

Genetik der Antikoagulantien-Resistenz bei Menschen und Nagetieren

Müller, C.R.

Institut für Humangenetik der Universität Würzburg, Biozentrum, Am Hubland, 97074 Würzburg

Zusammenfassung

Mit der Klonierung des VKORC1-Gens konnte die lange gesuchte Vitamin K-Epoxid-Reduktase identifiziert werden. Dieses Schlüsselenzym des Vitamin K-Zyklus sorgt für die Rückgewinnung von reduziertem Vitamin K, das für die γ -Carboxylierung der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X (und einiger anderer Proteine) benötigt wird. Damit konnte auch das Zielprotein der Substanzgruppe der Cumarine charakterisiert werden, die als Antikoagulantien zur Behandlung und Vorbeugung von Thrombosen weltweit seit Jahrzehnten im Einsatz sind. Dieselbe Substanzklasse wird auch zur Kontrolle von kommensalen Nagetierpopulationen verwendet.

Mutationen in VKORC1 führen beim Menschen entweder zu einer Blutungsneigung als Folge einer mangelhaften Carboxylierung der Vitamin K-abhängigen Faktoren (VKCFD2) oder zur Resistenz gegenüber Cumarinen (Warfarin-Resistenz). Beide Erkrankungen sind jedoch ausgesprochen selten. Bei Warfarin-resistenten Ratten und Mäusen hingegen konnte in zahlreichen Regionen weltweit ein breites Spektrum von VKORC1-Mutationen beobachtet werden.

Rekombinant exprimiertes VKORC1 kann Vitamin K-Epoxid reduzieren und ist sensitiv gegenüber Warfarin. Die funktionelle Analyse der beobachteten Mutationen ist aber dadurch erschwert, dass die VKOR-Enzymreaktion in einem lipophilen Milieu abläuft und deshalb *in vitro* nur eingeschränkt untersucht werden kann. Der Mechanismus der Warfarin-Resistenz ist daher noch nicht vollständig verstanden.

1. Der Vitamin K-Zyklus

In den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts untersuchte der dänische Biochemiker Hendrik Dam im Rahmen seiner Arbeiten über den Stoffwechsel des Cholesterins an Hühnern die Wirkung von fettfreiem Futter. Als Folge dieser Mangelernährung beobachtete er bei den Tieren starke subcutane und innere Blutungen und Knochendeformationen. Er schloss daraus, dass es einen fettlöslichen „anti-hämorrhagischen Faktor“ geben müsse, den er schließlich isolieren konnte und Vitamin K nannte (K für Koagulation). Vitamin K ist ein Derivat des 2-Methyl-1,4-Naphtochinons (Menadion). Natürliche und synthetische Vitamin K-Derivate unterscheiden sich in ihren lipophilen Seitenketten. Im Jahre 1943 erhielt Dam zusammen mit Edward A. Doisy, der die Struktur des Moleküls aufgeklärt und durch Synthese bestätigt hatte, für diese Entdeckung den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

Der Tagesbedarf an Vitamin K liegt für Erwachsene bei 60-80 μg und wird bei einer üblichen Mischkost gedeckt, v.a. durch grünes Gemüse. Auch Darmbakterien können Vitamin K synthetisieren.

Die einzige bekannte Stoffwechselfunktion, an der Vitamin K beteiligt ist, ist die γ -Carboxylierung von Proteinen. Bei dieser post-translationalen Modifikation werden interne Glutamat-Seitenketten zu Carboxy-Glutamaten (abgekürzt Gla) oxidiert. Reduziertes Vitamin K (VKH_2) liefert dazu als Kofaktor die benötigten Reduktionsäquivalente. VKH_2 wird dabei zum 2,3-Epoxid (VKO) oxidiert. Wegen der geringen Bioverfügbarkeit des VKH_2 wird das Epoxid in einer unmittelbar anschließenden Reaktion reduziert und so VKH_2 wieder zurück gewonnen. Diesen Kreislauf nennt man den Vitamin K-Zyklus (Abb. 1). Die Reaktionen laufen an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums ab. Bereits 1991 konnte das Gen für die γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX; OMIM *137167) kloniert werden (Wu et al. 1991). Andere Komponenten des Zyklus konnten jedoch weder biochemisch noch molekular-genetisch charakterisiert werden.

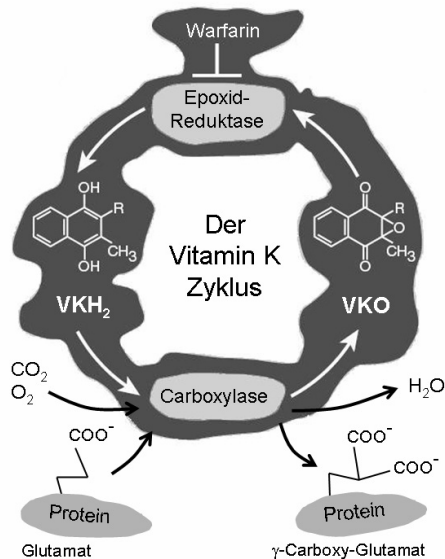


Abb. 1 Der Vitamin K-Zyklus: Die post-translationale γ -Carboxylierung von internen Glutamaten in Vitamin K-abhängigen Proteinen geht einher mit dem stöchiometrischen Verbrauch von Vitamin K-Hydrochinon (VKH₂), das dabei zu Vitamin K-2,3-Epoxid (VKO) oxidiert wird. Wegen der geringen chemischen Stabilität und Bioverfügbarkeit des Hydrochinons wird das Epoxid in zwei Reduktionsschritten zum Hydrochinon reduziert. Das ausführende Enzym wurde Vitamin K-Epoxid-Reduktase genannt und ist identisch mit VKORC1. Dieses Protein wird durch Warfarin und seine Derivate gehemmt. (Abbildung verändert nach Sadler, 2004 Nature 427: 493-4.)

2. Vitamin K-abhängige Proteine

Beim Menschen und anderen Säugetieren sind ein knappes Dutzend Proteine bekannt, die post-translationally carboxyliert werden müssen. Am besten untersucht sind die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie die antikoagulatorischen Proteine C, S und Z. Weitere Mitglieder sind die Regulatoren des Knochenstoffwechsels Osteocalcin und Matrix-Gla-Protein. Alle Vitamin K-abhängigen Proteine sind charakterisiert durch eine sog. Gla-Domäne, d.i. eine Gruppe von 6-12 benachbarten Glutamat-Resten, die sequentiell carboxyliert werden können. Ferner besitzen sie eine Propeptid-Bindungsdomäne, an die die Carboxylase andockt.

Die Gerinnungsfaktoren entfalten ihre volle Aktivität erst nach Bindung an Phospholipidmembranen, die durch Ca^{2+} vermittelt wird. Die Carboxy-Glutamate wirken dabei als starke Ca^{2+} -Chelatoren und verstärken die Bindung, so dass die Aktivität um mehrere Zehnerpotenzen gesteigert werden kann. Unvollständige Carboxylierung, z.B. durch Vitamin K-Mangel, führt zu einer verzögerten Blutgerinnung oder gar zu spontanen Blutungsereignissen.

3. Vitamin K-Antagonisten und Antikoagulation

Ebenfalls seit den 1930iger Jahren ist bekannt, dass Derivate des sekundären Pflanzeninhaltsstoffs Cumarin, dem u.a. frisches Heu und Waldmeister ihren Duft verdanken, die Blutgerinnung hemmen können. Entdeckt wurde dies durch spontane Blutungen bei Weiderindern, die verschimmelten Klee gefressen hatten. Die systematische Analyse des Phänomens führte zu der Erkenntnis, dass Bis-Hydroxy-Cumarine und andere Derivate potente Antagonisten des Vitamins K sind. Ihr physiologischer Angriffspunkt ist die Reduktion des VKO im Vitamin K-Zyklus (Abb. 1). Seit den fünfziger Jahren macht man sich in der Humanmedizin die Hemmung des Vitamin K-Zyklus therapeutisch zu Nutzen: Cumarin-Derivate (z.B. WarfarinTM oder Marcumar[®]) werden weltweit zur Behandlung und Prophylaxe von thrombo-embolischen Ereignissen eingesetzt.

Diese „Blutverflüssiger“ sollen unzeitige Gerinnsel auflösen bzw. verhindern, die in großen Gefäßen zu Schlaganfällen oder Herzinfarkt führen können, und damit zu den führenden Todesursachen in westlichen Zivilisationen zählen. Derzeit sind Cumarin-Derivate die einzigen Antikoagulantien, die oral und langfristig verabreicht werden können. Ihre Dosierung ist v.a. in der Anfangsphase schwierig, weil die natürliche Versorgung mit Vitamin K erheblich schwanken kann und außerdem genetische Faktoren die Effizienz der Antikoagulation steuern (s.u.). So kommt es trotz der im Allgemeinen guten Wirkung auch immer wieder zu schweren Komplikationen und Todesfällen durch spontane Blutungen.

In den 1950iger Jahren hat man begonnen, Cumarine auch als Rodentizide einzusetzen. Bei phobischen Spezies wie Ratten und Mäusen wirken Akutgifte i.A. nur sehr kurzfristig, weil die Köder nicht mehr angenommen werden, sobald die ersten Tiere am Köderplatz verendet sind. Da die Wirkung der Cumarine aber erst mit tagelanger Verzögerung eintritt, können die Tiere den Zusammenhang mit dem Köder nicht herstellen. In entsprechend hoher Dosierung waren Curmarine (z.B. Warfarin) sehr effizient zur Kontrolle von Ratten- oder Mäuseplagen. Schon Ende der fünfziger Jahre wurde aber von resistenten Rattenpopulationen in England berichtet. Nachfolgend traten resistente Nager-Populationen weltweit auch in vielen anderen Ländern auf. Die Entwicklung potenterer Cumarin-Derivate der zweiten Generation (z.B. Bromadiolon, Coumatetralyl, Difenacoum) brachte kurzzeitige Entlastung, jedoch entwickelte sich auch gegen diese Wirkstoffe sehr bald Resistenz.

4. Erbliche Störungen des Vitamin K-Zyklus

Beim Menschen sind drei genetische Störungen des Vitamin K-Zyklus bekannt. Der kombinierte Mangel aller Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren führt zu spontanen Blutungen, die sehr schwerwiegend sein können, wenn sie intracranial und/oder *in utero* auftreten. Daneben können Defekte des Knorpelwachstums bzw. der Ossifizierung des Knorpels auftreten. Die Mehrzahl der Patienten ist durch regelmäßige Gabe von Vitamin K effektiv therapierbar. Es handelt sich um eine autosomal-rezessive Erkrankung. Ein Teil der Fälle hat seine genetische Ursache in Mutationen der γ -Glutamyl-Carboxylase (VKCFD1, OMIM #277450). In anderen Familien konnte jedoch die GGX als genetische Ursache ausgeschlossen werden, so dass der Defekt in der Epoxid-Reduktase vermutet wurde (VKCFD2, OMIM #607473). Beide Formen sind extrem selten.

Ebenfalls selten sind Fälle von genetisch bedingter kompletter Warfarin-Resistenz beim Menschen (OMIM #122700). Die wenigen publizierten Familien legen einen autosomal-dominanten Erbgang nahe. (Deutlich häufiger ist eine Überempfindlichkeit gegenüber Warfarin, die in allelischen Varianten des CYP2C9-Gens (OMIM *601130) begründet ist. Das P450-Enzym CYP2C9 katalysiert die ersten Schritte beim Abbau von Warfarin. Die Allele CYP2C9*2 (p.Arg144Cys) und *3 (p.Ile359Leu) besitzen nur 12 bzw. 5 % der Wildtyp-Aktivität. Dem entsprechend ist die biologische Halbwertszeit von Warfarin in Trägern dieser Allele länger als bei Personen mit dem Wildtyp-Allel CYP2C9*1 und eine effektive Antikoagulation kann mit einer geringeren Dosis erzielt werden.)

Auch die Warfarin-Resistenz bei Mäusen und Ratten ist genetisch bedingt. Greaves und Ayres (1967, 1969) konnten zunächst durch Kreuzungsexperimente einen monogenen, dominanten Erbgang bei *R. norvegicus* belegen. Kohn und Pelz (1999) kartierten dann das Resistenz-Gen *Rw* auf Chromosom 1 der Ratte in einer Koppelungsgruppe, die ortholog zu einem Abschnitt auf Chromosom 7 der Maus ist, der den korrespondierenden *War*-Locus enthält (Wallace and MacSwiney, 1976).

5. Identifizierung der Vitamin K-Epoxid-Reduktase (VKORC1)

Ausgangspunkt für die Identifizierung der VKOR war eine konsanguine Familie libanesischer Herkunft, bei der 5 der 8 Kinder an einem angeborenen Mangel aller Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren litten. Mutationen im GGX-Gen konnten ausgeschlossen werden, so dass diese Familie die Möglichkeit bot, den Genort für die zweite Form des kombinierten Gerinnungsfaktor-Mangels (VKCFD2) zu kartieren. Durch eine genom-weite Koppelungsanalyse konnte ein perizentrisches Intervall auf Chromosom 16 identifiziert werden, welches das verantwortliche Gen enthalten musste (Fregin et al. 2002). Bei der Identifizierung des gesuchten Gens half folgende Überlegung: sowohl VKCFD2 als auch Warfarin-Resistenz haben ihre Ursache in einer Störung des Vitamin K-Zyklus. Es wäre also denkbar, dass beide Phänotypen auf Mutationen ein und desselben Gens zurück zu führen sind. Unter dieser Hypothese konnte die Information aus der Kartierung der Resistenz-Gene bei den Nagetieren zur Eingrenzung des Kandidatenintervalls verwendet werden:

Die *Rw/War*-Koppelungsgruppe befindet sich im menschlichen Genom auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16, alle Gene des langen Arms von 16 konnten daher außer Betracht bleiben. Unter den 129 Genen des fraglichen Abschnitts auf Chromosom 16p konnte schließlich ein Gen – zunächst unbekannter Funktion – gefunden werden, das Mutationen sowohl bei den VKCFD2-Patienten als auch bei Patienten mit Warfarin-Resistenz aufwies. Dieses Gen wurde *VKORC1* genannt für Vitamin K-Oxido-Reduktase component 1 (Rost et al. 2004; Li et al. 2004).

6. Mutationen des *VKORC1*-Gens.

Das *VKORC1*-Gen umfasst 5,1 kb mit drei codierenden Exons. Bei der Sequenzierung von Patienten mit VKCFD2 konnte bisher erst eine einzige homozygote Mutation (p.Arg98Trp) in drei unabhängigen Familien identifiziert werden (Rost et al. 2004, Marchetti et al. 2008). Das bestätigt den rezessiven Erbgang der VKCFD2.

Hingegen konnten in Warfarin-resistenten Patienten und Nagetieren zahlreiche verschiedene Mutationen entdeckt werden, die unterschiedliche Aminosäuren des Proteins betreffen (Abb. 2, Pelz et al. 2005). Offenbar vermittelt schon eine heterozygote Mutation die Resistenz, jedoch kommen in resistenten Populationen auch häufig homozygote Tiere vor.

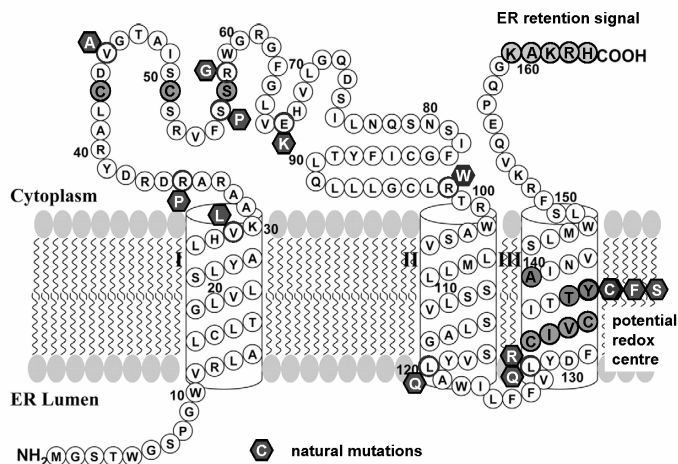


Abb. 2 Topologie-Modell des *VKORC1*-Proteins: Aufgrund der Aminosäuresequenz können drei Transmembrandomänen (I, II und III) vorhergesagt werden. Eingezeichnet sind die beiden bekannten funktionellen Motive für das ER-Retentionssignal (die letzten 5 Aminosäuren: KAKRHH) und das Redoxmotiv (CIVC). Die bisher beobachteten Mutationen sind in Sechsecken neben die Position der regulären Aminosäure gezeichnet.

7. Charakterisierung des *VKORC1*-Proteins.

Das kleine *VKORC1*-Protein mit nur 163 Aminosäuren ist extrem hydrophob mit einer vorhergesagten Topologie von 3 (oder 4) Transmembrandomänen (Abb. 2). Am C-Terminus konnte ein Lokalisierungssignal für das Endoplasmatische Retikulum (ER) identifiziert werden. Das ER ist das Zellkompartiment, in dem biochemisch die *VKOR*-Aktivität lokalisiert worden ist. Daneben weist das Protein ein kurzes CXXC-Motiv auf, das aus anderen Oxido-Reduktasen bekannt ist. Darüber hinaus lassen sich keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen erkennen. Es handelt sich also offenbar um ein neuartiges Protein. Im Vergleich mit den Genomsequenzen anderer Tier- und Pflanzenarten sowie Eu- und Archaeobakterien zeigte sich, dass nahezu alle untersuchten Spezies ein homologes Gen aufweisen (Goodstadt and Ponting 2004). Es handelt sich bei *VKORC1* also offenbar um ein evolutionär sehr altes Gen/Protein. Die weite Verbreitung macht es sehr unwahrscheinlich, dass die γ -Carboxylierung der einzige Stoffwechselschritt ist, an dem *VKORC1*-ähnliche Proteine beteiligt sind. Vermutlich ist die ursprüngliche Funktion eine andere, grundlegende Redoxreaktion.

8. Rekombinante Expression des VKORC1-Proteins

VKORC1-cDNA-Konstrukte lassen sich in verschiedenen eukaryotischen Zelltypen, die nur geringe endogene Aktivität besitzen, erfolgreich exprimieren. Das rekombinante Protein ist alleine in der Lage, Vitamin K-Epoxid (VKO) zu reduzieren (Rost et al. 2004, Li et al. 2004) und kann beide Reduktionsschritte ausführen, die notwendig sind, um VKO zu VKH₂ zu reduzieren (Chu et al. 2006). Da der natürliche Elektronendonator noch nicht bekannt ist, müssen dazu chemische Reduktionsmittel wie DTT verwendet werden. Die Reaktion ist auch *in vitro* sensitiv gegenüber Warfarin, demnach muss VKORC1 das Zielprotein der Cumarin-Antikoagulantien sein. Allerdings sind die zur Hemmung des rekombinanten Proteins erforderlichen Warfarinkonzentrationen weitaus höher als diejenigen, die an isolierten Leber-Mikrosomen von Ratten gemessen wurden (Lasseur et al. 2007).

Führt man durch gezielte Mutagenese in das cDNA-Konstrukt die Mutationen ein, die bei resistenten Patienten oder Tieren beobachtet worden sind, so zeigt sich bei der Expression meist eine reduzierte Enzymaktivität (Abb. 3). Volle Aktivität und Resistenz gegenüber Warfarin zeigen in diesem Testsystem nur die Mutationen an der Position Tyr139, die vermutlich direkt an der Bindung von Warfarin beteiligt ist (vgl. Y139F in Abb. 3). Bei den meisten anderen Mutationen ist die Aktivität so niedrig, dass sie bei höheren Warfarin-Konzentrationen nicht mehr gemessen werden kann (vgl. R58G und L128R in Abb. 3). Dies, zusammen mit den „unphysiologisch“ hohen Warfarinkonzentrationen, lässt den Schluss zu, dass dieser Enzymtest mit ungereinigtem Protein die Situation im lebenden Tier nicht richtig widerspiegelt. Die VKOR-Reaktion läuft *in vivo* in der Membran des ER ab, da alle beteiligten Komponenten (VKORC1, Vitamin K, Warfarin) stark lipophil sind. Es erfordert den Einsatz von Detergentien, um im wässrigen Milieu arbeiten zu können. Es ist gut vorstellbar, dass dadurch die Konfiguration und/oder die Zugänglichkeit der einzelnen Reaktionspartner beeinträchtigt werden. Biologisch wäre es nämlich schwer verständlich, wie Ratten, die homozygot für eine dieser Mutationen sind, mit einer so geringen VKORC1-Aktivität eine effektive Gerinnung bewerkstelligen könnten. Spontane Blutungen müssten die Folge sein und es ist nicht erkennbar, wie das einen Selektionsvorteil bei Exposition gegenüber Warfarin bringen sollte.

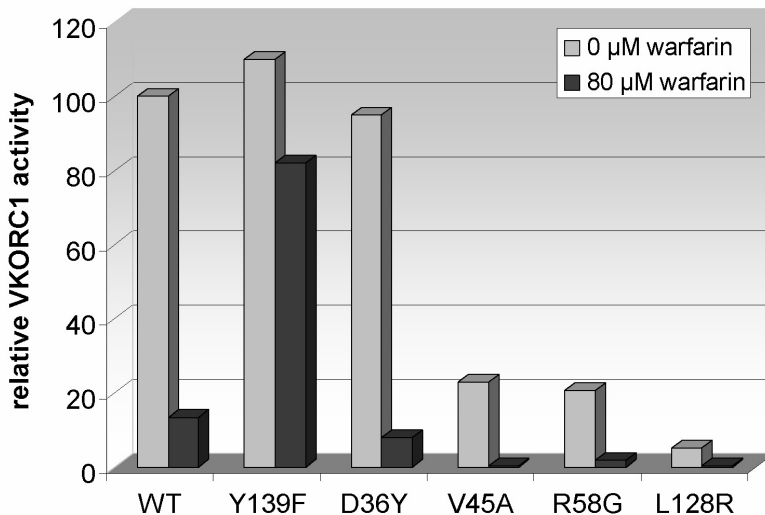


Abb. 3 Enzymatische Aktivität einiger VKORC1-Mutationen und ihre Resistenz gegenüber Warfarin: Mutante cDNA des VKORC1-Gens wurde in HEK293-Zellen rekombinant exprimiert und die Reduktion des Vitamin K-Epoxids zum Vitamin K-Chinon gemessen. Die grauen Balken geben die Aktivität ohne Warfarin wieder, die schwarzen Balken die Restaktivität in Gegenwart von 80 µM Warfarin (vgl. Pelz et al. 2005).

Literatur

- Chu, P.H., Huang, T.Y., Williams, J., Stafford, D.W. (2006): Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH₂. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 19308-13.
- Fregin, A., Rost, S., Wolz, W., Krebsova, A., Müller, C.R., Oldenburg, J. (2002): Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16. *Blood.* 100: 3229-3232.
- Goodstadt, L., Ponting, C.P. (2004): Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci.* 29: 289-92.
- Greaves, J.H., Ayres, P. (1967): Heritable resistance to warfarin in rats. *Nature* 215: 877-878.
- Greaves, J.H., Ayres, P. (1969): Linkages between genes for coat colour and resistance to warfarin in *Rattus norvegicus*. *Nature* 224: 284-285.
- Kohn, M.H., Pelz, H.J. (1999): Genomic assignment of the warfarin resistance locus, *Rw*, in the rat. *Mamm. Genome* 10: 696-698.
- Lasseur, R., Grandemange, A., Longin-Sauvageon, C., Berny, P., Benoit, E. (2007): Comparison of the inhibition effect of different anticoagulants on vitamin K epoxide reductase activity from warfarin-susceptible and resistant rat. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88: 203-208
- Li, T., Chang, C.Y., Jin, D.Y., Lin, P.J., Khvorova, A., Stafford, D.W. (2004): Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427: 541-4.
- Marchetti, G., Caruso, P., Lunghi, B., Pinotti, M., Lapecorella, M., Napolitano, M., Canella, A., Mariani, G., Bernardi, F. (2008): Vitamin K-induced modification of coagulation phenotype in *VKORC1* homozygous deficiency. *J Thromb Haemost* 6: 797-803.
- Pelz, H.J., Rost, S., Hünerberg, M., Fregin, A., Heiberg, A.C., Baert, K., MacNicol, A.D., Prescott, C.V., Walker, A.S., Oldenburg, J., Müller, C.R. (2005): The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics.* 170: 1839-47.
- Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hörtnagel, K., Pelz, H.J., Lappégard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E.G., Müller, C.R., Strom, T.M., Oldenburg, J. (2004): Mutations in *VKORC1* cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427: 537-41.
- Wallace, M.E., MacSwiney, F.J. (1976): A major gene control ling warfarin-resistance in the house mouse. *J. Hyg.* 76: 173-181.
- Wu, S.-M., Cheung, W.-F., Frazier, D., Stafford, D.W. (1991): Cloning and expression of the cDNA for human gamma-glutamyl carboxylase. *Science* 254: 1634-1636.