase activating potency in vitro. None of the pregnant Marburg I carriers suffered from thrombotic or other complications during pregnancy or puerperium. Nevertheless, as the small number of subjects with FSAP polymorphism remains a limitation of the present study, further epidemiological studies are required to elucidate whether female carriers of the polymorphism face a higher risk of thrombotic or other pathological events during pregnancy. As reported by other investigators, the co-segregation of the Marburg II polymorphism (found in 2 of the 101 pregnant women) had no in vitro effects on fibrinolytic activity. The physiological role of FSAP in normal pregnancy is still speculative. As an activator of plasma factor VII on the one hand, and of pro-urokinase on the other hand, FSAP might contribute to the control of the systemic hemostatic balance during pregnancy. Which of both hemostatic pathways is promoted is proposed to be regulated locally. In the present study we found FSAP present on trophoblast cells. In these cells also the urokinase type plasminogen activators are abundantly expressed. Urokinase, however, is the only protease, out of all proteases studied so far, identified to be a potential physiological activator of FSAP. Thus, the co-localization of FSAP and uPA in human trophoblasts provides might provide the equivalent of an "autocrine" loop that enhances fibrinolysis in the placenta. The high expression of FSAP observed on trophoblast cells further supports new concepts of how coagulation/fibrinolysis at the fetomaternal interface is essential for the maintenance of pregnancy. Further studies have to clarify whether the rise in FSAP is essential for the maintenance of the systemic hemostatic equilibrium in pregnant women and whether the marburg I mutation could be a riskfactor for recurrent abortion.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Aaro LA, Juergens JL.  
Thrombophlebitis associated with pregnancy.  
American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1971;109:1128-1133.
2. Altincicek B, Shibamiya A, Trusheim H, Tzima E, Niepmann M, Linder D, Preissner KT, Kanse SM.  
A positively charged cluster in the epidermal growth factor-like domain of Factor VII-activating protease (FSAP) is essential for polyanion binding.  
The Journal of Biochemistry. 2006 ; 394 (Pt 3):687-692.
3. Aoki N, Harpel PC.  
Inhibitors of the fibrinolytic enzyme system.  
Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 1984;10:24-41.
4. Bajzar L., Jain N, Wang P, Walker J.  
Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: Not just an inhibitor of fibrinolysis.  
Critical Care Medicine. 2004;Vol. 32, No. 5 (Suppl.).
5. Barbour LA, Pickard J.  
Controversies in thromboembolic disease during pregnancy: a critical review.  
Obstetrics and Gynaecology. 1995; 86(4 Pt 1): 621-633.
6. Bellart J, Gilabert R, Fontcuberta J, Borrell M, Miralles RM, Cabero L.  
Fibrinolysis changes in normal pregnancy.  
Journal of Perinatal Medicine. 1997;25:368-372.
7. Belo L, Santos-Silva A, Rumley A, Lowe G, Pereira-Leite L, Quintanilha A, Rebelo I.  
Elevated tissue plasminogen activator as a potential marker of endothelial dysfunction in pre-eclampsia: correlation with proteinuria.  
British Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2002; Vol. 109: 1250-1255.

8. Bergqvist A, Bergqvist D, Hallböök T.  
Deep vein thrombosis during pregnancy: A prospective study.  
*Acta Obstetrica and Gynecologica Scandinavica*. 1983;62:443-448.
9. Booth NA.  
Regulation of fibrinolytic activity by localization of inhibitors to fibrin(ogen).  
*Fibrinolysis and Proteolysis*. 2000;14:206-13.
10. Bremme KA.  
Haemostatic changes in pregnancy.  
*Best Practice and Research Clinical Haematology*. 2003; Vol.16, No 2, pp. 153-168.
11. Butenas S, Mann K.G.  
Blood Coagulation, Review.  
*Biochemistry*. 2002;Vol. 677, No. 1, pp. 3-12.
12. Choi-Miura NH, Otsuyama K, Sano Y, Saito K, Takahashi K, Tomita M.  
Hepatic injury-specific conversion of mouse plasma hyaluron binding protein to the active hetero-dimer form.  
*Biology and Pharmacology Bulletin*. 2001, 24(8):892-896.
13. Choi-Miura NH, Yoda M , Saito K, Takahashi K, Tomita M.  
Identification of the substrates for plasma hyaluron binding protein.  
*Biology and Pharmacology Bulletin*. 2001, 24(2): 140-143.
14. Choi-Miura NH, Saito K, Takahashi K, Yoda M, Tomita M.  
Regulation mechanism of the serine protease activity of plasma hyaluron binding protein.  
*Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2001, 24(3): 221-5.
15. Choi-Miura NH, Tobe T, Sumiya J, Nakano Y, Sano Y, Mazda T, Tomita M.  
Purification and characterisation of a novel hyaluron-binding protein (PHBP) from human plasma: it has three EGF, a kringle and a serine protease domain, similar to hepatocyte growth factor activator.

Journal of Biochemistry (Tokyo). 1996, 119(6): 1157-65.

16. Coll MD, Ramsay JE, Tait RC, Walker ID, McCall F, Conkie JA, Carty MJ, Greer IA.  
Risk factors for pregnancy associated venous thromboembolism.  
Thrombosis and Haemostasis. 1997;78:1183-1188.
17. Cumming AM, Tait RC, Fildes S, Yoong A, Keeney S, Hay CRM.  
Development of resistance to activated protein c during pregnancy.  
British Journal of Haematology. 1995;90:725-727.
18. Dalaker K, Prydz H.  
The coagulation factor VII in pregnancy.  
British Journal of Haematology. 1984; 56: 233-241.
19. Dalaker K, Ingebretsen OC, Rasmussen S, Berge LN, Prydz H.  
Phospholipase c-sensitive factor VII activity in normal pregnancy.  
Acta Obstetrica Gynecologica scandinavica. 1990, 69: 111-114.
20. Davie EW, Ratnoff OD.  
Waterfall sequence for intrinsic blood clotting.  
Science. 1964;145: 1310-1312.
21. DeMoerloose P, Mermillod N, Amiral J, Reber G.  
Thrombomodulin levels during normal pregnancy, at delivery and in the postpartum: comparison with tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1.  
Thrombosis and Haemostasis. 1998; 79: 554-556.
22. Drife J.  
Thromboembolism.  
British Medical Bulletin. 2003; 67: 177-190.
23. Etscheid M, Beer N, Seitz R, Dodt J.  
Regulation of the hyaluron-binding serine protease from human plasma.

GTH Febr. 2002.

24. Etscheid M, Beer N, Fink E, Seitz R, Dodt J.  
The hyaluron-binding serine protease from human plasma cleaves HMW and LMW kininogen and releases bradykinin.  
Journal of Biological Chemistry. 2002, 383: 1633-1643.
25. Etscheid M, Hunfeld A, König H, Seitz R, Dodt J.  
Activation of proPHBSP, the zymogen of a plasma hyaluron binding serine protease, by an intermolecular autocatalytic mechanism.  
Journal of Biological Chemistry. 2000, 381: 1223-1231.
26. Etscheid M, Hunfeld A, Beer N, Reimann V, Seitz R, Dodt J.  
Characterisation of a novel serine protease from plasma.  
Annals of Hematology. 1999, 78: A42.
27. Farlane RG.  
An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier.  
Nature. 1864;202:498-499.
28. Franchi F, Martinelli I, Biguzzi E, Bucciarelli P, Mannucci PM.  
Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease and risk of venous thromboembolism.  
Blood. 2006; 107(4):1731.
29. Greer IA.  
The special case of venous thromboembolism in pregnancy.  
Haemostasis. 1998;28:Suppl 3:22-34.
30. Greer IA.  
Thromboembolic problems in pregnancy.  
Fetal Medicine Review. 1989;1:79-103.
31. Greer IA.

- Thrombosis in pregnancy: maternal and fetal issues.  
Lancet. 1999; 353: 1258-1265.
32. Gulesserian T, Hron G, Endler G, Eichinger S, Wagner O, Kyrle PA.  
Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease and risk of recurrent venous thromboembolism.  
Thrombosis and Haemostasis. 2006, 95(1): 65-67.
  33. Hashimoto K, Tobe T, Sumiya J, Saguchi K, Sano Y, Nakano Y, Choi-Miura NH, Tomita M.  
Cloning of the cDNA for a mouse homologue of human PHBP: a novel hyaluron-binding protein.  
Biological and Pharmaceutical Bulletin. 1997, 20(11):1127-1130.
  34. Hellgren M, Blombäck M.  
Studies on blood coagulation and fibrinolysis in pregnancy, during delivery and in the puerperium.  
Gynecologic and Obstetric Investigation. 1981;12:141-154.
  35. Hellgren M.  
Hemostasis during normal pregnancy and puerperium.  
Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 2003; Vol. 29, No. 2:125-130.
  36. Higgins JR, Walshe JJ, Darling MR, Norris L, Bonnar J.  
Hemostasis in the uteroplacental and peripheral circulations in normotensive and pre-eclamptic pregnancies.  
American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1998 ;179(2):5209-6.
  37. Hoffman M, Monroe DM 3rd.  
A cell-based model of hemostasis.  
Thrombosis and Haemostasis. 2001;85:958-965.
  38. Hoffman MD, PhD.  
Remodeling the Blood coagulation cascade.  
Journal of Thrombosis and Thrombolysis. 2003; 16(1/2), 17-20.

39. Holmes VA, Wallace JM.  
Haemostasis in normal pregnancy: a balancing act?  
Biochemical Society Transactions. 2005 ;33(Pt 2):428-32.
40. Hoppe B, Dorner T, Kiesewetter H, Salama A.  
Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease and risk of recurrent venous thromboembolism.  
Thrombosis and Haemostasis. 2006; 95(5):907-908; author reply 908.
41. Hoppe B, Tolou F, Radtke H, Kiesewetter H, Dörner T, Salama A.  
Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is associated with idiopathic venous thromboembolism.  
Blood. 2005, 105(4):1549-51.
42. Horrevoets AJ.  
Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1): in vitro activities and clinical relevance, review.  
British Journal of Haematology. 2004;125:12-23.
43. Hunfeld A, Etscheid M, König H, Seitz R, Dodt J.  
Detection of a novel plasma serine protease during purification of vitamin K-dependent coagulation factors.  
Federation of European Biochemical Societies. 1999, 456:290-294.
44. Hunfeld A, Dodt J, Goy C, König H, Seitz R.  
IIa-like activity in prothrombin complex concentrates.  
Annals of Hematology. 1997, 74: A 87.
45. Hunfeld A, Etscheid M, König H, Seitz R, Dodt J.  
Identification of the thrombin-like activity of PCCs.  
Annals of Hematology. 1998, 76:A 101.
46. Ireland H, Miller GJ, Webb KE, Cooper JA, Humphries SE.  
The factor VII activating protease G511E (Marburg) variant and cardiovascular risk.

- Thrombosis and Haemostasis. 2004, 92(5): 986-92.
47. Kannemeier C, Kanse SM, Römisch J, Preissner KT.  
Factor VII activating protease (FSAP) regulates the proliferation of human vascular smooth muscle cells.  
Annals of Hematology. 2002, 81: A38.
  48. Kannemeier C, Al-Fakhri N, Preissner KT, Kanse SM.  
Factor VII-activating protease (FSAP) inhibits growth factor-mediated cell proliferation and migration of vascular smooth muscle cells.  
The Journal of the Federation of American Societies for experimental Biology. 2004, 18(6): 728-30.
  49. Kannemeier C, Feussner A, Stöhr HA, Weisse J, Preissner KT, Römisch J.  
Factor VII and single-chain plasminogen activator-activating protease. Activation and autoactivation of the proenzyme.  
European Journal of Biochemistry. 2001, 268(13): 3789-96.
  50. Kemkes-Matthes B, Oehler G.  
Blutgerinnung und Thrombose. Georg Thieme Verlag 2001; 3. Auflage.
  51. Kemkes-Matthes B.  
Veränderungen des Gerinnungssystems in der Schwangerschaft.  
Zeitschrift für Kardiologie. 2001,90; Suppl. 4, IV/45-IV/48.
  52. Kjelberg U, Andersson NE, Rosen S, Tengborn L, Hellgren M.  
APC resistance and other haemostatic variables during pregnancy and puerperium.  
Thrombosis and Haemostasis. 1999; 81: 527-531.
  53. Knoblauch B, Kellert J, Battmann A, Kannmeier C, Preissner KT, Römisch J.  
A histological study of FVII-activating protease (FSAP) distribution in human tissue-an immunohistological approach.  
Annals of Hematology. 2002, 81, A42.



54. Kress J, Beer N, Seitz R, Dodt J, Etscheid M.  
Interaction of the plasma hyaluron-binding serine protease with extracellular matrix proteins.  
GTH Erfurt Febr. 2002.
55. Kruithof EKO, Tran-Thang C, Gudinchet A, Hauert J, Nicoloso G, Genton C, Welte H, Bachmann F.  
Fibrinolysis in pregnancy: a study of plasminogen activator inhibitors.  
Blood. 1987, Vol. 69, No. 2: 460-466.
56. Lopez Y, Paloma MJ, Rifon J, Cuesta B, Paramo JA.  
Measurement of prethrombotic markers in the assessment of acquired hypercoagulable states.  
Thrombosis Research. 1999; 93: 71-78.
57. Macklon NS, Greer IA.  
Venous thromboembolic disease in obstetrics and gynaecology: the Scottish experience.  
Scottish Medical Journal. 1996;41:83-86.
58. Mann KG.  
Factor VII-activating protease. Coagulation, fibrinolysis, and atherothrombosis?  
Circulation. 2003, 107: 654-655.
59. Mazda T, Choi-Miura NH, Tomita M, Yoda M, Saito K, Takahashi K.  
Proteolytic activation and inactivation of the serin protease activity of plasma hyaluron binding proteine.  
Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2001, 24(5): 448-452.
60. Minkelen R, de Visser MC, Vos HL, Bertina RM, Rosendaal FR.  
The Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is not associated with venous thrombosis.  
Blood. 2005; 105(12).4898; author reply 4899.

61. Moseley P, Kerstein M.  
Pregnancy and thrombophlebitis.  
Journal of Surgery and Gynecology and Obstetrics. 1980;150:593-599.
62. Nakazawa F, Kannemeier C, Shibamiya A, Song Y, Tzima E, Schubert U, Koyama T, Niepmann M, Trusheim H, Engelmann B, Preissner KT.  
Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP).  
Journal of Biochemistry. 2005; 385: 831-838.
63. Nakazawa F, Kannmeier C, Römisch J, Preissner KT.  
Cellular effectors enhance the (auto-) activation of factor VII activating protease (FSAP).  
Annals of Hematology. 2002; 81: A58.
64. Nishida Y, Hayashi Y, Imai Y, Itoh H. Expression and localization of the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) in the human placenta.  
Kobe Journal of Medical Sciences. 1998;44:31-43.
65. Pabinger I, Grafenhofer H.  
Thrombosis during pregnancy: risk factors, diagnosis and treatment.  
Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis. 2002; 32 :322-324.
66. Paniccia R, Prisco D, Bandinelli B, Fedi S, Giusti B, Pepe G, Abbate R.  
Plasma and serum levels of d-dimer and their correlations with other hemostatic parameters in pregnancy.  
Thrombosis Research. 2002; 105:257-262.
67. Preissner KT, Nawroth P, Kanse SM.  
Vascular protease receptors: integrating haemostasis and endothelial cell functions.  
Journal of Pathology. 2000;190:360-372.
68. Preissner KT, Kanse SM, May AE.  
Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication.

Current opinion in cellular biology. 2000;12:621-628.

69. Riordan MN, Higgins JR.  
Haemostasis in normal and abnormal pregnancy.  
Best Practice and Research in Clinical Obstetrics and Gynaecology. 2003,  
Vol17,No.3:385-396.
70. Roberts D, Schwartz RS.  
Clotting and hemorrhage in the placenta - a delicate balance.  
New England Journal of Medicine. 2002; 347(1):57-9.
71. Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M.  
Newer concepts of blood coagulation.  
Haemophilia. 1998; 4:331-334.
72. Römisch J, Vermöhlen S, Feussner A, Stöhr HA.  
A protease isolated from plasma which activates FVII in a tissue factor  
independent manner but inactivates FV and FVIII.  
Annals of Hematology. 1999; 78: A10.
73. Römisch J, Feussner A, Vermöhlen S, Stöhr HA.  
A protease isolated from human plasma activating factor VII independent of  
tissue factor.  
Blood Coagulation and Fibrinolysis. 1999; 10 (8). 471-479.
74. Römisch J, Vermöhlen S, Feussner A, Stöhr HA.  
The FVII activating protease cleaves single-chain plasminogen activators.  
Haemostasis. 1999; 29: 292-299.
75. Römisch J, Feussner A, Stöhr HA.  
The FVII activating protease mediates fibrinolytic effects activating single-  
chain plasminogen activators.  
Annals of Hematology. 1999; 78: A24.
76. Römisch J, Kannemeier C, Feussner A, Stöhr HA, Preissner KT.

- Purification of the proenzyme form of the FVII-activator/sc-PA-activating protease and its quantification in plasmas of healthy subjects. Aventis, Poster 2000.
77. Römisch J, Feussner A, Stöhr HA.  
Quantitation of the factor VII- and single-chain plasminogen activator-activating protease in plasma of healthy subjects.  
Blood Coagulation and Fibrinolysis. 2001; 12: 375-383.
78. Römisch J, Feussner A, Nerlich C, Stöhr HA, Weimer T.  
Polymorphisms affect the prourokinase activating potency of the FVII- and single chain plasminogen activator-activating protease (FSAP) in up to 10% of currently healthy subjects. Aventis, Poster 2001.
79. Römisch J, Stöhr HA, Feussner A, Kleinhenn M, Nakazawa F, Kannemeier C, Preissner KT.  
The contribution of factor VII-activating protease (FSAP) to coagulation and fibrinolysis.  
Annals of Haematology. 2002; 81 (suppl): A69,272.
80. Römisch J.  
Factor VII activating protease (FSAP): a novel protease in hemostasis.  
Minireview.  
Journal of Biological Chemistry. 2002; 383: 1119-1124.
81. Römisch J, Feussner A, Nerlich C, Stöhr HA, Weimer T.  
The frequent Marburg I polymorphism impairs the prourokinase activating potency of the factor VII-activating protease (FSAP).  
Blood Coagulation and Fibrinolysis. 2002; 13(5): 433-41.
82. Rutherford S, Montoro M, McGehee W, Strong T.  
Thromboembolic disease associated with pregnancy: an 11-year review.  
American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1991; 164: Suppl:286.abstract.

83. Sattar N, Greer IA, Rumley A, Stewart G, Shepherd J, Packard CJ, Lowe GD.  
A longitudinal study of the relationships between haemostatic, lipid, and oestradiol changes during normal human pregnancy.  
Thrombosis and Haemostasis. 1999; 81 (1): 71-75.
84. Scarabin PY, Plu-Bureau G, Zitoun D, Bara L, Guize L, Samama M.  
Changes in haemostatic variables induced by oral contraceptives containing 50 µg or 30 µg oestrogen: absence of dose-dependent effect on PAI-1 activity.  
Thrombosis and Haemostasis. 1995; 74 (3): 928-932.
85. Schinzel H, Bahlmann F, Peetz D, Savidis S, Himmrich L, Klotz M.  
Thromboembolieprophylaxe mit niedermolekularem Heparin (Dalteparin-Na) bei Risikoschwangerschaften.  
Medizinische Klinik. 2002;97:193-203 (Nr.4).
86. Shu H, Wramsby M, Bokarewa M, Blomback M, Bremme K.  
Decrease in protein c inhibitor activity and acquired APC resistance during normal pregnancy.  
Journal for Thrombosis and Thrombolysis. 2000;9:277-281.
87. Siegert G, Tiebel O, Justus B.  
Veränderungen von Gerinnungs- und Fibrinolyseparametern während des Verlaufes der normalen Schwangerschaft.  
Klinisches Labor. 1992;38:136-140.
88. Stirling Y, Woolf L, North WRS, Seghatchian MJ, Meade TW.  
Haemostasis in normal pregnancy.  
Thrombosis and Haemostasis. 1984; 52 (2): 176-182.
89. Storck J, Hunfeld A, Dodt J.  
A new human plasma serine protease activates endothelial cells. European Journal of Physiology. 1999; 437 (5 Suppl.) R164.
90. Sumiya J, Asakawa S, Tobe T, Hashimoto K, Saguchi K, Coi-Miura NH, Shimizu Y, Minoshima S, Shimizu N, Tomita M.

Isolation and characterization of the plasma hyaluron-binding protein (PHBP) gene (HABP2).

Journal of Biochemistry. 1997; 122:983-990.

91. Swiet M.  
Thromboembolism.  
Clinical Hematology. 1985;14:643-661.
92. Tengborn L, Bergqvist D, Mätzsch T, Bergquist A, Hedner U.  
Recurrent Thromboembolism in pregnancy and puerperium.  
American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1985;28:107-118.
93. Uszynski M, Maciejewski K, Uszynski W, Kuczynski J.  
Placenta and Myometrium - the two main sources of fibrinolytic components during pregnancy.  
Gynecology and Obstetric Investigation. 2001;52:189-193.
94. Vostrov A, Quitschke W.  
Plasma hyaluron-binding protein PHBP is a serine protease.  
Journal of Biological Chemistry - Papers in press. 2000, M904640199.
95. Wersch JWJ, Ubachs JMH.  
Blood coagulation and fibrinolysis during normal pregnancy.  
Obstetrics and Gynecology. 1984;64:46-51.
96. Willeit J, Kiechl S, Weimer T, Mair A, Santer P, Wiedermann CJ, Römisch J.  
Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease. A prominent risk predictor of carotid stenosis.  
Circulation. 2003; 107: 667-670.
97. Wright JG, Cooper P, Astedt B, Lecander I, Wilde JT, Preston FE, Greaves M.  
Fibrinolysis during normal human pregnancy: complex inter-relationships between plasma levels of tissue plasminogen activator and inhibitors and the euglobulin clot lysis time.  
British Journal of Haematology. 1988;69(2): 253-258.

## 6. Anhang

### 6.1. Abschlussbrief an die Gynäkologischen Praxen (Muster)

#### Zentrum für Innere Medizin

##### Kardiologisches Labor

Med. Klinik I der JLU

Klinikstrasse 36

35392 Giessen

Sehr geehrte Frau Dr. Esch,

Giessen, 20.4.02

Sie haben sich freundlicherweise die Zeit genommen an unserer Studie „Thrombosegefahr in der Schwangerschaft“ teilzunehmen, die nun beendet ist. Von Ihren Patientinnen haben insgesamt 76 teilgenommen, deren Blutproben uns zur Verfügung standen.

Die genaue Auswertung und Interpretation der gewonnenen Ergebnisse wird noch einige Zeit in Anspruch nehmen. Sobald dieser Prozess abgeschlossen ist, erhalten Sie natürlich eine kurzgefasste Zusammenstellung der Ergebnisse, soweit das in Ihrem Interesse liegt.

Bis dahin möchten wir uns nochmals herzlich für Ihre Mitarbeit bedanken, für die Sie trotz Ihrer beruflichen Auslastung Zeit gefunden haben. Auch Ihre Kollegen und Ihr Team war uns eine große Hilfe!

Frau Isabella Prickartz wird vielleicht nochmals auf Ihre Patientenkartei zurückgreifen müssen, um unsere Daten zu vervollständigen, wir bitten dafür um Ihr Verständnis.

Wenn Sie noch Fragen haben sollten, ist Frau Prickartz unter **0177 / 3183782** zu erreichen.

Mit freundlichen Grüßen,

---

PD Dr. H. Hölschermann

---

Frau I. Prickartz

## 6.2. Aufklärungsbrief an die Probandinnen

---

JUSTUS-LIEBIG-



**Sehr geehrte, liebe Schwangere,**

der größte Teil Ihrer Schwangerschaft liegt nun bereits hinter Ihnen und Sie bereiten sich vermutlich gedanklich schon auf die anstehende Entbindung vor. Dafür wünschen wir Ihnen und Ihrem Baby alles, alles Gute.

Sie hatten sich freundlicherweise zu Beginn Ihrer Schwangerschaft bereit erklärt, an einer Untersuchung der Uniklinik zur Thrombosegefahr in der Schwangerschaft teilzunehmen. Allein in Gießen haben inzwischen über hundert Schwangere an dieser Untersuchung teilgenommen, wofür wir uns sehr gefreut haben und wofür wir uns ganz herzlich bedanken möchten.

Nun würden wir gerne erfassen, ob bei Ihnen während Schwangerschaft, Geburt, oder Wochenbett Besonderheiten oder gar Komplikationen aufgetreten sind. Wir möchten Sie daher höflich fragen, ob wir die erforderlichen Befunde Ihrem Mutterpaß entnehmen dürfen. Selbstverständlich werden wir auch weiterhin alle Daten streng vertraulich und ausschließlich in anonymisierter Form auswerten. Außerdem soll eine letzte Blutprobe (wiederum im Rahmen einer Routine-Blutentnahme nach der Entbindung) entnommen werden. Dadurch würden Sie ganz wesentlich zum Gelingen dieser Studie beitragen.

Damit dies alles im Trubel (und Jubel) der Geburt nicht untergeht, wären wir Ihnen sehr dankbar, wenn **Sie (oder Ihr Mann) uns unmittelbar nach Ihrer Geburt (noch im Krankenhaus!) kurz anrufen** würden. Frau Prickartz steht Ihnen hierfür zu jeder Tages- und Nachtzeit unter **0177-3183782** oder **0641-78609** zur Verfügung. Vermutlich werden Sie zwar nach der Entbindung Ihres Babys an alles andere bloß nicht an die Wissenschaft denken, aber jede Verbesserung der medizinischen Versorgung (auch die einer Schwangerschaft) beruht letztlich immer darauf, daß Ärzte und Patientinnen sich gemeinsam um neue Erkenntnisse bemühen. Diese Studie kann also nur zusammen mit Ihnen gelingen!

Mit den besten Wünschen für Sie und Ihre Familie - Ihre

Dr. H. Hölsebermann

Frau I. Prickartz

Prof. Dr. H. Tillmanns

→ **bitte dran denken! bitte anrufen!**

**innerhalb 24 Stunden nach der Geburt: 0177-3183782 oder 0641-78609**

**“Thrombose und Schwangerschaft”**



## 7. Eidesstattliche Erklärung

„ Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten“.

Bonn, Datum

Unterschrift

## 8. Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. med. Hans Hölschermann für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung bedanken. Zudem wird mir die Zeit in seinem Labor mit einem wunderbaren Team immer in sehr guter Erinnerung bleiben. Ich bedanke mich für die Geduld und die Kraft, die er in mich investiert hat.

Ich danke dem Laborteam, Frau Benoush Parvitz, Frau Dr. Heidi Muth und allen Anderen für ihre tatkräftige und liebe Unterstützung.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Hämatologischen Labors für die gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Teams von Herr Dr. Römisch, Aventis Behring Marburg für die interessante und nette Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Pabst für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die an mich geglaubt haben und mich immer wieder ermutigt haben diese Arbeit fortzuführen.

## 9. Lebenslauf

Name: Isabella Prickartz  
Geburtsdatum: 25.01.1977  
Familienstand: ledig  
Vater: Dr. Rainer Prickartz, Diplom-Ingenieur  
Mutter: Gisela Prickartz, Hausfrau

### Schulbildung

---

1983-1987 Grundschule Vaalserquartier, Aachen  
1987-1996 Couven-Gymnasium, Aachen  
1996 Abitur, Note: 2,3

### Studium

---

1997-2004 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen  
1999 Physikum  
2000 1. Staatsexamen  
2000-2002 Famulaturen:  
-Marienhospital Aachen, Gynäkologie  
-Praxis Dr.med.W.Kohler, Aachen, Pädiatrie  
-Dr.-von-Halem-Krankenhaus Norderney, Chirurgie  
-Medizinische Kliniken und Polikliniken der JLU Gießen, Innere  
2003 2. Staatsexamen  
2003-2004 Praktisches Jahr:  
-Aalborg-sygehus, Aalborg / Dänemark (Chirurgie)  
-Medizinische Klinik und Poliklinik der JLU Gießen (Innere)  
-Universitätskinderklinik Gießen (Pädiatrie)  
Mai 2004 3. Staatsexamen

### Berufliche Ausbildung

---

seit 10.2004 Assistenzärztin an der DRK-Kinderklinik Siegen  
seit 07.2007 Assistenzärztin am St. Marienhospital Bonn

### Promotion

---

Thema: Faktor-VII aktivierende Protease (FSAP) in der Schwangerschaft  
Betreuer: PD Dr. H.Hölschermann, kardiologisches Labor der Medizinischen  
Klinik der JLU Gießen  
Postervorstellung auf dem GTH-Kongress, Nov. 2002, Innsbruck