



 universitäts
klinikum**bonn** Institut für
Rechtsmedizin

Toxikogenetik

Dr. rer. nat. Cornelius Hess

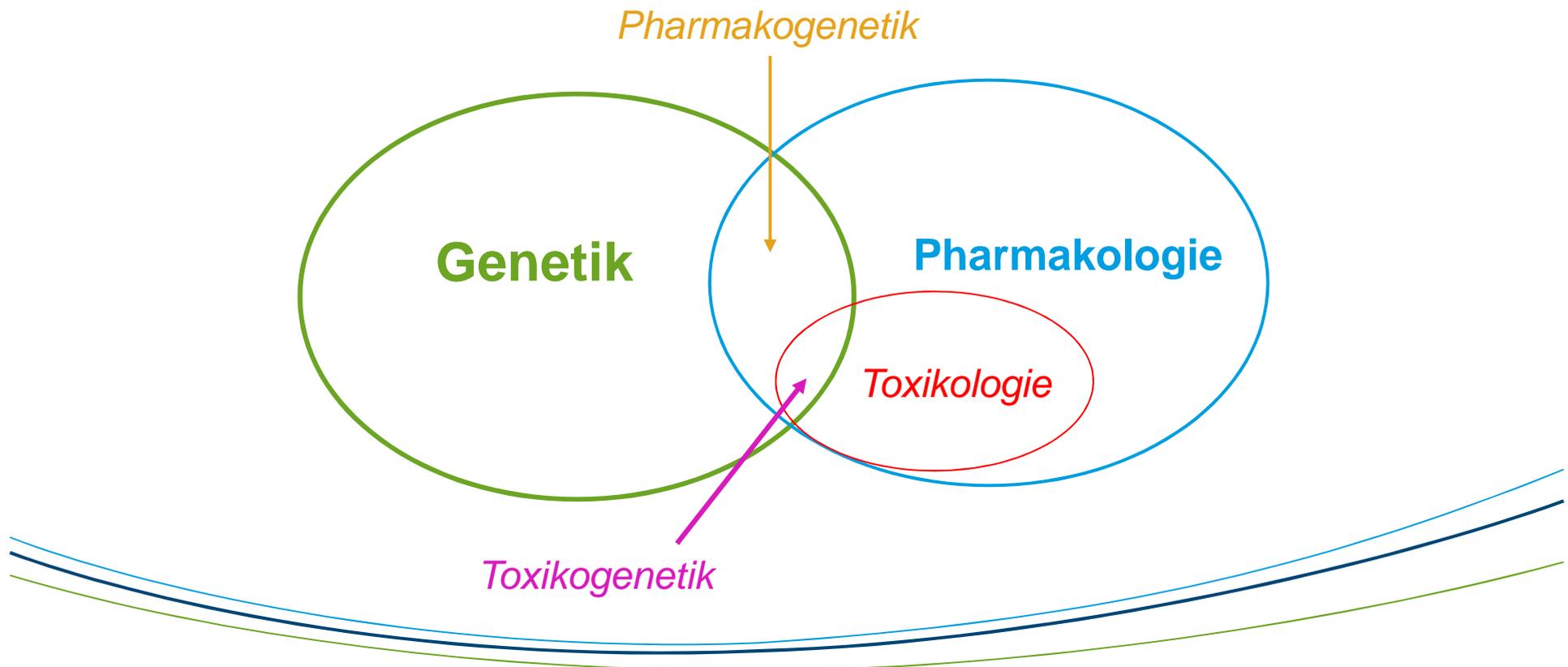
21.10.2015

Definitionen und Begriffe

Genetik: „Vererbungslehre“

Pharmakogenetik: Vererbliche Einflüsse auf Stoffwirkung

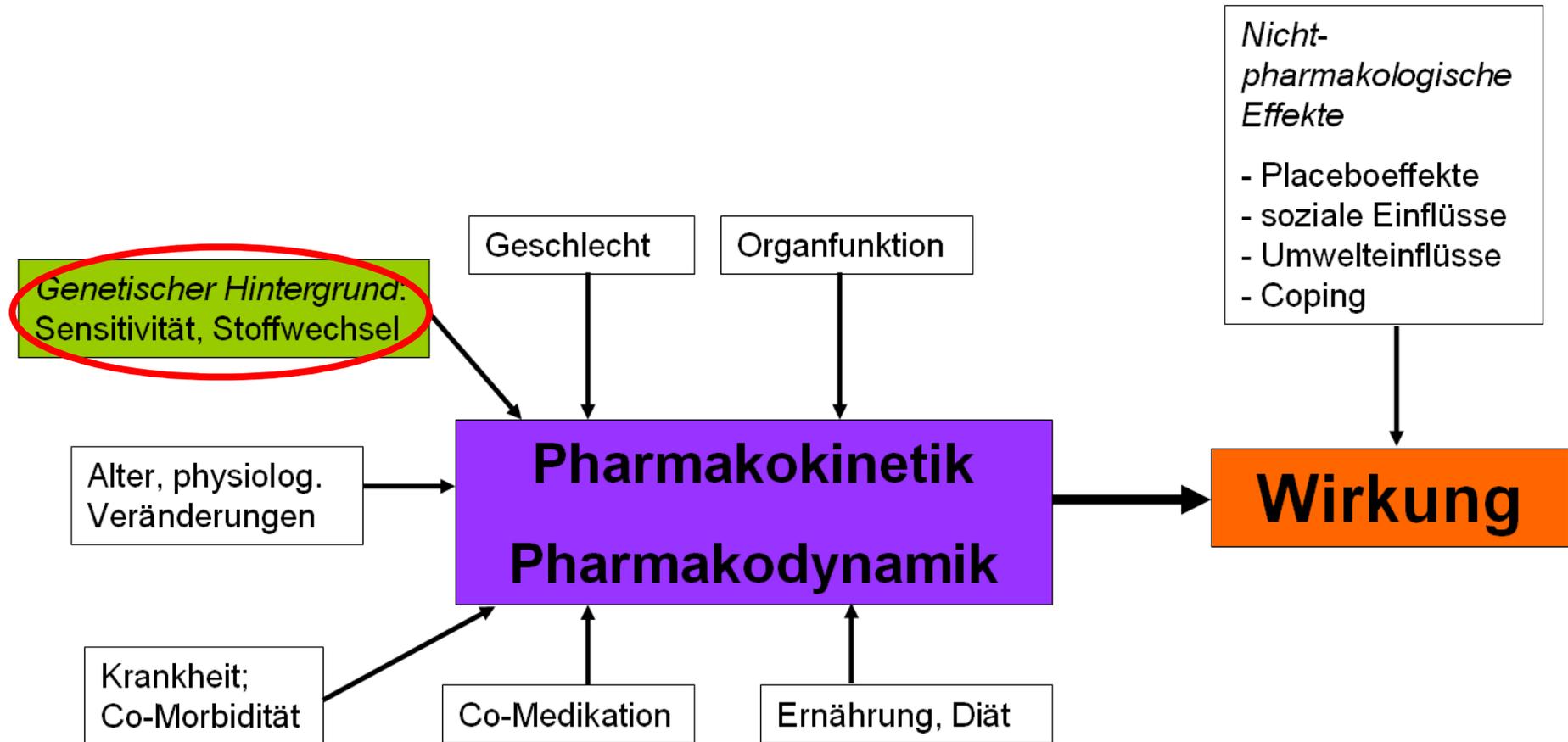
Toxikogenetik: Vererbliche Einflüsse auf Giftwirkung



Glossar

- **Gen**: informationstragender Abschnitt der DNA
- **Allel**: Variante eines Gens (z.B. Wildtyp (A) und Mutante (B))
- **Polymorphismus**: Auftreten mehrerer Genvarianten in einer Population (meist mit mehreren verschiedenen Phänotypen)
 - **SNP**: single nucleotide polymorphismus: Einzelnukleotidpolymorphismus
- **Genotyp**: Kombination von Allelen; AA, BB = homozygot, AB = heterozygot
- **Phänotyp**: Erscheinungsbild bei gegebenem Genotyp
- „**Droge**“: (Fremd)Stoff / Medikament / Gift

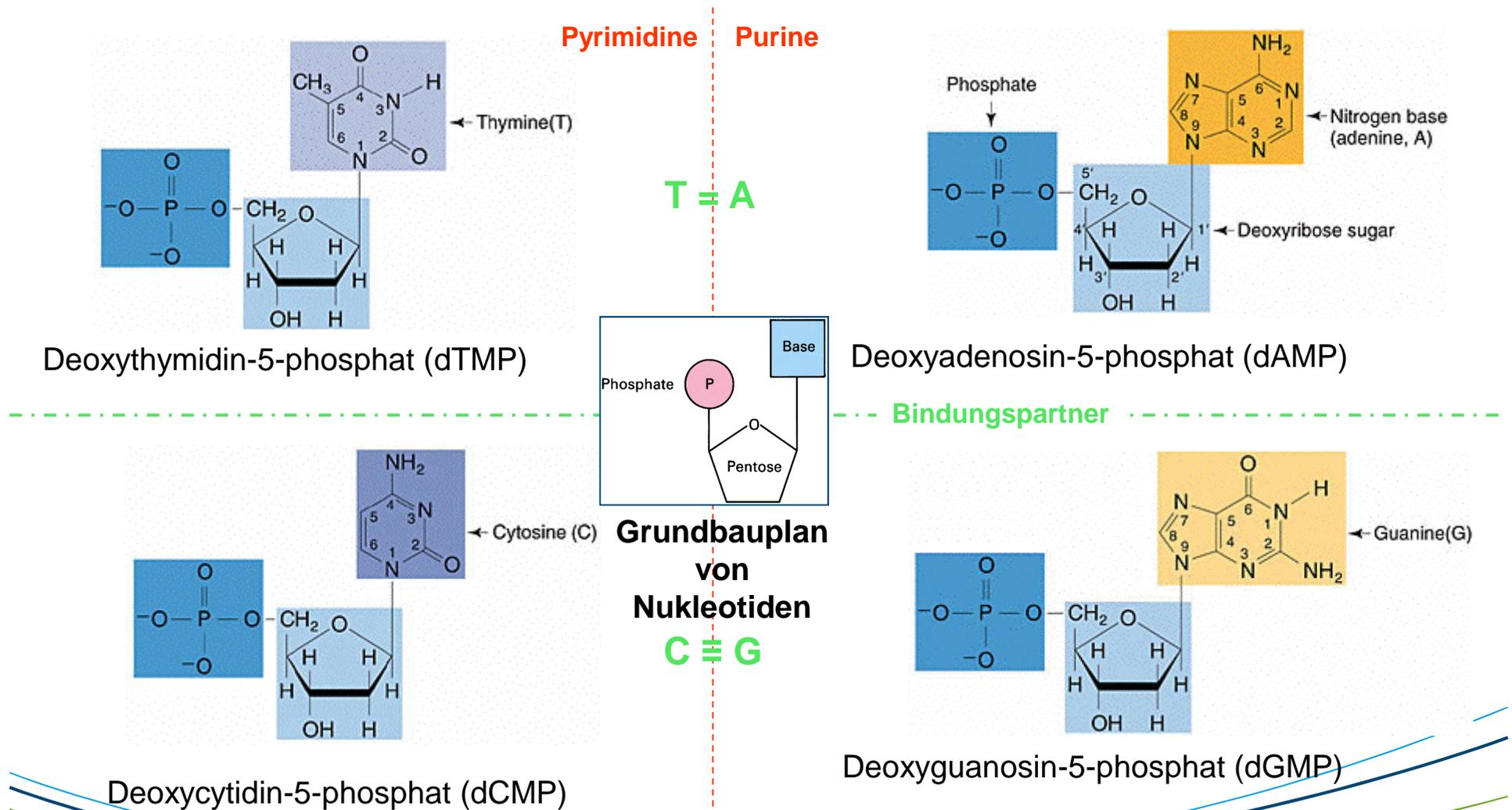
Einflüsse auf Drogenwirkung



Übersicht

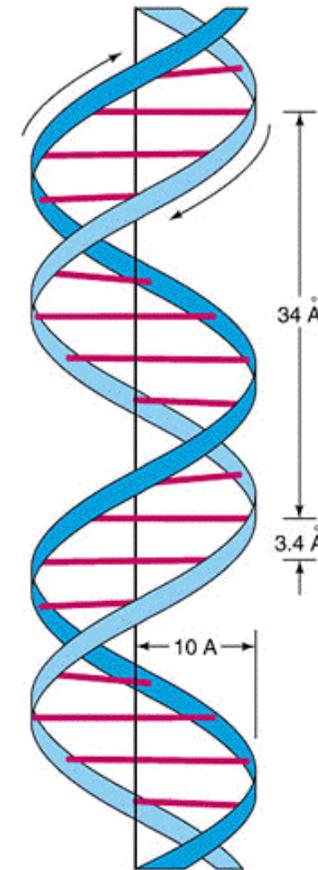
- Aufbau und Struktur der DNA
- Vererbung
- Stoffwechsel von Fremdstoffen
 - Phase-I-Enzyme
 - Cytochrom-P450
 - Phase-II-Enzyme
- Häufigkeit genetischer Varianten
- Toxikogenetik in der Forensik
- Ausblick: Toxikogenetik in der Zukunft

Grundstruktur und Nomenklatur der DNA-Bausteine



DNA-Struktur: Doppelhelix

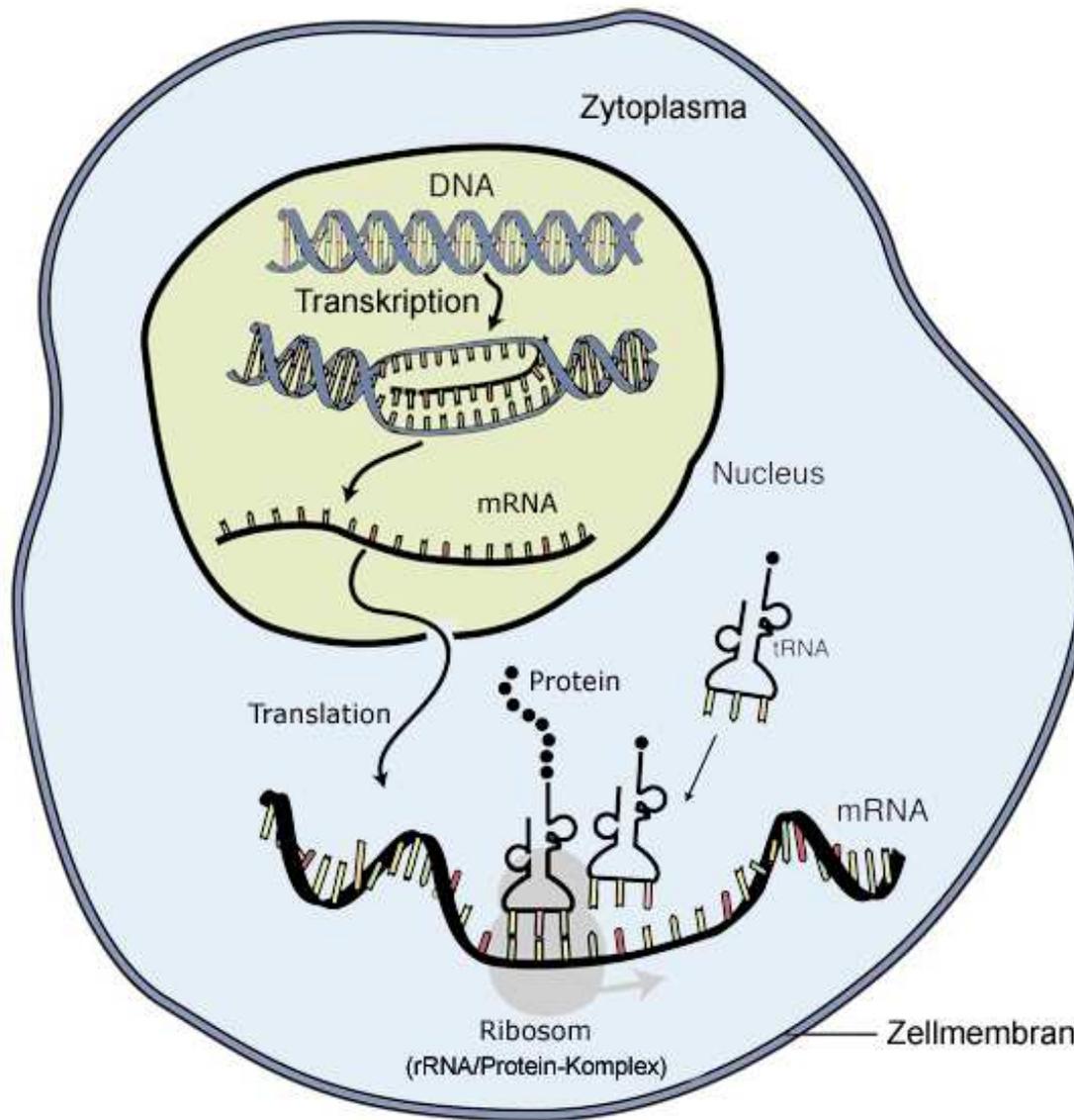
- » **Grundlagen für die Aufklärung der DNA-Struktur:**
 - Chargaff'sche Regel der Basenverhältnisse:
(T + C) = (A + G)
 - Hinweis auf Komplementarität der Basenpaare A-T und G-C
 - Röntgenstrukturanalysen (durchgeführt v.a. durch Maurice Wilkins u. Rosalind Franklin)
- » **Die beiden Stränge sind komplementär zueinander und antiparallel (5'-3'- bzw. 3'-5'- Strang)**
- » **Implikationen aus der DNA-Struktur:**
 - Sequenz der Nukleotide für genet. Information verantwortlich
 - Replikationsmodell wurde vorgeschlagen
- » **Nobelpreis 1962 für J. Watson u. F. Crick**
- » **2013: DNA wird 60!**



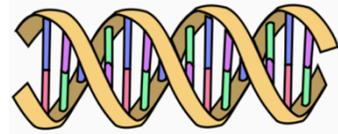
(34 Angström = 3,4 nm)

DNS-Doppelhelix nach James
Watson & Francis Crick, *Nature*,
1953

DNA → RNA → Protein



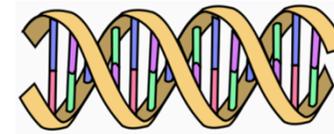
DNA → RNA → Protein



Wildtyp

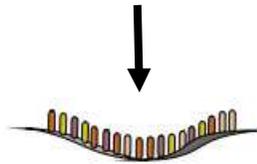
...ACT**GACTTC**...

DNA



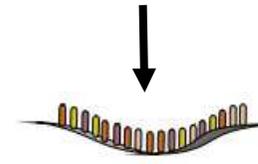
Mutante
(SNP)

...ACT**GAGTTC**...

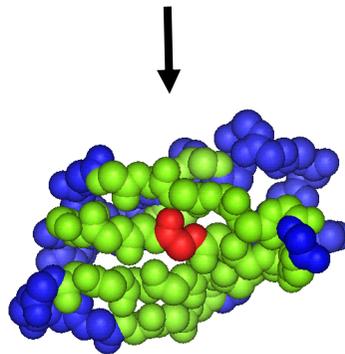


...ACU**GACUUC**...

RNA



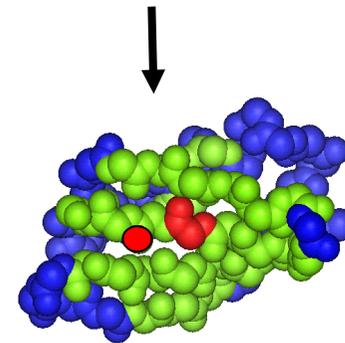
...ACU**GAGUUC**...



normale
Funktion

Protein

...**Asparaginsäure**...



veränderte
Funktion

...**Glutamin**...

Vererbung

Eltern (P)



Genotyp (2 Allele)

xx

xY

Gameten (Keimzellen);
1 Allel pro Keimzelle

x

x

x

Y

Nachkommen
(F₁)



xX

XY

xX

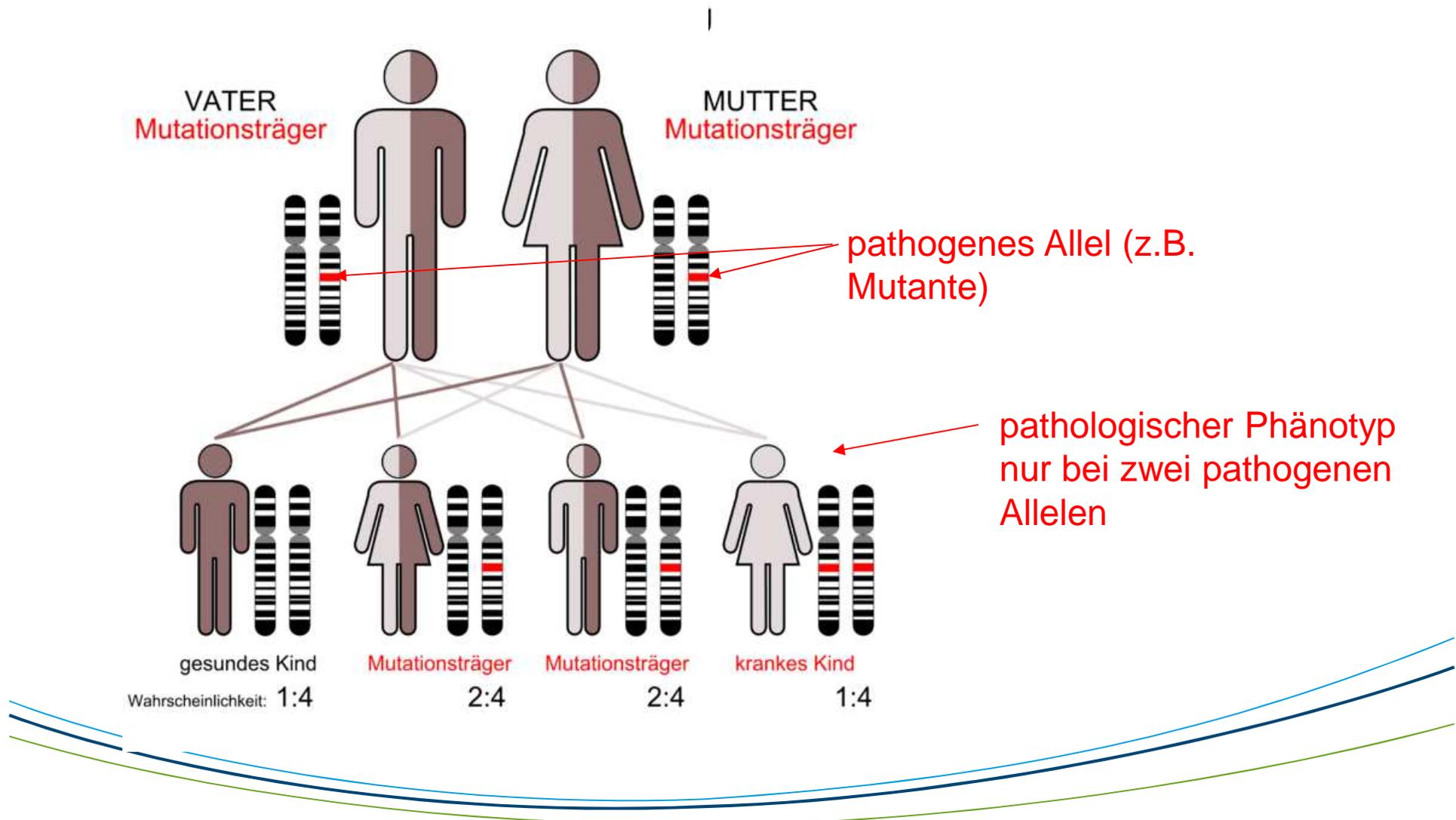
XY

Allele hier: X und Y

Ploidie: Angabe zum
Chromosomensatz
(Mensch: diploid)

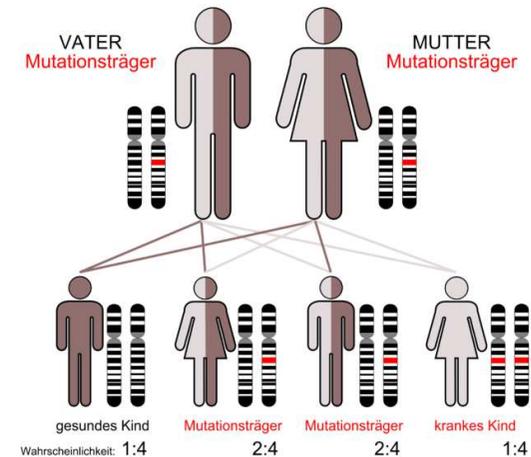
Vererbung

Autosomal-rezessiver Erbgang



Genetische Einflüsse auf Drogenwirkung

- **Genetische Disposition bedingt ca. 15 – 30 % der interindividuellen Unterschiede bei der Drogenwirkung**
- für bestimmte Substanzen bis zu 95%!
- beteiligt sind z.B. Mutationen in Genen für
 - Transportproteine (Kinetik)
 - Rezeptoren (Drogenziele)
 - Enzyme (Drogenmetabolismus)



Beispiel: **Maligne Hyperthermie** (lebensbedrohl. Narkosekomplikation), früher > 90% Versterben (heute: Therapie mit Dantrolen)

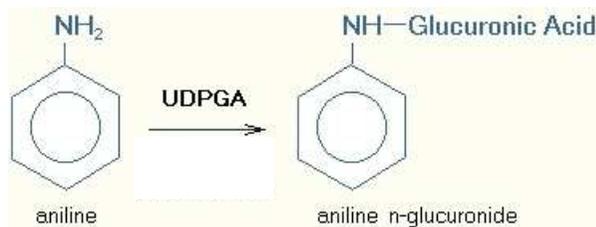
Auslösung: Gabe von Succinylcholin; Ursache: massive und unkontrollierte Calciumfreisetzung innerhalb der Muskelzelle wegen Mutation im RYR1-Gen

Stoffwechsel von Fremdstoffen

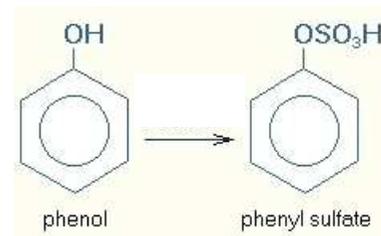
Phase I: oxidative Reaktionen zur Bildung oder Freilegung funktioneller Gruppen



Phase II: Konjugierungsreaktionen, die die Metaboliten i.A. hydrophiler und dadurch leichter ausscheidbar machen

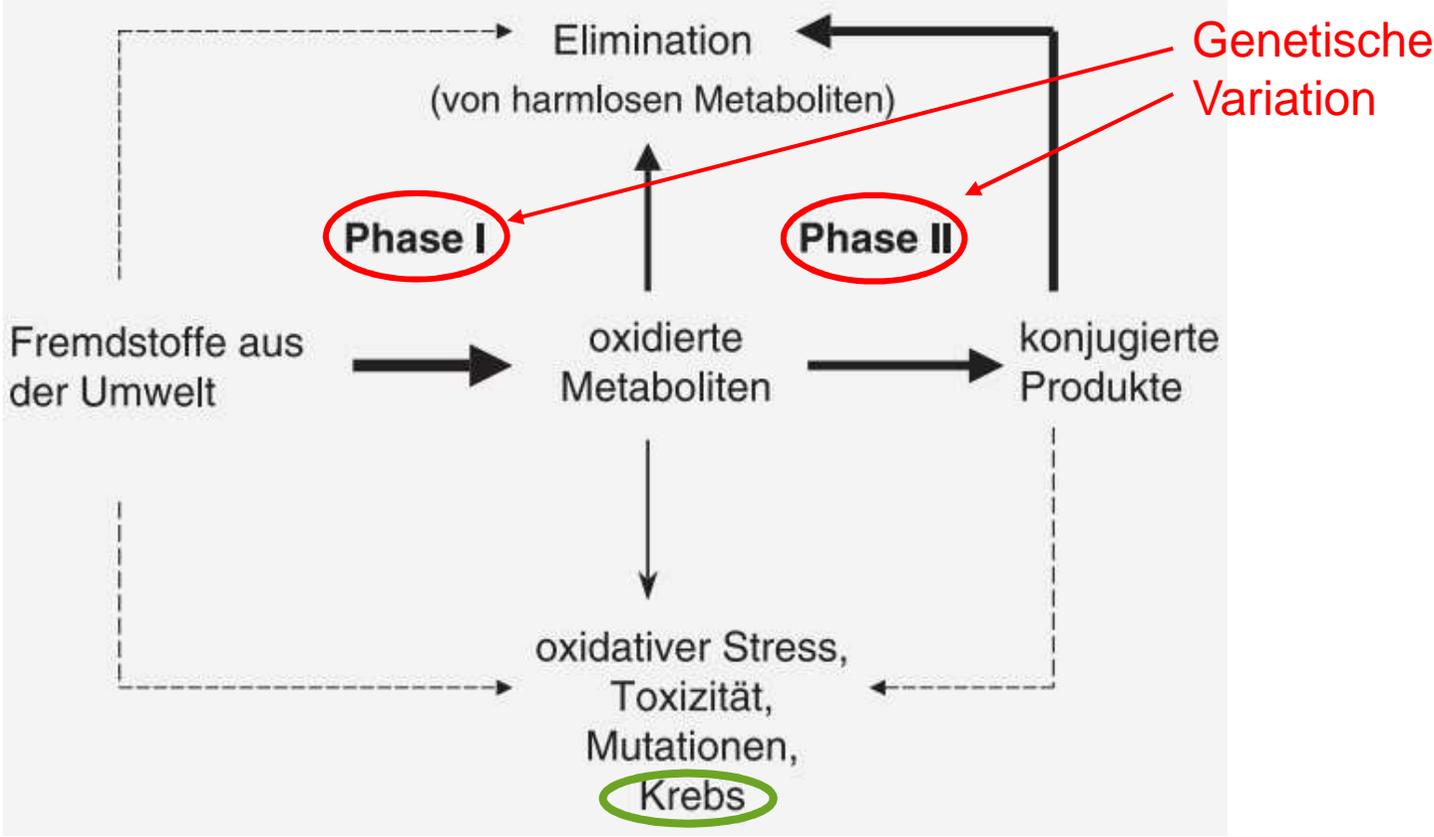


UDP-Glucuronosyltransferase



Sulfotransferase

Stoffwechsel von Fremdstoffen

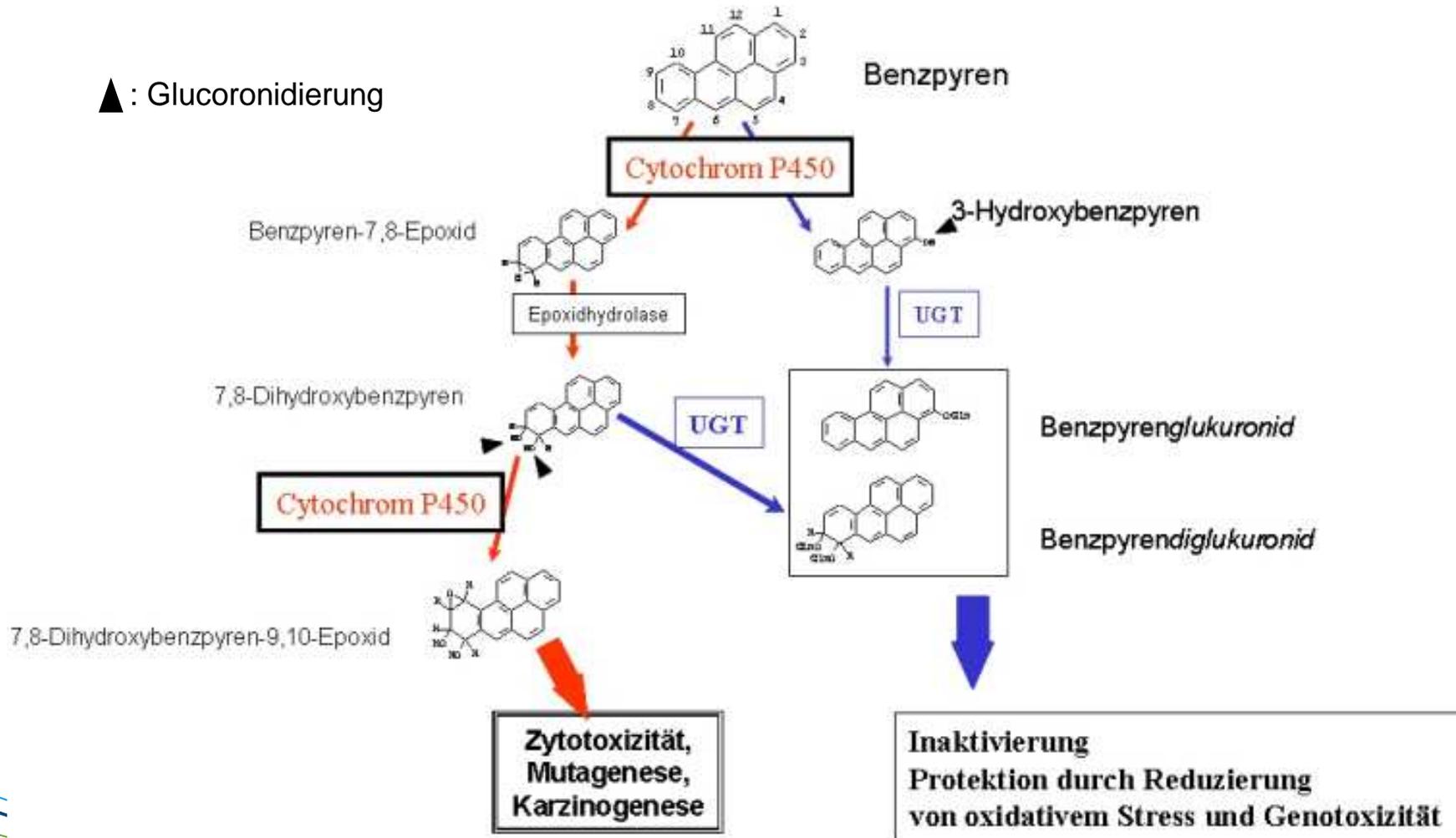


Chemische Kanzerogenese! (SoSe)

Stoffwechsel von Fremdstoffen

Beispiel: Benzo(a)pyren aus Tabakrauch

▲ : Glucuronidierung



Phase-I-Enzyme: CP-450

Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen; ca. 60 Gene mit zahlreichen Unterfamilien beim Menschen

CYP1 Familie:

CYP1A1; CYP1A2; CYP1B1

CYP2 Familie:

CYP2A6; CYP2A13; CYP2B6; CYP2C8; CYP2C9; CYP2C19; CYP2D6;
CYP2E1; CYP2F1; CYP2J2; CYP2R1; CYP2S1; CYP2W1

CYP3 Familie:

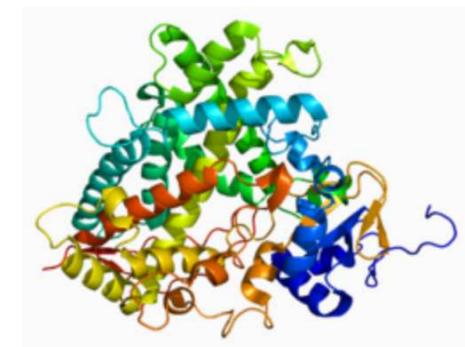
CYP3A4; CYP3A5; CYP3A7; CYP3A43

CYP4 Familie:

CYP4A11; CYP4A22; CYP4B1; CYP4F2

CYP>4 families:

CYP5A1; CYP8A1; CYP19A1; CYP21A2; CYP26A1



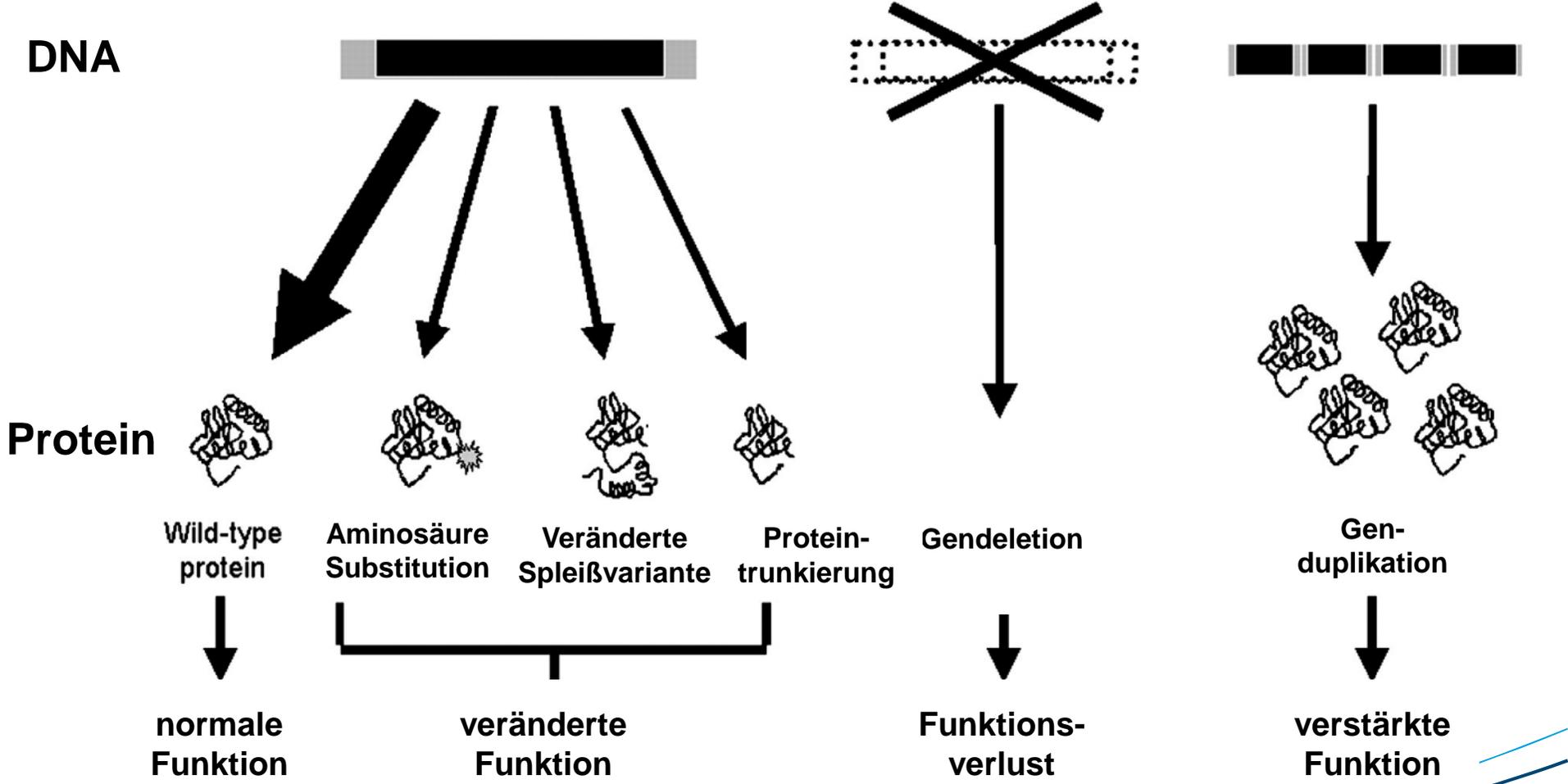
CYP1A2

Nomenklatur: <http://www.cypalleles.ki.se/>

Phase-I-Enzyme: CP-450

Reaktionstyp	Beispielverbindungen
Dehalogenierung	Halothan, Kohlenstofftetrachlorid, DDT, Triiodothyronin
N-Desalkylierung	Aminopyrin, Chlorpromazin, Ephedrin, Morphin
O-Desalkylierung	Phenacetin, Griseofulvin, Codein
S-Desalkylierung	6-Methylmercaptapurin, Methylthiobenzylthiazol, Dimethylsulfid
Desaminierung	Amphetamin, Ephedrin
Epoxidierung	Benzpyren, Aflatoxin
Hydroxylierung aliphatischer Verbindungen	Pentobarbital, Antipyrin, Tolbutamid, Imipramin
Hydroxylierung aromatischer Verbindungen	Salicylsäure, Phenobarbital, Acetanilid, synthetischen und natürlichen Östrogenen, Diphenyl
N-Oxidation	2-Acetylaminofluoren, Nicotinamid, Trimethylamin, Guanethidin, Chlorpromazin, Imipramin
Phosphothionatoxidation	Parathion
Sulfoxidation	Chlorpromazin

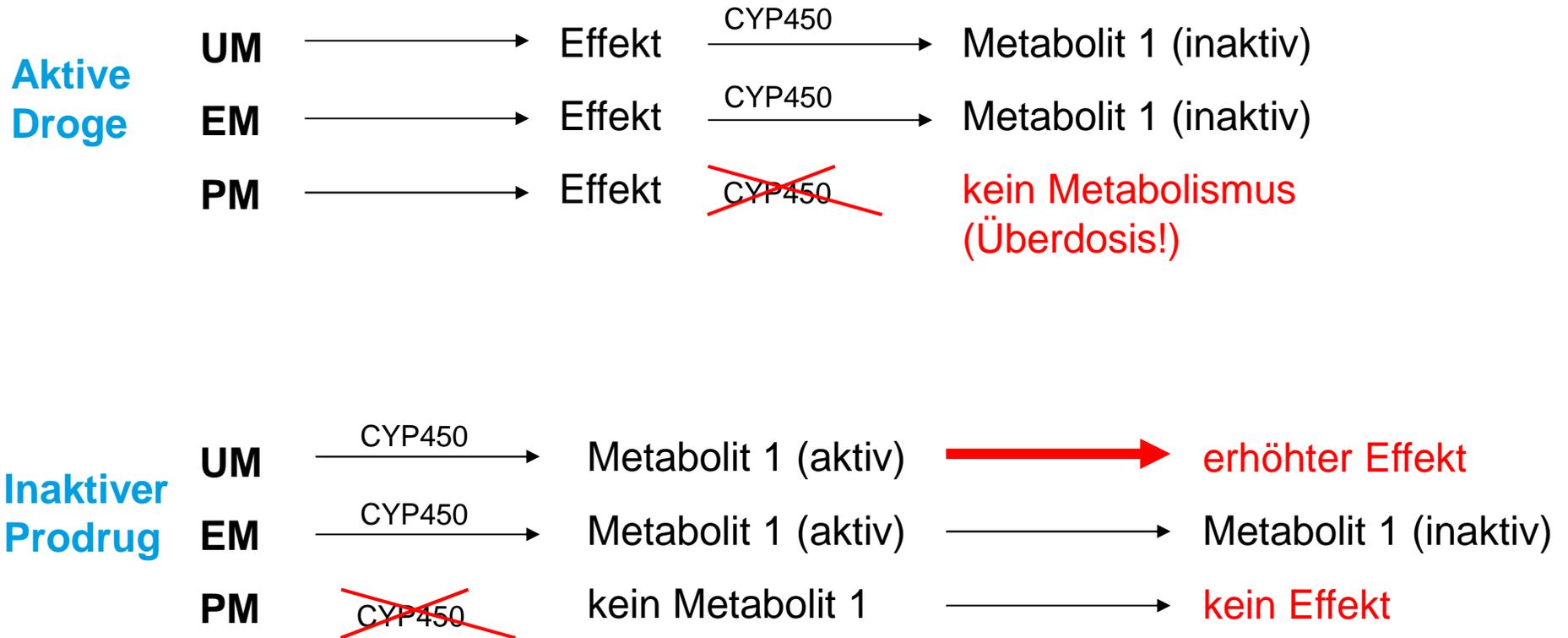
Zur Erinnerung: Auswirkungen von Mutationen auf Proteinfunktion



Cytochrom P450 Phänotypen

- **Ultra-rapid-Metabolizer (UM):** mehr als zwei funktionelle Kopien eines bestimmten Cytochrom P450-Gens (Duplikation)
- **Extensive Metabolizer (EM):** zwei funktionelle Kopien eines bestimmten Cytochrom P450-Gens
- **Intermediate Metabolizer (IM):** eine funktionelle Kopie eines bestimmten Cytochrom P450-Gens (heterozygot)
- **Poor Metabolizer (PM):** keine funktionelle Kopie eines bestimmten Cytochrom P450-Gens (Gendeletion)

Cytochrom P450 Phänotypen



Cytochrom P450 Polymorphie

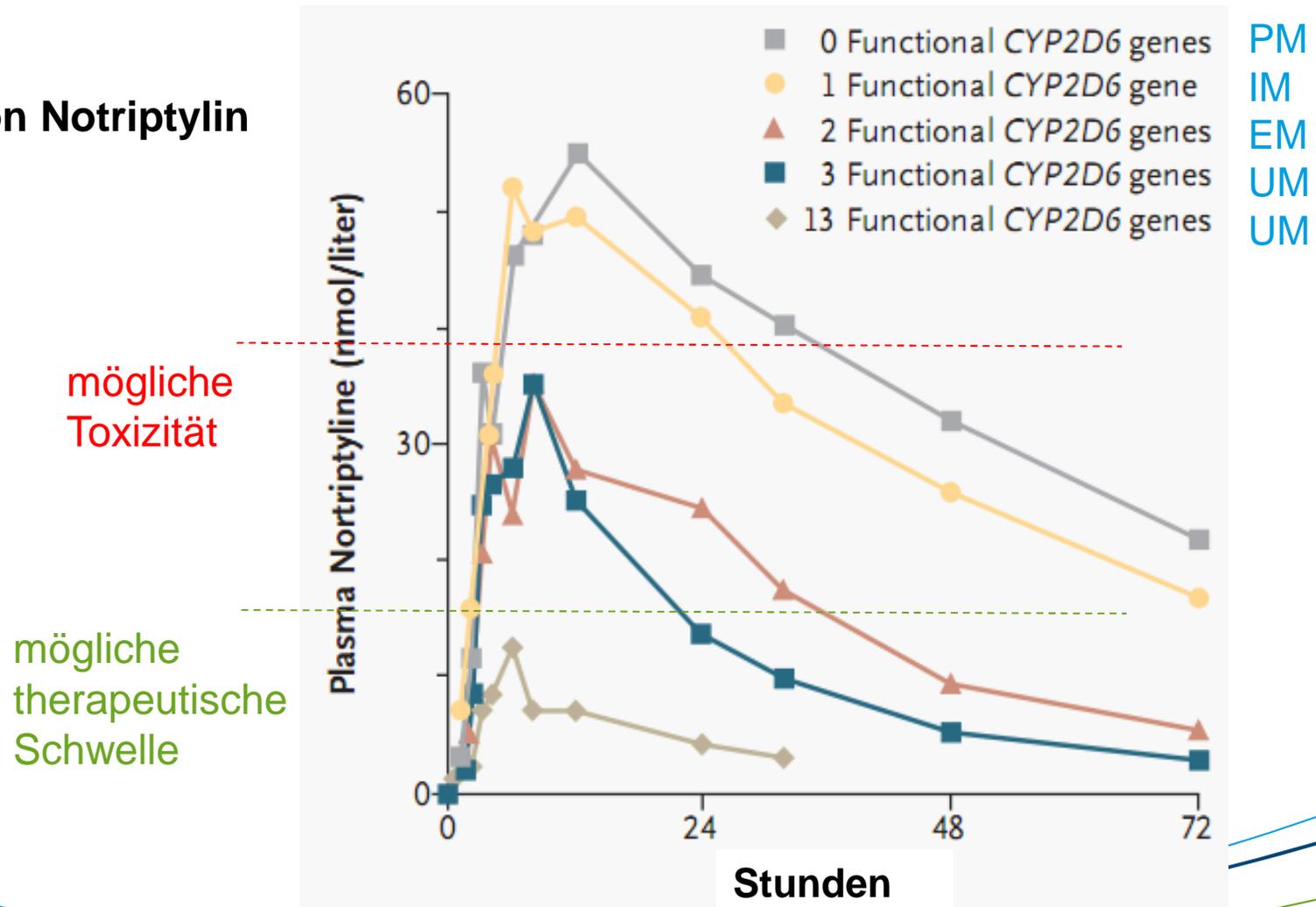
Beispiele

CP-450	Substrat (Wirkstoffe)	Beispiele für Auswirkungen genetischer Variation
<i>CYP2C9</i>	NSAI, Warfarin, Tolbutamid, Phenytoin	Erhöhte Antikoagulation von Warfarin
<i>CYP2C19</i>	Omeprazol, Mephenytoin	Peptischer Ulcus nach Omeprazol
<i>CYP2D6</i>	Antidepressiva (z.B. Nortiptylin), Codein, β -Blocker	Erhöhte AD-Toxizität, verringerte Codein-Analgesie
<i>CYP3A4 /3A5/ 3A7</i>	Cyclosporin, Tacrolimus, Calciumkanalblocker, Terfenadin, Etoposid, Lovastatin, Tamoxifen, Steroide	Reduzierte Wirksamkeit von Tacrolimus nach Organtransplantationen

Cytochrom P450 Phänotypen

Beispiel CYP2D6

Gabe von Nortriptylin



Phase-II-Enzyme

wichtige Rolle bei
der Detoxifikation !



- **Glutathion-S-Transferasen (GST)**

→ elektrophile Ausgangsverbind.; Metaboliten mit L-Glutathion

- **N-Acetyltransferasen (NAT)**

→ N- und O-Acetylierung von Fremdstoffen; intramolekularer Transfer von Acetyl-Gruppen

- **Sulfotransferasen (SULT)**

→ Konjugation von Verbindungen mit der Sulfo-Gruppe (aus PAPS) zu Schwefelsäureestern

Phase-II-Enzyme (Forts.)

- **UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT)**

→ Konjugation körpereigener Verbindungen und von Fremdstoffen mit Glucuronsäure

- **Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (kein Phase II-Enzym!)**

- Schlüsselenzym in Erythrozyten gegen oxidativen Stress
- Bereitstellung reduzierten Glutathions
- bei Versagen (z.B. durch Amino- und Nitroaromaten, Sulfonamide): Protein- und Zellschäden bis hin zu Hämolyse
- G-6-PDH-Mangel genetisch bedingt; hunderte genetische Varianten!

Polymorphe Phase-II-Enzyme

Beispiele

<u>Gen</u>	<u>Substrate (Beispiel)</u>
<i>GSTM1</i>	4-Nitrobenzylchlorid, Epoxide der polyzyklischen Aromaten
<i>GSTM3</i>	Wasserstoffperoxid
<i>GSTP1</i>	Acrolein, Ethacrynsäure, Chlordinitrobenzol
<i>GSTT1</i>	Dichlormethan, Halomethane, Ethylenoxid, Haloethane
<i>NAT1</i>	Aromatische Amine, p-Aminosalizylsäure, p-Aminobenzoessäure
<i>NAT2</i>	Aromatische Amine, Sulfamethazin
<i>SULT1A1</i>	Phenole, 4-Nitrophenol, Arylverbindungen
<i>SULT1A3</i>	Phenole, Katecholamine
<i>SULT2A1</i>	Steroide, Hydroxyacetylaminofluoren
<i>UGT1A1</i>	Bilirubin, 1-Naphtol
<i>UGT1A6</i>	3-Hydroxy-Benz[a]pyren, 2-Naphtylamin

Häufigkeit genetischer Varianten



- Häufigkeiten genetischer Varianten von Phase I und II Enzymen stark abhängig von Ethnizität
- Europäer:
 - inaktive bzw. weniger aktive Phase-I-Phänotypen bei CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6 zwischen 2 und 10 %.
 - inaktive bzw. weniger aktive Phase-II-Phänotypen bei GSTM1, GSTM2 und NAT2 bei ca. 15 – 60%!



Anwendung der Kenntnis von FME-Polymorphie bei der chemischen Risikobewertung

- Werte wie
 - maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK)
 - no observed adverse effect level (NOAEL) bzw. benchmark dose (BMD)
 - acceptable daily intake (ADI) / tolerable daily intake (TDI)
 - reference dose (RfD)

stammen aus Tierversuchen und müssen mit *Unsicherheitsfaktoren* berechnet werden

- der Standard-Unsicherheitsfaktor ist ca. 100 und setzt sich aus zwei Faktoren für Artunterschiede und menschliche Variation (je 10) zusammen
- Faktoren müssen pharmakokinetische und –dynamische Unterschiede abbilden

Anwendung der Kenntnis von FME-Polymorphie bei der chemischen Risikobewertung

→ Kenntnis von FME-Polymorphie erlaubt Ermittlung und Anwendung von z.B. pathway-spezifischen Unsicherheitsfaktoren:

Pathway	N_c	N_s	n	CV_{LN}	Ratio GM	Pathway-related uncertainty factors		
						95th	97.5th	99th
<i>Phase I</i>								
Monomorphic pathways								
CYP1A2	4	30	379	30		1.6	1.8	2.0
CYP2A6	3	18	181	29		1.6	1.7	1.9
CYP2E1	2	20	263	26		1.5	1.7	1.8
CYP3A4	12	107	1381	46		2.1	2.3	2.7
ADH	1	15	281	24		1.5	1.6	1.8
Hydrolysis	4	22	166	28		1.6	1.7	1.9
Polymorphic pathways								
CYP2C9 (NP)	3	41	481	32		1.7	1.9	2.1
CYP2C9 (*1/*1, *1/*2, *1/*3)	2	3, 3, 3	15, 13, 15	12–25	1.1–1.7	1.3–2.1	1.4–2.1	1.5–2.2
CYP2C19 (NP)	3	7	91	43		2.0	2.3	2.6
CYP2C19 (EM)	3	7	56	60		2.5	3.1	3.8
CYP2C19 (PM)	3	4	21	20	31	45	48	52
CYP2D6 (NP)	8	41	520	63		3.0	3.7	4.7
CYP2D6 (EM)	9	24	192	66		3.5	4.4	5.8
CYP2D6 (PM)	7	13	74	29	9.0	21	24	26

Anwendung der Kenntnis von FME-Polymorphie bei der chemischen Risikobewertung

Pathway	N_c	N_s	n	CV_{LN}	Ratio GM	Pathway-related uncertainty factors		
						95th	97.5th	99th
<i>Phase II</i>								
Monomorphic pathways								
Glucuronidation	15	87	906	29		1.6	1.8	2.0
Glycine conjugation	2	21	205	21		1.4	1.5	1.6
Sulphation	3	13	97	26		1.5	1.7	1.8
Polymorphic pathways								
NAT (FA)	2	15	191	32		1.7	1.8	2.1
NAT (SA)	2	16	472	22	3.1	4.4	4.8	5.2
<i>Renal excretion</i>								
Renal excretion	6	48	444	21		1.4	1.5	1.6

Quelle: Dorne, J. L. C. M., Walton, K., & Renwick, A. G. (2005). Human variability in xenobiotic metabolism and pathway-related uncertainty factors for chemical risk assessment: a review. *Food and chemical toxicology*, 43(2), 203-216.

Toxikogenetik in der Forensik

Forensische Toxikologie: unterstützt mit Hilfe toxikologischer, pharmazeutischer und chemischer Verfahren die Untersuchung von unnatürlichen Todesfällen, Vergiftungen und Drogen- sowie Medikamentenmissbrauch.

Relevanz der Toxikogenetik:

Einflüsse genetischer Varianten auf

- Vergiftungen (auch Drogenwirkung)
 - akzidentell
 - suizidal
 - homizidal
- Medikamentenwirkung
 - Kunstfehler (MH bei bekannter Mutation)



Toxikogenetik in der Forensik

Forens.toxikologische Routine

- Zur Abgrenzung des akuten vom chronischen Konsum: Messung des Verhältnisses von Parent Drug zu Metabolit (P/M)
- Besondere Schwierigkeiten: post-mortem Toxikologie
- P/M: auch beeinflusst von genetischen Varianten
- Toxikogenetik relevant für:
 - Opioide
 - Tramadol
 - Kodein
 - Dihydrokodein
 - Oxycodon
 - Ethylmorphin
 - Methadon
 - Fentanyl
 - Ecstasy
 - Benzodiazepine
 - Antidepressiva und Antiepileptika
 - Carisoprodol



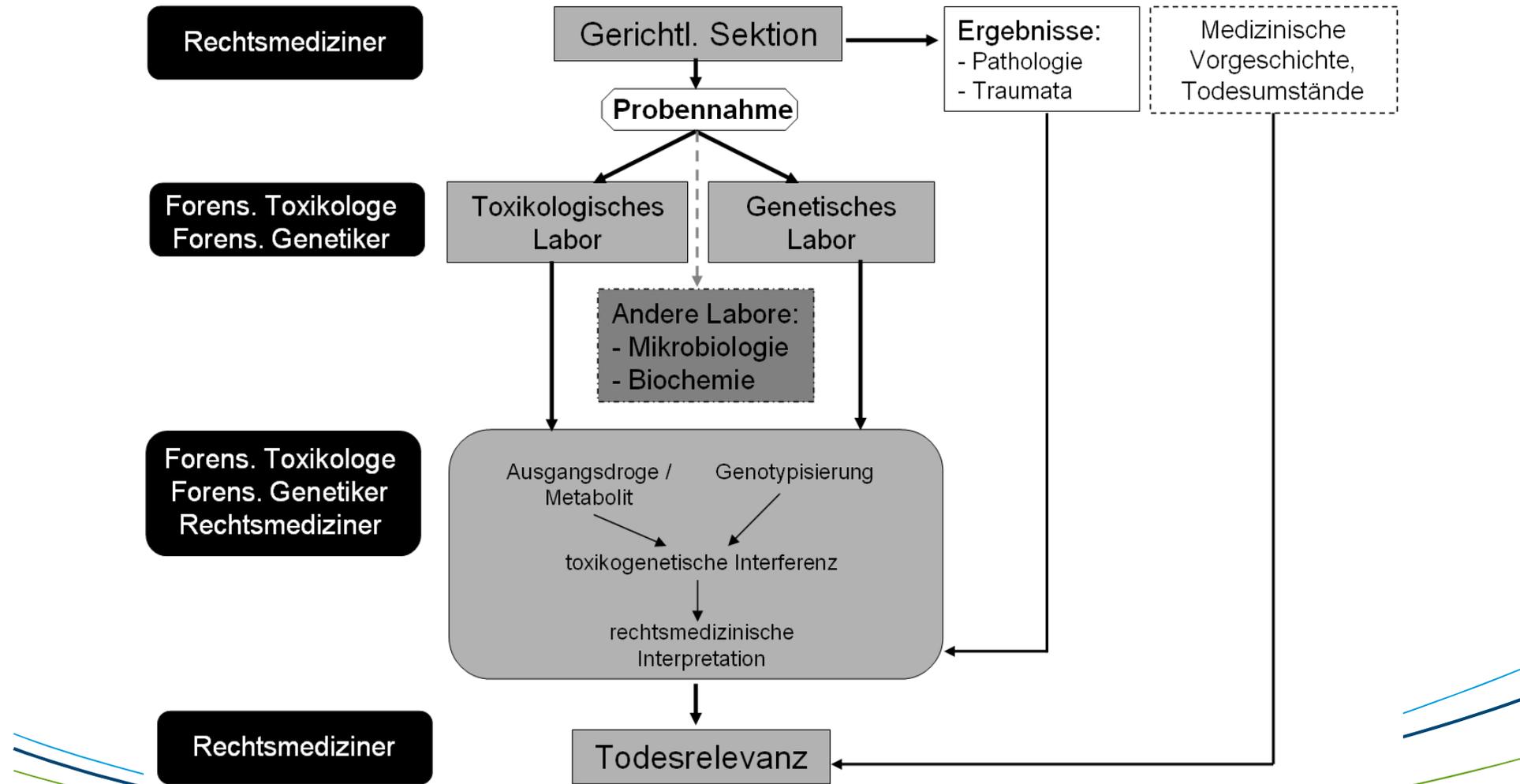
Toxikogenetik in der Forensik

Forens.toxikologische Routine

Analytische Befunde / sonstige Information	Zu bestimmende Faktoren		Genetische Analyse angeraten?
	Beteiligung eines polymorphen Enzyms?	Wechselwirkung mit anderen Drogen?	
Hoher Wert für P/M: Unfall oder Suizid?	Ja	Ja Nein	Abwägen Ja Nein
	Nein	-	Nein
Abnorm hoher oder niedriger Wert für P/M	Ja	Ja Nein	Abwägen Abwägen Nein
	Nein	-	Nein
Nebenwirkungen laut Anamnese	Ja	Ja Nein	Abwägen Abwägen Nein
	Nein	-	Nein
Hoher Wert für P/M: Einnahme gemäß Verschreibung wird behauptet	Ja	Ja Nein	Abwägen Ja Nein
	Nein	-	Nein

Toxikogenetik in der Forensik

Integrative Analyse



Toxikogenetik in der Zukunft

Zukunftsvision: Individualisierte Toxikologie

Ziel: Berücksichtigung aller bekannten toxikogenetischen Varianten und deren Einfluss auf die Verstoffwechselung von Giftstoffen

Anwendung:

- *individuelle MAKs*
- *Sicherheitsangaben auf Produkten*
- *angepasste chemische Risikobewertung* (z.B. für stark polymorphe Populationen)
- *In der Offizin:* Überprüfung von Wirkstoff und Dosis eines Medikaments hinsichtlich des individuellen genetischen Inventars des Patienten

Voraussetzung: Kenntnis aller relevanten toxikogenetischen Varianten und deren Auswirkungen

Toxikogenetik in der Zukunft

Individualisierte Toxikologie – Kein unerreichbares Ziel!

Next-Generation-Sequencing

- neue Sequenzierungstechnik, die das Auslesen des gesamten Genoms in weniger als einem Tag für weniger als 1000 €
- ermöglicht die Erhebung aller bekannten Polymorphismen (SNPs, Indels etc.) in drogenstoffwechselrelevanten Genen in einem einzigen Arbeitsschritt
- *Denkbar*: individuelles ToxGen-Profil (passt auf USB-Stick oder Smartphone)

- Mögliches Zukunftsszenario:

- *Arzt*: keine Verschreibungen „gefährlicher“ Medikamente bzw. Anpassung der Dosis
- *Apotheke*: (auf Wunsch) tox.-gen. Sicherheitskontrolle gekaufter Medikamente und Dosis-Beratung
- *Arbeitsplatz*: Betriebsarzt kann individuelle MAKs verordnen bzw. Arbeiten verbieten