

Technische Universität München
Zentrum für Allergie und Umwelt
Klinik und Poliklinik für Dermatologie
und Allergologie

**Glutathion-S-Transferase M1- und T1-
Polymorphismus bei malignem Melanom,
Multiple Chemical Sensitivity, atopischem
Ekzem, Quincke Ödem und akuter Urtikaria**

Martin J. Gerneth

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. J. T. M. Buters
2. Univ.-Prof. Dr. M. W. Ollert

Die Dissertation wurde am 31.03.2011 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.04.2011
angenommen.

Gewidmet meinem
Vater Josef Gerneth

Inhaltsverzeichnis

Internetquellen	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Entgiftungsmechanismus	1
1.2 Struktur von Glutathion-S-Transferasen	5
1.3 Funktionen von Glutathion-S-Transferasen	8
1.3.1 <i>Konjugation</i>	8
1.3.2 <i>Reduktion</i>	12
1.3.3 <i>Nichtkatalytische Bindungs- und Transportfunktion</i>	12
1.4 Vorkommen, Einteilung und Nomenklatur der Glutathion-S-Transferasen	13
1.5 Assoziation von GST M1 und T1 Polymorphismen zu Krankheiten	16
1.5.1 <i>Malignes Melanom</i>	16
1.5.2 <i>Psoriasis vulgaris</i>	17
1.5.3 <i>Multiple Chemical Sensitivity</i>	19
1.5.4 <i>Quincke Ödem und Urtikaria</i>	24
1.5.5 <i>Atopisches Ekzem</i>	27
2. Zielsetzung	28
3. Material und Methodik	29
3.1 Patientenkollektiv	29
3.2 DNS - Isolation aus dem Blut	33
3.3 Die Polymerase Kettenreaktion	36
3.3.1 <i>Allgemeine Bedingungen</i>	36
3.3.2 <i>Primer und Amplifikatlänge für die Gene GST M1 und GST T1</i>	37
3.4 Agarosegelelektrophorese	39

3.4.1 Gel- und Laufbedingungen	39
3.4.2 Auswertung	40
3.5 Methode	42
4. Ergebnisse	43
4.1 Tabelle der PCR	43
4.2 Balkendiagramme der PCR	49
4.3 Statische Auswertung	50
5. Diskussion	53
5.1 Malignes Melanom	53
5.2 Psoriasis Vulgaris	54
5.3 Multiple Chemical Sensitivity	55
5.4 Quincke Ödem und akute Urtikaria	56
5.5 Atopisches Ekzem	58
6. Zusammenfassung	59
7. Literaturverzeichnis	61

Internetquellen

Pfeilschifter, J. (2008)

Signalling durch Fettsäuremetabolite und Sphingolipide

(www.lipidsignalling.de/lipidimfocus/leukotriene.php)

Genehmigung nach Rücksprache mit dem Sprecher der Forschergruppe,
Stand: 09.12.2010.

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
Tabelle 1	Phase I, Phase II und Phase III Enzyme	3
Tabelle 2	Klassifizierung, Nomenklatur und gewebsspezifische Expression cytosolischer GST beim Menschen	15
Tabelle 3	Auflistung der untersuchten Krankheiten und der Kontrollgruppe mit dem entsprechenden Patientenkollektiv	29 - 33
Tabelle 4	Primer der Gene GST M1 und GST T1	38
Tabelle 5	Ergebnis der Genotypanalyse von GST M1 und GST T1	43 - 47
Tabelle 6	Auswertung der Genotypanalyse von GST T1	51
Tabelle 7	Auswertung der Genotypanalyse von GST M1	51
Tabelle 8	Auswertung der Genotypanalyse von GST M1/T1	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abbildung 1	Zusammenspiel zwischen Phase I und Phase II Metabolismus	4
Abbildung 2	Dreidimensionale Struktur von GST am Beispiel der Klasse Mü	7
Abbildung 3	Redoxreaktion von Glutathion	9
Abbildung 4	Phase II Metabolismus von GST	11
Abbildung 5	Biotransformation von Dichlormethan	21
Abbildung 6	Stoffwechselweg der Leuktrienbiosynthese	25
Abbildung 7	DNS-Isolation aus Blut	34
Abbildung 8	Bilddokumentation der Gelelektrophorese	41
Abbildung 9	GST T1 0-Polymorphismus	49
Abbildung 10	GST M1 0-Polymorphismus	49
Abbildung 11	GST M1/T1 0-Polymorphismus	50

Abkürzungsverzeichnis

Asp	Asparagin
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CA	Carcinoma
CMM	Cutaneous Malignant Melanoma
CTP	Cytidintriphosphat
CYP	Cytochrom
Cys	Cystein
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DPX	DNA Protein cross links
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FLAP	5 Lipoxigenase-aktivierendes Protein
Glu	Glutaminsäure (Glutamat)
Gly	Glycin
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
IgE	Immunglobulin E
IPCS	International Programme on Chemical Safety
Lys	Lysin
MCS	Multiple Chemical Sensitivity
NAT	N-Acetyltransferase
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OR	Cytochrom P450-Oxidoreduktase
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion

RFA	RNA Formaldehyd Adducts
rpm	Revolutions per minute
RNA	Ribonucleic acid
RNS	Ribonukleinsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TTP	Thymidintriphosphat
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Entgiftungsmechanismus

Der Mensch ist täglich einer Vielzahl von Stoffen ausgesetzt, die weder im anabolischen noch im katabolischen Stoffwechsel gebraucht werden. Sie stammen sowohl aus der Umwelt, als auch aus dem eigenem Stoffwechsel. Diese Xeno- und Endobiotika haben toxische oder kanzerogene Wirkung.

Ziel des Organismus ist es, diese Stoffe zu deaktivieren und in ausscheidbare Produkte zu verwandeln. Einige Stoffe können bei dieser Biotransformation auch zu reaktiven Metaboliten umgewandelt werden.

Absorption, Verteilung, Verstoffwechslung und Ausscheidung (ADME) sind die physiologischen Abläufe, bei der die Chemikalien in die Zelle absorbiert, verteilt, durch Metabolisierung verändert (wasserlöslich) und anschliessend ausgeschieden werden (Buters, J., 2007). Bei der Biotransformation sind schätzungsweise über 30 Enzymsysteme beteiligt (Jakoby W.B. et al., 1990).

Der Körper scheidet die wasserlöslichen Verbindungen über Niere, Galle, Schweiß und Darm aus.

Polare Ausgangsverbindungen unterlaufen den ADME-Prozess ohne der Verstoffwechslung. Die Metabolisierung ist ein 2-Stufenprozess. Er beinhaltet den initial metabolisch ersten Schritt, welcher häufig aus Oxidation oder Reduktion besteht (Phase I Metabolismus) und einem zweiten Schritt, bei der das Folgeprodukt durch Anhängen von polaren Gruppen (Phase II Metabolismus) wasserlöslich gemacht wird (Buters, J., 2007).

Davon waren die Phase-I-Enzyme mit breiter Substratspezifität evolutionär relativ spät entwickelt. Die bedeutsamste Enzymfamilie des Phase I Metabolismus stellt das Cytochrom P450 (CYP Enzyme) dar.

Die Aktivität dieser Enzyme hängt von der Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff, NADPH und dem elektronenliefernden Enzym Cytochrom P450-Oxidoreduktase ab. Diese Enzyme kommen vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum beim Menschen vor. Die höchsten Konzentrationen werden in den Hepatozyten nachgewiesen. Durch das Anhängen einer –OH Gruppe an Xeno- bzw. Endobiotika in der Phase I Reaktion werden diese Ausgangsverbindungen polarer und somit reaktiver zu Phase II Enzymen (Buters, J., 2007).

Die Phase II Enzyme sind effizienter als die Phase I Enzyme bei der Metabolisierung von hydrophoben Ausgangsverbindungen zu hydrophilen Endprodukten (Buters, J., 2007)

In der Phase II Reaktion werden die Metaboliten über Acetylierung, Sulfatierung sowie Konjugation an Aminosäuren, Glucuronsäure und Glutathion wasserlöslich gemacht und können anschließend ausgeschieden werden (Buters, J., 2007). In der Phase II sind Enzyme aus mehreren Enzymfamilien aktiv beteiligt. Eine Enzymfamilie davon sind die Glutathion-S-Transferasen.

In der Phase III werden die wasserlöslichen Verbindungen von Phase I und II katalysiert durch Phase III-Enzyme von der Zelle ausgeschleust.

Tabelle 1 zeigt eine Liste von Enzymen der Phase I, II und III

Tabelle 1: Phase I, Phase II und Phase III Enzyme
(Table 2, Buters, J., 2007)**Phase-I-Enzyme**

Oxidoreduktasen

- Cytochrom P450
- Flavinmonooxygenasen
- Monoaminoxidasen (MAO)
- Cyclooxygenasen (COX)
- Dihydrodioloxygenasen
- Alkoholdehydrogenasen (ADH)
- Aldehyddehydrogenasen (ALDH)
- NADPH P450 Oxidoreduktasen (OR)

Hydrolasen

- Esterasen
- Amidasen
- Glucuronidasen
- Epoxidhydrolasen (EH)

Phase-II-Enzyme

Transferasen

- Glutathiontransferasen (GST)
- UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT)
- Sulfotransferasen (SULT)
- Acetyltransferasen (NAT)
- Methyltransferasen
- Aminoacyltransferasen

Phase-III-Enzyme

Transporter

- ATP bindende Kassettentransporterfamilie B1 (ABCB1)
- ATP bindende Kassettentransporterfamilie C1 (ABCC1)
- ATP bindende Kassettentransporterfamilie G2 (ABCG2)

Tabelle 1: Phase-I-Enzyme werden nochmals untergliedert in Oxidoreduktasen und Hydrolasen. Cytochrom P450 wird den Oxidoreduktasen zugeordnet. Die Phase II-Enzyme sind Transferasen denen GST zuzuordnen ist.

Abbildung 1 zeigt die verschiedenen Stoffwechselwege von Phase I und II (Figure 1, Buters, J., 2007). Diese hängen von der Struktur und Polarität des jeweiligen Substrates ab.

Abbildung 1: Zusammenspiel zwischen Phase I und Phase II Metabolismus

(Figure 1, Buters, J., 2007)

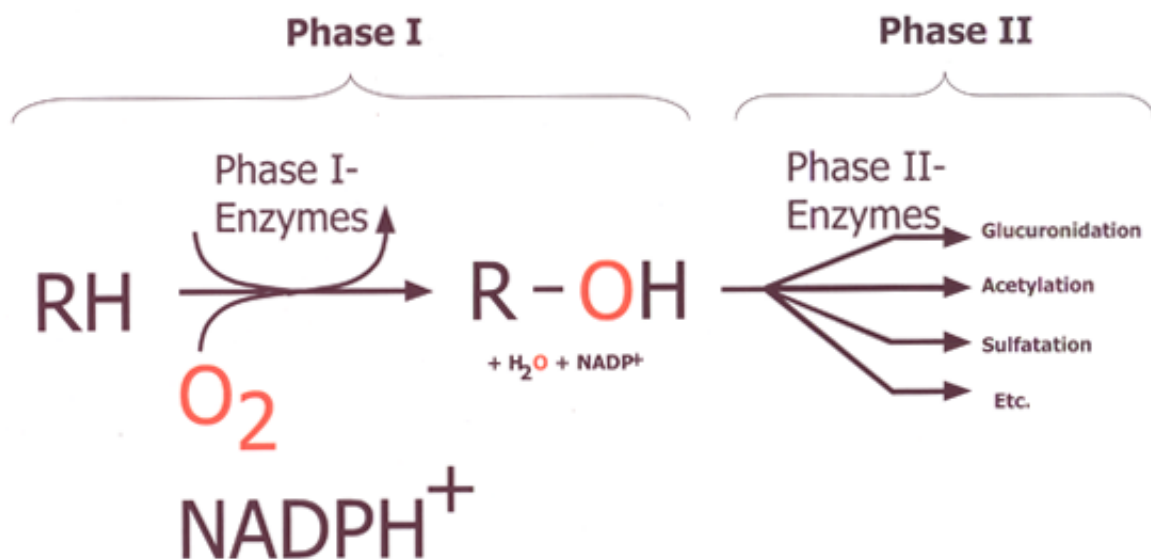


Abbildung 1: Aufgezeigt ist der Zwei-Stufen-Prozess (Phase I und II) der Metabolisierung. In Phase I werden hydrophobe Substrate (RH) durch Anhängen einer OH-Gruppe polarer und somit reaktiver zu Phase II-Enzymen. Mögliche Phase I-Enzyme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Aktivität dieser Enzyme hängt von molekularem Sauerstoff (O₂) und NADPH⁺ ab. Die entstanden Metaboliten R-OH werden in Phase II über verschiedene Stoffwechselwege wasserlöslich gemacht. Phase II-

Enzyme (darunter GST) sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Stoffwechselwege von GST werden in Kapitel 3 aufgezeigt.

Phase-II-Enzyme sind in den extrahepatischen Organen weit verbreitet und können dort ähnlich aktiv sein wie in der Leber.

Der Fremdstoffwechsel wird durch eine ganze Reihe von Variablen beeinflusst. Neben Enzym-Induktion, Enzym-Hemmung, Ernährung und Krankheit spielen genetisch bedingte Unterschiede, wie Art, Stamm und Individuum, aber auch Alter (ab 6 Monaten stabil) und Tageszeit eine wesentliche Rolle.

1993 empfahl die WHO im „International Programme on Chemical Safety (IPCS)“, bei Chemikaliensensitiven den Genpolymorphismus zu untersuchen (IPCS, 1993). Als Suszeptibilitätsmarker wurden anerkannt:

Aus der Phase I: Aryl Hydrocarbon-Hydroxylase (CYP1A1)
Debrisoquin-4-Hydroxylase (CYP2D6)

Aus der Phase II: Glutathiontransferasen (GST M1, GST P, GST T1)
N-Acetyltransferase (NAT-2)

Die Untersuchung des genetischen Polymorphismus der beiden Isoenzyme GST M1 und GST T1 bei einem dermatologischen und allergologischen Patientenkollektiv ist Ziel dieser Arbeit.

1.2 Struktur von Glutathion-S-Transferasen

Bei den Glutathion-S-Transferasen handelt es sich um die in vielen Spezies verbreiteten Produkte einer Supergenfamilie, die beim Menschen in nahezu allen Zellen vorkommen und an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt sind. Es sind dimere Proteine mit einem Molekulargewicht im Bereich von 23.000 - 27.000 Dalton pro

Untereinheit, wobei zwei gleiche (homodimeres Enzym) oder zwei verschiedene Untereinheiten (heterodimeres Enzym) kombiniert sein können. Es existiert für jede Untereinheit ein komplettes, unabhängiges aktives Zentrum, bestehend aus einer Bindungsstelle für Glutathion (G-site), einer benachbarten hydrophoben Bindungsstelle für das elektrophile Substrat (H-site) und einer Liganden-Bindungsstelle (L-site). Die G-site befindet sich in der N-terminalen Domäne der Untereinheit mit β -Faltblattstruktur und besteht aus ca. 80 Aminosäuren. Die ca. 150 Aminosäuren umfassende H-site ist in der C-terminalen, α -helikalen Domäne der Untereinheit gelegen (Wilce M.C. et al., 1995). Abbildung 2 zeigt die dreidimensionalen Struktur von GST der Klasse Mü.

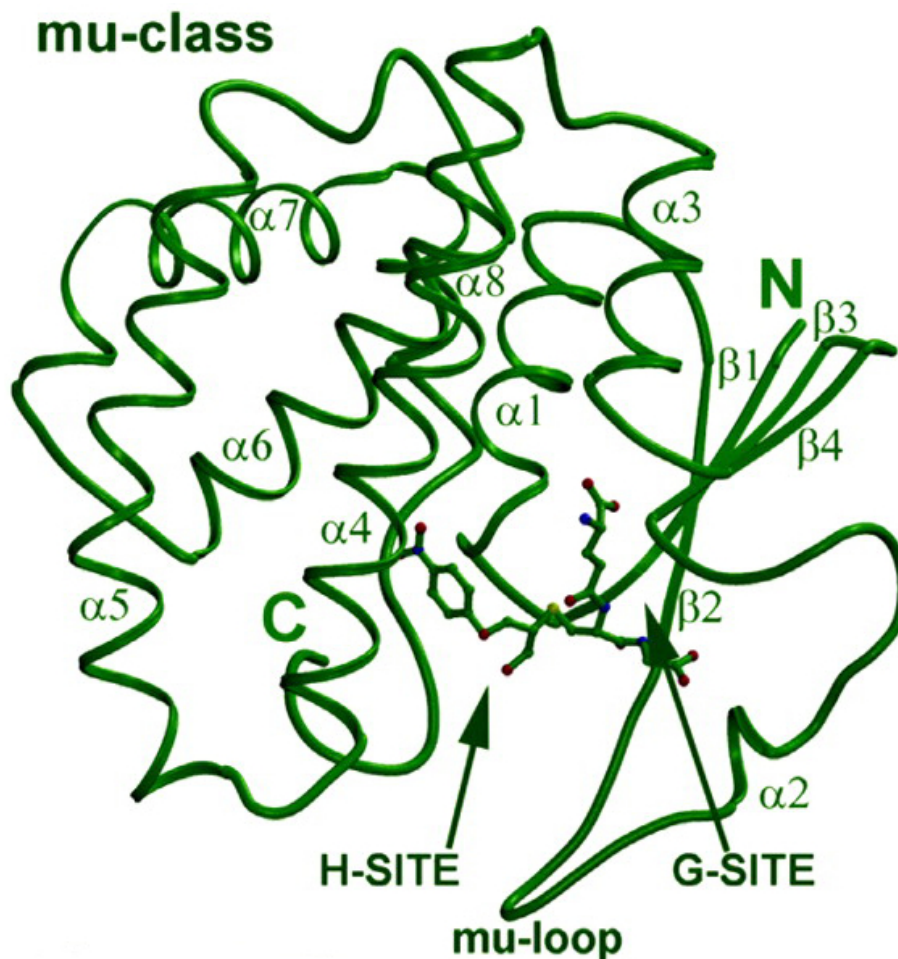
Abbildung 2: Dreidimensionale Struktur von GST am Beispiel der Klasse Mü (Fritz-Wolf, K. et al., 2003)

Abbildung 2: α -Helix (α) und β -Faltblattstrukturen (β) sind entsprechend gekennzeichnet. Das gebundene Glutathion (an der **G-site**) und das elektrophile Substrat (an der **H-site**) sind als Kugel-Stabmodell aufgezeigt. Das **C**-terminale und das **N**-terminale Ende sind entsprechend dargestellt.

Es wird angenommen, dass die GST der Klasse Theta die evolutionären Vorläufer der Klassen Alpha, Mü, Pi und Sigma sind, während die GST Kappa wiederum der Vorläufer von GST Theta sein könnte. Phylogenetische Studien haben das Vorkommen von GST Theta-
verwandten Enzymen nicht nur bei Säugern, sondern auch bei Fischen,

Pflanzen, Insekten, Hefen, Pilzen und Bakterien nachgewiesen (Pemble S. et al., 1992). Die Isoenzyme der Klasse Theta unterscheiden sich charakteristisch von denen der anderen GST-Klassen. Sie zeigen keine Aktivität mit dem Standardsubstrat 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (Habig, W.H. und Jakoby, W.B., 1981), auch bezüglich der Affinität zu anderen Substraten unterscheiden sie sich grundlegend von anderen GSTs. Eine mögliche Ursache dafür besteht darin, dass das aktive Zentrum der GST Theta in einer V-förmigen Tasche des Proteins liegt, die tiefer ist, als bei anderen GST (Wilce, M.C.J. et al., 1996).

1.3 Funktionen von Glutathion-S-Transferasen

Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-Cysteinglycin) ist ein Pseudotripeptid, das aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin gebildet wird. Es handelt sich bei Glutathion nicht um ein echtes Tripeptid, da die Amid-Bindung zwischen Glutaminsäure und Cystein über die γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure gebildet wird und nicht über die α -Carboxylgruppe wie bei einer echten Peptidbindung.

1.3.1 Konjugation

Die Hauptfunktion der GST ist die Konjugationsreaktion, bei der es die Übertragung des Nukleophils Glutathion auf hydrophobe Substrate katalysiert, die xenobiotischen Ursprungs sind.

Hierbei liegt das Tripeptid α -Glutamylcysteinylglycin (Glutathion, GSH) im gebundenen Zustand als Thiolat vor (siehe Abbildung 3), dass das eigentliche Nukleophil darstellt (Graminski G.F. et al., 1989).

Abbildung 3: Redoxreaktion von Glutathion (Koolmann J. et al., 2001)

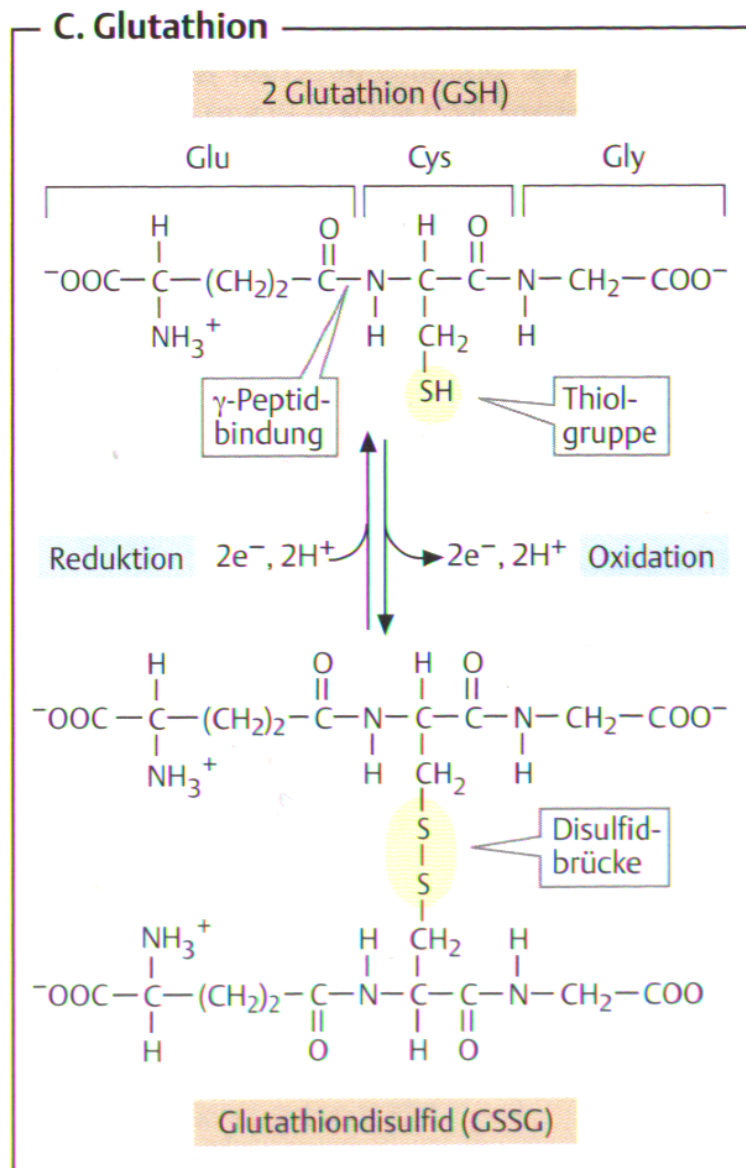


Abbildung 3: Glutathion (Sequenz: γ -Glu-Cys-Gly) enthält eine atypische γ -Peptid-Bindung zwischen Glu und Cys. Redoxaktiv ist die Thiol-Gruppe des Cysteinrestes. Zwei Moleküle der reduzierten Form GSH (oben) werden bei Oxidation zum Disulfid (GSSG, unten) verknüpft, das durch Reduktion wieder in zwei Moleküle GSH zerlegt werden kann. (Koolmann, J. et al., 2001)

Eine faszinierende Eigenschaft des GST-Entgiftungssystems ist seine breite Spezifität gegenüber strukturell unterschiedlichen Substraten, wie Alkyl- und Arylhalogeniden, Lactonen, Epoxiden, Estern und aktivierten Alkenen (Mannervik, B. et al., 1985). Das elektrophile Zentrum dieser hydrophoben Substrate besteht neben Kohlenstoff auch aus Stickstoff (Nitratester), Schwefel (Thiocyanate und Disulfide) oder Sauerstoff (Hydroperoxide).

Die Glutathion-S-Transferase ist das zentrale Enzym bei der Konjugation. Bei diesem Vorgang wird zunächst die SH-Gruppe des Glutathion mit einer aromatischen oder halogenierten Verbindung verknüpft (siehe Abbildung 4)

Die entstandenen Glutathion-Konjugate werden durch Abspaltung von Glutamin und Glycin zu Cystein-Konjugaten gespalten. Diese werden anschließend zu Mercaptusäuren acetyliert. Der beschriebene Phase II-Metabolismus wird in Abbildung 4 veranschaulicht.

Diese hydrophilen Verbindungen können über Niere oder Leber ausgeschieden werden (Brüning, T. et al., 1997).

Abbildung 4: Phase II Metabolismus von GST(Commadeur et al., 1995)

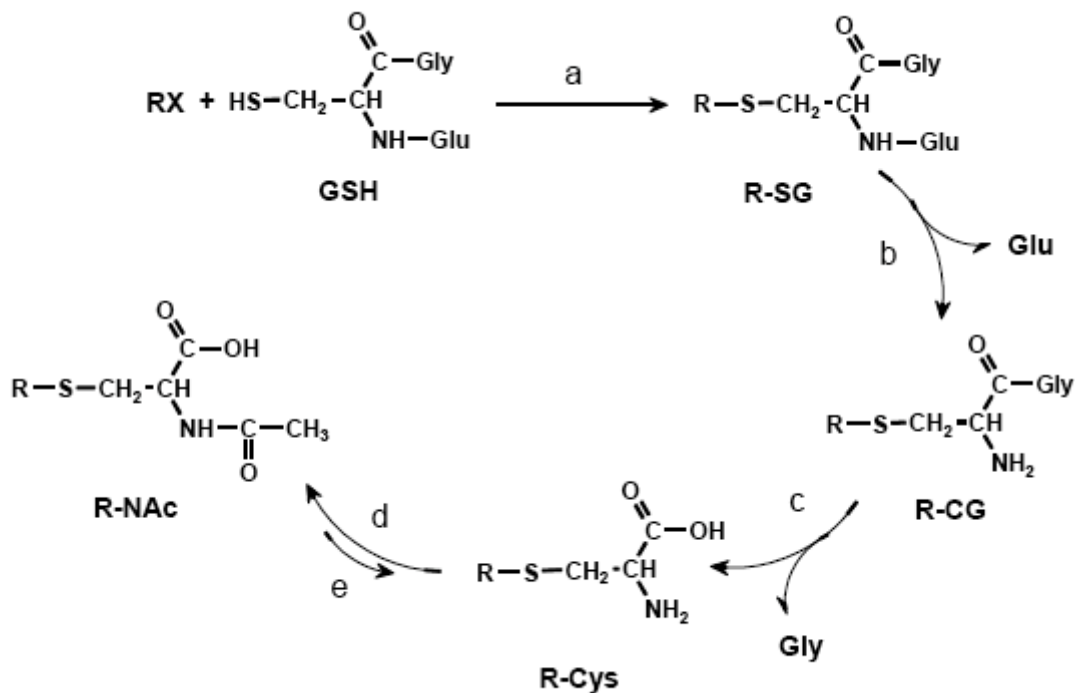


Abbildung 4: Der Katabolismus von GSH-Konjugaten und die Bildung entsprechender Mercaptusäuren.

- a: Glutathion-S-Transferase
- b: γ -Glutamyltranspeptidase
- c: Cysteinglycindiipeptidase und Aminopeptidase M
- d: Cystein-Konjugat-N-Acetyltransferase
- e: N-Deacetylase
- R-SG: Glutathion-S-Konjugat
- R-CG: Cysteinglycin-S-Konjugat
- R-CYS: Cystein-S-Konjugat
- R-NAc: N-Acetylcystein-S-Konjugat=Mercaptusäuren
- RX: elektrophile Stoffe

Ausscheidungsweg vom elektrophilen Substrat bis zur Mercaptusäure: Die entstandenen GSH-Konjugate werden häufig durch γ -Glutamyl-Transpeptidase und Cysteinglycindiipeptidase zu Cysteinkonjugaten

gespalten und anschließend durch N-Acetyltransferasen zu den als Mercaptursäuren bezeichneten N-Acetyl-S-Cysteinkonjugaten acetyliert.

Während o. g. Reaktionsfolge als Entgiftungsweg anzusehen ist, führt die durch Cystein- β -Lyasen katalysierte Biotransformation der Cystein-Konjugate (häufig zu den Phase-III-Reaktionen gerechnet) zu toxisch reaktiven Metaboliten. Ausgehend von den aus GSH-Konjugaten gebildeten Cystein-Konjugaten werden dabei durch Spaltung der Bindung zwischen dem β -C-Atom des Cysteins und dem S-Atom in der Regel instabile, reaktive Thiolmetaboliten sowie Pyruvat und Ammoniak gebildet. Cystein- β -Lyasen kommen vor allem in der Leber, der Niere und in den Darmbakterien vor (Brüning, T. et al., 1997).

1.3.2 Reduktion

Viele GST-Isoenzyme besitzen eine Peroxidase-Aktivität. Durch Übertragung von Elektronen aus dem Thiolat-Anion des Glutathions werden die Substrate zu den entsprechenden Alkoholen reduziert. Es sind z. B. Reaktionen mit DNS- und Phospholipid-Hydroperoxiden und 4-Hydroxyalkenalen beschrieben worden (Ketterer, B. und Meyer, D.J., 1989; Singhal, S.S. et al., 1992). Die 4-Hydroxyalkenale werden als hochtoxische Endprodukte der Lipidperoxidation angesehen (Jensson, H. et al., 1986). Glutathion-S-Transferasen können daher dem durch die Lipidperoxidation vermittelten oxidativen Stress entgegen wirken.

1.3.3 Nichtkatalytische Bindungs- und Transportfunktion

Glutathion-S-Transferasen verfügen über eine als L-site bezeichnete Liganden-Bindungsstelle. Diese „nichtkatalytische“ Bindungsregion besitzt eine hohe Affinität zu einer Reihe von hydrophoben Substanzen wie Bilirubin, Häm, Dexamethason und polycyclischen Kohlenwasserstoffen. Aufgrund dieser Eigenschaft wurden die Glutathion-S-

Transferasen der Leber als „Ligandin“ bezeichnet, bevor man ihre enzymatische Aktivität entdeckte. Durch die Bindung kann die Toxizität von Substanzen verringert werden. Diese Ligandinfunktion inhibiert die katalytische GST-Aktivität. Es wird angenommen, dass diese Hemmung allosterisch ist (Listowski, I., 1993). Die Ligandinfunktion wird als Transport- und Lagerungsfunktion angesehen, ähnlich der des Serumalbumins.

1.4 Vorkommen, Einteilung und Nomenklatur der Glutathion-S-Transferasen

Drei Hauptfamilien von Proteinen die in der Natur weit verteilt sind, zeigen Glutathiontransferase-Aktivität. Zwei von ihnen - die cytosolischen und mitochondrialen GST - umfassen lösliche Enzyme, die nur entfernt verwandt sind. Die dritte Hauptfamilie umfasst microsomales GST, welches derzeit als „membrane-associated proteins in eicosanoid und glutathione metabolism“ (MAPEG) bezeichnet wird (Hayes, J.D. et al., 2005).

Cytosolische und mitochondriale GST zeigen Ähnlichkeiten in ihrer dreidimensionalen Struktur, sie zeigen jedoch keine strukturelle Ähnlichkeit zu den MAPEG-Enzymen.

Jedoch beinhalten alle drei Hauptfamilien Vertreter, welche die Konjugation von GSH mit 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) katalysieren und welche, die Glutathione Proxidase Aktivität zu Cumene Hydroperoxide (CuOOH) aufzeigen. Die cytosolischen GST und die MAPEG-Enzyme katalysieren die Isomerisierung von verschiedenen ungesättigten Verbindungen und sind bedeutend in die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen mit einbezogen (Hayes, J.D. et al., 2005).

Die cytosolischen GSTs sind Dimere mit Untereinheiten von 199-244 Aminosäuren. Basierend auf Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz,

werden acht Klassen von cytosolischen GSTs aufgezeigt, die GST Alpha, Mu, Pi, Theta, Kappa, Omega, Sigma, und –Zeta bezeichnet werden (Strange, R.C. et al., 2001). Weitere Klassen von cytosolischen GSTs namens Beta, Delta, Lambda, Phi, Tau und U wurden nicht bei Säugetieren identifiziert (Hayes, J.D. et al., 2005).

Beim Menschen zeigen cytosolische GST-Isoenzyme innerhalb einer Klasse über 40% Identität und zwischen den Klassen weniger als 25% Identität.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Bezeichnung der GST-Isoenzyme die Nomenklatur nach Mannervik et al. verwendet (Mannervik, B. et al., 1992). Entsprechend zeigt Tabelle 2 die Klassifizierung, Nomenklatur und gewebsspezifische Expression cytosolischer GST im Menschen. Die Zugehörigkeit zu einer GST-Klasse wird durch Großbuchstaben gekennzeichnet. Die einzelnen GST-Untereinheiten werden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit arabischen Ziffern benannt, wobei - aufgrund der dimeren Struktur der cytosolischen GST - der Enzymname jeweils die Zusammensetzung der beiden Untereinheiten als Homo- bzw. Heterodimer wiedergibt. Liegt das codierende Gen - mit kursiven Enzymnamen bezeichnet - auf verschiedenen Allelen vor, werden diese durch Kleinbuchstaben (a und b) voneinander unterschieden.

Tabelle 2: Klassifizierung, Nomenklatur und gewebsspezifische Expression cytosolischer GST beim Menschen (modifiziert nach Whalen R. & Boyer T.D., 1998)

<i>Klasse</i>	<i>Enzym</i>	<i>Gen</i>	<i>Chromosom</i>	<i>Vorrangige Expression im Gewebe³⁾</i>	
Alpha	α	GSTA1-1	<i>GSTA1</i>	6p12	<i>A1</i> : Leber, Hoden >>> Niere, Nebenniere > Pankreas >> Lunge, Gehirn > Herz
		GSTA1-2 ²⁾			
		GSTA2-2	<i>GSTA2</i>	6p12	<i>A2</i> : Leber, Pankreas, Hoden > Niere > Nebenniere > Gehirn, Lunge, Herz
		GSTA3-3	<i>GSTA3</i>		<i>A3</i> : Plazenta
	GSTA4-4	<i>GSTA4</i>		<i>A4</i> : Dünndarm > Milz ⁴⁾ Leber, Lunge, Gehirn, Muskel, Hoden, Pankreas, Blase	
Mü	μ	GSTM1a-1a	<i>GSTM1</i>	1p13	<i>M1(+)</i> : Leber >> Hoden > Gehirn, Nebenniere, Niere, Pankreas > Lunge, Herz
		GSTM1a-1b ²⁾			
		GSTM1b-1b	<i>GSTM1</i>	1p13	⁴⁾ Lymphozyten, Muskel
		GSTM1a-2 ²⁾			
		GSTM1b-2 ²⁾			
		GSTM2-2	<i>GSTM2</i>	1p13	<i>M2</i> : Gehirn > Hoden > Herz > Pankreas, Niere > Nebenniere > Lunge, Leber; ⁴⁾ Muskel
	GSTM2-3 ²⁾				
	GSTM3-3	<i>GSTM3</i>	1p13	<i>M3</i> : Hoden >>>Gehirn, Milz >>andere ⁴⁾ Haut, Lunge; ⁵⁾ Niere, Leber	
	GSTM4-4	<i>GSTM4</i>	1p13	<i>M4</i> : Leber, Muskel > Herz, Gehirn >> Pankreas >> Lunge, Niere, Plazenta	
	GSTM5-5	<i>GSTM5</i>	1p13	<i>M5</i> : Gehirn, Hoden, Lunge	
Pi	π	GSTP1-1 (3 Allelvarianten)	<i>GSTP1</i>	11q13	<i>P1</i> : Gehirn > Lunge, Herz, Hoden > Nebenniere, Niere, Pankreas > Leber ⁴⁾ Kolon, Prostata, Haut, Milz, Muskel, Erythrozyten, Lymphozyten
Theta	θ	GSTT1-1	<i>GSTT1</i>	22q ¹⁾	<i>T1(+)</i> : Niere, Leber > Dünndarm > Gehirn, Milz, Prostata, Pankreas, Hoden > Herz, Lunge ⁴⁾ Kolon, Muskel, Erythrozyten
		GSTT2-2	<i>GSTT2</i>	22q11.2	<i>T2</i> : Leber; ⁴⁾ Lunge
Kappa	κ	GSTK1-1	<i>GSTK1</i>		<i>K1</i> : ⁴⁾ Leber
Omega¹⁾	ω		<i>GSTO1¹⁾</i>	10q ¹⁾	
Sigma¹⁾	σ		<i>GSTS1¹⁾</i>	4q ¹⁾	
Zeta	ζ	GSTZ1-1	<i>GSTZ1</i>	14q24.3	<i>Z1</i> : ⁴⁾ Gehirn, Leber, Muskel

Tabelle 2: Aufgelistet sind die cytosolischen GSTs beim Menschen. In dieser Tabelle nicht enthalten sind die mitochondrialen GSTs sowie die MAPEG-Enzyme.

Ergänzt ist die modifizierte Tabelle 2 mit Angaben von:

- 1) (Strange, J. et al., 2001)
- 2) (Beckett, G.J. und Hayes, J.D., 1993)
- 3) (Eaton, D.L und Bammler, T.K., 1999)
- 4) (Ketterer, B., 1998)
- 5) (Rowe, J.D. et al., 1997)

1.5 Assoziation von GST M1 und T1 Polymorphismen zu Krankheiten

1.5.1 Malignes Melanom

Durch UV-Strahlung kann es zu direkten Veränderungen (Mutationen) der DNS kommen (Bildung von Thymidindimeren), wobei diese vorwiegend UV-B Strahlung absorbiert. Sowohl UV-A als auch UV-B Strahlung können die DNS indirekt durch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen schädigen, die die Entstehung von oxidativen DNS-Läsionen bewirken, die wiederum zu Mutationen führen (Elsner, D. et al., 2005). Somit kann eine oxidative Stressbelastung in der Haut die Replikation der DNS verhindern. GST kann diesen potentiellen mutagenen Faktor reduzieren. Die aktiven Isoenzyme GST M1 und GST T1 in der Haut könnten daher einen Schutz in der Entstehung von Tumoren in der Haut darstellen (Kantetsky, P.A. et al., 2001).

Kerb untersuchte (Kerb, R. et al., 1997), ob ein GST M1- und GST T1-Polymorphismus Einfluss auf die Strahlensensitivität in der Haut bezüglich UV-Strahlung hat. Es zeigte sich, dass Patienten mit einem GST T1 0-Polymorphismus eine höhere Strahlensensitivität in der Haut bei UV-B-Strahlenbelastung aufwiesen, als Patienten mit einem GST M1 0-Polymorphismus.

Die höchste Strahlensensitivität (Entzündungsgeschehen der Haut) zeigten Patienten mit GST M1- und GST T1-0-Polymorphismus. Somit kam er zu der Feststellung, dass ein GST T1 0-Polymorphismus

hauptverantwortlich für die Strahlensensitivität in der Haut bezüglich UV-Strahlung sein könnte (Kerb, R. et al., 1997).

Lafuente hat dazu eine erniedrigte GST M1-Aktivität in Leukozyten bei Patienten mit Cutaneous Malignant Melanoma (CMM) phänotypisch nachgewiesen (Lafuente, A. et al., 1995).

Phenomenin, das bei Menschen mit blonder und roter Haarfarbe in der Epidermis vorkommt (Hunt, G. et al., 1995), stellt einen geringeren Schutz vor der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies durch UV-Bestrahlung dar als Eumelanin bei Menschen mit dunkler Haarfarbe (Menon, I.A. et al., 1985, S. 77).

Kanetsky konnte in einer Studie einen Zusammenhang eines GST M1- und GST T1-0-Polymorphismus bei Patienten mit heller Haarfarbe (rot und blond) und CMM nachweisen (Kanetsky, P.A. et al., 2001).

1.5.2 Psoriasis vulgaris

Die Genese der Psoriasis vulgaris scheint multifaktoriell und ist noch nicht abschließend geklärt.

Ursache der Hauterscheinungen ist eine Entzündungsreaktion der Haut, die ein überschießendes Wachstum von hautbildenden Zellen (Keratinozyten) bewirkt.

Die Entzündungsreaktion wird ausgelöst durch aktivierte T-Lymphozyten, welche in die Haut einwandern und Entzündungs-Botenstoffe freisetzen.

Ein Zytokin, das im Entzündungsvorgang eine zentrale Rolle spielt, ist der Tumornekrosefaktor alpha oder kurz TNF- α . TNF- α ist sowohl an der Entstehung psoriatischer Hautveränderungen, als auch an der Gelenkentzündung bei Psoriatischer Arthritis massgeblich beteiligt. Sowohl in der veränderten Haut, als auch in entzündeten Gelenken, konnten erhöhte Konzentrationen dieses Botenstoffes nachgewiesen werden. TNF- α fördert das vermehrte Zellwachstum und die Entzündung in der Haut, indem er verschiedene Entzündungsreaktionen beeinflusst

und die Produktion und Freisetzung anderer entzündungsfördernder Botenstoffe stimuliert.

Das Koebner-Phänomen ist der Anhaltspunkt für eine andere Erklärung, nach der die Schuppenflechte von den Keratinozyten ausgeht. Bei einer Verletzung wird ein Transkriptionsfaktor namens STAT3 aktiviert, der unter anderem bei der Wundheilung eine Rolle spielt, wodurch eine Hyperkeratose durch Vermehrung der Keratinozyten, gefolgt von einer Aktivierung der kutanen T-Zellen ausgelöst wird. Durch fortlaufende Aktivierung des STAT3 wird eine Wundheilung, also insbesondere Entzündung und Bildung von Epidermisschichten, ungebremst fortgesetzt.

In welchem Zusammenhang GST mit dem Transkriptionsfaktor STAT3 bzw. mit dem Tumornekrosefaktor TNF- α steht, ist noch nicht geklärt.

Die entzündliche Rötung der Haut entsteht durch eine Erweiterung der kleinen Blutgefäße (Kapillaren) in der Lederhaut. Die Gefäßwände werden immer durchlässiger. Dadurch können Gewebsflüssigkeit und so genannte Entzündungszellen vermehrt ins Gewebe gelangen.

Antonio Aceto untersuchte und charakterisierte GST in der entzündeten Haut bei Psoriasis vulgaris. Zur Charakterisierung verwendete er spezielle Antisera gegen menschliche GST A, GST M und GST P. Es zeigte sich anhand des Western Blot, dass nur GST P immunoreaktiv mit dem entsprechenden Antiserum reagierte. Außerdem stellte er fest dass die Enzymaktivität von GST P bei Psoriasis vulgaris höher ist als in gesunder Haut.

Damit stellte er die These auf, dass die Mehrheit aller Klassen von GST in der Haut von Patienten mit Psoriasis GST P vertreten und diese für die Hyperproliferation verantwortlich ist (Aceto, A. et al., 1992).

1.5.3 Multiple Chemical Sensitivity

Der Auslöser von multipler Chemikaliensensibilität (MCS) ist eine Überempfindlichkeit gegenüber hydrophoben organischen Lösungsmitteln. Zahlreiche organische Lösungsmittel (Formaldehyd, Benzol, Tetrachlormethan, Organochlorpestizide) erhöhen die Konzentration von Stickstoffmonoxid und das Oxidationsprodukt Peroxynitrit (Pall, M.L. et al., 2000).

Von Pall wurden vier Pathomechanismen vorgeschlagen, die zur Chemikaliensensibilität führen:

1. Stickstoffmonoxid wirkt als retrograder Messenger und erhöht die Freisetzung von Neurotransmittern (Glutamat und Aspartat) die die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren stimulieren (neuronale Sensibilisierung).
2. Peroxynitrit erschöpft die Energiespeicher (ATP) und macht die NMDA Rezeptoren sensibler gegenüber Stimulation.
3. Peroxynitrite bewirken einen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und ermöglicht somit einen besseren Zutritt von Chemikalien ins Gehirn.
4. Stickoxid und Peroxynitrit hemmen die Aktivität von Cytochrom P450 und verlangsamen somit den Abbau von organischen Lösungsmitteln (Pall, M. L., 2005).

Wong konnte in diesem Zusammenhang nachweisen, dass NO den Tyrosinrest an der aktiven Seite aller GSTs bindet und damit alle Isoenzyme von GST um bis zu 25% ihrer ursprünglichen Aktivität inhibiert (Wong, 2001).

NO und Peroxynitrite erhöhen die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke, für organische Verbindungen die im Zusammenhang mit MCS gesehen werden (Pall, M.L., 2005). Alle Isoenzyme, die in der Leber exprimiert

werden, - darunter auch GST M1 und GST T1 - werden durch NO und Peroxynitrite inhibiert (Lee, W.I., 2003).

Bei den aufgeführten organischen Lösungsmitteln, welche die Konzentration von NO und Peroxintrit im menschlichen Körper erhöhen, sind folgende Stoffwechselwege in Zusammenhang mit GST zu erwähnen:

1. **Benzol** wird nach mikrosomaler Oxidation durch das Cytochrom P450-System zum Epoxid. Von diesem Epoxid leiten sich alle bisher nachgewiesenen Metabolite ab. Es kann durch GST in ein Glutathion-Konjugat umgewandelt werden. Dieses wird über den aufgezeigten Phase II-Metabolismus von GST (1.3.1, Abbildung 4, S.14) zur Mercaptusäure verstoffwechselt und über Niere oder Leber ausgeschieden. Vom Epoxid ausgehend können aber auch Phenol, Catechol und Hydrochinon entstehen (Forth, W. et al., 2008). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Raucher (aromatische Kohlenwasserstoffe sind im Tabakrauch enthalten) mit Ösophaguskarzinom eine signifikante Erhöhung im 0-Polymorphismus von CYP1A1 und GST M1 im Vergleich zu Gesunden aufweisen (Nimura, M.D. et al., 2000).
2. **Dichlormethan** wird in der Farbenindustrie, zur Aerosolherstellung und vor allem als Lösungsmittel breit angewendet. Dichlormethan kann, wie in Abbildung 5 dargestellt, auf zwei Wegen verstoffwechselt werden.

Abbildung 5: Biotransformation von Dichlormethan
(modifiziert nach Andersen, M.E. et al., 1987)

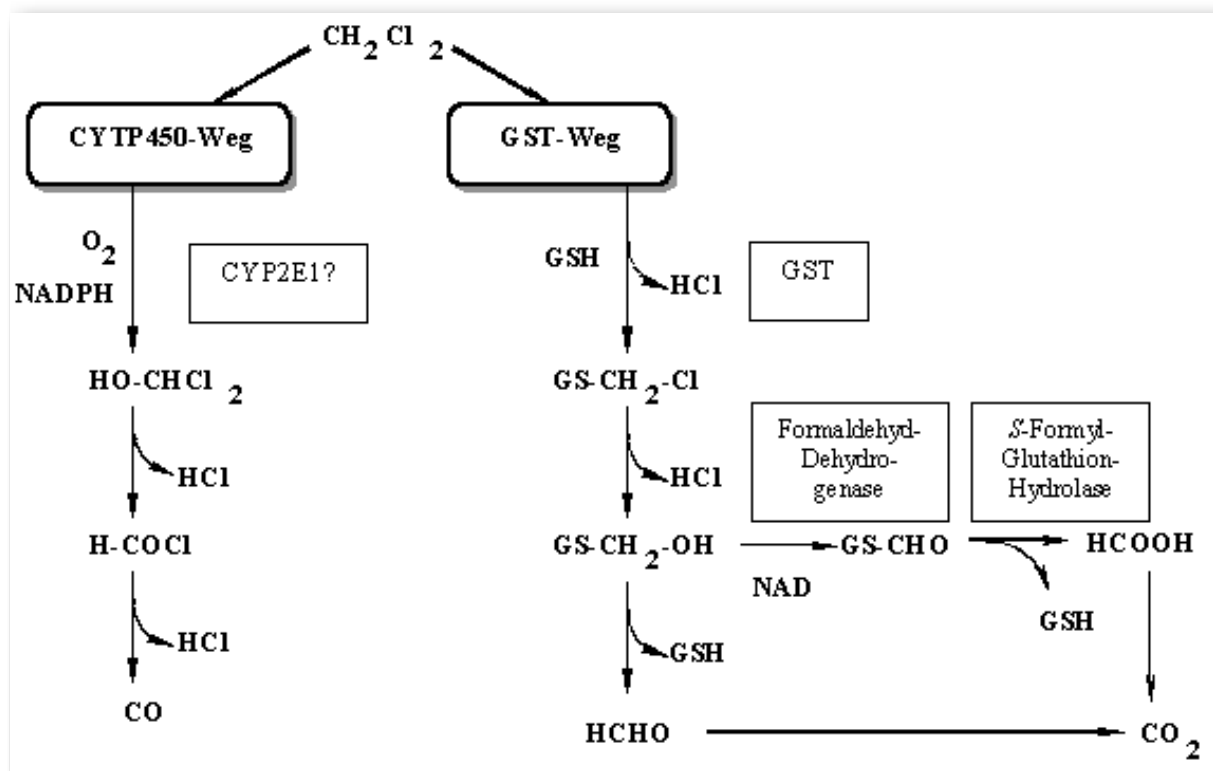


Abbildung 5: Dargestellt sind die beiden Stoffwechselwege von Dichlormethan. Endprodukt über den Cytochrom P450-Weg (CYTP450-Weg) ist Kohlenmonoxid und Chlorid. Endprodukt über den GST-Weg ist Formaldehyd (HCHO) oder Ameisensäure (HCOOH).

Bei der Cytochrom P450-vermittelten Biotransformation wird durch oxidative Dehalogenierung ein Formylchlorid-Zwischenprodukt (HCOCl) gebildet, welches rasch zu Kohlenmonoxid und Chlorid zerfällt. In Untersuchungen mit Rattenlebermikrosomen (Pankow, D. et al., 1994) und perfundierter Rattenleber (Kim, C. et al., 1996) wurde diese Umsetzung überwiegend durch CYP2E1 katalysiert. Beim Biotransformationsweg über GST T1 entsteht zunächst das Konjugat S-Chloromethylglutathion (GSCH_2Cl), welches nichtenzymatisch zum instabilen, nicht isolierbaren Zwischenprodukt S-Hydroxymethyl-

glutathion (GSCH₂OH) hydrolysiert wird. Dieses Hemimercaptal zerfällt zu Formaldehyd und Glutathion. Außerdem wird ein enzymatischer Abbau von S-Chloromethylglutathion über eine NAD-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase und eine S-Formyl-Glutathion-Hydrolase zum Endprodukt Ameisensäure postuliert (Ahmed, A.E. und Anders M.W., 1978). Diese Hypothese wird gestützt durch den Nachweis erhöhter Ameisensäurespiegel im Urin von Arbeitern nach Dichlormethan-Exposition (Kuzelova, M.A. und Vlasak, R., 1966). Die Cytochrom P450-abhängigen mischfunktionellen Oxidasen besitzen eine höhere Affinität zu Dichlormethan als die GSTs. Dagegen ist die Kapazität des GST-vermittelten Biotransformationsweges größer (Andersen, M. E. et al., 1987).

Es wurden verschiedene Studien zur Toxizität und Karzinogenität von Dichlormethan durchgeführt (Andersen, M.E. et al., 1987, Graves R.J. et al., 1994, Casanova, M. et al., 1997). Beim Menschen konnte die Karzinogenität der Substanz durch epidemiologische Studien noch nicht eindeutig belegt werden (IARC 1986 und 1987). Möglicherweise kommt Dichlormethan selbst aufgrund seiner geringen chemischen Reaktivität nicht als Karzinogen in Frage, sondern nur die bei seiner Biotransformation entstehenden reaktiven Spezies. Dabei scheinen besonders die über den GST-Biotransformationsweg gebildeten Metaboliten S-Chloromethylglutathion und Formaldehyd eine Rolle zu spielen.

Bei in vitro-Studien mit Maus- und Rattenleberhepatozyten konnten DNS-Protein-Crosslinking und DNS-Doppelstrangbrüche nach Einwirkung von Dichlormethan nachgewiesen werden. Für DNS-Crosslinking wird der Metabolit **Formaldehyd**, für die DNS-Doppelstrangbrüche der Metabolit S-Chloromethylglutathion verantwortlich gemacht (Graves, R.J. et al., 1994). Es wurden außerdem RNA-

Formaldehyd-Addukte in Hepatozyten von Mensch, Maus, Ratte und Hamster nachgewiesen (Casanova, M. et al., 1997).

Kunugita legt als eine der Hauptursachen für die Entstehung von Multiple Chemical Sensitivity eine Formaldehydbelastung des Menschen fest (Kunugita N., 2003). Casanova stellte fest, dass bei Mensch und Tier (Maus) Formaldehyd durch enzymatische Umwandlung von GST T1 und zu einem geringen Teil von GST M1 aus Dichlormethan entsteht. Bei einem 0-Polymorphismus von GST M1 und GST T1 findet keine Umwandlung von Dichlormethan zu Formaldehyd statt (Casanova, M. et al., 1997).

Weiter konnte er zeigen, dass Formaldehyd mit der DNS und der RNS Folgeprodukte bildet:

DNA-Protein cross links (DPX) und
RNA-Formaldehyde Adducts (RFA)

Bei Menschen entsteht lediglich RFA und nur dann wenn kein 0-Polymorphismus für GST T1 vorliegt (Casanova M. et, 1997).

In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit multipler Chemikaliensensitivität einen signifikant erhöhten 0-Polymorphismus von GST M1 [Odds ratio 2,08 Konfidenzintervall 95% (1,46-2,96)] und GST T1 [Odds ratio 2,80 Konfidenzintervall 95% (1,65-4,75)] im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen (Schnackenberg E. et al., 2007).

Somit konnte neben der phänotypischen Aktivitätsminderung der Isoenzyme GST M1 und GST T1 (Wong, P.S. et al., 2001) eine genotypische Erhöhung eines 0-Polymorphismus von GST M1 und GST T1 bei MCS aufgezeigt werden.

1.5.4 Quincke Ödem und Urtikaria

Leukotriene sind biologisch aktive Verbindungen und spielen als Arachidonsäurederivate eine wichtige pathophysiologische Rolle bei Entzündungsgeschehen und Asthma (Svartz, J. et al., 2003).

Das cysteinhaltige Leukotrien C₄ und seine Metabolite Leukotrien D₄ und Leukotrien E₄ stimulieren die Bronchokonstriktion (100 - 1000 fach stärker als Histamin), Vasodilatation und erhöhen die Gefäßpermeabilität, was zur Ödementstehung führt (Svartz, J. et al., 2003).

Eine lokale Vasodilatation und Steigerung der Gefäßpermeabilität mit einhergehender Rötung, Ödem und Erythem (= Lewisscher Trias) haben das Quincke Ödem und die akute Urtikaria gemeinsam.

Abbildung 6 zeigt den entscheidenden Schritt der Synthese von Leukotrien C₄ aus Leukotrien A₄ ausgehend von der Arachidonsäure. Leukotrien C₄ mit den Folgeprodukten Leukotrien D₄ und Leukotrien E₄ zählen zu den langsam reagierenden Reaktionspartnern der Anaphylaxis.

Abbildung 6: Stoffwechselweg der Leukotrienbiosynthese

(Quelle: www.lipidsignalling.de/lipidimfocus/leukotriene.php, Stand: 09.12.2010)

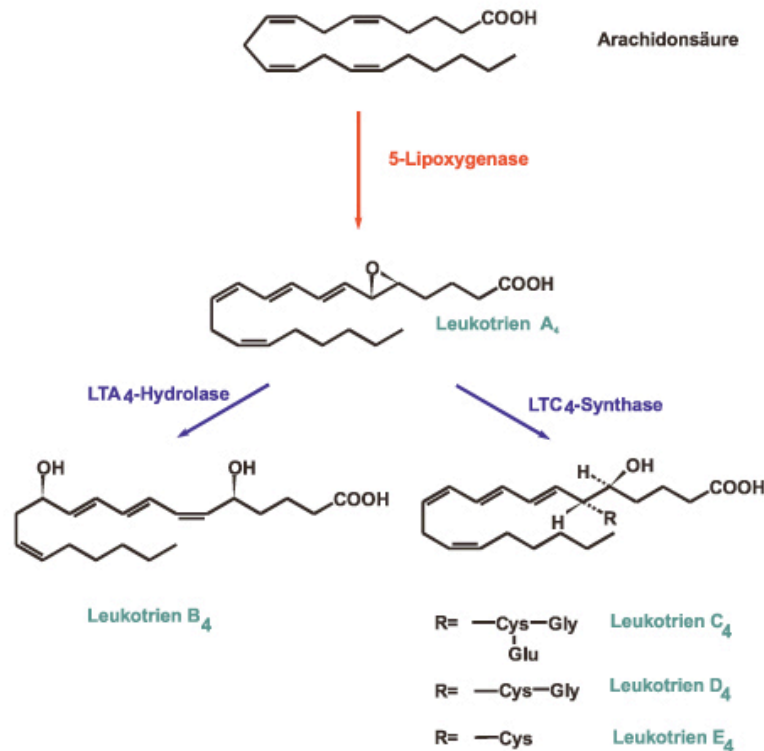


Abbildung 6: Leukotrienbiosynthese: Leukotrien A₄ wird gebildet von Arachidonsäuren, die durch einen immunologischen und inflammatorischen Stimulus von Membranphospholipiden freigesetzt werden. Es wird entweder hydrolysiert zum Leukozytenaktivator LTB₄ (linke Seite) oder umgewandelt in die cysteinhaltigen Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄.

LTC₄-Synthetase katalysiert den ersten Schritt in der Biosynthese der cysteinhaltigen Leukotriene, die als langsam reagierende Substanzen der Anaphylaxis angesehen werden.

Leukotrien C₄ wird gebildet aus Leukotrien A₄ durch Anhängen von Glutathion (Svartz, J. et al., 2003). Aus Leukotrien C₄ kann Leukotrien D₄ und Leukotrien E₄ entstehen.

Der entscheidende Schritt von Leukotrien A₄ zu Leukotrien C₄ wird enzymatisch katalysiert durch die Genfamilie vom 5-Lipoxygenase-aktivierenden Protein (FLAP) 5(S)-hydroxy-6(R)-S-glutathionyl-7,9-trans-11,14-cis eicosatetraenoic acid (LTC₄) Synthetase (Scoggan, K.A. et al., 1997).

Microsomal membrangebundene GSTs (MAPEG-Enzyme) katalysieren diesen Schritt (Scoggan, K.A. et al., 1997). Agarwal stellte fest, dass auch cytosolische GSTs (GST M, GST A und GST P) in der Haut bei Menschen Leukotrien A₄ als Substrat für die Umwandlung zu Leukotrien C₄ verwenden (Agarwal, R. et al., 1992). GST Z, das im Muskel und der Lunge beim Menschen exprimiert wird und eine hohe Aktivität in der enzymatischen Umwandlung von Leukotrien A₄ zu Leukotrien C₄ zeigt, weist Strukturhomologas zur Klasse von GST M auf (Singhal, S.S. et al., 1991). Shimizu zeigte, dass cytosolische GSTs fast im selben Ausmaß Leukotrien A₄-Isomere wie die MAPEG-Enzyme katalysieren und dass Methylesterformen von Leukotrien A₄ eine noch höhere Affinität zu cytosolischen GSTs aufweisen (Shimizu, T. et al., 1990).

Ein 0-Polymorphismus der cytosolischen Isoenzyme (z.B. GST T1, GST M1) würde demnach die Synthese der langsam reagierenden Substanzen der Anaphylaxis (LTC₄, LTD₄ und LTE₄) beeinträchtigen. Dies könnte einen Schutz in der Entstehung von akuter Urtikaria und Quincke Ödem darstellen.

1.5.5 Atopisches Ekzem

Patienten mit atopischen Ekzem weisen im Zuge vegetativer Dysregulation auf bestimmte pharmakologische Reize ein Ungleichgewicht insbesondere auf Überträgerstoffe des vegetativen Nervensystems auf.

Es kommt dabei zu einer abgeschwächten β -adrenergen und einer verstärkten α -adrenergen oder cholinergen Reaktivität. Dieses Ungleichgewicht von fördernden und hemmenden Einflüssen auf die Mediatorsekretion kann dazu führen, dass Patienten mit atopischen Ekzem auf kleinste Reizwirkung vermehrt vasoaktive Mediatoren (Leukotriene, Histamin) freisetzen.

Neben erhöhtem Plasma-Histamin-Spiegel bei Patienten mit atopischen Ekzem finden sich vermehrte Freisetzungsraten von Leukotrienen.

Leukotriene wirken aber nicht nur entzündungsfördernd, sondern greifen auch über Histamin-Rezeptoren auf Lymphozyten in die T-Zell-Regulation (meist hemmend) ein, wodurch es wiederum zu einer gesteigerten IgE-Produktion kommen kann („Circulus vitiosus“) (Jores, A. et al., 1967). Die Leukotriensynthese in der Haut wird unter anderem durch das cytosolische GST M1 katalysiert (Agarwal, R. et al., 1992).

2. Zielsetzung

Von 157 freiwilligen Patienten mit den unterschiedlichsten dermatologischen Erkrankungen wird die Analyse des Genotyps der Enzyme GST M1 und GST T1 durchgeführt. Ein 0-Polymorphismus bedeutet, dass kein Allel für das entsprechende Enzym vorhanden ist. Als Vergleich dient eine Kontrollgruppe, bestehend aus 36 gesunden Probanden.

Signifikante Abweichungen des Genotyps von GST M1 oder/und GST T1 bei einer Krankheit im Vergleich zum Genotyp der Kontrollgruppe werden entsprechend diskutiert.

3. Material und Methodik

3.1 Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden Patienten mit den unterschiedlichsten dermatologischen und allergischen Krankheiten hinsichtlich eines Polymorphismus der Isoenzyme GST M1 und GST T1 genotypisiert. In Tabelle 3 sind die untersuchten Krankheiten (Diagnose) alphabetisch aufgelistet.

Tabelle 3: Auflistung der untersuchten Krankheiten und der Kontrollgruppe mit dem entsprechenden Patientenkollektiv

Diagnose	Patienten- nummer	Alter	Geschlecht
Akne vulgaris	217	32	w
Allergische Rhinokonjunktivitis	209	31	w
	270	64	m
ASS-Unverträglichkeit	276	67	w
Atopisches Ekzem	247	50	w
	262	29	w
	292	69	w
	316	50	w
	317	88	m
	318	33	m
	303	32	m
	1	24	w
	2	28	w
	3	72	m
	4	27	m
	5	37	w
	6	45	m
	7	31	w
Basaliom+spinocelluläres CA	255	93	m
Borreliose	208	62	w

Candidainfekt	200	41	m
Erythema nodosum	212	49	m
Kontrollgruppe	100	41	w
	101	25	w
	102	52	w
	103	66	m
	104	38	w
	105	35	m
	106	24	m
	107	29	m
	108	41	m
	109	44	w
	110	33	m
	111	32	w
	112	25	m
	113	37	w
	114	41	w
	115	50	m
	116	42	m
	117	36	w
	118	32	m
	119	28	w
	120	44	m
	121	25	w
	122	36	m
	123	46	w
	124	39	w
	125	31	w
	126	45	m
	127	38	w
	128	65	m
	129	26	m
	130	35	m
	131	28	w
	132	56	w
	133	48	m

	134	31	w
	135	41	w
	136	32	m
Latexunverträglichkeit	256	34	w
Lokalanästhetikaunverträglichkeit	225	38	w
	278	49	w
MCS	179	31	w
	228	36	w
	241	35	w
	271	32	m
	300	34	w
	304	61	w
	407	40	w
	408	38	w
	409	63	w
	410	64	w
	411	57	w
	412	45	w
	413	76	w
	414	70	w
	415	63	w
	416	36	w
	417	53	w
	418	52	w
	419	45	w
	420	65	w
Medikamentenallergie	261	52	w
Melanom malignes	157	64	m
	158	67	m
	163	58	m
	168	74	w
	170	43	w
	176	46	m
	177	25	m
	178	24	m

	204	77	w
	205	70	w
	206	65	m
	213	59	w
	214	32	m
	218	60	w
	219	42	w
	234	71	w
	245	32	m
	246	72	w
	251	64	w
	252	53	m
	266	48	m
	267	69	m
	273	57	m
	288	61	w
	290	31	w
	298	57	m
Mikrobielles Ekzem	172	54	w
Onchynomykose	194	68	w
	210	53	w
Psoriasis vulgaris	161	77	m
	162	61	m
	211	59	w
	257	31	w
	265	67	w
	272	70	w
	277	32	w
	278	49	w
	279	45	w
	283	18	w
	286	24	w
	294	51	w
	295	44	w
Quincke Ödem	215	50	w
	242	59	w

	220	73	w
	264	52	w
	293	65	w
Rhinokonjunktivitis	209	31	w
	270	64	m
Urtikaria akute	160	30	w
	169	35	w
	203	61	w
	248	64	w
	268	29	w
	269	43	w
	296	40	w
Vaskulitis	173	20	m
	193	80	m
Vitiligo	254	74	w

Tabelle 3: Die Krankheiten bzw. die Kontrollgruppe (gesunde Patienten) sind alphabetisch unter Diagnosen aufgelistet. An zweiter Stelle folgt die Patientenummer (individuelle Verschlüsselung der Patientennamen). Das Alter und Geschlecht (m = männlich, w = weiblich) werden an dritter und vierter Stelle mit angegeben.

3.2 DNS - Isolation aus dem Blut

Nach dem „QIAamp DNS Mini and Blood Handbook“ der Firma Qiagen wurde die DNS Isolation des Patientenbluts vorgenommen (Qiagen Sample and Assay Technologies, Quiagen GmbH - Deutschland, Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden).

Die Blutentnahme erfolgte mit einer Standardmonovette. Zur Verhinderung der Blutgerinnung enthält die Monovette EDTA beschichtete Plastik Kügelchen. Jedes Blut/EDTA Röhrchen wird mit 1ml PBS-Puffer (Phosphat buffered saline) versetzt (Probe), um einen konstanten pH-Wert aufrechtzuerhalten und 15 min bei Raumtemperatur

(15°C-25°C) geschüttelt. Das folgende Verfahren der DNS-Isolation wird in Abbildung 7 dargestellt:

Abbildung 7: DNS-Isolation aus Blut

(QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook (Qiagen), 2010, Abbildung wurde modifiziert)

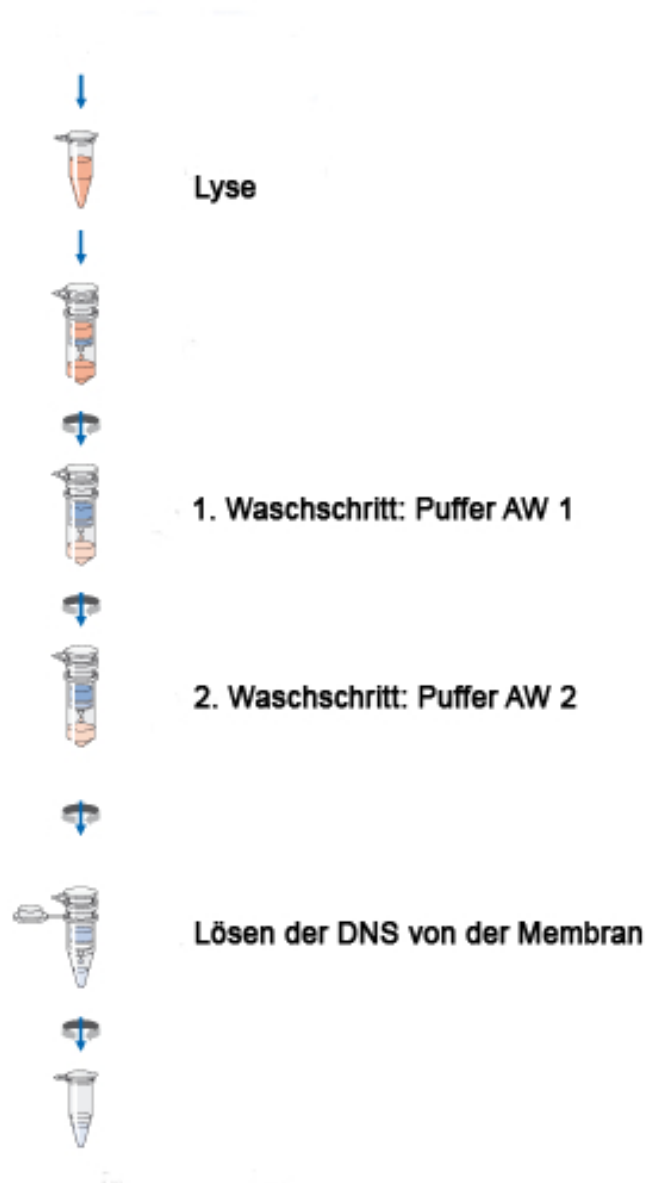


Abbildung 7: DNS Isolation aus Blut. Aufgeführt sind die einzelnen Schritte der DNS Isolation nach dem QIAamp DNA Mini and Blood Handbook. Zur **Lyse** der Zellen werden 200µl Blut mit 20µl Protease in die Microcentrifuge Tube (Firma Qiagen) gegeben und mit 200µl AL Puffer gemischt, welcher ein hypotones Milieu verursacht und somit die

Erythrozyten zum Platzen bringt. Der AL-Puffer enthält chaotrope Salze (Zusammensetzung ist Betriebsgeheimnis). Anschließend erfolgt für 15 Sekunden pulse-vortexing. Die Protease setzt die DNS aus den Zellkernen frei. In einem Wasserbad bei 56°C für 10 min wird eine maximale Ausbeute an DNS erreicht. Es erfolgt nochmals eine kurze Zentrifugation. Jetzt wird 200 µl Ethanol dazu gegeben. Dann folgt Pulse-Vortexing für 15 Sekunden. Das Gemisch wird sorgfältig aus der Microcentrifuge Tube in die 2 ml Collection Tube pipetiert. Die Collection Tubes sind Behälter, die in den QIAamp Mini spin columns (Firma Qiagen) enthalten sind. Um sicher zu gehen, dass die gewonnene DNS frei von Verunreinigungen ist, folgen zwei Waschschriffe mit den jeweiligen **Puffern-AW1** (500 µl, Zentrifugation: 8000 rpm für 1 Minute) und AW2 (500 µl, Zentrifugation: 14000 rpm für 3 Minuten). Der für den ersten Waschschriff verwendete AW1-Puffer enthält ein chaotropes Salz, so dass Proteine denaturiert und aus der Säule gespült werden. Der **AW2-Puffer** auf Ethanolbasis dient dazu, verbliebene Salze auszuwaschen.

Die verwendeten QIAamp spin columns (Firma Qiagen) enthalten Membranen aus Kieselsäuregel, welche die DNS nach einer kurzen Zentrifugation binden.

Durch die Waschpuffer werden optimale Salz- und pH-Bedingungen erreicht, um sicher zu gehen, dass die Membranen frei von Proteinverunreinigungen sind. Die **DNS** wird mit 200 µl AE-Puffer (10 mM Tris HCl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0) **von der Membran gelöst** (Inkubation bei Raumtemperatur 1 Minute, Zentrifugation bei 8000 rpm 1 Minute) und bei 4°C aufbewahrt.

3.3 Die Polymerase Kettenreaktion

3.3.1 Allgemeine Bedingungen

Die für die Genotypanalyse benötigten Amplifikate der DNS Sequenzen von den Isoenzymen GST M1 und GST T1 werden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion hergestellt. Um eine gute Amplifikation zu erreichen wurde entsprechende Reaktionsbedingungen für die verwendeten Primer gewählt. Ausgangspunkt der Reaktionsbedingungen waren vorgefertigte puReTaq Ready-To-Go PCR-Beads der Firma Amersham (Amersham Biosciences Europe GmbH, Munzinger Strasse 9, D-79111 Freiburg, Deutschland).

PCR-Gefäße; Puffer-, Nukleotid- und Polymerasemix in Kugelform; im vorgesehen Endvolumen von 25 µl sind enthalten:

- 1,5 Einheiten Taq Polymerase
- 10 mM Tris-HCl, pH=9,0
- 50 mM KCl
- 1,5 mM MgCl₂
- 200 µM-dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat, dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

Die Reaktionsansätze (Ready-To-Go PCR-Beads) wurden mit der DNS-Präparation und den jeweiligen Primern (GST M1, GST T1) in den PCR-Prozessor gestellt und das Programm sofort gestartet, um das Entstehen von unspezifischen Produkten zu minimieren:

Denaturierung	94°C	5 Minuten	
Denaturierung	94°C	1 Minute	} x 35 Reaktionszyklen
Annelierung	64°C	1 Minute	
Extension	72°C	1 Minute	
Extension	72°C	20 Minuten	
Aufbewahren	4°C		

Der erste Zyklus bestand aus einer fünfminütigen Denaturierungsphase bei 94°C. Es folgten 35 Reaktionszyklen, welche sich aus einer einminütigen Denaturierungsphase bei 94°C, einer einminütigen Annelierungsphase bei 64°C und einer einminütigen Extensionsphase bei 72°C zusammensetzten. Der letzte Zyklus bestand aus einer Extensionsphase bei 72°C von 20 Minuten. Das Reaktionsprodukt wurde bei 4°C aufbewahrt.

3.3.2 Primer und Amplifikatlänge für die Gene GST M1 und GST T1

Amplifiziert wurden die Exonbereiche der Gene GST M1 (Chromosom 1), GST T1 (Chromosom 22). Die Primer wurden so gewählt, dass die Intron/Exon-Grenze im Amplifikat mit enthalten war.

Tabelle 4 zeigt die verschiedenen Primer und die Amplifikationslänge der beiden Gene.

Tabelle 4: Primer der Gene GST M1 und GST T1

GST M1

Amplifikationslänge (Basenpaare)	Primersequenz	Literaturstelle
215	5'GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C3' 5'GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G3'	Arand M. 1996

GST T1

Amplifikationslänge (Basenpaare)	Primersequenz	Literaturstelle
480	5'TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC 3' 5'TCA CCG GAT CAT CAT GGC CAG CA 3'	Arand M. 1996

Tabelle 4: Dargestellt ist unter Primersequenz die jeweiligen Nukleotitsequenzen der Gene GST M1 und GST T1. Unter Amplifikationslänge versteht man die Anzahl der Basenpaare der beiden Gene.

Die Reaktionsbedingungen waren für beide Gene gleich:

PCR-Bead

Jedes Primer Oligonukleotid 400µM

DNS-Präparation 100-200ng

PCR nach dem oben erwähnten Protokoll

3.4 Agarosegelelektrophorese

3.4.1 Gel- und Laufbedingungen

Diese Technik basiert auf dem Prinzip der Auftrennung nach unterschiedlicher Molekülgröße. Die unter physiologischem pH-Wert und im alkalischen Bereich negativ geladene DNS läuft beim Anlegen einer Spannung zur Anode. Die Laufgeschwindigkeit (i) ist invers proportional zum Logarithmus der Basenpaaranzahl. Unabhängig ist jedoch die Laufgeschwindigkeit (i) von der Basenpaarzusammensetzung.

Ausgangspunkt der Untersuchung bilden die PCR amplifizierte DNS-Sequenzen mit einer Länge von 215 Bp (GST M1) und 480 Bp (GST T1). Um eine optimale Größentrennung der linearen doppelsträngigen DNS-Fragmente zu erhalten, wählt man entsprechend der Länge der DNS-Fragmente eine Agarosegelkonzentration von 2,5%. Agarose ist ein aus Algen gewonnenes Polysaccharid aus D-galactose- und 3,6-anhydro-L-galactose-Untereinheiten. Agarosegele sind ungiftig und eignen sich zur Auftrennung von Fragmenten zwischen 200 bp und 10 kbp.

Ziel des Auftragungspuffers G-Loading Buffer ist es, die Dichte der DNS-Lösung zu erhöhen, so dass die Lösung beim Auftragen in die Taschen des Gels absinkt und nicht in den Laufpuffer diffundiert. Der G-Loading Buffer enthält zusätzlich Farbstoffe, die während der Elektrophorese mit der DNS in Richtung Anode wandern und so einen Anhaltspunkt für die Wanderung der DNS bieten. Als Fluoreszenzfarbstoff wird Ethidiumbromid routinemäßig dem Agarosegel und dem Laufpuffer zugesetzt. Aufgrund der planaren Struktur interkaliert Ethidiumbromid in den doppelsträngigen DNS-Abschnitten und verändert dabei sein Absorptionsspektrum. Das Emissionsspektrum bleibt nahezu unverändert. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in Nukleinsäuren nimmt die Intensität der Fluoreszenz-Emission um den Faktor 50–100 zu. Das für die Fluoreszenz verantwortliche Ethidium-

kation wandert während der Elektrophorese zur Kathode, trifft während des Laufes auf die entsprechenden DNS-Abschnitte.

Ethidiumbromid ist sehr giftig, kanzerogen und kann durch die Haut resorbiert werden. Es interkaliert in die DNS, d. h., es bindet zwischen Basen eines Nukleotidstranges. Daher ist es mutagen und sollte **mit der entsprechenden Vorsicht** behandelt werden.

Beim Umgang mit Ethidiumbromid sollten grundsätzlich Nitrilhandschuhe getragen werden, die häufig gewechselt bzw. nach der Arbeit umgehend ausgezogen werden sollten.

Entstehende Abfälle dürfen nicht ins Wasser gelangen und werden daher gesondert entsorgt.

Die Gele wurde auf eine Gelplatte aufpolymerisiert. Der Lauf erfolgte bei 120V und wurde nach 15 Minuten beendet.

3.4.2 Auswertung

Zur Absicherung der Bilddokumentation wurde an Position 1 der Molekulargewichtsmarker (100-Basenpaarleiter), an Position 2 eine Positivkontrolle (GST M1+, GST T1+) und an Position 3 und 4 die aufpolymerisierten Gensequenzen der untersuchten Probanden aufgetragen. Bei Position 2, 3, 4 wurde zur besseren Übersicht ein 300 Basenpaarstrang mit aufgetragen. In Abbildung 8 ist als Beispiel die Bilddokumentation der Genotypanalyse zweier Probanden mit atopischem Ekzem (Patientennummer 292: Position 3, Patientennummer 317: Position 4) dargestellt.

Durch den Transilluminator Gel Doc 2000 werden die Banden sichtbar, in dem der interkalierte Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid bei Trans-UV-Licht der Wellenlänge (259-366nm) angeregt wird und Licht im orange-roten Bereich (590nm) emittiert. Der Transilluminator wurde als Periphergerät an einem Computer angeschlossen. In dem mitgelieferten

Programm mit dessen Hilfe u. a. die Bildschärfe und der Kontrast verändert werden konnte, wurden die Bilder gespeichert.

Abbildung 8: Bilddokumentation der Gelelektrophorese

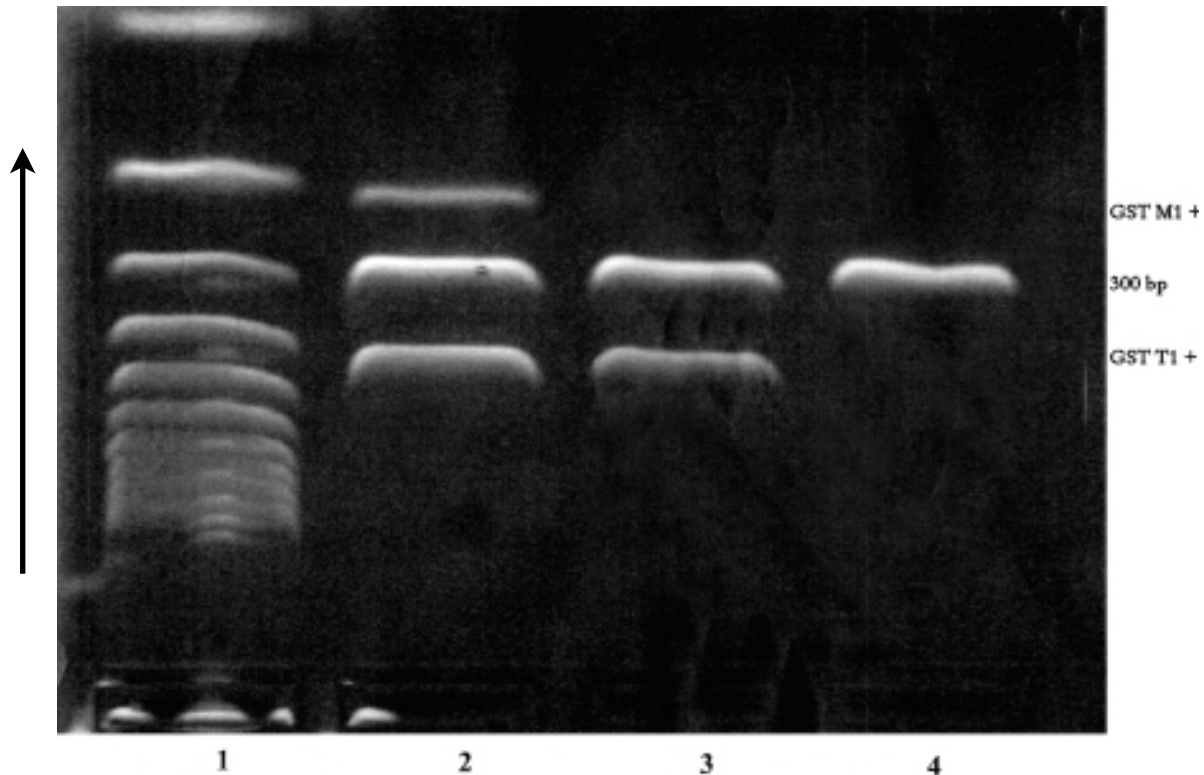


Abbildung 8: Die Positionen 1 - 4 sind besetzt durch:

Position 1: 100 Basenpaarleiter

Position 2: Positivkontrolle, Patientenummer 262, GST M1+, GST T1+

Position 3: Patient mit atopischem Ekzem, Patientenummer 292, GST M1-, GST T1+

Position 4: Patient mit atopischem Ekzem, Patientenummer 317, GST M1-, GST T1-

Die Bande des 300 Basenpaarstrangs ist von Position 1 - 4 mit dargestellt (300 bp). Die Laufrichtung ist an linker Stelle in Pfeilrichtung mit aufgezeigt.

Gelelektrophorese von den mittels PCR amplifizierten Banden der Genotypen:

300 bp; Kontrollplasmid von 300bp (nicht amplifiziert)

480 bp GST T1, positiv

215 bp GST M1, positiv

3.5 Methode

Zur Ermittlung signifikanter Ergebnisse der Genotypanalyse der beiden Isoenzyme GST M1 und GST T1 im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde die Berechnung zweier Tests durchgeführt. Die Odds Ratio wurde mit einem Konfidenzintervall von 95% errechnet. Zusätzlich wird der P-Wert errechnet. Signifikante Abweichungen beinhalten einen P-Wert kleiner 0,05 und ein Konfidenzintervall, das die 1 nicht beinhaltet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 6 - 8, 4.3 Statistische Auswertung, S. 54 - 55 dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Tabelle der PCR

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, wurde den Patienten Blut entnommen, die DNS isoliert und mit den vorgefertigten Primern der Isoenzyme GST M1 und GST T1 anhand der Polymerase-Kettenreaktion das Isoenzymmuster genotypisiert. Die Krankheiten, die weiter diskutiert werden, sind graphisch in der folgenden Tabelle 5 hervorgehoben.

Tabelle 5: Ergebnis der Genotypanalyse von GST M1 und GST T1

Diagnose	Patientennummer	GST M1 null	GST M1	GST T1 null	GST T1
Akne vulgaris	217	+			+
Allergische Rhinokonjunktivitis	209	+			+
	270		+	+	
ASS-Unverträglichkeit	276	+			+
Atopisches Ekzem	247		+		+
	262		+		+
	292	+			+
	316		+		+
	317	+		+	
	318		+		+
	303		+		+
	1	+			+
	2	+			+
	3		+	+	
	4	+			+
	5	+		+	
	6	+			+
	7	+			+
Basaliom+spinocelluläres CA	255		+		+
Borreliose	208		+		+

Candidainfekt	200		+		+
Erythema nodosum	212	+		+	
Kontrollgruppe	100	+			+
	101	+			+
	102		+		+
	103	+			+
	104	+			+
	105		+		+
	106		+		+
	107	+		+	
	108		+		+
	109	+			+
	110	+			+
	111		+		+
	112		+		+
	113	+			+
	114	+			+
	115		+		+
	116	+			+
	117		+		+
	118	+			+
	119		+		+
	120		+		+
	121	+			+
	122	+			+
	123	+			+
	124		+		+
	125	+			+
	125	+			+
	126				+
	127		+		+
	128		+		+
	129	+			+
	130		+		+
	131	+			+

	132		+		+
	133	+			+
	134	+		+	
	135		+	+	
	136	+			+
Latexunverträglichkeit	256	+			+
Lokalanästhetikaunverträglichkeit	225	+		+	
	278	+			+
MCS	179	+		+	
	228		+	+	
	241	+			+
	271	+			+
	300		+		+
	304	+			+
	407		+	+	
	408	+		+	
	409	+			+
	410	+			+
	411		+		+
	412	+			+
	413		+		+
	414	+			+
	415	+		+	
	416		+	+	
	417		+		+
	418		+	+	
	419	+			+
	420		+		+
Medikamentenallergie	261		+		+
Melanom malignes	157	+		+	
	158		+		+
	163	+			+
	168	+		+	
	170	+		+	

	176		+		+
	177		+		+
	178	+			+
	204	+			+
	205	+			+
	206	+		+	
	213	+		+	
	214	+			+
	218	+			+
	219	+			+
	234		+	+	
	245		+		+
	246		+		+
	251		+	+	
	252		+		+
	266	+			+
	267		+	+	
	273		+		+
	288		+	+	
	290	+			+
	298		+		+
Mikrobielles Ekzem	172	+		+	
Onchynomykose	194		+		+
	210		+		+
Psoriasis vulgaris	161		+		+
	162		+	+	
	211		+		+
	257	+			+
	265		+	+	
	272		+	+	
	277	+			+
	278	+			+
	279		+		+
	283		+		+
	286	+			+

	294	+			+
	295		+		+
Quincke Ödem	215		+		+
	220		+		+
	242		+		+
	264		+		+
	293		+		+
Teratozospermie					
Urtikaria akute	160		+		+
	169		+		+
	203		+		+
	248		+		+
	268		+		+
	269		+		+
	296		+		+
Vitiligo	254		+	+	
Vaskulitis	173	+		+	
	193	+		+	

Tabelle 5: Entsprechend Tabelle 3, 3.1 Patientenkollektiv, S. 32 - 36 sind die untersuchten Krankheiten bzw. die Kontrollgruppe (gesunde Patienten) alphabetisch aufgelistet unter Diagnose. Die weiter diskutierten Krankheiten (Fallzahl $n > 4$) sind graphisch hervorgehoben. Die Patientenummer entspricht der individuellen Verschlüsselung der Patienten wie in Tabelle 3.

GST M1 null / GST T1 null bedeuten einen 0-Polymorphismus für die Isoenzyme GST M1 / GST T1 (kein Allel des entsprechenden Isoenzym ist vorhanden).

GST M1 / GST T1 spricht für die Exprimierung des Genotyps der Isoenzyme GST M1 / GST T1.

„+“ in der Tabelle ordnet den Genotyp zum entsprechenden Patienten mit der jeweiligen Krankheit zu.

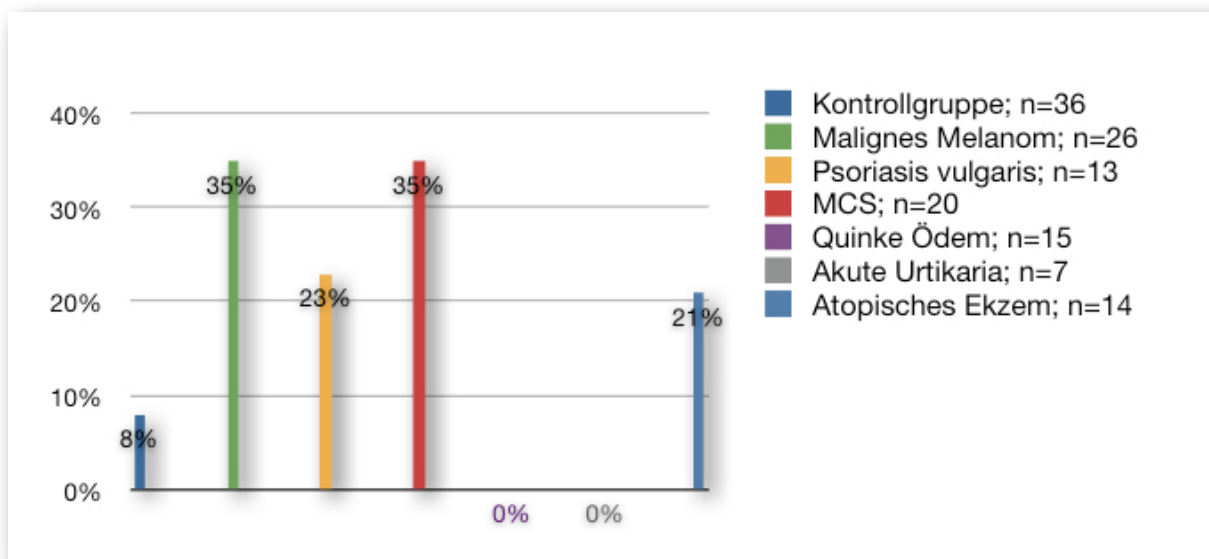
Die folgenden drei Graphiken (Abbildungen 10 - 12, 4.2 Balkendiagramme der PCR, S. 52 - 53) stellen die Genotypanalyse des 0-Polymorphismus der einzelnen Krankheiten gesondert für die Isoenzyme GST M1, GST T1 und GST M1/T1 in Prozentangaben dar. Aufgeführt und weiter diskutiert werden die untersuchten Krankheiten mit einer Fallzahl (n) von mehr als vier.

Die Krankheiten Malignes Melanom, Psoriasis vulgaris, Multiple chemical sensitivity, atopisches Ekzem, Quincke Ödem und akute Urtkaria werden aufgrund der Fallzahlen ($n > 4$) weiter diskutiert.

4.2 Balkendiagramme der PCR

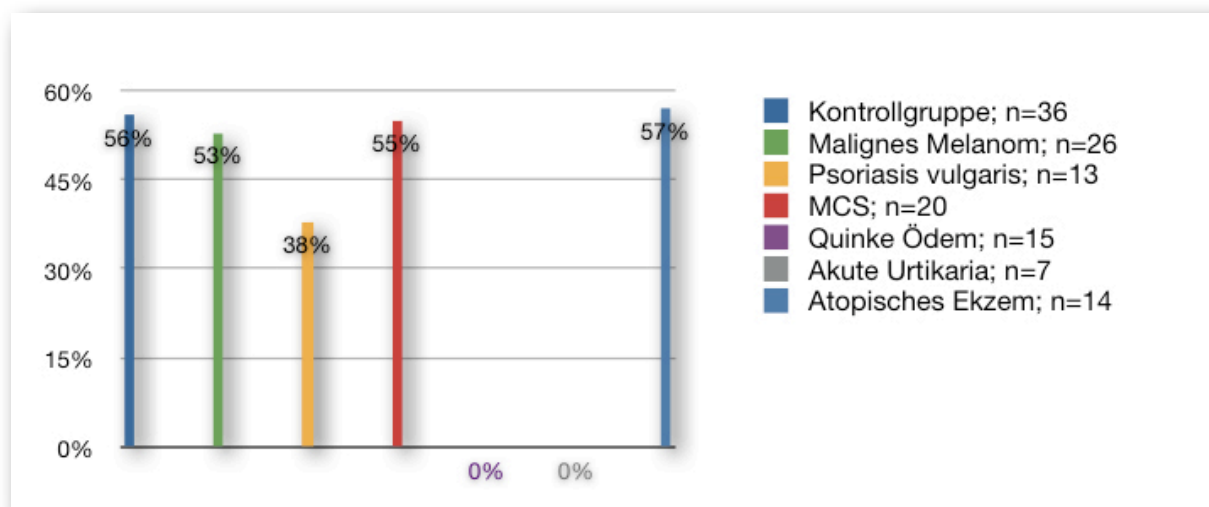
Die Ergebnisse der Genotypanalyse der Enzyme GST M1 und GST T1 sind in den Abbildungen 9 - 11 für die weiter untersuchten Krankheiten (Fallzahl n>4) zur besseren Übersicht in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

Abbildung 9: GST T1 0-Polymorphismus



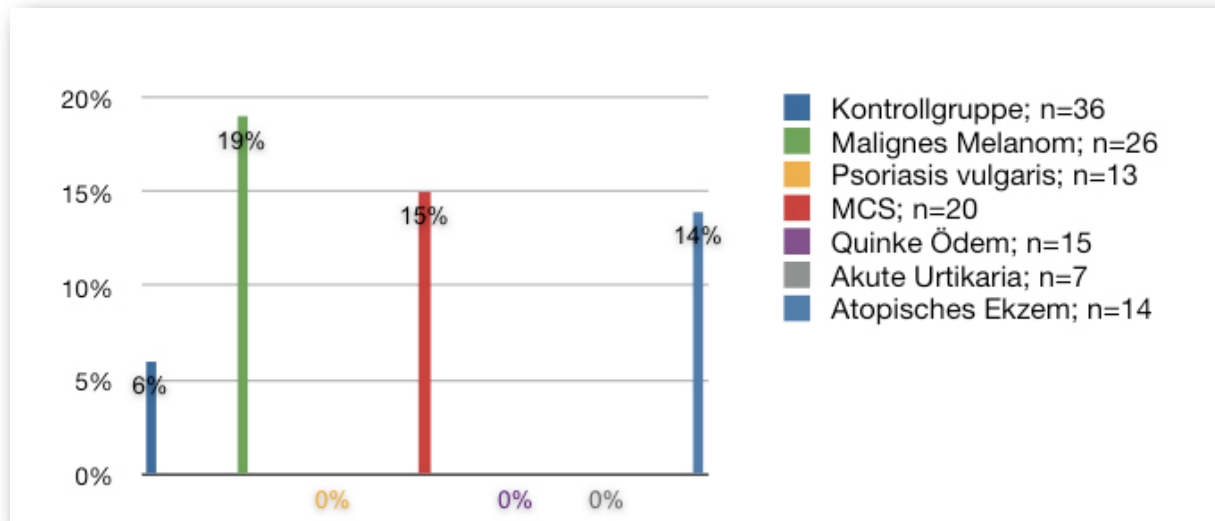
n = Anzahl der untersuchten Patienten

Abbildung 10: GST M1 0-Polymorphismus



n = Anzahl der untersuchten Patienten

Abbildung 11: GST M1/T1 0-Polymorphismus



n = Anzahl der untersuchten Patienten

Abbildung 9-11: Die Prozentangabe des 0-Polymorphismus für GST T1 (Abbildung 9), GST M1 (Abbildung 10) und GST M1/T1 (Abbildung 11) ist bei den jeweiligen Krankheiten an der Spitze des Balkens aufgeführt. Die Krankheiten sind zur besseren Übersicht farbig hinterlegt und werden in der Legende mit den entsprechend untersuchten Fallzahlen n aufgeführt. Als Vergleich ist an erster Stelle die jeweilige Prozentangabe des 0-Polymorphismus der Kontrollgruppe blau hinterlegt.

4.3 Statische Auswertung

Signifikante Abweichungen der Genotypanalyse der einzelnen Krankheiten im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden mit der Odds Ratio bei einem Konfidenzintervall von 95% berechnet. Zusätzlich wird der P-Wert mit angegeben. Signifikante Abweichungen (p-wert kleiner 0,05; Konfidenzintervall beinhaltet nicht 1) werden in Rot aufgeführt. Die statistische Auswertung wird gesondert in Tabelle 6 (0-Polymorphismus von GST T1), Tabelle 7 (0-Polymorphismus von GST M1) und Tabelle 8 (0-Polymorphismus von GST M1/T1) dargestellt.

Tabelle 6: Auswertung der Genotypanalyse von GST T1

GST T1 0	Odds Ratio	Konfidenzintervall	P-Wert
Malignes Melanom	0,17	0,04 - 0,72	0,01
Psoriasis Vulgaris	0,3	0,05 - 1,74	0,16
MCS	0,17	0,04 - 0,75	0,16
Quincke Ödem	unendlich	unendlich	0,5
Akute Urtikaria	unendlich	unendlich	0,43
Atopisches Ekzem	0,33	0,06 - 1,90	0,2

Tabelle 7: Auswertung der Genotypanalyse von GST M1

GST M1 0	Odds Ratio	Konfidenzintervall	P-Wert
Malignes Melanom	0,93	0,34 - 2,57	0,89
Psoriasis Vulgaris	2	0,55 - 7,31	0,29
MCS	1,02	0,34 - 3,07	0,97
Quincke Ödem	unendlich	unendlich	0,02
Akute Urtikaria	unendlich	unendlich	0,01
Atopisches Ekzem	0,94	0,27 - 3,26	0,92

Tabelle 8: Auswertung der Genotypanalyse von GST M1/T1

GST M1/T1 0	Odds Ratio	Konfidenzintervall	P-Wert
Malignes Melanom	0,25	0,04 - 1,39	0,09
Psoriasis Vulgaris	unendlich	unendlich	0,39
MCS	0,33	0,05 - 2,18	0,23
Quincke Ödem	unendlich	unendlich	0,59
Akute Urtikaria	unendlich	unendlich	0,52
Atopisches Ekzem	0,35	0,05 - 2,79	0,31

Tabelle 6 - 8: Signifikante Unterschiede der untersuchten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (gesunde Probanden) zeigen sich bei den Krankheiten:

Malignes Melanom (signifikante Abweichung in Tabelle 6 rot aufgeführt)

Multiple Chemical Sensitivity (signifikante Abweichung in Tabelle 6 rot aufgeführt)

Quincke Ödem (signifikante Abweichung in Tabelle 7 rot aufgeführt)

Akute Urtikaria (signifikante Abweichung in Tabelle 7 rot aufgeführt)

5. Diskussion

Die aufgeführten Krankheiten im Kapitel 4.3 Statistische Auswertung werden weiter diskutiert. Zur besseren Übersicht verweise ich auf die in Kapitel 4.2 dargestellten Balkendiagramme der PCR (Abbildungen 10 - 12, S. 52 - 53).

Die Isoenzyme GST M1 und GST T1 weisen jeweils einen autosomal dominanten Erbgang auf. Ein 0-Polymorphismus für GST M1 und/oder GST T1 weisen homozygot kein Allel für das entsprechende Enzym auf. Beim Nachweis eines positiven Genotyps der untersuchten Isoenzyme kann jedoch keine Aussage über die Ausprägung homo-/heterozygot gemacht werden. Das Alter und das Geschlecht wurden nicht berücksichtigt. Die untersuchten Probanden (Gesunde und Erkrankte) sind europäischer Herkunft. Ich weise hier auf die Unterschiede im Genotyp der beiden Isoenzyme hinsichtlich ethnischer Abstammung hin. Die entsprechenden Referenzquellen hinsichtlich ethnischer Abstammung aus der Literatur wurden aus zwei Gründen nicht in die Diskussion mit einbezogen:

- es wird zwischen gesund und krank nicht unterschieden
- unter den Autoren zeigen sich grosse Unterschiede in der Genotypanalyse von GST M1 und GST T1

5.1 Malignes Melanom

Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Patienten mit malignem Melanom konnte bei GST T1 aufgezeigt werden: signifikante Erhöhung des **0-Polymorphismus von GST T1** bei den untersuchten Probanden mit malignen Melanom (35%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (8%) (Odds Ratio 0,17 Konfidenzintervall 95% (0,04 - 0,72), p-Wert: 0,01)

Bei der Expression von GST M1 zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Patienten mit malignem Melanom zu der Kontrollgruppe.

Auch in der Expression eines GST M1 und gleichzeitig GST T1 negativen Genotyps konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Feststellung von Kerb, der einen GST T1 0-Polymorphismus hauptverantwortlich für die Strahlensensitivität in der Haut bezüglich UV-B-Strahlung sieht, zeigt in dieser Arbeit eine signifikante Übereinstimmung (Kerb R. et al., 1997).

Die Genotypanalyse von GST M1 zeigt somit keine Übereinstimmung mit der Feststellung von Lafuente, der eine erniedrigte GST M1 Aktivität in Leukozyten bei Patienten mit CMM phänotypisch feststellte (Lafuente A. et al., 1995).

Somit wäre nach Kanetsky ein Zusammenhang eines GST M1- und GST T1-0-Polymorphismus bei Patienten mit heller Haarfarbe (rot/blond) und CMM nur für GST T1 null richtig (Kanetsky, P. A. et al., 2001).

Anhand meiner Genotypanalyse stellt das Isoenzym GST T1 einen Schutz vor der Entstehung von Thymidindimeren und reaktiven Sauerstoffradikalen durch UV Strahlung in der Haut dar. Deswegen stellen sie einen Schutz vor der Entstehung von Malignen Melanom dar.

5.2 Psoriasis Vulgaris

Bei der Expression von GST M1 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Bei der Expression von GST T1 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Auch in der Expression eines GST M1 und gleichzeitig GST T1 negativen Genotyps konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Das Enzym GST P das Acteo in den Hautschuppen von Patienten mit Psoriasis vulgaris nachwies, zeigte gleichzeitig eine erhöhte Enzymaktivität, als in der Haut bei Gesunden (Aceto, A. et al., 1992). Jedoch ist darauf hinzuweisen, dass nur Antiseren gegen GST A, GST M und GST

P verwendet wurden. Dies ist die einzig publizierte Untersuchung von GST und Psoriasis vulgaris bisher.

5.3 Multiple Chemical Sensitivity

Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Patienten mit MCS konnte bei GST T1 aufgezeigt werden:

Signifikante Erhöhung des **0-Polymorphismus von GST T1** bei den untersuchten Probanden mit MCS (35%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (8%) (Odds Ratio 0,17 Konfidenzintervall 95% (0,04-0,75), p-Wert: 0,01)

Bei der Expression von GST M1 zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Auch in der Expression eines GST M1 und gleichzeitig GST T1 negativen Genotyps konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt.

Die Glutathion-S-Transferasen der Klasse Theta besitzen eine Affinität zu halogenierten Kohlenwasserstoffen und Epoxiden, die als Substrate für GSTs anderer Klassen kaum relevant sind.

Formaldehyd, das Kunugita als eine der Hauptursachen in der Entstehung von MCS sieht (Kunugita, N. et al., 2003), kann durch Umwandlung von Dichlormethan enzymatisch katalysiert mit GST T1 und zu einem geringen Teil mit GST M1 entstehen (Casanova, M. et al., 1997) (siehe Abbildung 7, 1.5.3 Multiple Chemical Sensitivity, S. 24). Ein erhöhter 0-Polymorphismus von GST T1, den wir bei der Genotypanalyse der 15 Patienten mit MCS gefunden haben, ist mit dieser Theorie nicht vereinbar.

Jedoch besitzen Cytochrom P450-abhängige mischfunktionelle Oxidasen eine höhere Affinität zu Dichlormethan als GST T1. Dagegen ist die Kapazität des GST-vermittelten Biotransformationsweges größer (Andersen, M.E. et al., 1987).

Somit stellt sich die Frage, ob niedrige Konzentrationen von Dichlormethan über einen langen Zeitraum (Cytochrom P450-Metabolismus) oder eine einmalige Exposition in einer hohen Konzentration für die Entstehung von MCS in einem Zusammenhang zu sehen sind.

Zahlreiche organische Lösungsmittel (Formaldehyd, Benzol, Tetrachlormethan, Organochlorpestizide) erhöhen die Konzentration von Stickstoffmonoxid und das Oxidationsprodukt Peroxynitrit.

Pall postulierte vier Pathomechanismen ausgehend von NO und Peroxynitrid bei MCS (siehe 1.5.3 Multiple Chemical Sensitivity, S. 22 - 23). Benzol, das beim Menschen durch Cytochrom P450 zum Epoxid metabolisiert, wird durch GST zur Mercaptusäure abgebaut. Wenn - wie oben erwähnt - davon auszugehen ist, dass GST T1 die höchste Affinität zu Epoxiden aufweist, dann könnte ein erhöhter 0-Polymorphismus von GST T1 in Zusammenhang mit der Pathogenese von MCS zu sehen sein.

Schnackenberg konnte in diesem Zusammenhang einen gehäuften 0-Polymorphismus von GST M1 und GST T1 bei Patienten mit MCS nachweisen (Schnackenberg, E. et al., 2007).

5.4 Quincke Ödem und akute Urtikaria

Da das Quincke Ödem und die akute Urtikaria als gemeinsamen Pathomechanismus den Lewisschen Trias aufweisen, werden sie zusammen diskutiert.

0/5 (0%) Patienten mit **Quincke Ödem** haben einen 0-Polymorphismus von GST M1.

0/5 (0%) Patienten mit Quincke Ödem haben gleichzeitig auch einen 0-Polymorphismus von GST T1.

0/7 (0%) Patienten mit **akuter Urtikaria** haben einen 0-Polymorphismus von GST M1.

0/7 (0%) Patienten mit akuter Urtikaria haben gleichzeitig auch einen 0-Polymorphismus von GST T1.

Einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Fallzahlen ergab sich im 0-Polymorphismus von GST M1 bei akuter Urtikaria (p-Wert: 0,01) und Quincke Ödem (p-Wert: 0,02). Das Konfidenzintervall kann bei entsprechender Fallzahl nicht errechnet werden.

Die Hauterscheinungen bei akuter Urtikaria, wie Rötung, Ödem, Erythem (= Lewissche Trias) spielen sich bei einem Quincke Ödem in der Subkutis ab. Eine lokale Vasodilatation und Steigerung der Kapillarpermeabilität haben beide als Pathomechanismus gemeinsam.

Arachidonsäurederivate wie Leukotrien C₄, D₄ und E₄ können diesen Pathomechanismus auslösen. MAPEG-Enzyme sind wichtige Vertreter der Leukotrien-C₄-Synthetase (siehe Abbildung 7, 1.5.4 Quincke Ödem und akute Urtikaria, S. 28) (Scoggan, K.A. et al., 1997).

Agarwal stellte fest, dass auch cytosolische GSTs (GST M, GST A und GST P) in der Haut bei Menschen Leukotrien A₄ als Substrat für die Umwandlung zu Leukotrien C₄ verwenden (Agarwal, R. et al., 1992). GST Z, das im Muskel und der Lunge beim Menschen exprimiert wird und eine hohe Aktivität in der enzymatischen Umwandlung von Leukotrien A₄ zu Leukotrien C₄ zeigt, weist Strukturhomologas zur Klasse von GST M auf (Singhal, S.S. et al., 1991). Shimizu zeigte, dass cytosolische GSTs fast im selben Ausmaß Leukotrien A₄-Isomere (5,6-, 11, 12 und 14,15-LTA₄) wie MAPEG-Enzyme katalysieren und dass Methylesterformen von Leukotrien A₄ eine noch höhere Affinität zu cytosolischen GSTs aufweisen (Shimizu, T. et al., 1990)

Alle Patienten mit akuter Urtikaria und Quincke Ödem exprimieren die cytosolständigen Enzyme GST M1 und GST T1. Ein signifikanter Unterschied ergab sich jedoch nur bei GST M1. Anhand dieses

Ergebnisses könnte man vermuten, dass zumindest GST M1 als Leukotrien-C4-Synthetase fungieren könnte. Dies wäre auch mit der Aussage von Argawal vereinbar, der cytosolische GSTs (GST A, GST M, GST P) als Leukotrien-C4-Synthetase entdeckte.

Leukotrien C4 und seine Folgeprodukte Leukotrien D4 und Leukotrien E4 führen zu einer Vasodilatation und einer Steigerung der Kapillarpermeabilität.

Dies könnte ein möglicher Auslöser von akuter Urtikaria und Quincke Ödem sein.

5.5 Atopisches Ekzem

Bei der Expression von GST M1 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

Bei der Expression von GST T1 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Auch in der Expression eines GST M1 und gleichzeitig GST T1 negativen Genotyps konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Damit waren beide Isoenzyme im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert. Somit würden über diese beiden Isoenzyme, ausgehend von der Verteilung des Genotyps, im gleichen Sinne Leukotrien C4 mit Folgeprodukten Leukotrien D4 und E4 bei den Patienten mit atopischen Ekzem synthetisiert als im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Dadurch wäre der Pathomechanismus, der im Zuge vegetativer Dysregulation durch einen erhöhten Leukotrienspiegel beiträgt (katalysiert über GST M1) in der Entstehung von atopischen Ekzem nicht denkbar.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, Patienten mit dermatologischen und allergologischen Krankheiten hinsichtlich des Genotyps der Enzyme Glutathion-S-Transferase M1 und T1 zu untersuchen. Die Verteilung des Genotyps (von GST M1 und T1) der jeweiligen Krankheiten sollte mit dem Genotypmuster (von GST M1 und T1) einer Kontrollgruppe bestehend aus 36 gesunden Probanden europäischer Herkunft verglichen und entsprechend ausgewertet werden. Das Alter und das Geschlecht wurden dabei nicht berücksichtigt.

Es wurden bei insgesamt 25 verschiedenen Krankheiten 106 europäische Patienten auf den Genotyp der beiden Enzyme untersucht. Aufgrund der Fallzahlen bei den jeweiligen Krankheiten ($n > 4$) wurden die Krankheiten malignes Melanom, Psoriasis vulgaris, MCS, Quincke Ödem, akute Urtikaria und atopisches Ekzem statistisch ausgewertet und anschließend weiter diskutiert.

Die Isoenzyme GST M1 und GST T1 weisen jeweils einen autosomal dominanten Erbgang auf. Bei einem 0-Polymorphismus für GST M1 und/oder GST T1 weisen sie homozygot kein Allel für das entsprechende Enzym auf.

Beim Nachweis eines positiven Genotyps der untersuchten Isoenzyme konnte jedoch keine Aussage über die Ausprägung homo-/heterozygot gemacht werden.

Die Ergebnisse zeigen signifikante Unterschiede im Genotyp der beiden Isoenzyme im Vergleich zur Kontrollgruppe bei akuter Urtikaria (GST M1, GST T1), Quincke Ödem (GST M1, GST T1), malignem Melanom (GST T1) und Multiple Chemical Sensitivity (GST T1).

Unter den 14 Atopikern und den 13 Patienten mit Psoriasis vulgaris zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Genotyp der beiden Isoenzyme GST M1 und GST T1 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Von den fünf Patienten mit Quincke Ödem und sieben Patienten mit akuter Urtikaria exprimierten alle GST M1 und GST T1.

Der 0-Polymorphismus von GST T1 war bei den 26 Personen mit der Diagnose malignes Melanom signifikant erhöht.

Ein signifikanter Anstieg im 0-Polymorphismus von GST T1 zeigte sich auch bei den 20 Patienten mit MCS.

Das Screening beider Isoenzyme von dermatologischen und allergologischen Krankheiten zeigte damit vier Krankheiten auf die signifikante Abweichungen im Genotyp von GST M1 und/oder GST T1 im Vergleich zur Kontrollgruppe hatten. Da die Fallzahlen der Krankheiten relativ niedrig sind, sollte diese Arbeit eine Anregung sein, mehr Patienten hinsichtlich des Genotyps und auch des Phänotyps von GST M1 und GST T1 bei atopischem Ekzem, akuter Urtikaria, Quincke Ödem, malignem Melanom, MCS und Psoriasis vulgaris zu untersuchen.

7. Literaturverzeichnis

Aceto, A., Martini, F., Dragani, B., Bucciarelli, T., Sacchetta, P., Dillio, C.
Purification and characterization of glutathione transferase from psoriatic skin.

Biochem Med Metab Biol 48 (1992) 212-218

Agarwal, R., Raza, H., Allyn, D.L., Bickers, D.R, Mukhtar, H.
Glutathione S-transferase-dependent conjugation of leukotriene A4-methyl ester to leukotriene C4-methyl ester in mammalian skin.

Biochem Pharmacol 44 (1992) 2047-2053

Ahmed, A.E., Anders, M.W.

Metabolism of dihalomethanes to formaldehyde and inorganic halide.

II. Studies on the mechanism of the reaction.

Biochem Pharmacol 27 (1978) 2021-2025

Andersen, M.E., Clewell, H.J., Gargas, M.L., Smith, F.A., Reutz, R.H.
Physiologically based pharmacokinetics and the risk assessment process for methylene chloride.

Toxicol Appl Pharmacol 87 (1987) 185-295

Anuradha, D., Reddy, K.V., Kumar, T.C., Neeraja, S., Reddy, P.R., Reddanna, P.

Purification and characterization of rat testicular glutathione S-transferases: role in the synthesis of eicosanoids.

Asian J Androl 2 (2000) 277-282

Arand, M., Muhlbauer, R., Hengstler, J.

A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms.

Anal Biochem 236 (1996) 184–186

Beckett, G.J., Hayes, J.D.

Glutathione S-transferases: biomedical applications.

Adv Clin Chem 30 (1993) 281-380

Brüning, T., Lammert, M., Kempkes, M., Thier, R., Golka, K., Bolt, H.M.
Influence of polymorphisms of GST M1 and GST T1 for risk of renal cancer in workers with long-term high occupational exposure to trichlorethene.

Arch Toxicol 71 (1997) 596-599

Buters, J.

Phase I Metabolism

In:“Toxicology and Risk Assessment: A Comprehensive Introduction“, Greim, H., Snyder, R. (Hrsg.), Wiley-VCH Verlag GmbH & KG aA, Weinheim, 2008, 1. Auflage, 49-74

Casanova, M., Bell, D.A., Heck, H.D.

Dichloromethane metabolism to formaldehyde and reaction of formaldehyde with nucleic acids in hepatocytes of rodents and humans with and without glutathione S-transferase T1 and M1 genes.

Fundam Appl Toxicol 37 (1997) 168-180.

Danielson, U., Esterbauer, H. Mannervik, B.

Structure civity relationship of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases.

Biochem J 247 (1987) 707-713

Dekant, W., Wambakas, S.

Organische Lösungsmittel

In: "Allgemeine und spezielle Pharmakologie", Actories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K. (Hrsg.), Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München, 2009, 10. Auflage, 1063-1067

Eaton, D.L., Bammler, T.K.

Concise Review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology.

Toxicol Sci 49 (1999) 156-164

Elsner, P., Hölzle, E., Diepgen, T., Grether-Beck, S., Hönigsmann, H., Kruthmann, J., Scharfetter-Kochanek, K., Schwarz, T., Luger, T.

Empfehlung: Täglicher Lichtschutz in der Prävention chronischer UV-Schäden der Haut.

Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 2 (2007) 166-173

Fritz-Wolf, K., Becker, A., Rahlfs, S., Harwaldt, P., Schirmer, R.H., Kabsch, W., Becker, K.

X-ray structure of glutathione S-transferase from the malarial parasite plasmodium faclicparum

Proceeding of the National Academy of Sciences 100 (2003) 13821-13826

Graminski, G.F., Kubo, Y., Armstrong, R.N.
Spectroscopic and kinetic evidence for the thiolate anion of glutathione at
the active site of glutathione-s-transferase
Biochemistry 28 (1989) 3562 – 3568

Graves, R.J., Coutts, C., Eyton-Jones, H., Green, T.
Relationship between hepatic DNS damage and methylene chloride-
induced hepatocarcinogenicity in B6C3F1 mice.
Carcinogenesis 15 (1994) 991-996

Griffiths, H.R., Mistry, P., Herbert, K. E., Lunec, J.
Molecular and cellular effect of ultraviolet light-induced genotoxicity.
Crit Rev Clin Lab Sci 35 (1998) 189-237

Hayes, J.D., Flagan, J.U., Jowsey, I.R.
Glutathione transferases.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 45 (2005) 51-88

Habig, W.H., Jakoby, W.B.
Assays for differentiation of glutathione S-transferases.
MIE 77 (1981) 398-405

Herbert, H., Schmidt-Krey, I., Morgenstern, R.
The projection structure of microsomal glutathione transferase.
EMBO J 14 (1995) 3864-3869.

Hunt, G., Kyne S., Ito, S., Wakamatsu, K., Todd, C., Thody, A.
Eumelanin and pheomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes.

Pigm Cell Res 8 (1995) 202-208

IARC, International Agency for Research on Cancer
"Dichloromethane"

IARC Monogr 41, Lyon ,1986, 43-85

IARC, International Agency for Research on Cancer.

"Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1-42."

IARC Monogr Suppl 7, Lyon, 1987

IPCS

Environment Health Criteria. Biomarkers and risk assessment: Concept and Principles.

WHO, International Programme on Chemical Safety 155 (1993) 59-63

Ishikawa, T.

The ATP-Dependent Glutathione-S-Conjugate Export Pump.

Trends Biochem Sci 17 (1992) 463 – 468

Jensson, H., Guthenberg, C., Alin, P., Mannervik, B.

Rat glutathione transferase 8-8, an enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxy-alk-2-enals.

FEBS Lett 203 (1986) 207-209

Ji, X., Zhang, P., Armstrong, R.M., Gilliland, G.L.

The three – dimensional structure of a glutathione-s-transferase from the mu gene class. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3 –3 and glutathione at 2,2 A resolution.

Biochemistry, 31 (1992) 10169 – 10184

Jakoby, W.B., Ziegler, D.M.

The Enzymes of detoxifikation.

JBC 265 (1990) 20715-20718

Jores, A., von Kerekjarto, M.

Der Asthmatiker, Ätiologie und Therapie von Asthma bronchiale in psychologischer Sicht.

Acta Derm Venereol 80 (1967) 348-353

Kanetsky, P.A., Holmes, R., Walker, A., Najarian, D., Swoyer, J., Guerry, D., Halpern, A., Rebbeck, T.R.

Interaction of Glutathione S-transferase M1 and T1 Genotypes and Malignant Melanoma.

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 10 (2001) 509-513

Kerb, R., Brockmüller, J., Reum, T., Roots, I.

Deficiency of glutathione S-transferases T1 and M1 as heritable factors of increased cutaneous UV sensitivity.

J Invest Dermatol. 108 (1997) 229-232

Ketter, B.

Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage.

Free Rad Res 28 (1998) 647-658

Ketterer, B., Meyer, D.J.

Glutathione transferases: a possible role in the detoxication and repair of DNS and lipid hydroperoxides.

Mutat Res 214 (1989) 33-40

Kim, C., Manning, R.O., Brown, R.P., Bruckner, J.V.

Use of the vial equilibration technique for determination of metabolic rate constants for dichloromethane.

Toxicol Appl Pharmacol 139 (1996) 243-251

Kong, K.H., Takasu, K., Inoue, H., Takahashi, K.

Tyrosine 7 in human class pi glutathione-s-transferase is important for lowering the pKa of the thiol group of glutathione in the enzyme – glutathione complex.

Biochemical and Biophysics Research Communications 184 (1992)

194 –197

Koolmann, J., Böhm, K.-H., Wirth, J.

Gewebe und Organe

In: "Taschenatlas für Biochemie", Koolmann, J., Böhm, K.-H., Wirth, J. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2001, 4. Auflage, 265-380

Kunugita, N.

Formaldehyd Exposure and Multiple Chemical Sensitivity.

J UOEH 25 (2003) 229-235

Kuzelova, M.A., Vlasak, R.

Recent work on formaldehyde.

Food Chem Toxicol 4 (1966) 241-249

Lafuente, A., Molina, R., Palou, J., Castel, T., Moral, A., Trias, M.

Phenotype of glutathione S-transferase μ (GST M1) and susceptibility to malignant melanoma.

Br J Cancer 72 (1995) 324-326

Lee, W.I., Fung, H.L.

Mechanism-based partial inactivation of glutathione S-transferases by nitroglycerin: tyrosine nitration vs sulfhydryl oxidation.

Nitric Oxide 8 (2003) 103-110

Listowski, I.

Glutathione-S-Transferases: intracellular binding, detoxification, and adaptive responses.

In: "Hepatic Transport and Bile Secretion: Physiology and Pathophysiology", Tavolini, N., Beck, P. D., (Hrsg.), Raven Press, New York, 1993, 397-405

LoBello, M., Pastore, A., Petruzelli, R., Parker, M., Wilce, M., Federicci, G., Ricci, G.

Conformational states of human placental glutathione transferase as probed by limited proteolysis.

Biochem Biophys Res Comm 194 (1993) 804-810

Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M.K., Warholm, M., Jörnvall, H.

Identifikation of three classes of cytosolic glutathione-s-transferases common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties.

PNAS USA 82 (1985)7202-7206

Mannervik, B., Awasthi, Y.C., Board, P.G., Hayes, J.D., Di Ilio, C., Ketterer, B., Listowsky, I., Morgenstern, R., Muramatsu, M., Pearson, W.R.

Nomenclature for human glutathione transferases.

Biochem J 282 (1992) 305-308

Menon, I. A., Persad, S., Ranadive, N. S., Haberman, H. F.

Photobiological effects of eumelanin and pheomelanin.

In: "Biological, Molecular, and Clinical Aspects of Pigmentation", Bagnara, J., Klaus, S., N., Paul, E., Scharl, M. (Hrsg.), University of Tokyo Press, Tokyo, 1985, 77-85

Meyer, D.J., Coles, B., Pemble, S.E., Gilmore, K.S., Frazer, G.M., Ketterer, B.

Theta, a new class of glutathione-s-transferase purified from rat and man.

Biochemical Journal 274 (1991) 409-414

Oakley, A.J., Rossjohn, J., Lo Bello, M., Caccuri, A.M., Federici, G., Parker, M. W.

The Three-Dimensional Structure of Human Pi Class Glutathione Transferase P1-1 in Complex with the Inhibitor Ethacrynic Acid and its Glutathione Conjugate.

Biochemistry 36 (1997) 576 –585

Pall, M.L.

Elevated peroxinrite as the cause of chronic fatigue syndrome: other inducers and mechanisms of symptom generation.

J Chronic Fatigue Syndr 7 (2000) 45-58

Pall, M.L.

Multiple chemical sensitivity towards to the end of controversy

Townsend Lett. Doctors Patients Aug / Sept (2005) 52 - 56

Pankow, D., Damme, B., Schror, K.

Acetylsalicylic acid - inducer of cytochrome P450 2E1.

Arch Toxicol 68 (1994) 261-265

Pemble, S., Taylor, J.B.

An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class theta glutathione transferase cDNA sequences.

Biochem J 287 (1992) 957-963

Rowe, J.D., Nieves, E., Listowsky, I.

Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferases: interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera.

Biochem J 325 (1997) 481-486

Schnackenberg, E., Fabig, K.R., Stanulla, M., Strobl, N., Lustig, M., Fabig, N., Scloot, W.A.

A cross-sectional study of self-reported chemical-related sensitivity is associated with gene variants of drug-metabolizing enzymes.

Environ Health 10 (2007) 6:6

Scoggan, K.A., Jakobsson, P.J., Ford-Hutchinson, A.W.

Production of leukotriene C₄ in different human tissues is attributable to distinct membrane bound biosynthetic enzymes.

JBC 272 (1997) 10182-10187

Shimizu, T., Izumi, T., Honda, Z., Seyama, Y., Kurachi, Y., Sugimoto, T.

Biosynthesis and functions of leukotriene C₄.

Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res 20 (1990) 46-53

Singhal, S.S., Ahmad, H., Sharma, R., Gupta, S., Haque, A.K, Awasthi, Y.C.

Purification and characterization of human muscle glutathione S-transferases: evidence that glutathione S-transferase zeta corresponds to a locus distinct from GST1, GST2, and GST3.

Arch Biochem Biophys. 285 (1991) 64-73

Singhal, S.S., Saxena, M., Ahmad, H., Awasthi, S., Haque, A.K., Awasthi, Y.C.

Glutathione S-transferases of human lung: characterization and evaluation of the protective role of the alpha-class isoenzymes against lipid peroxidation.

Arch Biochem Biophys 299 (1992) 232-241

Singhal, S.S., Zimniak, P., Sharma, R., Srivastava, S.K., Awasthi, S., Awasthi, Y.C.

A novel glutathione S-transferase isoenzyme similar to GST8-8 of rat and mGSTA4-4 (GST5.7) of mouse is selectively expressed in human tissues.

Biochim Biophys Acta 1204 (1994) 279-286

Strange, R.C., Spiteri, M., Ramachandran, S., Fryer, A.A.

Glutathione S-transferase family of enzymes

Mutat Res 482 (2001) 21-26

Svartz, J., Blomgran, R., Hammarstrom, S., Soderstrom, M.

Leukotriene C4 synthase homo-oligomers detected in living cells by bioluminescence resonance energy transfer.

Biochim Biophys Acta 1633 (2003) 90-95

Whalen, R., Boyer, T.D.

Human glutathione S-transferases (review).

Seminars in Liver Disease 18 (1998) 345-358

Wilce, M.C., Board, P.G., Feil, S.C., Parker, M.W.

Crystal structure of a theta-class glutathione transferase.

EMBO J 14 (1995) 2133-2143

Wilce, M.C., Oakley, A.J., Rossjohn, J., Feil, S.C., Bello, M.L., Ricci, G., Board, P.G., Parker, M.W.

Crystallographic studies of pi- and theta-class glutathione transferases.

In: "Glutathione S-Transferases: Structure, Function and Clinical Implications", Vermeulen N.P.E., Mulder, G.J., Nieuwenhuysse, H., Peters, W.H.M. and van Bladeren, P.J.(Hrsg.), Taylor and Francis Ltd., London (1996), 39-48.

Wong, P.S., Eisenreich, J., Reddy, S., Lopez, C.L., Cross, C.E., van der Vliet, A.

Inactivation of Glutathione S-Transferases by Nitric Oxide-Derived Oxidants: Exploring a Role for Tyrosine Nitration.

Arch Biochem Biophys. 394 (2001) 216-228

Wormhoudt, L.W., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P.

Genetic Polymorphisms of Human N-Acetyltransferase, Cytochrome P450, Glutathione-S-Transferase, and Epoxide Hydrolase Enzymes: Relevance to Xenobiotic Metabolism and Toxicity.

Crit Rev Toxicol 29 (1999) 59-124

Nimura, Y., M.D., Yokoyama, S., M.D., Fujimori, M., M.D., Aoki, T, M.D., Adachi, W., M.D., Nasu, T., M.D., He, M., M.D., Ping, Y., M.D., Futoshilida, M.D.

Genotyping of the CYP1A1 and GST M1 genes in esophageal carcinoma patients with special reference to smoking.

Cancer 80 (2000) 852-857

Zhong, S., Hayes, J.D., Spurr, N.K., Wolf, R.C.

Molecular genetics of human mu class gst multigene family.

In: "Structure and function of glutathione transferases", Tew, K.D., Pickett, C.B., Mantle T.J., Mannervik, B., Hayes, J.D. (Hrsg.), CRC Press, London Tokyo, 1993, 147-159.