

Klinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein
Technische Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)

Mutation des Chymase Gens im aktiven Zentrum und ihre Beziehung zu dermatologischen Erkrankungen

Julia Ellert

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

Doktors der Medizin

genemigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. M. W. Ollert
2. Priv.- Doz. Dr. C. I. Traidl-Hoffmann

Die Dissertation wurde am 17.09.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.2008 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1.	Die Mastzellen.....	4
1.1.1.	Herkunft und Differenzierung.....	4
1.1.2.	Morphologie und Färbeverhalten.....	5
1.1.3.	Mediatoren der Mastzellen.....	6
1.1.4.	Vorkommen und Funktion der Mastzellen.....	7
1.2.	Funktion der Mastzellproteasen	8
1.2.1.	Einteilung der Mastzellen nach dem Proteasegehalt.....	8
1.2.2.	Funktion der Tryptase	9
1.2.3.	Funktion der Chymase	10
1.3.	Single-nucleotid-polymorphismen im Chymase Gen	11
1.3.1.	Das Chymase Gen (CMA1)	12
1.3.2.	Single nucleotid polymorphismen.....	13
1.3.3.	Genetische Assoziationsstudien	15
2.	Zielsetzung der Arbeit.....	17
3.	Material und Methoden	18
3.1.	Materialien	18
3.1.1.	Reagenzien und Chemikalien.....	18
3.1.2.	Lösungen und Puffer	19
3.1.3.	Enzyme.....	20
3.1.4.	Primer und DNA-Marker	20
3.1.5.	Verbrauchsmaterialien	20
3.1.6.	Geräte	21
3.1.7.	Computerprogramme	22
3.2.	Methoden.....	23
3.2.1.	Patienten	23
3.2.2.	Isolierung von genomischer DNA aus Vollblut.....	23
3.2.3.	Spektrophotometrische Quantifizierung von DNA.....	24
3.2.4.	Prinzipien der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
3.2.5.	DNA-Amplifikation und Quantifizierung durch die real time TaqMan PCR..	25
3.2.6.	Bestimmung des CMA1 A/G Genotyps mittels konventioneller PCR	28

3.2.7.	Gelelektrophorese der Produkte der konventionellen PCR.....	30
3.2.8.	Statistik.....	31
4.	Ergebnisse	32
4.1.	Experimentelle Ergebnisse	32
4.1.1.	Ergebnisse der real time TaqMan PCR.....	32
4.1.2.	Ergebnisse der konventionellen PCR.....	33
4.2.	Patientencharakteristika	34
4.2.1.	Allgemeine Patientencharakteristika.....	34
4.2.2.	Klinische Patientencharakteristika	35
4.3.	Statistische Auswertung	38
4.3.1.	Zusammenhang zwischen Atopie und heterozygoten Genotyp A/G	38
4.3.2.	Zusammenhang zwischen Neoplasien und heterozygoten Genotyp A/G	39
4.3.3.	Zusammenhang zwischen Psoriasis und heterozygoten Genotyp A/G.....	41
4.3.4.	Auswertung des telefonischen Interviews.....	48
5.	Diskussion	50
5.1.	Genetische Varianten der Chymase und Atopie	50
5.2.	Genetische Varianten der Chymase und kardiovaskuläre Erkrankungen	54
5.3.	Mastzellen, Genetische Varianten der Chymase und Neoplasien.....	57
5.4.	Genetische Varianten der Chymase und verschiedene Typen von Psoriasis	62
5.5.	Genetische Varianten der Chymase und Häufigkeit der Aborte und Totgeburten ..	68
6.	Zusammenfassung.....	72
7.	Literaturverzeichnis.....	74
8.	Abkürzungsverzeichnis	108
9.	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen.....	110
10.	Danksagung.....	113
11.	Ehrenwort.....	114

1. Einleitung

1.1. Die Mastzellen

Mastzellen wurden vor mehr als 100 Jahren (1978) von Paul Ehrlich im Bindegewebe des Menschen entdeckt ^(47, 48). Ihren Namen erhielten sie aufgrund ihrer charakteristischen, das Zytoplasma nahezu ausfüllenden, metachromatisch anfärbbaren Granula. Ehrlich beschrieb sie als „gemästete“ Zellen. Wegen ihrer weiten anatomischen Verbreitung, ihrer Empfindlichkeit gegenüber zahlreichen Stimuli der Aktivierung und wegen ihrer Fähigkeit, eine Vielzahl von Mediatoren freizusetzen, spielen Mastzellen bei vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle ⁽⁶⁵⁾. Sie sind wichtige Effektorzellen allergischer Reaktionen, können Immunantwort initiieren und modulieren, inflammatorische Reaktionen auslösen, endogene Fibrino- und Thrombolysen und Angiogenese beeinflussen ⁽¹⁷⁰⁾.

1.1.1. Herkunft und Differenzierung

Die Mastzellen entwickeln sich aus CD34+ multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen (multipotent colony forming progenitors cells) ⁽¹¹²⁾, die primär das Knochenmark besiedeln. Im Gegensatz zu anderen Abkömmlingen der pluripotenten Stammzellen, beenden die Mastzellen ihre Differenzierung jedoch nicht im hämatopoetischen Gewebe. Im Blut sind deshalb auch keine reifen Mastzellen, sondern nur morphologisch nicht identifizierbare Vorläuferzellen der Mastzellen nachweisbar. Diese wandern in das Bindegewebe ein und differenzieren sich unter dem Einfluss von SCF (Stem cell factor) in die funktionell reifen und morphologisch identifizierbaren Mastzellen ^(217, 65).

1.1.2. Morphologie und Färbeverhalten

Reifen Mastzellen sind runde bis langgestreckte Zellen mit einem Durchmesser von ca. 12,6-13,5 μm . Ihre Zellform ist an das umgebende Gewebe angepasst. Im lockeren Bindegewebe sind sie eher rund bis oval, im kollagenen Bindegewebe und um Blutgefäße eher langgestreckt ^(13, 229). Sie haben einen runden, gelegentlich exzentrisch gelegenen Kern und zytoplasmatische Granula, deren Gehalt bis zu 50-55% des gesamten Zytoplasmas betragen kann ^(16, 93, 188). Diese basophilen sekretorischen Mastzellgranula färben sich typischerweise metachromatisch ⁽⁴⁷⁾. Dies beruht auf dem Gehalt an stark sauren, polyanionischen Proteoglykanen in den Granula.

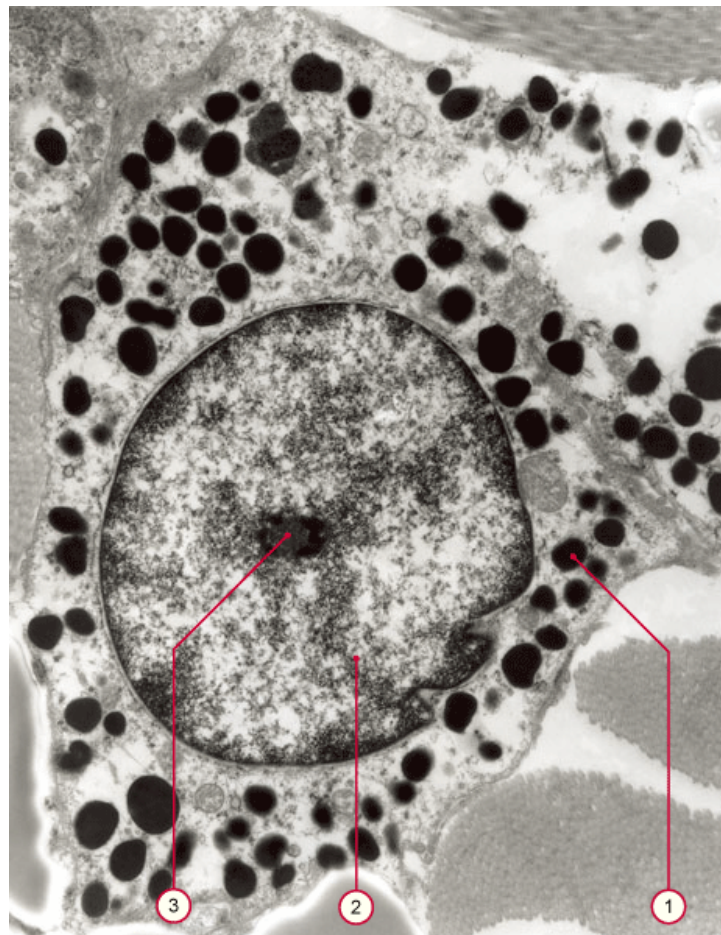


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Mastzelle:

1. Dunkel gefärbte Granula
2. Zellkern
3. Nukleolus

1.1.3. Mediatoren der Mastzellen

Mastzellen werden anhand der in ihren Granula synthetisierten und gespeicherten Inhaltsstoffe identifiziert und charakterisiert. Mediatoren lassen sich in drei Gruppen unterteilen: man unterscheidet präformierte Mediatoren, d.h. in aktiver Form intragranulär gespeicherte, neu synthetisierte, d.h. nach Zellaktivierung de novo synthetisierte Mediatoren und Mastzellzytokine, welche teilweise schon präformiert in den Granula gespeichert vorliegen und teilweise erst nach Mastzellaktivierung neu produziert werden.

Tabelle 1: Überblick über die Mediatoren der Mastzellen

1. Präformierte Mediatoren	
1.1. Proteoglykane Heparin Chondroitinsulfat A Chondroitinsulfat E	139, 192, 210
1.2. Neutrale Proteasen Tryptase Chymase Carboxypeptidase Cathepsin G	187, 101, 67, 178
1.3. Biogene Amine Histamin	54
2. Neu synthetisierte Mediatoren	
Leukotriene Prostaglandine Thrombozyten-aggregierender Faktor	184
3. Mastzellzytokine	
Interleukine Tumor-Nekrose Faktor- α (TNF- α) Granulozyte macrophage-colony stimulating Factor (GM-CSF) Transforming growth factor- β (TGF- β) Interferon- γ Macrophage inflammatory protein-1(MIP-1)	68, 69, 19

Auf die wichtigsten Charakteristika und Funktionen aller Mastzellmediatoren kann im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden. Im Abschnitt 1.2 werden nur die neutralen Proteasen näher besprochen.

1.1.4. Vorkommen und Funktion der Mastzellen

Mastzellen kommen in fast allen Organen und Geweben des Körpers vor und haben weitreichende, jedoch noch längst nicht vollständig geklärte Bedeutungen. Sie spielen bei vielen biologischen Prozessen eine Rolle.

Die höchste Mastzellichte findet man in Geweben, die in direktem Kontakt zur Außenwelt stehen, also in der Haut und Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes und des Tracheobronchialsystems. Diese Verteilung bringt Mastzellen in eine Position, in der sie leicht in Kontakt mit Antigenen und anderen Agentien treten können ⁽¹⁵⁷⁾. Die Mastzellaktivierung kann durch Bindung von Immunglobulin E, aber auch durch verschiedene andere Substanzen und Mechanismen ausgelöst werden, was zur Freisetzung von neu synthetisierten und präformierten Mediatoren führt ^(50, 119). Aufgrund der vielfältigen Wirkung dieser Mediatoren nehmen Mastzellen nicht nur in der Immunpathologie, sondern auch bei zahlreichen physiologischen Prozessen eine wichtige Stellung ein. Sie beeinflussen wegen ihres Effektes auf die Kollagenbildung, auf die Gefäßpermeabilität und auf die Angiogenese die Wundheilung ⁽¹⁷⁰⁾. Weiterhin sind die Mastzellen beim Knochengewebsumbau und bei der Homöostase vaskulärer, glandulärer, muskulärer und entzündlicher Funktionen von Bedeutung ⁽²⁰⁷⁾.

Vor allem sind aber die Mastzellen an immunpathologischen Reaktionen beteiligt, so üben sie einen wichtigen Einfluss auf allergische Reaktionen vom Soforttyp z.B. Bronchialasthma, allergische Rhinitis, Urtikaria und sogar auch auf Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ aus ^(154, 10). Bei der Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp steht aber im Gegensatz zu Immunreaktion vom Soforttyp, nicht die Mastzelldegranulation, sondern die Mastzellhyperplasie im Mittelpunkt ⁽¹⁵⁾.

Auch an der Pathogenese von vielen nicht allergischen Erkrankungen sind die Mastzellen beteiligt ⁽⁶⁵⁾. Sie beeinflussen die Narbengewebsbildung, die Kallusbildung, osteoporotische

Erkrankungen und verschiedene peripheren Neuropathien ^(136, 15). Bei entzündlichen Reaktionen wie interstitiellen Pneumonien, intestinalen Helminthosen und ulzerativer Kolitis wird die Rolle der Mastzellen diskutiert ⁽¹³⁶⁾. Auch im Zusammenhang mit der Pigmentspeicherung bei Fibrosen, der Infiltration von Tumoren, zystischer Fibrose, atopischer Dermatitis, Psoriasis und bei systemischer Mastozytose wurde von einer Mastzellbeteiligung berichtet ^(200, 136).

1.2. Funktion der Mastzellproteasen

Die in den Mastzellgranula gespeicherten Proteasen sind serine Proteine, welche nach der Mastzellaktivierung in katalytisch aktiver Form freigesetzt werden ^(25, 189). Zu den wichtigsten Mastzellproteasen gehören Tryptase, Chymase, daneben Carboxypeptidase und Cathepsin G ^(103, 178). Sie werden in hoher Konzentration intrazellulär in den sekretorischen Granula, an Proteoglykane gebunden, gespeichert ^(182, 183).

1.2.1. Einteilung der Mastzellen nach dem Proteasegehalt

Beim Menschen kann man die Mastzellen aufgrund ihres unterschiedlichen Gehaltes an den neutralen Proteasen in zwei Typen einteilen. Es werden Mastzellen, die nur Tryptase enthalten, die sogenannten MC_T-Mastzellen, von denen unterschieden, die Tryptase und Chymase enthalten, die sogenannten MC_{TC}-Mastzellen ^(102, 223). Laut Saito et al. wird in MC_{TC}-Mastzellen die mRNA für Chymase hochreguliert, während sie in MC_T-Mastzellen fehlt ⁽¹⁷³⁾. Außerdem befinden sich in den chymasehaltigen MC_{TC}-Mastzellen als weitere Proteasen auch Cathepsin G und Carboxypeptidase ^(178, 67).

Die MC_{TC}-Mastzellen machen die Mehrheit der Mastzellpopulation der Haut (98%), der Synovia, des Herzens, der Plazenta und der intestinalen Submukosa aus ^(101, 214). Die MC_T-Mastzellen sind vorwiegend in der intestinalen Mukosa und machen 90% der pulmonalen Mastzellenpopulation aus ⁽¹⁰²⁾. Bei den beiden Subpopulationen finden sich Hinweise auf den verschiedenen Satz ihrer Zytokine, was auf die Unterschiede in der funktionellen Bedeutung

schliessen lässt⁽¹⁹⁾. Die Anzahl der MC_T-Mastzellen ist um die Zentren der Proliferation der Th₂-Lymphozyten sowie bei allergischen und parasitären Erkrankungen erhöht und bei Patienten mit Immundefektsyndromen erniedrigt⁽¹⁹¹⁾. Das spricht für die Bedeutung dieser Subpopulation bei Abwehrmechanismen des Organismus. Die MC_{TC}-Mastzellen scheinen für die Angiogenese und das Geweberemodelling verantwortlich zu sein. Sie finden sich in erhöhter Anzahl bei fibrotischen, nicht jedoch bei allergischen und parasitären Erkrankungen⁽¹⁹¹⁾.

1.2.2. Funktion der Tryptase

Mit Hilfe von DNA-Analysen konnte man Tryptase in α - und β -Tryptase differenzieren, wobei bei der α -Tryptase zwei Hauptformen (α I und α II), bei der β -Tryptase drei Hauptformen (β I, β II und β III) unterschieden werden können^(218, 193, 140). Die α -Tryptase stellt die aktive homotetramere Form dar, dessen Dissoziation durch Heparin verhindert wird^(186, 190). Die β -Tryptase ist die monomere, inaktive Form, die in Anwesenheit von Heparin und saurem pH-Wert in die aktive tetramere Form umgewandelt werden kann⁽¹⁷⁴⁾.

Bedeutung im Respirationstrakt:

Tryptase potenziert beim sensibilisierten Menschen die Histamin-vermittelte Bronchokonstriktion durch die Erhöhung der Sensitivität der glatten Muskulatur gegenüber dem Histamin⁽¹⁰⁶⁾. Außerdem erhöht sie die Kontraktilität der glatten Muskulatur dadurch, dass sie bronchodilatatorisch wirkende Neuropeptide, wie VIP (vasoaktives intestinales Peptid) und CGRF (Calcitonin-Gen-Related Polypeptid) spaltet^(194, 206). Schließlich ist Tryptase ein Mitogen für Epithelzellen und stimuliert in diesen die Produktion von Il-8, was eine Beteiligung der Tryptase an entzündlichen und allergischen Erkrankungen des Respirationstraktes vermuten lässt⁽²⁴⁾.

Bedeutung beim Gewebeumbau:

Tryptase ist ein Mitogen für die Fibroblasten. Es kann die Fibroblastenproliferation direkt oder auch indirekt, durch Aktivierung des bFGFs (basic fibroblast growth factor), induzieren⁽¹²⁴⁾.

Bedeutung bei Entzündungen:

Trypsinase kann aufgrund ihrer hydrolytischen Aktivität zu einer Degradation verschiedener Elemente des interzellulären Bindegewebes führen und damit eine Auflockerung der Interzellulärmatrix und Erleichterung der Ausbreitung austretender Blutflüssigkeit bewirken⁽⁷⁷⁾. Trypsinase aus der Haut des Menschen kann nämlich sowohl direkt Typ IV Kollagen⁽¹¹¹⁾ als auch indirekt Kollagenase von Typ IV und Fibronectin spalten⁽¹²⁹⁾. Außerdem kann sie Pro-Stromelysin zu Stromelysin (Metalloproteinase III) aktivieren, welches wiederum Prokollagenase aktiviert⁽⁷⁶⁾. Durch die Spaltung und Inaktivierung von Fibrinogen hemmt Trypsinase zudem die Blutgerinnung und fördert die Extravasation von Blutplasma⁽¹⁸⁵⁾. Auf die Wirkung der Trypsinase kann auch die Leukozytenemigration bei Entzündungen zurückgeführt werden, da sie die Freisetzung von IL-8 und die Expressierung von ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) in Epithelzellen stimuliert⁽²⁴⁾.

1.2.3. Funktion der Chymase

Nach dem heutigen Kenntnisstand gibt es beim Menschen nur eine Chymase Form, die als Monomer vorliegt⁽²⁷⁾. In der sekretorischen Granula der Mastzellen ist sie in nichtkovalenter Bindung an anionische, sulfatierte Proteoglykane gebunden⁽¹⁷⁶⁾. Die Chymase ist, im Gegensatz zur Trypsinase, gegenüber der Inaktivierung durch die im Blutplasma, in der Lunge und im Urin vorhandenen klassischen Inhibitoren seriner Esterasen, wie dem α_1 -Proteinase-Inhibitor nicht resistent⁽¹⁷⁷⁾.

Bedeutung im Respirationstrakt:

Die Chymase der Mastzellen ist der potenteste Sekretionsauslöser für submuköse und seröse Drüsenzellen in den Atemwegen⁽¹⁹⁹⁾. Erhöhte Sekretionsaktivität ist für entzündliche Atemwegserkrankungen, wie Asthma, chronische Bronchitis und zystische Fibrose charakteristisch⁽²⁰⁰⁾. Außerdem kann Chymase sowohl das bronchodilatatorisch wirkende VIP als auch bronchokonstriktorisch wirkende Peptide wie z.B. Bradykinin und Kallidin spalten^(163, 61). Weiterhin bewirkt Chymase die Limitierung der Mastzelldegranulation durch die Degradation von Substanz P⁽²⁶⁾.

Bedeutung bei Entzündungen:

Bei entzündlichen Veränderungen spielt Chymase aufgrund verschiedener Mechanismen eine wichtige Rolle. Sie kann Histamin degradierende Enzyme inaktivieren und den Histamineffekt über die Induzierung einer Vasodilatation verstärken und damit die Extravasation von Blutplasma fördern ⁽¹⁷¹⁾. Weiterhin hat Chymase ähnlich wie Tryptase hydrolytische Aktivität und kann damit eine Auflockerung der Interzellulärmatrix bewirken ⁽⁷⁷⁾. Um das zu bewirken, kann sie direkt Prokollagenase und Pro-Stromelysin zu Stromelysin aktivieren ^(122, 172). Sichtbare Veränderungen in der Haut des Menschen sind ein Verlust der Adhäsionsfilamente zwischen Basalmembran und dermo-epidermaler Junctionszone. Das führt zu einer Separierung der Epidermis von der Dermis in der Lamina lucida, was als Blasenbildung sichtbar wird ⁽²⁰⁾. Eine weitere wichtige Funktion, die Chymase in der Haut übernimmt, ist die Kontrolle der Mastzellaktivität, da sie durch die Inaktivierung des Histaminliberators Substanz P die Mastzelldegranulation limitieren kann ⁽²⁶⁾.

Bedeutung bei der Regulierung des Blutdrucks:

In vielen Studien konnte man zeigen, dass Chymase die Fähigkeit besitzt, unabhängig von ACE (Angiotensin-Converting-Enzyme), Angiotensin I zu Angiotensin II, einem potenten lokalen Vasokonstriktor, zu konvertieren ^(195, 214). Allerdings ist es bis heute nicht klar, welchen Einfluss Chymase tatsächlich auf den Blutdruck hat.

1.3. Single-nucleotid-polymorphismen im Chymase Gen

Während der letzten Jahre wurden große Anstrengungen unternommen, genetische Faktoren bei der Entstehung komplexer Erkrankungen (z.B. Atopisches Ekzem, Asthma, Psoriasis und Bluthochdruck) zu identifizieren. In diesem Zusammenhang ist der Einfluss des Chymase Gens und seinen Polymorphismen interessant.

1.3.1. Das Chymase Gen (CMA1)

Das Chymase Gen, welches das Chymase Enzym codiert, liegt auf dem langen Arm des Chromosom 14⁽²⁸⁾. Er befindet sich auf den Banden 14q11.1-11.2, in der selben Gruppe wie die Gene für die drei anderen serinen Proteasen: Cathepsin G, Granzyme H und Granzyme B. Dabei liegt Cathepsin G Gen 50-150 kb vom 5'Ende des Chymase Gens entfernt⁽²⁹⁾. Die schematische Darstellung der Lage der serinen Proteasen zueinander erfolgt in Abbildung 2.

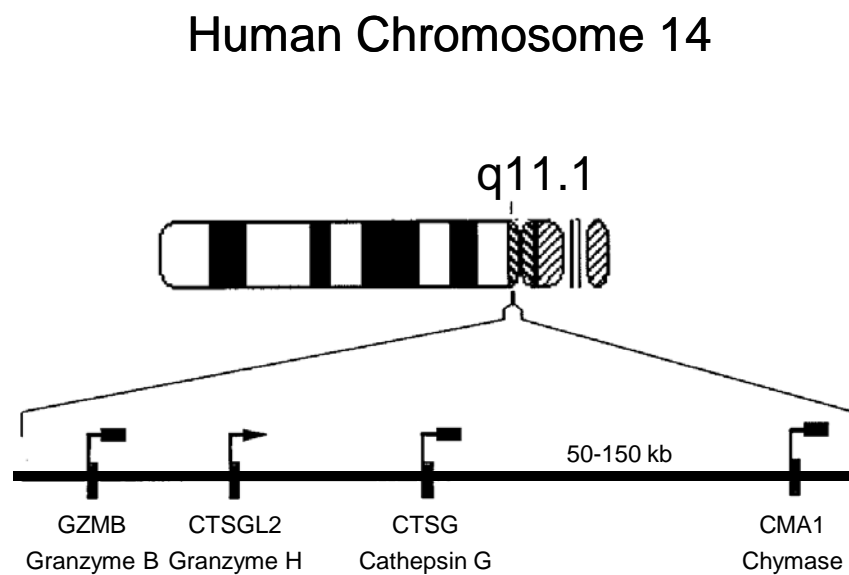


Abbildung 2: Gruppe der humanen serinen Proteasen auf dem Chromosom 14q11.1-11.2. Der Pfeil zeigt die Richtung der Transkription an⁽³⁰⁾.

Die Nukleotid Sequenz der Chymase hat eine ungefähre Länge von 3kb und enthält fünf codierende Sequenzen (Exons), die durch vier nichtcodierende Sequenzen (Introns) getrennt sind. Die 5' flankierende Region des Promotors enthält eine CAAT und eine TATA Box, in der 3' flankierenden Region befindet sich der Motiv, AATAAA, der für die Anheftung eines Poly-A-Restes von Bedeutung ist⁽²¹⁵⁾. Schematische Darstellung des Chymase Gens erfolgt in der Abbildung 3.

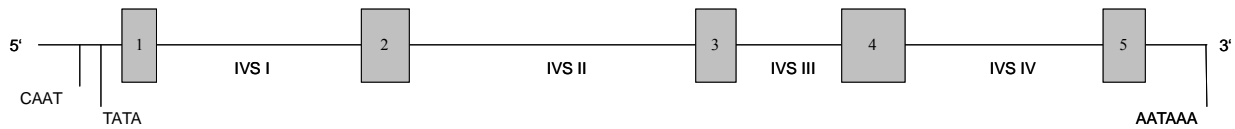


Abbildung 3: Schematische Darstellung des humanen Chymase Gens. Es werden die Exons (Offene Boxen mit arabischen Nummern) und die intervenierende Sequenzen (IVS, I-IV) dargestellt. CAAT, TATA Boxen und AATAAA-Motiv befinden sich in den 5'- und 3'- flankierenden Regionen ⁽²¹⁵⁾.

Das initial kodierte Protein ist ein Präproenzym und hat eine Länge von 247 Aminosäuren, dabei bilden die ersten 19 Aminosäuren ein Signalpeptid, anschließend kommt ein N-terminales Dipeptid und die letzten 226 Aminosäuren bilden die katalytische Domäne mit dem aktiven Zentrum (His66, Asp110, Ser203) ^(28, 215). Nach der Abtrennung des Signalpeptids und des Propeptids entsteht das reife aus 226 Aminosäuren bestehende Enzym, das noch auf zwei Seiten durch N-Glykosylierung modifiziert wird und zum Schluss ein Gewicht von $\approx 30\text{kDa}$ aufweist ⁽²⁸⁾.

1.3.2. Single nucleotid polymorphismen

Bei den Genpolymorphismen handelt es sich um häufig vorkommende Varianten der genomischen DNA. Tritt eine Abweichung in einer Base mit einer Häufigkeit von mehr als 1% in einer Population auf, so spricht man von einem Einzelbasenpolymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP). Solche Einzelbasenpolymorphismen verteilen sich mit unterschiedlicher Dichte über das Genom, wobei sich ein Großteil der SNPs in nichtcodierenden Bereichen befindet. Prinzipiell kann ein Polymorphismus die Menge (Quantität) und die Eigenschaften (Qualität) des Genproduktes beeinflussen. So konnte an der Hand einer Reihe von Beispielen gezeigt werden, dass Polymorphismen im Promotor eines Gens die Bindungstelle für einen oder mehrere Transkriptionsfaktoren verändern können und dadurch die Transkription und Expression des Gens beeinflussen ⁽²¹⁹⁾. In anderen Fällen konnte gezeigt werden, dass Genpolymorphismen einen Einfluss auf Spleißen und Stabilität der mRNA haben können ⁽¹⁹⁷⁾. Polymorphismen sind aber auch in der Lage Austausch einer Aminosäure oder eine andere Veränderung in der Aminosäuresequenz des Genproduktes zu verursachen. Derartige Veränderungen der Aminosäuresequenz können natürlich zu

erheblichen Veränderungen der Funktion des Proteins führen. Es sind auch Fälle bekannt, bei denen der Austausch einer Aminosäure zum Einfügen oder Wegfallen einer Schnittstelle für Proteasen führt^(209, 148). Dadurch kann wiederum die Menge an verfügbarem Genprodukt beeinflusst werden.

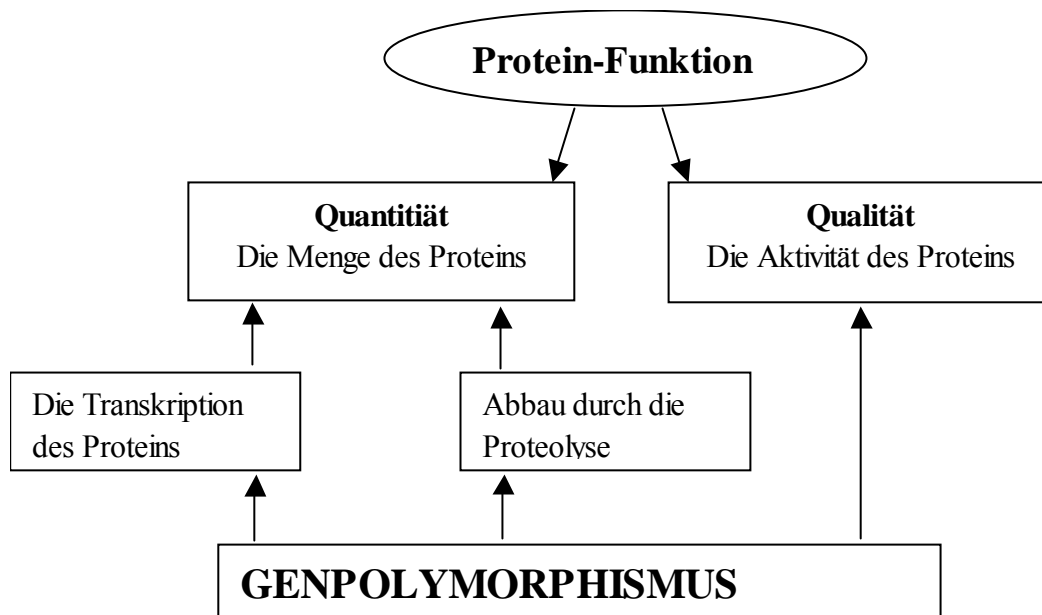


Abbildung 4: Schema zum möglichen Einfluss eines Genpolymorphismus auf Quantität und Qualität des Genproduktes

Im Chymase Gen wurden bis heute insgesamt acht Einzelbasenpolymorphismen in der codierenden Region beschrieben. Von diesen acht SNPs führten sechs zu einem Aminosäureaustausch, sind also nichtsynonyme SNPs. Im nichtcodierenden Bereich (Introns, 5' flankierende Region) wurden ebenfalls zahlreiche Einzelbasenpolymorphismen identifiziert⁽¹⁹⁸⁾.

Tabelle 2: SNPs im codierenden Bereich des Chymase Gens ^(198, 215, 28).

DbSNP rs# cluster id	Wildtyp (W)- Sequenz	Mutations (M)- Sequenz	Codon Position	Aminosäure W/M	Aminosäure Position	Allelfrequenzen W/M (in %)
Rs13306254	TAC	TAA	Exon 2	Tyr/Stop	38	k.A.
rs2546	GGT	CGT	Exon 2	Gly/Arg	46	G=97,9/C=2,1
Rs13306251	ACG	ATG	Exon 2	Thr/Met	63	k.A.
rs5247	CAT	CGT	Exon 2	His/Arg	66	A=95,7/G=4,3
Rs13306252	CGT	CAT	Exon 3	Arg/His	98	k.A.
rs5249	TCA	TAA	Exon 4	Ser/Ser	133	C=6,4/A=93,67
Rs13306253	AGA	AGG	Exon 4	Arg/Arg	151	k.A.
Rs7142020	GTG	GCG	Exon 4	Val/Ala	165	k.A.

Fett gedruckt: nichtsynonyme SNPs, es kommt also zum Aminosäureaustausch

Position der Aminosäure bezieht sich auf Präproenzym

k.A.: keine Angaben

1.3.3. Genetische Assoziationsstudien

Durch Assoziationsstudien wird versucht, Krankheitsgene auf dem Genom zu lokalisieren, was auf der Detektion von Krankheitsassoziationen mit bestimmten „Single Nukleotide Polymorphismen“ beruht. Wie bereits erwähnt, sind für das Chymase Gen einige Polymorphismen bekannt. Es wurden bis heute zahlreiche Assoziationsstudien unternommen, um den möglichen Zusammenhang von einigen Chymase Gen Polymorphismen mit dermatologischen und kardiovaskulären Erkrankungen festzustellen.

Mao und Mitarbeiter haben als erste den Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus in der 5' flankierenden Region des Promotors (-1903G/A) und Asthma, Rhinitis und Ekzem in der japanischen Bevölkerung untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass dieser Polymorphismus nur auf das Ekzem Einfluss haben könnte ⁽¹³¹⁾. In weiterer Studie bestätigten Mao und seine Mitarbeiter dieses Ergebnis und stellten sogar fest, dass die Assoziation bei Ekzempatienten mit niedrigerem Immunglobulin E Serumspiegel höher ist, als bei Ekzempatienten mit hohem Immunglobulin E Serumspiegel ⁽¹³²⁾. Auch andere Forschergruppen haben sich mit dieser genetischer Variante des Chymase Gens im

Zusammenhang mit Atopie beschäftigt, die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich ^(109, 208, 104).

Pfeufer untersuchte den Einfluß dieses Chymase Genpolymorphismus (-1903G/A) auch auf die hypertrophische Kardiomyopathie und stellte dabei fest, dass der Genotyp AA oder AG das relative Risiko für den Genpolymorphismus des Angiotensin Converting Enzyms erhöht (ACE DD Phänotyp). ACE DD Phänotyp kommt wiederum häufiger bei Patienten mit Kardiomyopathie vor ⁽¹⁵⁹⁾. Auch eine andere Studie konnte diese Aussage bestätigen ⁽⁷⁸⁾. Ein Zusammenhang mit Bluthochdruck ergab sich nicht, jedoch gab es einige Hinweise, dass dieser SNP Lipidmetabolismus beeinflussen könnte ⁽⁶³⁾.

Eine andere japanische Forschergruppe hat kürzlich zwei Mutationen im Chymase Gen, die zum Funktionsverlust des Enzyms führen, gefunden und die Assoziation mit der Pathogenese des Bluthochdrucks untersucht. Bei der ersten Mutation (C785A-Aminosäure Position 38) im Exon 2 entsteht ein Stop Codon. Bei der zweiten Mutation (G881C) in der das Spleißen beeinflussenden Region zwischen Exon 2 und Intron 2 entsteht auch ein Stop Codon und eine frame-shift Mutation. In dieser Studie konnte jedoch kein Zusammenhang mit der Pathogenese des Bluthochdrucks festgestellt werden ⁽¹⁵²⁾.

2. Zielsetzung der Arbeit

Aus den vorherigen Assoziationsanalysen wird ersichtlich, dass das Chymase Gen eine wichtige Schlüsselrolle bei der Entwicklung von vielen dermatologischen und kardiovaskulären Erkrankungen spielen könnte, jedoch bleiben die Ergebnisse kontrovers.

In diesem Zusammenhang war es für uns naheliegend, sich mit dieser Thematik zu beschäftigen und weitere Untersuchungen durchzuführen. Von den sechs nichtsynonymen Polymorphismen interessierten wir uns vor allem für den SNP (rs5247), bei dem der Einzelbasenaustausch, Adenosin (A) wird durch Guanin (G) ersetzt, zu einem Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum des Enzyms führt (His66Arg). Da das aktive Zentrum eine hochdifferenzierte Raumstruktur darstellt, die Enzymen die Fähigkeit gibt Substrate sehr spezifisch zu binden und umzusetzen⁽¹²⁸⁾, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass durch den Austausch der Aminosäure im aktiven Zentrum die Funktion der Chymase gestört ist.

Im einzelnen sollten folgende Fragestellungen untersucht werden.

- Wie häufig kommt es zum Einzelbasenaustausch G/A? In diesem Zusammenhang ist es aufschlussreichend zu erfahren, wie oft der heterozygote Genotyp A/G vorkommt, und ob der homozygote Genotyp GG überlebensfähig ist?
- Welchen Einfluss hat der His66Arg Polymorphismus (rs5247) im humanen Chymase Gen auf das Auftreten von dermatologischen Erkrankungen wie Atopie, Psoriasis und Neoplasien usw.?

Hierzu wurde in einem Kollektiv von 1004 konsekutiven Patienten der dermatologischen Klinik der His66Arg SNP durch real time TaqMan PCR und Restriktionsenzymanalyse bestimmt, die anamnestischen und klinischen Daten erfasst und die Daten mittels statistischer Analyse untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Reagenzien und Chemikalien

NaCl 5M (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim)

Isopropanol (Apotheke des Klinikums rechts der Isar der TU München)

Ethanol 70% (Apotheke des Klinikums rechts der Isar der TU München)

NH₄CL 155mM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim)

KHCO₃ 20mM (Merck, D-64271 Darmstadt)

EDTA 0,5M (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim)

HCl (Merck, D-64271 Darmstadt)

NaOH (Merck, D-64271 Darmstadt)

Tris/HCl 1M (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim)

Aqua ad iniectabilia (Delta Select, D-72793 Pfullingen)

SDS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim)

Agarose (Serva, D-69126 Heidelberg)

Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim)

3.1.2. Lösungen und Puffer

RBC-Lysis-Puffer: NH₄Cl 155mM 8,29g
KHCO₃ 20mM 1,00g
EDTA 0,5M 200µl
Mit Aqua ad iniectabilia 1,00l auffüllen und umrühren
pH 7,4 mit (HCl/NaOH) einstellen
nach Autoklavieren pH kontrollieren

Proteinase K Puffer: Tris/HCl 1M 5,00ml
EDTA 0,5M 2,00ml
NaCl 5M 3,00ml
Mit Aqua ad iniectabilia auf 1,00l auffüllen und autoklavieren

TE-Puffer: Tris/HCl 10mM 1,576g
EDTA 0,5M 2ml
Mit Aqua ad iniectabilia auf 1,00l auffüllen und autoklavieren

Proteinase K: Proteinase K 10,00mg
Aqua ad iniectabilia 500µl hinzufügen und bei -20°C lagern

SDS20%: SDS 20,00g
Mit Aqua ad iniectabilia auf 100ml auffüllen

TBE-Puffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim)

Ladepuffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim)

3.1.3. Enzyme

Hot start Taq master mix (Qiagen GmbH, D-40721 Hilden)

TaqMan®Universal PCR Master Mix, No AmpErase®UNG (PE Biosystems, D-64331 Weiterstadt)

Restriktionsenzym Bcl I (Fermentas GmbH, D-68789 St.Leon-Rot)

Proteinase K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim)

3.1.4. Primer und DNA-Marker

Primer Vorwärts, Primer Rückwärts (MWG-biotechnology, D- 85560 Ebersberg)

80X Assay Mix (PE Biosystems, D-64331 Weiterstadt)

DNA-Marker 50bp und 1kb (Roche, D-82377 Pensberg)

3.1.5. Verbrauchsmaterialien

EDTA-Monovetten (Sarstedt Monovette®, D-51588 Nümbrecht)

Falcon Röhrchen 15ml (Becton Dickinson Labware, D-69126 Heidelberg)

Filter Tips Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Bioenzym Scientific GmbH D-31833 Oldendorf)

Sterile Einmalpipetten 5ml, 10ml (Sarstedt Serological Pipette, D-51588 Nümbrecht)

Eppendorf Tubes 1,5ml (Eppendorf AG, D-22331 Hamburg)

PCR-Tube mit Filter (Bioenzym Diagnostik GmbH, D-26121 Oldenburg)

3.1.6. Geräte

GeneAmp ® 2700 PCR System, Perkin Elmer (PE Biosystems, D-64331 Weiterstadt)

ABI Prism Sequence Detection System SDS 7000 (PE Biosystems, D-64331 Weiterstadt)

Elektrophoresekammern (Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg)

Gleichspannungsgeräte (Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg)

Gelträger (EASY-CAST™, peQLab, D-91052 Erlangen)

UV-Leuchttisch (Bachhofer GmbH, D-72760 Reutlingen)

Zentrifuge mit variabler Temperatureinstellung (Sigma-Laborzentrifugen GmbH, D-37507 Osterode am Harz)

Mikrowellenherd (Siemens AG, D-81679 München)

Spektrophotometer: UltroSpec3 (Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg)

Elektronischer Heizblock (Gebrüder Liebisch GmbH, D-33649 Bielefeld)

Schüttelwasserbad (Gesellschaft für Labortechnik GmbH, D-30927 Burgwedel)

Vortex (IDL GmbH & CO. KG, D-61130 Nidderau)

Laborwaage (Sartorius AG, D-37073 Göttingen)

pH-Meter (pH537, WTW, D-79809 Weilheim)

HICLAVE (Wagner & Munz GmbH, D-81829 München)

Eppendorf Easypet Pipettierhilfe (Eppendorf AG, D-22331 Hamburg)

Eppendorf Reference-Pipetten (Eppendorf AG, D-22331 Hamburg)

Brutschrank (Geneo BioTechProducts GmbH, D-Hamburg)

3.1.7. Computerprogramme

ABI PRISM 7000 SDS Software (PE Biosystems, D-64331 Weiterstadt)

GelDoc2000 System (Biorad Laboratories GmbH, Hercules, 94547 CA, USA)

Microsoft Word (Microsoft, USA)

Programm SPSS, Version 11.0 Professional (Mathsoft, Inc., Seattle, USA)

3.2. Methoden

3.2.1. Patienten

Der His66Arg Polymorphismus wurde an einer großen Anzahl der konsekutiven Patienten, die sich im Zeitraum von Oktober 2003 bis April 2004 in der stationären oder ambulanten Behandlung der dermatologischen Klinik der Technischen Universität München befanden, untersucht. Insgesamt waren es 1004 Patienten im Alter zwischen zwei Monaten und 95 Jahren, davon waren 552 weiblich und 452 männlich. Jedem Patienten wurden ca. 3ml Vollblut peripher venös in EDTA-Monovette entnommen und, sofern keine sofortige Bearbeitung im Labor durchgeführt worden ist, lagerte man die Proben bei -20°C.

3.2.2. Isolierung von genomischer DNA aus Vollblut

Zur Weiterverarbeitung des Erbguts mittels Amplifikationsverfahren war es erforderlich, die DNA aus den kernhaltigen Zellen des Blutes freizusetzen und in eine gereinigte Form überzuführen. Man ist nach dem folgenden Prinzip vorgegangen:

3ml EDTA-Vollblut wurden mit 12ml eiskaltem RBC-Lysis-Puffer in einem 15ml-Falcon-Röhrchen vermengt und unter mehrmaligen Mischen mindestens 15min auf Eis inkubiert. Anschließend hat man die Zellen für 10min bei 2500rpm und 4°C zentrifugiert, den Überstand vorsichtig abgekippt, das Zellpellet erneut in 5ml eiskalten RBC-Lysis-Puffer vollständig resuspendiert und wieder für 10 min bei 2500rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgekippt und die kernhaltigen Zellen enthaltende Pellet in 2,5ml Proteinase-K-Puffer vollständig suspendiert, nach Zugabe von 20µl Proteinase K (20mg/ml) und 125 µl SDS (20%) bei 37°C über Nacht inkubiert. SDS hat dabei die Zellmembran zerstört und die Proteine der Zellen für die Proteinase K angreifbar gemacht. Nach der Leukolyse wurde am nächsten Tag 2,5ml Proteinase K Puffer und 1,5ml saturiertes NaCl zugegeben, die Mischung 15sec gevortext und anschließend für 20min bei 3500rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Röhrchen sollte ein Pellet, den DNA haltigen klaren Überstand sowie oben eine Schaumschicht enthalten. Um die DNA zu gewinnen, wurde der

klare Überstand in ein neues Röhrchen umpipettiert, das Röhrchen mit Isopropanol aufgefüllt und 50x invertiert. Die DNA fällt dabei als Knäuel aus. Anschließend wurde die DNA für 10min bei 4500rpm und Raumtemperatur pelletiert, dann dekantiert, mit 10ml 70% Ethanol gewaschen und zum Schluss noch mal 10min lang bei 4500rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Dekantierung wurde die DNA enthaltene Röhrchen umgedreht auf Filterpapier für mindestens 30 min trocknen gelassen, anschließend die trockene DNA in 100µl TE-Puffer gelöst, am nächsten Tag in die Eppendorf Tubes umpipettiert und bei -20°C gelagert.

3.2.3. Spektrophotometrische Quantifizierung von DNA

DNA hat die Eigenschaft UV-Licht bei einer Wellenlänge zwischen 260 und 280nm, mit einem Absorptionsmaximum bei 260nm, zu absorbieren. Mit Hilfe eines Photometers konnte die optische Dichte (OD) einer DNA-Lösung im Ultraviolettbereich bei 260nm und 280nm bestimmt werden. Hierbei ging man davon aus, dass eine OD₂₆₀ von 1 etwa 50g hochmolekularer doppelsträngiger DNA entspricht. Zur Konzentrationsbestimmung wurde 400µl einer 40-fach verdünnten DNA-Lösung gegen das gleiche Volumen des Verdünnungsmediums (hier H₂O) gemessen. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte im Bereich 1,7 und 1,9 liegen und bei einer guten Präparation reproduzierbar sein. Bei niedrigeren Werten spricht es für eine Verunreinigung der Lösung hin.

3.2.4. Prinzipien der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein 1986 von Mullis beschriebenes, sehr sensitives Verfahren, welches ermöglicht die Nukleinsäurefragmente spezifisch zu amplifizieren⁽¹⁴³⁾. So ist es möglich, die Anwesenheit oder Abwesenheit einer bestimmten Sequenz, die beispielweise für eine Genmutation charakteristisch ist, nachzuweisen. Durch hohe Temperaturen (etwa 95°C) wird die DNA in Einzelstränge aufgetrennt (denaturiert), so dass die Zielsequenzen flankierende Oligonukleotide (Primer) nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung binden können. Diese Primer sind gegenläufig und komplementär zu der Sequenz des zu amplifizierenden Abschnittes und binden bei einer

Temperatur, die meist 3°C bis 9°C unter ihrem Schmelzpunkt liegt (Annealing). Bei 72°C werden die Primer durch eine hitzestabile DNA-Polymerase an ihrem 3'Ende beginnend verlängert (Elongation) und dann durch eine Temperaturerhöhung erneut in Einzelstränge getrennt, die jetzt wieder als Matrize (Template) dienen. Diese drei Schritte werden 30-40mal wiederholt. So ist es möglich, eine bestimmte Sequenz exponentiell zu vervielfältigen und diese dann, beispielweise mittels Gelelektrophorese oder Detektion mit spezifischen Sonden, zu identifizieren.

3.2.5. DNA-Amplifikation und Quantifizierung durch die real time TaqMan PCR

Für die Amplifikation und Quantifizierung der 1004 DNA Proben hat man sich für die schnellere und die kontaminationsniedrigere Methode der real time TaqMan PCR entschieden, die freundlicherweise von dem Biotechnologen, Behnam Naderi Kalali, durchgeführt wurde. Diese Methodik basiert auf dem 5'Nuklease Assay⁽¹²⁷⁾. Für die Reaktion sind ein Primerpaar und zwei für die beiden Allele spezifischen DNA-Sonden erforderlich. Die Sonden sind Oligonucleotide, die zum DNA-Abschnitt um die polymorphe Stelle komplementär sind. Sie werden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Reporterfarbstoff am 5'Ende und Quencherfarbstoff am 3'Ende) markiert. Die beiden allelspezifischen Sonden sind mit zwei verschiedenen Reporterfarbstoffen markiert. Die Nähe des Quencher-Farbstoffs zum Reporter-Farbstoff bei Intaktheit der Sonde verringert die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs. Die AmpliTaq DNA-Polymerase besitzt eine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität, welche die im Verlauf einer PCR an einen DNA-Strang hybridisierte komplementäre Sonde schneidet und zerstört. Das führt zu einer räumlichen Trennung der beiden Farbstoffe und damit zur einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffes. Die Sondenfragmenten sind dann vom Zielabschnitt entfernt und die PCR wird fortgesetzt. In der Abbildung 5 wird der Ablauf der PCR schematisch dargestellt. Die Bestimmung des Genotyps erfolgt durch Auswertung der allelspezifischen Fluoreszenzsignale.

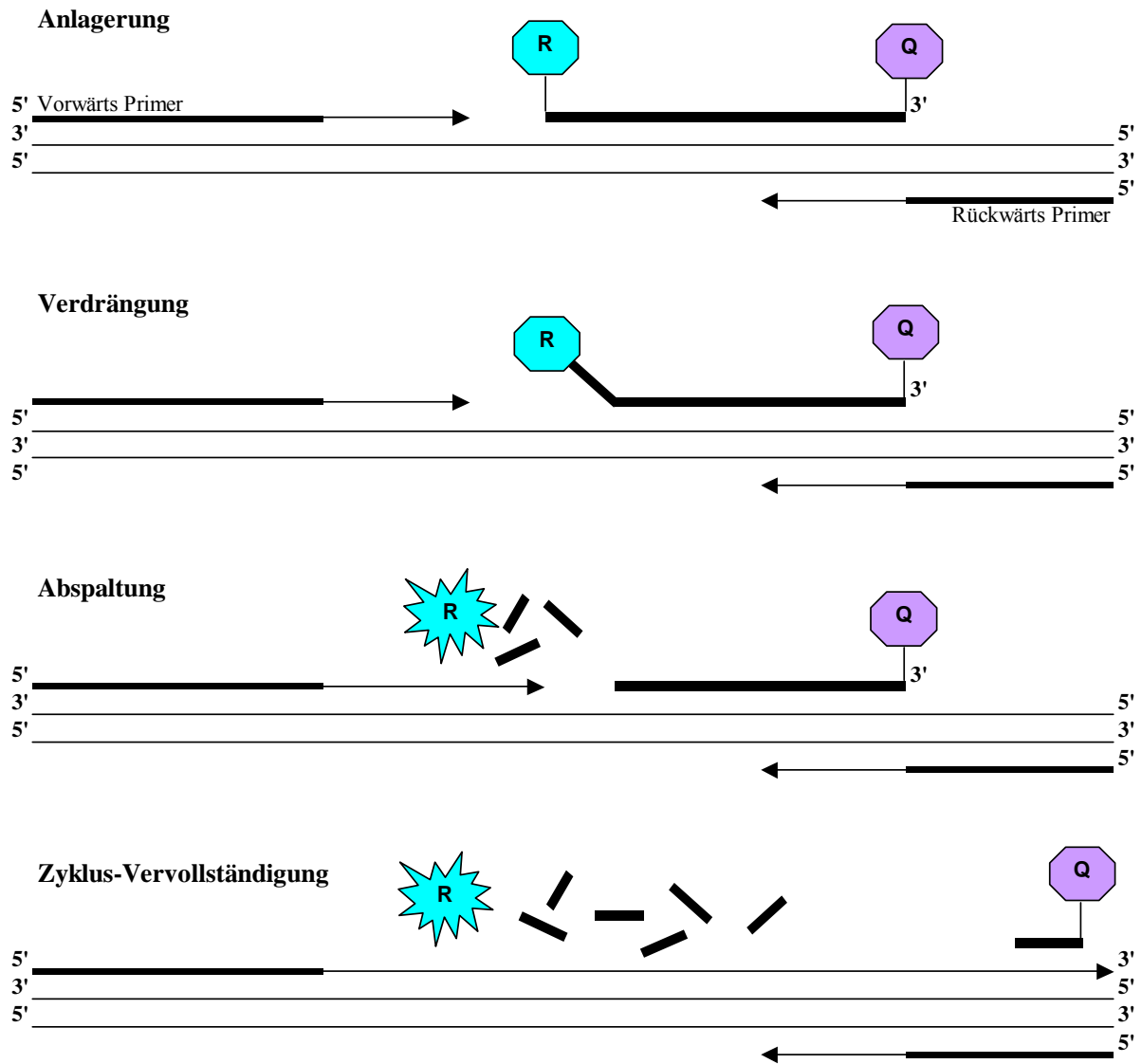


Abbildung 5: Es wird das Grundlegende Prinzip des TaqMan-Verfahrens dargestellt. Während der PCR werden die sich zuvor angelagerten DNA-Sonden aufgrund der 5' → 3'-Aktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase abgespalten, was zur räumlichen Trennung von Reporter- (R) und Quencher- (Q) Farbstoff und damit zum Anstieg der allelspezifischen Fluoreszenz führt.

Bestimmung des CMA1 A/G Genotyps mittels real time TaqMan Verfahren:

Die Primer und die markierten Sonden wurden von Assay-by-DesignSM Service für Genotypisierung spezieller SNPs ausgewählt und als 80x Assay Mix geliefert. Die im 80x Assay Mix verwendeten Primer und Sonden sind in den Tabellen 3 und 4 dargestellt. Die G Allel Sonde war mit dem Reporterfarbstoff 6-Carboxyfluoreszin (FAM) und die A Allel

Sonde mit dem Reporter VIC am 5'Ende markiert. Das 3'Ende der Sonden trug jeweils den Quencherfarbstoff TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin).

Tabelle 3: Nukleotidsequenzen der Primer für TaqMan Assay

	Primersequenzen
Vorwärts Primer	5' TGG CCT ACC TGG AAA TTG TAA CTT 3'
Rückwärts Primer	5' ACC CTG TTG TCT CAC CTT CCT 3'

Tabelle 4: Nukleotidsequenzen der Sonden für TaqMan Assay

	Sequenzen der Sonden
Reporter 1. (VIC)	5' ACG GCT GCT CAT TGT 3'
Reporter 2. (FAM)	5' ACG GCT GCT CGT TGT 3'

Polymorphe Basen in fetter kursiver Schrift

Die TaqMan Assay wurde mit dem in Tabelle 5 dargestellten Reaktionsmix durchgeführt. Von diesem Mix, der sowohl die Primer als auch die Sonden beinhaltete, wurden 24µl in jedes Loch der 96 Loch-Platte gegeben. Anschließend wurde jeweils 1µl gelöste DNA oder auch Wasser hinzugefügt. Die Anordnung der Proben auf der 96 Lochplatte war wie gefolgt: drei Negativkontrollen mit Wasser, sowie jeweils drei Positivkontrollen mit Standard-DNA für heterozygoten Genotyp A/G und für homozygoten Genotyp A/A, gefolgt von 87 Patientenproben mit unbekanntem Genotyp.

Tabelle 5: Bestandteile des Reaktionsmixes für TaqMan Assay

Bestandteile	Menge (in µl)
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2x)	12,5
80x Assay Mix (Primer /Sonden)	0,3125
Aqua ad iniectabilia	11,1875
Gesamtvolumen	24

Für die Reaktion wurde der Thermocycler im „ABI Prism 7000 Sequence Detection System“ benutzt und unter den in der Tabelle 6 dargestellten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für real time TaqMan PCR

95°C für 10min	Aktivierung von AmpliTaq DNA-Polymerase
40 Zyklen:	
92°C für 15sec	Denaturierung
60°C für 1min	Annealing und Extension

Nach dem Lauf der PCR wurden die Proben im ABI Prism 7000 Sequence Detection System analysiert, wo die während der PCR akkumulierende Fluoreszenz gemessen und weiterverarbeitet wurde. Ein isolierter Signalanstieg von FAM oder VIC Fluoreszenz wäre charakteristisch für G bzw. A Allel Homozygotie, ein Anstieg der beiden Signale würde auf Heterozygotie der untersuchten DNA hinweisen. Die Genotypisierung wurde durchgeführt ohne die klinischen und anamnestischen Daten der Patienten zu kennen.

3.2.6. Bestimmung des CMA1 A/G Genotyps mittels konventioneller PCR

Da die konventionelle Polymerase-Kettenreaktion zeitaufwendiger ist und ein höheres Kontaminationsrisiko mit sich bringt, hat man diese Methode nur dazu genutzt die Ergebnisse der Patientenproben zu überprüfen, die bei der real time PCR heterozygot waren.

Die PCR wurde in Anlehnung an die Methode nach Mullis zur Amplifikation von DNA-Fragmenten durchgeführt ⁽¹⁴³⁾. Die genspezifischen Primer, die in der Tabelle 7 dargestellt sind, wurden von der Firma MWG-Biotechnology entwickelt und auf Bestellung geliefert.

Tabelle 7: Nukleotidsequenzen der Primer für konventionelle PCR

	Primersequenzen
Vorwärts Primer	5' AAC TTT GTG CTG ACG GCT GAT 3'
Rückwärts Primer	5' CCA AAG TCT TCC CTC TCC TGA 3'

Zur Durchführung der PCR wurden in der Tabelle 8 aufgeführten Bestandteile in einem Reaktionsgefäß vereinigt und im Thermocycler GeneAmp® 2700 PCR System, Perkin Elmer, darauf abgestimmte Reaktionsbedingungen (siehe Tabelle 9), eingegeben. Bei jeder PCR wurden eine Negativkontrolle, in der alle Komponenten bis auf die DNA enthalten waren, sowie zwei Positivkontroll mit Standard-DNA, eine davon für homozygoten Genotyp A/A und die andere für heterozygoten Genotyp A/G, mitgeführt.

Tabelle 8: Bestandteile des Reaktionsmixes für konventionelle PCR

Bestandteile	Menge (in µl)
Hot start Taq master mix (Qiagen)	12,5
Vorwärts Primer	0,5
Rückwärts Primer	0,5
Gelöste DNA	2,0
Aqua ad iniectabilia	9,5
Gesamtvolumen	25

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen für konventionelle PCR

95°C für 15min	Aktivierung von Hot start Taq master mix (Qiagen)
30 Zyklen:	
95°C für 30sec	Denaturierung
51°C für 30sec	Annealing
72°C für 30sec	Elongation
72°C für 10min	Abschliessende Elongation
4°C	Forever

Auf 4°C abgekühlte DNA konnte bei dieser Temperatur so lange gelagert werden, bis sie bei der Gelelektrophorese auf die Säule geladen worden ist.

3.2.7. Gelelektrophorese der Produkte der konventionellen PCR

Nukleinsäuren liegen im alkalischen und schwach sauren pH-Bereich als Polyanionen vor. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes können sie daher nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist auf Grund des konstanten Ladung/Masse-Verhältnisses proportional zu ihrem Molekulargewicht. Der Proportionalitätsbereich kann durch die Wahl der Porengröße des Gels, bestimmt durch dessen Agarosekonzentration, beeinflusst werden. Für kurze PCR-Produkte bis 1kb reicht eine Agarosekonzentration von 3%. Dazu wurden im Mikrowellenherd 3g Agarose in 100ml TBE-Puffer unter Aufkochen gelöst, anschließend 50µl des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid dazugegeben, und nach Abkühlen auf ca. 50°C in einen Gelträger gegossen.

Die Gelelektrophorese der unvorbehandelten PCR-Produkte erlaubt noch keine Aussage welcher Genotyp des diallelen Systems vorliegt, da der Austausch einer Base keinen zur Darstellung ausreichenden physikalischen Unterschied liefert. Hier kommen Restriktionsenzyme zur Anwendung, die den DNA-Strang nur dann zerteilen, wenn das Enzym eine besondere Basensequenz erkennt. So kann man anhand des Vorliegen eines geschnittenen oder unversehrten PCR-Produktes sehen, welche Allel-Variante vorliegt. In unserem Fall schneidet das Restriktionsenzym BclI in der Tabelle 10 dargestellten Sequenzen, die nur im nichtmutierten A Allel vorhanden sind. Aus diesem Grund würde man erwarten, dass beim homozygoten Genotyp A/A beide Allele geschnitten werden, beim heterozygoten Genotyp A/G ein Allel geschnitten wird und beim homozygoten Genotyp G/G beide Allele ungeschnitten bleiben.

Tabelle 10: Nukleotidsequenzen, die vom Restriktionsenzym BclI geschnitten werden

Restriktionsenzym	Palindrom Sequenzen
BclI	5' ...T↓GATCA... 3' 3' ...ACTAG↑T... 5'

Pfeile zeigen die Schnittstellen an

Für die Reaktion wurden zu 19ml PCR-Ansatz je 1µl BclI hinzugefügt, vorsichtig gemischt und anschließend zentrifugiert. Die Verdaureaktion selbst hat man in einem auf 50°C vorgewärmten Wasserbad durchgeführt. Als suffiziente Verdaurezeit bis zum vollständigen Schnitt des Ausgangsprodukts erwies sich ca. eine Stunde.

Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurden 10ml des Verdaugemisches mit 6ml Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei 100V im elektrischen Feld lange laufen gelassen. Zur genauen Bestimmung der Bandengröße hat man in jedem Gel zusätzlich 6µl DNA-Marker mit einer Größe von 50bp und 1kb verwendet. Als weitere Orientierung lief grundsätzlich jeweils 6µl des ungeschnittenen PCR-Produktes, versetzt mit 4µl Ladepuffer, mit. Abschließend konnte man mit Hilfe von UV-Licht Ethidiumbromid, welches in die DNA-Doppelhelix interkaliert ist, zu Fluoreszenz anregen und dadurch die Banden sichtbar machen. Mit GelDoc 2000 konnten die sichtbaren Banden in den Computer eingescannt werden.

3.2.8. Statistik

Ziel dieser Studie war es, den möglichen Zusammenhang zwischen dem heterozygoten Genotyp A/G und den verschiedenen dermatologischen Erkrankungen festzustellen. Dazu wurden die Häufigkeiten für die uns am interessantesten erscheinenden Erkrankungen in den Kontingenztafeln dargestellt. Anschließend erfolgte die Signifikanzprüfung mit Hilfe des exakten Tests nach Fischer. Für die Analyse des relativen Risikos hat man jeweils die Odds Ratio und das 95% Konfidenzintervall berechnet. In den Analysen wurden die Ergebnisse der Homozygoten A/A mit den Heterozygoten A/G verglichen.

Die statistische Auswertung führte man mit dem Programm SPSS, Version 11.0 Professional (Mathsoft, Inc., Seattle, USA) durch. Als signifikant wurden P Werte unter 0,05 angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Experimentelle Ergebnisse

4.1.1. Ergebnisse der real time TaqMan PCR

Wir haben in unserer Studie in einem Kollektiv von 1004 konsekutiven Patienten der dermatologischen Klinik den His66Arg SNP (heterozygoter Genotyp A/G) durch real time TaqMan Verfahren untersucht. Dabei wurden die Proben im ABI Prism 7000 Sequence Detection System analysiert, indem die während der PCR akkumulierenden Fluoreszenzen der beiden Reporterfarbstoffen gemessen und weiterverarbeitet wurden. Die Ergebnisse von einem PCR-Durchlauf sind in der Abbildung 6 dargestellt.

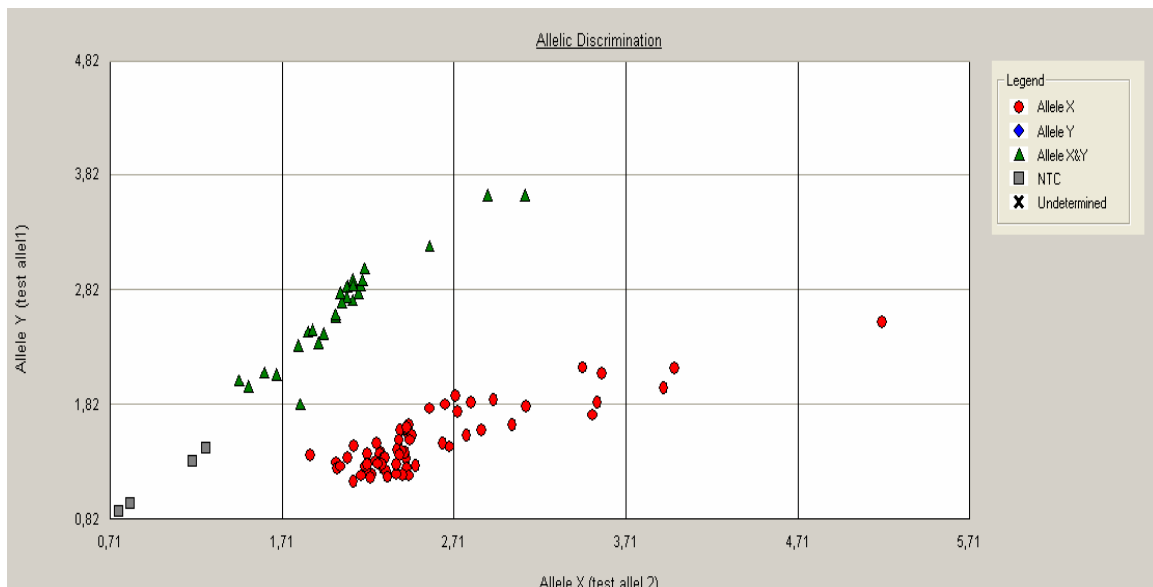


Abbildung 6: Es wird die Auswertung eines der Durchläufe der real time TaqMan PCR dargestellt. Die X-Achse entspricht dem Anstieg der VIC Fluoreszenz, die A Allel (Allele X) charakterisiert, die Y-Achse entspricht dem Anstieg der FAM Fluoreszenz, die G Allel (Allele Y) charakterisiert. Der dazwischen liegende Bereich entspricht dem Anstieg der beiden Fluoreszenzen und charakterisiert das gleichzeitige Vorkommen der Allele A und G (Allele X/Y). Die Abkürzung NTC steht für die Negativkontrollen. Aus dieser Abbildung wird ersichtlich, dass bei diesem PCR-Durchlauf von den untersuchten Patientenproben nur homozygote Genotyp A/A und heterozygote Genotyp A/G gefunden wurde.

Nach der Auswertung von allen DNA-Proben, haben wir von 1004 untersuchten Personen bei 40 den mutierten Genotyp His66Arg auf einem der beiden Allele nachweisen können, somit sind ca. 4% von diesen Personen heterozygot A/G. Unsere Ergebnisse widersprechen nicht den Daten aus den Genbanken, die die Häufigkeit für das Allel G in der allgemeinen Bevölkerung mit 4,3% angeben ⁽¹⁹⁸⁾.

4.1.2. Ergebnisse der konventionellen PCR

Da die konventionelle PCR im Vergleich zur real time PCR von der Durchführung her komplizierter ist, haben wir nur die DNA-Proben mit dieser Methode amplifiziert, welche in der real time TaqMan PCR Heterozygot A/G waren. Nach dem enzymatischen Verdau der 40 amplifizierten DNA-Proben, wurden diese zur Quantifizierung auf ein Agarosegel aufgetragen. Alle 40 DNA-Proben erwiesen sich auch in der konventionellen PCR als heterozygot A/G und bestätigten somit die Ergebnisse der real time TaqMan PCR. Abbildung 7 zeigt die entsprechenden Banden im Vergleich zu dem DNA-Marker und den ungeschnittenen PCR-Produkten an.

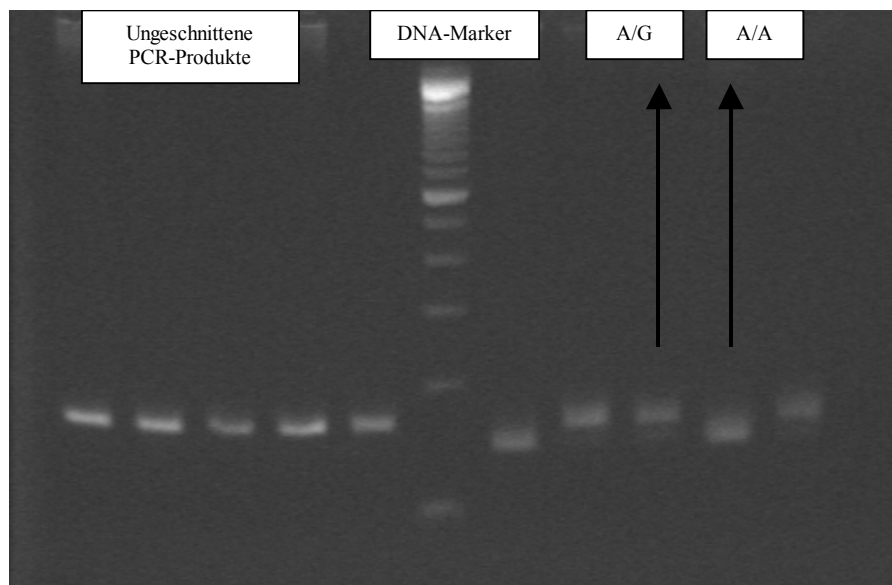


Abbildung 7: Auf dem eingescannten Bild der Gelelektrophorese sieht man, dass beim Homozygoten A/A (Positivkontrolle) beide Allele geschnitten werden und auf dem Gel nur ein Band sichtbar ist, da die zwei Banden der beiden Allele A zusammenfallen. Beim Heterozygoten A/G wird nur Allel A geschnitten, deshalb sind zwei Bänder registrierbar, das Band von Allel A liegt auf der gleichen Höhe wie die beiden Allele des Homozygoten A/A und das Band von Allel G liegt auf der gleichen Höhe wie die mit BclI unvorbehandelten ungeschnittenen PCR-Produkte.

4.2. Patientencharakteristika

4.2.1. Allgemeine Patientencharakteristika

Wir haben den His66Arg Polymorphismus an 1004 konsekutiven Patienten, die im Zeitraum von Oktober 2003 bis April 2004 wegen atopischen Ekzems, anderer atopischer Erkrankungen sowie anderer Dermatosen die Hautklinik der Technischen Universität München aufgesucht haben, untersucht. Alle Untersuchungsmethoden wurden gemäß der Deklaration von Helsinki zu den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen durchgeführt und wurden vom Ethikkomitee der Bayerischen Landesärztekammer München bewilligt.

Von 1004 Patienten haben wir mit Hilfe von real time PCR bei 40 Patienten die gesuchte Mutation auf einem der Allele nachweisen können. Damit war die Häufigkeit des heterozygoten Genotyps A/G in der untersuchten Population ca. 4%. In unseren Untersuchungen haben wir keinen einzigen Patienten finden können bei dem beide Allele verändert waren.

Die Patientencharakteristika waren in den beiden Gruppen miteinander vergleichbar. Das Mittelalter ($47,7 \pm 20,4$ vs. $48,8 \pm 19,8$) sowie der Anteil an Frauen (40% vs. 56%) waren bei dem heterozygoten Genotyp A/G gegenüber dem homozygoten Genotyp A/A nicht wesentlich unterschiedlich. In der Tabelle 11 und Abbildungen 8 und 9 werden die Geschlechtsverteilung und Mittelalterverteilung nochmal gegenüber gestellt.

Tabelle 11: Geschlechtsverteilung

Genotyp	Männlich	Weiblich	Gesamt
Heterozygot A/G	24	16	40
Homozygot A/A	428	536	964
Gesamt	452	552	1004

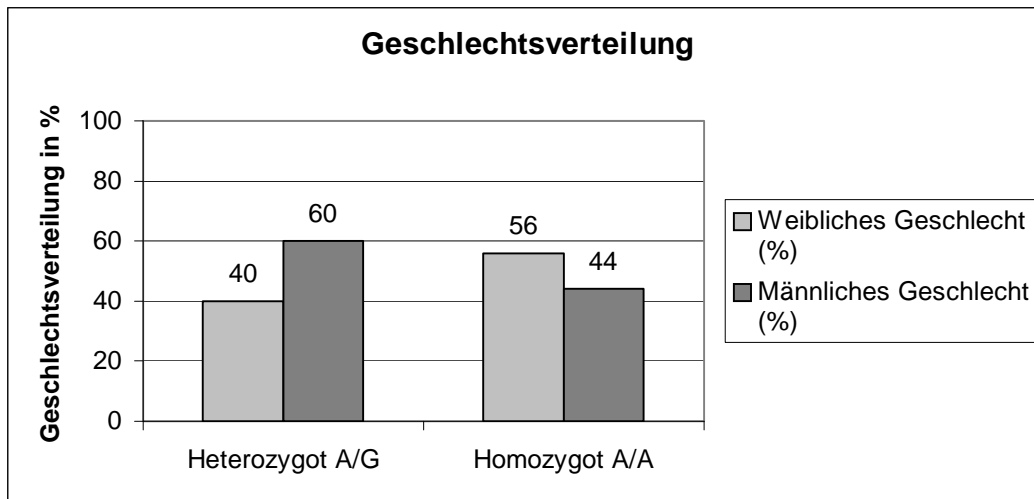


Abbildung 8: Geschlechtsverteilung

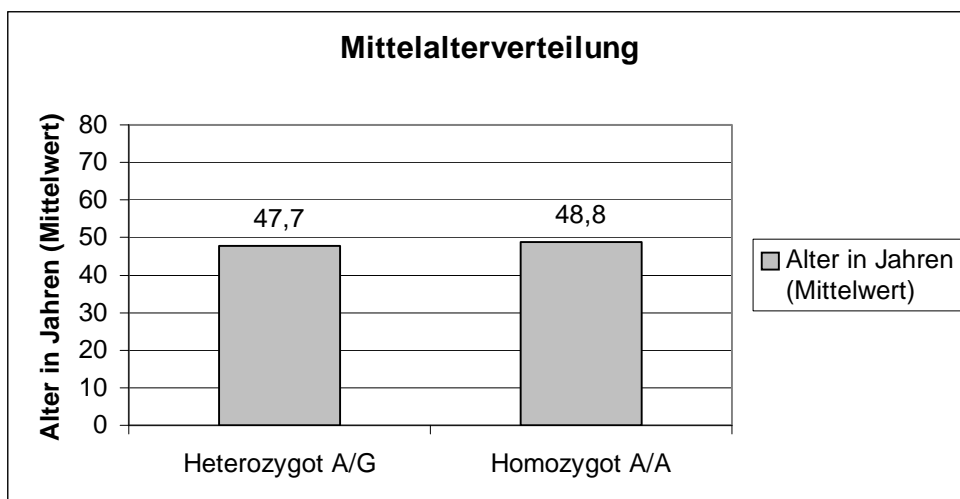


Abbildung 9: Mittelalterverteilung

4.2.2. Klinische Patientencharakteristika

Um zu erfahren welchen Einfluß der His66Arg Polymorphismus auf das Auftreten von dermatologischen Erkrankungen haben könnte, wurden aus den ambulanten Akten von 1004 Patienten alle Diagnosen herausgesucht und die Häufigkeiten der einzelnen Erkrankungen berechnet. In der Tabelle 12 und Abbildungen 10 und 11 werden die Ergebnisse anschaulich dargestellt.

Tabelle 12: Vorkommen der einzelnen Erkrankungen in Prozent (%)

Erkrankungen	Heterozygot A/G	Homozygot A/A
Psoriasis pustulosa	7,5	0,4
Psoriasis palmoplantaris	2,5	0,5
Psoriasis vulgaris	2,5	5,9
Psoriasis arthropatica/inverse	0	3,0
Malignes Melanom	7,5	6,7
Basalzellkarzinom	10,0	5,5
Aktinische Keratosen	7,5	2,1
Spinozelluläres Karzinom	5,0	1,9
Morbus Bowen	2,5	1,0
Mycosis fungoides	2,5	1,0
Mastozytose	5,0	0,9
Nahrungsmittelunverträglichkeit	10,0	4,7
Medikamentenunverträglichkeit	2,5	9,9
Arzneiexanthem	2,5	2,6
Angioödem	5,0	3,4
Wespen Giftallergie	7,5	4,4
Allergisches Kontaktekzem	5,0	7,4
Typ IV Sensibilisierungen	5,0	8,5
Atopisches Ekzem	5,0	5,9
Arterielle Hypertonie	20,0	24,5

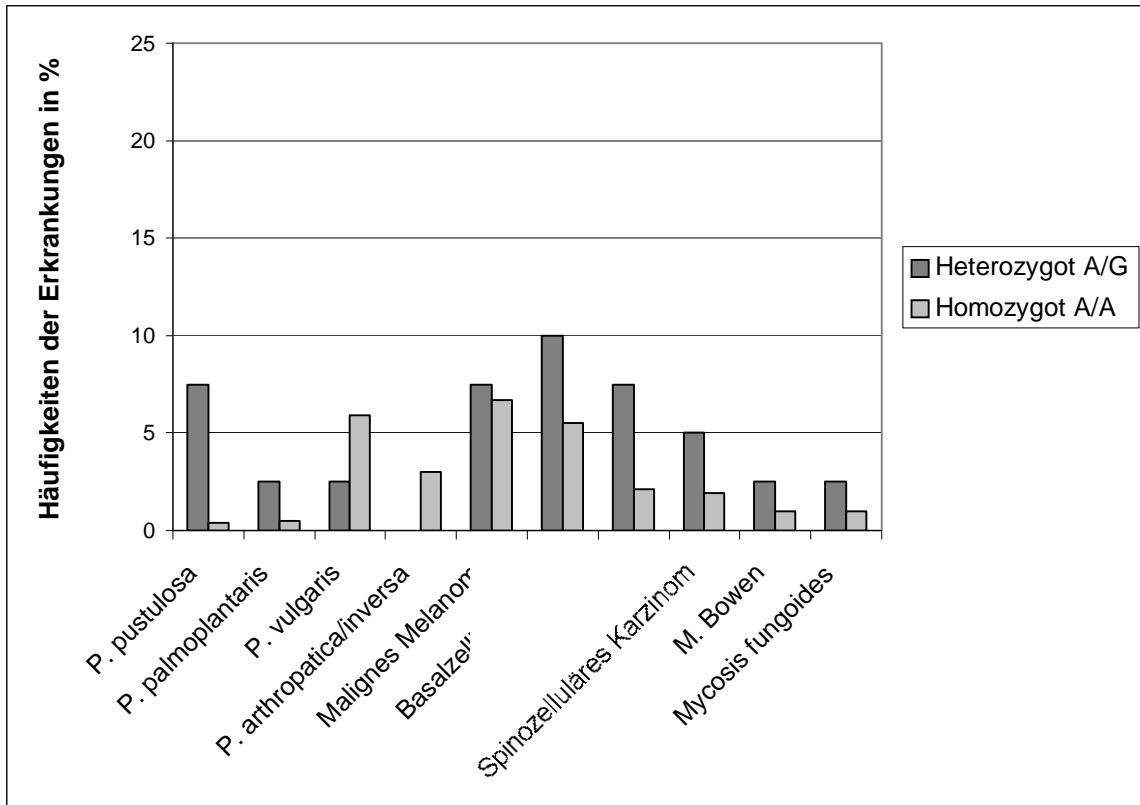


Abbildung 10: Übersicht über die Häufigkeiten (%) der einzelnen Erkrankungen

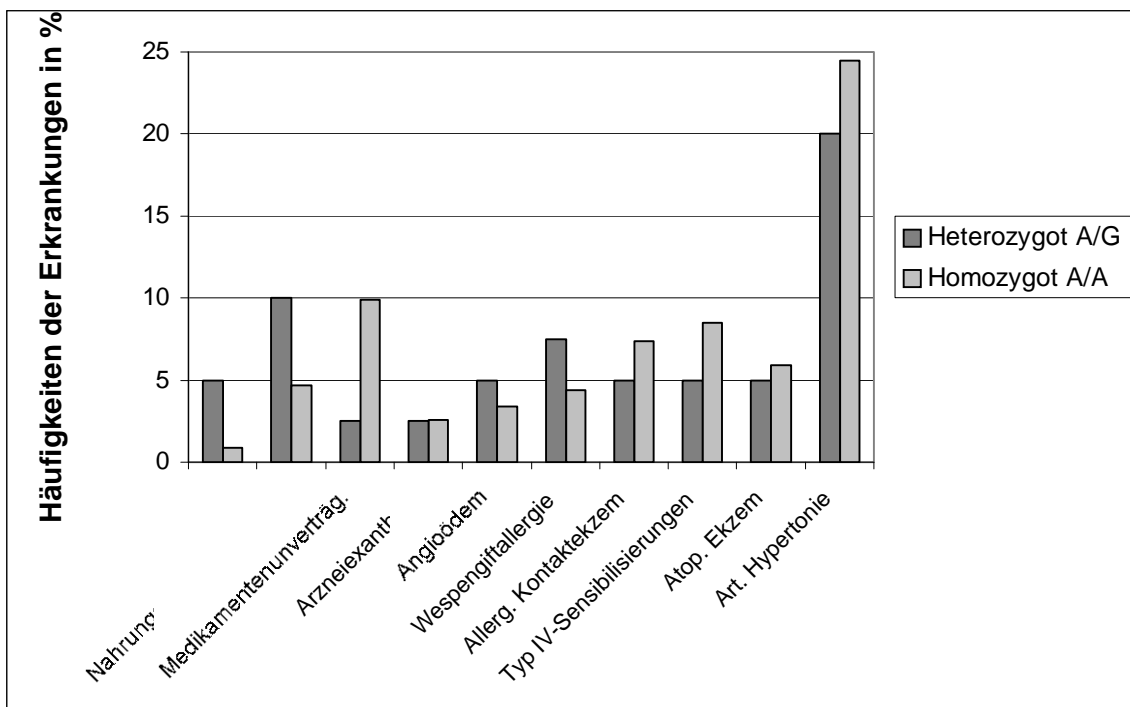


Abbildung 11: Übersicht über die Häufigkeiten der einzelnen Erkrankungen in Prozent (%)

4.3. Statistische Auswertung

Statistisch näher wurde der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von atopischen Erkrankungen, Neoplasien, verschiedenen Psoriasis Formen und dem heterozygoten Genotyp A/G untersucht.

4.3.1. Zusammenhang zwischen Atopie und heterozygoten Genotyp A/G

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Gruppe der atopischen Erkrankungen und den beiden Genotypen A/A und A/G wurden Erkrankungen wie Atopisches Ekzem, Rhinokonjunktivitis, Asthma bronchiale in eine Gruppe zusammengefasst. Von 1004 Patienten wiesen 220 Patienten eine atopische Erkrankung auf, davon waren 211 Patienten homozygot A/A und 9 Patienten heterozygot A/G. Der Anteil der Atopiker unter den Homozygoten A/A betrug 21,89% und unter den Heterozygoten A/G 22,50%, somit konnte kein signifikanter Unterschied ($P=1,00$) zwischen den beiden Genotypen A/A und A/G festgestellt werden. In der Tabelle 13 und Abbildung 12 werden noch einmal die Anzahl und die Anteile der Atopiker an den jeweiligen Genotyp Gruppen dargestellt.

Tabelle 13: Verteilung der Atopiker an den Genotyp Gruppen

Genotyp	Atopie		Gesamt
	Nein	Ja	
Homozygot A/A	753	211	964
Heterozygot A/G	31	9	40
Gesamt	784	220	1004

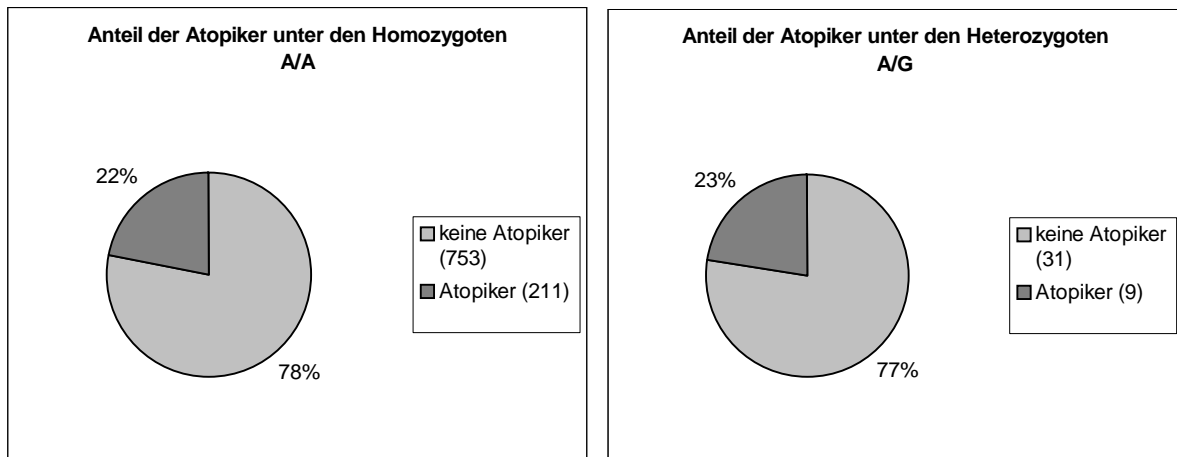


Abbildung 12: Darstellung des Anteils der Atopiker unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und Genotyp A/G (P=1,00)

4.3.2. Zusammenhang zwischen Neoplasien und heterozygoten Genotyp A/G

Um die statistische Untersuchung zu vereinfachen wurden in der Tabelle 14 dargestellten Erkrankungen in die Gruppe der Neoplasien zusammengefasst und der Zusammenhang mit den beiden Genotypen A/A und A/G untersucht.

Tabelle 14: Gruppe der neoplastischen Erkrankungen (manche Patienten wurden mehrfach erfasst, wenn sie mehr als eine Erkrankungsform dieser Gruppe aufwiesen)

Neoplasien	Patientenanzahl
Malignes Melanom	68
Basalzellkarzinom	57
Aktinische Keratosen	24
Spinozelluläres Karzinom	21
Morbus Bowen	11
Mycosis fungoides	11
Mastozytose	11

Insgesamt wiesen von 1004 Patienten 166 Patienten mindestens eine neoplastische Erkrankung auf, davon waren 154 Patienten homozygot A/A und 12 Patienten heterozygot A/G. Der Anteil der Patienten mit neoplastischen Erkrankungen unter den Homozygoten A/A betrug 15,98% und unter den Heterozygoten A/G 30,00%, somit wiesen die Patienten mit dem Genotyp A/G häufiger eine neoplastische Erkrankung im Vergleich zu den Patienten mit dem Genotyp A/A auf, sogar mit einem statistisch auffälligen Unterschied ($P=0,0280$). In der Tabelle 15 und Abbildung 13 werden noch einmal die Anzahl und die Anteile der Patienten mit Neoplasien an den jeweiligen Genotyp Gruppen im Vergleich dargestellt.

Tabelle 15: Verteilung der Patienten mit Neoplasien an den Genotyp Gruppen

Genotyp	Neoplasie		Gesamt
	Nein	Ja	
Homozygot A/A	810	154	964
Heterozygot A/G	28	12	40
Gesamt	838	166	1004

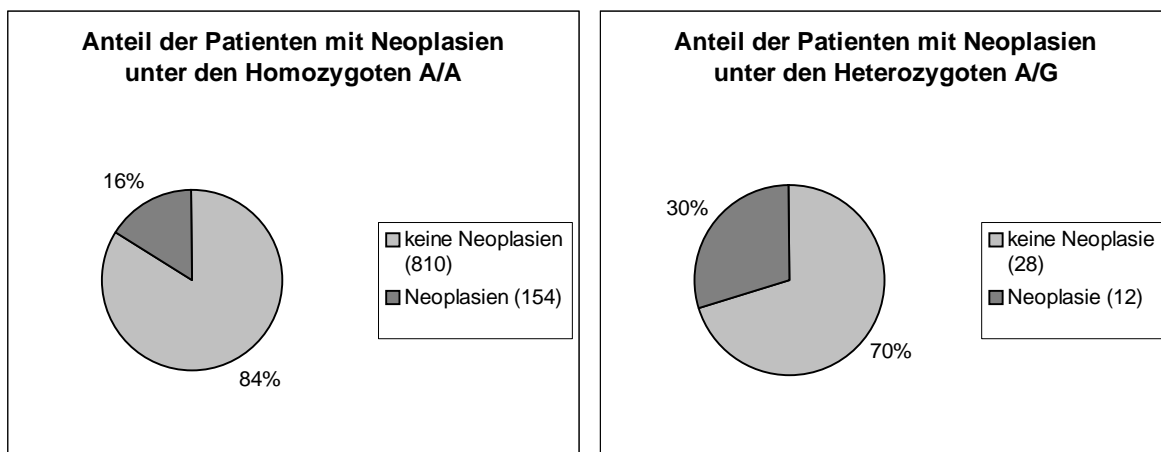


Abbildung 13: Darstellung des Anteils der Patienten mit Neoplasien unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und Genotyp A/G

4.3.3. Zusammenhang zwischen Psoriasis und heterozygoten Genotyp A/G

Die Analyse der Psoriatiker wurde ziemlich genau durchgeführt, dabei haben wir jede Psoriasisform einzeln im Vergleich zum restlichen Kontrollkollektiv statistisch untersucht.

Psoriasis vulgaris versus Kontrollkollektiv:

Von 1004 untersuchten Patienten hatten 60 Personen die Erkrankung Psoriasis vulgaris, dabei waren von diesen 60 Patienten 59 homozygot A/A und 1 heterozygot A/G. Der Anteil der Patienten mit Psoriasis vulgaris unter den Homozygoten A/A betrug somit 6,12% und unter den Heterozygoten A/G 2,50%. Dabei war auch der mit dem exakten Test nach Fischer berechneter P Wert ($P=0,5074$) und Odds Ratio ($OR=0,4228$; $CI\ 0,0102-2,6132$) statistisch unauffällig. In der Tabelle 16 und Abbildung 14 werden die Anzahl und die Anteile der Patienten mit Psoriasis vulgaris an den jeweiligen Genotyp Gruppen verglichen.

Tabelle 16: Verteilung der Patienten mit Psoriasis vulgaris an den Genotyp Gruppen

Genotyp	Psoriasis vulgaris		Gesamt
	Nein	Ja	
Homozygot A/A	905	59	964
Heterozygot A/G	39	1	40
Gesamt	944	60	1004

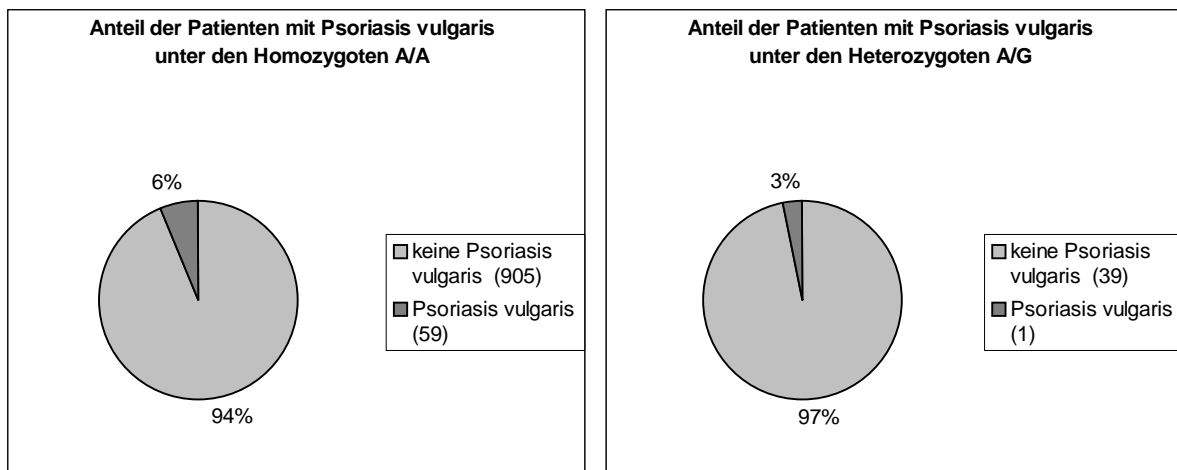


Abbildung 14: Darstellung des Anteils der Patienten mit Psoriasis vulgaris unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und Genotyp A/G

Psoriasis inversa/arthropatica versus Kontrollkollektiv:

Insgesamt wiesen 31 Patienten von 1004 untersuchten Patienten entweder Psoriasis inversa und/oder Psoriasis arthropatica auf, dabei waren alle 31 Patienten homozygot A/A und deren Anteil an dieser Genotypgruppe betrug 3,22% ($P=0,6309$; $OR= 0,0000$; $CI 0,0000-2,6406$). Kein einziger Patient mit dieser Erkrankung hatte heterozygoten Genotyp A/G. Die Darstellung der Verteilung erfolgt in der Tabelle 17 und Abbildung 15.

Tabelle 17: Verteilung der Patienten mit Psoriasis inversa/arthropatica an den Genotyp Gruppen

Genotyp	Psoriasis inversa/arthropatica		Gesamt
	Nein	Ja	
Homozygot A/A	933	31	964
Heterozygot A/G	40	0	40
Gesamt	973	31	1004

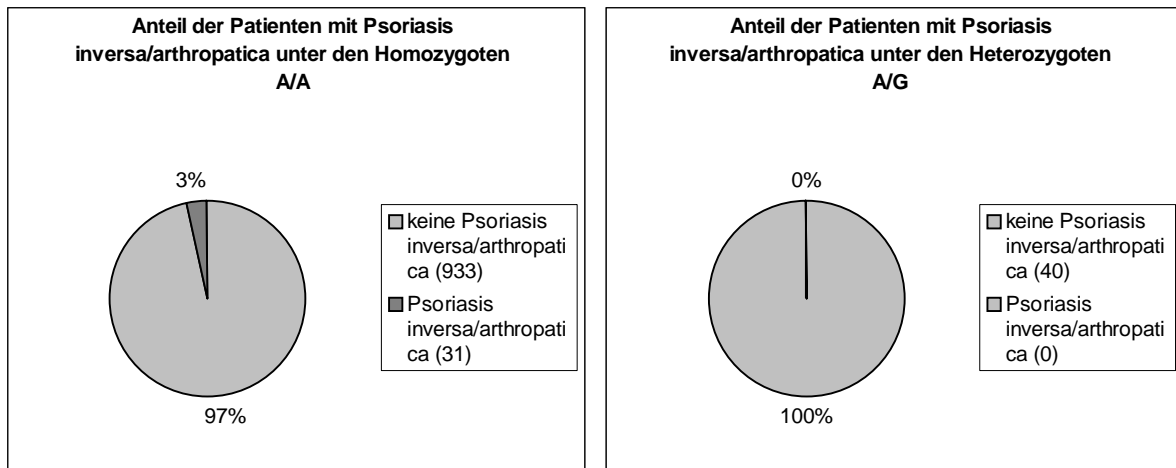


Abbildung 15: Darstellung des Anteils der Patienten mit Psoriasis inversa/arthropatica unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und Genotyp A/G

Psoriasis palmoplantaris versus Kontrollkollektiv:

Nur 6 Patienten von 1004 konsekutiven Patienten hatten die Diagnose Psoriasis palmoplantaris gestellt gehabt, davon waren 5 homozygot A/A und 1 Patient war heterozygot A/G. Der Anteil der Patienten mit Psoriasis palmoplantaris unter den Homozygoten A/A betrug 0,52% und unter den Heterozygoten A/G 2,50% und ist somit größer unter dem Genotyp A/G, jedoch ohne statistisch signifikant zu sein ($P=0,2169$; $OR=4,9886$; $CI\ 0,1026-46,1524$). Die Anteile an den beiden Genotypgruppen werden in der Tabelle 18 und Abbildung 16 dargestellt.

Tabelle 18: Verteilung der Patienten mit Psoriasis palmoplantaris an den Genotyp Gruppen

Genotyp	Psoriasis palmoplantaris		Gesamt
	Nein	Ja	
Homozygot A/A	959	5	964
Heterozygot A/G	39	1	40
Gesamt	998	6	1004

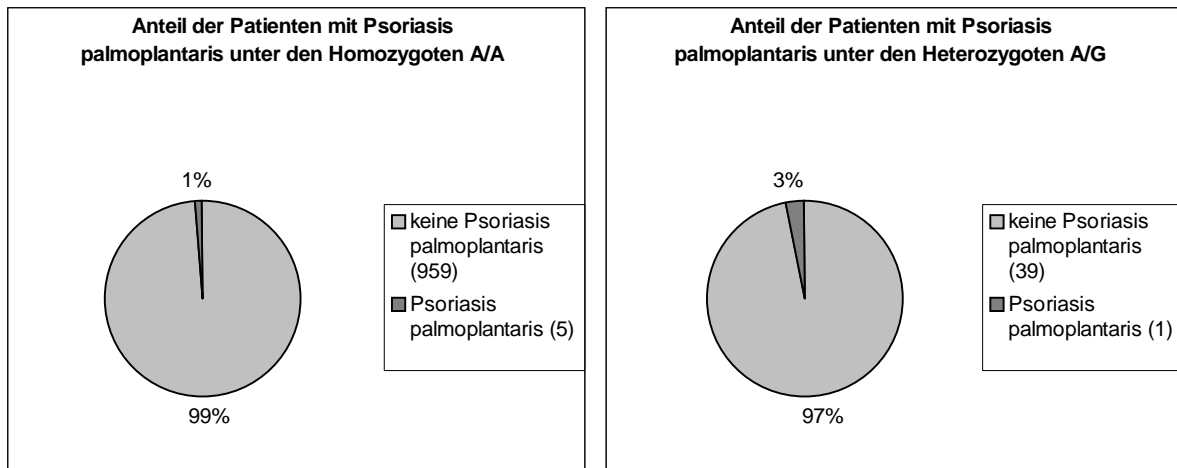


Abbildung 16: Darstellung des Anteils der Patienten mit Psoriasis palmoplantaris unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und Genotyp A/G

Psoriasis pustulosa versus Kontrollkollektiv:

Zum Schluß haben wir noch das Krankheitsbild der Psoriasis pustulosa statistisch untersucht. Diese relativ selten Erkrankung wurde bei 7 von 1004 Patienten diagnostiziert, dabei waren 4 Patienten mit homozygotem Genotyp A/A und 3 Patienten mit heterozygoten Genotyp A/G. Unter den Homozygoten A/A war der Anteil der Patienten mit Psoriasis pustulosa 0,41% und unter den Heterozygoten A/G 7,50%, was einen statistisch signifikanten Unterschied (0,41% vs. 7,50%) ausmachte ($P=0.0018$). Auch das relative Risiko (rohe Odds Ratio) für den Genotyp A/G in Bezug auf das Auftreten von Psoriasis pustulosa ergab einen hohen Wert: $OR=18,7071$ (95% Konfidenzintervall: 2,6118-113,9474). Zur Darstellung der Verteilung und der Anteile an den beiden Genotypen dient die Tabelle 19 und die Abbildung 17.

Tabelle 19: Verteilung der Patienten mit Psoriasis pustulosa an den Genotyp Gruppen

Genotyp	Psoriasis pustulosa		Gesamt
	Nein	Ja	
Homozygot A/A	960	4	964
Heterozygot A/G	37	3	40
Gesamt	997	7	1004

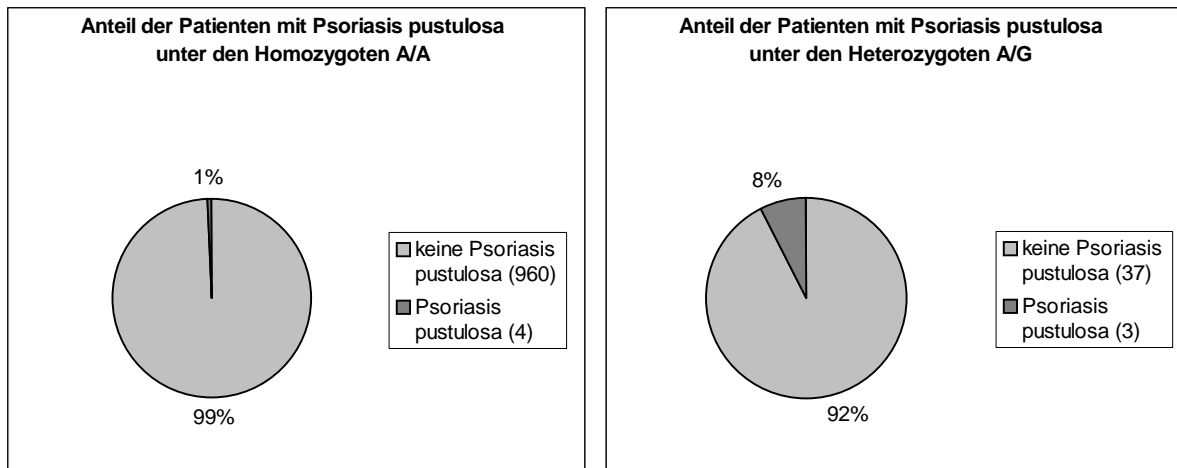


Abbildung 17: Darstellung des Anteils der Patienten mit Psoriasis pustulosa unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und Genotyp A/G

Psoriasis pustulosa et palmoplantaris versus Kontrollkollektiv:

Von vielen Autoren werden die beiden Psoriasisformen wie Psoriasis palmoplantaris und Psoriasis pustulosa als eine Erkrankungsgruppe betrachtet. Deshalb werden in der Tabelle 20 und in der Abbildung 18 vollständigshalber die beiden Formen zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 20: Verteilung der Patienten mit Psoriasis pustulosa et palmoplantaris an den Genotyp Gruppen

Genotyp	Psoriasis pustulosa et palmoplantaris		Gesamt
	Nein	Ja	
Homozygot A/A	955	9	964
Heterozygot A/G	36	4	40
Gesamt	991	13	1004

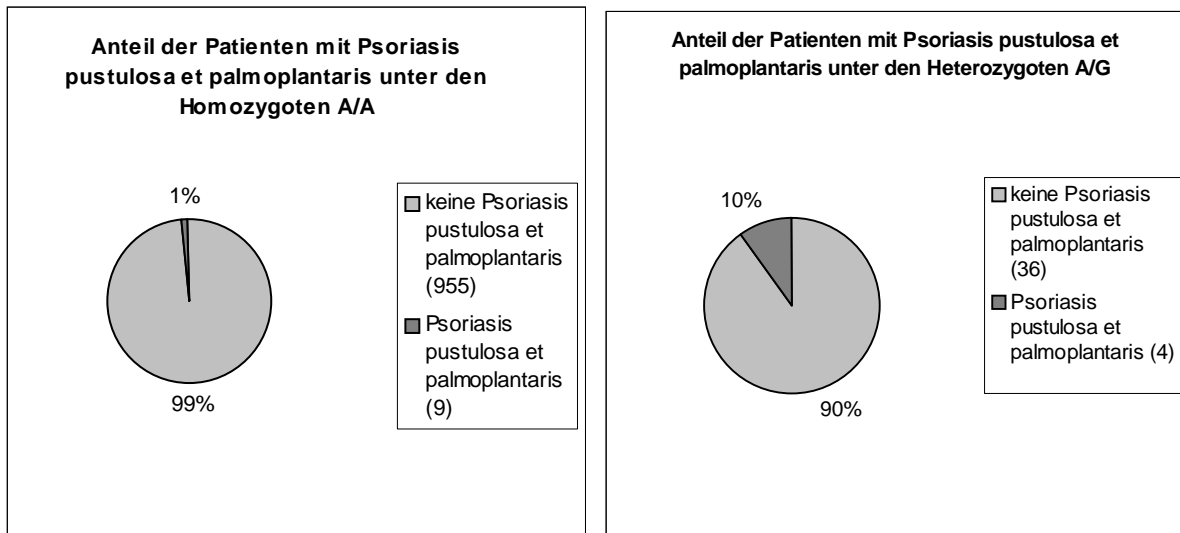


Abbildung 18: Darstellung des Anteils der Patienten mit Psoriasis pustulosa et palmoplantaris unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und Genotyp A/G

Außerdem werden zur besseren Vorstellung die Anteile an den beiden Genotypen von Patienten mit Psoriasis vulgaris und Psoriasis pustulosa et palmoplantaris in Abbildung 19 dargestellt.

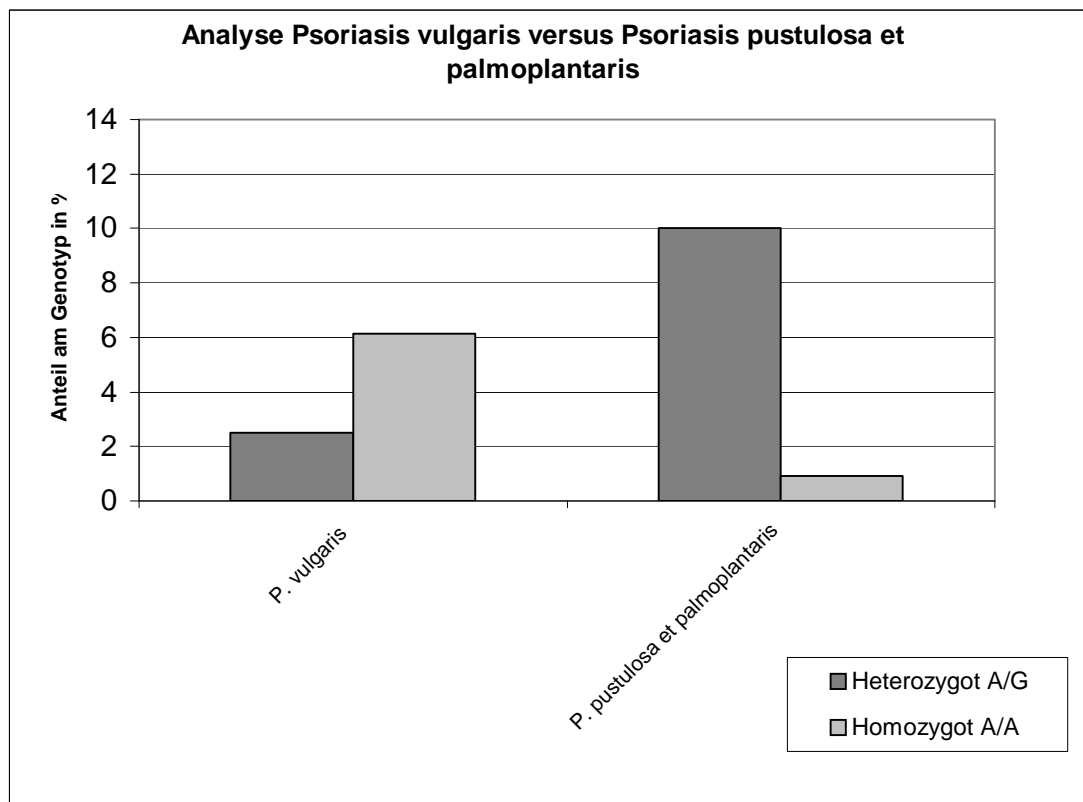


Abbildung 19: Darstellung des Anteils der Patienten mit Psoriasis vulgaris und Psoriasis pustulosa et palmoplantaris unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und Genotyp A/G

In der Tabelle 21 und Abbildung 20 werden noch einmal die statistischen Ergebnisse von allen Patienten mit Psoriasis zusammengefasst und anschaulich dargestellt.

Tabelle 21: Ergebnisse der statistischen Auswertung

Psoriasisformen	Anteil am Genotyp A/A	Anteil am Genotyp A/G	P	OR
Psoriasis vulgaris	6,12%	2,50%	0,5074	0,4228
Psoriasis inversa/arthropatica	3,22%	0,00%	0,6309	0,0000
Psoriasis palmoplantaris	0,52%	2,50%	0,2169	4,9886
Psoriasis pustulosa	0,41%	7,50%	0,0018	18,7071

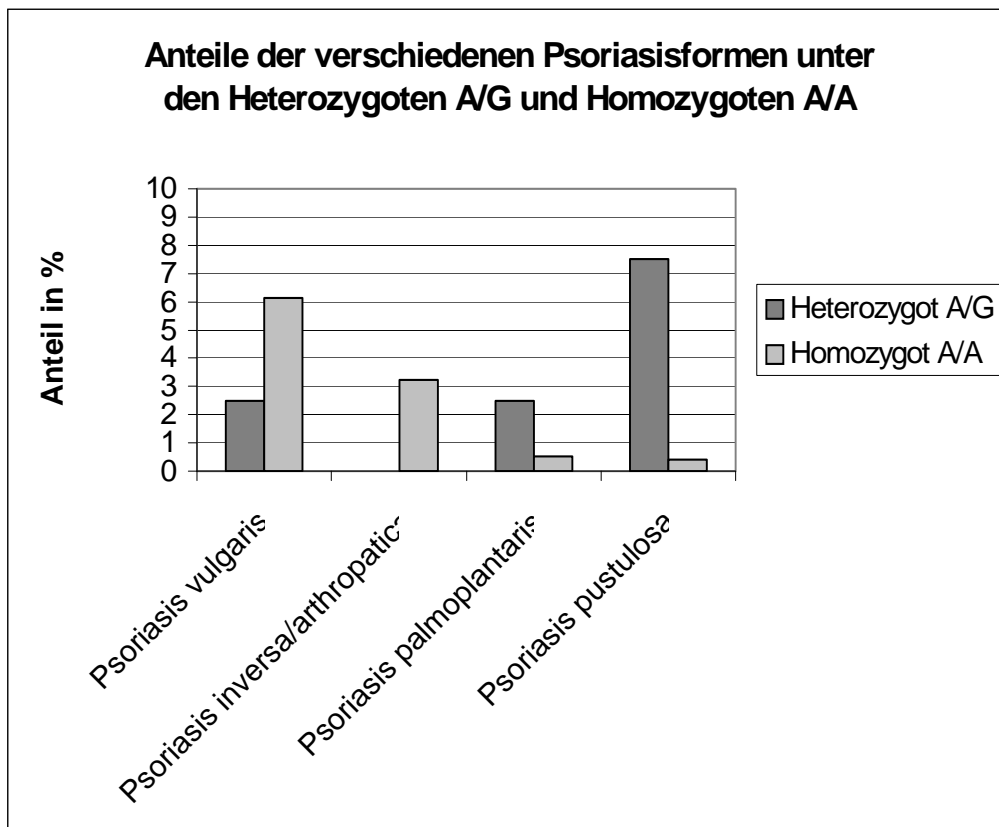


Abbildung 20: Gegenüberstellung von Patientenanteilen der verschiedenen Psoriasisformen unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und Genotyp A/G

4.3.4. Auswertung des telefonischen Interviews

In unserer Studie haben wir 40 Patienten mit einem heterozygoten Genotyp A/G von 1004 untersuchten Patienten finden können. Es wurde jedoch kein Patient mit homozygotem Genotyp G/G identifiziert. Das könnte bedeuten, dass dieser Genotyp zu intrauterinem oder frühkindlichem Kindstod führt. Es wurden daher nach entsprechender Einwilligung telefonische Interviews geführt, um Hinweise in dieser Richtung aus der Gruppe der Patienten mit heterozygotem Genotyp A/G zu erhalten. Bei denjenigen, die zu einem telefonischen Interview ihr Einverständnis gaben, wurden die vorbekannten Angaben zunächst verifiziert und falls nötig, komplettiert. Dabei wurden speziell Fragen zu Vorerkrankungen wie Atopie, Psoriasis, Neoplasien und Bluthochdruck gestellt. Bezüglich der familiären Häufigkeit von Aborten, Todgeburten und plötzlichen Kindstodes konnte man nur die Aussagen von 24 Patienten werten. Von diesen gaben 7 Patienten an, mindestens einen Abort oder eine Totgeburt in der Familie gehabt zu haben, was einen Anteil von 29,17% ausmachte. In der Tabelle 22 werden alle Daten des telefonischen Interviews zusammengefasst. Eine Darstellung der Verteilung der Häufigkeiten von Aborten und Todgeburten erfolgt in der Abbildung 21.

Tabelle 22: Zusammenfassung aller Daten des telefonischen Interviews

Heterozygote A/G	Anzahl der Patienten
Nicht erreichbar	9
Verstorben	1
Keine Äußerung	2
Keine Erinnerung	4
Kein Abort	17
Mutter erleidet 2 Aborte	1
Mutter erleidet 1 Abort	2
Mutter erleidet 1 Todgeburt	1
Mutter erleidet 1 Todgeburt und 2 Aborte	1
Patientin erleidet selbst 1 Abort	1
Patientin erleidet selbst 5 Aborte	1
Gesamt	40

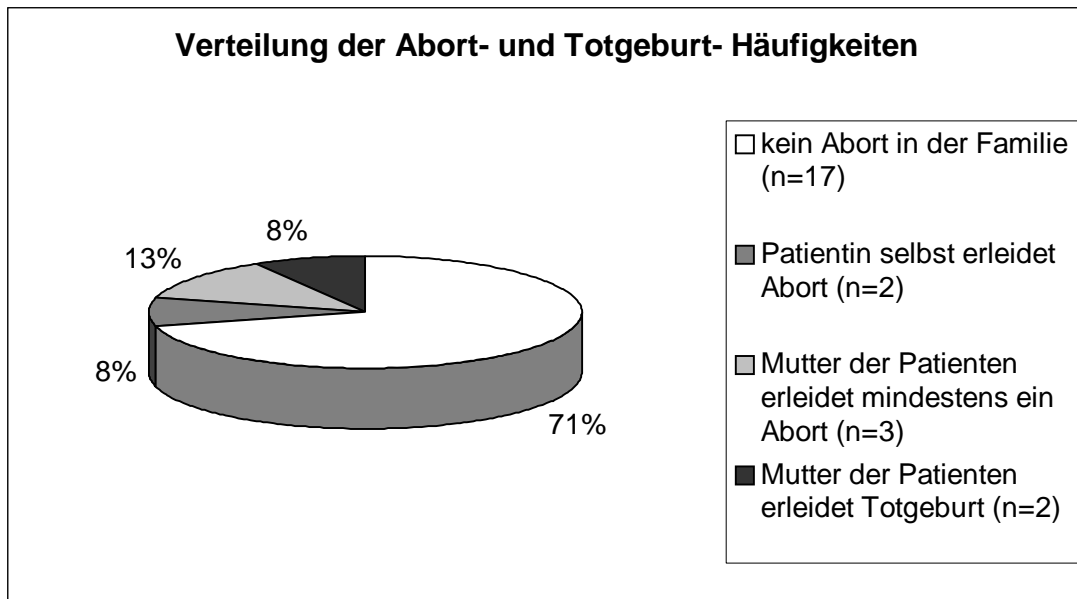


Abbildung 21: Verteilung der Abort- und Totgeburtshäufigkeiten unter den Patienten mit heterozygotem Genotyp A/G

5. Diskussion

Zahlreiche Untersuchungen am Menschen belegen, dass Mastzellen und Mastzellproteasen eine große Bedeutung für bestimmte immunologische und nichtimmunologische Erkrankungen haben ^(170, 200, 77). So könnte das zunehmende Wissen über die funktionelle Bedeutung der beiden wichtigsten Mastzellproteasen Trypsinase und Chymase zur Klärung der Pathogenese beitragen.

In der vorliegenden Untersuchung haben wir uns vor allem mit dem Chymase Enzym beschäftigt und das Ziel verfolgt, die mögliche Assoziation des His66Arg Polymorphismus mit verschiedenen dermatologischen Erkrankungen zu finden.

5.1. Genetische Varianten der Chymase und Atopie

Aus zahlreichen Zwillings- und Familienstudien ist es schon lange bekannt, dass atopische Erkrankungen wie atopisches Ekzem, atopisches Asthma und Rhinokonjunktivitis zu den komplexen Erkrankungen gehören bei deren Entstehung gleichzeitig genetische Faktoren und Umweltfaktoren einwirken. Außerdem hat man festgestellt, dass in letzter Zeit die Häufigkeit der Erkrankungen aus dem atopischen Kreis zugenommen hat ^(167, 179). Die bisher in Zusammenhang mit diesen Erkrankungen gebrachten Genvarianten sind auf verschiedenen Chromosomen verteilt. So liegt die codierende Region für die β -Kette des IgE Rezeptors (Fc ϵ RI β) auf Chromosom 11q13 ^(38, 230, 175, 37, 196), für Interleukin-4 (IL-4) auf Chromosom 5q31 ^(135, 56) und für α -Kette des T-Zell-Rezeptors auf Chromosom 14 ⁽¹⁴¹⁾.

Man weiß aus vielen Studien, dass das Chymase Enzym auch in die Pathogenese von atopischen Erkrankungen involviert ist ^(83, 221). Aus diesem Grund war es für viele Forschergruppen sehr Interessant, sich mit genetischen Varianten des Chymase Gens, der auf dem Chromosom 14q11 liegt, auseinanderzusetzen. Bei dem bis jetzt am meisten untersuchten Polymorphismus handelt es sich um einen Einzelbasenaustausch (-1903G/A), der sich in der 5' flankierenden Region des Promotors befindet. Mao und seine Mitarbeiter

haben als erste den Zusammenhang zwischen dieser Genvariante und atopischem Asthma, nicht-atopischem Asthma, Ekzem und Rhinitis anhand von 100 japanischen erwachsenen Patienten in jeder Erkrankungsgruppe untersucht. Dabei wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Genotypvarianten A/A, A/G, und G/G ($P=0,009$) nur in der Gruppe der Ekzempatienten festgestellt ⁽¹³¹⁾. In einer weiteren Studie, die mit 851 Schulkindern durchgeführt worden ist, konnte Mao et al. das Ergebnis seiner vorherigen Untersuchungen bestätigen ($P=0,001$) und stellte sogar fest, dass die Assoziation mit homozygoten Genotyp G/G größer war, wenn Patienten mit Ekzem einen niedrigeren IgE Spiegel aufwiesen ⁽¹³²⁾. Dabei wurde auch keine Assoziation mit Asthma und Rhinitis beobachtet, die vor allem mit einem hohen IgE Serumspiegel in Zusammenhang gebracht wird. Eine andere japanische Arbeitsgruppe wollte den Ergebnissen von Mao und seinen Mitarbeitern auf den Grund gehen und teilte bei ihrer Studie 169 Patienten (Mittelalter 24 Jahre) in mehrere Gruppen ein. Dabei wurde berücksichtigt, ob Patienten außer dem atopischen Ekzem auch Asthma oder Rhinitis in der Eigen- oder Familienanamnese aufwiesen und wie hoch der IgE Serumspiegel war. Der statistisch signifikanter Unterschied konnte zwischen den Genotypen in der Gruppe, in der Patienten atopisches Ekzem und niedrigen IgE Spiegel ($<500\text{IU/ml}$) zeigten und erstaunlicherweise auch in der Gruppe, in welcher Patienten außer dem atopischen Ekzem auch Asthma und hohe IgE Spiegel ($>2000\text{IU/ml}$) aufwiesen, gezeigt werden ⁽²⁰⁸⁾. Dieses Ergebnis ließ die Vermutung aufkommen, dass nur atopisches Ekzem mit Genvarianten des Chymase Gen Promoters assoziiert ist und, dass die genetische Basis des atopischen Ekzems sich von der genetischen Basis des atopischen Ekzems mit Asthma unterscheidet ⁽²⁰⁸⁾. Obige Ergebnisse sind allerdings durch widersprüchliche Arbeiten wieder in Diskussion geraten. In zwei unterschiedlichen Studien konnte man bei der Untersuchung von einem sehr jungen Patientenkollektiv (Mittelalter 9 und 11 Jahren), jeweils keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und Gruppe mit atopischen Ekzem in der Genotypverteilung feststellen ^(109, 155). Die kürzlich veröffentlichte Studie zu diesem Thema untersuchte, anhand von 341 britischen Familien mit Asthma, die Rolle dieses Polymorphismus bei der Entwicklung von Atopiesyndrom und/oder Asthma, unter Berücksichtigung der IgE Serumwerte. Es konnte eine statistisch signifikante Assoziation zwischen Genotypen des Chymase Gens und totalem IgE Spiegel bei den Eltern mit Asthma und Ekzem festgestellt werden (Mittelwerte für IgE Serumspiegel: GG: 297IU/ml , GA: 144IU/ml , AA: $48,4\text{IU/ml}$, $P=0,0004$) ⁽¹⁰⁴⁾. Aufgrund seiner Ergebnisse stellte Iwanaga et al. die Hypothese auf, dass der Chymase Gen Polymorphismus im Promotorbereich nicht zu Asthmaanfälligkeit beiträgt, aber vielleicht in

die Regulierung des IgE Spiegels bei Patienten mit Asthma involviert ist ⁽¹⁰⁴⁾). Insgesamt gesehen sind die Ergebnisse der einzelnen Studien zum Teil widersprüchlich. Es ist immer noch nicht klar, inwieweit dieser Polymorphismus die Pathogenese des atopischen Erkrankungskreises beeinflusst. In diesem Zusammenhang war es interessant, andere Polymorphismen des Chymase Gens zu untersuchen, um zu erfahren, welche Auswirkung sie auf die atopischen Erkrankungen haben. Weidinger et al. beschäftigte sich mit sieben verschiedenen CMA1 Einzelbasenpolymorphismen, um den Zusammenhang mit atopischen Phänotyp anhand einer großen Population der deutschen Erwachsenen (n=1875) festzustellen. Nur beim homozygoten Genotyp (GG) des SNPs (-1903G/A) in der 5' flankierenden Region des Promotors wurde eine signifikante Assoziation mit atopischem Ekzem festgestellt. Keine Assoziation wurde mit Asthma, Rhinokonjunktivitis, totalem IgE Serumspiegel und totalem IgE Serumspiegel bei einzelnen Individuen mit Asthma oder atopischen Ekzem festgestellt ⁽²²²⁾. Aufgrund seiner Ergebnisse spekuliert Weidinger mit seinen Mitarbeitern darüber, ob diese Genvariante die Expression der Chymase beeinflusst. Da wie aus den vorherigen Studien hervorgeht, ist die Chymase Aktivität der Mastzellen in den Hautläsionen des chronisch atopischen Ekzems erhöht ⁽¹¹⁾ und spielt eine potentiale Rolle in der Förderung des Defektes der Hautbarriere ⁽⁷⁵⁾.

Im Rahmen unserer Studie haben wir uns mit einer Genvariante des Chymase Enzyms beschäftigt, die in der codierenden Region auf dem zweiten Exon des Chymase Gens liegt. Dabei haben wir anhand von 1004 konsekutiven Patienten den Einfluss des His66Arg Polymorphismus, bei dem der Einzelbasenaustausch (A→G) zum Aminosäureaustausch (Histidin→Arginin) im aktiven Zentrum des Enzyms führt, auf atopische Erkrankungen untersucht. Wie schon in der vorherigen Studie von Weidinger und seinen Mitarbeitern, die auch unter anderem diesen SNP (rs5247) untersucht haben ⁽²²²⁾, stellten wir in unserem Fall beim beschriebenen Polymorphismus keine statistisch signifikante Assoziation mit der Krankheitsgruppe der Atopiker fest (P=1,00). Dieses Ergebnis würde nicht unseren Erwartung widersprechen, wenn man davon ausgeht, dass durch den Aminosäureaustausch, höchstwahrscheinlich die Funktion des Chymase Enzyms beeinträchtigt wird. Diese wiederum spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von atopischen Erkrankungen ^(83, 221), da Chymase unter anderem zum größten Teil an entzündlichen Veränderungen in der Haut ^(171, 122, 26) und im Respirationstrakt ^(200, 163) beteiligt ist. Wie schon vorhin erwähnt hat man in den Hautbiopsien von den Patienten mit chronischem atopischen Ekzem in den betroffenen Hautbezirken im Vergleich zu normaler Haut von den Kontrollpersonen eine

signifikant erhöhte Anzahl ($P < 0,5$) von Chymase-positiven Zellen festgestellt ⁽¹¹⁾. Aufgrund dessen schlägt Badertscher et al. vor, dass erhöhte Aktivität von Chymase den Defekt der Hautbarriere im atopischen Ekzem fördern könnte und damit die Permeabilität der Haut für Allergene und Mikroben steigert. Das verschlimmert wiederum das Ekzem ⁽¹¹⁾. So könnte man sogar die Hypothese aufstellen, dass der Genotyp Träger A/G, wenn bei ihm die Aktivität des Chymase Enzyms wirklich erniedrigt wäre, weniger dazu neigen würde eine atopische Erkrankung zu entwickeln.

Die aufgestellte Hypothese steht im Einklang mit Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen, die den Einfluss von Chymase auf Hauptkrankheitssymptome des atopischen Ekzems und atopischen Asthmas wie Pruritus und IgE Serumspiegel, untersucht haben. Hagermark et al. haben durch Injektion der Chymase der Ratte in die menschliche Haut, Pruritus und Extravasation von Blutplasma bei den Probanden ausgelöst ⁽⁸⁰⁾. Eine japanische Forschergruppe hat den Einfluss von Chymase-Inhibitor Y-40613 auf Pruritus und IgE Serumspiegel untersucht und kam zum interessanten Ergebnis, dass der Chymase-Inhibitor Y-40613 dosisabhängig das Kratzbedürfnis im Mäusemodell unterdrückt und in vitro die Produktion von IgE durch Mäusezellen herabsetzt ⁽⁹⁷⁾.

Die in der vorliegenden Studie ermittelten Ergebnisse sind nur bedingt mit den am Anfang geschilderten Ergebnissen anderer Forschergruppen vergleichbar, da es sich um unterschiedliche Polymorphismen handelt. Außerdem haben wir bei unseren statistischen Analysen nicht nach den einzelnen Krankheitsbildern unterschieden, sondern die verschiedenen atopischen Erkrankungen als eine Erkrankungsgruppe aufgefasst.

Aus den obigen Schilderungen wird ersichtlich, dass die Pathogenese von atopischen Erkrankungen sehr komplex ist und noch viele weitere Studien durchgeführt werden müssen, bis der Einfluss der einzelnen genetischen Varianten geklärt sein wird.

5.2. Genetische Varianten der Chymase und kardiovaskuläre Erkrankungen

Das Angiotensin II spielt durch die Bindung an die Zielrezeptoren in der Gefäßwand, in der Niere und Nebenniere eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Bluthochdruck, Modellierung der Gefäße, beim Wasser- und Elektrolythaushalt^(44, 141). Außer Angiotensin Converting Enzym (ACE) ist auch Chymase Enzym zu 80% an der Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II beteiligt⁽²¹⁶⁾. Zuvor hat man schon eine genetische Variante des ACE Gens, ACE D/D Genotyp, mit der Pathogenese der hypertrophischen Kardiomyopathie in Verbindung gebracht⁽¹³³⁾. Nun wollte Pfeufer mit seinen Kollegen, anhand von 50 Patienten mit hypertrophischen Kardiomyopathie und 50 Kontrollpersonen, untersuchen, ob außer ACE D/D Genotyp auch zwei von ihm gefundene Polymorphismen des Chymase Gens - einer davon befindet sich im zweiten Intron (1625G/A) und der andere in der 5' flankierenden Region des Promotors (-1903G/A) - an der Pathogenese der hypertrophischen Kardiomyopathie beteiligt sein können. Im Rahmen dieser Arbeit stellte man fest, dass die Frequenz des ACE D/D Genotyps in der Gruppe mit hypertrophischen Kardiomyopathie signifikant höher war (2,37 mal, $P=0,039$) als bei den Kontrollpersonen. Jedoch wurde in der Verteilung der Genotypen der beiden Polymorphismen des Chymase Gens zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt. Allerdings konnte man sehen, dass in der Gruppe mit ACE D/D Genotyp das relative Risiko für A/A und A/G Genotyp des Chymase Gen Polymorphismus in der 5' flankierenden Region des Promotors (-1903G/A) um 3,2 mal erhöht ist ($P=0,02$). Somit wurde von Pfeufer et al. die Vermutung aufgestellt, dass durch den Chymase Gen Locus die Krankheitsanfälligkeit bei Patienten mit hypertrophischen Kardiomyopathie modifiziert werden kann⁽¹⁵⁹⁾. In der zweiten Studie dieser Arbeitsgruppe wurde der Effekt des Chymase Gen Polymorphismus in der 5' flankierenden Region des Promotors (-1903G/A) auf das Risiko des Myokardinfakts, der Herzgröße und des Bluthochdrucks erforscht⁽¹⁶⁰⁾. Die Untersuchungen wurden anhand einer 394 Patienten bestehenden Population gemacht, bei der schon in einer anderen Studie eine Assoziation zwischen ACE D/D Genotyp und dem Risiko für Myokardinfarkt gefunden worden war⁽¹⁸¹⁾, sowie anhand 166 Zwillingspaaren, bei denen Busjahn et al. zuvor einen Einfluss der I/D Allele des ACE-Gens auf ACE Plasmaspiegel und Herzgröße entdeckt haben⁽²²⁾. In diesem Zusammenhang liessen sich der akute Myokardinfarkt, die Herzgröße, die Koronargefäßerkrankung und der Bluthochdruck nicht auf den beschriebenen Polymorphismus zurückführen. Die Ergebnisse erlauben jedoch nicht die Aussage, dass das

Chymase Gen keinen Effekt auf das menschliche Herz und die Blutgefäße hat ⁽¹⁶⁰⁾. Es konnte nämlich durch eine andere Arbeitsgruppe die Wichtigkeit der Rolle der ACE-unabhängigen Angiotensin II Produktion in der Gefäßmodellierung nach Ballondilatation hervorgehoben werden ⁽¹⁵⁰⁾.

Aus vielen Studien ist außerdem bekannt, dass Angiotensin II in der Lage ist die Proliferation der Fibroblasten und glatten Muskelzellen zu stimulieren und damit den atherosklerotischen Prozess in koronaren Arterien zu steigern ⁽¹⁰⁸⁾. Aufgrund dieser Tatsache fand es eine deutsche Arbeitsgruppe interessant, den Einfluss der Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems auf die Degeneration der koronaren Bypässe zu erforschen. Anhand von 101 Bypass-Patienten konnte von den untersuchten Polymorphismen der vier Gene (AGTR1, CYP11B2, ACE, CMA) nur der Homozygote GG Genotyp des Chymase Gens Polymorphismus in der 5' flankierenden Region des Promotors (-1903G/A) mit einer höheren Degeneration der Bypässe assoziiert werden ($P=0,005$) und damit einen möglichen genetischen Risikofaktor für Atherosklerose in venösen koronaren Bypässen darstellen ⁽¹⁵³⁾. In diesem Zusammenhang ist es interessant, die Beeinflussung des Lipidmetabolismus durch Chymase Enzym zu berücksichtigen. Zu diesem Thema wurden viele Studien, die sich mit Chymase und reversem Cholesteroltransport befasst haben, veröffentlicht ^(126, 120, 121). Sehr aufschlussreiche Ergebnisse erhielt man in der Studie, die eine japanische Arbeitsgruppe an einer großen Population (1046 Personen) zur Untersuchung des Einflusses des (-1903G/A) Polymorphismus in der 5' flankierenden Region des Chymase Gens auf Bluthochdruck und Lipidmetabolismus, durchgeführt hat. Es konnte zwar kein signifikanter Unterschied in der Frequenz der Patienten mit Bluthochdruck in den drei Genotypgruppen (A/A; A/G; G/G) festgestellt werden ($P=0,82$), der HDL-Cholesterol Spiegel war jedoch in der Genotypgruppe A/A signifikant erhöht ($P=0,038$) ⁽⁶³⁾. Aufgrund dieses Ergebnisses kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Chymase in die Pathogenese der Atherosklerose involviert ist und der Homozygote A/A Genotyp resistenter gegen Atherogenese sein könnte ⁽⁶³⁾, was wiederum gut in Einklang mit den Ergebnissen der deutschen Forschergruppe steht ⁽¹⁵³⁾. Kovanen et al. schlagen sogar vor, dass genetische Varianten des Chymase Gens das Risiko für koronare Herzerkrankungen modulieren können, da die Chymase sich vorherrschend auf der Seite der atheromatösen Rupturen und Erosionen, die für die meisten akuten koronaren Syndrome verantwortlich sind, befindet ⁽¹¹³⁾. Zu beachten ist jedoch, dass mehrere Fall-Kontroll Studien, die zwar eine kleine Anzahl an Probanden untersucht haben, keine Assoziation zwischen

Chymase Gen Polymorphismen und kardiovaskulären Erkrankungen finden konnten^(159, 160, 232, 66).

Bei den bisherigen Studien konnte zwar kein Einfluss des (-1903G/A) Polymorphismus in der 5' flankierenden Region des Chymase Gens auf Bluthochdruck festgestellt werden, es kann aber trotzdem nicht ausgeschlossen werden, dass andere genetische Varianten des Chymase Gens an dessen Entstehung beteiligt sind. So haben kürzlich japanische Forscher die Promotor Region, die Exons und die Exon-Intron Verbindungen des Chymase Gens durchsequenziert und 13 Polymorphismen gefunden, von denen zwei zum Funktionsverlust des Enzyms führen. Der erste Polymorphismus (C785A; Aminosäureposition 38) befindet sich im Exon 2 und führt zum Stop Codon, die zweite Polymorphismus (G881C) liegt in der das Spleißen beeinflussenden Region zwischen Exon 2 und Intron 2 und führt auch zum Stop Codon und einer frame-shift Mutation⁽¹⁵²⁾. Anschließend haben Ono et al. den Einfluss dieser Polymorphismen in einer großen aus 1859 konsekutiven Personen bestehenden, für die japanischen Population repräsentativen, Studienkohorte auf Bluthochdruck untersucht. Es ergab sich, dass die verschiedenen Genotypen von den untersuchten Polymorphismen sich in der Verteilung zwischen den Patienten mit Bluthochdruck und denen ohne Bluthochdruck nicht signifikant unterscheiden und damit den Bluthochdruck nicht zu beeinflussen scheinen. Man muss allerdings dazu anmerken, dass in dieser Studie gefundenen Allelfrequenzen des 785A mit 0,62% und des 881C mit 0,78% relativ selten in der japanischen Bevölkerung vertreten sind und eigentlich eine Population von 100000 Personen benötigt wird, um eine Aussage machen zu können. Dennoch kann man sagen, dass aufgrund der Seltenheit der Allelfrequenzen 785A und 881C, der Einfluss der untersuchten Genotypen des Chymase Gens auf den Bluthochdruck in der japanischen Bevölkerung vernachlässigbar ist⁽¹⁵²⁾.

Im Rahmen unserer Studie konnten wir nur eingeschränkt den Einfluss des von uns untersuchten His66Arg Polymorphismus auf dem Exon 2 des Chymase Gens auf Bluthochdruck oder andere kardiovaskuläre Erkrankungen nachprüfen, da in den ambulanten Akten der dermatologischen Klinik nicht alle Diagnosen, abgesehen von dermatologischen Erkrankungen, ersichtlich waren. Auch ist der Vergleich mit anderen bisher durchgeführten Studien, die sich mit dem Zusammenhang mit Polymorphismen des Chymase Enzyms beschäftigt haben, nur eingeschränkt möglich, da es sich um verschiedene Polymorphismen handelt. Die aus den uns zur Verfügung stehenden Daten berechneten Anteile der Bluthochdruck Patienten an den Homozygoten A/A (Kontrollkollektiv) und an den Heterozygoten A/G (24,5% und 20%) unterschieden sich nicht signifikant von einander.

Wenn man allerdings berücksichtigt, dass eher eine erhöhte Chymase Aktivität eine Rolle bei der Pathogenese des Blutdrucks spielen sollte, wie es von vielen Forschergruppen vermutet wird ^(216, 160), so ist eine mögliche Erklärung für das vorliegende Ergebnis die folgende Überlegung: Wenn es zu einer Punktmutation im aktiven Zentrum des Enzyms auf einem der Allele kommt und der andere Allel nicht ausreichend Chymase nachproduzieren kann, dann könnte dadurch die Aktivität der Chymase erniedrigt sein. Erniedrigte Chymase Aktivität würde wiederum nicht das Risiko für den Bluthochdruck erhöhen, sondern wenn, dann eher protektiv wirken. So wird in der kürzlich erschienen Arbeit von Miyazaki et al. zum Beispiel eine erhöhte Chymase Aktivität unter anderem mit Pathogenese der Atherosklerose und akutem Myokardinfarkt in Verbindung gebracht, dessen größtes Risikofaktor Bluthochdruck ist ⁽¹⁴¹⁾.

5.3. Mastzellen, Genetische Varianten der Chymase und Neoplasien

Viele genetische Faktoren und Umweltfaktoren tragen zu Pathogenese von Hautkrebs bei. Intermittierende intensive Sonnenexposition, vor allem UVB-Strahlen der Wellenlänge 280-320nm und starke Sonnenbrände in der Kindheit wurden als signifikante Risikofaktoren für die Entwicklung von Basalzellkarzinomen und Malignen Melanomen beschrieben ^(114, 9, 224). Im Gegensatz dazu wurde Spinozelluläres Karzinom mit kumulativer Sonnenexposition im Verlauf der Lebenszeit und steigender Häufigkeit mit dem Alter assoziiert ^(205, 9).

UVB Bestrahlung induziert einerseits DNA-Brüche, führt zu Mutationen und Transformationen in den Zellen der Epidermis und unterdrückt andererseits das Immunsystem der Haut und ermöglicht damit durch die UV-Strahlen induzierten Tumoren der Zerstörung durch das Immunsystem zu entfliehen ^(115, 39). Studien mit Mäusen, bei denen Mastzellen entfernt wurden (Wf/Wf), schlugen vor, dass Mastzellen entscheidend für die Immunmodulation durch Bestrahlung sind. Im Gegensatz zu Wildtypen (+/+ Mäuse) wurde die systemische Immunantwort durch verschieden hohe Strahlendosen bei den Wf/Wf Mäusen nicht unterdrückt und außerdem wurde eine lineare Beziehung zwischen dem Vorhandensein von Mastzellen und dem Logarithmus der UVB Dosis, die erforderlich war,

um 50% der Immunantwort zu unterdrücken, festgestellt ⁽⁸²⁾. Der Mechanismus, der dahinter steckt, wurde lang erforscht und ist höchst kompliziert. Durch die UVB-Strahlen wird der Photorezeptor trans-Urocanic acid (UCA) im Stratum corneum der Epidermis zu seiner cis Form isomerisiert ⁽¹⁵¹⁾. Cis-UCA kann sensorische Nervenendigungen zur Freilassung von Neuropeptiden, nämlich Substanz P und CGRP, stimulieren, die wiederum die Degranulation der in der Nähe von Nerven befindlichen Mastzellen beeinflussen ^(46, 85, 149, 110). Wie aus den bisherigen Studien ersichtlich, ist vor allem Histamin, einer der wichtigsten Mediatoren der Mastzellen, für die Unterdrückung des systemischen Immunsystems verantwortlich ⁽⁸¹⁾. Histamin kann nicht nur die Keratinozyten zur Produktion von Prostaglandin E₂ anregen ⁽¹⁰⁵⁾, sondern auch die Migration der Immunzellen in das UV-bestrahlte Gebiet beeinflussen ⁽¹¹⁷⁾, sowie die Proliferation der Lymphozyten und das Profil der Zytokinen regulieren ^(118, 51).

Um noch einmal auf den wesentlichen Punkt zu kommen, so muss man betonen, dass durch UVB via Mastzellen induzierte systemische Herunterregulierung des Immunsystems ein angenehmes Milieu für die Entwicklung von Hautkrebs liefert ⁽⁸⁴⁾. Aus diesem Grund war es für viele Forschergruppen interessant zu ermitteln, ob eine erhöhte Anzahl der Mastzellen in der Haut einen signifikanten prädisponierenden Faktor für die Entwicklung von Hautkrebs liefert. Für die Untersuchungen wurden Biopsien aus der Gesäßbacke entnommen, um den Einfluss zu reduzieren, den die Sonne auf das Vorhandensein von Mastzellen in der Haut ausübt. Laut Grimbaldeston kann man davon ausgehen, dass das Vorherrschen der Mastzellen in der nicht-sonnenexponierten Haut den genetischen Einfluss auf das Vorhandensein der Mastzellen in einem Individuum representiert ⁽⁷³⁾. Im Gegensatz dazu ist die vermehrte Menge der Mastzellen in der sonnenexponierten Haut auf die genetischen Faktoren und Umweltfaktoren, wie Sonnenstrahlen, zurückzuführen ⁽⁷³⁾. In der ersten Studie untersuchten Grimbaldeston und seine Mitarbeiter anhand 21 dänischer Patienten mit Basalzellkarzinom, in der nächsten Studie anhand 21 dänischer und 26 australischer Patienten, das Vorherrschen von Mastzellen in der Biopsie aus der Gesäßbacke, und stellten eine signifikant höhere Anzahl an Mastzellen bei Patienten mit Basalzellkarzinom in der Krankengeschichte als bei den Kontrollgruppen fest ^(70, 71). Auch die Untersuchungen an 45 Patienten mit Malignem Melanom kamen zum Ergebnis, dass die Anzahl an Mastzellen in nicht-sonnenexponierter Haut signifikant höher im Vergleich zu Kontrollgruppe war. Das könnte einer der vielen Faktoren sein, die zu Induzierung und Entwicklung von Malignem Melanom beitragen ⁽⁷⁴⁾. Allerdings war bei der Untersuchung von 20 Patienten mit Spinozellulärem Karzinom kein

signifikanter Unterschied im Vorkommen von Mastzellen verglichen mit den Kontrollpersonen zuerkennen⁽⁷²⁾.

Die Schlussfolgerung daraus ist, dass das Vorherrschen der Mastzellen in der nicht-sonnenexponierter Haut nur einer der Gründe für die Entwicklung von Hautkrebs ist. Hautkrebs Patienten mit niedriger Anzahl von Mastzellen müssten andere unbekannte prädisponierende genetische Faktoren, wie z.B. Mutation im PTCH Tumorsuppressor Gen besitzen⁽⁶⁴⁾, die das Risiko der Entwicklung von Hautkrebs potenzieren. Kontrollpersonen mit niedriger Anzahl von Mastzellen sind weniger anfällig für UVB-induzierte Immunsuppression und können deshalb eher abnormale Hautzellen eliminieren, bevor es zur klonalen Expansion kommt. Kontrollpersonen mit einer hohen Anzahl von Mastzellen, die trotzdem keinen Hautkrebs haben, haben sich höchstwahrscheinlich weniger den UVB-Strahlen ausgesetzt oder der Hautkrebs wurde noch nicht klinisch manifest⁽⁷⁰⁾.

In unseren bisherigen Ausführungen haben wir das allgemein vermehrte Vorkommen von Mastzellen in der Haut mit der UVB-abhängigen Unterdrückung der systemischen Immunantwort in Verbindung gebracht und in Folge davon mit der Induzierung von Hautkrebs. Es ist aber auch interessant zu betrachten, wie Mastzellen lokal auf die Entwicklung von verschiedenen Neoplasien Einfluss nehmen können. Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass Mastzellen in mehreren Neoplasien, wie Mundboden-, Haut-, Brust- und Zervixkarzinom, signifikant erhöht sind^(96, 40, 107, 23). Weiterhin wurde die Akkumulation und Degranulation von Mastzellen mit schnelleren Tumorprogression und höheren Metastasenrate assoziiert^(42, 107). Einige Berichte lieferten direkte Beweise, dass Mastzellakkumulationen um das Tumorgebiet herum unter anderem mit Hilfe von Tryptase und Chymase - zwei der wichtigsten Mastzellmediatoren - durch die Hochregulierung der Angiogenese die Tumorprogression fördern können^(40, 231). Durch die Aktivierung latenter Formen der Metalloproteinasen und Serinproteinasen führen sie zu Degradierung der extrazellulären Matrix und unterstützen damit die Tumormetastasierung^(172, 201).

Im Rahmen unserer Studie haben wir uns mit dem His66Arg Polymorphismus im humanen Chymase Gen beschäftigt. Wie aus den vorherigen Erläuterungen ersichtlich ist, spielen Mastzellen und deren Mediatoren eine große Rolle bei der Entwicklung von Neoplasien. So war es auch für uns interessant zu erforschen, ob es dabei eine Beziehung zu dem Genotyp A/G gibt. Bei den Untersuchungen stellten wir fest, dass eine gewisse Assoziation zwischen

dem heterozygoten Genotyp A/G und neoplastischen Erkrankungen vorliegt ($p=0,0280$). Da wir aber noch nicht genau wissen, in wie weit dieser Polymorphismus Einfluss auf die Aktivität hat, fand ich es wichtig, mich mit Studien auseinander zu setzen, welche die Aktivität von Chymase und Tryptase in Neoplasien untersucht haben. Die Studie von Kankkunen et al. hat anhand von 128 Frauen die Verteilung von MC_T und MC_{TC} in benignen und malignen Tumoren in der Brust untersucht und kam zu dem interessanten Ergebnis, dass die signifikant erhöhte Anzahl von Mastzellen in malignen Brusttumoren, verglichen mit benignen Brusttumoren, vor allem auf die Tryptase-haltigen Mastzellen zurückzuführen ist, während in benignen Brusttumoren kein Unterschied in der Verteilung gefunden wurde ⁽¹⁰⁷⁾. Die relative Abwesenheit von Chymase Aktivität in den Mastzellen könnte mit der Erhöhung von Tryptase aktiven Mastzellen, mit der Inaktivierung von Chymase durch Proteinase-Inhibitoren, wie schon in der Haut von Psoriatikern beobachtet worden ist ⁽⁹¹⁾, oder mit der Erniedrigung der Aktivität des Enzyms beim His66Arg Polymorphismus im Chymase Gen, zusammenhängen. Kankkunen et al. schlagen vor, dass Tryptase aufgrund der Möglichkeit zur indirekten Aktivierung von Metalloproteinasen mit invasivem Wachstum von Tumoren in Verbindung gebracht werden kann, und dass sie aufgrund der Stimulierung von Tumorneovaskularisierung mit der Tumorprogression assoziiert ist. Bisher gibt es noch keine logische Begründung, wieso niedrige Chymase Aktivität mit Tumorwachstum assoziiert sein soll, da man aufgrund der Fähigkeit von Chymase, verschiedene Metalloproteinasen zu aktivieren, eine erhöhte Chymase Aktivität in der invasiven Zone erwarten würde ⁽¹⁰⁷⁾. Auch eine Studie von Cabanillas-Saez et al. kam bei der Untersuchung von 84 Patientinnen mit Zervixneoplasien zu ähnlichen Ergebnissen, nämlich dass im invasiven Zervixkarzinom verglichen mit nicht invasiven Stadien CIN I-III die Anzahl von Mastzellen signifikant höher war, was vor allem auf MC_T zurückzuführen ist ⁽²³⁾. Diese Befunde sind vereinbar mit früheren Berichten, die demonstrieren, dass der dominante Phänotyp der Mastzellen, der die menschlichen Tumoren umgibt und infiltrierte, der MC_T Phänotyp ist ^(12, 166). Auch die kürzlich erschienene Arbeit von Toacuteth et al., in der die Rolle der Mastzellen beim angiogenetischen Prozess im Malignem Melanom untersucht wurde, beschreibt interessante Ergebnisse. Es konnte eine signifikant erhöhte Anzahl der Mastzellen bei denen es sich vor allem um die Tryptase positiven Mastzellen handelte, in der Umgebung des Malignen Melanoms im Vergleich zum benignem Nävus nachgewiesen werden ⁽²¹¹⁾. Wie schon vorhin erwähnt, könnte eben einer der Gründe für die niedrige Aktivität von Chymase im Stroma des Tumorgewebes das Vorherrschen des heterozygoten Genotyps A/G sein, unter der Voraussetzung natürlich, dass dieser Genotyp mit Störung der Funktion der Chymase

einhergeht. Aber solange die wirkliche Chymase Aktivität beim heterozygoten Genotyp A/G nicht nachgewiesen ist und man nicht weiß, ob der andere unveränderte Allel die Chymase Produktion kompensieren kann, bleibt es alles nur Spekulation.

Allerdings führt die im Jahr 2005 erschienene Arbeit von Rojas und seinen Mitarbeitern zu etwas anderen Resultaten ⁽¹⁶⁹⁾. Rojas et al. haben anhand von 21 Patienten mit invasivem Spinozellulären Karzinom der Lippen die Verteilung der MC_T und MC_{TC} in der Stroma des Tumors und invasiven Zone untersucht. Im Gegensatz zu der vorherigen Studie dieser Arbeitsgruppe, in der MC_T in den prämaligen Lippenläsionen, nämlich in der aktinischen Cheilitis, vorherrschten ⁽¹⁶⁸⁾, kam es beim invasiven Spinozellulären Karzinom zu einem eindeutigen Wechsel im Phänotyp der Mastzellen mit einem Anstieg der Chymase in den Mastzellen. Das könnte laut Rojas et al. vielleicht ein Indikator der Malignität sein ⁽¹⁶⁹⁾. Im Vergleich zu normalen Lippen, bei denen der MC_T Phänotyp der Dominante ist, waren im invasivem Spinozellulären Karzinom der Lippen beide MC_{TC} und MC_T signifikant erhöht. In der invasiven Zone dominierte der MC_{TC} Phänotyp ⁽¹⁶⁹⁾, der unter anderem Chymase enthält, die dafür bekannt ist, die Degradation der Extrazellulären Matrix zu fördern und indirekt die Angiogenese zu stimulieren, was für die Tumordinvasion und Metastasierung essentiell ist ^(40, 62). Auf der anderen Seite dominierte im Stroma des Tumorgewebes der MC_T Phänotyp mit aktiver Tryptase ⁽¹⁶⁹⁾, die wiederum ein wichtiger Angiogenese Faktor ist. Das ist entscheidend für das Wachstum und das Überleben der Tumorzellen ⁽¹⁶⁶⁾.

Eine der möglichen Erklärungen dafür, dass in vielen im vorhergehenden besprochenen Studien ^(107, 23, 12, 166) im Gegensatz zur Studie von Rojas et al. keine Erhöhung von Chymase Aktivität festgestellt werden konnte, ist die, dass man vielleicht die invasive Zone nicht explizit untersucht hat. Andererseits kann es zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht zum Wechsel in die aggressivere Form des Karzinom gekommen sein und damit zu keinem eindeutigen Wechsel im Phänotyp der Mastzellen mit Anstieg der Chymase in den Mastzellen, welche laut Rojas et al. ein Indikator der Malignität sein könnte ⁽¹⁶⁹⁾.

Dass Mastzellen und Chymase Enzym in die Pathogenese von Neoplasien involviert sind, wurde aus den vorher beschriebenen Studien eindeutig ersichtlich. Welche Rolle der von uns untersuchte His66Arg Polymorphismus im humanen Chymase Gen, bei dem der Einzelbasenaustausch (A→G) zum Aminosäureaustausch (Histidin→Arginin) im aktiven Zentrum des Enzyms führt, dabei spielt, bleibt noch offen, da man nicht weiß, wie viel

Chymase wirklich produziert wird. Wenn beim heterozygoten Genotyp A/G die Chymase Aktivität erniedrigt wäre, könnte dies einer der möglichen Gründe für die niedrige Anzahl von MC_{TC} im Stroma des Tumorgewebes sein oder, wenn die Aktivität doch erhöht wäre, könnte das der Grund für den Wechsel im Phänotyp mit Anstieg der Chymase in den Mastzellen sein, der die Tumordinvasion und Metastasierung erleichtert.

Ein anderer Ansatzpunkt zur Klärung des Einflusses von His66Arg Polymorphismus auf neoplastische Erkrankungen, ist die Berücksichtigung der Tatsache, dass Chymase in der Lage ist, die Mastzelldegranulation durch die Degradation von Substanz P zu limitieren ⁽²⁶⁾. Wenn wir annehmen, dass beim heterozygoten Genotyp A/G aufgrund von Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum die Aktivität des Enzyms erniedrigt ist, würde es einen Anstieg der Substanz P bedeuten und damit auch die vermehrte Freilassung von Histamin aus den Mastzellen ^(46, 85, 149, 110). Histamin fördert aber wiederum die Unterdrückung des systemischen Immunsystems ⁽⁸¹⁾ und schafft damit ein angenehmes Milieu für die Entwicklung von Hautkrebs ⁽⁸⁴⁾. So könnte diese Überlegung auch eine mögliche Erklärung für die bei unserer Arbeit festgestellte Assoziation zwischen dem heterozygoten Genotyp A/G und neoplastischen Erkrankungen sein. Allerdings muss man berücksichtigen, dass wir zur statistischen Untersuchung heterogene Krankheitsbilder in die Gruppe der Neoplasien aufgenommen haben. Deshalb kann man zwar keine eindeutige Schlussfolgerungen aus unseren Ergebnissen ableiten, die gefundenen Hinweise legen es aber nahe, dass es sich lohnen würde, weitere Untersuchungen durchzuführen, um dieser Assoziation nachzugehen und sie zu verifizieren.

5.4. Genetische Varianten der Chymase und verschiedene Typen von Psoriasis

Psoriasis ist eine gutartige Hauterkrankung. Schätzungen zufolge sind zwischen zwei und drei Prozent der Deutschen davon betroffen. Sie ist eine so genannte multifaktoriell bedingte Erkrankung, bei deren Entstehung ein Zusammenspiel von Vererbung und Immunsystem die zentrale Rolle einnimmt. Es besteht einerseits eine genetische Veranlagung, andererseits kommt die Erkrankung erst durch das Zusammenwirken einer Reihe auslösender Faktoren

zum Ausbruch. Etwa 30-40% der Patienten mit Schuppenflechte haben Verwandte, die ebenfalls erkrankt sind. An der Krankheitsentstehung sind mehrere Gene beteiligt, auf den Chromosomen 1, 3, 6 und 19 konnten bereits für die Psoriasis typische Genorte gefunden werden, wobei die eigentlichen Gensequenzen aber noch unbekannt sind. Neben der genetischen Veranlagung gibt es eine Reihe von Faktoren, die als Auslöser beziehungsweise Risikofaktoren gelten und zu einem Ausbruch oder einer Verschlechterung der Erkrankung beitragen. Hierzu zählen das Rauchen, Übergewicht, Alkoholkonsum, emotionaler Stress, bestimmte Medikamente und hormonelle Faktoren sowie äußere mechanische Einflüsse (Druck, Verletzung) ⁽¹⁰⁰⁾.

Beim eigentlichen psoriatischen Prozess handelt es sich um eine Autoimmunreaktion, bei der sich das Abwehrsystem gegen Zellen des eigenen Körpers richtet. Fehlgesteuerte Blutzellen und Botenstoffe des Immunsystems lösen über eine Entzündungsreaktion die Beschwerden aus. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Überaktivität der Th₁-Lymphozyten, die über ihre Botenstoffe die Immunreaktion vermitteln und damit eine Schlüsselrolle bei der Entzündung übernehmen. Ziel der Autoimmunreaktion sind Keratinozyten, welche für die Hauterneuerung eine zentrale Rolle spielen. Die Haut reagiert auf den Angriff des Immunsystems mit einer allgemeinen Entzündungsreaktion, die Keratinozyten reagieren mit exzessiver Teilung, was die bekannte Symptomatik in Form von Verdickung und Schuppung zur Folge hat ⁽¹⁰⁰⁾.

Es werden drei Hauptformen der Psoriasis unterschieden: Die Psoriasis vulgaris (gewöhnliche Schuppenflechte), die 85% aller Psoriasisfälle ausmacht, die Psoriasis arthritis der Gelenke, unter der zwischen fünf und 10% der Psoriatiker leiden und die seltene mit Eiterbläschen einhergehende Psoriasis pustulosa, die weniger als 5% der Fälle ausmacht ⁽¹⁰⁰⁾.

Im Rahmen unserer Arbeit haben wir uns mit einer Genvariante des Chymase Enzyms beschäftigt. Dabei haben wir anhand von 1004 konsekutiven Patienten den Einfluss des His66Arg Polymorphismus, bei dem der Einzelbasenaustausch (A→G) zum Aminosäureaustausch (Histidin→Arginin) im aktiven Zentrum des Enzyms führt, auf unterschiedliche Psoriasis Formen untersucht. Bei unseren Experimenten stellten wir fest, dass der Anteil der Patienten mit der besonders seltenen und schwerwiegenden Form der Psoriasis, nämlich der Psoriasis pustulosa, in der Gruppe der Patienten mit heterozygotem Genotyp A/G im Vergleich zu dem Anteil in der Kontrollgruppe mit homozygotem Genotyp

A/A signifikant höher war (7,50% vs. 0,41%; $P=0.0018$). Bei den anderen Psoriasis Formen haben wir keinen statistisch auffälligen Unterschied in der Verteilung festgestellt.

Es stellt sich jetzt die Frage, inwieweit die im aktiven Zentrum veränderte Chymase auf die verschiedenen Psoriasis Formen und vor allem auf die Psoriasis pustulosa Einfluss nehmen kann. Um diese Frage zu klären, muss man einige wichtige Grundzüge in der Pathogenese der Psoriasis berücksichtigen. Psoriasis ist charakterisiert durch Hyperplasie der Epidermis, erweiterte Kapillaren in den Papillen der Dermis und prominente Entzündungsreaktion in der Dermis und Epidermis der betroffenen Haut⁽¹¹⁶⁾. Seit dem es bekannt ist, dass die Krankheit durch Stress beeinflusst wird, haben einige klinische Befunde darauf hingewiesen, dass neurogenetische Faktoren in den Entzündungsprozess involviert sein können^(52, 53). Das symmetrische Auftreten der Hautläsionen⁽⁵³⁾ und Fallberichte von der Remission der Psoriasis in den Gebieten der traumatischen Denervierung mit der Persistenz der Krankheit auf der Gegenseite⁽¹⁶⁴⁾, unterstützten diese Ansicht.

Zunächst konnte mit immunhistochemischen Färbemitteln die positiv erhöhte Substanz P und VIP (Vasoaktive intestinal Polypeptide) in psoriatischen Plaques nachgewiesen werden^(3, 144). Um zu untersuchen, wann und ob die Substanz P, VIP und CGRP (Calcitonin gene related Polypeptide) vermehrt in den verschiedenen Stadien der Psoriasis auftritt, hat Naukkarinen et al. das Köbner Phänomen⁽¹⁸⁾ genutzt und durch das Abreißen des Klebebandes in der davor symptomlosen Haut des Patienten mit Psoriasis eine Läsion induziert⁽¹⁴⁶⁾. In den ausgereiften psoriatischen Plaques waren die Substanz P positiven Fasern am meisten vorhanden und in der Koebner-positiven psoriatischen Haut ab dem siebten Tag nach dem mechanischen Reiz vermehrt nachweisbar verglichen mit der Haut ohne psoriatischen Läsionen und normaler Haut. VIP war zwar weniger positiv als Substanz P, konnte aber trotzdem vermehrt in den ausgereiften Plaques und Koebner-positiven psoriatischen Haut nachgewiesen werden. CGRP war nur dürftig positiv sowohl in den ausgereiften psoriatischen Plaques als auch in der Koebner-positiven psoriatischen Haut⁽¹⁴⁶⁾. Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass CGRP keine große Rolle in der Pathogenese der Psoriasis spielt, obwohl es eigentlich in der Lage wäre, die neurogenetische Entzündungsreaktion zu stimulieren und die Vasodilatation zu verstärken⁽⁵⁵⁾. Im Gegensatz zu Substanz P, kann VIP die Proliferation von humanen Keratinozyten stimulieren^(79, 161). Substanz P kann wiederum speziell die Keratinozyten zur Freilassung von Zytokinen wie Interleukin-1 und GM-CSF (Granulozyte macrophage-colony stimulating Factor) anregen, die einen Entzündungsprozess in der Haut

auslösen ⁽⁵⁾. Substanz P und VIP wurden unter anderem vermehrt in den Wänden der dilatierten Kapillare der Dermis beobachtet, was deren Funktion als Vasodilatoren in den psoriatischen Hautläsionen bestätigt ^(55, 146).

Sowohl für Substanz P als auch für VIP sind auf den Mastzellen, die vermehrt in den psoriatischen Hautläsionen nachweisbar sind ⁽⁴¹⁾, Rezeptoren vorhanden ⁽³⁴⁾. Sie können dadurch zur Degranulation von verschiedenen Entzündungsmediatoren angeregt werden ^(14, 60). Interessanterweise wurde auch in der Studie von Naukkarinen et al. eine signifikant höhere Anzahl der Kontakte vor allem zwischen Substanz P-haltigen Nerven und Mastzellen in den psoriatischen Plaques verglichen mit den nicht betroffenen Hautbezirken ($P < 0.001$) festgestellt. Außerdem wurde eine statistisch signifikante Differenz in der Anzahl der Mastzellen in den beiden Gruppen ($P < 0.01$) nachgewiesen ⁽¹⁴⁶⁾. Durch den Axon-Reflex Mechanismus, bei dem die, durch die Aktivierung von sensorischen Nerven freigesetzte Substanz P Histamin aus den Mastzellen freilässt - das wiederum andere sensorischen Neuronen erregt - können Mastzellen und Substanz P-haltigen Nerven die Entzündungsreaktion in der Psoriasis verstärken ^(53, 123). Zum Vergleich hat man zum Beispiel in der Haut der Patienten mit Lichen planus, von der auch die entzündliche Infiltration bekannt ist, keine erhöhte Anzahl der Kontakte zwischen Nerven und Mastzellen gemessen ⁽¹⁴⁵⁾, was darauf hinweist, dass eine erhöhte Anzahl der Kontakte zwischen Nerven und Mastzellen in Psoriasis nicht nur auf die ausgedehnte Entzündungsreaktion zurückzuführen ist.

In der Studie von Naukkarinen et al. wurden die Substanz P positiven Nervenfasern insbesondere in den Papillen der Dermis gesehen, dort wo die Mastzellen ⁽⁹⁰⁾, T-Zellen und Makrophagen ⁽¹⁷⁾ konzentriert sind ⁽¹⁴⁶⁾. Das konnte erwartet werden, seitdem man weiß, dass Substanz P die Makrophagen zur Endozytose von Interleukin-1 und Tumor Nekrose Faktor anregt ⁽⁸⁶⁾ und die Proliferation von T-Lymphozyten zu Th₁-Helferzellen erhöht, welche die ersten T-Zellen sind, die in der psoriatischen Hautläsion erscheinen ^(156, 17). Durch die Fähigkeit, chemotaktisch für die T-Zellen zu sein ⁽⁵⁷⁾ und die Expression von ELAM-1 (endothelial-leucocyte adhesion molecule) in den postkapillaren Venolen zu induzieren ⁽¹³⁸⁾, kann die Substanz P direkt durch die Anlockung der Entzündungszellen die Entzündung in der psoriatischen Haut verstärken.

Wie bereits erwähnt, haben zwar viele Forscher über die Proliferation der terminalen Hautnerven und die Hochregulierung von verschiedenen Neuropeptiden, wie Substanz P, VIP und CGRP, in den psoriatischen Läsionen berichtet^(146, 49, 31), der eigentliche Grund wurde aber nicht ausreichend adressiert. Da aus früheren Studien bekannt war, dass NGF (Nerve growth factor) eine Rolle in der Regulierung der Innervation spielt und die Hochregulierung der Neuropeptiden verursacht^(228, 125), hat eine Forschergruppe die Expression von NGF in den psoriatischen Plaques und zum Vergleich mit der nichtbetroffenen Haut der Psoriatiker, der normaler Haut und der Haut der Patienten mit Lichen planus untersucht⁽¹⁶⁵⁾. NGF, das normalerweise von den Keratinozyten während der embryonalen Entwicklung produziert wird, war in den Keratinozyten der Psoriatiker, sowohl in den betroffenen als auch in nicht betroffenen Hautarealen, im Vergleich zur normaler Haut und Lichen planus Haut signifikant höher nachweisbar ($P < 0.01$ und $P < 0.05$)⁽¹⁶⁵⁾. Dies deutet darauf hin, dass erhöhte Expression von NGF in den Keratinozyten bei Psoriatikern wahrscheinlich nicht durch die Entzündungsreaktion bedingt ist. Wie wir wissen, ist bei Psoriasis ein Durcheinander im Reifungsprozess der Keratinozyten vorhanden, deshalb ist es möglich, dass die unreifen Keratinozyten in einer bestimmten Phase ihres Zellzyklus vermehrt NGF produzieren⁽¹⁶⁵⁾. NGF kann abgesehen von Hochregulierung der Neuropeptiden mitogen auf die Keratinozyten wirken^(226, 162), außerdem Mastzellen anlocken und ihre Degranulation fördern^(4, 158).

Mastzellen spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und in der Reifung psoriatischen Läsionen^(21, 180). Nach der Induzierung des Köbner Phänomens hat man ab dem vierten Tag eine abnorme Proliferation der Mastzellen⁽²¹²⁾, vor allem direkt unter der Epidermis^(41, 213), beobachtet. Im menschlichen Bindegewebe hat man mindestens zwei Subtypen der Mastzellen entdeckt. Mastzellen in der gesunden menschlichen Haut sind zu fast 99% MC_{TC}, die beides Tryptase und Chymase enthalten⁽¹⁰²⁾. Dagegen hat man festgestellt, dass in psoriatischen Läsionen Mastzellen mit erhöhter Tryptase Aktivität vermehrt vorhanden sind, vor allem in den Papillen der Dermis und in einem engen Kontakt zu den Basalzellen der Epidermis. Zum Teil konnte man Tryptase auch in den interzellulären Räumen der Keratinozyten nachweisen. Gleichzeitig war die Anzahl der Mastzellen mit Chymase Aktivität in den Papillen der Dermis relativ erniedrigt. In dem tieferen Anteil der Dermis bestand der Unterschied zwischen psoriatischen Läsionen und der nicht betroffenen Haut des Psoriatikers nicht mehr^(89, 90, 91). Es wurden verschiedene Erklärungen für den Mangel der Chymase Aktivität in den psoriatischen Läsionen vorgeschlagen. So ist es zum Beispiel möglich, dass die starke Entzündungsreaktion den Einstrom von Plasma Inhibitoren, wie α_1 -

Antitrypsin, α_1 -Proteinase-Inhibitor und α_1 -Antichymotrypsin, induziert, welche Chymase inaktivieren können. Tryptase wird dagegen nicht durch Plasma Inhibitoren beeinflusst^(58, 87, 177). Andererseits können Mastzellen wie Makrophagen diese Inhibitoren selbst produzieren und dadurch die Chymase Aktivität limitieren^(2, 227). Es wurde nachgewiesen, dass der Prozentsatz an Mastzellen, die α_1 -Proteinase-Inhibitor, α_1 -Antichymotrypsin und α_2 -Makroglobulin enthalten in den psoriatischen Läsionen verglichen mit der nicht befallenen Haut signifikant erhöht ist⁽⁹²⁾. Eine andere Erklärung wäre, dass auf bis jetzt unbekannte Weise kann zum Beispiel auch die Synthese der Chymase in den Mastzellen unterdrückt oder ihre Umsetzung nach Freilassung aus Mastzellen im Vergleich zu Tryptase erhöht sein. Zieht man unsere Studie in Betracht, so könnte auch durch ein Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum die Funktion des Enzyms beeinträchtigt werden und beim heterozygoten Genotyp A/G im Vergleich zum A/A Genotyp daraus eine niedrige Aktivität des Enzyms resultieren. Alternativ kann die gesteigerte Proliferation oder Rekrutierung des Tryptase haltigen MC_T Typs der Mastzellen zum Teil die Erniedrigung des MC_{TC} Typs erklären.

Die mögliche Rolle der Tryptase in den psoriatischen Läsionen wurde in vielen Studien diskutiert. Tryptase kann an einer allgemeinen Entzündungsreaktion teilhaben, da sie biologisch aktive Proteine und Peptide aktivieren kann^(27, 91). Außerdem kann sie die Degradierung der verschiedenen Komponenten der Basalmembran fördern und dadurch verschiedenen Mediatoren erlauben, mit den Keratinozyten zu interagieren⁽¹⁴⁷⁾. In der Epidermis kann die Tryptase als proteolytischer Enzym die Oberfläche der Keratinozyten verändern, so dass diese Zellen der Kontakt-Hemmung entfliehen können, was eine erhöhte Zellteilung zur Folge hat⁽⁸⁸⁾. Eine andere Möglichkeit, ist dass Tryptase innerhalb der Keratinozyten die Histone hydrolysiert und es dadurch zu vermehrten RNA und DNA Synthese kommt^(59, 88).

Zusammenfassend kann man sagen, dass in den Papillen der Dermis der psoriatischen Läsionen eine erhöhte Anzahl der Kontakte zwischen den Tryptase positiven Mastzellen und den Neurofilament positiven sensorischen Nerven, vor allem von Substanz P haltigen Nerven, vorhanden ist. Das hängt mit der neurogenetischen Entzündung zusammen^(144, 145). Tryptase der menschlichen Mastzellen ist in der Lage, verschiedene Neuropeptide inklusive VIP und CGRP, aber nicht Substanz P zu spalten⁽²⁰⁶⁾. Stattdessen kann Chymase sowohl Substanz P als auch VIP hydrolysieren⁽²⁶⁾. Auf diese Weise kann das vermehrte Vorkommen von Substanz P und das Verschwinden der Chymase Aktivität mit der Entwicklung von

psoriatischen Läsionen einhergehen, in denen die Substanz P die Mastzellen degranulieren kann ⁽³⁴⁾ ohne durch Chymase oder Tryptase degradiert zu werden.

In der vorliegenden Untersuchung haben wir uns vor allem mit einer Genvariante des Chymase Enzyms beschäftigt und das Ziel verfolgt, eine mögliche Assoziation des His66Arg Polymorphismus, bei dem der Einzelbasenaustausch (A→G) zum Aminosäureaustausch (Histidin→Arginin) im aktiven Zentrum des Enzyms führt, mit verschiedenen Psoriasisformen zu finden. Diese Veränderung in der Chymase könnte mit einer niedrigen Aktivität einhergehen, was zur Pathogenese der psoriatischen Läsionen beitragen würde ⁽⁹¹⁾. In unserer Studie haben wir keine Assoziation zwischen dem heterozygoten Genotyp A/G und den häufigen Psoriasis Typen, wie Psoriasis vulgaris, Psoriasis arthritis und Psoriasis inversa usw., festgestellt. Interessanterweise fanden wir aber eine statistisch signifikante Assoziation zu der nicht oft vorkommenden und sehr schweren Form der Psoriasis, nämlich Psoriasis pustulosa. So könnte es sein, dass der seltene heterozygote Genotyp A/G durch den Verlust der Chymase zu einer besonders schweren Entzündungsreaktion neigt und es auf diese Weise zu Pustelbildung kommen kann. Das ist allerdings nur Spekulation. Eindeutige Ergebnisse hinsichtlich dieser möglichen Assoziation liessen sich wahrscheinlich erreichen, wenn man ein größeres Patientenkollektiv mit Psoriasis pustulosa untersucht und dabei die Häufigkeit des heterozygoten Genotyp A/G in dieser Gruppe bestimmt. Schwierigkeiten könnten dadurch entstehen, dass die Häufigkeit dieses Genotyps in der deutschen Bevölkerung sehr selten ist - in unserer Studie nur 4% - und Psoriasis pustulosa auch nur ein Anteil unter 5% an allen Psoriasis Typen ausmacht.

5.5. Genetische Varianten der Chymase und Häufigkeit der Aborte und Totgeburten

Fehlgeburten (Aborte), definiert als das Absterben eines Embryos oder die Geburt eines Kindes vor Erreichen der Lebensfähigkeit, sind die häufigsten Schwangerschaftskomplikationen. 10-15% aller Schwangerschaften enden vorzeitig, meist als Frühaborte vor Beendigung der 12ten Schwangerschaftswoche. Diese Zahl gilt nur für klinisch erkannte Schwangerschaften, die via Ultraschall oder mittels hCG-Bestimmung

festgestellt werden konnten. Studien zeigen, dass bis zu 70% aller Conceptus schon vor dem Zeitpunkt der Regelblutung unerkannt absterben. Zwei oder mehr Aborte, welche als habituelle Aborte bezeichnet werden, kommen mit einer Häufigkeit von 0,4 bis 1,8% aller Schwangerschaften vor und betreffen etwa 2% der Paare im reproduktionsfähigen Alter ⁽⁹⁹⁾.

Unter den zahlreichen bekannten Ursachen, für eine Fehlgeburt, wie anatomische, endokrinologische oder mikrobiologische Faktoren, sind die chromosomal bedingten am häufigsten und machen etwa 50-60% aller Spontanaborte aus ⁽⁹⁹⁾. Darüber hinaus haben zahlreiche Studien auf die Beteiligung von immunologischen Entgleisung hingewiesen. Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden diese Beobachtungen durch Studien ergänzt, die die Beteiligung von sozialen bzw. Umweltfaktoren wie Stress bei der Entstehung von Schwangerschaftsverlusten aufzeigten ⁽⁹⁸⁾.

Stress beeinflusst Implantation und fetales Wachstum, und kann dadurch zum Abort führen ^(36, 8, 225). Auch durch Veränderung des Immunsystems kann Stress die Abortrate erhöhen ^(1, 43). Die Stress-getriggerten Aborte wurden unter anderem assoziiert mit hohem Spiegel von TNF α (Tumor necrosis factor α) und erniedrigtem Spiegel von TNF β (Transforming growth factor β) ⁽⁷⁾. Wie aus vielen Studien bekannt, ist die durch Stress erhöhte Neurotransmitter Substanz P in der Lage die Produktion von TNF α in den Mastzellen und Makrophagen, die auch im schwangeren Uterus vorhanden sind, zu steigern ^(69, 205, 7, 8, 130, 134, 95). Substanz P kann nämlich Dosis abhängig selektiv die TNF α mRNA Expression in den Mastzellen und damit die TNF α Sekretion steigern, die Expression von anderen Zytokinen, wie IL-3, IL-4, IL-6 oder GM-CSF aber nicht beeinflussen ⁽⁶⁾. Eine, die bisherigen Ergebnisse unterstützende Studie, wurde von Marx et al. durchgeführt. Bei der Untersuchung der Rolle der Mastzellen und der die Substanz P enthaltenen Nervenfasern in menschlicher Dezidua in normaler und pathologischer Schwangerschaft, fand man heraus, dass in Dezidua der normalen Schwangerschaft die Mastzellen (36,7 Tryptase+ Mastzellen/mm² Dezidua) spärlich verteilt waren ⁽¹³⁷⁾. Im Gegensatz dazu waren die Mastzellen in Dezidua aus Aborten dramatisch erhöht (448,7 und 469,2 Tryptase+ Mastzellen/mm² Dezidua im ersten bzw. im zweiten Abort), was vor allem auf MC_T Typ zurückzuführen ist. Außerdem wurde eine Erhöhung von Substanz P positiven Nervenfasern beobachtet ⁽¹³⁷⁾. Daraus lässt sich schliessen, dass Mastzellen und Substanz P in Dezidua, in Bezug auf die Zytokin Produktion wie TNF α , ein wichtige Rolle in der Abortinduktion spielen.

TNF α ist bekannt dafür, durch Injektion in die Mäuse oder Ratten Aborte zu verursachen und scheint die Durchblutung von Plazenta zu beeinflussen, was sich in Hämorrhagien und Nekrosen äußert ⁽⁷⁾. Es wurde auch demonstriert, dass TNF α die DNA Synthese und Proliferation in den Trophoblasten hemmen kann ⁽⁹⁴⁾. Außerdem ist TNF α wahrscheinlich in die Aktivierung von NK Zellen in die LAK-Zellen, die fetale Trophoblasten zerstören können, involviert ^(35, 33, 45). Der Gegenspieler von TNF α ist TNF β_2 , der nach dem 8,5 Tag der Gestation die Aktionen von TNF α antagonisieren kann. Der Mechanismus, wonach Stress den TNF β_2 Spiegel erniedrigt, bleibt jedoch noch unklar ^(7, 8).

Auch auf anderem Wege kann Substanz P das Abortrisiko erhöhen. Durch Modulierung der T-Zellen Proliferation, Immunglobulin Synthese, Makrophagen Aktivierung, Mastzellen Degranulation und Mastzellen abhängige Granulozyten Infiltration, kann Substanz P die Immunantwort verändern ^(202, 203). Außerdem kann Substanz P die Produktion von IL1 und γ -Interferon (γ -IFN) durch manche Zell Typen induzieren ⁽²²⁰⁾, die ähnlich wie TNF α Abort in Nagetieren verursachen können ^(32, 45).

Im Rahmen unserer Studie haben wir anhand von 1004 konsekutiven Patienten den His66Arg Polymorphismus im humanen Chymase Gen untersucht, bei dem der Einzelbasenaustausch (A \rightarrow G) zum Aminosäureaustausch (Histidin \rightarrow Arginin) im aktiven Zentrum des Enzyms führt. Wir konnten zwar 40 Heterozygote A/G von 1004 untersuchten Patienten finden, aber keinen einzigen Homozygoten G/G. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass der Homozygote Genotyp G/G eventuell nicht überlebensfähig ist und der Fötus mit diesem Genotyp schon intrauterin abstirbt. Die Erklärung dafür könnte sein, dass mit einem Totalausfall der Chymasefunktion beim homozygoten Genotyp G/G, deren Aufgabe unter anderem die Substanz P zu hemmen ist, gerade mit einer erhöhten Aktivität von Substanz P einhergeht, was wiederum zu einem höherem Abortrisiko führt ^(26, 134, 137). Auch in der Studie von Marx et al. zeigte sich eine Vermehrung von Mastzellen in Dezidua aus den Aborten, die vor allem auf die Tryptase positiven Mastzellen ohne Chymase Aktivität zurückzuführen ist und gleichzeitig eine Erhöhung der Anzahl von Substanz P positiven Nervenfasern ⁽¹³⁷⁾. Das bestätigt unsere Hypothese, dass der His66Arg Polymorphismus im Chymase Gen unter anderem zum erhöhten Abortrisiko beiträgt. Leider lassen die Ergebnisse unserer Studie nur Vermutungen zu, da man aus 40 Patienten mit heterozygotem Genotyp A/G nur 28 Patienten befragen konnte, von denen vier sich nicht mehr erinnern konnten, ob ihre Mutter schon mal ein Abort erlitten hatte. Von den restlichen 24 Patienten gaben 7 an, mindestens einen Abort

oder eine Totgeburt in der Familie gehabt zu haben, unter denen zwei Patientinnen selbst und von fünf die Mütter betroffen waren (8% und 21%). Im Vergleich zu der bekannten Häufigkeit von Aborten, schätzungsweise sind es 10-15%, ist die Abortrate in unserer Studie leicht höher, aber nicht signifikant. Folglich kamen wir zwar in unseren Untersuchungen nicht zu statistisch signifikanten Ergebnissen, trotzdem bleibt das von uns untersuchte Thema aktuell. Es lohnt sich deshalb weitere Studien durchzuführen.

6. Zusammenfassung

Mastzellen sind in grosser Masse und in vielseitiger Weise an physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt ⁽⁶⁵⁾. Sie sind wichtige Effektorzellen allergischer Reaktionen, können Immunantwort initiieren und modulieren, inflammatorische Reaktionen auslösen, endogene Fibrinolyse- und Thrombolyse und Angiogenese beeinflussen ⁽¹⁷⁰⁾. Nach dem Gehalt der Proteasen, wie Chymase und Tryptase, werden Mastzellen in MC_T-Mastzellen und MC_{TC}-Mastzellen eingeteilt, was die etwas unterschiedliche funktionelle Bedeutung erklärt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des His66Arg Polymorphismus im Chymase Gen für dermatologische und kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht. Hierzu wurde in einem Kollektiv von 1004 konsekutiven Patienten der dermatologischen Klinik der Technischen Universität München der Genotyp durch real time TaqMan PCR und Restriktionsenzymanalyse bestimmt, die anamnestischen und klinischen Daten erfasst und mittels statistischer Analyse untersucht.

Insgesamt fanden wir bei 40 Patienten den mutierten Genotyp A/G, was einen Anteil von ca. 4% an allen untersuchten Personen ausmachte. Für den untersuchten Polymorphismus konnte kein Zusammenhang mit atopischen Erkrankungen nachgewiesen werden. Auch mit kardiovaskulären Erkrankungen war keine Assoziation festzustellen. Schwache Hinweise auf Assoziation fanden wir in der Gruppe der neoplastischen Erkrankungen, in welcher bei 30% der Patienten mit dem heterozygoten Genotyp A/G eine Neoplasie diagnostiziert wurde. Um aus dem telefonischen Interview einen eindeutigen Schluss ziehen zu können, fehlten uns dazu viele nötige Daten. Aus den Informationen, die uns schliesslich zur Verfügung standen konnten wir nur die Vermutung aufstellen, dass beim heterozygoten Genotyp A/G die Abortrate leicht erhöht war.

Der wichtigste Befund dieser Studie ist, dass der heterozygote Genotyp A/G mit der besonders seltenen und schwerwiegenden Variante der Psoriasis statistisch signifikant assoziiert war. Die Patienten mit Genotyp A/G hatten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung von Psoriasis pustulosa. Dabei betrug der Anteil der Patienten mit dieser Erkrankung 7,5% unter den Genotypträger A/G. Verglichen mit dem Anteil von 0,41% unter den Genotypträger A/A war der Unterschied statistisch signifikant

[P=0.0018; OR=18,7071 (95% Konfidenzintervall: 2,6-113,9)]. Mit den anderen Varianten von Psoriasis wurde kein statistisch auffälliger Zusammenhang festgestellt.

Zusammenfassend ergibt sich aus dieser Studie, dass der Genotyp A/G nur mit Psoriasis pustulosa statistisch signifikant assoziiert ist. So könnte es sein, dass dieser seltene Genotyp durch den möglichen Verlust der Chymase Funktion zu einer besonders schweren Entzündungsreaktion tendiert. Allerdings wäre es wichtig, zur Überprüfung unserer Ergebnisse weitere experimentelle und klinische Studien an grösseren Kollektiven durchzuführen. Von den Ergebnissen dieser Studien wäre es denkbar neue Therapieoptionen für die Behandlung der Psoriasis pustulosa abzuleiten.

7. Literaturverzeichnis

1. Adler, R.; Felten, D.L.; Cohen, N. (1992):

Psychoneuroimmunology II.
Academic Press, New York

2. Akiyama, M.; Watanabe, Y.; Nishikawa, T. (1991):

Immunohistochemical characterization of human cutaneous mast cells in urticaria pigmentosa (cutaneous mastocytosis).
Acta Pathol Jpn 41, 344-349

3. Al'Abadie, M.S.K.; Senior, H.J.; Bleehen, S.S.; Gawkrödger, D.J. (1992):

Neurogenic changes in psoriasis. An immunohistochemical study.
J Invest Dermatol 98, 535

4. Aloe, L.; Levi-Mantalcini, R. (1977):

Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor.
Brain Res 133, 358-366

5. Ansel, J.C.; Perry, P.; Brown, J.; Damm, D.; Phan, T.; Hart, C.; Luger, T.; Hefeneider, S. (1990):

Cytokine modulation of keratinocyte cytokines.
J Invest Dermatol 94, 101-107

6. Ansel, J.C.; Brown, J.R.; Payan, D.G.; Brown, M.A. (1993):

Substance P selectively activates TNF- α gene expression in murine mast cells.
J Immunol 150, 4478-4485

7. Arck, P.C.; Merali, F.S.; Manuel, J.; Chaouat, G.; Clark, D.A. (1995):

Stress-triggered abortion: inhibition of protective suppression and promotion of tumor necrosis factor- α (TNF- α) release as a mechanism triggering resorptions in mice.
Am J Reprod Immunol 33, 74-80

8. Arck, P.C.; Merali, F.S.; Stanisz, A.M.; Stead, R.H.; Chaouat, G.; Manuel, J.; Clark, D.A. (1995):

Stress-induced murine abortion associated with substance p-dependent alteration in cytokines in maternal uterine decidua.

Bio Reprod 53, 814-819

9. Armstrong, B.K.; Kricker, A. (2001):

The epidemiology of UV induced skin cancer.

J Photochem Photobiol B 63, 8-18

10. Askenase, P.W.; Van Loveren, H. (1983):

Delayed-type hypersensitivity: activation of mast cells by antigen-specific T-cell factors initiates the cascade of cellular interactions.

Immunol Today 4, 259-264

11. Badertscher, K.; Bronnimann, M.; Karlen, S.; Braathen, L.R.; Yawalkar, N. (2005):

Mast cell chymase is increased in chronic atopic dermatitis but not in psoriasis.

Arch Dermatol Res 296, 503-536

12. Beil, W.J.; Fureder, W.; Wiener, H.; et al. (1998):

Phenotypic and functional characterization of mast cells derived from renal tumor tissues.

Exp Hematol 26, 158-169

13. Beneditt, E.P. (1957):

Morphology, chemistry and function of mast cells.

Ann NY Acad Sci 73, 204

14. Benyon, R.C.; Lowman, M.A.; Church, M.K. (1987):

Human skin mast cells: their dispersion, purification, and secretory characterization.

J Immunol 138, 861-867

15. Bienenstock, J.; Befus, A.D.; Denburg, J. (1986):

Mast cell heterogeneity: basic questions and clinical implications.

In: Befus, A.D.; Bienenstock, J.; Denburg, J.A. (eds): Mast Cells Heterogeneity.

Raven Press, New York, 391-402

16. Bloom, G.D. (1974):

Structural and biochemical characteristics of mast cells.

In: Zweifach, B.W.; Grant, L.; Cluskey, Mc. (eds): The inflammatory process. 2nd ed. Vol. 1
ch. 10

Academic Press, New York San Francisco London

17. Bos, J.D.; Hulsebosch, H.J.; Krieg, S.R.; Bakker, P.M.; Cormane, R.H. (1983):

Immunocompetent cells in psoriasis.

Arch Dermatol Res 275, 181-189

18. Boyd, A.S.; Neldner, K.H. (1990):

The isomorphic response of Koebner.

Int J Dermatol 29, 401-410

19. Bradding, P.; Okayama, Y.; Howarth, P.H.; Church, M.K.; Holgate, S.T. (1995):

Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content.

J Immunol 155, 297-307

20. Briggaman, R.A.; Schechter, N.M.; Fräki, J.; Lazarus, G.S. (1984):

Degradation of the epidermal-dermal junction by proteolytic enzymes from human skin and human polymorphonuclear leukocytes.

J Exp Med 160, 1027-1042

21. Brody, I. (1984):

Mast cell degranulation in the evolution of acute eruptive guttate psoriasis vulgaris.

J Invest Dermatol 82, 460-464

22. Busjahn, A.; Knoblauch, J.; Knoblauch, M.; Bohlender, J.; Menz, M.; Faulhaber, H.D.; Becker, A.; Schuster, H.; Luft, F.C. (1997):

Angiotensin converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms, plasma levels, and left ventricular size: a twin study.

Hypertension 29, 165-170

23. Cabanillas-Saez, A.; Schalper, J.A.; Nicovani, S.M.; Rudolph, M.I. (2002):

Characterization of mast cells according to their content of tryptase and chymase in normal and neoplastic human uterine cervix.

Int J Gynecol Cancer 12, 92-98

24. Cairns, J.A.; Walls, A.F. (1996):

Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of Il-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression.

J Immunol 156, 275-283

25. Caughey, G.H.; Lazarus, S.C.; Viro, N.F.; Gold, W.M.; Nadel, J.A. (1988a):

Tryptase and chymase: comparison of extraction and release in two dog mastocytoma lines.

Immunology 63, 339-344

26. Caughey, G.H.; Leidig, F.; Viro, F.; Nadel, J.A. (1988d):

Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase.

J Pharmacol Exp Ther 244, 133-137

27. Caughey, G.H. (1991):

The structure and airway biology of mast cell proteinases.

Am J Respir Cell Mol Biol 4, 387-394

28. Caughey, G.H.; Zerweck, E.H.; Vanderlice, P. (1991):

Structure, chromosomal assignment, and deduced amino acid sequence of a human gene for mast cell chymase.

J Biol Chem 266, 12956-12963

29. Caughey, G.H.; Schaumberg, T.H.; Zerweck, E.H.; Butterfield, J.H.; Hanson, R.D.; Silverman, G.A.; Ley, T.J. (1993):

The human mast cell gene (CMA1): mapping to the cathepsin G/granzyme gene cluster and lineage-restricted expression.

Genomics 15, 614-620

30. Caughey, G.H. (2001):

New developments in the genetics and activation of mast cell proteases.

Mol Immunol 38, 1353-1357

31. Chan, J.; Smoller, B.R.; Raychauduri, S.P.; Jiang, W.Y.; Farber, E.M. (1997):

Intraepidermal nerve fiber expression of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal peptide and substance P in psoriasis.

Arch Dermatol Res 289, 611-616

32. Chaouat, G.; Kolb, J.P.; Kiger, N.; Stanislawski, M.; Wegmann, T.G. (1985):

Immunologic consequences of vaccination against abortion in mice.

Immunology 134, 1594-1598

33. Chaouat, G.; Menu, E.; Clark, D.A.; Dy, M.; Minkowski, M.; Wegmann, T.G. (1990):

Control of fetal survival in CBAxDBA/2 mice by lymphokine therapy.

J Reprod Fertil 89, 447-458

34. Church, M.K.; Lowman, M.A.; Robinson, C.; Holgate, S.T.; Benyon, R.C. (1989):

Interaction of neuropeptides with human mast cells.

Int Arch Allergy Appl Immunol 88, 70-78

35. Clark, D.A.; Lea, R.G.; Flanders, K.; Banwatt, D.; Chaouat, G. (1992):

Role of unique species of TGF- β in preventing rejection of the conceptus during pregnancy.

In: Gergely, J.; Benczur, Erdei, N.; Falus, A.; Fyts, Gy.; Medgyesi, G.; Petranyi; Rajnavsly, E. (eds): Progress in Immunology VIII.

Springer Verlag, Budapest, 841-847

36. Clark, D.A.; Banwatt, D.; Chaouat, G. (1993):

Stress-triggered abortion in mice prevented by alloimmunization.

Am J Reprod Immunol 29, 141-147

37. Coll  , J.M.; ten Kate, L.P.; de Vries, H.G.; Kliphuis, J.W.; Bouman, K.; Scheffer, H.; Gerritsen, J. (1993):

Allele sharing on chromosome 11q13 in sibs with asthma and atopy.

Lancet 342, 936

38. Cookson, W.O.C.M.; Sharp, P.A.; Faux, J.A.; Hopkin, J.M. (1989):

Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q.

Lancet I, 1292-1295

39. Cooper, K.D. (1996):

Cell-mediated immunosuppressive mechanisms induced by UV radiation.

Photochem Photobiol 63, 400-406

40. Coussens, L.M.; Raymond, W.W.; Bergers, G.; et al. (1999):

Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis.

Genes Dev 13, 1382-1397

41. Cox, A.J. (1976):

Mast cells in psoriasis.

In: Farber, E.M.; Cox, A.J. (eds): Psoriasis, proceedings of the second international symposium.

Yorke Medical Books, New York, 36-43

42. Dabbous, M.K.; Haney, L.; Nicolson, G.L.; Eckley, D.; Woolley, D.E. (1991):

Mast cell modulation of tumour cell proliferation in rat mammary adenocarcinoma 13762NF.

Br J Cancer 63, 873-878

43. Dorian, B.; Garfinkel, P.E. (1987):

Stress, immunity and illness: a review.

Psychol Med 17, 393-407

44. Dzau, V.J.; Gibbons, G.H.; Kobilka, B.K.; Lawn, R.M.; Pratt, R.E. (1995):

Genetic models of human vascular disease.

Circulation 91, 521-531

45. Ecker, J.L.; Laufer, M.R.; Hill, J.A. (1993):

Measurement of embryotoxic factors is predictive of pregnancy outcome in women with a history of recurrent abortion.

Obster Gynecol 81, 1-4

46. Egan, C.L.; Viglione-Schneck, M.J.; Walsh, L.J.; Green, B.; Trojanowski, J.Q.; Whitaker-Menezes, D.; Murphy, G.F. (1998):

Characterization of unmyelinated axons uniting epidermal and dermal immune cells in primate and murine skin.

J Cutan Pathol 25, 20-29

47. Ehrlich, P. (1878):

Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik.

Archiv für Mikroskopische Anatomie (Bonn) 13, 263

48. Ehrlich, P. (1879):

Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und eosinophilen Leukozyten.

Arch Anat Physiol 3, 166-169

49. Elder, J.T. (1995):

Cytokine and genetic regulation in psoriasis.

Adv Dermatol 10, 99-133

50. Enerbäck, L.; Norrby, K. (1989):

The mast cell.

In: Iversen, O. (eds): Cell Kinetics of the Inflammatory reaction.

Springer Verlag, New York, 169-204

51. Falus, A.; Meretey, K. (1992):

An early messenger in inflammatory and immune reactions.

Immunol Today 13, 154-156

52. Farber, E.M.; Nall, M.L. (1974):

The natural history of psoriasis in 5,600 patients.

Dermatologica 148, 1-18

53. Farber, E.M.; Nickoloff, B.J.; Recht, B.; Fraki, J.E. (1986):

Stress, symmetry, and psoriasis: possible role of neuropeptides.

J Am Acad Dermatol 14, 305-311

54. Flint, K.C.; Leung, K.B.P.; Pearce, B.N.; Hudspith, B.N.; Brostoff, J.; Johnson, N.Mc.I. (1985):

Human mast cells recovered by bronchoalveolar lavage: their morphology, histamine release, and the effects of sodium cromoglycate.

Clin Sci 68, 427-432

55. Foreman, J.C. (1987):

Peptides and neurogenic inflammation.

Br Med Bull 43, 386-400

56. Forrest, S.; Dunn, K.; Elliott, K.; Fitzpatrick, E.; Fullerton, J.; McCarthy, M.; Brown, J.; Hill, D.; Williamson, R. (1999):

Identifying genes predisposing to atopic eczema.

J Allergy Clin Immunol 104, 1066-1070

57. Foster, C.A.; Mandak, B.; Kromer, E.; Rot, A. (1991):

The neuropeptide Substance P is chemoactiv for human T Cells.

Clin Res 39, 535A

58. Fräki, J.E.; Hopsu-Havu, V.K. (1975):

Human skin proteases: separation and characterization of two alkaline proteases, one splitting trypsin and the other chymotrypsin substrates.

Arch Dermatol Res 253, 261-276

59. Fräki, J.E.; Hopsu-Havu, V.K. (1976):

Plasminogen activator and histone hydrolyzing proteases in psoriasis scales – possible role in increased cell division.

Ann Clin Res 8, 335-339

60. Fräki, J.E.; Schechter, N.M.; Lazarus, G.S. (1983):

Human skin proteases as inflammatory mediators.

Br J Dermatol 1095, 72-76

61. Franconi, G.M.; Graf, P.D.; Lazarus, S.C.; Nadel, J.A.; Caughey, G.H. (1989):

Mast cell tryptase and chymase reverse airway smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in the ferret.

J Pharmacol Exp Ther 248, 947-951

62. Fukami, H.; Okunishi, H.; Miyazaki, M. (1998):

Chymase: its pathophysiological roles and inhibitors.

Curr Pharm Des 4, 439-453

63. Fukuda, M.; Ohkubo, T.; Katsuya, T.; Hozawa, A.; Asai, T.; Matsubara, M.; Kitaoka, H.; Tsuji, I.; Araki, T.; Satoh, H.; Higaki, J.; Hisamichi, S.; Imai, Y., Ogihara, T. (2002):

Association of a Mast Cell Chymase Gene Variant with HDL Cholesterol, but not with Blood Pressure in the Ohasama Study.

Hypertens Res 25, 179-184

64. Gailani, M.R.; Stahle-Bäckdahl, M.; Leffell, D.J. (1996):

The role of the human homolog of *Drosophila* patched in sporadic basal-cell carcinomas.

Nat Genet 14, 78-81

65. Galli, S.J. (1993):

New concepts about the mastcells.

In: Flier, J.S.; Underhill, L.H. (eds): Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital. Boston.

N Engl J Med 328, 257-265

66. Gardemann, A.; Harnami, M.; Katz, N.; Tillmann, H.; Haberbosch, W. (2000):

The chymase A(-1903)G gene polymorphism is not associated with the risk and extent of coronary heart disease.

Atherosclerosis 150, 445-446

67. Goldstein, S.M.; Kaempfer, C.E.; Proud, D.; Schwartz, L.B.; Irani, A.M.; Wintroub, B.U. (1987):

Detection and partial characterization of a human mast cell carboxypeptidase.

J Immunol 139, 2724-2729

68. Gordon, J.R.; Burd, P.R.; Galli, S.J. (1990):

Mast cells as a source of multifunctional cytokines.

Immunol Today 11, 458-464

69. Gordon, J.R.; Galli, S.J. (1990):

Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α .

Nature 346, 274-276

70. Grimbaldston, M.A.; Skov, L.; Baadsgaard, O.; Skov, B.G.; Marshmann, G.; Finlay-Jones, J.J.; Hart, P.H. (2000):

High dermal mast cell prevalence is a predisposing factor for basal cell carcinoma in humans.

J Invest Dermatol 115, 317-320

71. Grimbaldston, M.A.; Skov, L.; Finlay-Jones, J.J.; Hart, P.H. (2002):

Increased dermal mast cell prevalence and susceptibility to development of basal cell carcinoma in humans.

Methods 28, 90-96

72. Grimbaldston, M.A.; Skov, L.; Finlay-Jones, J.J.; Hart, P.H. (2002):

Squamous cell carcinoma is not associated with high dermal mast cell prevalence in humans.

J Invest Dermatol 119, 1204-1206

73. Grimbaldston, M.A.; Simpson, A.; Finlay-Jones, J.J.; Hart, P.H. (2003):

The effect of ultraviolet radiation exposure on the prevalence of mast cells in human skin.

Br J Dermatol 148, 300-306

74. Grimbaldston, M.A.; Pearce, A.L.; Robertson, B.O.; Coventry, B.J.; Marshman, G.; Finlay-Jones, J.J.; Hart, P.H. (2004):

Association between melanoma and dermal mast cell prevalence in sun-unexposed skin.

Br J Dermatol 150, 895-903

75. Groneberg, D.A.; Bester, C.; Grutzkau, A.; Serowka, F.; Fischer, A.; Henz, B.M. et al. (2005):

Mast cells and vasculature in atopic dermatitis-potential stimulus of neoangiogenesis.

Allergy 60, 90-97

76. Gruber, B.L.; Marchese, M.J.; Suzuki, F.; Schwartz, L.B.; Okada, Y.; Nagase, H.; Ramamurthy, N.S. (1989):

Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase activation.

J Clin Invest 84, 1657-1662

77. Gruber, B.L.; Schwartz, L.B. (1990):

The mast cell as an effector on connective tissue degradation: A study of matrix susceptibility to human mast cells.

Biochem Biophys Res Commun 171, 1272-1278

78. Gumprecht, J.; Zychma, M.; Grzeszczak, W.; Lacka, B.; Burak, W.; Mosur, M.; Kaczmarek, J.; Otulski, I.; Stoklosa, T.; Czank, P. (2002):

Angiotensin I-converting enzyme and chymase gene polymorphisms-relationship to left ventricular mass in type 2 diabetes patients.

Med Sci Monit 8, CR603-606

79. Haegerstrand, A.; Jonzon, B.; Dalsgaard, C.J.; Nilsson, J. (1989):

Vasoactive intestinal polypeptide stimulates cell proliferation and adenylate cyclase activity in cultured human keratinocytes.

Proc Natl Acad Sci USA 86, 5993-5996

80. Hagermark, O.; Rajka, G.; Bergvist, U. (1972):

Experimental itch in human skin elicited by rat mast cell chymase.

Acta Dermatol 52, 125-128

81. Hart, P.H., Jaksic, A.; Swift, G.; Norval, M.; El-Ghorr, A.A.; Finlay-Jones J.J. (1997):

Histamine involvement in UVB- and cis-urocanic acid-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses.

Immunology 91, 601-608

82. Hart, P.H.; Grimbaldeston, M.A.; Swift, G.J.; Jaksic, A.; Noonan, F.P.; Finlay-Jones, J.J. (1998):

Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice.

J Exp Med 187, 2045-2053

83. Hart, P.H. (2001):

Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products.

Immunol Cell Biol 79, 149-153

84. Hart, P.H.; Grimbaldeston, M.A.; Finlay-Jones, J.J. (2001):

Sunlight, immunosuppression and skin cancer: role of histamine and mast cells.

Clin Exp Pharm Phys 28, 1-8

85. Hart, P.H.; Townley, S.L.; Grimbaldeston, M.A.; Khalil, Z.; Finlay-Jones, J.J. (2002):

Mast cells, neuropeptides, histamine, and prostaglandins in UV-induced immunosuppression.
Methods 28, 79-89

86. Hartung, H.P.; Toyka, K.V. (1989):

Substance P, the immune system and inflammation.
Int Rev Immunol 4, 229-249

87. Harvima, I.T.; Schecher, N.M.; Harvima, R.J.; Fräki, J.E. (1988):

Human skin tryptase: purification, partial characterization and comparison with human lung tryptase.
Biochim Biophys Acta 957, 71-80

88. Harvima, I.T.; Harvima, R.J.; Penttilä, I.M.; Eloranta, T.O.; Horsmanheimo, M.; Fräki, J.E. (1989):

Effect of human mast cell tryptase on human plasma proenzymes.
Int Arch Allergy Appl Immunol 90, 104-108

89. Harvima, I.T.; Naukkarinen, A.; Harvima, R.J.; Horsmanheimo, M. (1989):

Enzyme- and immunohistochemical localization of mast cell tryptase in psoriatic skin.
Arch Dermatol Res 281, 387-391

90. Harvima, I.T.; Naukkarinen, A.; Harvima, R.J.; Aalto, M.L.; Neittaanmäki, H.; Horsmanheimo, M. (1990):

Quantitative enzyme histochemical analysis of tryptase- and chymase- containing mast cells in psoriatic skin.
Arch Dermatol Res 282, 428-433

91. Harvima, R.J.; Schwartz, L.B. (1993):

Mediators of mast cells and basophils.

In: Foreman, J. (eds): Immunopharmacology of mast cells and basophil leukocytes.
Academic Press, London, in press

92. Harvima, I.T.; Haapanen, L.; Ackermann, L.; Naukkarinen, A.; Harvima, R.J.; Horsmanheimo, M. (1999):

Decreased chymase activity is associated with increased levels of protease inhibitors in mast cells of psoriatic lesions.

Acta Derm Venerol (Stockh) 79, 98-104

93. Helender, H.F.; Bloom, G.D. (1974):

Quantitative analysis of mast cell structure.

J Microsc (Oxf) 100, 315

94. Hunt, J.S. (1989):

Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells.

J Reprod Immunol 16, 1-17

95. Hunt, J.S. (1994):

Immunologically relevant cells in the uterus.

Biol Reprod 50, 461-466

96. Iamaroon, A.; Pongsiriwet, S.; Jittidecharaks, S.; Pattanaporn, K.; Prapayasadok, S.; Wanachantararak, S. (2003):

Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma.

J Oral Pathol Med 32, 195-199

97. Imada, T.; Komorita, N.; Kobayashi, F.; Naito, K.; Yoshikawa, T.; Miyazaki, M.; Nakamura, N.; Kondo, T. (2002):

Therapeutic Potential of a Specific Chymase Inhibitor in Atopic Dermatitis.

Jpn J Pharmacol 90, 214-217

98. Internet: www.hu-berlin.de/forschung/fdb/deutsch/PJ/PJ1999997113.html

99. Internet: www.humgenpeine.de/spun_ab.php

100. Internet: www.m-ww.de/krankheiten/hautkrankheiten/psoriasis/

101. Irani, A.A.; Schechter, N.M.; Craig, S.S.; DeBlois, G.; Schwartz, L.B. (1986):

Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions.

Proc Natl Acad Sci USA 83, 4464-4468

102. Irani, A.A.; Bradford, T.R.; Kepley, C.L.; Schechter, N.M.; Schwartz, L.B. (1989a):

Detection of MC_T and MC_{TC} types of human mast cell by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies.

J Histochem Cytochem 37, 1509-1515

103. Irani, A.A.; Goldstein, S.M.; Wintroub, B.U.; Bradford, T.; Schwartz, L.B. (1991):

Human mast cell carboxypeptidase: selective localization to MC_{TC} cells.

J Immunol 147, 247-253

104. Iwanaga, T.; McEuen, A.; Walls, A.F.; Clough, J.B.; Keith, T.P.; Rorke, S.; Barton, S.J.; Holgate, S.T.; Holloway, J.W. (2004):

Polymorphism of the mast cell chymase gene (CMA1) promotor region: lack of association with asthma but association with serum total immunoglobulin E levels in adult atopic dermatitis.

Clin Exp Allergy 34, 1037-1042

105. Jaksic, A.; Finlay-Jones, J.J.; Watson, C.J.; Spencer, L.K.; Santucci, I.; Hart, P.H. (1995):

Cis-urocanic acid synergizes with histamine for increased PGE₂ production by human keratinocytes: Link to indomethacin-inhibitable UVB-induced immunosuppression.

Photochem Photobiol 61, 303-309

106. Johnson, P.R.; Ammit, A.J.; Carlin, S.M.; Armour, C.L.; Caughey, G.H.; Black, J.L. (1997):

Mast cell tryptase potentiates histamine-induced contraction in human sensitized bronchus.

Eur Respir J 10, 38-43

107. Kankukunen, J.P.; Harvima, I.T.; Naukkarinen, A. (1997):

Quantitative analysis of tryptase and chymase containing mast cells in benign and malignant breast lesions.

Int J Cancer 72, 385-388

108. Katz, A. (1990):

Angiotensin II: hemodynamic regulator or growth factor ?

J Mol Cell Cardiol 22, 739-747

109. Kawashima, T.; Noguchi, E.; Arinami, T.; Kobayashi, K.; Otsuka, F.; Hamaguchi, H. (1998):

No evidence for an association between a variant of the mast cell chymase gene and atopic dermatitis based on case-control and haplotype-relative-risk analysis.

Hum Hered 48, 271-274

110. Khalil, Z.; Townley, S.L.; Grimbaldeston, M.A.; Finlay-Jones, J.J.; Hart, P.H. (2001):

Cis-Urocanic Acid Stimulates Neuropeptide Release from Peripheral Sensory Nerves.

J Invest Dermatol 117, 886-891

111. Kielty, C.M.; Lees, M.; Shuttleworth, C.A.; Wooley, D. (1993):

Catabolism of intact type VI collagen microfibrils: susceptibility to degradation by serine proteinases.

Biochem Biophys Res Commun 191, 1230-1236

112. Kirshenbaum, A.S.; Kessler, S.W.; Goff, J.P.; Metcalfe, D.D. (1991):

Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells.

J Immunol 146, 1410-1415

113. Kovanen, P.T.; Kaartinen, M.; Paavonen, T. (1995):

Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction.

Circulation 92, 1084-1088

114. Kricger, A.; Armstrong, B.K.; English, D.R.; Heenan, P.J. (1995):

Does intermittent sun exposure cause basal cell carcinoma? A case-control study in Western Australia.

Int J Cancer 60, 489-494

115. Kripke, M.L. (1981):

Immunologic mechanisms in UV radiation carcinogenesis.

Adv Cancer Res 34, 69-106

116. Krueger, G.G. (1981):

Psoriasis: Current concepts of its etiology and pathogenesis.

In: Dobson, R.I.; Triers, B.H. (eds): Year book of dermatology.

Year Book Medical Publishers, Chicago, 13-70

117. Laberge, S.; Cruikshank, W.W.; Kornfeld, H.; Center, D.M. (1995):

Histamine-induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8⁺ T cells is independent of transcription and translation. Evidence for constitutive protein synthesis and storage.

J Immunol 155, 2902-2910

118. Lagier, B., Lebel, B.; Bousquet, J.; Pene, J. (1997):

Different modulation by histamine of IL-4 and interferon-gamma (IFN- γ) release according to the phenotyp of human Th0, Th1 and Th2 clones.

Clin Exp Immunol 108, 545-551

119. Lagunoff, D.; Martin, T.W.; Read, G. (1983):

Agents that release histamine from mast cells.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 23, 331-351

120. Lee, M.; von Eckardstein, A.; Lindstedt, L.; Assmann, G.; Kovanen, P.T. (1999):

Depletion of pre beta 1LpA1 and LpA4 particles by mast cell chymase reduces cholesterol efflux from macrophage foam cells induced by plasma.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 19, 1066-1074

121. Lee, M.; Uboldi, P.; Giudice, D.; Catapano, A.L.; Kovanen, P.T. (2000):

Identification of domains in apoA-I susceptible to proteolysis by mast cell chymase: implications for HDL function.

J Lipid Res 41, 975-984

122. Lees, M.; Taylor, D.J.; Wooley, D.E. (1994):

Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinases A and B.

Eur J Biochem 223, 171-177

123. Lembeck, F.; Holzer, P. (1979):

Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 310, 175-183

124. Levi-Schaffer, F. (1995):

Mast cell/fibroblast interactions in health and disease.

In: Marone, G. (eds): Human Basophils and Mast Cells: Biological Aspects.

Chem Immunol. Karger, Basel 61, 161-185

125. Lindsay, R.M.; Harmar, A.L. (1989):

Nerve growth factor regulates expression of neuropeptides genes in adult sensory neurons.

Nature 337, 362-364

126. Lindstedt, L.; Lee, M.; Castro, G.R.; Fruchart, J.C.; Kovanen, P.T. (1996):

Chymase in exocytosed rat mast cell granules effectively proteolyzes apolipoprotein AI-containing lipoproteins, so reducing the cholesterol efflux-inducing ability of serum and aortic intimal fluid.

J Clin Invest 97, 2174-2182

127. Livak, K.J. (1997):

Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay.

Genet Anal 14, 143-149

128. Löffler, G. (2001):

Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.

Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 66

129. Lohi, J.; Harima, I.; Keski-Oja, J. (1992):

Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72000 dalton gelatinase and fibronectin.

J Cell Biochem 50, 337-349

130. Lotz, M.; Vaughan, J.H.; Carson, D.A. (1988):

Effects of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes.

Sciences 241, 1218-1221

131. Mao, X.Q.; Shirakawa, T.; Yoshikawa, K.; Yoshikawa, T.; Sasaki, S.; Kawai, M.; Enomoto, T.; Hashimoto, T.; Furuyama, J.; Hopkin, J.M.; Morimoto, T. (1996):

Association between mast cell chymase gene and ekzema.

Lancet 348, 581-583

132. Mao, X.Q.; Shirakawa, T.; Enomoto, T.; Shimazu, S.; Dake, Y.; Kitano, H.; Hagihara, A.; Hopkin, J.M. (1998):

Association between Variants of Mast Cell Chymase Gene and Serum IgE Levels in Eczema.

Hum Hered 48, 38-41

133. Marian, A.; Yu, Q.; Workman, R.; Gottfried, G.; Roberts, R. (1993):

Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden death.

Lancet 342, 1085-1086

134. Markert, U.R.; Arck, P.C.; McBey, B.A.; Manuel, J.; Croy, B.A.; Marshall, J.S.; Chaouat, G.; Clark, D.A. (1997):

Stress triggered abortions are associated with alterations of granulated cells into the decidua.

Am J Reprod Immunol 37, 94-100

135. Marsh, D.G.; Neely, J.D.; Breazeale, D.R.; Ghosh, B.; Freidhoff, L.R.; Ehrlich-Kautzky, E.; Schou, C.; Krishnaswamy, G.; Beaty, T.H. (1994):

Linkage analysis of Il-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations.

Science 264, 1152-1156

136. Marshall, J.S.; Bienenstock, J. (1990):

Mast Cells.

Springer Semin Immunopathol 12, 191-202

137. Marx, L.; Arck, P.; Kieslich, C.; Mitterlechner, S.; Kapp, M.; Dietl, J. (1999):

Decidual mast cells might be involved in the onset of human first-trimester abortion.

Am J Reprod Immunol 41, 34-40

138. Matis, W.L.; Lavker, R.M.; Murphy, G.F. (1990):

Substance P induces the expression of an endothelial-leukocyte adhesion molecule by microvascular endothelium.

J Invest Dermatol 94, 492-495

139. Metcalfe, D.D.; Soter, N.A.; Wassermann, S.I.; Austen, K.F. (1980):

Identification of sulfated mucopolysaccharides heparin in the lesional skin of a patient with mastocytosis.

J Invest Dermatol 74, 210-215

140. Miller, J.S.; Moxley, G.; Schwartz, L.B. (1990):

Cloning and characterization of a second complementary DNA for human tryptase.

J Clin Invest 86, 864-870

141. Miyazaki, M.; Takai, S.; Jin, D.; Muramatsu, M. (2006):

Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models.

Pharmacology & Therapeutics 112, 668-676

142. Moffatt, M.F.; Hill, M.R.; Cornélis, F.; Schou, C.; Faux, J.A.; Young, R.P.; James, A.L.; Ryan, G.; le Souef, P.; Musk, A.W.; Hopkin, J.M.; Cookson, W.O.C.M. (1994):
Genetic linkage of T-cell receptor α/δ complex to specific IgE responses.
Lancet 343, 1597-1600

143. Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986):
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1, 263-273

144. Naukkarinen, A.; Nickoloff, B.J.; Farber, E.M. (1989):
Quantification of cutaneous sensory nerves and their Substance P content in psoriasis.
J Invest Dermatol 92, 126-129

145. Naukkarinen, A.; Harvima, I.T.; Aalto, M.L.; Harvima, R.J.; Horsmanheimo, M. (1991):
Quantitative analysis of contact sites between mast cells and sensory nerves in cutaneous psoriasis and lichen planus based on a histochemical double staining technique.
Arch Dermatol Res 283, 433-437

146. Naukkarinen, A.; Harvima, I.; Paukkonen, K.; Aalto, M.L.; Horsmanheimo, M. (1993):
Immunohistochemical analysis of sensory nerves and neuropeptides, and their contacts with mast cells in developing and mature psoriatic lesions.
Arch Dermatol Res 285, 341-346

147. Naukkarinen, A.; Jarvikallio, A.; Lakkakorpi, J.; Harvima, I.T.; Harvima, R.J.; Horsmanheimo, M. (1996):
Quantitative histochemical analysis of mast cells and sensory nerves in psoriatic skin.
J Pathol 180, 200-205

148. Nicolaes, G.A.; Dahlback, B. (2002):
Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 22, 530-538

149. Niizeki, H.; Alard, P.; Streilein, J.W. (1997):

Calcitonin gene-related peptid is necessary for ultraviolet B-impaired induction of contact hypersensitivity.

J Immunol 59, 5183-5186

150. Nishimura, H.; Hoffmann, S.; Balatu, O.; Sugimura, K.; Ganten, D.; Urata, H. (1996):

Angiotensin I converting enzyme and heart chymase in cardiovascular tissues.

Kidney Int 49 (suppl 55), 18-23

151. Noonan, F.P.; De Fabo, E.C. (1992):

Immunosuppression by ultraviolet B radiation: initiation by urocanic acid.

Immunol Today 13, 250-254

152. Ono, K.; Kokubo, Y.; Toshifumi, M.; Inamoto, N.; Shioji, K.; Iwai, N. (2004):

Heterozygous disruption of CMA1 does not affect blood pressure.

J Hypertens 22, 103-109

153. Ortlepp, J.R.; Janssens, U., Bleckmann, F.; Lauscher, J.; Merkelbach-Bruse, S.; Hanrath, P.; Hoffmann, R. (2001):

A chymase gene variant is associated with atherosclerosis in venous coronary artery bypass grafts.

Coron Artery Dis 12, 493-497

154. Padawer, J. (1978):

The mast cell and immediate hypersensitivity.

In: Bach, M.K. (eds): Immediate Hypersensitivity.

Dekker Inc., New York 7, 301-367

155. Pascale, E.; Tarani, L.; Meglio, P.; Businco, L.; Battiloro, E.; Cimino-Reale, G.; Verna, R.; D'Ambrosio, E. (2001):

Absence of Association between a Variant of the Mast Cell Chymase Gene and Atopic Dermatitis in an Italian Population.

Hum Hered 51, 177-179

156. Payan, D.G.; Brewser, D.R.; Missirian-Bustian, A.; Goetzl, E.J. (1984):

Substance P recognition by a subset of human T lymphocytes.

J Clin Invest 74, 1532-1539

157. Pearce, F.L. (1986):

On the heterogeneity of mast cells.

Pharmacology 32, 61-71

158. Pearce, F.L.; Thompson, H.L. (1986):

Some characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated with nerve growth factor.

J Physiol 372, 379-393

159. Pfeufer, A.; Osterziel, K.J.; Urata, H.; Borck, G.; Schuster, H.; Wienker, T.; Dietz, R.; Luft, F.C. (1996):

Angiotensin-Converting Enzyme and Heart Chymase Gene Polymorphisms in Hypertrophic Cardiomyopathy.

Am J Cardiol 78, 362-364

160. Pfeufer, A.; Busjahn, A.; Vergopoulos, A.; et al. (1998):

Chymase gene locus is not associated with myocardial infarction and is not linked to heart size or blood pressure.

Am J Cardiol 82, 979-981

161. Pincelli, C.; Fantini, F.; Romualdi, P.; Sevigani, C.; Lesa, G.; Benassi, L.; Giannetti, A. (1992):

Substance P is diminished and vasoactive intestinal peptide is augmented in psoriatic lesions and these peptides exert disparate effects on the proliferation of cultured human keratinocytes.

J Invest Dermatol 98, 421-427

162. Pincelli, C.; Seignani, C.; Manfredini, R.; Grande, A.; Fantini, F.; Bracci-Laudiero, et al. (1994):

Expression and function of nerve growth factor and nerve growth factor receptor on cultured keratinocytes.

J Invest Dermatol 103, 13-18

163. Reilly, C.F.; Schechter, N.B.; Travis, J. (1985):

Inactivation of bradykinin and kallidin by cathepsin G and mast cell chymase.

Biochem Biophys Res Commun 127, 443-444

164. Rhaychaudhuri, S.P.; Farber, E.M. (1993):

Are sensory nerves essential for the pathogenesis of psoriasis?

J Am Acad Dermatol 28, 448-449

165. Rhaychaudhuri, S.P.; Jiang, W.Y.; Farber, E.M. (1998):

Psoriatic keratinocytes express high level of nerve growth factor.

Acta Derm Venereol 78, 84-86

166. Ribatti, D.; Vacca, A.; Marzullo, A., et al. (2000):

Angiogenesis and mast cell density with tryptase activity increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas.

Int J Cancer 85, 171-175

167. Ring, J.; Kramer, U.; Darsow, U.; Behrendt, H. (2001):

Why are allergies increasing?

Curr Opin Immunol 13, 701-708

168. Rojas, G.; Martinez, A.; Pineda, A.; Spencer, M.L.; Jimenez, M.; Rudolph, M.I. (2004):

Increased mast cell density and protease content in actinic cheilitis.

J Oral Pathol Med 33, 567-573

169. Rojas, G.; Spencer, M.L.; Martinez, A.; Maurelia, M.A.; Rudolph, M.I. (2005):

Characterization of mast cell subpopulations in lip cancer.

J Oral Pathol Med 34, 268-273

170. Rothe, M.J.; Nowak, M.; Kerdel, F.A. (1990):

The mast cell in health and disease.

J Am Acad Dermatol 23, 615-624

171. Rubinstein, I.; Nadel, J.A.; Graf, P.D.; Chaughey, G.H. (1990):

Mast cell chymase potentiates histamine-induced wheal formation in the skin of ragweed-allergic dogs.

J Clin Invest 86, 555-559

172. Saarinen, J.; Kalkkinen, N.; Welgus, H.G.; Kovanen, P.T. (1994):

Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu-Thr bond by mast cell chymase.

J Biol Chem 269, 18134-18140

173. Saito, H.; Matsumoto, K.; Okumura, S.; Kashiwakura, J.; Oboki, K.; Yokoi, H.; Kambe, N.; Ohta, K.; Okayama, Y. (2006):

Gene Expression Profiling of Human Mast Cell Subtypes: An In Silico Study.

Allergology International 55, 173-179

174. Sakai, K.; Ren, S.; Schwartz, L.B. (1996):

A novel heparin – dependent processing pathway for human tryptase. Autocatalysis followed by activation with dipeptyl peptidase I.

J Clin Invest 15, 988-995

175. Sandford, A.J., Shirakawa, T.; Moffatt, M.F.; Daniels, S.E.; Ra, C.; Faux, J.A.; Young, R.P.; Nakamura, Y.; Lathrop, G.M.; Cookson, W.O.C.M.; Hopkin, J.M. (1993):

Localization of α and β subunit of high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI β) on chromosome 11q.

Lancet 341, 332-334

176. Sayama, S.; Iozzo, R.V.; Lazarus, G.S.; Schechter, N.M. (1987):

Human skin chymotrypsin-like proteinase chymase. Subcellular localization to mast cell granules and interaction with heparin and other glycosaminoglycans.

J Biol Chem 262, 6808-6815

177. Schechter, N.M.; Sprows, L.J.; Schoenberger, O.L.; Lazarus, G.S.; Cooperman, B.S.; Rubin, H. (1989):

Reaction of human skin chymotrypsin-like proteinase chymase with plasma proteinase inhibitor.

J Biol Chem 264, 21308-21315

178. Schechter, N.M.; Irani, A.M.; Sprows, J.L.; Abernethy, J.; Wintroub, B.; Schwartz, L.B. (1990):

Identification of a cathepsin G-like proteinase in the MC_{TC}-type of human mast cell.

J Immunol 145, 2652-2661

179. Schnyder, U.W. (1960):

Neurodermitis-Asthma-Rhinitis. Eine genetische-allergologische Studie.

Acta Genet Stat Med 10, 1-106

180. Schubert, C.; Christophers, E. (1985):

Mast cells and macrophages in early relapsing psoriasis.

Arch Dermatol Res 277, 352-358

181. Schuster, H.; Wienker, T.F.; Stremmler, U.; Noll, B.; Steinmetz, A.; Luft, F.C. (1995):

A variant of the angiotensin converting enzyme gene is associated with myocardial infarction, but not with risk factors or severity of coronary disease.

Am J Cardiol 76, 601-603

182. Schwartz, L.B.; Lewis, R.A.; Austen, K.F. (1981a):

Tryptase from human pulmonary mast cells: purification and characterization.

J Biol Chem 256, 11939-11943

183. Schwartz, L.B.; Riedel, C.; Caulfield, J.P.; Wassermann, S.I.; Austen, K.F. (1981c):

Cell association of complexes of chymase, heparin proteoglycan, and protein after degranulation by rat mast cells.

J Immunol 126, 2071-2078

184. Schwartz, L.B.; Austen, K.F. (1984):

Structure and function of the chemical mediators of mast cells.

Prog Allergy 34, 271-321

185. Schwartz, L.B.; Bradford, T.R.; Littman, B.H.; Wintroub, B.U. (1985b).

The fibrogenolytic activity of purified tryptase from human lung mast cells.

J Immunol 135, 2762-2767

186. Schwartz, L.B.; Bradford, T.R. (1986):

Regulation of tryptase from human lung mast cells by heparin. Stabilization of the active tetramer.

J Biol Chem 261, 7372-7379

187. Schwartz, L.B.; Irani, A.A.; Roller, K.; Castells, M.; Schechter, N.M. (1987a):

Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells.

J Immunol 138, 2611-2615

188. Schwartz, L.B.; Austen, K.F. (1988):

The mast cell and mediators of immediate hypersensitivity.

In: Samter, M. (eds): Immunological diseases.

Little, Brown and Company, Boston Toronto, 157-201

189. Schwartz, L.B. (1990a):

Neutral proteases of mast cells.

In: Hanson, L.A.; Shakib, F. (eds): Monographs in Allergy.

Karger, Basel 27, 165

190. Schwartz, L.B.; Bradford, T.R.; Lee, D.C.; Chlebowski, J.F. (1990):

Immunologic and physiochemical evidence for conformational changes occurring on conversion of human mast cell tryptase from active tetramer to inactive monomer. Production of monoclonal antibodies recognizing active tryptase.

J Immunol 144, 2304-2311

191. Schwartz, L.B. (1993):

Heterogeneity of human mast cells.

In: Kaliner, M.A.; Metcalfe, D.D. (eds): The mast cells in health and disease.

Dekker, New York, 219-236

192. Schwartz, L.B. (1994):

Mast cells: function und contents.

Curr Op Immunol 6, 91-97

193. Schwartz, L.B.; Min, H.K.; Shunlin, R.; Xia, H.Z.; Hu, J.; Zhao, W.; Moxley, G.; Yoshihiro, F. (2003):

Tryptase precursors are preferentially and spontaneously released, whereas mature tryptase is retained by HMC-1-cells, mono-mac-6-cells, and human skin-derived mast cells.

J Immunol 170, 5667-5673

194. Sekizawa, K.; Caughey, G.; Lazarus, S.C.; Gold, W.M.; Nadel, J.A. (1989):

Mast cell tryptase causes airway smooth muscle hyperresponsiveness in dogs.

J Clin Invest 83, 175-179

195. Shiota, N.; Okunishi, H.; Fukamizu, A.; Sakonjo, H.; Kikumori, M.; Nishimura, T.; Nakagawa, T.; Murikami, K.; Miyazaki, M. (1993):

Activation of two angiotensin-generating systems in the balloon-injured artery.

FEBS Lett 323, 239-242

196. Shirakawa, T.; Li, A.; Dubowitz, M., Dekker, J.W.; Shaw, A.E.; Faux, J.A.; Ra, C.; Cookson, W.O.C.M.; Hopkin, J.M. (1994):

Association between atopy and variants of the β subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor.

Nature Genet 7, 125-130

197. Siffert, W.; Roszkopf, D.; Siffert, G.; Busch, S.; Moritz, A.; Erbel, R.; Sharma, A.M.; Ritz, E.; Wichmann, H.E.; Jakobs, K.H.; Horsthemke, B. (1998):

Association of a human G-protein $\beta 3$ subunit variant with hypertension.

Nat Genet 18, 45-48

198. SNP; geneID1215

199. Sommerhoff, C.P.; Chaughey, G.H.; Finkbeiner, W.E.; Lazarus, S.C.; Basbaum, C.B.; Nadel, J.A. (1989a):

Mast cell chymase: a potent secretagogue for airway gland serous cells.

J Immunol 142, 2450-2456

200. Sommerhoff, C.P. (1995):

Dog mast cell proteinases in models of airway secretion, bronchoconstriction, cutaneous vascular permeability, and tissue fibrosis.

In: Caughey, G.H. (eds): Mast Cell Proteases in Immunology and Biology.

Dekker, New York, 145-167

201. Stack, M.S.; Johnson, D.A. (1994):

Human mast cell tryptase activates single-chain urinary type plasminogen activator (pro-urokinase).

J Biol Chem 269, 9416-9419

202. Stanisz, A.M.; Scicchitano, R.; Dazin, P.; Bienenstock, J.; Payan, D.G. (1987):

Distribution of substance P receptors on murine spleen and Peyer's patch T and B Cells.

J Immunol 139, 749-754

203. Stanisz, A.M. (1994):

Neuroimmunomodulation in the gastrointestinal tract.

Ann NY Acad Sci 741, 64-72

204. Stead, R.H.; Bienenstock, J. (1990):

Cellular interactions between the immune and peripheral nervous system. A normal role for mast cells?

In: Burger, M.M.; Sordat, B.; Zinkernagel, R.M. (eds): Cell to cell interaction.

Karger, Basel, 170-187

205. Strom, S.S.; Yamamura, Y. (1997):

Epidemiology of nonmelanoma skin cancer.

Clin Plast Surg 24, 627-636

206. Tam, E.K.; Caughey, G.H. (1990):

Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase.

Am J Respir Cell Molec Biol 3, 27-32

207. Tam, E.K. (1995):

Mast cell neuropeptidases.

In: Caughey, G.H. (eds): Mast Cell Proteases in Immunology and Biology.

Dekker, New York, 71-107

208. Tanaka, K.; Sugiura, H.; Uehara, M.; Sato, H.; Hashimoto-Tamaoki, T.; Furuyama, J. (1999):

Association between mast cell chymase genotype and atopic eczema: comparison between patients with atopic eczema alone and those with atopic eczema and atopic respiratory disease.

Clin Exp Allergy 29, 800-803

209. Tesauro, M.; Thompson, W.C.; Rogliani, P.; Qi, L.; Chaudhary, P.P.; Moss, J. (2000):

Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298.

Proc Natl Acad Sci USA 97, 2832-2835

210. Thompson, H.L.; Schulman, E.S.; Metcalfe, D.D. (1988):

Identification of chondroitin sulfate E in human lung mast cells.

J Immunol 140, 2708-2713

211. Toacuteth, T. ; Toacuteth-Jakatics, R. ; Jimi, S.; Takebayashi, S.; Kawamoto, N. (2006) :

Cutaneous malignant melanoma : Correlation between neovascularization and peritumor accumulation of mast cells over expressing vascular endothelial growth factor.

Hum Pathol 31, 955-960

212. Toruniowa, B.; Jablonska, S. (1988):

Mast cells in the initial stages of psoriasis.

Arch Dermatol Res 280, 189-193

213. Töyry, S.; Fräki, J.E.; Tammi, R. (1988):

Mast cell density in psoriatic skin. The effect of PUVA and corticosteroid therapy.

Arch Dermatol Res 280, 282-285

214. Urata, H.; Kinoshita, A.; Misono, K.S.; Bumpus, F.M.; Husain, A. (1990):

Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart.

J Biol Chem 265, 22348-22357

215. Urata, U.; Kinoshita, A.; Perez, D.M.; Misono, K.S.; Bumpus, F.M.; Graham, R.M.; Husain, A. (1991):

Cloning of the gene and cDNA for human heart chymase.

J Biol Chem 266, 17173-17179

216. Urata, H.; Boehm, K.D.; Philip, A.; Kinishita, A.; Gabrovsek, J.; Bumpus, F.M.; Husain, A. (1993):

Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart.

J Clin Invest 91, 1269-1281

217. Valent, P.; Spanblochl, E.; Sperr, W.R.; Sillaber, C.; Zsebo, K.M.; Agis, H.; Strobl, H.; Geissler, K.; Bettelheim, P.; Lechner, K. (1992):

Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/c-kit ligand in long term culture.

Blood 80, 2237-2245

218. Vanderslice, P.; Ballinger, S.M.; Tam, E.K.; Goldstein, S.M.; Craik, C.S.; Caughey, G.H. (1990):

Human mast cell tryptase: multiple cDNAs and genes reveal a multigene serine protease family.

Proc Natl Acad Sci USA 87, 3811

219. Van't Hooft, F.M.; von Bahr, S.J.; Silveira, A.; Iliadou, A.; Erikson, P.; Hamsten, A. (1999):

Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 19, 3063-3070

220. Wagner, F.; Fink, R.; Hart, R.; Dancygier, H. (1987):

Substance p enhances γ -interferon production by human peripheral blood mononuclear cells.

Regul Pept 19, 355-358

221. Walls, A.F. (1998):

Mast Cell Proteases in Asthma.

In: Holgate, S.T.; Busse, W.W. (eds): Inflammatory mechanisms in asthma.

Dekker, New York, 89-110

222. Weidinger, S.; Rümmler, L.; Klopp, N.; Wagenpfeil, S.; Baurecht, H.J.; Fischer, G.; Holle, R.; Gauger, A.; Schäfer, T.; Jakob, T.; Ollert, M.; Behrendt, H.; Wichmann, H.E.; Ring, J.; Illig, T. (2005):

Association study of mast cell chymase polymorphisms with atopy.

Allergy 60, 1256-1261

223. Welle, M. (1997):

Development, significance and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast-cell specific proteases chymase and tryptase.

J Leuc Biol 61, 233-245

224. Whiteman, D.C.; Whiteman, C.A.; Green, A.C. (2001):

Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies.

Cancer Causes Control 12, 69-82

225. Wiebold, J.L.; Stanfield, P.H.; Becker, W.C.; Hillers, J.K. (1986):

The effect of restraint stress in early pregnant mice.

J Reprod Fertil 78, 185-192

226. Wilkinson, D.I.; Theeuwes, M.I.; Farber, E.M. (1994):

Nerve growth factor increases the mitogenicity of certain growth factors for cultured human keratinocytes: a comparison with epidermal growth factor.

Exper Dermatol 3, 239-245

227. Wood, C.; Sina, B.; Webster, C.G.; Kurgansky, D.; Drachenberg, C.B.; Reedy, E.A. (1992):

Fibrous mastocytoma in a patient with generalized cutaneous mastocytosis.

J Cutan Pathol 19, 128-133

228. Wyatt, S.; Shoeter, E.M.; Davies, A.M. (1990):

Expression of the NGF receptor gene in sensory neurons and their cutaneous targets prior to and during innervation.

Neuron 2, 421-427

229. Yong, L.C. (1997):

The mast cell: origin, morphology, distribution and function.

Exp Toxic Pathol 49, 409-424

230. Young, R.P.; Sharp, P.A.; Lynch, J.R.; Faux, J.A.; Lathrop, G.M.; Cookson, W.O.C.M.; Hopkin, J.M. (1992):

Confirmation of genetic linkage between atopic IgE responses and chromosome 11q13.

J Med Genet 29, 234-238

231. Zhang, W.; Stoica, G.; Tasca, S.I.; Kelly, K.A.; Meininger, C.J. (2000):

Modulation of tumor angiogenesis by stem cell factor.

Cancer Res 60, 6757-6762

232. Zee, R.Y.; Rao, V.S.; Paster, R.Z.; Sweet, C.S.; Lindpainter, K. (1998):

Three candidate genes and angiotensin-converting enzyme inhibitor-related chough: a pharmacogenetic analysis.

Hypertension 31, 925-928

8. Abkürzungsverzeichnis

A:	Adenosin
ABI:	Applied Biosystems
ACE:	Angiotensin Converting Enzyme=Angiotensin Konversionsenzym
AGTR1:	Angiotensin II type 1 receptor
Arg:	Arginin
BFGF:	Basic Fibroblast Growth Factor = basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
CD:	Cluster of differentiation = Differenzierungsgrad
CGRP:	Calcitonin gene-Related Polypeptid
CIN :	Zervicale intraepitheliale Neoplasie
CMA1:	Chymase Gen
CTSG:	Cathepsin G Gen
CTSG2:	Granzyme H Gen
CYP11B2:	Mineralocorticoid receptor aldosterone synthase
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
ELAM-1 :	Endotheliales Leukozytenadhäsionsprotein
FAM:	Reporterfarbstoff 6-Carboxyfluoreszin
G:	Guanin
GM-CSF:	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GZMB:	Granzyme B Gen
HCG:	Humanes Choriongonadotropin
His:	Histidin
IACM:	Induzierbare Zelladhensionsmolekül
IF:	Interferon
IG:	Immunglobulin
IL:	Interleukin
IVS:	Intervenierende Sequenzen
LAK-cells:	Lymphokine-activated Killer (LAK)-type Cells
MC:	Mastzellen
MC_T:	Tryptase positive Mastzellen
MC_{TC}:	Tryptase und Chymase positive Mastzellen

MIP:	Macrophage Inflammatory Protein = Makrophagen Entzündungsprotein
mRNA:	Messenger-Ribonukleinsäure
NGF:	Nerve Growth Factor = Nervenwachstumsfaktor
NK-Zellen:	Natürliche Killerzellen
NTC:	Negativkontrollen
OD:	Optische Dichte
OR:	Odds Ratio
PCR:	Polymerasekettenreaktion
PG:	Prostaglandin
PTCH:	Human homolog of Drosophila Patched gene
Q:	Quencherfarbstoff
R:	Reporterfarbstoff
RBC:	Rote Blutkörperchen
SCF:	Stem cell factor = Stamm Zellen Faktor
SNP:	Single Nucleotide Polymorphism =Einzelbasenpolymorphismus
SP:	Substanz P
TAMRA:	Quencherfarbstoff 6-Carboxytetramethylrhodamin
TGF:	Tumor Growth Factor = Tumorwachstumsfaktor
Th:	T-Helferzellen
TNF:	Tumor Nekrose Faktor
UCA:	Urocanic acid
UV:	Ultraviolett
VIP:	Vasoaktives intestinales Polypeptid

9. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

	Seite
1. Einleitung	
Tabelle 1: Überblick über die Mediatoren der Mastzellen	6
Tabelle 2: SNPs im codierenden Bereich des Chymase Gens	16
Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Mastzelle	5
Abbildung 2: Gruppe der humanen serinen Proteasen auf dem Chromosom 14q11.1-11.2	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung des humanen Chymase Gens	14
Abbildung 4: Schema zum möglichen Einfluss eines Genpolymorphismus auf Quantität und Qualität des Genproduktes	15
3. Material und Methoden	
Tabelle 3: Nukleotidsequenzen der Primer für TaqMan Assay	28
Tabelle 4: Nukleotidsequenzen der Sonden für TaqMan Assay	28
Tabelle 5: Bestandteile des Reaktionsmixes für TaqMan Assay	28
Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für real time TaqMan PCR	29
Tabelle 7: Nukleotidsequenzen der Primer für konventionelle PCR	30
Tabelle 8: Bestandteile des Reaktionsmixes für konventionelle PCR	30
Tabelle 9: Reaktionsbedingungen für konventionelle PCR	30
Tabelle 10: Nukleotidsequenzen, die von dem Restriktionsenzym BclI geschnitten werden	31
Abbildung 5: Prinzip des TaqMan-Verfahrens	27

4. Ergebnisse

Tabelle 11:	Geschlechtsverteilung	35
Tabelle 12:	Vorkommen der einzelnen Erkrankungen in %	37
Tabelle 13:	Verteilung der Atopiker an den Genotyp Gruppen	39
Tabelle 14:	Gruppe der neoplastischen Erkrankungen	40
Tabelle 15:	Verteilung der Patienten mit Neoplasien an den Genotyp Gruppen	41
Tabelle 16:	Verteilung der Patienten mit Psoriasis vulgaris an den Genotyp Gruppen	42
Tabelle 17:	Verteilung der Patienten mit Psoriasis inversa/arthropatica an den Genotyp Gruppen	43
Tabelle 18:	Verteilung der Patienten mit Psoriasis palmoplantaris an den Genotyp Gruppen	44
Tabelle 19:	Verteilung der Patienten mit Psoriasis pustulosa an den Genotyp Gruppen	45
Tabelle 20:	Verteilung der Patienten mit Psoriasis pustulosapalmoplantaris an den Genotyp Gruppen	46
Tabelle 21:	Ergebnisse der statistischen Auswertung	48
Tabelle 22:	Zusammenfassung aller Daten des telefonischen Interviews	49
Abbildung 6:	Darstellung der Auswertung eines der Durchläufe der real time TaqMan PCR	33
Abbildung 7:	Eingescanntes Bild der Gelelektrophorese	34
Abbildung 8:	Geschlechtsverteilung	35
Abbildung 9:	Mittelalterverteilung	36
Abbildung 10:	Übersicht über die Häufigkeiten der einzelnen Erkrankungen	38
Abbildung 11:	Übersicht über die Häufigkeiten der einzelnen Erkrankungen	38
Abbildung 12:	Darstellung des Anteils der Atopiker unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und A/G	40
Abbildung 13:	Darstellung des Anteils der Patienten mit Neoplasien unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und A/G	41

Abbildung 14:	Darstellung des Anteils der Patienten mit Psoriasis vulgaris unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und A/G	43
Abbildung 15:	Darstellung des Anteils der Patienten mit Psoriasis inversa/arthropatica unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und A/G	44
Abbildung 16:	Darstellung des Anteils der Patienten mit Psoriasis palmoplantaris unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und A/G	45
Abbildung 17:	Darstellung des Anteils der Patienten mit Psoriasis pustulosa unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und A/G	46
Abbildung 18:	Darstellung des Anteils der Patienten mit Psoriasis pustulosapalmoplantaris unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und Genotyp A/G	47
Abbildung 19:	Darstellung des Anteils der Patienten mit Psoriasis vulgaris und Psoriasis pustulosapalmoplantaris unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und Genotyp A/G	47
Abbildung 20:	Gegenüberstellung von Patientenanteilen der verschiedenen Psoriasisformen unter den Patienten mit dem Genotyp A/A und A/G	48
Abbildung 21:	Verteilung der Abort- und Totgeburt-Häufigkeiten unter den Patienten mit heterozygotem Genotyp A/G	50

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München für ihre tatkräftige und freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken.

Besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. M. Ollert als Doktorvater für die Einführung in die Thematik, für Ratschläge und die abschließende Korrektur. Außerdem danke ich Herrn Dr. med. S. Weidinger, der mit der Betreuung beauftragt war. Für fachkundigen Rat in technischen Fragen danke ich vor allem Frau B. Heuser (MTA).

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und vor allem meiner Schwester.

11. Ehrenwort

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Mutation des Chymase Gens im aktiven Zentrum und ihre Beziehung zu dermatologischen Erkrankungen

in der Klinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. J. Ring ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe an keiner in- und ausländischen medizinischen Fakultät bzw. an keinem Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

München, den

Julia Ellert