

Pharmakogenomik

◆ Fortschritte in der molekularen Genetik führen zu einem immer besseren Verständnis bestimmter Erkrankungen und zeigen Wege zu ihrer Therapie auf; Krankheitsbilder lassen sich mit dem neuen Wissen zunehmend differenzieren. Immer noch werden Krankheiten aber primär vom Phänotyp her diagnostiziert. Ähnliche Symptome können jedoch in einigen Fällen auf verschiedene zugrunde liegende Mechanismen und ursächliche Erkrankungen zurückgeführt werden, es können aber auch gleiche Erkrankungen unterschiedliche Symptome ausprägen. Eine kausale Diagnostik und Therapie wird erst möglich, wenn man Erkrankungen auf molekularer Ebene versteht. In diesem Zusammenhang kommt der Sequenzierung des menschlichen Genoms – der erste Entwurf wurde im Juni 2000 fertiggestellt –^{1,2)} eine besondere Bedeutung zu. Man darf mit den Erkenntnissen aus den Humangenomprojekten erwarten, eines Tages nicht nur die genetischen Gemeinsamkeiten, sondern auch die genetischen Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen erklären zu können.³⁾ Diese Unterschiede können als Marker für die ungleiche Suszeptibilität gegenüber krankheitsauslösenden Faktoren und der individuellen Antwort des Körpers auf verschiedene Therapien dienen. Auf Fragen wie „Warum zeigen viele Arzneimittel nur bei einem Teil der behandelten Patienten die erhoffte Wirkung, bei anderen nicht“ oder „Aus welchem Grund haben manche Medikamente bei einigen Patienten schwere Nebenwirkungen, obwohl sie sonst eine gute Verträglichkeit aufweisen“ gibt es meist noch keine Antwort. Mit den Analyse und dem Vergleich genetischer Muster suchen hier Pharmakogenomik und Pharmagenetik nach Lösungen, mit dem Ziel einer individualisierten Arzneimitteltherapie.

Begriffsbestimmungen

◆ Wegen der Verwirrung um den Begriff Pharmakogenomik und seiner Abgrenzung zur Pharmakogenetik werden beide Begriffe hier definiert:

Pharmakogenomik befasst sich mit der Untersuchung der Veränderung des Genexpressionsprofils in Gegenwart von Arzneimitteln, die Pharmakogenetik dagegen beschreibt die Ursachen dieser Veränderungen auf der Ebene der individuellen genetischen Sequenz eines Organismus. Pharmakogenetik – der Begriff wurde von Vogel Ende der 50er Jahre geprägt –, beschäftigt sich also mit den erblichen Unterschieden in der Reaktion von Individuen auf Arzneistoffe und kann daher auch als spezielle Form der Gendiagnostik bezeichnet werden. Als relevant für pharmakogenetische Überlegungen gelten polymorphe Gene, also Gene mit geringer Abweichung in ihrer DNA-Sequenz (Allele) dann, wenn sie mit einer Frequenz von > 1 % in einer Population existieren und mindestens ein Polymorphismus die Aktivität des betroffenen Enzyms verändert. Wird der Polymorphismus durch die Veränderung nur eines Basenpaares hervorgerufen, wird dies als „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP) bezeichnet.

Wirkung und Verträglichkeit von Arzneimitteln

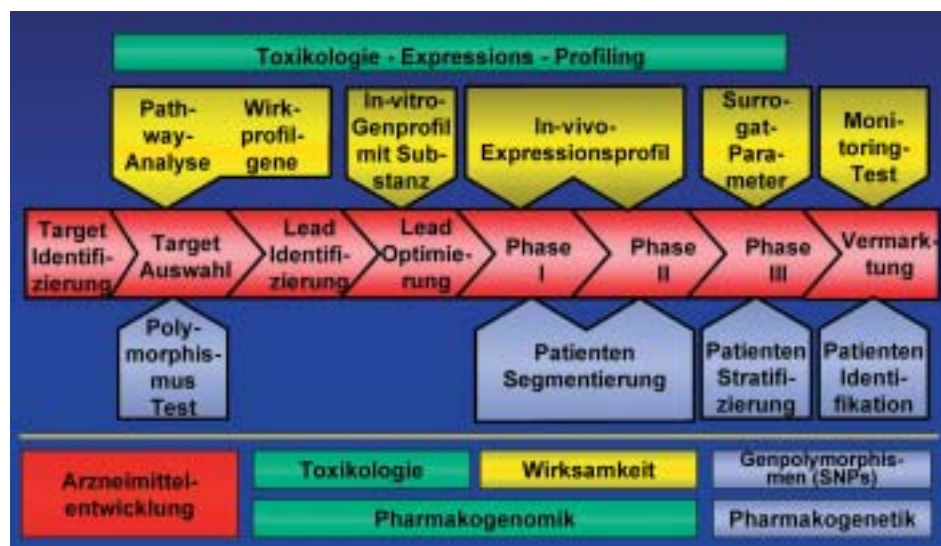
◆ In den letzten 40 Jahren wurden mehr als 100 Beispiele beschrieben, bei denen genetische Abweichungen für übermäßige Arzneimittelwirkungen nach normaler Dosis verantwortlich waren. Die beobachteten interindividuellen metabolischen Differenzen lassen sich oftmals auf genetisch bedingte Unterschiede in der Codierung verschiedener Enzyme zurückführen. So stellten beispielsweise in den 50er Jahren Wissenschaftler zum ersten Mal interindividuelle Unterschiede in Enzymmustern als Ursache unerwünschter Nebenwirkungen bei bestimmten Arzneimitteln fest. Sie beobachteten, dass 10 % aller Afroamerikaner, die im Korea-Krieg kämpften, nach Einnahme eines bestimmten Antimalariamittels anämisch wurden.⁴⁾ Diese Nebenwirkung trat bei weißen Amerikanern nur sehr selten auf. Eine Isoform der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P) war die Ursache dieser Nebenwirkung.

Im Mittelpunkt des Interesses steht heute die Cytochrom-P-450 (CYP)-Superfamilie. Diese Gruppe von Enzymen spielt bei der Metabolisierung von Arzneimitteln die wohl bedeutendste Rolle. Die Enzyme fungieren als Monooxygenasen hauptsächlich in der Leber. Dabei werden lipophile Stoffe in Phase-I-Reaktionen hydrophilisiert, beispielsweise durch die Einführung einer Hydroxygruppe. Innerhalb der Superfamilie ist ein Enzym des Typs 2D6 (CYP2D6) von besonderem Interesse, da es die oxidative Biotransformation von mehr als 60 Medikamenten kontrolliert.⁵⁾ Die meisten von ihnen sind entweder kardiovaskuläre oder psychoaktive Präparate mit einem engen therapeutischen Index und für die Dauertherapie konzipiert.^{6,7)} Die besonders hohen Anforderungen an Wirksamkeit und Sicherheit stehen im Widerspruch zu der hochvariablen Aktivität der diese Substanzen verstoffwechselnden Cytochrome, sowohl im inter- als auch im intraindividuellen Bereich. Zum Teil kann dies durch unterschiedliche spezifische katalytische Aktivität von Isoenzymen erklärt werden. Diese sind wiederum auf genetische Polymorphismen zurückzuführen, die die Aminosäurestruktur der CYP450-Enzyme verändern. Das wohl bekannteste Beispiel einer solchen Mutation ist das Enzym CYP2D6del 506.⁸⁾ Die Deletion einer einzelnen Base führt zu einer Verschiebung des Leserasters (Frameshift) von 3er Codons bei der Translation von RNA in Protein. Durch den Frameshift wird die Synthese des CYP450-Enzyms vorzeitig abgebrochen. Dadurch wird ein CYP-Peptid mit einer deutlich reduzierten katalytischen Aktivität synthetisiert. Neben den Unterschieden in der spezifischen Aktivität des Enzyms können sich unterschiedliche Expressionsgrade des Gens auf der Transkriptionsebene auf die CYP450-Aktivität auswirken, indem weniger Enzym synthetisiert wird. Die Expression kann vielfach durch Xenobiotika induziert werden. Um die Auswirkung auf eine Therapie abschätzen zu können, ist es daher erforderlich, dass sowohl individuelle Abweichungen in

den DNA-Sequenzen, in der Regel SNPs, als auch der Expressionsgrad der Enzyme bestimmt werden. Es kommen also sowohl pharmakogenetische als auch pharmakogenomische Methoden zum Einsatz. In der weißen Bevölkerungsgruppe tritt eine verminderte CYP2D6-Aktivität aufgrund eines Polymorphismus bei 5 – 10 % der Gesamtpopulation auf.⁹⁾ Die Effekte genetischer Polymorphismen in Enzymen, die an der Metabolisierung von Arzneimitteln beteiligt sind, werden in drei Klassen unterteilt: Man unterscheidet Individuen mit einer effizienten Arzneimittel-metabolisierung („Extensive Metabolisers“) von denen mit einer schlechten Arzneimittel-metabolisierung („Poor Metabolisers“) auf der einen Seite und denen mit Überexpression („Ultra-Rapid Metabolisers“) auf der anderen.¹⁰⁾ Standarddosen an Arzneimitteln mit steiler Dosis-Wirkungs-Kurve oder engem therapeutischem Index können dann leicht zu unerwünschten Nebenwirkungen führen oder weniger wirksam sein.

Pharmakogenomik in Forschung und Entwicklung

◆ Messungen der CYP450-Aktivität sind in der Pharma-F&E mittlerweile zur Routine geworden. Trotzdem werden immer noch etwa 35 % aller klinischen Entwicklungsprojekte wegen Unverträglichkeiten abgebrochen. Und noch immer ist die klassische Toxikologie ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt im Projektablauf. Diese Situation soll sich durch den zunehmenden Einsatz pharmakogenomischer Techniken in der Toxikologie (Toxikogenomik) in Zukunft deutlich verbessern. Die Ansätze dazu bauen vielfach auf der Messung von Expressionsprofilen in Modellkulturen in Gegenwart aktiver Substanzen auf. Wichtig ist, dass das toxikologische Potential einer Substanz möglichst früh im Forschungsprozess (am besten direkt nach der kombinatorischen Synthese und dem anschließenden Hochdurchsatzscreening) festgestellt werden kann. Wegen der zu diesem Zeitpunkt limitierten Mengen an Substanz muss das



Verfahren miniaturisiert und in vitro durchgeführt werden.¹¹⁾ Die verschiedensten Pharma- und Biotechnologiefirmen versuchen toxikogenomische Screens zu etablieren und dabei neben den klassischen CYP450-Stoffwechselwegen möglichst viele andere hepatotoxische, nephrotoxische und weitere Mechanismen im Hochdurchsatzverfahren zu erfassen. Messungen zu einem derart frühen Zeitpunkt ermöglichen es, in der darauf folgenden synthetischen Optimierung der Substanzen das toxikologische Potenzial zu eliminieren. Gelingt es, den Verschleiß an Substanzen durch toxikogenomische Techniken hin zu früheren Phasen der Arzneimittelentwicklung zu verschieben, könnte die Effizienz der Pharma-F&E gesteigert und damit die Kosten für ein neues Arzneimittel reduziert werden. Pharmakogenomische Methoden können nur dann im Sinne effizienterer und besser verträglicher Arzneimittel bei reduzierten Entwicklungsaufwendungen erfolgreich sein, wenn diese nicht nur punktuell, sondern entlang der gesamten Wertschöpfungskette von Pharma-F&E angewendet werden (Abbildung 1). In einem frühen Stadium des F&E-Zyklus ist es sinnvoll, die Substanzwirkung auf die generischen Stoffwechselwege, z. B. den Substanzmetabolismus oder -transport, zu erfassen, die zu toxischen Effekten führen. Die Messung target-spezifischer Surrogatmarker oder die

Stratifizierung von Patientenpopulationen bezüglich der zu erwartenden Wirkung einer Substanz unterstützt hingegen die klinischen Prüfungen. Veränderungen im Expressionsgrad des Arzneimitteltargets selbst, zum Beispiel eines Rezeptors und der Proteine der entsprechenden angrenzenden Stoffwechselwege, können als Surrogatmarker eingesetzt werden und damit frühzeitig auf die Wirksamkeit während der klinischen Prüfungen hinweisen.^{12,13)} Das Konzept des Surrogatmarkers ist bereits bei der Behandlung von HIV-Patienten mit der Messung des Virus-Load akzeptiert und auf eine molekularbiologische Grundlage gestellt. Neben diesen pharmakogenomischen Messungen können jedoch auch pharmakogenetische Messungen, also populationspezifische Informationen, für die Optimierung von klinischen Prüfungen von Bedeutung sein. Hier spielt die Stratifizierung von Arzneimittelrespondern, also den Personen, die auf einen Wirkstoff in der erwünschten Weise reagieren, eine besondere Rolle.¹⁴⁾ →

Abb.1.
Integration von
Pharmakogenomik
und Pharmakogenetik in die
Arzneimittelentwicklung.

Beispiele aus der Praxis

◆ Der Einsatz von Pharmakogenomik in der Klinik in Zusammenhang mit der Behandlung von aggressivem Brustkrebs mit Herceptin (Trastuzumab) ist das wohl am meisten zitierte Beispiel dieser neuen medizinischen Disziplin. 28 Prozent der Tumore von Brustkrebspatientinnen weisen ein abnormal amplifiziertes HER2-Gen auf. Diese Überrepräsentanz des HER2-Gens führte auch zur Überproduktion der entsprechenden Boten-RNA (mRNA) und des HER2-Proteins, eines Rezeptors für Wachstumsfaktoren. Diesem Gen untersteht ein ganzes Netzwerk von Signalen, die zwischen den Zellen ausgetauscht werden. Sind zu viele dieser Gene im Inneren und der dazugehörigen Proteine auf der Außenhaut der Brustkrebszelle vorhanden, handelt es sich um eine Form von Krebs, die schnell Metastasen bildet. Bei der Behandlung von Brustkrebspatientinnen mit Trastuzumab erfolgt die Identifizierung der Responder und die Kontrolle des Behandlungserfolges über den Expressionsgrad des HER-2-Onkogens. Trastuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der gegen das HER-2-Onkogen gerichtet ist. Trastuzumab greift den HER-2-Rezeptor an und blockiert dessen Überfunktion. Der Behandlungserfolg mit Herceptin ist abhängig vom Expressionsgrad des HER-2-Onkogens im Tumorgewebe der Patientin, und die Auswahl der richtigen Therapie setzt voraus, dass die Patientin auf das Vorhandensein von HER 2 untersucht wurde. Bei etwa zwei Dritteln aller Brustkrebspatientinnen ist Trastuzumab nicht wirksam. In diesen Fällen ist das Arzneimitteltarget nicht überexprimiert. Bei dem Drittel der Patienten, bei denen dieses Gen überexprimiert ist, steigt durch die Behandlung mit dem Antikörper die Überlebensrate signifikant.¹⁵⁾

Weitere breit angelegte pharmakogenetische Forschungen beschäftigen sich zum Teil schon erfolgreich^{16,17)} damit, Responder zur Behandlung von Leukämien, speziell der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML),

mit dem kürzlich zugelassenen Gleevec zu identifizieren.

Neben diesen beiden Beispielen, die bereits täglich in der Praxis angewendet werden, sind weitere Beispiele für die Korrelation bestimmter pharmakogenetischer Information mit der Wirksamkeit von Arzneimitteln beschrieben. Dazu gehören eine Reihe von Asthmamarkern. Asthma wird in erster Linie mit Arzneimitteln behandelt, die mehrere generische Stoffwechselwege modulieren. Mit Hilfe pharmakogenetischer Bestimmungen konnten Patienten identifiziert werden, die auf bestimmte Behandlungen nicht ansprechen. So stellte sich die Inhibierung der Leukotriensynthese bei dem kleinen Teil der Patienten, die lediglich Nicht-Wildtyp-Allele der 5-Lipoxygenase-Promotor-Region tragen, als nicht effektiv heraus.¹⁸⁾ Ähnlich konnten molekulare Varianten der β -2-Adrenorezeptoren mit unterschiedlichen Behandlungserfolgen mit β -2-Agonisten in Verbindung gebracht werden.^{19,20)} Kuivenhoven beschreibt einen Polymorphismus des Cholesterinester-Transferproteins (CETP), der mit dem Behandlungserfolg von Pravastatin in Patienten mit Koronatherosklerose korreliert.²¹⁾ Polymorphismen des Serotoninneurotransmitterrezeptors (5-HT_{2A}) wurden mit der Wirksamkeit des Antipsychotikums Clozapine in Verbindung gebracht.²²⁾

Pharmakogenomik im Umfeld der Behörden

◆ Inwieweit die Pharmakogenomik in Zukunft routinemäßig in der Klinik angewendet und wie schnell dies geschehen wird, hängt in erster Linie davon ab, wie die Arzneimittelzulassungsbehörden künftig derartige Daten bewerten werden. Auf der einen Seite wird es im Spannungsfeld von Wirksamkeit, Arzneimittelsicherheit und Druck zur Senkung der Entwicklungskosten für neue Arzneimittel mit der Pharmakogenomik gelingen, die Anzahl der Patienten in klinischen Studien zu reduzieren und dennoch die statistische Signifikanz der Studien wirksam zu erhöhen.^{23,24)} Auf der an-

deren Seite werden jedoch auch weiterhin Nonresponder zum Nachweis der Arzneimittelsicherheit behandelt werden müssen. Kurzfristig wird daher wohl der Nutzen von Pharmakogenomik auf die Verringerung der Patientenzahlen in klinischen Trials auf Folgestudien beschränkt bleiben – wenn die Arzneimittelsicherheit bereits in anderen, nicht stratifizierten Trials gezeigt werden konnte. Die amerikanische Gesundheitsbehörde, die Food and Drug Administration (FDA), fordert bereits, dass ethnische Unterschiede im Metabolismus, sofern es die Pharmakokinetik oder Pharmakodynamik betrifft, berücksichtigt werden.²⁵⁾ Dasselbe trifft für Untersuchungen von Arzneimittelsicherheit und Wirksamkeit vor dem Hintergrund interindividueller Unterschiede im Arzneimittelmetabolismus zu. Wie beschrieben, sind die ersten molekulargenetischen Tests zur Individualisierung der Therapie bereits auf dem Markt, und die Pharmakonzerne entwickeln neue Tests für Arzneimittel, die derzeit in der klinischen Prüfung sind.

Ausblick – praktische Erwägungen, Machbarkeit

◆ So unterschiedlich die Zielrichtung von pharmakogenomischen und -genetischen Untersuchungen ist, so unterschiedlich ist auch die Verfügbarkeit des Probenmaterials zur Bestimmung von SNPs und Expressionsmustern. Während das Probenmaterial für die Bestimmung von SNPs leicht aus weißen Blutzellen gewonnen werden kann, sind die Proben für das Expressionsprofiling deutlich schwerer zugänglich. RNA-basierte Messungen sind oft nur über Biopsien also Untersuchungen von Gewebe, möglich. Bei Erkrankungen, in denen Biopsien nicht zur Verfügung stehen, wird man sich darauf konzentrieren müssen, sekundäre Proteinprofile im Blutserum oder anderen leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten zu vermessen. Entsprechende Marker müssen identifiziert und zudem Reagentien für die diagnostischen Tests hergestellt werden. Diese Tests müssen nicht nur in der

Forschung durchführbar, sondern auch auf den alltäglichen Einsatz in der Praxis abgestimmt sein. Trotz des problematischen Zugangs zu relevantem Probenmaterial werden die Expressionsprofil-Marker vor allem in der nahen Zukunft für die Anwendung von Pharmakogenomik eine besondere Bedeutung haben. Denn mit diesen Markern können die dynamischen Parameter gemessen werden, die den Krankheitsstatus und -verlauf beschreiben. Wegen unseres noch beschränkten Verständnisses der Genregulation lassen sich derartige Parameter aus SNP-Daten noch nicht voraussagen. Mittelfristig werden mit SNPs vorwiegend statische Zustände von Patienten beschrieben, wobei sie sich vornehmlich auf die Bestimmung monogener Effekte konzentrieren. Während pharmakogenomische und -genetische Methoden in F&E heute bereits weit verbreitet sind, wird die Routineanwendung in der Klinik erst langsam Einzug halten. Langfristig jedoch wird der Paradigmenwechsel von der symptomatisch behandelnden Therapie hin zur kombinierten genetisch basierten kausalen Diagnose und Therapie nicht aufzuhalten sein. Damit wird die individuelle Erfahrung des behandelnden Arztes durch objektive Testparameter ergänzt. Von den schnellen Fortschritten in der Genomforschung beflügelt, steigt die Erwartung, dass die Therapie für jeden Patienten maßgeschneidert wird.²⁶⁾ Die tatsächliche Umsetzung dieses Ziels mag noch weit in der Zukunft liegen, die Unterteilung in mehrere Untergruppen, wie im Falle der Metabolisierer wird jedoch schon heute vorgenommen. Und in nicht allzu ferner Zukunft werden wir den heutigen „One-size-fits-all“-Ansatz für die Arzneimittelauswahl und -dosierung wie die Anfänge der medikamentösen Behandlung zu Beginn des letzten Jahrhunderts betrachten.

Werner Kroll
Bayer Corp., West Haven, USA
Wolfgang Hartwig
Bayer AG, Wuppertal

- 1) Int. Human Genome Sequencing Consortium, Nature 2001, 409, 860.
- 2) J. C. Venter et al., Science 2001, 291, 1304.
- 3) The International SNP Map Working Group, Nature 2001, 409, 928.
- 4) J. B. Leathart et al., Pharmacogenetics 1998, 8, 529.
- 5) www.imm.ki.se/CYPalleles/
- 6) S. Chen et al., Clin. Pharmacol. Ther. 1996, 60, 522.
- 7) K. Nakagawa et al., Pharmacol. Ther. 2000, 86, 1.
- 8) A. A. Gough et al., Nature 1990, 347, 773.
- 9) M. Ingelman-Sunderberg et al., TIPS 1999, 20, 342.
- 10) S. Raimundo et al., Pharmacogenetics 2000, 8, 577.
- 11) K. A. Elliget et al., J. Tissue Cult. Meth. 1983, 8, 1.
- 12) J. Kuhlmann, J. Clin. Pharmacol. Ther. 1999, 37, 1575.
- 13) M. P. Murphy et al., Pharmacogenomics 2000, 1, 115.
- 14) A. D. Roses, Lancet 2000, 355, 1358.
- 15) J. Baselga et al., J. Clin. Oncol. 1996, 14, 737.
- 16) M. E. Gorre et al., Science 2001, 293, 876.
- 17) C. Barthe et al., Science 2001, 293, 2163.
- 18) J. M. Drazen et al., Nature Genetics 1999, 22, 168.
- 19) F. D. Martinez et al., J. Clin. Invest. 1997, 100, 3184.
- 20) S. Tan et al., Lancet 1997, 350, 995.
- 21) J. A. Kuivenhoven, New Engl. J. Med. 1998, 338, 86.
- 22) M. J. Arranz, Schizophr. Res. 1998, 32, 93.
- 23) B. A. Fijal et al., Control.Clin. Trials 2000, 21, 7.
- 24) L. R. Cardon et al., Pharmacogenetics 2000, 10, 503.
- 25) www.fda.gov/default.htm.
- 26) A. D. Roses, Nature 2000, 405, 857.

Inositphosphate

Das unerkannte Arsenal der intrazellulären Signalübertragung?

◆ Inositphosphate und Phosphoinositide sind intrazelluläre Botenstoffe (second messenger). In ihrer Entdeckungsgeschichte ist das Jahr 1983 von besonderer Bedeutung. Den Gruppen von Schulz und Berridge gelang damals der Nachweis, dass myo-Inosit-1,4,5-trisphosphat [Ins(1,4,5)P₃] wesentlich an der Regulation der intrazellulären Calciumionenkonzentration beteiligt ist.¹⁾ Damit war ein Meilenstein bei der Aufklärung der „black box“ zwischen Rezeptorstimulation und physiologischer Antwort der Zellen erreicht. In kurzer Zeit wurden ca. 30 weitere Inositphosphate in verschiedenen Zelltypen identifiziert.

Da myo-Inosit ein Cyclohexangerüst mit sechs Hydroxygruppen aufweist (Abbildung 1), können 63 ver-

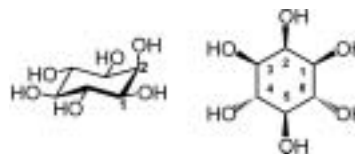


Abb 1.
Die Struktur des Inosits in der myo-Konfiguration. Konventionsgemäß wird gegen den Uhrzeigersinn nummeriert und die einzige axiale OH-Gruppe mit der Ziffer 2 bezeichnet.

schieden stark phosphorylierte Inositphosphate auftreten, vom myo-Inosit-1-phosphat bis zur sechsfach phosphorylierten Phytinsäure (InsP₆), einem der wichtigsten Phosphatspeicherstoffe in Pflanzen. Damit nicht genug, treten in einigen Zellen kurzzeitig Inositpyrophosphate auf. Diese werden unpräziserweise oft mit InsP₇ und InsP₈ bezeichnet. Charakteristisch für die besser mit Formeln wie InsP₃PP abgekürzten Verbindungen ist das Pyrophosphat in der 5-Position.

Trotz der faszinierenden Vielfalt an Inositphosphaten, die Zellen zur Regulation ihrer physiologischen Prozesse zur Verfügung haben, gelingt eine Zuordnung der Bedeutung der einzelnen Isomere nur zögerlich. Dabei wurden keine Anstrengungen gescheut, um Enzyme zu identifizieren, die Inositphosphate metabolisieren. Tatsächlich sind die meisten der