Zum Mechanismus einer gentoxischen Wirkung des 1,3-Butadien-Metaboliten 1,2:3,4-Diepoxybutan auf das Nierengewebe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Dem Fachbereich Chemie
der Universität Dortmund

vorgelegt von

Evert Harald Delbanco
aus Jever

Dortmund
2000

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. B. Lippert

ALII NULLUM NOXIUM ALII ACRE VENENUM

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG		1
	1.1.	Nierenkrebs als Folge berufsbedingter Exposition in der chemischen Industrie	1
	1.2.	Metabolische Grundlagen der Kanzerogenese von 1,3-Butadien	4
	1.3.	Aufgabenstellung	10
2.	MATERIAL		11
	2.1.	Cytosole und Mikrosomen	11
	2.1.1.	Humane Proben	11
	2.1.2.	Tierische Proben	12
	2.2.	Bakterien	12
	2.3.	Enzyme und Antikörper	13
	2.4.	Chemikalien	13
	2.5.	Puffer, Lösungen und Nährmedien	16
	2.6.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
3.	METHODEN		23
	3.1.	Herstellung von Cytosol und Mikrosomen	23
	3.1.1.	Cytosol- und Mikrosomenherstellung aus humanem Nierengewebe	23
	3.1.2.	Herstellung von Bakteriencytosol	23
	3.2.	Aufreinigung der rekombinanten rGSTT1-1 aus Bakteriencytosol	24
	3.2.1.	Dialyse	24
	3.2.2.	Affinitätschromatographie	24
	3.2.3.	Messung der Enzymaktivität gegenüber EPNP	25
	3.2.4.	Prüfung auf DNase	26
	3.2.5.	Aufkonzentrieren des Enzyms	26
	3.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration	27
	3.4.	DNA-Aufarbeitung	27
	3.4.1.	DNA-Isolierung aus humanem Nierengewebe	27
	3.4.2.	Bestimmung der DNA-Konzentration	28
	3.5.	Untersuchungen zum Auftreten von CYP2E1 in humanem Nierengewebe	28
	3.5.1.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
	3.5.2.	Western Blot	29

3.5.3.	Immunodetektion	30
3.6.	Genotypisierungen von polymorphen GSTs in humanem Nierengewebe mittels PCR	31
3.6.1.	GSTM1-Genotypisierung	31
3.6.2.	GSTM3-Genotypisierung	33
3.6.3.	GSTP1-Genotypisierung	35
3.6.3.1.	Polymorphismus in Codon 105	35
3.6.3.2.	Polymorphismus in Codon 114	37
3.6.4.	GSTT1-Genotypisierung	39
3.7.	Messung von spezifischen GST-Aktivitäten in Nierencytosolen	40
3.7.1.	Bestimmung der GST α-Klasse-Aktivität gegenüber 7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol	41
3.7.2.	Bestimmung der GST μ-Klasse-Aktivität gegenüber 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol	42
3.7.3.	Bestimmung der GSTP1-1-Aktivität	42
3.7.3.1.	Substrat Ethacrynsäure	42
3.7.3.2.	Substrat 4-Vinylpyridin	43
3.7.4.	Bestimmung der GSTT1-1-Aktivität gegenüber Methylchlorid	43
3.7.5.	Bestimmung der GST-Aktivität gegenüber 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	45
3.8.	Massenspektroskopie (ESI-MS^n)	45
3.8.1.	Inkubationen	45
3.8.2.	Direktinfusion	46
3.8.3.	Gekoppelte Flüssigchromatographie-Massespektroskopie (μLC-MS)	47
3.9.	^{13}C-NMR-Spektroskopie	48
3.9.1.	Inkubationen	48
3.9.2.	Proteinfällung und Lyophilisation	48
3.9.3.	Meßbedingungen	48
3.10.	Phosphorimaging	49
3.10.1.	^{32}P-Markierung	49
3.10.2.	Inkubationen	49
3.10.3.	Isolierung der Oligonukleotide	50
3.10.4.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
3.10.5.	Detektion der radioaktiv markierten Banden	51
4.	ERGEBNISSE	52
4.1.	CYP2E1 im Nierengewebe des Menschen	52

4.2. Genotypisierung von polymorphen GST-Isoenzymen im Nierengewebe des Menschen 53
4.2.1. GSTM1 53
4.2.2. GSTM3 54
4.2.3. GSTP1 54
4.2.4. GSTT1 55
4.2.5. Zusammenfassung der Genotypisierungen 56
4.3. Expression von GST-Isoenzymen im menschlichen Nierengewebe (gesundes Gewebe und Tumorgewebe) 57
4.3.1. GST α-Klasse-Aktivität gegenüber 7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol 57
4.3.2. GST μ-Klasse-Aktivität gegenüber 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol 58
4.3.3. GSTP1-1-Aktivität 59
4.3.3.1. Substrat Ethacrynsäure 59
4.3.3.2. Substrat 4-Vinylpyridin 60
4.3.4. GSTT1-1-Aktivität gegenüber Methylchlorid 61
4.3.5. GST-Gesamtaktivität gegenüber 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol 63
4.3.6. Zusammenfassung der Aktivitätsmessungen 64
4.4. Aufreinigung der rekombinant exprimierten rGSTT1-1 65
4.5. Durchführung von in vitro Untersuchungen mit 1,2:3,4-Di-epoxybutan 68
4.5.1. Reaktion von 1,2:3,4-Diepoxybutan mit Glutathion 68
4.5.2. Reaktion von 1,2:3,4-Diepoxybutan mit Glutathion und 2'-Deoxyguanosin 77
4.5.3. Reaktion von ^{32}P-markierten Oligonukleotiden mit Glutathion 84

5. DISKUSSION 86
5.1. Bildung von 1,2:3,4-Diepoxybutan als Metabolit von 1,3-Butadien 86
5.2. GST-Isoenzyme in der Niere des Menschen 87
5.3. Veränderung der GST-Expression in Nierenzellkarzinomgewebe 89
5.4. Wirkung von 1,2:3,4-Diepoxybutan als potentiellem Nierenkanzerogen 91
5.5. DNA-Reaktivität von Glutathion 94

6. ZUSAMMENFASSUNG 96

7. LITERATURVERZEICHNIS 99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AGE	Agarose-Gelelektrophorese
ala	Alanin
arb. units	willkürliche Einheiten (arbitrary units)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5‘-triphosphat
AU	Absorptionseinheiten
BCA	Bicinchoninsäure
BD	1,3-Butadien
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
C	Cytosin
c_{abs}	Konzentration eines absorbierenden Stoffes
c_{Prot}	Proteinkonzentration
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
CYP	Cytochrom P450
d	Küvettenschichtdicke
δ	chemische Verschiebung
dATP	Deoxyadenosin-5‘-triphosphat
DCNB	1,2-Dichlor-4-nitrobenzol
dCTP	Deoxycytosin-5‘-phosphat
ddH_2O	doppelt-deionisiertes Wasser
DEB	1,2:3,4-Diepoxybutan
DEPT	Verdrehungserhöhung durch Polarisationstransfer (Distortions Enhancement by Polarization Transfer)
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
dGuo	2‘-Deoxyguanosin
dGTP	Deoxyguanosin-5‘-triphosphat

DMPS	Dimethylpolysiloxan
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleosid-5‘-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Deoxythymidin-5‘-triphosphat
ε	molarer Absorptionskoeffizient
EA	Ethacrynsäure
EB	1,2-Epoxy-3-buten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EH	Epoxidhydrolase
EPNP	1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propan
ESI	Elektrospray-Ionisation
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Erdbeschleunigung (9,81 ms^{-2})
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
GSH	Glutathion
GST	Glutathiontransferase
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
IARC	International Agency for Research on Cancer
Ig	Immunglobulin
IISRP	International Institute of Synthetic Rubber Producers
ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Geschwindigkeitskonstante
Kap.	Kapitel
LC	Flüssigchromatographie
LD_{50}	letale Dosis
m	Masse
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MC	Methylchlorid

MS	Massenspektroskopie
MWCO	Molekulargewichtsausschlußgrenze (Molecular Weight Cut Off)
NBD-Cl	7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NMR	magnetische Kernresonanz
NTP	National Toxicology Program
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBPK-Modell	auf physiologischen Daten basierendes pharmakokinetisches Modell (Physiologically Based Pharmacokinetic Model)
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
SCE	Schwester-Chromatid-Austausch
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	Einzelionenmonitoring
T	Temperatur, Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Triborsäure-EDTA
TEMED	N, N, N‘, N‘-Tetramethylethylendiamin
TEOA	Triethanolamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP	3-(Trimethylsilyl)-propionsäure-2,2,3,3-d_4 Natriumsalz
UV	ultraviolett
val	Valin
VP	4-Vinylpyridin
z	Ladung

1. EINLEITUNG

1.1. Nierenkrebs als Folge berufsbedingter Exposition in der chemischen Industrie

Krebserkrankungen sind in den Industrienationen neben kardiovaskulären Krankheiten die häufigste Todesursache. Aufgrund epidemiologischer Befunde wird geschätzt, daß bei der Entstehung von über 70 % der Krebserkrankungen beim Menschen exogene Faktoren verantwortlich sind. Unter diesen sind chemische Risikofaktoren vermutlich die bedeutsamsten (Doll und Peto 1981). Nierenkrebs tritt bezogen auf alle Krebserkrankungen mit einer Häufigkeit von ca. 3 % auf (Brenner und Rector 1991). In Deutschland zählt diese Krebsform bei Männern zu den zehn häufigsten Krebstodesursachen (Becker und Wahrendorf 1998).

Die Nieren sind das zentrale Organ für die lebensnotwendige Kontrolle der Körperflüssigkeiten im Organismus. Sie sorgen für eine konstante Zusammensetzung und ein gleichbleibendes Volumen der extrazellulären Flüssigkeit (Interstitium und Blutplasma) und garantieren somit für möglichst optimale Funktionsbedingungen aller Zellen im Körper (Schmidt und Thews 2000).
Die morphologische und funktionelle Einheit der humanen Niere ist das Nephron, bestehend aus Glomerulus (Nierenkörperchen), Tubulus (Nierenkanälchen) und Sammelrohr. Die Glomeruli befinden sich ausschließlich in der Nierenrinde. Im Gegensatz dazu reichen die Tubuli bis ins Mark. Ein Tubulus gliedert sich in einen von der Rinde ins äußere Mark verlaufenden proximalen Tubulus, der Henle-Schleife, die vom äußeren ins innere Mark reicht sowie einen dicken aufsteigenden Teil zurück ins äußere Mark besitzt, und dem sich anschließenden distalen Tubulus in der Rinde. Mehrere Tubuli münden in ein gemeinsames Sammelrohr, das in das Nierenbecken führt. Von dem in die Niere gelangenden Blutstrom (ca. 1 l/min) wird etwa 20 % durch glomeruläre Filtration abgesondert. Dieser sogenannte Primärharn gelangt in die einzelnen Tubuliabschnitte, wo durch empfindlich regulierte aktive und passive Transport- und Sekretionsvorgänge

98–99 % so rückresorbiert werden, daß lebenswichtige Stoffe bzw. Wasser konserviert und überflüssige Stoffe mit dem Endharn über die Sammelrohre, das Nierenbecken und den Harnleiter in die Harnblase gelangen (Forth et al. 1996).

Die hohe Exkretionsleistung der Niere setzt eine überdurchschnittlich starke Durchblutung voraus, was zu ständiger Belastung mit exogenen Noxen führen kann. Die toxische Wirkung eines Stoffes kann direkt oder indirekt nach extrarenaler bzw. intrarenaler Bioaktivierung erfolgen. Die daraus resultierenden Nierenschäden, die mit unterschiedlichen Funktionsbeeinträchtigungen bzw. Krankheitsbildern einhergehen, können sich reversibel oder irreversibel von akuter bis chronischer Weise manifestieren.

Die Entstehung eines Nierentumors vollzieht sich nach dem sogenannten Mehrstufenmodell der Kanzerogenese, das eine zentrale Rolle für das Verständnis der Krebsentstehung durch Chemikalien spielt, in drei Phasen (Pitot 1981, Shields und Harris 1991, Barrett 1993).
Nach diesem theoretischen Modell entstehen in einer ersten Initiations-Phase nach bereits einmaliger Einwirkung eines gentoxischen Stoffes initiierte Zellen (Tumorvorläuferzellen), die sich zunächst nicht oder nur wenig von normalen Körperzellen unterscheiden. Hierbei führt die Wechselwirkung des kanzerogenen Agens mit der DNA zur Bildung von DNA-Addukten oder im Falle großer und planarer Initiatoren zu Interkalationen. Die Folge sind somatische Mutationen, die nach wenigstens einer Zellteilung als irreversible Schäden erhalten bleiben.
Die anschließende Promotions-Phase ist durch clonale Expansion dieser Tumorvorläuferzellen gekennzeichnet, welche unter dem Einfluß von Promotoren stark beschleunigt ablaufen kann. Die Vermehrung der initiierten Zellen wird durch epigenetische Faktoren, wie eine erhöhte Mitoserate in Verbindung mit der Unterdrückung von Apoptose, verursacht. In dem Zusammenhang der Fehlsteuerung zellulärer Funktionen ist die Aktivierung von Protoonkogenen bzw. der Ausfall von Tumorsuppressorgenen von Bedeutung (Caporaso und Goldstein 1995). Die Tumorpromotion ist ein langandauernder Vorgang, der bei niedrigen Dosen oder kurzer Einwirkzeit reversibel ist.
In der letzten Phase des Mehrstufenmodells, der Progressions-Phase, findet der Übergang vom benignen zum malignen Tumor statt. Charakteristisch für diese Phase der

Kanzerogenese ist die zunehmende Instabilität des Genoms. Die Progression verläuft ebenso wie die Initiation irreversibel.

Aufgrund des differenziert aufgebauten Parenchyms der Niere werden Nierenzellkarzinome in vier cytomorphologisch definierte Subtypen eingeteilt (Thoenes et al. 1990). Am häufigsten (ca. 82 %) ist das klarzellige Nierenkarzinom mit Lokalisation im proximalen Tubulus gefolgt von dem chromophil-zelligen (ca. 12 %), das im Übergangsbereich von proximalem Tubulus und Henle-Schleife auftritt. Eher selten sind die chromophob-zelligen Nierenkarzinome (2-5 %) im Verbindungsstück zwischen distalem Tubulus und Sammelrohr (Thoenes et al. 1988) sowie Ductus Bellini-Karzinome (ca. 1%) im Sammelrohr und Nierenbecken (Hai und Diaz-Peres 1982, Fleming und Lewi 1986).

Die Senatskommission der DFG zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Komission) hat die Industriechemikalie Trichlorethen 1996 in die Gruppe A1 (heute Kategorie 1) des Abschnittes III der MAK-Liste als „erwiesenermaßen für den Menschen kanzerogen“ eingestuft (DFG 1996). Die Substanz zeigte in epidemiologischen Studien stark erhöhte Nierenzellkarzinom-Inzidenz (Henschler et al. 1995, Vamvakas et al. 1998). Als weitere mögliche Stoffe mit nephrokanzerogenem Potential gelten die chlorierten Kohlenwasserstoffe Tetrachlorethen (Ulm et al. 1996, DFG 1997) und 1,1,2,3,4,4-Hexachlor-1,3-butadien (Jaffe et al. 1983, DFG 1983, IARC 1999). Die Einstufung dieser Chemikalien erfolgte vorläufig in die Kategorie 3 des Abschnittes III der MAK-Liste, die sogenannte Verdachtsgruppe.
Seit der Publikation der Ergebnisse einer epidemiologischen Fall-Kontroll-Studie von Divine und Hartmann (1996), bei der die Standardmortalitätsrate bezüglich Nierenkrebs für mindestens 6 Monate in der 1,3-Butadien (BD)-Herstellung tätigen Arbeiter um 80 % erhöht war, besteht der begründete Verdacht für eine nephrokanzerogene Wirkung von BD. Bisher stand diese Substanz insbesondere mit erhöhtem Auftreten von Lymphosarkomen (Ward et al. 1995) und Leukämien (Delzell et al. 1996) in Verbindung und wurde somit in die Kategorie 1 des Abschnittes III der MAK-Liste als „erwiesenermaßen für den Menschen kanzerogen“ eingestuft (DFG 1998).

Verbesserte Kenntnisse zum Verständnis der experimentellen Nierenkanzerogenese, die im Vergleich zur experimentellen Leber- und Lungenkanzerogenese (Wogan 2000, Sozzi und Carney 1998) weit weniger erforscht wurde, sind für eine erfolgreiche Prävention in der arbeitsmedizinischen Praxis unverzichtbar.

1.2. Metabolische Grundlagen der Kanzerogenese von 1,3-Butadien

BD ist ein gasförmiger Arbeitsstoff, der zum überwiegenden Teil als Ausgangssubstanz für die Herstellung einer Vielzahl synthetischer Polymere in der Kunststoffindustrie von großer Bedeutung ist. Beispiele hierfür sind insbesondere Polybutadien (BR) zur Reifenherstellung sowie Styrol-Butadien (SB) Latex, Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS) oder Chloropren (CR). Mit einem innerhalb der letzten 5 Jahre weltweit um ca. 20 % auf heute 7,5 Millionen Tonnen angestiegenem Jahresproduktionsvolumen gehört BD zu den am meisten produzierten organischen Stoffen überhaupt (Himmelstein et al. 1997, Kligerman et al. 1999).
Aufgrund des hohen Produktionsvolumens und des vielfältigen Einsatzes ist BD eine ubiquitär vorkommende Substanz. Sie befindet sich auch in Autoabgasen und Zigarettenrauch (Pelz et al. 1990, Brunnemann et al. 1990).

Nach akuter Exposition von BD wurden beim Menschen Irritationen an Augen , Haut und Respirationstrakt beobachtet (Wilson 1944). Die LD_{50} beträgt nach inhalativer Exposition über 2 h bei Mäusen bzw. 4 h bei Ratten 122000 bzw. 129000 ppm (Shugaev 1969).
In den USA wurden chronische Inhalationsstudien an Mäusen als Teil des NTP und an Ratten von dem IISRP durchgeführt. Eine erste Studie an Mäusen, die gegenüber 625 und 1250 ppm BD exponiert waren, mußte aufgrund von überhöhten Krebsmortalitäten nach etwa der Hälte der ursprünglich angesetzten Zeit vorzeitig abgebrochen werden (Huff et al. 1985). In einer zweiten Studie (NTP 1993) war die unterste Dosisgruppe um den Faktor 100 geringer exponiert. Im Vergleich zu der chronischen Inhalationsstudie bei 1000 und 8000 ppm BD an Ratten (Owen et al. 1987) war die Tumorinzidenz höher und das sich ergebende Tumorspektrum breiter.

Insbesondere nach Bekanntwerden der kanzerogenen Wirkung von BD im Tierversuch wurden intensive toxikologische und biochemische Untersuchungen zum Metabolismus bzw. dem der Kanzerogenität zugrundeliegenden Mechanismen durchgeführt.
In Abb. 1 sind die Hauptschritte des sehr komplexen Metabolismus von BD dargestellt, innerhalb dessen einige DNA-reaktive, intermediäre Epoxide gebildet werden.

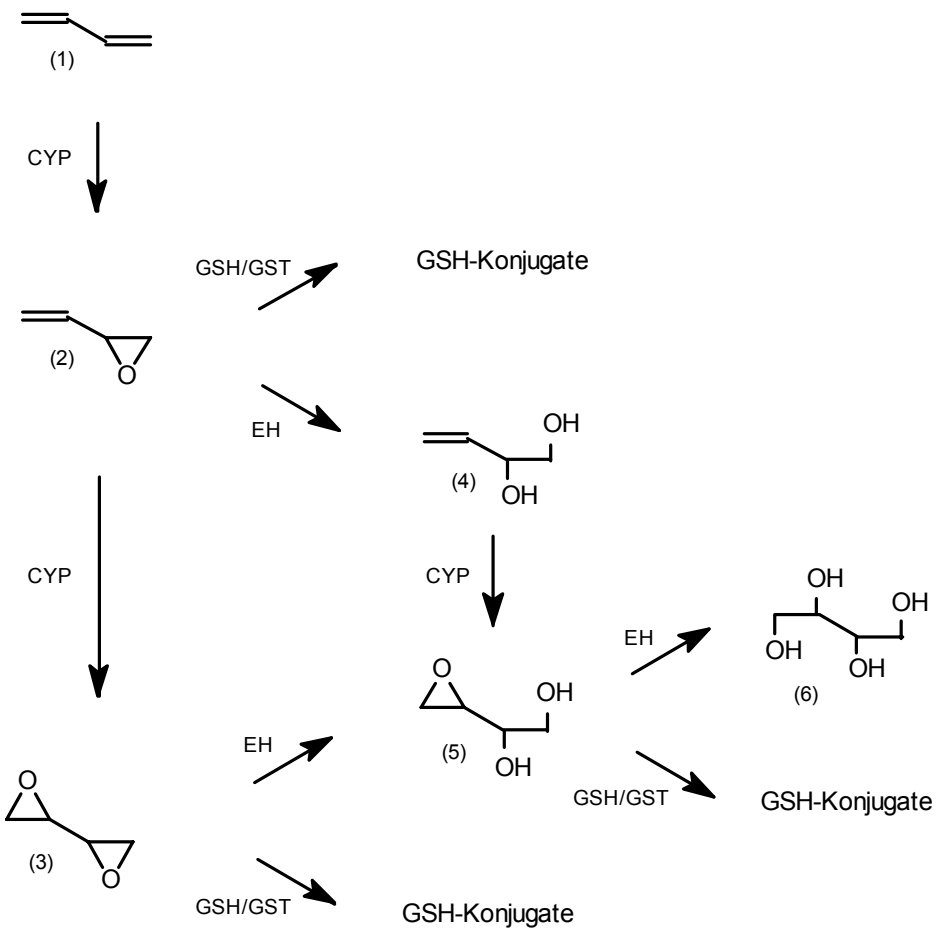

Abb. 1: Metabolismus von 1,3-Butadien (Adler et al. 1995, Henderson et al. 1996)

Zunächst wird BD (1) durch mikrosomale Cytochrom P450 (CYP)-Enzyme zu 1,2-Epoxy-3-buten (EB) (2) und dann weiter zu 1,2:3,4-Diepoxybutan (DEB) (3) oxidiert. Die so gebildeten Epoxide werden entweder Glutathiontransferasen (GST)-katalysiert zu Glutathion (GSH)-Konjugaten weiterverstoffwechselt oder durch Epoxidhydrolasen (EH)

zu 1,2-Dihydroxy-3-buten (4), 1,2-Dihydroxy-3,4-epoxybutan (5) oder Erythritol (6) hydrolysiert.

Die Bioaktivierung zu den DNA-reaktiven Epoxiden erfolgt überwiegend durch das Isoenzym CYP2E1 (Csanady et al. 1992, Duescher und Elfarra 1994, Seaton et al. 1995). Über das Vorkommen dieses polymorph exprimierten Enzyms (Carriere et al. 1996, Fairbrother et al. 1998) in der humanen Niere existieren widerspüchliche Angaben in der Literatur. Während Amet et al. (1997) über fehlende Expression berichteten, gelang es Vieira et al. (1998), auf RNA-Ebene geringe, um 34-fach niedrigere Mengen als in der Leber zu detektieren.

Die Alkylierung der Basen Guanin und Adenin durch EB und DEB (Bolt und Jelitto 1996a, Kambouris et al. 1996, Tretyakova et al. 1998) kann zu Basenpaarsubstitutionen führen. Als bifunktionelles Agens ist DEB darüber hinaus zur Bildung von DNA-DNA interstrand cross-links und DNA-Protein cross-links befähigt, was frameshift-Mutationen zur Folge haben kann (Lawley und Brookes 1967, Vangala et al. 1993). Neben dem Nachweis der gebildeten Addukte konnte die Gentoxizität der beiden Epoxide auch mit Hilfe von Mutagenitätstests, wie Ames-Test oder Mikrokerntest (Thier et al. 1995, Lähdetie et al. 1997), und Indikatortests, wie Comet-Assay, UDS (Unscheduled DNA Synthesis)-Test, SCE-Test oder Chromosomenaberrations (CA)-Test (Anderson et al. 1997, Sasiadek et al. 1991, Kligerman et al. 1999), nachgewiesen werden. Bei den durchgeführten Untersuchungen ergab sich für DEB eine höhere Gentoxizität als für EB. Vergleichsweise gering ist die Mutagenität von 1,2-Dihydroxy-3,4-epoxybutan (Cochrane und Skopek 1994). Darüber hinaus konnte die Bildung dieses Metaboliten sowohl nach BD- als auch nach EB-Exposition von Ratten in deren Blut nicht nachgewiesen werden (Malvoisin und Rubberfroid 1982). Die Bestimmung der EB- und DEB-Blutspiegel nach BD-Exposition ergab bei Mäusen deutlich höhere Werte als bei Ratten (Thornton-Manning et al. 1995), was auf eine speziesspezifische Toxikokinetik zurückzuführen ist.

Erkenntnisse hinsichtlich der bevorzugten Bildung oder weiteren Metabolisierung jeweils möglicher Epoxid-Stereoisomere innerhalb einer Spezies oder eines Gewebetyps liegen bisher genauso wenig vor wie bezüglich unterschiedlicher Toxizitäten.

Alternativ zur DNA-Adduktbildung können die elektrophilen Epoxide über zwei Wege enzymatisch weiterverstoffwechselt werden. Eine Möglichkeit ist die durch EH katalysierte Hydrolyse zu nicht gentoxischen Alkoholen. Die beim Menschen polymorph exprimierte mikrosomale mEH ist metabolisch von größerer Bedeutung als die cytosolische cEH (Hassett et al. 1994). Nach Untersuchungen von Mc Kay et al. (1995) ist die enzymatische Aktivität der mEH in der Niere relativ hoch. Darüber hinaus können die Epoxide durch GST-katalysierte Konjugation mit GSH metabolisiert werden.

GSTs sind vor allem im Cytosol lokalisiert, obwohl auch mikrosomale und mitochrondriale Formen beschrieben wurden (Lee und de Jong 1999, Pemble et al. 1996). Die cytosolischen GSTs werden nach ihrer Sequenzhomologie in die Klassen α, μ, π und θ eingeteilt (Mannervik et al. 1985, Meyer et al. 1991). Die Identität der Aminosäure-seqenzen zwischen zwei Vertretern einer Klasse ist typischerweise > 70 % verglichen mit < 30 % zwischen zwei Klassen (Wilce et al. 1995). Die biologische Kontrolle der verschiedenen GSTs ist kompliziert. Sie werden alters-, geschlechts-, spezies- und gewebespezifisch exprimiert. Zudem bestehen Unterschiede zwischen der Aktivität in normalem Gewebe und Tumorgewebe. Daneben werden GSTs durch eine Reihe von strukturell verschiedenartigen Fremdstoffen reguliert. Es wurden bereits zahlreiche Chemikalien identifiziert, die GSTs induzieren oder inhibieren (Hayes und Pulford 1995). Beim Menschen bestehen zusätzlich interindividuelle Unterschiede in der Expression einiger GSTs. Polymorphismen wurden für GSTM1 (Seidegard et al. 1988, Fryer et al. 1993), GSTM3 (Inskip et al. 1995), GSTP1 (Board et al. 1989), GSTT1 (Pemble et al. 1994) und GSTT2 (Board et al. 1998) gefunden. In der humanen Niere ist von den bekannten GST-Subklassen nur ein Teil exprimiert.

Für die Konjugatbildung zwischen DEB und GSH mit Lebercytosol von Mensch, Ratte und Maus als GST-Träger postulierten Boogaard et al. (1996a und 1996b) das in Abb. 2 dargestellte Reaktionsschema. Je nach enzymatischer oder nicht-enzymatischer Reaktion erfolgt der nucleophile Angriff von GSH am C2 oder C1 des DEB. Die so entstandenen Verbindungen S-[1-(Hydroxymethyl)-2,3-epoxypropyl]-glutathion bzw. S-(2-Hydroxy-3,4-epoxybutyl)-glutathion können in einem zweiten Reaktionsschritt zu S-[1-(Hydroxy-methyl)-2,3-dihydroxypropyl]-glutathion bzw. S-(2,3,4-Trihydroxybutyl)-glutathion hydrolysiert werden.

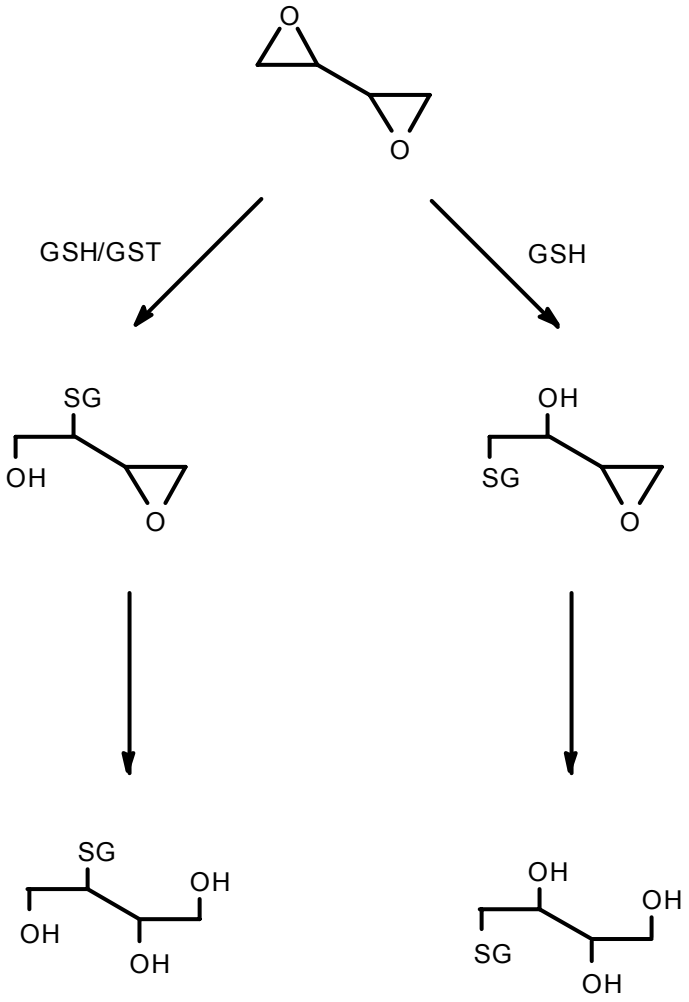

Abb. 2: GSH-Konjugatbildung durch Reaktion von DEB mit GSH (Boogaard et al. 1996a und 1996b)

Genauso wie die EH-abhängige Hydrolyse der DNA-reaktiven Epoxide EB und DEB wird die GST-katalysierte Konjugation mit GSH als detoxifizierend angesehen (Adler et al. 1995).

Untersuchungen von Thier et al. (1995) ergaben in Ames-Tests mit einem rGSTT1-1 cDNA exprimierenden Salmonella typhimurium-Bakterienstamm TA1535 für DEB eine erhöhte Mutagenität im Vergleich zu Tests mit dem entsprechenden GST-negativen Kontrollstamm. Bei gleichen Untersuchungen mit EB traten keine unterschiedlichen Mutagenitäten auf.

Die Ursache für die GST-abhängigen Mutagenitätsunterschiede bei DEB besteht gemäß Guengerich et al. (1995) in der Möglichkeit zur intermediären Bildung eines sehr reaktiven Episulfoniumions, wie in Abb. 3 dargestellt.

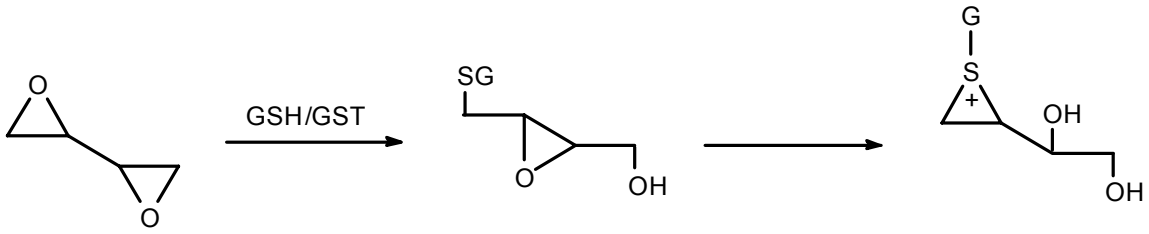

Abb. 3: Mögliche Bildung eines Episulfoniumions durch enzymatische Reaktion von DEB mit GSH (Guengerich et al. 1995)

Die Annahme, daß die Konjugation mit GSH eine Detoxifizierung darstellt, ist mit diesen Untersuchungen und der daraus abgeleiteten Hypothese der Bildung eines Episulfoniumions in Frage gestellt.

Die wesentliche Voraussetzung für die chemische Kanzerogenese ist häufig die metabolische Aktivierung eines Stoffes zur ultimalen Wirkform. Polymorphismen fremstoffmetabolisierender Enzyme kann sich durch eine Steigerung, eine Verminderung oder einen Verlust der enzymatischen Aktivität äußern. Daraus resultieren individuelle Unterschiede im Proteom. Kenntnisse bezüglich des Fremdstoffmetabolismus und der daran beteiligten Enzyme sind daher wichtig für die Beurteilung individueller Suszeptibilitätsfaktoren im Hinblick auf das Krankheitsrisiko nach Schadstoffexposition.

1.3. Aufgabenstellung

Auf der Grundlage des Metabolismus von BD und der Hypothese von Guengerich et al. (1995), daß DEB über Isoenzyme der GST (z. B. GSTT1-1) zu einem Episulfoniumion metabolisiert wird, das seinerseits mit der DNA der Nierenzelle reagieren kann, ergaben sich für die hier vorliegende Arbeit folgende Aufgabenstellungen:

Es war zu untersuchen, welche bekannten Isoenzyme der GST im Nierengewebe des Menschen normalerweise vorhanden sind. Dazu wurden auf enzymatischer Ebene durch den Einsatz spezifischer Substrate die Enzymaktivitäten ermittelt. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität einzelner Isoenzyme von Polymorphismen wurde dabei berücksichtigt.

Da die chemische Kanzerogenese einen Mehrstufenprozess darstellt, bei dem gentoxische Einflüsse auf mehreren Stufen der Malignisierung wirksam werden können, sollte untersucht werden, ob Isoenzyme der GST auch im Nierentumorgewebe biologisch aktiv exprimiert werden und wie sich humane Nierentumoren vom umgebenden Normalgewebe unterscheiden.

Nach den Vorarbeiten von Thier et al. (1995) ist das Isoenzym GSTT1-1 für die Bioaktivierung von DEB von besonderer Bedeutung. Daher sollte in vitro in einem Ansatz von rekombinanter rGSTT1-1, dem Substrat DEB und GSH untersucht werden, welche Produkte gebildet werden und welchen spezifischen Einfluß das Vorhandensein von GSTT1-1 in diesem Ansatz hat.

Unter Modifikation des vorstehenden in vitro Reaktionsansatzes sollte in Verbindung mit spektroskopischen Methoden der analytischen Chemie der von Guengerich et al. (1995) postulierte Reaktionsmechanismus weiter aufgeklärt werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob sich Hinweise auf die intermediäre Bildung eines Episulfoniumions ergeben.

2. MATERIAL

2.1. Cytosole und Mikrosomen

2.1.1. Humane Proben

Die Cytosole und Mikrosomen wurden aus tiefgefrorenen Nierenproben von 21 Nierenzellkarzinom-Patienten der Urologischen Universitätsklinik Marienhospital Herne der Ruhr-Universität Bochum (Prof. Dr. T. Senge) hergestellt. Von allen Spendern dieser Proben konnte neben dem Tumorgewebe auch normales Gewebe erhalten werden.
Die cytomorphologische und pathologische Klassifikation des Primärtumors sowie ein histopathologisches Grading wurde von Pathologen der Abteilung Pathologie der Ruhr Universität Bochum (Prof. Dr. K. Morgenroth) gemäß Thoenes et al. (1990) sowie Wittekind und Wagner (1997) durchgeführt. Die Beschreibung von Primärtumoren und Patientenkollektiv befindet sich in Tab. 1.

Patient	Geschlecht	Alter, [Jahre]	Cytomorphologie	Stadium	Grad
1	M	67	klarzellig	2	2
2	M	47	klarzellig	2	2
3	W	65	klarzellig	3b	2
4	M	64	klarzellig	3b	2
5	M	64	klarzellig	3b	2
6	W	63	klarzellig	3b	2
7	M	62	klarzellig	2	2
8	M	55	klarzellig	2	2
9	W	63	klarzellig	3a	2
10	W	67	klarzellig	2	2
11	W	68	klarzellig	3a	2

Patient	Geschlecht	Alter / Jahre	Cytomorphologie	Stadium	Grad
12	M	61	klarzellig	3a	2
13	M	72	klarzellig	3b	2
14	M	52	klarzellig	3a	2
15	M	63	chromophil	3a	2
16	W	76	chromophil	3a	2
17	M	61	chromophob	3a	2
18	M	65	chromophob	2	2
19	W	74	chromophob	2	2
20	M	69	chromophob	3a	2
21	M	67	ductus Bellini	1	2

Tab. 1: Klassifikation der Nierenzellkarzinome (M = männlich, W = weiblich)

Die DNA für die Bestimmung der GST-Genotypen wurde aus dem gesunden Gewebe der Nierenproben isoliert.

2.1.2. Tierische Proben

Die Lebermikrosomen der Ratte waren eine freundliche Gabe von Dr. T. G. Schulz (Universität Göttingen) und stammten von einer weiblichen Wistar-Ratte. Die Mikrosomenherstellung erfolgte gemäß Schulz-Schalge et al. (1991).

2.2. Bakterien

Verwendet wurde der von Thier et al. (1993) beschriebene transformierte Salmonella typhimurium-Stamm TA1535, der die rGSTT1-1 (alte Nomenklatur GST5-5) exprimiert.

2.3. Enzyme und Antikörper

Enzyme	
DNase I	Boehringer
Endonukleasen:	
BsmA I	New England Biolabs
Cac8 I	New England Biolabs
Mnl I	New England Biolabs
Pvu II	New England Biolabs
HotStar Taq DNA Polymerase	Qiagen
Taq DNA Polymerase	Qiagen
Antikörper	
anti-Mensch CYP2E1 IgG	Gabe von Dr. R. J. Edwards (London)
anti-Kaninchen IgG	Sigma

2.4. Chemikalien

Agarose	Gibco
Agarose NuSieve	Biozym
Ammoniak-Lösung (25 %)	Merck
Ammoniumacetat	Fluka
Ampicillin (D-(-)-α-Aminobenzylpenicillin)	Sigma
APS	Sigma
ATP, [γ-^{32}P] Isoblue stabilisiert	ICN
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
iso-Butanol (2-Methyl-1-propanol)	Fluka
CDNB	Aldrich
DCNB	Merck

DEB (Racemat)	Sigma
Dextranblau	Serva
dGuo	Sigma
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
DTT	Sigma
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Biozym
deuteriertes Wasser	Aldrich
EA	Sigma
EDTA	Roth
EPNP	Sigma
Essigsäure (100 %)	Merck
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll	Sigma
Formamid	USB
Glycerin (87 %)	Merck
Glycin	Sigma
Guanidinhydrochlorid	Aldrich
Helium	Messer-Griesheim
IPTG	Gibco
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
MC	Messer-Griesheim
2-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
Molekulargewichtsmarker (100 bp, 1000 bp)	Gibco
Natriumacetat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
NBD-Cl	Merck
Nutrient Broth No. 2	Oxoid

Orange A-Affinitätsgel	Amicon
Plasmid-DNA pSP 64 (ca. 3800 bp)	Gabe von Prof. Dr. J. A. Hartley (London)
PMSF	Aldrich
Primer/Oligonukleotide:	
1 (5‘-GCTTCACGTGTTATGAAGGTTTC-3‘)	Eurogentec
2 (5‘-TTGGGAAGGCGTCCAAGCGC-3‘)	Eurogentec
3 (5‘-TTGGGAAGGCGTCCAAGCAG-3‘)	Eurogentec
4 (5‘-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3‘)	Eurogentec
5 (5‘-TGAGGGCACAAGCCCCT-3‘)	Eurogentec
6 (5‘-CCTCAGTACTTGGAAGAGCT-3‘)	MWG Biotech
7 (5‘-CACATGAAAGCCTTCAGGTT-3‘)	MWG Biotech
8 (5‘-GTTGTGGGGAGCAAGCAGAGG-3‘)	Eurogentec
9 (5‘-CACAATGAAGGTCTTGCCTCCC-3‘)	Eurogentec
10 (5‘-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3‘)	Eurogentec
11 (5‘-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3‘)	Eurogentec
12 (5‘-CAACTTCATCCACGTTCACC-3‘)	Eurogentec
13 (5‘-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3‘)	Eurogentec
14 (5‘-GTTTTCTAGCATGAATCACTCTGC-3‘)	Eurogentec
15 (5‘-CCTGTACTTACCACAACAACCTTATC-3‘)	Eurogentec
16 (5‘-GGAATCGAATTCCGATGTTG-3‘)	Eurogentec
Salzsäure (32 %)	Merck
SDS	Sigma
SDS-Molekulargewichtsmarker (27–180 kDa)	Sigma
Stickstoff (flüssig)	Messer-Griesheim
Stickstoff (gasförmig)	Messer-Griesheim
synthetische Luft	Messer-Griesheim
TEMED	Sigma
Tris	Merck
Trockeneis	Air Liquid
TSP	Aldrich
Tween 20	Sigma

VP	Sigma
Wasserstoff	Messer-Griesheim
Xylencyanol	Sigma

2.5. Puffer,Lösungen und Nährmedien

Acrylamid/Bisacrylamid (40 %, 29:1)	Appligene / Oncor
Bakterien-Nährmedium	25 g Nutrient Broth No. 2 in 1 l ddH_2O lösen und autoklavieren, 0,285 mM Ampicillin, 1,68 mM IPTG
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
BSA-Lösung	von New England Biolabs mit Mnl I mitgeliefert
Dextranblau-Lösung	10 mg Dextranblau in 1 ml ddH_2O lösen
DNA-Isolierungskit QIAamp Tissue	Qiagen
ECL™ Blotting Detection Reagents	Amersham
Entwickler-Lösung D-19	Kodak
Ficoll-Blau-Lösung	7,5 g Ficoll in 50 ml ddH_2O lösen, 3,5 mM Bromphenolblau
Fixier-Lösung	Kodak
Formamid-Puffer	20 mM EDTA, 0,5 mM Xylencyanol, 0,5 mM Bromphenolblau in Formamid

Inkubationslösung	0,1 % BSA in PBS
Molekulargewichtsmarker-Blau-Lösung	1 mg SDS-Molekulargewichtsmarker in 1 ml ddH_2O lösen, 3,5 mM Bromphenolblau
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4
PCR-Puffer (10 x)	von Qiagen mit Taq DNA Polymerase und HotStar Taq DNA Polymerase mitgeliefert
Proben-Puffer	4 % SDS, 40 % Glycerin, 10 % 2-Mercaptoethanol und 0.05 % Bromphenolblau zu gleichen Teilen mit Sammelgel-Puffer verdünnen
Puffer A	100 mM M Tris/Acetat pH 7,4, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,1 mM PMSF
Puffer B	100 mM M Tris/Acetat pH 7,4, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 30 % Glycerin
Puffer C	10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 (autoklaviert), 200 µM DTT, 25 µM PMSF
Puffer NEB 2	von New England Biolabs mit Mnl I mitgeliefert

Puffer NEB 3	von New England Biolabs mit Bsm AI und Cac8 I mitgeliefert
Q-Solution	von Qiagen mit Taq DNA Polymerase mitgeliefert
Roti®-Block-Stammlösung (10 x)	Roth
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
SequaGel™-Kit	Biozym
TBE-Puffer	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA
TEOA-Puffer (10 x)	250 mM TEOA/HCl pH 7,2, 10 mM EDTA
Transfer-Puffer	25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % Methanol
Trenngel-Puffer	3,0 M Tris/HCl pH 8,8
T4-Polynukleotid Kinase Kit	Gibco
Wasch-Puffer	0,5 % Tween 20 und 0,5 % BSA in PBS

2.6. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Affinitätschromatographiesäule (50 x 0,8 cm I.D.)	Biorad
AGE-Gelelektrophorese:	
Elektrophorese-Kammern	Biorad, IBI
Netzgerät Power Pac 300	Biorad
Autoklav 500	Varioklav®
Bio-Spin® 6 Chromatographiesäulen	Biorad
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld
Bördelzangen	Fleischhacker
Brutschrank B 5050 E	Heraeus
Dialyseschläuche Spectra/Por® (MWCO 3,5 kDa)	Roth
Dialyseschlauchklammern	Roth
Eis-Automat	Ziegra
Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Exsikkator (816 ml)	Fleischhacker
Falcon-Röhrchen (50 ml)	Falcon
Filterpapier MM3	Whatman
Frischhaltefolie	Schlecker
GC:	
elektrisches 6-Wege-Ventil	Valco
Gaschromatograph GC-8A mit FID	Shimadzu
Headspace-Gläschen (9 ml) mit Verschlußkappen	ASS-Chem
Integrator Chromopac C-R6A	Shimadzu
Probenschleife (250 µl)	Rheodyne
Säule DB™-1 DMPS 5 µm (30 m x 0,53 mm I.D.)	J & W
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Gefrierschrank VX 53 O (-80°C)	Jouan
Glasgefäße	Brand, Hirschmann, Schott
Gradientenmischer	Faust

Imaging:	
Eraser	Raytest
Imager BAS-1800 II	Fuji
Imaging-Kassette BAS 2325	Fuji
Imaging-Platte BAS-MS (23 x 25 cm)	Fuji
Kryogefäße (1 ml)	Sarstedt
Kühlschrank	Privileg
Lyophilisator Alpha I-5	Christ
Magnetrührer MR 2000	Heidolph
Mikrowelle	Schütt
MS:	
Massenspektrometer LCQ™ Deca	Finnigan
Stickstoffgenerator UHPN 2500	Domnick Hunter
Vorvakuumpumpen 30	Edwards
Mikro-HPLC:	
Autosampler HTS PAL	CTS Analytics
Probefläschchen Rotilabo® (0,1 ml)	Roth
Pumpe Rheos 2000	Flux Instruments
Säule Luna™ C18 5 µm (50 x 0,3 mm I.D.)	Phenomenex
Säule Pep Mop™ C18 3 µm (150 x 0,3 mm I.D.)	LC Packings
Splitter ACU Rate	LC Packings
Vorsäule C18 3 µm (5 x 0,3 mm I.D.)	LC Packings
NMR-Spektroskopie:	
NMR-Röhrchen	Fischer Scientific
NMR-Spektrometer GX 400	Jeol
PAGE-Gelelektrophorese:	
Diethylaminoethylcellulose-Membran DE 81	Whatman
Elektrophoresekammer SE 600	Pharmacia
Geltrockner 583	Biorad
Netzgerät PS 9009	Gibco
Parafilm “M“®	American National Can™

PCR:	
Filme	Polaroid
Kamera Quickshooter QSP	IBI
Reaktionsplatten Micro Amp® Optical (96-Well)	Perkin Elmer
Thermocycler Gene Amp® PCR System 9700	Perkin Elmer
UV-Tisch (302 nm)	Bachofer
Videodokumentationssystem	Matrix Vision®
Petrischalen	Diagonal
pH-Meter MP 225	Mettler
Photometrie:	
Dioden-Array-Spektrometer 8452A	Hewlett Packard
Einmal-Küvetten Plastibrand® (1 ml, d = 1 cm)	Brand
Mikrotiterplatten (96-well)	Falcon
Mikrotiterplattenschüttler MTS 2	Janke & Kunkel
Photometer 340 ATC	SLT
Quarzküvetten (1,5 ml, d = 1 cm)	Hellma
Spektrophotometer MPS 2000	Shimadzu
Pipetten (2µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5000 µl)	Eppendorf, Gilson
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl)	Eppendorf, Gilson
Potter	B. Braun
Präparierbesteck	Fleischhacker
Rollenmischer Assistent RM 5	Heinemann
Schüttelwasserbad mit Thermostat	GFL®
Skalpell	Fleischhacker
Sonifier Cell Disruptor B15	Brauson
Spritzen (250 µl, 500 µl, 1000 µl gasdicht)	Unimetrics, Hamilton, Henke
Sterilbank	Holten
Stoppuhren	Peter, Hanhart
Ultraschallbad Transsonic Digital S	Elma
Ultra-Turrax® mit Dispergierwerkzeug S25N-10G	Jahnke & Kunkel
Vortex	Heidolph

Waagen:	
Analysenwaage 3707 MP1	Sartorius
Präzisionswaage AE 160	Mettler
Wasserbad mit Thermostat	Lauda
Wasserstrahlpumpe Plastibrand®	Brand
Western-Blotting:	
Belichtungskassette	Amersham
ECL™-Film	Amersham
Netzgerät	CAMAG
Nitrocellulose-Membran	Amersham
semidry-Blotter	Biometra
Zentrifugen:	
Corex®-Röhrchen (30 ml)	Du Pont
Eppendorfzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Konzentratoren Fugisep Midi® (4 ml, MWCO 4 kDa)	Sevatec
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman
Festwinkelrotor JA-20 (34°)	Beckman
Metafuge 1.0 R	Heraeus
Ultrazentrifuge TGA-50	Kontron
Festwinkelrotor 50.2Ti (24°)	Beckman
Ultrazentrifugen-Röhrchen (26,3 ml) mit Deckel	Beckman

3. METHODEN

3.1. Herstellung von Cytosol und Mikrosomen

3.1.1. Cytosol- und Mikrosomenherstellung aus humanem Nierengewebe

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. mit vorgekühlten Geräten und Lösungen durchgeführt.

Die Nierengewebsproben wurden eingewogen (ca. 5 g pro Ansatz), in einer Petrischale mit einem Skalpell in möglichst feine Stückchen zerkleinert und in Falcon-Röhrchen gegeben. Nach Zugabe von Puffer A in dem Verhältnis 1:5 (1 Gewichtsteil Gewebe und 4 Gewichtsteile Puffer) erfolgte die Homogenisation mit Hilfe eines Ultra-Turrax®. Das Homogenat wurde in 30 ml Corex®-Röhrchen überführt und 20 min in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 10000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden nach Absaugen der oberen Fettschicht abgenommen und noch einmal für 1 h in der Ultrazentrifuge bei 4°C und 100000 x g zentrifugiert. Wiederum wurden die Überstände (die Cytosole) abgenommen, homogenisiert und in 1,5 ml Eppendorfgefäßen bei –80°C aufbewahrt. Die Pellets (die Mikrosomen) wurden zum Waschen in Puffer A resuspendiert und gepottert. Es folgte eine erneute Ultrazentrifugation für 1 h bei 4°C und 100000 x g. Der Überstand wurde verworfen und die Mikrosomen in dem Verhältnis 1:2 (1 Gewichtsteil Gewebe und 1 Gewichtsteil Puffer) in Puffer B aufgenommen. Nach Homogenisation durch Pottern wurden die Mikrosomen in 1 ml Kryogefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

3.1.2. Herstellung von Bakteriencytosol

200 ml Bakterien-Nährmedium wurde mit dem rGSTT1-1 exprimierenden und Ampicillin-resistenten Salmonella typhimurium-Bakterienstamm angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelwasserbad geschüttelt. Die Übernachtkultur wurde zunächst 30 min auf

Eis gekühlt, dann in 30 ml Corex®-Röhrchen überführt und 15 min in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 4000 x g zentrifugiert. Die Nährlösung (der Überstand) wurde verworfen, die Pellets (die Bakterien) vereint und in 20 ml Puffer C resuspendiert. Insgesamt zweimal wurde die Bakterien auf diese Weise gewaschen. Anschließend wurden die Zellmembranen durch mehrmalige Behandlung über jeweils 10 s mit Hilfe eines Ultraschall-Stabes (Sonifier) auf Eis aufgebrochen. Das Lysat wurde 30 min in der Ultrazentrifuge bei 4°C und 100000 x g zentrifugiert, der Überstand (das Cytosol) abgenommen.

3.2. Aufreinigung der rekombinanten rGSTT1-1 aus Bakterien-cytosol

Die einzelnen Aufreinigungsschritte erfolgten in Anlehnung an Meyer et al. (1991).

3.2.1. Dialyse

Zu Reinigungszwecken wurde der verwendete Dialyseschlauch Spectra/Por® vor dem Gebrauch für einige Minuten mit 10 mM $NaHCO_3$-Lösung sowie mit 10 mM EDTA-Lösung unter Rühren gekocht und anschließend gründlich mit ddH_2O abgespült. Das Bakteriencytosol wurde mit einer Spatelspitze DNase I versetzt und in den Dialyse-schlauch gegeben. Dieser wurde mit Klammern verschlossen, in 1 l Puffer C gegeben und leicht gerührt. Nach 5 h bei Raumtemperatur wurde die Dialyse in den Kühlschrank (4°C) verlagert. Über einen Zeitraum von 2 Tagen wurde der Puffer C dreimal durch frischen auf 4°C vorgekühlten Puffer C ersetzt.

3.2.2. Affinitätschromatographie

Vor dem Befüllen der Säule wurde das Orange A-Affinitätsgel im Wasserstrahlvakuum entgast. Darauf wurde die Säule gemäß Herstellerangaben in dieser Reihenfolge mit 6 M Guanidinhydrochlorid-Lösung, 10 mM und 400 mM Natriumphosphat-Puffer gewaschen

sowie mit Puffer C äquilibriert. Der Inhalt des Dialyseschlauches wurde auf die Säule gegeben und mit 2-3 Säulenvolumina Puffer C chromatographiert. Eluiert wurde mit 6 Säulenvolumina eines linearen Gradienten von 1 M KCl in Puffer C nach 10 % Glycerin in Puffer C mit Hilfe eines Gradientenmischers. Die während Chromatoghraphie und Elution auf Eis gesammelten 5 ml- bzw. 1 ml-Fraktionen wurden bei –20°C eingefroren.

3.2.3. Messung der Enzymaktivität gegenüber EPNP

Die rGSTT1-1-Aktivität der gesammelten Fraktionen gegenüber dem Substrat EPNP wurde mittels einer spektralphotometrischen Methode bestimmt (Fjellstedt et al. 1973, Habig et al. 1974), bei der die Konjugation des Epoxids mit GSH über die Zeit verfolgt wird.

Hierzu wurden 950 µl eines auf 37°C vorgewärmten 0,1 M Natriumphosphat-Puffers (pH 7,0), 20 µl einer 0,25 M GSH-Lösung und 20 µl einer 25 mM EPNP-Lösung (in Ethanol) in einer 1 ml Einmal-Küvette zusammenpipettiert und gut gemischt. Darauf wurden 10 µl einer Fraktion zugegeben und sofort eine kinetische Messung der Absorption bei 37°C über 1 min und einer Wellenlänge von 360 nm gegen einen Leerwert durchgeführt.

Da Co-Substrat A und Substrat B in der Sättigung vorliegen, ist die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Reaktion 0. Ordnung von den Subtratkonzentrationen unabhängig und somit proportional zu der in der Probe bzw. in der entsprechenden Fraktion vorliegenden Enzymkonzentration [E] (Bisswanger 1979). Experimentell läßt sich dieses durch eine lineare Zunahme des Produktes P (des Konjugats) mit der Zeit erkennen.

$$A + B + E \xrightarrow{k} P + E \tag{1}$$

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k \cdot [E] = k' \tag{2}$$

3.2.4. Prüfung auf DNase

Die Prüfung auf DNase erfolgte bei den Fraktionen mit Enzymaktivität. Hierzu wurden die Eluate der einzelnen Fraktionen mit dem durch die Endonuklease Pvu II geschnittenen Plasmid-DNA pSP 64 nach der folgenden Anleitung in einem Reaktionsansatz vermischt:

50 µl	Reaktionsansatz
10 µl	Eluat einer Fraktion
1 µl	Plasmid-DNA pSP 64 / Pvu II
5 µl	TEOA-Puffer (10 x)
34 µl	ddH_2O

Die Reaktionsansätze wurden 2 h bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 15 % Ficoll-Blau-Lösung auf einem 1,5 % igem Agarosegel in DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Zur UV-Detektion der DNA-Banden wurde den Gelen 25 µM Ethidium-bromid zugesetzt.
Das Eluat einer Fraktion enthält keine DNase, wenn die beiden DNA-Fragmente (ca. 800 und 3000 bp) als scharfe, gleich intensive Banden erkennbar sind und nicht wegen des Verdaus durch DNase verschmiert erscheinen.

3.2.5. Aufkonzentrieren des Enzyms

GST-aktive sowie DNase-freie Eluat-Fraktionen wurden in einen Konzentrator Fugisep Midi® pipettiert und 2 h in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 6000 x g zentrifugiert. Die Filtrate wurden entnommen und die Enzym-Konzentrate durch Umdrehen der Konzentratoren sowie anschließender Zentrifugation für 1 h bei 4°C und 6000 x g gewonnen. Die GSTT1-1-Aktivität der vereinigten Enzym-Konzentrate und der Filtrate wurde gegenüber EPNP (vgl. Kap. 3.2.3.) bestimmt. Die Lagerung der aufkonzentrierten rGSTT1-1 erfolgte aliquotiert bei –80°C.

3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen aller verwendeten Cytosole und Mikrosomen wurde mit Hilfe eines Bestimmungs-Kits (BCA Protein Assay Reagent) gemessen (Smith et al. 1985, Walker 1994). Kalibriert wurde mit BSA-Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 50–1200 µg Protein/ml Lösung.

Zunächst wurden die Kit-Reagenzien A und B in einem Verhältnis von 50:1 vermischt. In einer 96-well Mikrotiterplatte wurden 10 µl jeder Probe bzw. Standardlösung mit 200 µl der A:B-Reagenzienmischung zusammenpipettiert (Doppelbestimmungen) und durch 30 sekündiges Schütteln auf einem Mikrotiterplattenschüttler vermischt. Die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm verschlossen und 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Reagenz A enthält BCA und sorgt durch 0,2 M NaOH für alkalische Bedingungen. Reagenz B ist eine 4 % ige $CuSO_4$-Lösung. Die Cu^{2+}-Ionen werden von Proteinen im alkalischen Medium zu Cu^{+}-Ionen reduziert, die mit BCA einen farbigen Chelatkomplex mit Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm bilden. Bei dieser Wellenlänge wurden die Proben im Anschluß an die Inkubation spektralphotometrisch vermessen. Damit ist die Farbintensität jeder Probe ein direktes Maß für ihre Proteinkonzentration.

3.4. DNA-Aufarbeitung

3.4.1. DNA-Isolierung aus humanem Nierengewebe

Die Isolierung der DNA aus dem Gewebe erfolgte mit Hilfe eines für diesen Zweck speziellen DNA-Isolierungskit (QIAamp Tissue) nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie.

Das Nierengewebe wurde zunächst mit einem Skalpell zerkleinert und nach Zugabe der Kit-Reagenzien ATL-Puffer sowie Proteinase K über einen Zeitraum von mindestens 2 h bei einer Temperatur von 55°C lysiert. Im Anschluß daran wurde das Lysat zur Erhöhung seiner Salzkonzentration mit dem Kit-Puffer AL 10 min bei 70°C inkubiert, mit Ethanol versetzt und auf eine Kieselgel-Säule aus dem Kit gegeben. Diese wurde 1 min bei

6000 x g zentrifugiert. In Gegenwart der hohen Salzkonzentration sowie Ethanol bindet die DNA an die Säulenmatrix. Durch Zugabe des Kit-Puffers AW sowie Zentrifugation für 3 min bei 6000 x g wurde zweimal gewaschen. Die DNA wurde mit Hilfe des Kit-Puffers AE und 1 minütiger Zentrifugation bei 6000 x g eluiert und dann bei 4°C gelagert.
Pro 1 mg Gewebe lassen sich 0,2–1,2 µg DNA isolieren.

3.4.2. Bestimmung der DNA-Konzentration

DNA-Konzentrationen oberhalb von 1 µg/ml lassen sich gut spektralphotometrisch bestimmen. Für doppelsträngige DNA gilt, daß eine wäßrige Lösung von 50 µg/ml eine Absorption A = 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm aufweist (Maniatis et al. 1989, Ausubel et al. 1989).
Die DNA-Gehalte wurden in 1,5 ml Quarzküvetten bestimmt und die Proben wurden so verdünnt, daß die Absorption einen Wert von A = 1,5 nicht überschritt.

3.5. Untersuchungen zum Auftreten von CYP2E1 in humanem Nierengewebe

3.5.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Trennung der mikrosomalen Proteine erfolgte durch diskontinuierliche, eindimensionale Gelelektrophorese auf vertikalen Gelen, bestehend aus Sammel- und Trenngel (Lämmli, 1970). Die Glasplatten und Spacer wurden vor der Benutzung mit Ethanol gereinigt und dann nach Herstellerangaben zusammengesetzt. Die Trenngellösung wurde gemäß der unten angegebenen Vorschrift zusammenpipettiert, anschließend sofort zwischen die Platten gegossen und, um eine gleichmäßige Geloberfläche zu erhalten, mit iso-Butanol überschichtet (ca. 2-3 mm).

Sammelgel	Trenngel	
0,95 ml	6,75 ml	40 % ige Acrylamid/Bis-acrylamid-Lösung (29:1)
2,5 ml	-	Sammelgel-Puffer
-	3,75 ml	Trenngel-Puffer
5,95 ml	17,7 ml	ddH_2O
100 µl	300 µl	10 % ige SDS-Lösung
0,5 ml	1,5 ml	15 % ige APS-Lösung
7,5 µl	15 µl	TEMED

Die Polymerisation war nach ca. 30 min abgeschlossen und das iso-Butanol wurde mit ddH_2O abgewaschen. Im Anschluß daran wurde die Lösung für das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Nach der Polymerisation von ca. 1 h wurde das Gel in eine vertikale Gelelektrophorese-Kammer eingespannt und die Pufferreservoirs mit SDS-PAGE-Laufpuffer aufgefüllt. Die gewünsche Proteinmenge wurde zu gleichen Teilen mit Proben-Puffer vermischt, 3 min bei 100°C im Wasserbad aufgekocht und nach dem Abkühlen auf Eis in die Geltaschen pipettiert (250 µg Protein je Tasche). Als Marker diente Molekulargewichtsmarker-Blau-Lösung. Die elekrophoretische Trennung wurde bei Raumtemperatur und 75 mA im Sammelgel bzw. 150 mA im Trenngel durchgeführt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblaufront ca. 1 cm vom unteren Rand entfernt war. Nach Abschluß der Elektrophorese erfolgte ein Transfer der Proteine mittels Western Blot sowie ein immunchemischer Nachweis.

3.5.2. Western Blot

Zur spezifischen Immunodetektion wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der elektrische Transfer auf die Membran wurde in Anlehnung an die Methode von Towbin et al. (1979) durchgeführt.

Nach Lösen des Gels von den Glasplatten wurde der für des Blotting vorgesehene Teil herausgeschnitten. Dieser Teil des Gels wurde zur Aquilibrierung ca. 20 min in Transfer-

Puffer geschüttelt. Filterpapier und die Nitrocellulose-Membran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und ebenfalls in Transfer-Puffer getränkt. Der Aufbau des "Blottingsandwiches" erfolgte wie nachfolgend dargestellt:

2 Lagen Filterpapier
Nitrocellulose-Membran
Polyacrylamidgel
2 Lagen Filterpapier

Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte durch Elektro-Blotting nach dem semidry blotting-Verfahren. Das "Blottingsandwich" wurde so fixiert, daß die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode hin ausgerichtet waren. Der Transfer erfolgte über ca. 1 h bei Raumtemperatur und 160 mA.

3.5.3. Immunodetektion

Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulose-Membran 5 min in ca. 50 ml PBS gewaschen. Damit sich in den folgenden Schritten kein Antikörper unspezifisch an die Membran bindet, wurde die Membran in eine Petrischale überführt und über Nacht bei 4°C mit 1:10 verdünnter Roti®-Block-Stammlösung "geblockt". Anschließend wurde die Blocklösung durch eine 1:4000-Verdünnung des anti-CYP2E1 Antikörpers aus Kaninchen (Edwards et al. 1995) mit Inkubationslösung ersetzt und 1 h unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper bindet an hCYP2E1-Antigen-Bindungsstellen auf der Membran. Die Inkubationslösung wurde verworfen und restlicher, ungebundener Antikörper durch fünfmaliges Waschen über 3-5 min mit je 20 ml Wasch-Puffer entfernt. Der Antigen-Antikörper-Komplex wurde durch Einsatz eines zweiten Antikörpers (Anti-Antikörper) nachgewiesen. Verwendet wurde hierfür ein aus Ziegen gewonnenes, mit Meerrettich-peroxidase gekoppeltes Anti-Kaninchen IgG. Dieser sekundäre Antikörper wurde 1:20000 mit Inkubationslösung verdünnt und 1 h unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloß sich wieder fünfmaliges Waschen der Membran über 3-5 min mit je 20 ml Wasch-Puffer an sowie das Trocknen der Membran zwischen Blottingpapier.

Die sich anschließende Nachweisreaktion führt das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase durch, indem es ein Substrat so umsetzt, daß es zur Chemolumineszenz angeregt wird. Zu diesem Zweck wurde die noch feuchte Nitrocellulose-Membran in einer Petrischale mit einer Mischung bestehend aus je 1 ml ECL™ Blotting Detection Reagent 1 und 2 für 1 min geschwenkt. Darauf wurde die Membran in Frischhaltefolie verpackt und zusammen mit dem ECL™-Film in eine Belichtungskassette gegeben. Nach ca. 2 min wurde der Film über 1 min entwickelt, kurz gewaschen und 1 min fixiert. Im Anschluß an erneutes waschen erfolgte die Trocknung des Films an der Luft.

3.6. Genotypisierungen von polymorphen GSTs in humanem Nierengewebe mittels PCR

3.6.1. GSTM1-Genotypisierung

Der hGSTM1-Polymorphismus basiert auf einer Gendeletion. Zusätzlich tritt bei hGSTM1-positiven Individuen eine Basensubstitution in Codon 173 auf. Insgesamt resultieren daraus fünf GSTM1-positive Genotypen (Eaton und Bammler 1999). Die Bestimmung der Genotypen erfolgte nach einer semiquantitativen Multiplex-PCR-Methode von Fryer et al. (1993), die modifiziert wurde.

Je Probe wurden in zwei separaten PCR-Ansätzen 150 ng DNA zusammen mit den Primern, den freien Nukleosidtriphosphaten und der Taq DNA Polymerase nach folgendem Schema vermischt:

30,00 µl	Reaktionsansatz 1
3,00 µl	PCR-Puffer
0,24 µl	25 mM dNTPs
1,00 µl	10 µM Primer 1 (forward M1)
1,00 µl	10 µM Primer 2 (reverse M1a)
1,00 µl	10 µM Primer 4 (forward Referenz)
1,00 µl	10 µM Primer 5 (reverse Referenz)
0,15 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
17,61 µl	ddH_2O
5,00 µl	DNA (30 ng/µl)

30,00 µl	Reaktionsansatz 2
3,00 µl	PCR-Puffer
0,24 µl	25 mM dNTPs
1,00 µl	10 µM Primer 1 (forward M1)
1,00 µl	10 µM Primer 3 (reverse M1b)
1,00 µl	10 µM Primer 4 (forward Referenz)
1,00 µl	10 µM Primer 5 (reverse Referenz)
0,15 µl	HotStar Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
17,61 µl	ddH_2O
5,00 µl	DNA (30 ng/µl)

Die Reaktionsansätze durchliefen im Thermocycler folgende Temteraturprogramme:

Reaktionsansatz 1

5,0 min	94°C		
0,5 min	94°C	(Denaturierung)	
0,5 min	55°C	(Annealing)	⇒ 29 Zyklen
1,0 min	72 °C	(Polymerisierung)	
10,0 min	72°C		

Reaktionsansatz 2

15,0 min	94°C		
0,5 min	94°C	(Denaturierung)	
0,5 min	55°C	(Annealing)	⇒ 29 Zyklen
1,0 min	72 °C	(Polymerisierung)	
10,0 min	72°C		

Die Produkte wurden nach Zugabe von 15 % Ficoll-Blau-Lösung auf einem 3,2 % igen Agarosegel NuSieve 3:1 in TBE-Puffer aufgetrennt. Zur UV-Detektion der DNA-Banden wurde den Gelen 25 µM Ethidiumbromid zugesetzt.
Durch spezifische Anlagerung der Primer an hGSTM1-positive Allele liegt nach der Amplifikation ein 132 bp-Fragment vor. Im Falle eines hGSTM1ab-Genotyps liegt das Fragment in beiden Ansätzen vor. Die Unterscheidung zwischen den Genotypen hGSTM1aa bzw. hGSTM1a0 und hGSTM1bb bzw. hGSTM1b0 erfolgte semiquantitativ mit der 176 bp-Referenzbande aus dem hGSTP1-Gen (immer homozygot positiv) als internem Standard. Dabei wurden mit Hilfe einer densitometrischen Auswertungseinheit die hGSTM1- und die hGSTP1-Bande ins Verhältnis gesetzt.
Zuvor wurde der lineare Bereich der PCR (Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zyklenzahl) durch Variation der Zyklenzahl bestimmt.

3.6.2. GSTM3-Genotypisierung

Durch eine 3 bp-Deletion in dem Intron 6 entsteht der hGSTM3-Polymorphismus. Die Unterscheidung der drei hGSTM3-Genotypen erfolgte mit Hilfe von PCR-RFLP gemäß Inskip et al. (1995).
Hierzu wurden in einem PCR-Ansatz ca. 200 ng DNA, die Primer, die freien Nukleosidtriphosphate und die Taq DNA Polymerase nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

40,00 µl	Reaktionsansatz
4,00 µl	PCR-Puffer
8,00 µl	Q-Solution
0,32 µl	25 mM dNTPs
1,30 µl	10 µM Primer 6 (forward M3)
1,30 µl	10 µM Primer 7 (reverse M3)
0,20 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
20,88 µl	ddH_2O
4,00 µl	DNA (ca. 50 ng/µl)

Nach gutem Mischen durchliefen die Proben im Thermocycler folgendes Temperaturprogramm:

5 min	94°C		
1 min	94°C	(Denaturierung)	
1 min	55°C	(Annealing)	⇒ 35 Zyklen
1 min	72 °C	(Polymerisierung)	
10 min	72°C		

Nachdem die PCR-Ansätze (273 bp- bzw. 273-3 bp-Fragmente) mit der Endonuklease Mnl I wie folgt vermischt wurden, erfolgte der enzymatische Verdau im Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C über 18 h.

20,00 µl	Reaktionsansatz
2,00 µl	Puffer NEB 2
0,20 µl	BSA-Lösung (500 µg/ml)
1,00 µl	Mnl I (5 U/µl)
6,80 µl	ddH_2O
10,00 µl	PCR-Ansatz

Die Proben wurden nach Zugabe von 15 % Ficoll-Blau-Lösung auf einem 3,2 % igen Agarosegel NuSieve 3:1 in TBE-Puffer aufgetrennt. Zur UV-Detektion der DNA-Banden wurde den Gelen 25 µM Ethidiumbromid zugesetzt.
Die 3 bp-Deletion in dem Intron 6 verhindert eine Schnittstelle der Endonuklease bei 97 bp in mutierten Allelen neben einer immer vorhandenen Schnittstelle bei 148 bp. Eine weitere Schnittstelle liegt bei 11 bp vor. Da sich die Erkennungssequenz des Mnl I jedoch am Anfang des forward-Primers befindet, kann diese nicht erkannt werden. Für die drei hGSTM3-Genotypen ergeben sich somit folgende Fragmentierungsmuster auf dem Gel:

Genotyp	Bezeichnung	Banden im Gel / bp
homozygoter Wildtyp	hGSTM3 A	97 | 51 | 125
heterozygoter Typ	hGSTM3 AB	97 | 51 | 145 | 125
homozygoter Mutant	hGSTM3 B	145 | 125

Tab. 2: DNA-Fragmentierungsmuster ber der hGSTM3 Genotypisierung

3.6.3. GSTP1-Genotypisierung

In dem hGSTP1-Gen liegen zwei polymorphe Stellen vor. Sowohl in Codon 105 als auch in Codon 114 kommt es durch Punktmutationen zu Basenpaarsubstitutionen. Im Genprodukt führt dieses zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Valin (Codon 105) und Alanin nach Valin (Codon 114) (Board et al. 1998). Es resultieren vier Allelvarianten bzw. neun Genotypen (Eaton und Bammler 1999).

3.6.3.1. Polymorphismus in Codon 105

Mit Hilfe einer PCR-RFLP-Methode nach Harries et al. (1997) wurden die hGSTP1-Genotypen bezüglich Codon 105 ermittelt.
Es wurden in einem PCR-Ansatz ca. 200 ng DNA zusammen mit den Primern, den freien Nukleosidtriphosphaten und der Taq DNA Polymerase nach folgendem Schema vermischt:

40,00 µl	Reaktionsansatz
4,00 µl	PCR-Puffer
0,32 µl	25 mM dNTPs
1,30 µl	10 µM Primer 4 (forward P1 Codon 105)
1,30 µl	10 µM Primer 5 (reverse P1 Codon 105)
0,20 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
28,88 µl	ddH_2O
4,00 µl	DNA (ca. 50 ng/µl)

Anschließend erfolgte die PCR der Proben im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

5,0 min	94°C		
0,5 min	94°C	(Denaturierung)	
0,5 min	55°C	(Annealing)	⇒ 35 Zyklen
1,0 min	72 °C	(Polymerisierung)	
10,0 min	72°C		

Darauf wurden die PCR-Ansätze (176 bp-Fragmente) mit der Endonuklease Bsm AI wie folgt vermischt und im Wasserbad bei einer Temperatur von 55°C über 1 h enzymatisch verdaut.

20,00 µl	Reaktionsansatz
2,00 µl	Puffer NEB 3
0,50 µl	Bsm AI (2,5 U/µl)
7,50 µl	ddH_2O
10,00 µl	PCR-Ansatz

Nach Zugabe von 15 % Ficoll-Blau-Lösung wurden die Proben auf einem 3,2 % igen Agarosegel NuSieve 3:1 in TBE-Puffer aufgetrennt. Die Gele wurden zur UV-Detektion der DNA-Banden mit 25 µM Ethidiumbromid versetzt.

Duch eine Basenpaarsubstitution in Codon 105 wird eine Schnittstelle für die Endonuklease im DNA-Fragment bei 86 bp eingeführt. Für die drei hGSTP1-Genotypen hinsichtlich Codon 105 ergeben sich somit folgende Fragmentierungsmuster auf dem Gel:

Genotyp	Bezeichnung	Banden im Gel / bp
homozygoter Wildtyp	ile/ile	176
heterozygoter Typ	ile/val	176 | 85 | 91
homozygoter Mutant	val/val	85 | 91

Tab. 3: DNA-Fragmentierungsmuster ber der hGSTP1 Genotypisierung in Codon 105

3.6.3.2. Polymorphismus in Codon 114

Die Bestimmung der hGSTP1 Genotypen hinsichtlich von Codon 114 wurde mittels einer PCR-RFLP-Methode gemäß Harris et al. (1998) durchgeführt.
In einem PCR-Ansatz wurden ca. 200 ng DNA zusammen mit den Primern, den freien Nukleosidtriphosphaten und der Taq DNA Polymerase nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

40,00 µl	Reaktionsansatz
4,00 µl	PCR-Puffer
8,00 µl	Q-Solution
0,32 µl	25 mM dNTPs
1,30 µl	10 µM Primer 8 (forward P1 Codon 114)
1,30 µl	10 µM Primer 9 (reverse P1 Codon 114)
0,20 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
20,88 µl	ddH_2O
4,00 µl	DNA (ca. 50 ng/µl)

Nach gutem Mischen durchliefen die Proben im Thermocycler folgendes Temperaturprogramm:

5,0 min	94°C		
0,5 min	94°C	(Denaturierung)	
0,5 min	62°C	(Annealing)	⇒ 35 Zyklen
1,0 min	72 °C	(Polymerisierung)	
10,0 min	72°C		

Nachdem die PCR-Ansätze (217 bp-Fragmente) mit der Endonuklease Cac8 I wie folgt vermischt wurden, erfolgte der enzymatische Verdau im Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C über 2 h.

20,00 µl	Reaktionsansatz
2,00 µl	Puffer NEB 3
1,40 µl	Cac8 I (7 U/µl)
6,60 µl	ddH_2O
10,00 µl	PCR-Ansatz

Mit 15 % Ficoll-Blau-Lösung wurden die Proben auf einem 3,2 % igen Agarosegel NuSieve 3:1 in TBE-Puffer aufgetrennt. Zur UV-Detektion der DNA-Banden wurden die Gele mit 25 µM Ethidiumbromid versetzt.
Der hGSTP1-Wildtyp besitzt in Codon 114 für die Endonuklease im DNA-Fragment bei 93 bp eine Schnittstelle, die durch Basenpaarsubstitution entfällt. Desweiteren existiert eine von der Mutation unabhängige Schnittstelle bei 11 bp. Für die drei hGSTP1-Genotypen hinsichtlich Codon 114 ergeben sich somit folgende Fragmentierungsmuster auf dem Gel:

Genotyp	Bezeichnung	Banden im Gel / bp
homozygoter Wildtyp	ala/ala	11 | 93 | 113
heterozygoter Typ	ala/val	11 | 93 | 113 | 206
homozygoter Mutant	val/val	11 | 206

Tab. 4: DNA-Fragmentierungsmuster ber der hGSTP1 Genotypisierung in Codon 114

3.6.4. GSTT1-Genotypsierung

Der Polymorphismus der hGSTT1 basiert auf einer Gendeletion (Pemble et al. 1994), woraus drei Genotypen resultieren. Mit Hilfe einer Multiplex-PCR-Methode nach Kempkes et al. (1996) kann unterschieden werden, ob ein Individuum hGSTT1 defizient oder Träger zumindest eines funktionellen Allels ist. Bei semiquantitativer Durchführung dieser Methode können die heterozygoten und homozygoten Allelträger voneinander unterschieden werden.

Hierzu wurden in einem PCR-Ansatz ca. 200 ng DNA, die Primer, die freien Nukleosidtriphosphate und die Taq DNA Polymerase nach dem folgenden Schema zusammenpipettiert und gemischt:

30,00 µl	Reaktionsansatz
3,00 µl	PCR-Puffer
0,24 µl	25 mM dNTPs
1,00 µl	10 µM Primer 10 (forward T1)
1,00 µl	10 µM Primer 11 (reverse T1)
1,00 µl	10 µM Primer 12 (forward Referenz)
1,00 µl	10 µM Primer 13 (reverse Referenz)
0,15 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
17,61 µl	ddH_2O
5,00 µl	DNA (ca. 50 ng/µl)

Anschließend erfolgte die PCR der Proben im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

3,0 min	94°C		
0,5 min	94°C	(Denaturierung)	
1,0 min	60°C	(Annealing)	⇒ 35 Zyklen
1,0 min	72 °C	(Polymerisierung)	
10,0 min	72°C		

Die Proben wurden nach Zugabe von 15 % Ficoll-Blau-Lösung auf einem 1,5 % igen Agarosegel in TBE-Puffer aufgetrennt. Zur UV-Detektion der DNA-Banden wurde den Gelen 25 µM Ethidiumbromid zugesetzt.
Durch Anlagerung der Primer 10 und 11 an hGSTT1 positive Allele liegt nach der Amplifikation ein 480 bp-Fragment vor. Die 268 bp-Referenzbande aus dem β-Globin-Gen (immer homozygot positiv) dient als interner Standard für die semiquantitative Auswertung. Hierzu werden mit Hilfe einer densitometrischen Auswertungseinheit die hGSTT1-1-Bande und die β-Globin-Bande ins Verhältnis gesetzt.
Der lineare Bereich der PCR (Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zyklenzahl) wurde zuvor durch Variation der Zyklenzahl bestimmt.

3.7. Messung von spezifischen GST-Aktivitäten in Nieren-cytosolen

Mit Ausnahme der GSTT1-1-Aktivität wurden alle Aktivitäten der GST-Isoenzyme spektralphotometrisch bestimmt.
Für die jeweiligen GST-Isoenzyme liegen die Konzentrationen des Co-Substrats GSH wie auch der entsprechenden spezifischen Substrate deutlich über ihren k_M-Werten, so daß Sättigung vorliegt. Damit sind alle Reaktionen 0. Ordnung. Die Integration von Gleichung (2) (vgl. Kap. 3.2.3.) ergibt eine lineare Produktzunahme bzw. Eduktabnahme in Abhängigkeit der Zeit.

$$v = [A]_0 - [A]_t = [P]_t = k' \cdot t \qquad (3)$$

Die Produktzunahme bzw. Eduktabnahme ist bei einer spektralphotometrischen Messung mit einer Absorptionsänderung in einem bestimmten Wellenlängenbereich verbunden. Damit entspricht die Steigung m der Geradengleichung (3) bzw. die Geschwindigkeits-konstante k‘ der Absorptionsänderung pro Zeitintervall $\Delta A/\Delta t$. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Lottspeich und Zorbas 1998), Gleichung (4), sowie anschließender Umformung lassen sich mit Hilfe der Gleichung (5) die Enzymaktivitäten AKT berechnen.

$$\Delta A = \Delta c_{abs} \cdot \varepsilon \cdot d \tag{4}$$

$$\frac{\Delta c_{abs}}{\Delta t} = \frac{m}{\varepsilon \cdot d} = AKT \tag{5}$$

Die spezifischen Enzymaktivitäten AKT_{spez} ergeben sich durch Normierung auf die eingesetzte Proteinmenge (Pingoud und Urbanke 1997) nach Gleichung (6).

$$AKT_{spez} = \frac{m}{\varepsilon \cdot d \cdot c_{Prot}} \tag{6}$$

Mit Hilfe der Software Statistical Analysis System (SAS) und eines zweiseitigen t-Tests für paarweise Vergleiche (Büning und Trenkler 1978) wurden die Aktivitäten in gesundem Gewebe und in Tumorgewebe auf signifikante Unterschiede hin überprüft.

3.7.1. Bestimmung der GST α-Klasse-Aktivität gegenüber 7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol

Die Aktivitätsbestimmung der hGST Klasse α erfolgte gegenüber dem Substrat NBD-Cl (Ricci et al. 1994).

Es wurden 750 µl eines auf 25°C vorgewärmten 0,1 M Natriumacetat-Puffers (pH 5,0), 100 µl einer 5 mM GSH-Lösung und 100 µl einer 2 mM NBD-Cl-Lösung (in Ethanol) in eine 1 ml Einmal-Küvette zusammenpipettiert und gut gemischt. Nach der Zugabe von 50 µl Nierencytosol wurde die Zunahme der Absorption des GSH-Konjugats 7-Glutathionyl-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol bei einer Wellenlänge von 419 nm über eine Zeit von 2 min gegen einen Leerwert gemessen. Die Temperatur während der Messung betrug 25°C.

Die spezifische Aktivität errechnet sich gemäß Gleichung (6) mit einem molaren Absorptionskoeffizienten für NBD-Cl von 14,5 $l \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

3.7.2. Bestimmung der GST µ-Klasse-Aktivität gegenüber 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol

Die Messung der hGST Klasse µ-Aktivität wurde gegenüber dem Substrat DCNB gemäß Habig et al. (1974) durchgeführt.

Hierzu wurden 600 µl einer auf 30°C vorgewärmten 0,2 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5), 100 µl einer 50 mM GSH-Lösung und 100 µl einer 10 mM DCNB-Lösung (in Ethanol) in einer 1,5 ml Quarzküvette zusammenpipettiert und gut gemischt. Darauf wurde 200 µl Nierencytosol zugegeben und der Anstieg der Absorption durch die Bildung des GSH-Konjugats 1-Glutathionyl-2-chlor-4-nitrobenzol bei 30°C und einer Wellenlänge von 345 nm über 2 min kinetisch gegen einen Leerwert gemessen.

Mit einem molaren Absorptionskoeffizienten von 8,5 $l \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$ errechnet sich die spezifische Aktivität entsprechend Gleichung (6).

3.7.3. Bestimmung der GSTP1-1-Aktivität

3.7.3.1. Substrat Ethacrynsäure

Die Bestimmung der hGSTP1-1-Aktivität wurde gegenüber dem Substrat EA gemäß Habig und Jakoby (1981) durchgeführt.

In einer 1,5 ml Quarzküvette wurden 700 µl eines auf 25°C vorgewärmten 0,1 M Kaliumphosphat-Puffers, 100 µl einer 2,5 mM GSH-Lösung und 100 µl 2 mM EA (in Ethanol) zusammenpipettiert. Nach gutem Mischen wurden 100 µl Nierencytosol hinzugefügt. Im Anschluß daran wurde bei einer Temperatur von 25°C die Zunahme der Absorption aufgrund der Enstehung des GSH-Konjugats [2,3-Dichloro-4-(2-methylglutathionyl-butyryl)-phenoxy]-essigsäure durch Michael-Addition von GSH an die Doppelbindung bei einer Wellenlänge von 270 nm über 2 min kinetisch gegen einen Leerwert verfolgt.

Der molare Absorptionskoeffizient von EA beträgt 5,0 $l \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$, womit sich die spezifische Enzymaktivität nach Gleichung (6) berechnen läßt.

3.7.3.2. Substrat 4-Vinylpyridin

Die hGSTP1-1-Aktivität wurde gegenüber dem Substrat VP bestimmt (Berhane et al. 1994)

Hierzu wurden in einer 1,5 ml Quarzküvette 930 µl eines auf 37°C vorgewärmten 50 mM Natriumphosphat-Puffers (pH 6,8) mit 10 µl einer 0,1 M GSH-Lösung sowie mit 10 µl einer 10 mM VP-Lösung versetzt und gut gemischt. Durch die Zugabe von 50 µl Nierencytosol bildet sich das GSH-Konjugat 4-Ethylglutathionylpyridin. Gemessen wurde bei einer Temperatur von 37°C die Abnahme der Absorption durch den Verbrauch von VP bei einer Wellenlänge von 248 nm über 3 min gegen einen Leerwert.

Durch Spiegelung der Geraden an der x-Achse wird die Steigung positiv. Mit einem molaren Absorptionskoeffizienten für VP von 7,4 $l \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$ läßt sich die spezifische Aktivität dann Gleichung (6) folgend ermitteln.

3.7.4. Bestimmung der GSTT1-1-Aktivität gegenüber Methylchlorid

Die GSTT1-1 Aktivität gegenüber dem Substrat MC wurde gaschromatographisch ermittelt (Peter et al. 1989, Thier et al. 1998a).

In einem Headspace-Gläschen wurden 500 µl 0,5 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3), 600 µl ddH_2O, 100 µl 0,2 M GSH-Lösung und 800 µl Nierencytosol zusammenpipettiert. Die Gläschen wurden gasdicht verschlossen und auf einem Rollenmischer im Brutschrank 10 min bei 37°C vorinkubiert. Darauf wurde, um in den Gläschen eine MC-Anfangskonzentration von 1000 ppm zu erhalten, aus dem Gasraum 400 µl mit einer gasdichten Spritze entnommen und durch das entsprechende Volumen von zuvor im Exsikkator frisch angesetzten 5 % igen MC in Luft ersetzt. Schließlich wurden die Gläschen wieder auf dem Rollenmischer im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 30 min, 90 min, 150 min und 210 min wurden jeweils 500 µl Probe mit der gasdichten Spritze aus dem Gasraum entnommen und zur Bestimmung der MC-Konzentration über eine Probenschleife in den Gaschromatographen injiziert. Über den Beobachtungszeitraum nimmt die MC-Konzentration aufgrund der Bildung von S-Methylglutathion ab. Unter den folgenden Bedingungen erscheint der MC-Peak bei einer Retentionszeit von 0,6 min (36 s).

Säule

T = 100°C

Trägergasfluß (N_2) = 20 ml/min

Detektor

T = 200°C

Gasfluß synthetische Luft = 500 ml/min

Gasfluß H_2 = 40 ml/min

Die MC-Konzentration ergibt sich mit Hilfe einer zuvor aufgenommenen Kalibrierungsgeraden.

Im Gegensatz zu GSH liegt MC unter den Reaktionsbedingungen nicht in der Sättigung vor. Damit handelt es sich um eine Reaktion 1. Ordnung, deren Reaktionsgeschwindigkeit nur von der GSH-Konzentration unabhängig ist (Bisswanger 1979). Aus der Reaktionsgleichung (1) (vgl. Kap. 3.2.3.) folgt somit Gleichung (7).

$$v = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k \cdot [E] \cdot [B] = k' \cdot [B] \qquad (7)$$

Die Integration dieser Gleichung führt zu Gleichung (8).

$$\ln [B]_t \cdot ppm^{-1} = -k' \cdot t + \ln [B]_0 \cdot ppm^{-1} \qquad (8)$$

Damit entspricht die negative Steigung –m der Geradengleichung (8) der Geschwindigkeitskonstanten k‘, die ein direktes Maß für die im Reaktionsansatz vorhandene Enzymaktivität ist. Man erhält sie durch lineare Regression einer halblogarithmischen Auftragung der MC-Konzentration gegen die Inkubationszeit. Da jedoch eine geringe nicht-enzymatische Reaktion von MC mit GSH stattfindet und außerdem während der Messung durch die Probenahme Substrat aus dem System entzogen wird, ist auch in der Pufferkontrolle eine Abnahme des Substrates zu beobachten. Der daraus resultierende Steigungsbetrag wird bei der Berechnung als Hintergrundsteigung

einheitlich berücksichtigt. Die spezifische Enzymaktivität ergibt sich schließlich durch Normierung auf die in der jeweiligen Probe vorhandene Proteinmenge.

3.7.5. Bestimmung der GST-Akivität gegenüber 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol

Nach einer von Habig et al. (1974) entwickelte Methode wurde gegenüber dem Substrat CDNB die GST-Aktivität in den Cytosolen bestimmt. Während CDNB für die meisten GST-Isoenzyme ein Substrat ist, zeigt die Klasse θ gegenüber dem Substrat keine Aktivität.

925 µl eines auf 37°C vorgewärmten 0,1 M Kaliumphosphat-Puffers (pH 7,0), 25 µl einer 40 mM GSH-Lösung sowie 25 µl 40 mM CDNB-Lösung (in Ethanol) wurde in einer 1,5 ml Quarzküvette gut vermischt. Im Anschluß an die Zugabe von 25 µl Nierencytosol wurde bei 37°C die Zunahme der Absorption aufgrund der Bildung des GSH-Konjugats 1-Glutathionyl-2,4-dinitrobenzol bei einer Wellenlänge von 340 nm über eine Zeit von 1 min gegen einen Leerwert gemessen.

Mit dem molaren Absorptionskoeffiienten von CDNB von 9,6 $l \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$ errechnet sich die spezifische Aktivität gemäß Gleichung (6).

3.8. Massenspektroskopie (ESI-MS^n)

3.8.1. Inkubationen

Die Inkubationen für die massenspektroskopischen Untersuchungen wurden in Eppendorfgefäßen in einem Reaktionsvolumen von 200 µl durchgeführt. Hierzu wurde Ammoniumacetat-Puffer (pH 7,4) vorgelegt und wahlweise Lösungen von GSH, DEB sowie dGuo dazugegeben, so daß sich folgende Konzentrationen im Reaktionsansatz ergaben:

Substanz	Konzentration / mM
Puffer	10 100
GSH	1 10
DEB	0,05 0,5 1,0 5,0
dGuo	2,5

Tab. 5: Endkonzentrationen für die MS-Reaktionsansätze

Die Inkubationen wurden sowohl nicht-enzymatisch als auch enzymatisch durchgeführt. Den enzymatischen Reaktionsansätzen wurde rekombinante rGSTT1-1 in aufgereingter Form zugesetzt, so daß die Konzentration 40 µg/ml betrug. Alle Inkubationen wurden im Blockthermostat bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Die Inkubationszeiten betrugen 10 min und 60 min.

3.8.2. Direktinfusion

Bei der Direktinfusion wurden die Proben unmittelbar nach dem Ende der Inkubation auf eine Spritze aufgezogen und über einen automatischen Vorschub in das MS injiziert. Die Proben mit einer 10 mM GSH-Konzentration wurden vor der Messung im Verhältnis 1:10 verdünnt, um die Signalintensitäten zu verringern.
Die Spektren bzw. Stoßspektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgezeichnet:

Ionisierung mittels ESI (positive Ionen)

Infusionsfluß = 3 µl/min
sheath flow Probe:Methanol = 2:1
sheath gas (N_2) = 25 arb. units
Kapillartemperatur = 250°C
Kapillarspannung = 15 V

Massenanalyse mittels Ionenfalle

3.8.3. Gekoppelte Flüssigchromatographie-Massenspektroskopie (µLC-MS)

Bei der Kopplung von µHPLC und MS wurden 2 µl einer Probe direkt nach der Inkubation über einen Autosampler in des System injiziert. Die chromatographische Trennung sowie die massenspektroskopische Detektion erfolgte je nach Abwesenheit (a) oder Anwesenheit (b) von dGuo im Inkubationsansatz unter verschiedenen Bedingungen:

(a)

Chromatographie

Säule Pep Mop™ C18 3 µm (150 x 0,3 mm I.D.) mit Vorsäule
Laufmittel Ammoniumacetat-Puffer (pH 3,5) isokratisch
Fluß = 4 µl/min

Massenspektroskopie

positive Ionen
sheath gas (N_2) = 25 arb. units
Kapillartemperatur = 250°C
Kapillarspannung = 15 V
Ionenfalle

(b)

Chromatographie

Säule Luna™ C18 5 µm (50 x 0,3 mm I.D.) mit Vorsäule
Laufmittel Ammoniumacetat-Puffer (pH 5,5) isokratisch
Fluß = 4 µl/min

Massenspektroskopie

positive Ionen
sheath flow Probe:Methanol = 1:1
sheath gas (N_2) = 20 arb. units
Kapillartemperatur = 200°C
Kapillarspannung = 45 V
Ionenfalle

3.9. ^{13}C-NMR-Spektroskopie

3.9.1. Inkubationen

Die Inkubationen für die NMR-Spektroskopie wurden in 2 ml Eppendorfgefäßen in einem Reaktionsvolumen von 1 ml durchgeführt. Hierzu wurden in 100 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4), 20 mM GSH und 50 mM DEB nicht-enzymatisch sowie enzymatisch im Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C über 30 min inkubiert. Den enzymatisch durchgeführten Reaktionsansätzen wurde rekombinante rGSTT1-1 in aufgereingter Form zugesetzt, so daß die Konzentration 20 µg/ml betrug.

3.9.2. Proteinfällung und Lyophilisation

Bei den enzymatisch durchgeführten Reaktionen erfolgte im Anschluß an die Inkubation eine Proteinfällung durch die Zugabe von mittels Trockeneis vorgekühltem Methanol zu gleichen Teilen. Nach Zentrifugation in der Eppendorfzentrifuge wurde der Überstand abpipettiert. Dieser wurde genauso wie die nicht-enzymatischen Proben lyophilisiert.

3.9.3. Meßbedingungen

Zur Aufnahme der ^{13}C-NMR-Spektren wurden je sechs lyophilisierte nicht-enzymatische bzw. enzymatische Reaktionsansätze vereint und in deuteriertem Wasser gelöst. Die Bedingungen waren folgende:

externer Standard TSP (0 ppm)
^{1}H-Breitband-entkoppelt
Frequenz = 100 MHz
Relaxationswartezeit = 2 s
Pulswinkel = 45° (^{13}C-NMR)
Winkel des Editing-Pulses = 135° (^{13}C-NMR-DEPT)

3.10. Phosphorimaging

3.10.1. ^{32}P-Markierung

Die ^{32}P-Markierung der Oligonukleotide 14, 15 und 16 wurde mit T4-Polynukleotid Kinase Kit und [γ-^{32}P]-ATP durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde nach folgenden Schema in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und vermischt:

250 µl	Reaktionsansatz
50 µl	10 µM Oligonukleotid
50 µl	forward-Puffer (5 x)
10 µl	T4 Kinase
10 µl	[γ-^{32}P]-ATP (0,37 MBq/µl)
130 µl	ddH_2O

Während der 30 minütigen Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37°C im Blockthermostat wurde die Bio-Spin® 6 Säule durch dreimalige Zugabe von 1 ml ddH_2O und abschließender Zentrigugation für 4 min bei 1100 x g konditioniert. Darauf wurde der Ansatz der Markierungsreaktion auf die Säule gegeben und 4 min bei 1100 x g zentrifugiert. Das Eluat, das die ^{32}P-markierten Oligonukleotide enthält, wurde für die Inkubationen verwendet.

3.10.2. Inkubationen

Die Inkubationen wurden in 0,5 ml Eppendorfgefäßen in einem Reaktionsvolumen von 100 µl durchgeführt. Hierzu wurden in 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 7,4) 0,2 µM Oligonukleotid 14, 15 bzw. 16 und 20 mM GSH nicht-enzymatisch sowie enzymatisch im Blockthermostat bei einer Temperatur von 37°C über 30 min inkubiert. Den enzymatisch durchgeführten Reaktionsansätzen wurde rekombinante rGSTT1-1 in aufgereingter Form zugesetzt, so daß die Konzentration 40 µg/ml betrug.

3.10.3. Isolierung der Oligonukleotide

Zur Isolierung der drei Oligonukleotide wurden die Proben in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß transferiert und mit 10 µl 3 M Natriumacetat-Puffer (pH 4,8), 250 µl Ethanol sowie 1 µl Dextranblau-Lösung versetzt, gemischt und 5 min stehengelassen. Dabei bewirkt Dextranblau nicht nur eine Färbung des Pellets, es bewirkt als Copräzipitat auch eine effektivere Fällung. Es folgte eine 20 minütige Zentrifugation in der Eppendorfzentrifuge bei höchster Drehzahl. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet zweimal zum Waschen in 70 % Ethanol resuspendiert sowie 5 min in der Eppendorfzentrifuge bei höchster Drehzahl zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet an der Luft getrocknet.

3.10.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Oligonukleotide wurden durch kontinuierliche, eindimensionale Gelelektrophorese auf vertikalen Gelen getrennt. Die Glasplatten und Spacer wurden vor der Benutzung mit Ethanol gereinigt und dann nach Herstellerangaben zusammengesetzt. Aus den SequaGel™-Kit Reagenzien wurde ein Acrylamidvormix hergestellt, indem 40 ml Konzentrat, 50 ml Verdünner und 10 ml Puffer (10 x) vermischt wurden. Die Gellösung für ein 10 % iges Sequenziergel wurde dann gemäß der unter angegebenen Vorschrift zusammenpipettiert und sofort gegossen.

80 ml	Acrylamidvormix
223 µl	25 % ige APS-Lösung
28 µl	TEMED

Nach der Polymerisation über Nacht wurde das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt und die Pufferreservoirs mit TBE-Puffer aufgefüllt. Die Vorelektrophorese wurde konstant bei 3000 V und einer Temperatur von 45–50°C über 30–40 min durchgeführt. Zum Laden des Gels wurde die Vorelektrophorese gestoppt und alle Taschen wurden gründlich mit TBE-Puffer gespült. Nach Aufnahme der Oligonukleotid-Pellets in 5 µl Formamid-Puffer wurde das Gel beladen. Die

elektrophoretische Trennung erfolgte bei ca. 50°C und einer Spannung von 2500 V. Die Elektrophorese wurde beendet, als die Bromphenolblaufront nur noch ca. 5 cm vom unteren Rand des Gels entfernt war. In einem 10 % igen Sequenziergel markieren Bromphenolblau bzw. Xylencyanol einen Bereich zwischen 10 bp und 55 bp. Dieser Teil des Gels wurde abgetrennt, mit Diethylaminoethylcellulose-Membran sowie Filterpapier beschichtet und vorsichtig von der Glasplatte abgezogen. Das Sandwich wurde mit dem Filterpapier nach unten in den Geltrockner gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und 2 h bei einer Temperatur von 80°C im Vakuum getrocknet.

3.10.5. Detektion der radioaktiv markierten Banden

Nach Fixierung des trockenen Gels in der Imaging-Kassette wurde eine Imagingplatte aufgelegt und über ca. 5 min exponiert. Anschließend wurde die Imagingplatte entnommen und das latent gespeicherte Bild durch Bestrahlung mit Laserlicht im Imager ausgewertet.

4. ERGEBNISSE

Grundlage der durchgeführten Untersuchungen ist die ist die Tatsache, daß BD zunächst enzymatisch in DEB überführt wird. In vivo Studien von Thornton-Manning et al. (1995) an Mäusen und Ratten haben gezeigt, daß DEB als Metabolit nach inhalativer Aufnahme von BD im Blut sowie in unterschiedlichen Geweben der Tiere nachweisbar ist. Die Umsetzung von BD nach DEB erfolgt überwiegend durch das Isoenzym CYP2E1 in der Leber (Csanady et al. 1992, Duescher und Elfarra 1994, Seaton et al. 1995).
Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen war zunächst zu prüfen, ob CYP2E1 auch in der humanen Niere, im Zusammenhang mit BD als Erfolgsorgan der Kanzerogenese diskutiert, nachweisbar ist, was die Notwendigkeit einer Modifikation der These, die Leber als zentrales Organ der Bioaktivierung von BD anzusehen, zur Folge hätte. Nach Klärung dieses Sachverhalts folgen im weiteren Verlauf der Arbeit die Ergebnisse zur Aktivität von GST-Isoenzymen in der Niere.

4.1. CYP2E1 im Nierengewebe des Menschen

Die Untersuchungen bezüglich des Vorhandenseins von dem Isoenzyms CYP2E1 in der humanen Niere wurde mit Mikrosomen durchgeführt, die sowohl aus dem gesunden Gewebe als auch aus dem Tumorgewebe aller 21 Patienten isoliert wurden. Nach Trennung der in den Proben enthaltenen Proteine auf einem Polyacrylamidgel erfolgte ein Western-Blot sowie Immunodetektion. Da der verwendete Antikörper auch mit rCYP2E1 reagiert, dienten Ratten-Lebermikrosomen als positive Kontrolle. Ein meßbarer Größenunterschied zwischen dem humanen Enzym (56,85 kDa) und dem der Ratte (56,63 kDa) liegt nicht vor (Song et al. 1986).
Bei der Rattenprobe in Abb. 4 ist eine deutliche CYP2E1-Bande zu erkennen. In den Spuren der Nierenproben fehlt diese Bande. Bei keinem der untersuchten 21 Patienten trat diese Bande weder im gesunden Gewebe noch im Tumorgewebe auf, was auf fehlende Expression von CYP2E1 in der humanen Niere hindeutet. Allerdings ist in beiden

Gewebetypen immer jeweils eine charakteristische Bande zu erkennen, die auf unterschiedlich große Proteine schließen läßt und auf Antikörper-Kreuzreaktivitäten hindeutet.

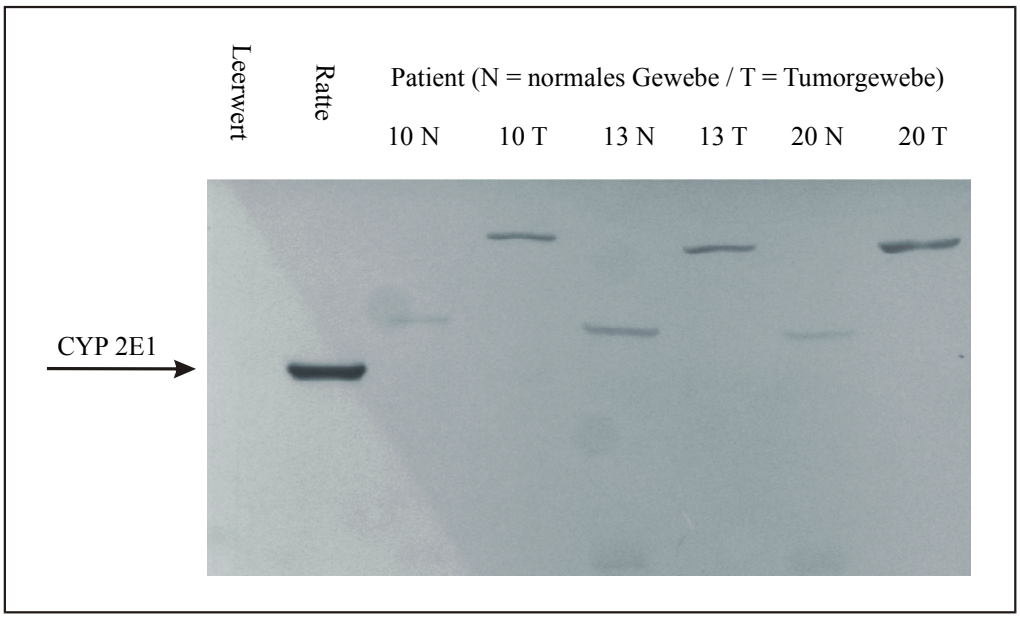

Abb. 4: Western-Blot nach vorangegangener SDS-PAGE von Mikrosomen aus humaner Niere und Rattenleber
primärer Antikörper: anti-Mensch CYP2E1 IgG aus Kaninchen
sekundärer Antikörper: anti-Kaninchen IgG aus Ziegen

4.2. Genotypisierung von polymorphen GST-Isoenzymen im Nierengewebe des Menschen

4.2.1. GSTM1

Die Bestimmung der GSTM1-Genotypen erfolgte mit Hilfe semiquantitativer Multiplex-PCR. Ein negativer GSTM1-Genotypen verteilt sich auf 52,3 % der Patienten. Von den 47,7 % mit GSTM1-positivem Genotypen trägt der größte Teil (50 %) die Allele a0. Auf die Allele aa, bb und ab entfallen je 10 % und auf die Kombination b0 20 %. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengestellt.

Genotyp		Verteilung, [%] (n)	
00		52,3 (11)	
a	a0	23,8 (5)	28,6 (6)
	aa	4,8 (1)	
b	b0	9,5 (2)	14,3 (3)
	bb	4,8 (1)	
ab		4,8 (1)	

Tab. 6: Verteilung der GSTM1-Genotypen in dem Patientenkollektiv

4.2.2. GSTM3

Die GSTM3-Genotypisierung des Patientenkollektivs wurde mittels PCR-RFLP durchgeführt. Die Verteilung der drei Genotypen ist in Tab. 7 dargestellt.

Genotyp	Verteilung, [%] (n)
AA	71,4 (15)
AB	28,6 (6)
BB	0 (0)

Tab. 7: Verteilung der GSTM3-Genotypen in dem Patientenkollektiv

4.2.3. GSTP1

Die Untersuchung der Mutationen in Codon 105 und 114 des hGSTP1-Gens erfolgte in beiden Fällen durch PCR-RFLP. Für die Patienten sind die einzelnen hGSTP1-Genotypen sowie die sich daraus gemäß Ali-Osman et al. (1997) und Watson et al. (1998) ergebenden

Allelvarianten in Tab. 8 aufgeführt. Mindestens 47,7 % der Patienten besitzen ein in Codon 105 mutiertes Allel. Hinsichtlich der Mutation in Codon 114 sind es 28,6 %.

Genotyp (Codon 105)	Verteilung, [%] (n)	Genotyp (Codon 114)	Verteilung, [%] (n)	Allel-varianten	Verteilung, [%] (n)
ile/ile	52,3 (11)	ala/ala	71,4 (15)	AA	52,3 (11)
ile/ile		ala/val	28,6 (6)	AD	0 (0)
ile/ile		val/val	0 (0)	DD	0 (0)
ile/val	33,4 (7)	ala/ala	71,4 (15)	AB	14,3 (3)
ile/val		ala/val	28,6 (6)	AC / BD	19,1 (4)
ile/val		val/val	0 (0)	CD	0 (0)
val/val	14,3 (3)	ala/ala	71,4 (15)	BB	4,8 (1)
val/val		ala/val	28,6 (6)	BC	9,5 (2)
val/val		val/val	0 (0)	CC	0 (0)

Tab. 8: Verteilung der GSTP1-Genotypen (Codon 105 und 114) sowie der resultierenden Allelvarianten in dem Patientenkollektiv

4.2.4. GSTT1

Die Bestimmung der drei hGSTT1-Genotypen wurde mittels semiquantitativer Multiplex-PCR durchgeführt. Die Verteilung der Genotypen ist in Tab. 9 dargestellt.

Genotyp	Verteilung, [%] (n)
-/-	19,1 (4)
+/-	33,2 (7)
+/+	47,7 (10)

Tab. 9: Verteilung der GSTT1-Genotypen in dem Patienten-kollektiv

4.2.5. Zusammenfassung der Genotypisierungen

In Tab. 10 sind die mit Hilfe von PCR-Techniken ermittelten Genotypen für alle bisher bekannten polymorphen GSTs mit Ausnahme der Subklasse T2 den einzelnen Patienten zugeordnet.

Patient	M1	M3	P1	T1
1	a0	AB	AA	-/-
2	00	AA	AB	-/-
3	a0	AA	AB	+/-
4	00	AB	BC	+/-
5	bb	AA	AA	+/-
6	ab	AB	AB	+/+
7	00	AA	AC / BD	+/-
8	00	AA	AA	+/+
9	00	AA	BC	+/+
10	aa	AA	AA	+/+
11	a0	AA	AA	+/+
12	a0	AB	AA	+/-
13	b0	AB	AC / BD	+/+
14	a0	AA	AA	+/+
15	00	AA	AA	+/-
16	00	AB	AC / BD	+/+
17	00	AA	AC / BD	-/-
18	b0	AA	AA	-/-
19	00	AA	BB	+/+
20	00	AA	AA	+/+
21	00	AA	AA	+/-

Tab. 10: Zusammenfassung der GST-Genotypen in dem Patientenkollektiv

4.3. Expression von GST-Isoenzymen im menschlichen Nierengewebe (gesundes Gewebe und Tumorgewebe)

4.3.1. GST α-Klasse-Aktivität gegenüber 7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol

Die gegenüber dem Substrat NBD-Cl spektralphotometrisch bestimmten GST α-Klasse-Aktivitäten sind in Abb. 5 dargestellt.

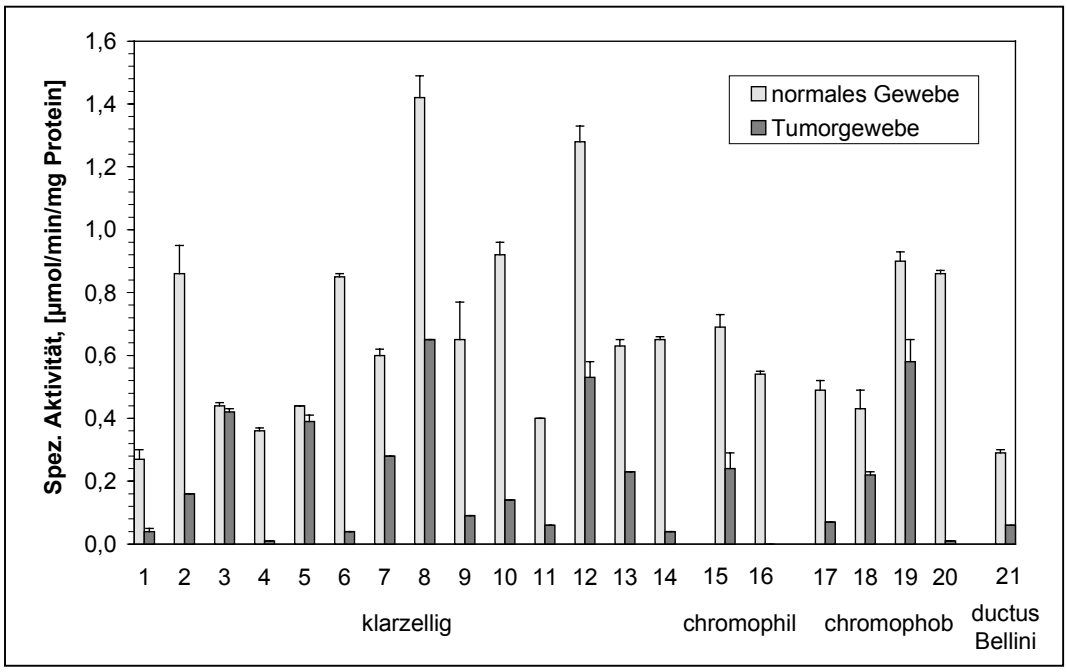

Abb. 5: Spezifische Aktivität der hGST α-Klasse gegenüber NBD-Cl in normalem Gewebe und in Tumorgewebe in Abhängigkeit der Tumorcytomorphologie

In normalem Gewebe schwankten die spezifischen Aktivitäten in einem Bereich von 0,27–1,42 µmol/min/mg Protein. Der Mittelwert betrug 0,65 µmol/min/mg Protein. Die spezifischen Aktivitäten im Tumorgewebe lagen im Bereich von 0–0,65 µmol/min/mg Protein mit dem Mittelwert 0,20 µmol/min/mg Protein. Bei allen Patienten nahm die spezifische Aktivität im Tumor im Vergleich zu dem normalen Gewebe ab. Dieser Aktivitätsverlust war statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Bei Tumoren im Stadium 3a war der Aktivitätsverlust mit 84 % ($n = 8$) am höchsten. Im Stadium 2 bzw. 3b lag er bei 63 %

(n = 7) bzw. bei 54 % (n = 5). Ein Zusammenhang zwischen den spezifischen Aktivitäten und der Cytomorphologie der Tumoren war nicht erkennbar.

4.3.2. GST µ-Klasse-Aktivität gegenüber 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol

Die Bestimmung der hGST µ-Klasse-Aktivität erfolgte spektralphotometrisch gegenüber dem Substrat DCNB (Abb. 6).

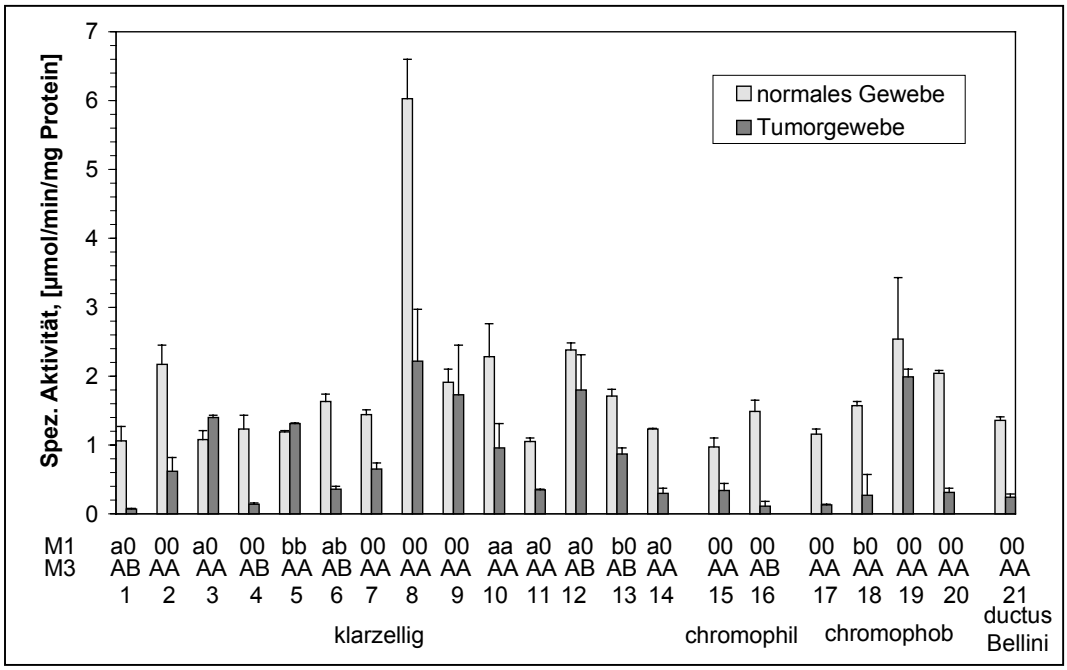

Abb. 6: Spezifische Aktivität der hGST µ-Klasse gegenüber DCNB in normalem Gewebe und in Tumorgewebe in Abhängigkeit der Tumorcytomorphologie und der GSTM1-und GSTM3-Genotypen

Die spezifischen Aktivitäten in normalem Gewebe von 0,97–6,03 µmol/min/mg Protein führten zu dem Mittelwert von 1,78 µmol/min/mg Protein. Im Tumorgewebe variierten die spezifischen Aktivitäten von 0,07–2,22 µmol/min/mg Protein. Der Mittelwert betrug 0,77 µmol/min/mg Protein. Mit Ausnahme von 2 Proben war die spezifische Aktivität in allen Fällen im Tumorgewebe erniedrigt. Der Aktivitätsverlust war statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Eine Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von dem Stadium des Tumors oder der Tumorcytomorphologie war nicht erkennbar. Bezüglich der Genotypen war auffallend, daß die spezifische Aktivität der hGSTM1-negativen Patienten (n = 11) mit

2,03 µmol/min/mg Protein im Vergleich zu 1,52 µmol/min/mg Protein bei den hGSTM1-positiven (n = 10) trotz Fehlens der Subklassen-Aktivität um 25 % erhöht war.

4.3.3. GSTP1-1-Aktivität

4.3.3.1. Substrat Ethacrynsäure

Die GSTP1-1-Aktivitätsbestimmung gegenüber dem Substrat EA erfolgte spektralphotometrisch (Abb. 7). In normalem Gewebe schwankten die spezifischen Aktivitäten von 2,4–12,2 nmol/min/mg Protein mit 6,5 nmol/min/mg Protein als Mittelwert. Die spezifischen Aktivitäten im Tumorgewebe lagen im Bereich von 1,2–6,6 nmol/min/mg Protein. Der Mittelwert betrug 3,6 nmol/min/mg Protein. Bei 18 der 21 Patienten war die spezifische Aktivität im Tumorgewebe verringert. Der Aktivitätsverlust war statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Ein Zusammenhang zwischen der enzymatischen Aktivität und dem Stadium des Tumors bzw. seiner Cytomorphologie war nicht zu sehen. Zimniak et al. (1994) fanden bei rekombinant exprimierter hGSTP1-1 mit der Mutation in Codon 105 eine höhere spezifische Aktivität gegenüber EA als bei rekombinanten Wildtyp-GST. Dementsprechend wurden die spezifische Aktivität in normalem Gewebe von den Patienten, die den homozygoten Wildtyp in beiden Codons tragen, also mit Allelvariante AA (n = 11), mit dem Patienten, der in Codon 105 homozygot mutiert ist und zugleich den homozygoten Wildtyp in Codon 114 besitzt, Allelvariante BB (n = 1), verglichen. Bei den Patienten mit der Allelvariante AA betrug der Mittelwert der spezifischen Aktivität 6,3 (± 3,0) nmol/min/mg Protein, bei dem Patienten mit der Allelvariante BB war die spezifische Aktivität 8,7 nmol/min/mg Protein und somit um 38 % erhöht. Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Standardabweichung der spezifischen Aktivität in der ersten Gruppe mit ca. 50 % relativ hoch ist und die zweite Gruppe nur aus einem einzigen Patienten besteht.

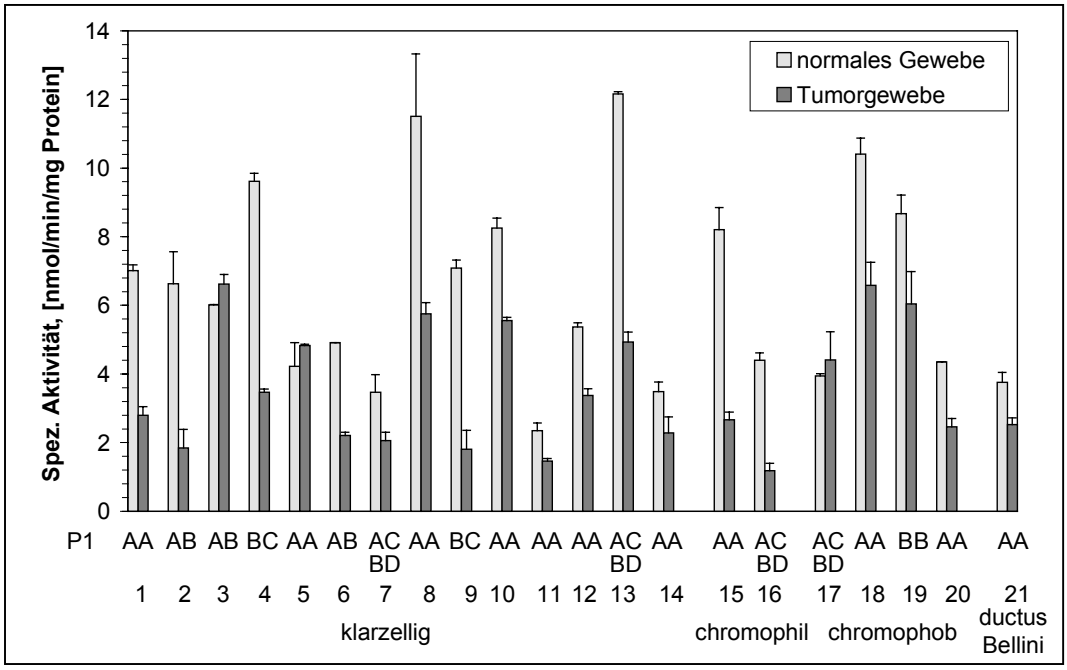

Abb. 7: Spezifische Aktivität der hGSTP1-1 gegenüber EA in normalem Gewebe und in Tumorgewebe in Abhängigkeit der Tumorcytomorphologie und der GSTP1-Allelvarianten

4.3.3.2. Substrat 4-Vinylpyridin

Mit dem Substrat VP wurde die Bestimmung der GSTP1-1-Aktivität spektralphotometrisch durchgeführt (Abb. 8). In normalem Gewebe schwankten die spezifischen Aktivitäten von 15,2–50,4 nmol/min/mg Protein. 25,5 nmol/min/mg Protein betrug der Mittelwert. Die spezifischen Aktivitäten im Tumorgewebe lagen im Bereich von 5,8–54,0 nmol/min/mg Protein mit dem Mittelwert 21,4 nmol/min/mg Protein. Bei 7 der 21 Patienten war die spezifische Aktivität im Tumorgewebe nicht verringert. Besonders traten hierbei die Tumoren mit chromophob-zelliger Cytomorphologie in Erscheinung. Der unter Berücksichtigung aller Patienten resultierende Aktivitätsverlust war statistisch nicht signifikant ($p = 0{,}1943$). Eine Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von dem Stadium des Tumors war nicht erkennbar. Ein Vergleich der spezifischen Aktivität von Patienten

mit der Allelvariante AA mit dem mit der Allelvariante BB (vgl. Kap. 4.3.3.1.) führte gegenüber dem Substrat EA zu keinen nennenswerten Unterschieden.

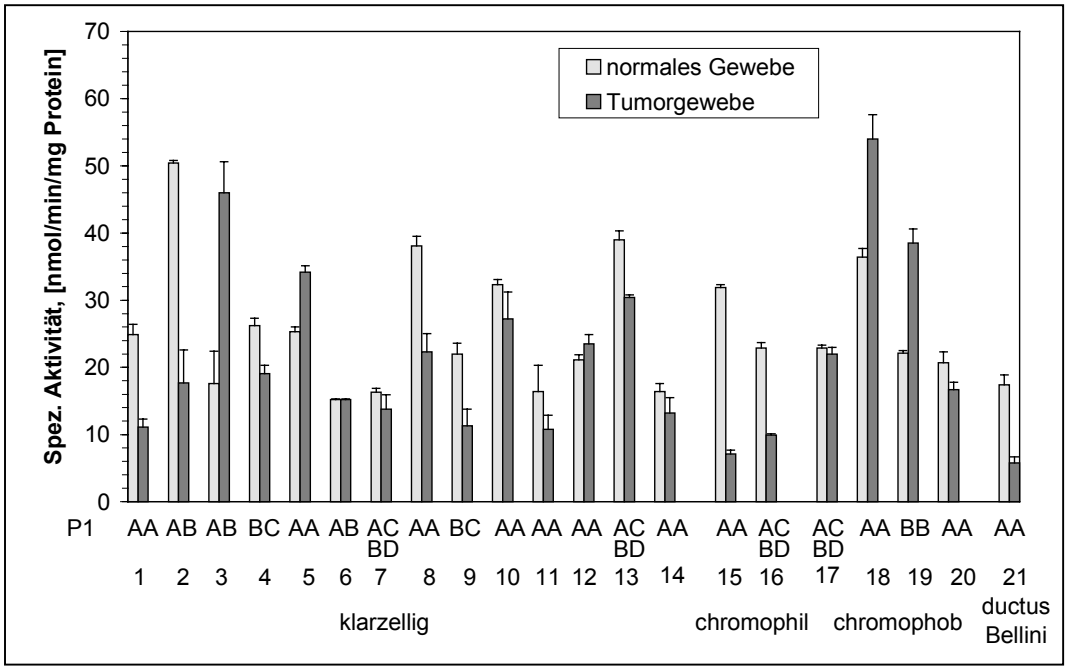

Abb. 8: Spezifische Aktivität der hGSTP1-1 gegenüber VP in normalem Gewebe und in Tumorgewebe in Abhängigkeit der Tumorcytomorphologie und der GSTP1-Allelvarianten

4.3.4. GSTT1-1-Aktivität gegenüber Methylchlorid

Die Bestimmung der hGSTT1-1-Aktivität erfolgte gaschromatographisch gegenüber dem Substrat MC (Abb. 9). In normalem Gewebe zeigte sich aufgrund des Gendeletion-Polymorphismus eine Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von dem Genotyp mit drei daraus resultierenden Phänotypen. Den Trägern keines funktionellen Allels (-/-), sogenannten nicht-Konjugierern (NK), fehlt jegliche enzymatische Aktivität. Schnelle Konjugierer (SK) besitzen zwei funktionelle Allele (+/+) und damit eine höhere enzymatische Aktivität als die heterozygoten langsame Konjugierer (LK) mit nur einem funktionellen Allel (+/-). Bei 2 Patienten (7 und 12) stimmten die mittels PCR ermittelten Genotypen nicht mit den sich ergebenden Phänotypen überein. Die spezifische Aktivität nahm im Tumorgewebe im Vergleich zu dem normalen Gewebe statistisch signifikant ab

($p < 0{,}0001$). Die Einteilung in Phänotypen erfolgte ausschließlich aus den Messungen in normalem Gewebe. Ein Zusammenhang zwischen enzymatischer Aktivität und dem Stadium des Tumors bzw. seiner Cytomorphologie war nicht erkennbar.

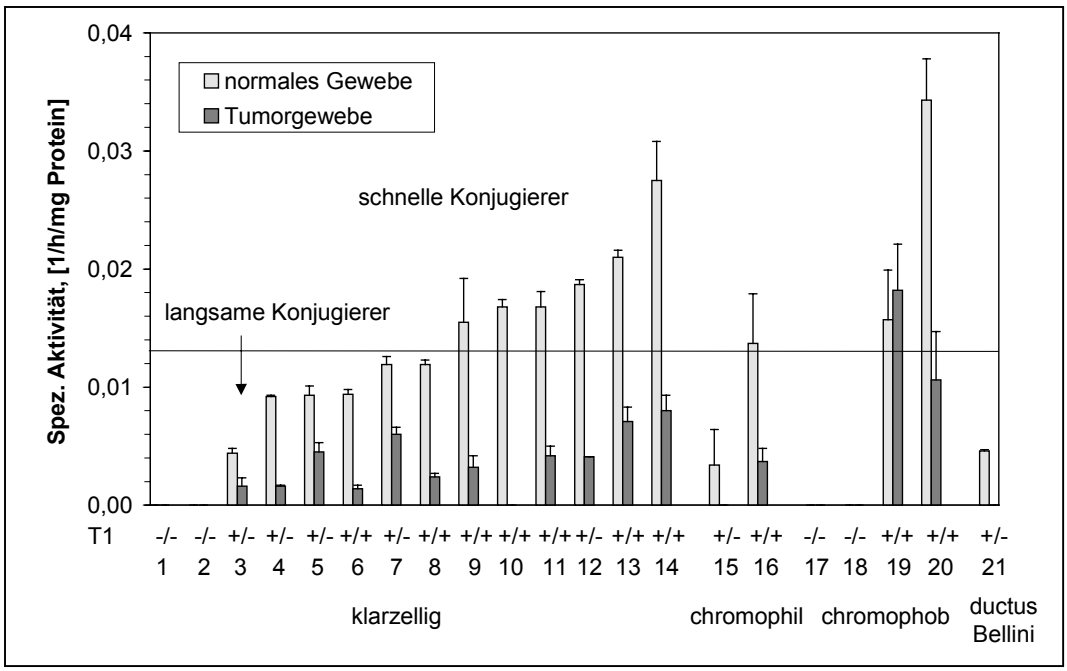

Abb. 9: Spezifische Aktivität der hGSTT1-1 gegenüber MC in normalem Gewebe und in Tumorgewebe in Abhängigkeit der Tumorcytomorphologie und des GSTT1-1-Genotyps

Daß schnelle Konjugierer die doppelte spezifische Aktivität von langsamen Konjugierern besitzen (Thier et al. 1998b), wurde durch Mittelung der Aktivitäten bestätigt (Abb. 10).

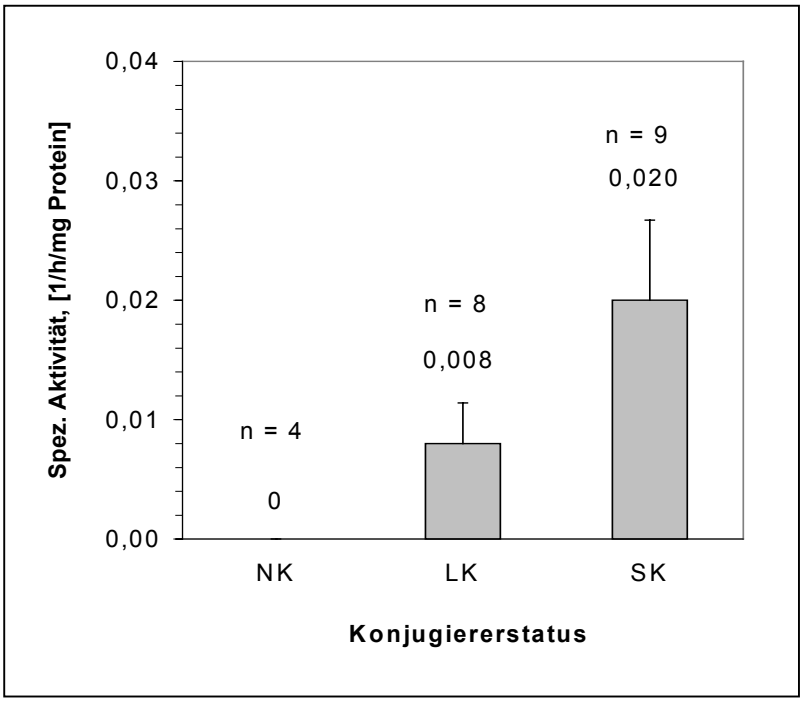

Abb. 10: Einteilung des Patientenkollektivs in hGSTT1-1-Phänotypen

4.3.5. GST-Gesamtaktivität gegenüber 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol

Bei der Bestimmung der Aktivität gegenüber CDNB, die spektralphotometrisch erfolgte, wurden die enzymatischen Aktivitäten aller in der Niere exprimierten GSTs mit Ausnahme der GSTT1-1-Aktivität in charakteristischer Weise erfaßt (Abb. 11). Die spezifischen Aktivitäten in normalem Gewebe lagen im Bereich von 0,90–7,19 µmol/min/mg Protein mit dem Mittelwert 3,32 µmol/min/mg Protein. Im Tumorgewebe variierten die spezifischen Aktivitäten von 0,32–5,04 µmol/min/mg Protein. Der Mittelwert betrug 1,81 µmol/min/mg Protein. Mit Ausnahme von 3 Patienten war die spezifische Aktivität in allen Fällen im Tumorgewebe erniedrigt. Der Aktivitätsverlust war statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Eine Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von dem Stadium des Tumors oder der Tumorcytomorphologie war nicht erkennbar. Die Aktivität gegenüber CDNB spiegelt damit die Ergebnisse von den vorherigen Aktivitätsbestimmungen der einzelnen GSTs wider.

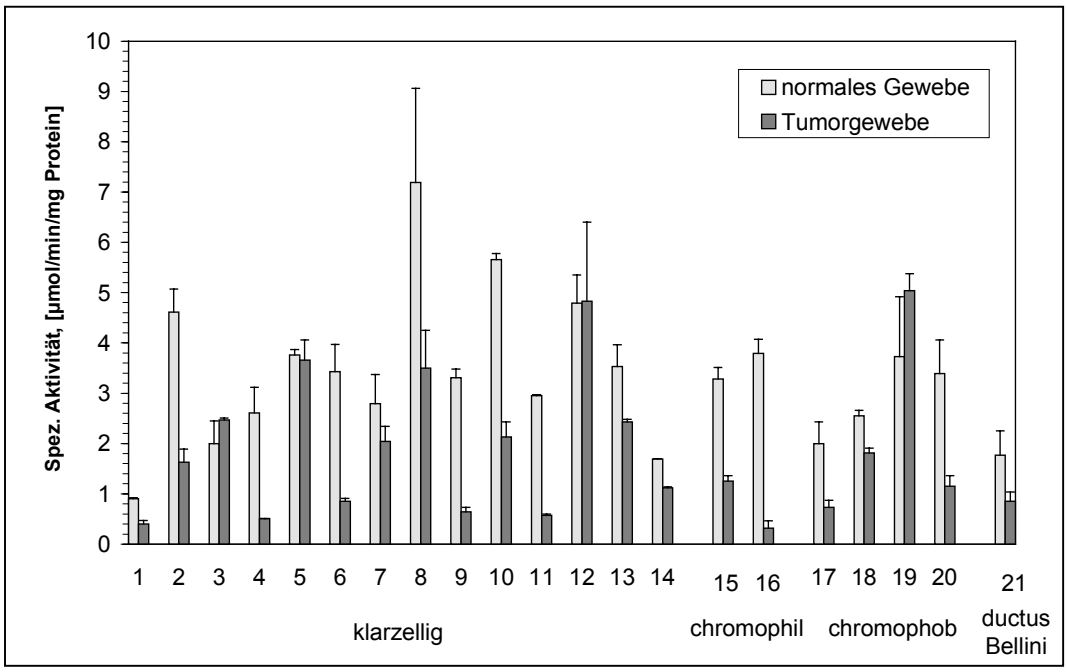

Abb. 11: Spezifische hGST-Gesamtaktivität gegenüber CDNB in normalem Gewebe und in Tumorgewebe in Abhängigkeit der Tumorcytomorphologie

4.3.6. Zusammenfassung der Aktivitätsmessungen

Bei allen untersuchten GSTs war die spezifische Aktivität im Tumorgewebe im Vergleich zu dem normalen Gewebe vermindert. In Abb. 12 sind die Aktivitätsverluste dargestellt, die mit einer Ausnahme, der hGSTP1-1-Aktivität gegenüber VP, signifikant waren. Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse bei den zwei hGSTP1-1-Substraten könnte in verschiedenen Substratspezifitäten bzw. Substratüberlappungen liegen. Die Aktivitäten der hGST α-Klasse und hGST µ-Klasse waren im Tumorgewebe um über 50 % reduziert. Der hGST-Gesamtaktivitätsverlust gegenüber CDNB von 46 % stimmte prozentual mit den Aktivitätsverlusten der untersuchten hGST-Klassen α, µ und π überein. Der gesamte GST-Aktivitätsverlust im Gewebe von Nierenzellkarzinomen erhöht sich noch um den Anteil der hGSTT1-1 und liegt somit größenordnungsmäßig um 50 %.

Ein Zusammenhang zwischen den individuell unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten und Alter sowie Geschlecht der Patienten war nicht feststellbar.

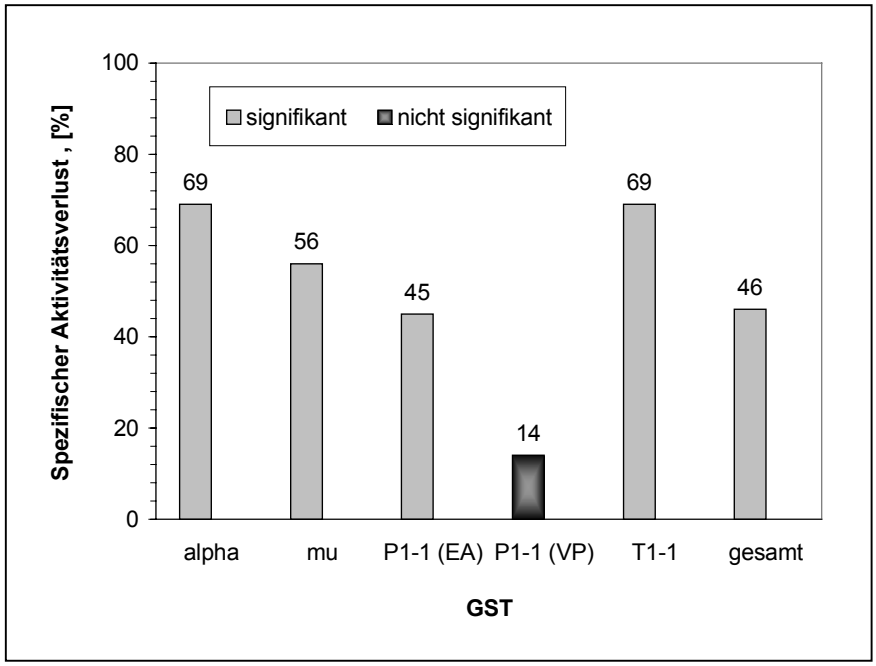

Abb. 12: Spezifische GST-Aktivitätsverluste im Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe

4.4. Aufreinigung der rekombinant exprimierten rGSTT1-1

Die Aufreinigung der rekombinant exprimierten rGSTT1-1 aus Bakteriencytosol erfolgte mit Hilfe der Affinitätschromatographie mit Orange A-Gel und Puffer C. Eluiert wurde das Enzym bei 1,0–2,5 % Glycerin im Gradienten wie spetkralphotometrische Messungen der einzelnen Eluatfraktionen gegenüber dem Substrat EPNP ergaben (Abb. 13). Ein zweiter Peak mit deutlich geringerer Aktivität gegenüber dem Substrat konnte bei 6,5–7,5 % Glycerin im Gradienten detektiert werden. Ursachen für diesen Peak können Modifikation sowie Degeneration des Proteins sein oder eine Interaktion des Substrats mit einem weiteren aus den Bakterien stammenden unbekannten Enzym.

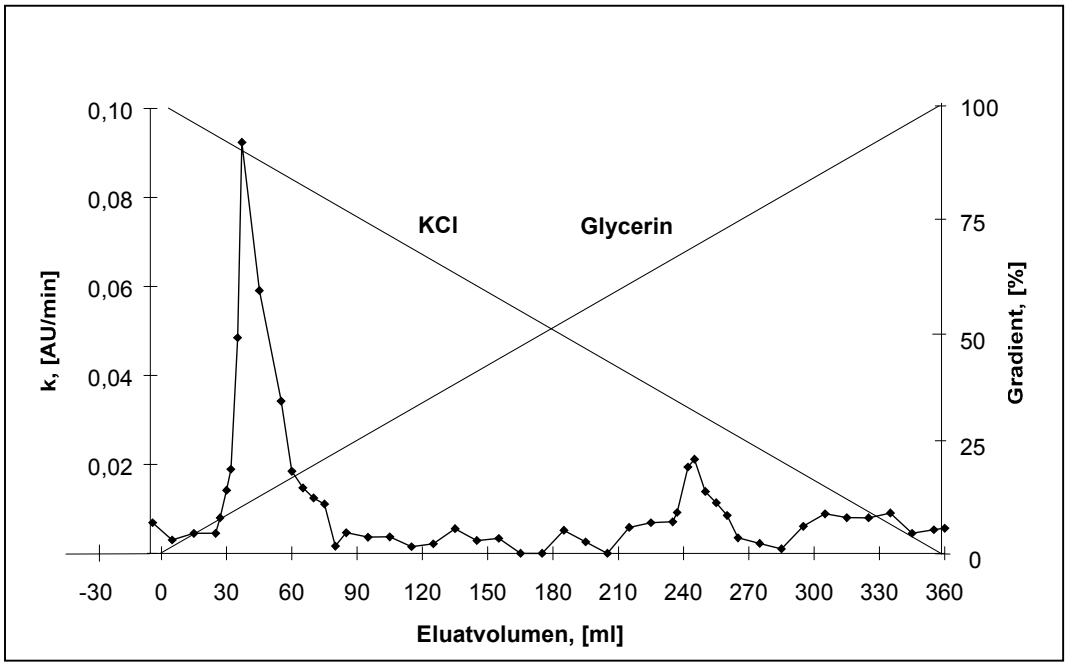

Abb. 13: Eluationsprofil der GSTT1-1 bei der Affinitätschromatographie

Vor der Dialyse wurde das Bakteriencytosol zum enzymatischen Verdau der Plasmid-DNA mit DNase I versetzt. Da die Anwesenheit von DNase im rGSTT-1-1-Konzentrat unerwünscht ist, wurden die Eluat-Fraktionen des ersten Peaks auf DNase hin überprüft. Dieses wurde durch Inkubation mit geschnittener Plasmid-DNA realisiert.

In der Spuren 4–7 in Abb. 14 sind zwei scharfe Banden zu erkennen, die von der geschnittenen Plasmid-DNA stammen. Alle anderen untersuchten Eluat-Fraktionen ergaben das gleiche Bild. Bei der Anwesenheit von DNase in den Fraktionen hätten die Banden aufgrund des enzymatischen Verdaus der DNA und dem daraus resultierenden Vorhandensein von Fragmenten jeglicher Größe eine verschmierte Gestalt gehabt. Dieses war bei der Inkubation des Bakteriencytosol vor der Affinitätschromatographie der Fall, wie die Spuren 10/11 verdeutlichen.

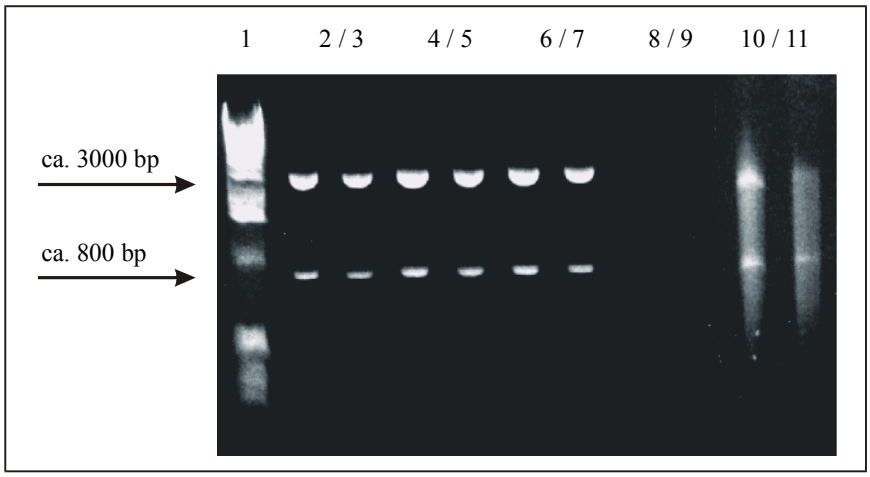

Abb. 14: Agarosegel nach vorheriger Inkubation mit der einfach geschnittenen Plasmid-DNA pSP 64
1: Molekulargewichtsmarker (1000 bp)
2/3: für die Inkubationen verwendete geschnittene Plasmid-DNA
4/5: Fraktion bei 35 ml Eluatvolumen inkubiert
6/7: Fraktion bei 42 ml Eluatvolumen inkubiert
8/9: Fraktion bei 35 bzw. 42 ml Eluatvolumen nicht inkubiert
10/11: Bakteriencytosol direkt nach der Dialyse inkubiert

Das Aufkonzentrieren der GST-aktiven und DNase-freien Eluat-Fraktionen wurde mit Hilfe von Zentrifugen-Konzentratoren durchgeführt. Die Eluatvolumina wurden auf diese Weise zu Konzentraten vereinigt (Abb. 15). Vor der Messung ihrer Aktivität gegenüber EPNP wurden diese Enzym-Konzentrate im Verhältnis 1:10 verdünnt. Durch Vergleich der Aktivität in den Konzentraten mit der Aktivität der entsprechenden Eluatvolumina in Abb. 13 läßt sich eine Proteinanreicherung von Faktor > 10 ableiten. Bezogen auf das Flüssigkeitsvolumen betrug der Anreicherungsfaktor 13.

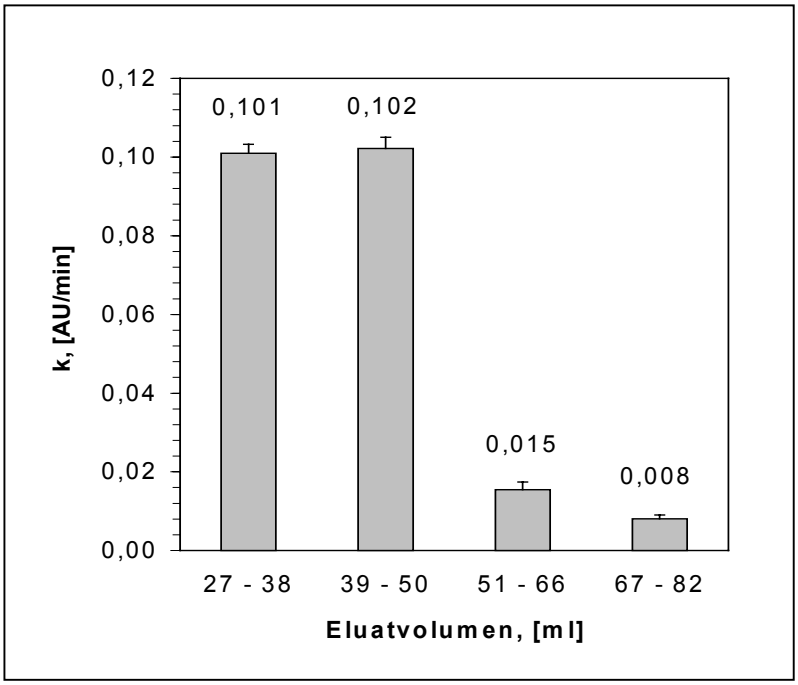

Abb. 15: rGSTT1-1-Aktivität gegenüber EPNP in den Konzentraten

4.5. Durchführung von in vitro Untersuchungen mit 1,2:3,4-Diepoxybutan

4.5.1. Reaktion von 1,2:3,4-Diepoxybutan mit Glutathion

Die Inkubationen wurden in Form von 200 µl Reaktionsansätzen sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Die Inkubationszeiten lagen bei 10 min bzw. 60 min. Unmittelbar nach Ende der Inkubationen wurden die Proben über Direktinfusion in das Massenspektrometer gegeben. Alle enzymatisch durchgeführten Inkubationen führten zur Bildung eines Produktes bei m/z 394.

Es könnte sich hierbei entweder um einen $[M]^+$-Peak eines Episulfoniumions (vgl. Kap. 1.2. Abb. 3) oder um ein $[M + H]^+$-Signal der GSH-Konjugate S-[1-(Hydroxymethyl)-2,3-epoxypropyl]-glutathion bzw. S-(2-Hydroxy-3,4-epoxybutyl)-glutathion

handeln (vgl. Kap. 1.2. Abb. 2). Mögliche $[M + H]^+$-Ionen mit m/z 412, die aufgrund von Epoxidhydrolyse entstehen, wurden in keinem Inkubationsansatz detektiert.

Die Signale bei m/z 394 waren für die nicht-enzymatischen Inkubationen nur bei DEB-Konzentrationen von 1 mM und 5 mM nachweisbar. In Abb. 16 ist das Massenspektrum eines enzymatischen Reaktionsansatzes dargestellt.

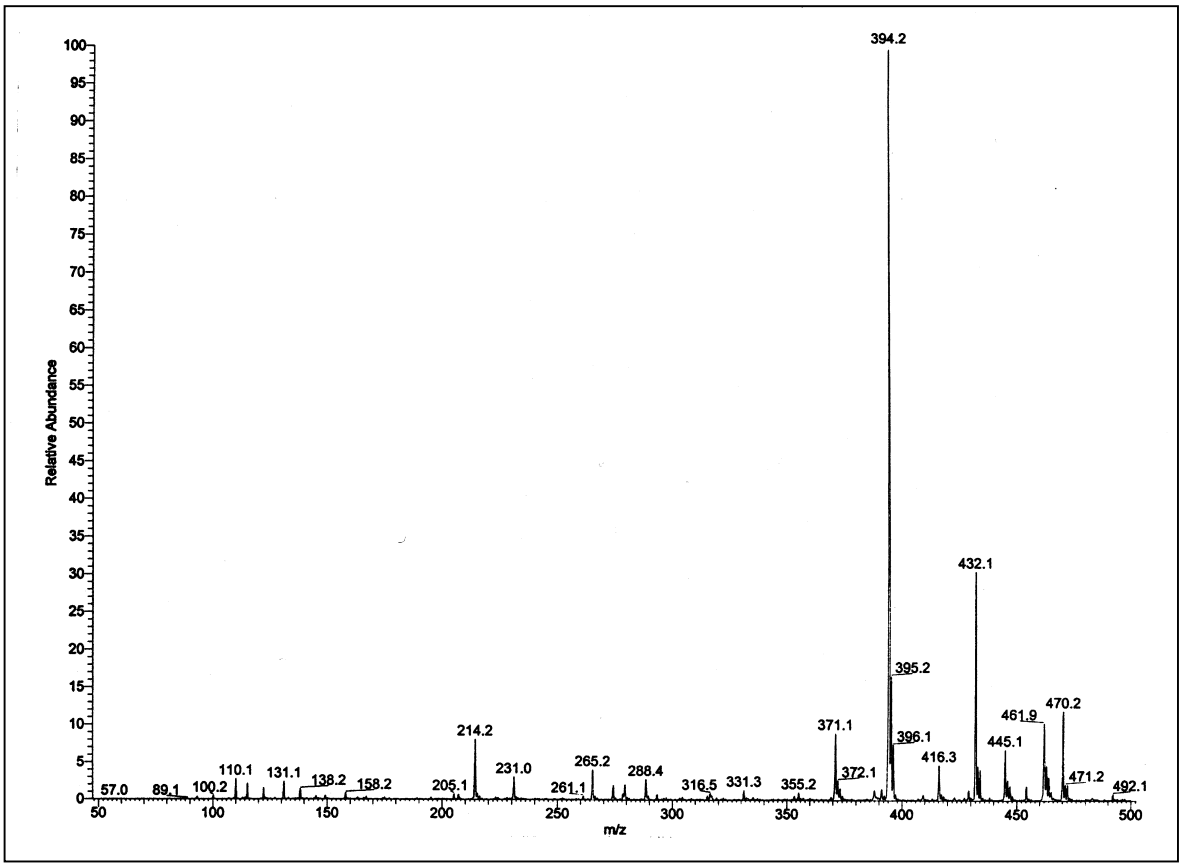

Abb. 16: Massenspektrum nach enzymatischer Inkubation über 10 min von 5 mM DEB mit 1 mM GSH

Die quantitative Betrachtung des Massenpeaks 394 zeigte für beide untersuchten GSH-Konzentrationen in enzymatisch durchgeführten Inkubationsansätzen eine linear von der DEB-Konzentration abhängige Konjugatbildung (Abb. 17 und 18).

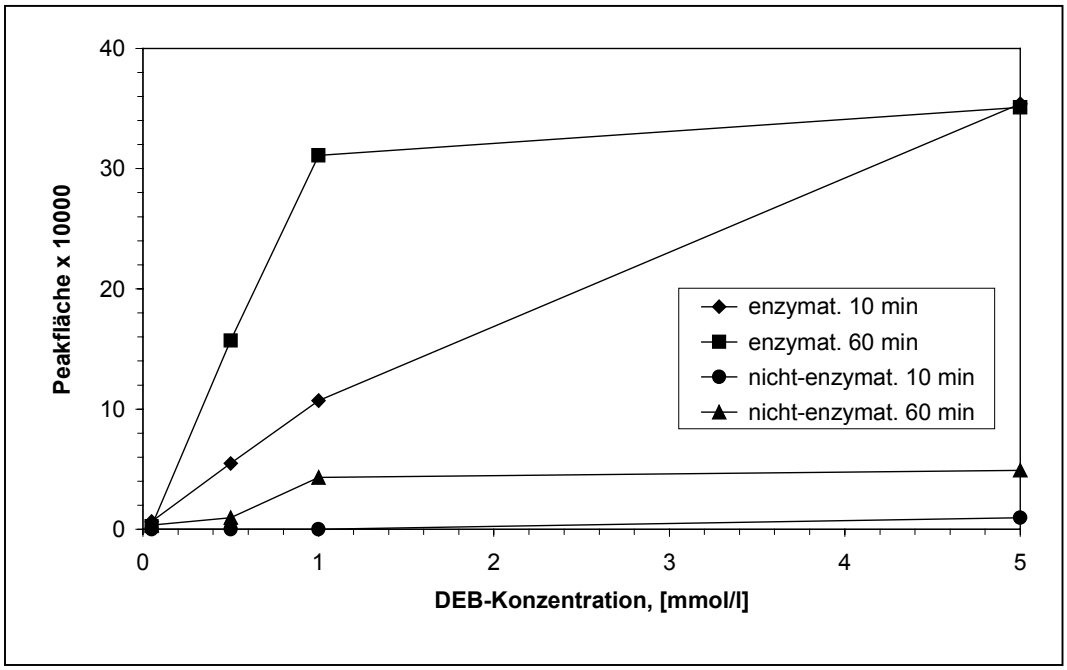

Abb. 17: Bildung eines GSH-Konjugats mit der Massenzahl 394 bei 1 mM GSH in Abhängigkeit der DEB-Konzentration

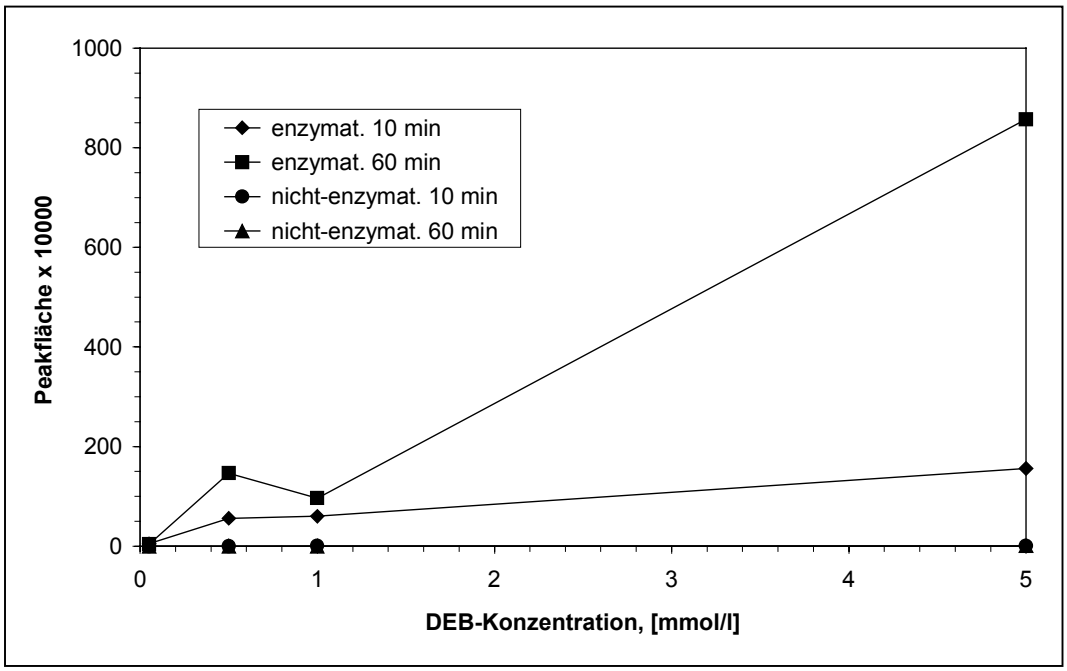

Abb. 18: Bildung eines GSH-Konjugats mit der Massenzahl 394 bei 10 mM GSH in Abhängigkeit der DEB-Konzentration

Bei der niedrigen GSH-Konzentration von 1 mM (Abb. 17) wurde im Falle der enzymatischen Inkubation über 60 min ab einer DEB-Konzentration von 1 mM die Linearität durch das Erreichen eines Plateaus beendet. Der Grund hierfür bestand in dem Verbrauch von GSH. Dieses wurde im Massenspektrum durch das Fehlen des $[M + H]^+$-Peaks von GSH bei m/z 308 bestätigt. Desweiteren konnte durch Erhöhung der DEB-Konzentration auf 5 mM nur ein unwesentlicher Anstieg der Konjugatbildung erreicht werden. Unter diesen Bedingungen lag GSH somit nicht mehr in der Sättigung vor, und die Reaktion war nicht mehr 0. Ordnung. Bei der hohen GSH-Konzentration von 10 mM (Abb. 18) erstreckte sich die Linearität der Konjugatbildung über den gesamten untersuchten DEB-Konzentrationsbereich. Nach linearer Regression ergab sich, daß die Steigung bzw. die Zunahme der Konjugatbildung nach 60 min Inkubationszeit mit 170 Flächeneinheiten/mmol auch ungefähr sechsmal so hoch war wie nach 10 min mit 27 Flächeneinheiten/mmol.

Um zu untersuchen, ob der Peak bei m/z 394 mehrere Reaktionsprodukte auf sich vereint, wurde der massenspektroskopischen Detektion mittels SIM eine flüssigchromatographische Trennung in Form von µHPLC vorangestellt. In Abb. 19 ist das Chromatogramm einer enzymatischen Inkubation von 5 mM DEB und 1 mM GSH für den Peak bei m/z 394 dargestellt. Die chromatographische Trennung zeigte die Existenz von zwei Reaktionsprodukten. Das Hauptprodukt erschien unter den in Kap. 3.8.3. (a) aufgeführten Bedingungen bei einer Retentionszeit von 8,2 min. Das Nebenprodukt konnte nach 4,6 min detektiert werden.

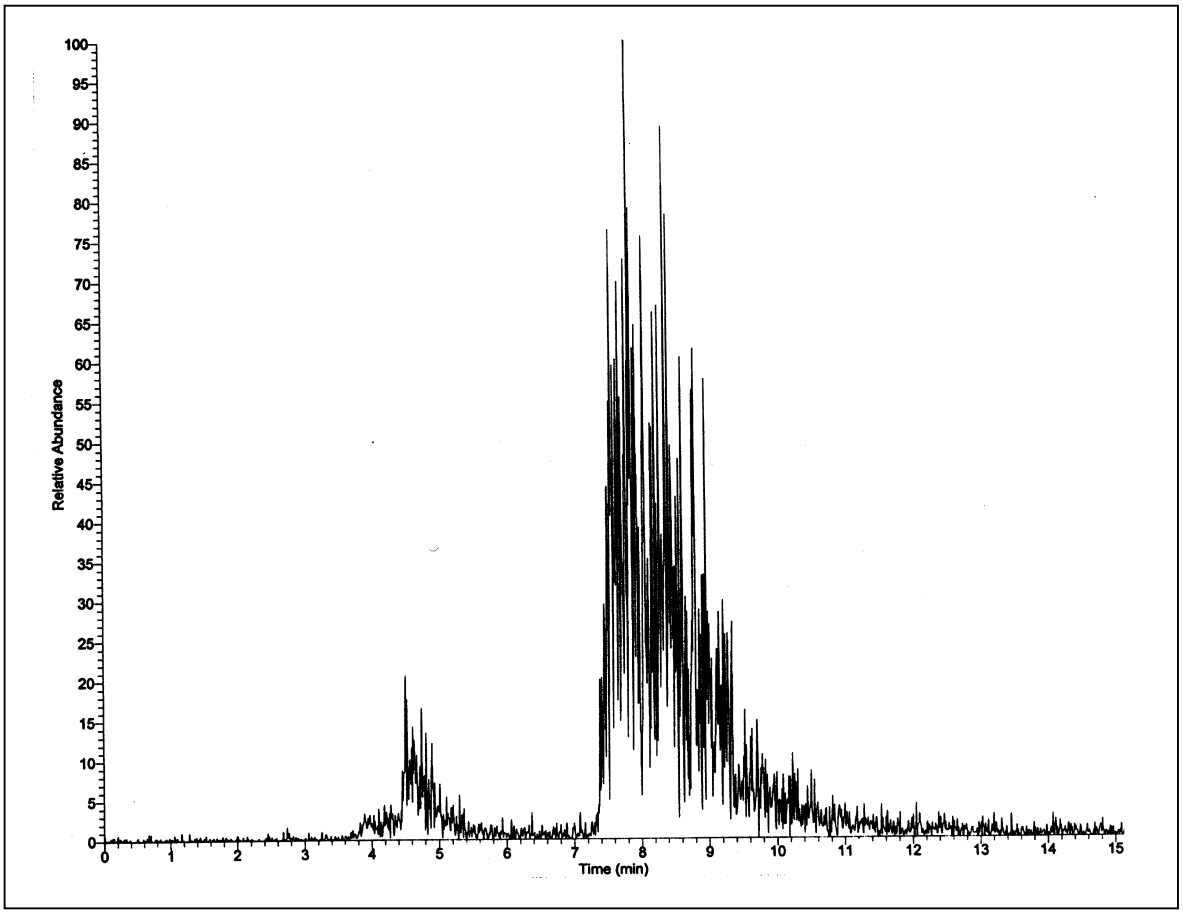

Abb. 19: Chromatogramm nach enzymatischer Inkubation über 10 min von 5 mM DEB und 1 mM GSH detektiert mittels MS-SIM für m/z 394

Um strukturelle Informationen über die beiden Reaktionsprodukte zu erlangen, wurden die in der Ionenfalle eingefangenen Ionen mit m/z 394 nach entsprechender Stoßaktivierung in charakteristischer Weise fragmentiert. Abb. 20 und 21 zeigen Stoßspektren des Hauptproduktpeaks. Im MS^2 erfolgte eine Fragmentierung von GSH, indem der Glutaminsäure- sowie der Glycinrest abgespalten wurden. Darüber hinaus kam es zu Abspaltungen von Amino- und Carboxylgruppe der Glutaminsäure (Abb. 20).

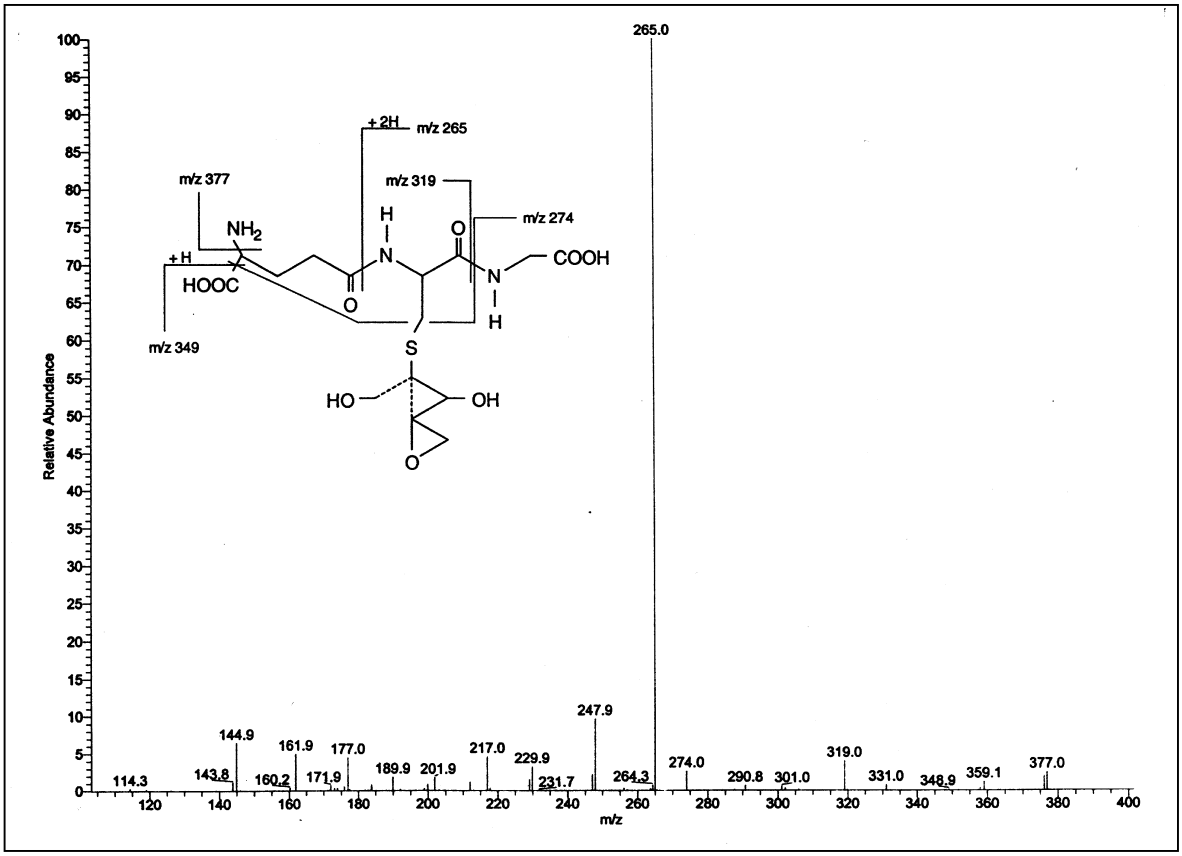

Abb. 20: MS^2 von dem Molekülionenpeak des Hauptproduktes bei m/z 394 nach chromatographischer Trennung

Von dem intensivsten Fragment mit m/z 265 wurde ein MS^3 aufgenommen. Die Zuordnung der Fragmente zu den Peaks ist Abb. 21 zu entnehmen. Das Fragment bei m/z 230 war vermutlich das Resultat der Abspaltung der Hydroxygruppe von dem Fragment bei m/z 248. Aus diesem Fragment bildeten sich auch die Ionen mit m/z 217 und 162, die strukturelle Informationen lieferten. Das Ion mit m/z 217 entstand durch Abspaltung der CH_2OH-Gruppe des gestrichelt dargestellten DEB-Restes. Eine derartige Fragmentierung erscheint nur bei einem GSH-Konjugat mit Bindungsstelle am C2 sinnvoll. Das Ion mit m/z 162 war das dominierende Tochterion eines MS^4 des Fragments bei m/z 248 (nicht abgebildet). Dieses Ion konnte durch komplette Abspaltung des normal dargestellten DEB-Restes gebildet werden, was eher auf ein GSH-Konjugat mit der Bindungsstelle am C1 hindeutet. Es scheint also so, als bildeten sich hauptsächlich am C1-, aber auch am C2-

gebundene Konjugate von DEB mit GSH, die unter den chromatographischen Bedingungen als ein Peak erscheinen.

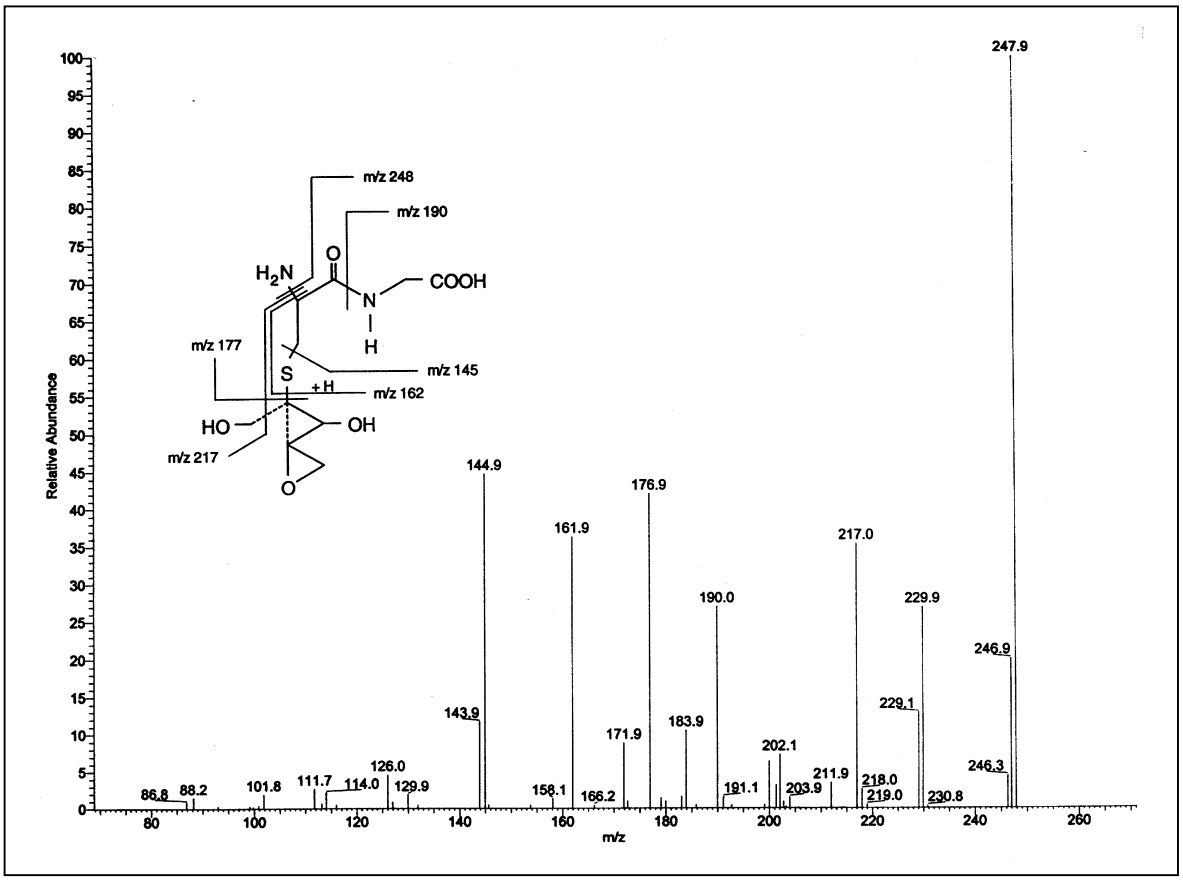

Abb. 21: MS^3 von dem intensivsten Tochterion des Hauptproduktes bei m/z 265 nach chromatographischer Trennung

Der Molekülionenpeak des Nebenproduktes der chromatographischen Trennung (Abb. 19) wurde ebenfalls mittels MS^2 untersucht. Das Stoßspektrum ist in Abb. 22 dargestellt. Das Fragmentierungsmuster unterscheidet sich deutlich von dem des Hauptproduktes (vgl. Abb. 20). Das für das Hauptprodukt charakteristische Tochterion bei m/z 265 konnte nicht detektiert werden, wohl aber die daraus resultierenden Fragmente mit m/z 177 und 145. Die durch GSH-Zerfall entstehenden Ionen bei m/z 377, 349, 319 und 274 konnten auch für das Nebenprodukt beobachtet werden. Zusätzlich traten Ionen mit m/z 359, 301 und 247 auf, deren Entstehung nicht nachvollziehbar ist. Obwohl die Struktur des Nebenproduktes unklar ist, gibt das Fragmentierungsmuster genauso wie beim Hauptprodukt keinerlei Hinweise für die Bildung eines Episulfoniumions.

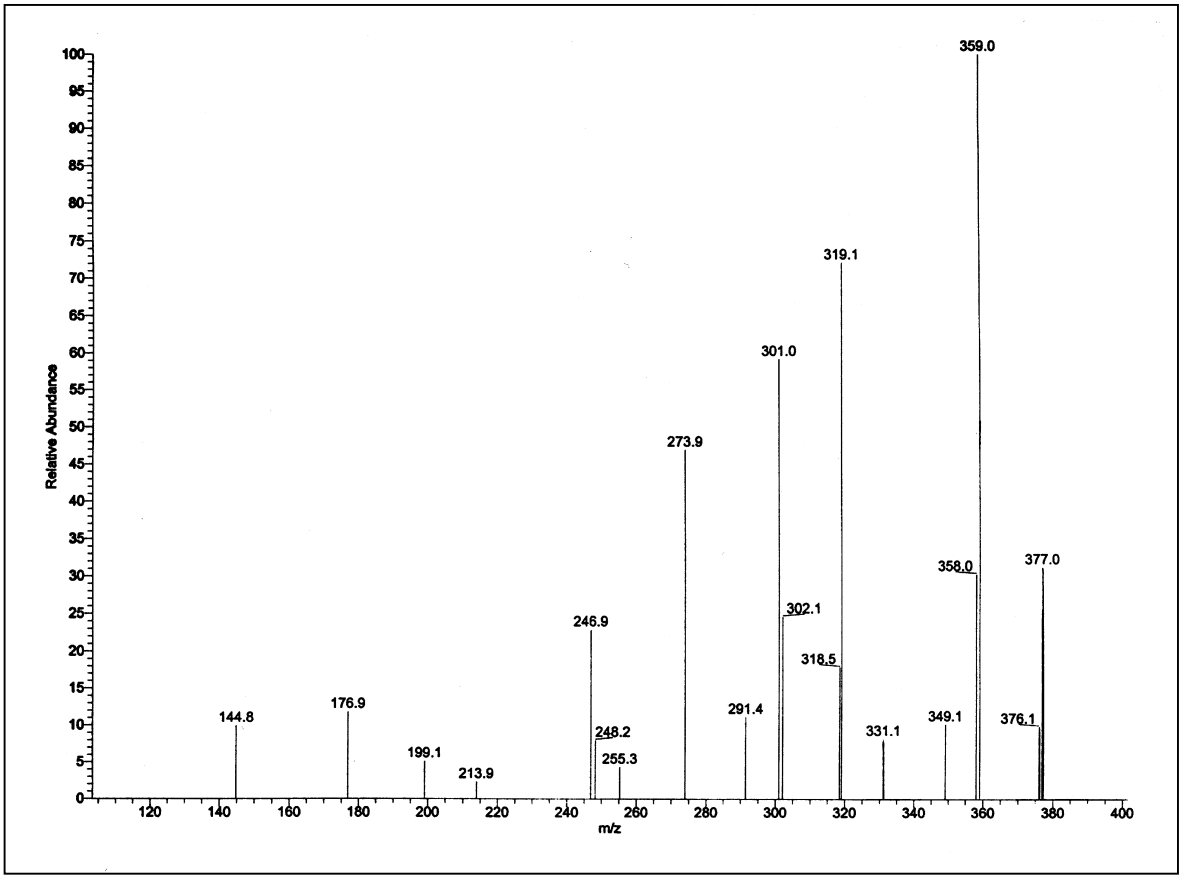

Abb. 22: MS^2 von dem Molekülionenpeak des Nebenproduktes bei m/z 394 nach chromatographischer Trennung

Bei dem entsprechenden Reaktionsansatz (Inkubation von 5 mM DEB und 1 mM GSH über 10 min), aber unter nicht-enzymatischen Bedingungen ließen sich im Chromatogramm mittels MS-SIM für m/z 394 die beiden Peaks ebenfalls detektieren. Das Intensitätsverhältnis der zwei Peaks war genauso wie bei der enzymatischen Reaktion.

Die genaue Struktur der gebildeten GSH-Konjugate wurde mit Hilfe der ^{13}C-NMR-Spektroskopie ermittelt. Um für die Messung ausreichend Produkt zu erhalten, wurden die Inkubationen über einen Zeitraum von 30 min bei höheren DEB- und GSH-Konzentrationen durchgeführt. Der unmittelbar folgenden Lyophilisation der Proben ging bei den enzymatischen Inkubationen noch eine Methanol-Proteinfällung voraus. Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte in deuteriertem Wasser mit TSP als externem Standard. Wie die markierten Signale des ^{13}C-NMR-Spektrums in Abb. 23 zeigen, fand die

GSH-Konjugatbildung am C1 des DEB statt. Darüber hinaus kam es zu einer Hydrolyse des Epoxids. Die weiteren nicht markierten Signale stammten überwiegend von nicht umgesetztem GSH.

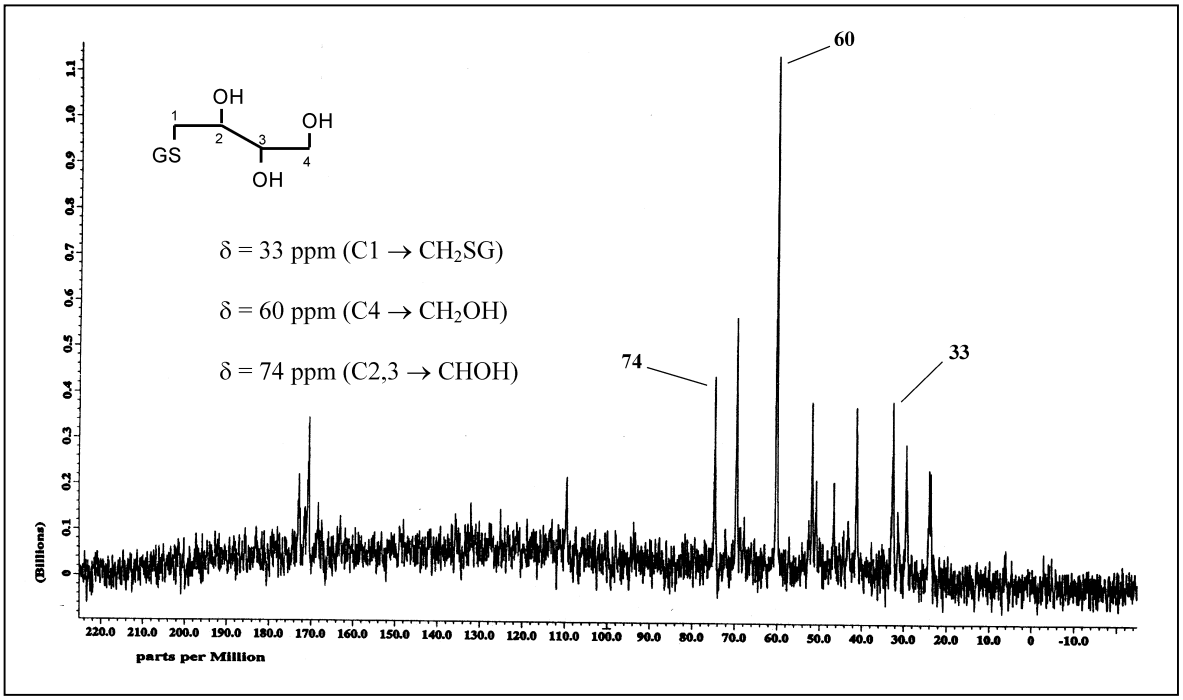

Abb. 23: ^{13}C-NMR-Spektrum nach enzymatischer Inkubation über 30 min von 50 mM DEB und 20 mM GSH

In Abb. 24 ist ein ^{13}C-NMR-DEPT-Spektrum für eine nicht-enzymatisch durchgeführte Inkubation dargestellt. Mit Hilfe dieser Aufnahmetechnik lassen sich CH-Gruppen (positive Signale) von CH_2-Gruppen (negative Signale) unterscheiden. Der Peak bei einer chemischen Verschiebung von 33 ppm zeigt, daß die GSH-Bindung an ein endständiges Kohlenstoffatom des DEB erfolgte (vgl. Abb. 23). Die übrigen drei markierten Signale unterstrichen diese Form der Produktbildung. Der Grund dafür, daß das GSH-Konjugat bei der nicht-enzymatischen Reaktion als Epoxid detektiert werden konnte, liegt wahrscheinlich an dem fehlenden Proteinfällungsschritt.

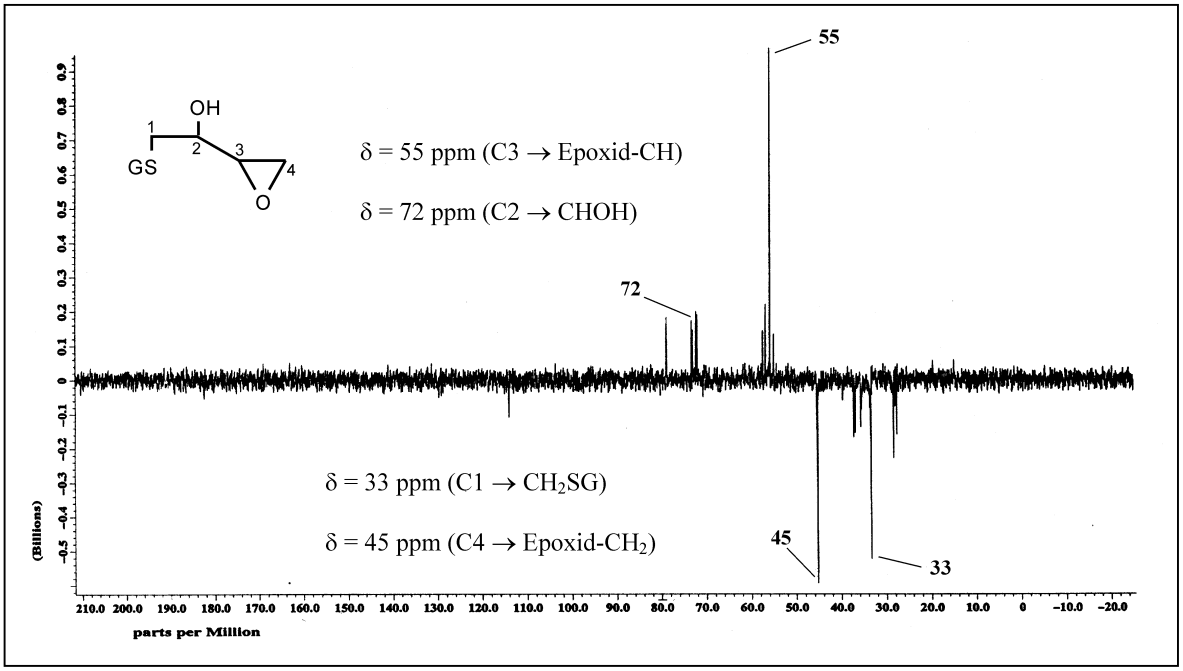

Abb. 24: ^{13}C-NMR-DEPT-Spektrum einer nicht-enzymatischen Inkubation über 30 min von 50 mM DEB und 20 mM GSH

Die ^{13}C-NMR-Spektren verdeutlichen, daß sowohl für enzymatisch als auch für nicht-enzymatisch durchgeführte Reaktionen die Konjugatbildung zwischen DEB und GSH am endständigen Kohlenstoffatom des DEB stattfindet, was zur Bildung von S-(2-Hydroxy-3,4-epoxybutyl)-glutathion führt. Eine zusatzliche Bildung von geringen Mengen S-[1-(Hydroxymethyl)-2,3-epoxypropyl]-glutathion mit Konjugatbildung am C2 des DEB ist gerade auch wegen der massenspektroskopischen Hinweise wahrscheinlich.

4.5.2. Reaktion von 1,2:3,4-Diepoxybutan mit Glutathion und 2‘-Deoxy-guanosin

Die Inkubationen wurden enzymatisch in 200 µl Reaktionsansätzen über 10 min bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Unmittelbar nach Ende der Inkubationen wurden die Proben über Direktinfusion in das Massespektrometer gegeben. Die bei den Inkubationen charakteristischen Ionen sind in dem Massenspektrum in Abb. 25 dargestellt.

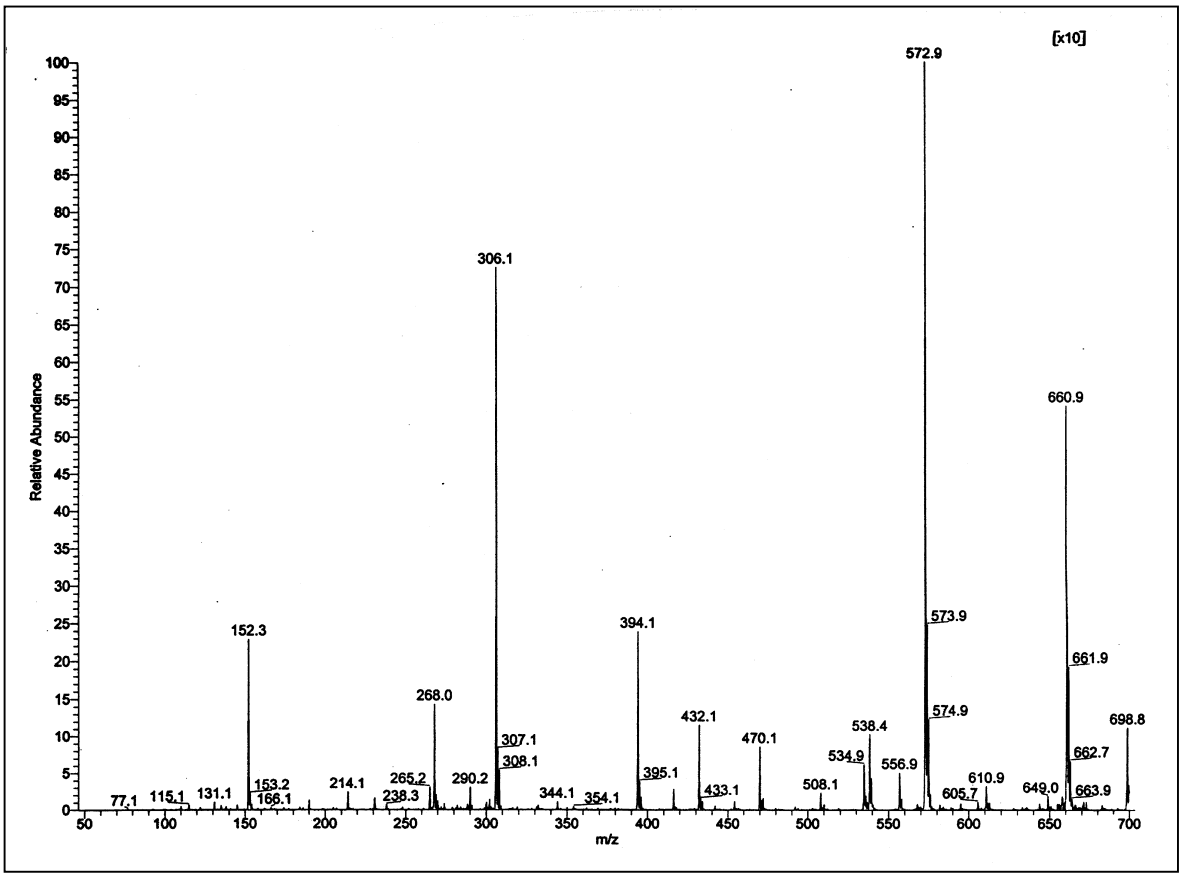

Abb. 25: Massenspektrum nach enzymatischer Inkubation über 10 min von 5 mM DEB, 2,5 mM dGuo und 1 mM GSH

Folgende Ionen konnten identifiziert werden:

a) nicht umgesetzte Edukte

m/z 268 → $[M + H]^+$ von dGuo

m/z 535 → $[M + H]^+$ eines dGuo-Dimers

m/z 308 → $[M + H]^+$ von GSH

m/z 575 → $[M + H]^+$ eines dGuo-GSH-Dimers

b) gebildete Produkte

m/z 394 → $[M + H]^+$ von DEB-GSH-Konjugaten (vgl. Kap. 4.5.1.)

m/z 573 → $[M]^+$ eines möglichen dGuo-GSH-Adduktes

m/z 661 → $[M]^+$ eines möglichen dGuo-DEB-GSH-Adduktes

c) gebildete Fragmente

m/z 306 → $[M]^+$ von GS^+

m/z 152 → $[M + H]^+$ des Guaninrestes

Das Signal bei m/z 661 konnte bei allen Inkubationen außer denen mit einer DEB-Konzentration von 0,05 mM beobachtet werden. Das MS^2-Spektrum des Ions lieferte keine zur Aufklärung der Struktur hilfreichen Fragmente. Bei ähnlichen Versuchen mit den ebenfalls bifunktionellen Substanzen 1,2-Dichlorethan (Rannug et al. 1978, Huang et al. 1998) bzw. 1,2-Dibromethan (Ozawa und Guengerich 1983, Koga et al. 1986, Foureman und Reed 1987, Huang et al. 1998) konnte das Addukt S-[2-(N7-Guanyl)-ethyl]-glutathion nachgewiesen werden. Den Beweis für die intermediäre Bildung eines Episulfoniumions lieferten Peterson et al. (1988). In analoger Weise könnte für die Reaktion von DEB, GSH und dGuo die Bildung des Adduktes S-[1-(N7-Guanosinyl)-3,4-dihydroxybutyl]-glutathion postuliert werden. Die Struktur des entsprechenden bei m/z 661 detektierten Ions zeigt die Abb. 26.

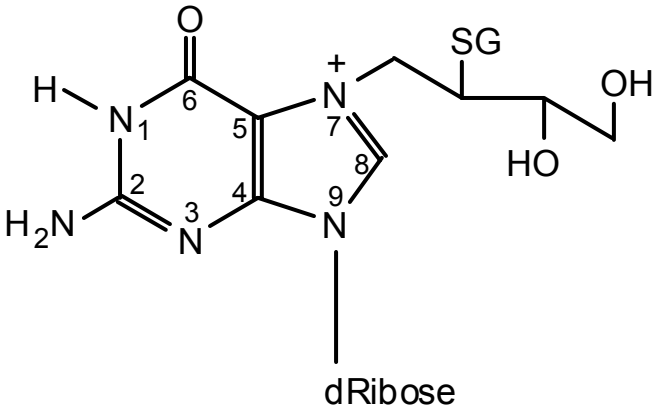

Abb. 26: Strukturvorschlag für ein DEB-GSH-Addukt an dGuo

Da ein Episulfoniumion durch Ringöffnung über die Bildung eines primären bzw. sekundären Carbokations mesomeriestabilisiert ist, kann die Bindung auch zwischen dem N7 des dGuo und dem sekundären Carbokation am C2 erfolgen, was zu dem weiteren Addukt S-[2-(N7-Guanosinyl)-3,4-dihydroxybutyl]-glutathion führen würde. Weil nach LC-MS-Kopplung kein Produkt mehr detektiert werden konnte, war eine Aussage bezüglich der Anzahl bzw. des Verhältnisses gebildeter Addukte nicht möglich.

Die Untersuchung des Signals bei m/z 573 und damit eines möglichen dGuo-GSH-Adduktes erfolgte durch Inkubationen ohne Zugabe von DEB. In Abb. 27 und 28 sind die Massenspektren für enzymatisch bzw. nicht-enzymatisch durchgeführte Inkubationen dargestellt.

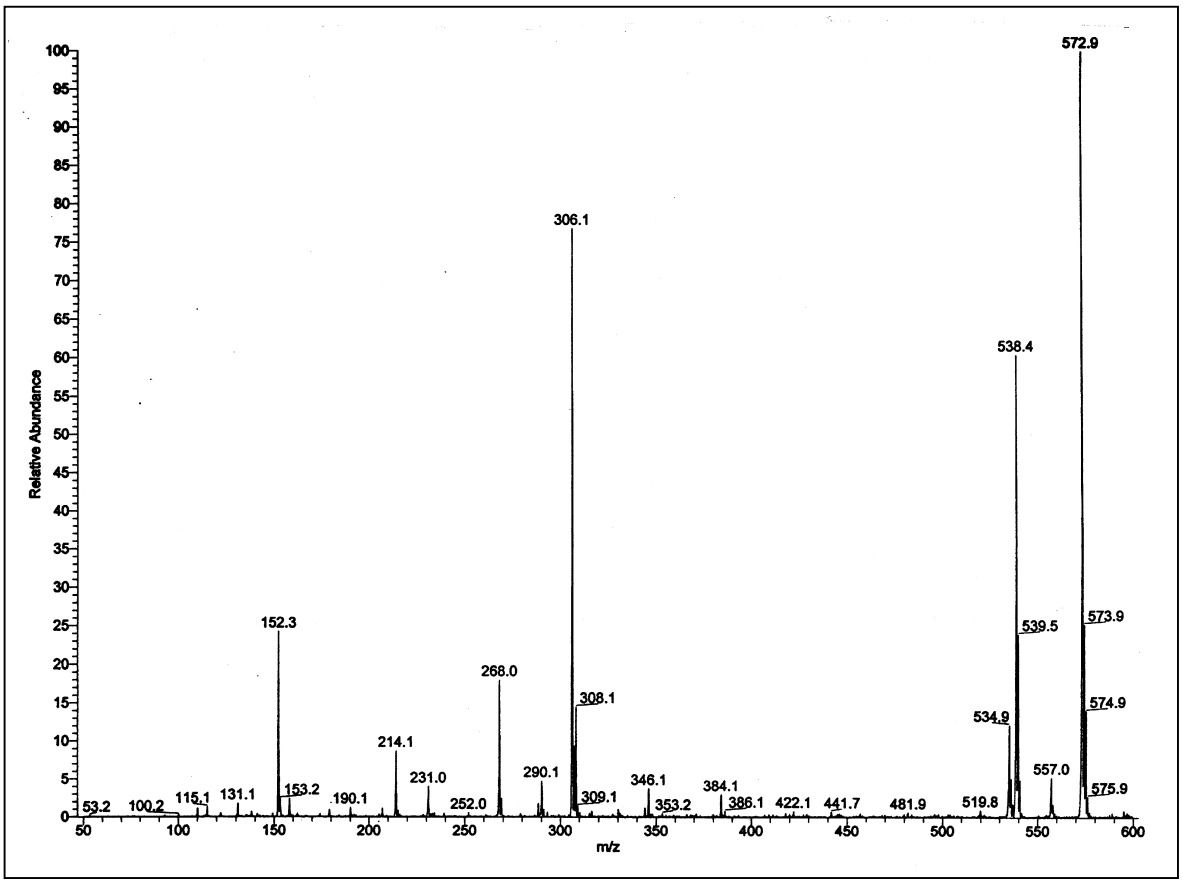

Abb. 27: Massenspektrum nach enzymatischer Inkubation über 10 min von 2,5 mM dGuo und 1 mM GSH

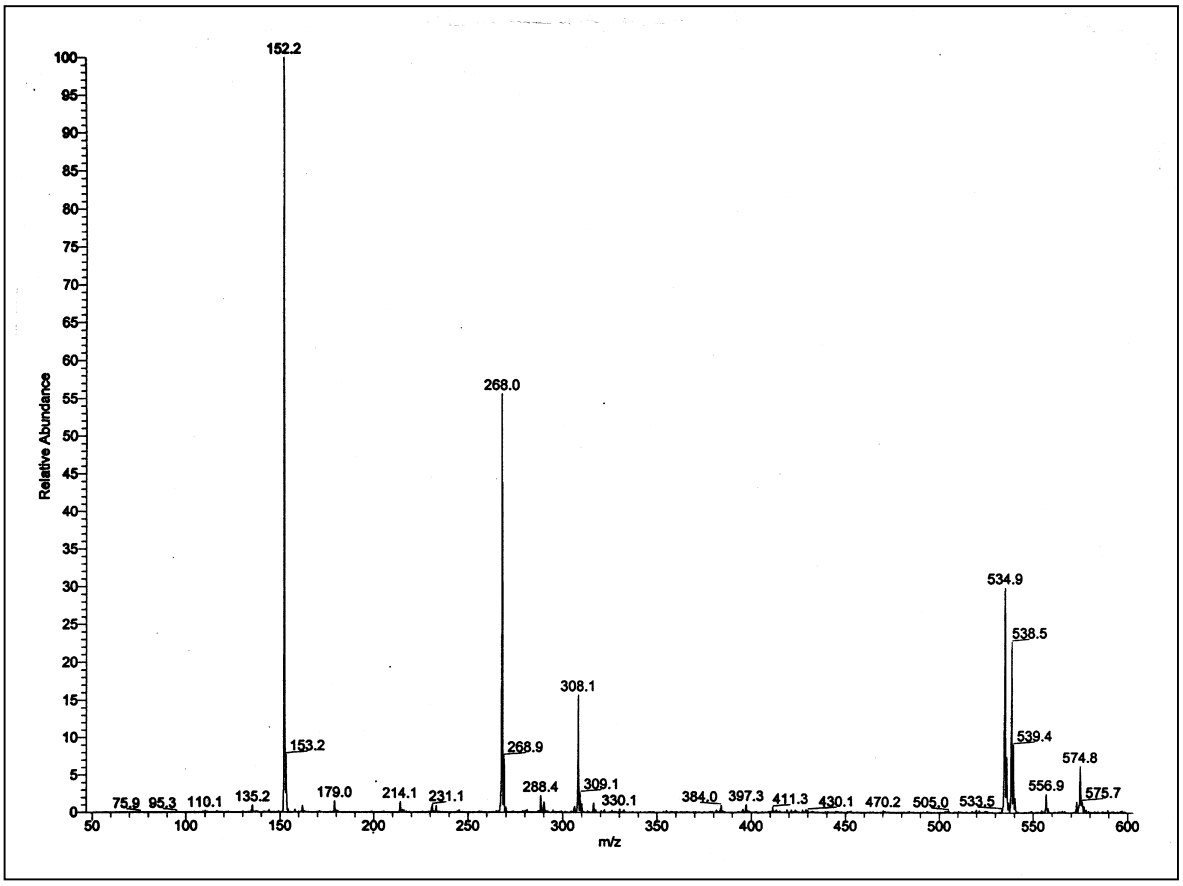

Abb. 28: Massenspektrum einer nicht-enzymatischen Inkubation über 10 min von 2,5 mM dGuo und 1 mM GSH

Der Vergleich beider Massenspektren zeigt, daß bei enzymatisch durchgeführten Reaktionen zusätzliche Signale bei m/z 573 und 306 auftraten. Aus MS^2 ergab sich, daß das Signal bei m/z 306 ein Fragment (GS^+) des Molekülions ist. Der pK_s-Wert der Thiolgruppe des GSH wird durch die katalytische GST-Aktivität so erniedrigt, daß GSH in Form eines Thiolations (GS^-) auch nucleophile Stickstoffatome angreifen kann (Beckett und Hayes 1993). Auf diese Weise könnte es, wie in Abb. 29 dargestellt, zu einem Angriff des Thiolations an die N3-Position des dGuo gekommen sein. Ein derartiges Addukt ist über Elektronenpaarverschiebungen mesomeriestabilisiert.

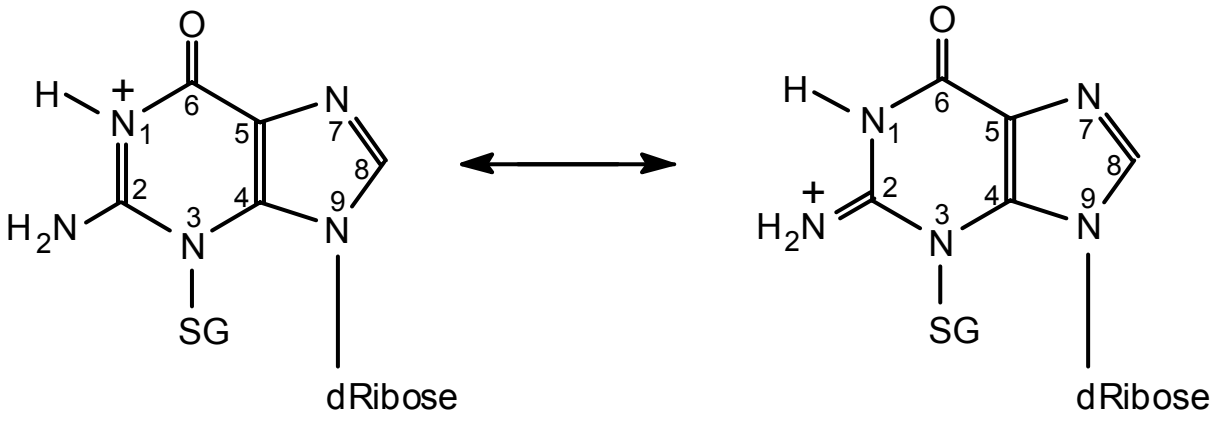

Abb. 29: Strukturvorschlag für ein GSH-Addukt an dGuo

Mit Hilfe der LC-MS-Kopplung konnte nur ein Reaktionsprodukt identifiziert werden, wie das Chromatogramm einer enzymatischen Inkubation von 2,5 mM dGuo und 1 mM GSH für den Peak bei m/z 573 zeigt (Abb. 30). Die Verbindung erschien unter den in Kap. 3.8.3. (b) aufgeführten Bedingungen bei einer Retentionszeit von 3,6 min.

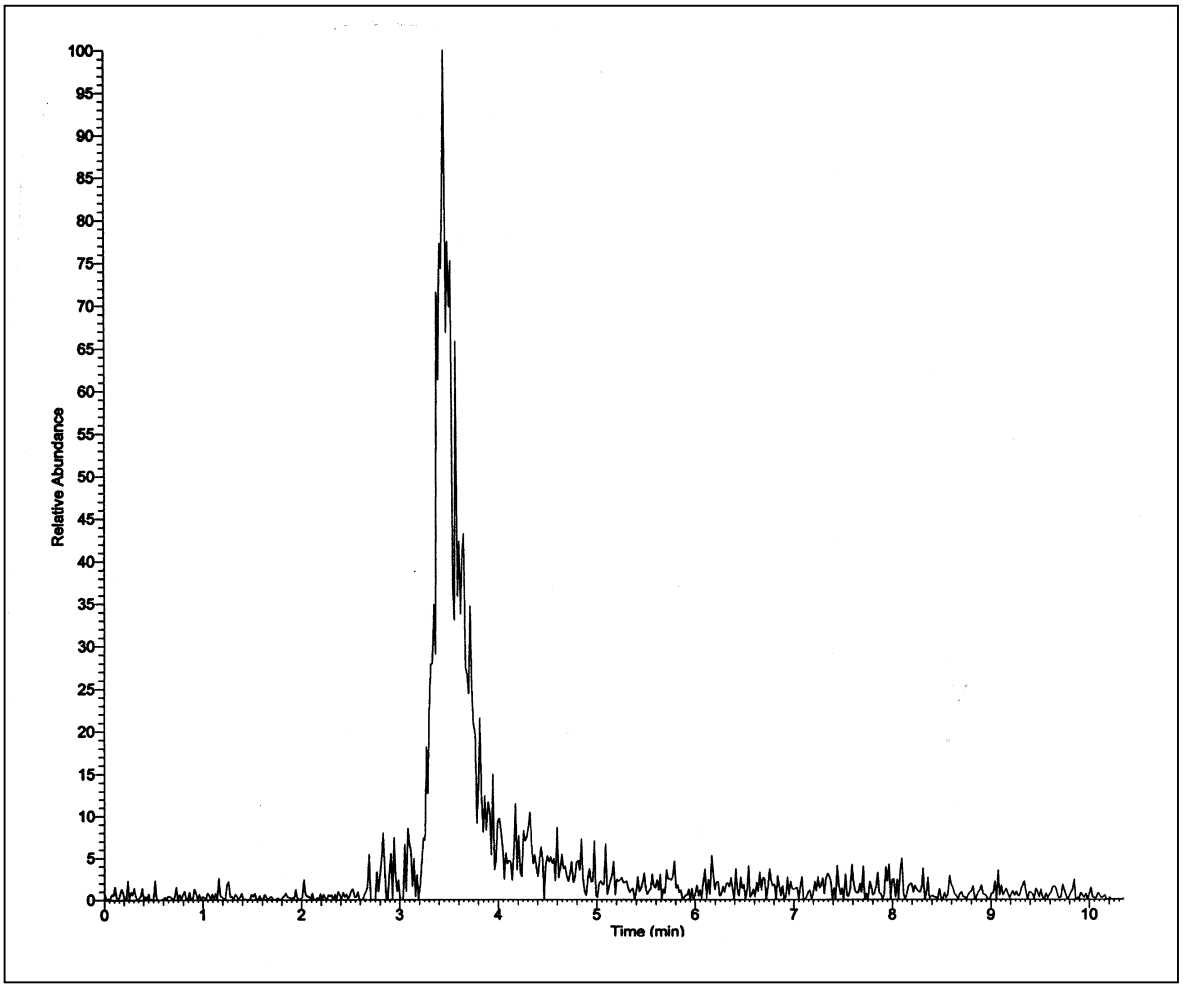

Abb. 30: Chromatogramm nach enzymatischer Inkubation über 10 min von 2,5 mM dGuo und 1 mM GSH detektiert mittels MS-SIM für m/z 573

Eine geringe Adduktbildung zwischen dGuo und DEB konnte erst nach Inkubation von 5 mM DEB und 2,5 mM dGuo über einen Zeitraum von 12 h in Form eines $[M]^+$-Ions bei m/z 354 detektiert werden. Damit wurde das zweite Epoxid am DEB-Rest nicht hydrolysiert. Adduktbildungen sind am N1, N2, N3 oder N7 des dGuo sowie am C1 oder C2 des DEB denkbar.

4.5.3. Reaktion von ^{32}P-markierten Oligonukleotiden mit Glutathion

Die Untersuchungen hinsichtlich der Adduktbildung von GSH an Oligonukleotide wurden durch nicht-enzymatische sowie enzymatische Inkubationen von ^{32}P-markierten Oligonukleotiden und GSH durchgeführt. Bei der Auswahl der Oligonukleotide wurde berücksichtigt, daß die Base Guanin mit möglicher Bindungsstelle sowohl einfach (Oligonukleotid 15) als auch mehrfach und endständig (Oligonukleotid 14 und 16) vorhanden war. Nach Trennung der Oligonukleotide auf einem Polyacrylamidgel erfolgte die Detektion mittels Phosphorimaging.

In den Spuren 1, 6, 7, 13 und 18 in Abb. 31 befinden sich nur die entsprechenden Oligonukleotide als Kontrollen. Es ist eine deutliche Unterscheidung aufgrund ihrer Länge bzw. Größe möglich. Zwischen den jeweiligen Kontrollbanden und den dazugehörigen Banden nach nicht-enzymatischer sowie enzymatischer Inkubation sind keine Größenzunahmen um eine oder mehrere GSH-Einheiten feststellbar. Damit ist GSH-Adduktbildung unter den gewählten Reaktionsbedingungen sowohl am Guanin als auch an den Basen Adenin, Cytosin und Thymin auszuschließen.

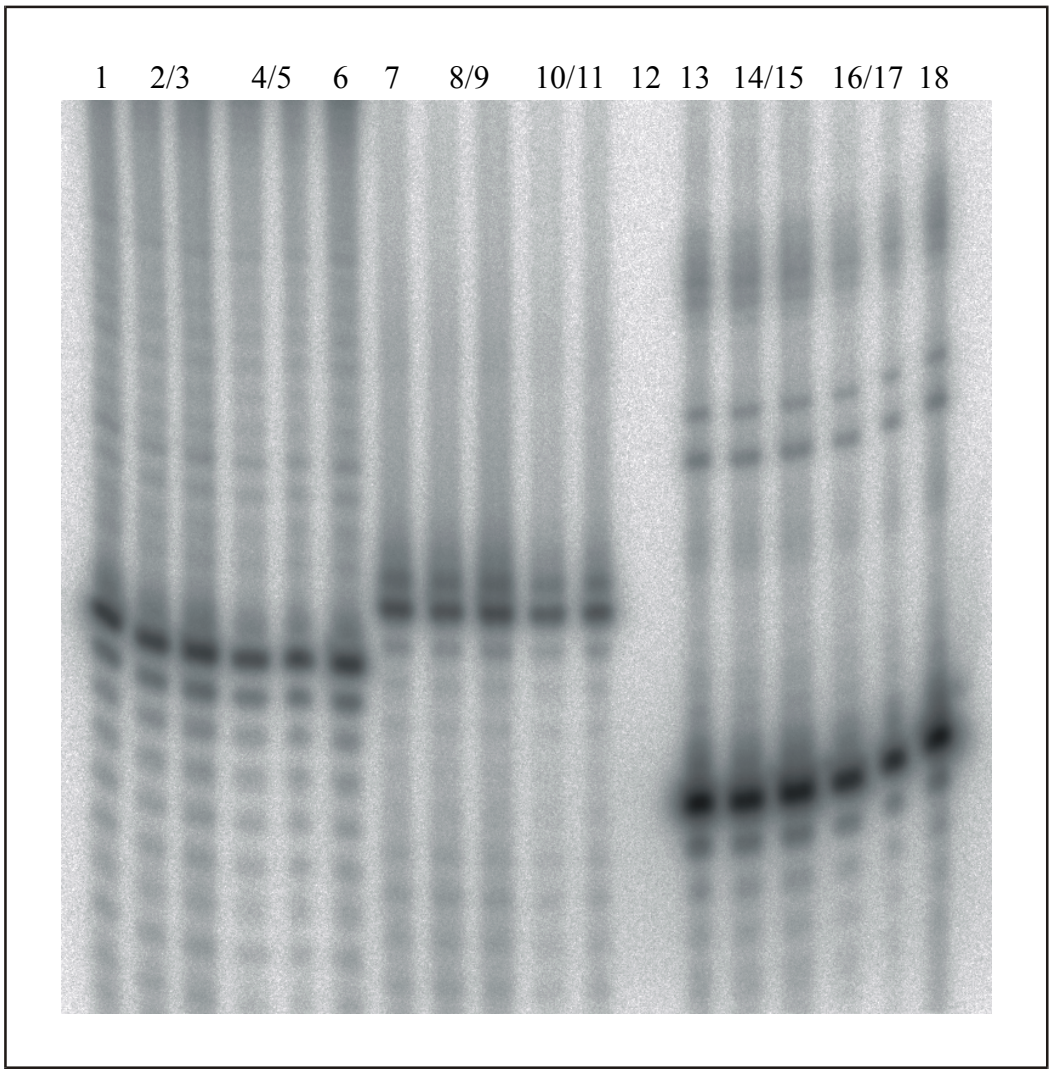

Abb. 31: Polyacrylamidgel nach vorheriger Inkubation der Oligonukleotide mit GSH
1: Oligonukleotid 14 (24 bp)
2/3: Oligonukleotid 14 + GSH
4/5: Oligonukleotid 14 + GSH/GST
6: Oligonukleotid 14
7: Oligonukleotid 15 (26 bp)
8/9: Oligonukleotid 15 + GSH
10/11: Oligonukleotid 15 + GSH/GST
12: GSH/GST
13: Oligonukleotid 16 (20 bp)
14/15: Oligonukleotid 16 + GSH
16/17: Oligonukleotid 16 + GSH/GST
18: Oligonukleotid 16

5. DISKUSSION

5.1. Bildung von 1,2:3,4-Diepoxybutan als Metabolit von 1,3-Butadien

Wie die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen zum Metabolismus von BD zeigen, erfolgt die Bildung des DNA-reaktiven Epoxids DEB im wesentlichen durch die oxidative Katalyse des Isoenzyms CYP2E1 (Duescher und Elfarra 1994, Seaton et al. 1995). Die Bioaktivierung findet wie von Johanson und Filser (1993) und Sweeney et al. (1997) beschriebenen PBPK-Modellen nach inhalativer Aufnahme von BD in der Leber statt. Mit Hilfe solcher Modelle lassen sich Aufnahme, Verteilung, Ausscheidung und Konzentrationen von Stoffen in bestimmten Organen (Kompartimenten) vorhersagen. Die PBPK-Modelle beruhen auf experimentell bestimmten physiologischen Parametern und Stoffeigenschaften. Als zentrales Organ des oxidativen Stoffwechsels exogener und endogener Stoffe besitzt die Leber die höchste CYP2E1-Aktivität (Greim und Deml, 1996). Bezüglich renaler Expression des Enzyms existieren in der Literatur widersprüchliche Angaben (Amet et al. 1997, Vieira et al. 1998).

Das Ziel war es daher, durch Western Blots humaner Nierenmikrosomen eigene Erkenntnisse hinsichtlich des Vorhandenseins von CYP2E1 in diesem Organ zu gewinnen. Bei allen untersuchten 21 Nierenzellkarzinom-Patienten konnte das Enzym weder in normalem Gewebe noch im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Infolgedessen ist eine renale BD-Bioaktivierung nur durch ein unspezifischeres CYP-Isoenzym, wie CYP2A6 (Kharasch et al. 1995, Himmelstein et al. 1997), sowie durch Induktion von CYP2E1 denkbar. Als potentieller Induktor gilt Ethanol (Lieber 1997).

Als mögliche Kompartimente für die metabolische Bildung von DEB beim Menschen können aufgrund ihrer CYP2E1-Aktivität neben der Leber auch die Lunge (Wheeler et al. 1992) sowie die Lymphocyten im Blut (Raucy et al. 1997) angesehen werden. Dieses sollte bei zukünftigen PBPK-Modellen zur genaueren Risikoabschätzung ebenso in Betracht

gezogen werden wie die Polymorphismen im CYP2E1-Gen, die zu Aktivitätsänderungen im Genprodukt führen (Fairbrother et al. 1998).

5.2. GST-Isoenzyme in der Niere des Menschen

Im Metabolismus von BD besitzen die GSTs eine große Bedeutung, da sie die Konjugation des Co-Substrats GSH an die DNA-reaktiven Epoxide EB und DEB katalysieren. Die so gebildeten Konjugate können einerseits nach dem enzymatischen Abbau über γ-Glutamyl-transferase, Cyteinylglycinase und N-Acetyltranstransferase als N-acetylierte Cyteinthioether, sogenannte Mercaptursäuren, ausgeschieden werden (Greim und Deml 1996). Andererseits gilt speziell bei DEB eine intramolekulare Umwandlung zu sehr reaktiven Episulfoniumionen als wahrscheinlich (Guengerich et al. 1995). Die GST-abhängige Konjugation von DEB ist somit als bioaktivierend anzusehen, obwohl sie überwiegend gentoxische Epoxide in für den Körper harmlose Ausscheidungsprodukte überführt.
Untersuchungen von Sharer et al. (1991) und Thier et al. (1995) mit aufgereingtem bzw. rekombinant exprimiertem Protein ergaben, daß EB von GSTP1-1 und DEB von GSTT1-1 enzymatisch konjugiert wird. Hinsichtlich der Substratspezifität der zwei Epoxide in Bezug auf andere GST-Subklassen liegen in der Literatur bisher keine Ergebnisse vor. Allerdings konnten in Lymphocyten nach EB- bzw. DEB-Exposition Zusammenhänge zwischen erhöhtem Auftreten von SCEs und fehlender GST-Expression aufgrund der GSTM1- und GSTT1-Deletionspolymorphismen gezeigt werden. Für EB waren die SCEs bei Individuen mit GSTM1-negativen Genotypen erhöht (Uusküla et al. 1995), während sie für DEB bei GSTM1-negativen Individuen unverändert und bei GSTT1-positiven erhöht waren (Landi et al. 1996). Scheinbar können also durch die GSTM1-1- bzw. GSTT1-1-katalysierte Konjugation von EB bzw. DEB genomische Schäden in Form von SCEs minimiert werden. Es ist nicht möglich, die Katalyse der GSH-Konjugation an EB und DEB einem speziellen GST-Isoenzym zuzuordnen.

Um in diesem Zusammenhang das organspezifische metabolische Potential der Niere für die Spezies Mensch beurteilen zu können, wurde ein GST-Profil erstellt. Dazu wurden in dem Nierengewebe der 21 untersuchten Patienten die Aktivitäten der bekannten GST-

Isoenzyme gemessen und die Genotypen der polymorphen GSTs mit Hilfe von PCR-Methoden bestimmt.

Die Bestimmung der hGST α-Klasse-Aktivität erfolgte spektralphotometrisch gegenüber dem Substrat NBD-Cl. Da in der Niere von den bekannten hGST-Subklassen A1-A4 nur Homo- und Heterodimere der Subklassen A1 und A2 identifiziert werden konnten (Hayes und Pulford 1995), beschränkt sich die gemessene Aktivität auf diese beiden Isoenzyme.

Von der hGST μ-Klasse werden alle Subklassen M1-M5 in der Niere exprimiert. Das stärkste Gewicht entfällt dabei auf die Subklasse M1, sofern sie aufgrund des Gendeletion-Polymorphismus überhaupt vorhanden ist. Die hGST-Subklasse M5 spielt neben der hGSTM4 und der ebenfalls polymorphen hGSTM3 eine eher untergeordnete Rolle in der Niere (Rowe et al. 1997, Eaton und Bammler 1999). Die Bestimmung der hGST μ-Klasse-Aktivität erfolgte spektralphotometrisch gegenüber dem Substrat DCNB.

Die an zwei Stellen polymorphe hGSTP1-1 ist das einzige π-Klasse Isoenzym beim Menschen (Hayes und Pulford 1995). Die Messung der Aktivität wurde mit den beiden Substraten EA und VP spektralphotometrisch durchgeführt.

Von der hGST θ-Klasse, die aus den zwei polymorphen Subklassen T1 und T2 besteht, wird in der Niere nur die Subklasse T1 exprimiert (Sherratt et al. 1997, Thier et al. 1998a). Die Bestimmung der hGSTT1-1-Aktivität erfolgte gaschromatographisch gegenüber dem Substrat MC.

Die Untersuchungen ergaben, daß alle hGST-Subklassen in der Niere biologisch aktiv exprimiert sind. Somit sind GST-abhängige Reaktionen im Metabolismus von BD in der menschlichen Niere möglich.

Die jeweils ermittelten Enzymaktivitäten unterliegen individuellen Unterschieden. Darüber hinaus scheinen einige als spezifisch geltende Substrate überlappende Affinitäten zu anderen GSTs zu haben. Anhand der Aktivitäten gegenüber dem hGST μ-Klasse Substrat DCNB wird deutlich, daß die Substratspezifität für die einzelnen Isoenzyme auch innerhalb einer Klasse verschieden ist. So ist die spezifische Aktivität der hGSTM1-negativen Patienten trotz Fehlens der entsprechenden Subklassen-Aktivität im Vergleich zu den hGSTM1-positiven Patienten um 25 % erhöht. Eine mögliche Ursache ist, daß die Konjugatbildung zu 1-Glutathionyl-2-chlor-4-nitrobenzol bevorzugt von der in der Niere ebenfalls hoch exprimierten Subklasse M2 katalysiert wird. Innerhalb bestimmter Grenzen

lassen sich Aktivitätsunterschiede in Bezug auf ein Substrat auch aufgrund von Inhibition oder Induktion bestimmter GST-Isoenzyme durch individuelle Unterschiede in der begleitenden Medikation oder Anästhesie der Patienten erklären.

Eine Korrelation zwischen dem Genotyp eines polymorphen GST-Isoenzyms und einer damit verbundenen charakteristischen enzymatischen Aktivität (Phänotyp) konnte nur bei der hGSTT1-1 gegenüber MC festgestellt werden.

5.3. Veränderung der GST-Expression in Nierenzellkarzinom-gewebe

Die gewebespezifische Expression von GSTs wird in Verbindung mit Chemoprotektion und Arzneimittelresistenz eingehend diskutiert. So ist eine erhöhte Toleranz gegenüber chemischen Noxen mit einer erhöhten GST-Expression assoziiert (Hayes und Pulford 1995).

Bei den Untersuchungen zahlreicher Zellinien von Menschen und Nagetieren wurde festgestellt, daß die GST-Level, insbesondere aber die GST π-Klasse, erhöht exprimiert sind. Ebenso wurde in menschlichen Tumoren von Lunge, Speiseröhre, Magen, Darm, Bauchspeicheldrüse, Eierstöcke und Brust eine Überexpression der hGSTP1-1 festgestellt Hayes und Pulford 1995). Di Ilio et al. (1987) schlugen vor, die von ihnen in Tumoren der Niere gemessenen erhöhten hGSTP1-1-Level sogar als Biomarker für Nierenzellkarzinome zu nutzen. Ähnliche Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten führten allerdings zu widersprüchlichen Ergebnissen. So berichteten Howie et al. (1990) und Rodilla et al. (1998) von einer unveränderten Expression von hGSTP1-1 im Tumorgewebe, Toffoli et al. (1992) von einer Überexpression und Klöne et al. (1990) von einer abnehmender Expession, welche bis zu 50 % gegenüber dem umgebenden normalen Gewebe reduziert war. Darüber hinaus konnten Klöne et al. (1990) eine Verminderung der GST α-Klasse, die normalerweise im proximalen Tubulus hoch exprimiert ist (Sundberg et al. 1993), bis hin zu nicht mehr nachweisbaren Isoenzymen detektieren.

Eine GST-Überexpression im Tumorgewebe kann zu Resistenzen gegenüber von GSTs metabolisierten Cytostatika, wie alkylierenden Wirkstoffen, führen, was den

therapeutischen Erfolg minimiert. In entsprechender Weise bemerkten Hall et al. (1994) bei an Leukämie erkrankten Kindern nach Behandlung mit Cytostatika einen deutlich höherern Heilungserfolg im Falle GSTM1-negativer Genotypen.
Kenntnisse zur GST-Expression im Tumorgewebe sind daher insbesondere für die richtige Wahl der Chemotherapie unverzichtbar. So lassen sich Überexpressionen einerseits auch ausnutzen, um Cytostatika endogen in die biologisch wirksame Form zu überführen, oder andererseits durch die Gabe entsprechender Inhibitoren verringern (Tew et al. 1997). Die GST-Aktivitäten in normalem Gewebe können in diesem Zusammenhang mit dazu beitragen, organspezifische Anfälligkeiten für unerwünschte Nebenwirkungen abzuschätzen.

Mit einer im Vergleich zu früheren Untersuchungen hohen Anzahl von 21 Patienten sollten durch die zusätzliche Ermittlung der GST-Aktivitäten im Tumorgewebe (vgl. Kap. 5.2.) Aktivitätsunterschiede zum normalen Gewebe bestimmt werden.
Es zeigte sich eine statistisch signifikante Tendenz zu abnehmender Aktivität für alle GST-Subklassen im Tumor, auch wenn in vereinzelten Fällen eine Zunahme beobachtet werden konnte. Dadurch ist der GST-abhängige Schutz vor gentoxischen Einflüssen bei einer Tumorzelle in der Niere in seiner Funktion stark beeinträchtigt, was die fortschreitende Malignisierung im Verlaufe der Progression beschleunigt.
Trotz der insbesondere im proximalen Tubulus exprimierten GST α-Klasse war für die dort lokalisierten klarzelligen Nierenzellkarzinome die Aktivität gegenüber NBD-Cl im Vergleich zu den anderen cytomorphologisch klassifizierten Tumorzellsubtypen nicht auffällig verschieden. Die statistische Häufigkeit der einzelnen Tumorzellsubtypen in dem betrachteten Kollektiv spiegelt den Bevölkerungsdurchschnitt wider (Thoenes et a. 1988).

Die innerhalb des Kollektivs bestimmten Allelfrequenzen für die polymorphen GST-Isoenzyme M1, M3, P1 in Codon 114 und T1 stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Verteilungen gesunder Bevölkerungsgruppen überein (Eaton und Bammler 1999, Inskip et al. 1995, Harris et al. 1998). Ergebnisse von Sweeney et al. (2000), denen zufolge bei hGSTT1-1-negative Genotypen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Nierenzellkarzinomen besteht, konnten nicht bestätigt werden. Der homozygot mutierte Genotyp im hGSTP1-Polymorphismus in Codon 105 liegt mit einem Anteil von 14,3 %

knapp 10 % über dem Bevölkerungsdurchschnitt. Ein Zusammenhang mit einer erhöhten Tumorinzidenz bei diesem hGSTP1-Genotyp ist trotz der nur geringen Anzahl von 21 Patienten denkbar, weil von Harries et al. (1997) ähnliche Beobachtungen bei Krebserkrankungen an der Blase, an den Hoden und der Lunge gemacht wurden.

5.4. Wirkung von 1,2:3,4-Diepoxybutan als potentiellem Nieren-kanzerogen

Die gentoxische Wirkung von DEB besteht in der Fähigkeit, die DNA zu alkylieren und DNA-DNA interstrand cross-links sowie DNA-Protein cross-links zu bilden. Im Vergleich zu EB verläuft die DNA-Alkylierung, die nach dem Mechanismus einer nucleophilen Substitution verläuft, bei DEB um den Faktor 120 langsamer (Bolt et al. 1996b).

Tretyakova et al. (1998) identifizierten nach Inkubation von DNA mit DEB in vitro drei unterschiedliche DNA-Addukte an Purinbasen. Es handelte sich dabei um ein N7-Guanin-Addukt, wie Bolt und Jelitto (1996a) es bereits zuvor fanden, sowie um N6- und N3-Adenin-Addukte. Letzteres war in vivo sowohl in Mäusen als auch in Ratten nicht nachweisbar. Bei allen Addukten erfolgte die Bindung am C1 des DEB.

Ein zweiter gentoxischer Wirkungsmechanismus von DEB erfolgt nach der von Guengerich et al. (1995) postulierten GST-abhängigen Bioaktivierung als Episulfonium-ion. Bei der ebenfalls bifunktionellen Indutriechemikalie 1,2-Dibromethan konnte ein Episulfoniumion als reaktives Intermediat bei der Bildung des DNA-Addukts S-[2-(N7-Guanyl)-ethyl]-glutathion nachgewiesen werden (Peterson et al. 1988). Die Bildung des Adduktes konnte in vitro und in vivo gezeigt werden (Ozawa und Guengerich 1983, Koga et al. 1986, Foureman und Reed 1987, Huang et al. 1998).

Thier et al. (1995) verglichen die Mutagenität von DEB ohne und mit Bioaktivierung durch GSTT1-1. Verwendet wurden ein transgener Salmonella typhimurium-Bakterienstamm TA1535, der die im Vergleich zum Menschen aktivere GSTT1-1 der Ratte rekombinant exprimiert, sowie ein negativer Kontrollstamm. Auf diese Weise konnte auf die Zugabe eines enzymatische Aktivierungssystems aus der Leber von Ratten, dem “S9-Mix“, verzichtet werden. Darüber hinaus war die Bioaktivierung direkt innerhalb der Zelle möglich und eine Diffusion des aktivierten DEB durch die Bakterienzellwand nicht mehr

erforderlich. Die Revertantenzahlen nahmen in Anwesenheit von GSTT1-1 deutlich zu. Die Mutagenität eines durch die Katalyse von GSTT1-1 gebildeten Metaboliten ist damit im Vergleich zu DEB erhöht.

In verschiedenen Reaktionsansätzen sollten DEB, dGuo und GSH nicht-enzymatisch sowie unter enzymatischer Katalyse von rekombinanter rGSTT1-1 inkubiert werden und die Bildung der Produkte mit Hilfe von Massenspektroskopie und NMR-Spektroskopie untersucht werden.

Die Inkubationen von DEB und GSH führten überwiegend zur Bildung des GSH-Konjugats S-(2-Hydroxy-3,4-epoxybutyl)-glutathion, das über das endständige C1 des DEB gebunden ist. In Gegenwart der rGSTT1-1 war die Konjugatbildung deutlich höher als bei nicht-enzymatisch durchgeführten Inkubationen. Boogaard et al. (1996a und 1996b) konnten bei ähnlichen Experimenten mit Lebercytosol von Mensch, Ratte und Maus die Bildung von zwei GSH-Konjugaten nachweisen. Das endständige Konjugat bildete sich vorwiegend bei nicht-enzymatischen Reaktionen, die ohne die Zugabe von Lebercytosol erfolgten. In Gegenwart von Lebercytosol entstand das über das C2 des DEB gebundene Konjugat S-[1-(Hydroxymethyl)-2,3-epoxypropyl]-glutathion (vgl. Kap. 1.2. Abb. 2).
Die enzymatische Bildung unterschiedlicher Konjugate ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die Reaktionen von verschiedenen GST-Isoenzymen katalysiert werden. Gerade in Cytosolen der Leber befinden sich diverse GSTs. Zwar werden Epoxide häufig als typische GSTT1-1-Substrate bezeichnet, jedoch bestehen, wie im Falle von EB und Ethylenoxid, auch Affinitäten zu anderen GST-Isoenzymen (Sharer et al. 1991, Vollmer et al. 1998). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten nicht-enzymatischen Inkubationen unterscheiden sich von Boogaard et al. (1996a und 1996b) durch die niedrigeren DEB-Konzentrationen. Es ist daher denkbar, daß die Position der DEB-Konjugation abhängig ist von der Konzentration des Elektrophils.

Das eben beschriebene GSH-Konjugat S-(2-Hydroxy-3,4-epoxybutyl)-glutathion bildete sich auch bei enzymatischen Inkubationen von DEB, dGuo und GSH. Desweiteren konnte die Bildung einer Verbindung beobachtet werden, für die in Anlehnung an entsprechende Versuche mit 1,2-Dibromethan über ein intermediäres Episulfoniumion (Ozawa und Guengerich 1983, Koga et al. 1986, Foureman und Reed 1987, Huang et al. 1998) die

Struktur des N7-Adduktes S-[1-(N7-Guanosinyl)-3,4-dihydroxybutyl]-glutathion (vgl. Kap. 4.5.2. Abb. 26) postuliert wurde.
Eine gleichzeitige Adduktbildung zwischen DEB und dGuo konnte nicht nachgewiesen werden. Dieses war erst bei Inkubationen über eine Zeitraum von 12 h möglich. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen von Tretyakova et al. (1998), die nach 18 stündiger Inkubation und DEB-Konzentrationen, die 50-5000-fach höher lagen, DNA-Addukte am N7 des Guanins sowie am N6 und nur in vitro am N3 des Adenins fanden.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der durch GSTT1-1 katalysierte Konjugatbildung von DEB mit GSH ist vielfach höher als die der Adduktbildung zwischen DEB und dGuo. Infolgedessen verläuft auch die damit verbundene intramolekulare Bildung eines Episulfoniumions bzw. dem daraus resultierenden dGuo-Addukt schneller. Dieses erklärt auch die von Thier et al. (1995) beschriebene erhöhte Mutagenität von DEB in Ames-Tests in Gegenwart von GSTT1-1.

Am häufigsten treten DNA-Alkylierungen an der Position N7 des Guanins auf (Dipple 1995). Derartige Alkylierungen treten sowohl bei DEB als auch vermutlich nach GSTT1-1 katalysierter Bioaktivierung zum Episulfoniumion auf. Darüber hinaus konnten am Adenin nach Alkylierung mit DEB Addukte am N3 und N6 beobachtet werden.
Die Addukte an Position N7 des Guanins und N3 des Adenins beeinträchtigen die normale Watson-Crick-Anordnung (N1 der Purinbase gegenüber N3 der Pyrimidinbase) der Basenpaarung innerhalb der DNA nicht (Swann 1990). Die Addukte selbst stellen daher keine promutagenen Schäden dar. Erst anschließende spontane Hydrolyse der glykosidischen Bindung führt zu Depurinierung und damit zu apurinischen Stellen. Die Folge dieser sogenannten AP-Läsionen sind Transitionen. Beim N7-alkylierten Guanin kann es zusätzlich zur Öffnung des Imidazolringes kommen (Lawley 1966). Addukte an Position N6 des Adenins dagegen beeinträchtigen die korrekte Basenpaarung.
Die Mutationen können sich im Hinblick auf die Initiation im Mehrstufenmodell der Kanzerogenese beträchtlich voneinander unterscheiden. Aufgrund der Redundanzen des genetischen Codes können einige Mutationen stumm bleiben, andere sind dagegen mißcodierend. Gerade für diese Art von Mutationen sind DNA-Reparaturmechanismen von großer Bedeutung. Der Zusammenhang zwischen Kanzerogenese und DNA-Reparatur

ist allerdings sehr komplex, da die Induktion der Reparatur von den unterschiedlichsten Faktoren, wie dem Kanzerogen selbst bzw. der Position der Adduktbildung, der Sequenzspezifität der DNA-Alkylierung und dem betroffenen Organ bzw. auch der damit verbundene Proliferationsrate der Zellen abhängig ist.

Die hier beschriebenen Bioaktivierung von DEB und die daraus resultierenden Konsequenzen für den Organismus sind generell in jedem Organ mit GSTT1-1-Aktivität möglich. Sofern die Bildung des entsprechenden Episulfoniumions nicht auch von anderen GST-Isoenzymen katalysiert wird, besitzen GSTT1-1-defiziente Individuen (nicht-Konjugierer) ein verringertes Risiko für Mutationen nach BD-Exposition. Wichtig für die Abschätzung individueller Suszeptibilität ist sicher auch die Kenntnis, mit welcher Geschwindigkeit die detoxifizierende Hydrolyse von DEB durch EH unter anderem als Konkurrenzreaktion zur GST-abhängigen Konjugation mit GSH abläuft.

5.5. DNA-Reaktivität von Glutathion

Das Tripeptid GSH besitzt zahlreiche biologische Funktionen innerhalb der Zelle. Die Bildung erfolgt intrazellulär durch die enzymatische Katalyse von γ-Glutamylcystein-Sythetase und GSH-Synthetase. Darüber hinaus kann oxidiertes GSH (GSSG), das beispielsweise bei der GSH-Peroxidease-abhängigen Verstoffwechslung von Peroxiden entsteht, durch GSH-Reduktase wieder in die reduzierte Form (GSH) gebracht werden. Die GSH-Konzentration in einer Säugerzelle variiert je nach Spezies und Zelltyp zwischen 0,1 und 10 mM (Meister und Anderson 1983).
Für GSH berichteten Glatt et al. (1983) und Glatt (1989) im Bereich endogen vorkommender Konzentrationen in Ames-Tests über erhöhte Mutagenität, die allerdings nur bei Zugabe von “S9-Mix“ aus der Niere von Ratten auftrat. Reaktive Metaboliten konnten bei den Untersuchungen nicht identifiziert werden. Eine Bildung von Thiyl-radikalen wurde jedoch diskutiert.

Im Rahmen der enzymatisch durchgeführten Inkubationen von DEB, dGuo und GSH konnte im Massenspektrum die Bildung eines Peaks beobachtet werden, der sich als GSH-Addukt an dGuo interpretieren ließ (vgl. Kap. 4.5.2. Abb. 29). Der gleiche Peak fand sich

auch bei alleiniger enzymatischer Inkubation von dGuo mit GSH. Es konnte weder die Adduktbildung an die Base Guanin noch an andere Nukleobasen durch Experimente mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden bestätigt werden.

Eine Ursache hierfür könnte darin bestehen, daß eine GSH-Adduktbildung durch die Verknüpfung der einzelnen Basen des Oligonukleotids über die Phosphorsäurereste sterisch ungünstig ist. Neben den analytischen Unterschieden war bei den massenspektroskopisch untersuchten Inkubationen die GSH-Konzentration niedriger als die dGuo-Konzentration. Bei den Inkubationen mit Oligonukleotiden war die GSH-Konzentration vielfach höher. Eine Konzentrationsabhängigkeit der Adduktbildung ist daher auch denkbar. Darüber hinaus ist es möglich, daß die Empfindlichkeit des radiochemischen Nachweises von GSH-Addukten nicht ausreicht.
Eine Bildung endogener DNA-Addukte, sogenannter I-Compounds (Marnett und Burcham 1993, Randerrath et al. 1999), unter Bindung von GSH ist somit nicht ausgeschlossen. Die Klärung dieser Frage ist sowohl im Hinblick auf damit verbundene bisher unbekannte regulative Eigenschaften von GSH innerhalb der Zelle als für die Kanzerogenese von Bedeutung.

6. ZUSAMMENFASSUNG

BD ist eine ubiquitär vorkommende, gasförmige Chemikalie, die in großem Maßstab insbesondere als Ausgangssubstanz zahlreicher synthetischer Polymere in der Kunststoffindustrie dient. Die Expositionpfade für den Menschen sind somit nicht auf Kontakte von Arbeitern in der BD-Herstellung ober BD-Weiterverarbeitung beschränkt.
Die Einstufung von BD in die Kategorie 1 des Abschnittes III der MAK-Liste als „erwiesenermaßen für den Menschen kanzerogen“ erfolgte 1998 aufgrund neuer epidemiologischer Daten. Im Rahmen der durchgeführten Studien ergab sich auch ein begründeter Verdacht für ein nephrokanzerogenes Potential von BD.
Die Bioaktivierung von BD im Organismus erfolgt über Metabolisierung durch das Isoenzym CYP2E1 zu den DNA-reaktiven Epoxiden EB und DEB. Für die erhöhte Mutagenität von DEB gegenüber EB nach GSTT1-1-katalysierter Weiterverstoffwechslung wird die Bildung eines intermediären, sehr reaktiven Episulfoniumions diskutiert.

Ziel dieser Arbeit war es, den Reaktionsmechanismus von DEB gerade im Hinblick auf die Bildung eines Episulfoniumions weiter aufzuklären. Aus den gewonnenen Erkenntnissen sollte in Verbindung mit der enzymatischen Charakterisierung der menschlichen Niere das nephrokanzerogene Potential abgeschätzt werden. Dabei sollten auch individuelle Suszeptibilitätsfaktoren aufgrund von Enzympolymorphismen berücksichtigt werden.

Um die GSTT1-1-abhängige Metabolisierung von DEB zu untersuchen, wurden in vitro Inkubationen durchgeführt und die Reaktionsprodukte spektroskopisch bestimmt.
Die Reaktionen von DEB mit GSH führten sowohl nicht-enzymatisch als auch enzymatisch zur Bildung des GSH-Konjugats S-(2-Hydroxy-3,4-epoxybutyl)-glutathion, das über das endständige C1 des DEB gebunden ist. Im Falle der enzymatisch durchgeführten Inkubationen war die Konjugatbildung linear abhängig von der DEB-Konzentration.
Der zusätzliche Einsatz von dGuo als chemischer Quenscher reaktiver Verbindungen führte enzymatisch darüber hinaus zur Detektion eines Adduktes, für das die intermediäre

Bildung eines Episulfoniumions und die Struktur S-[1-(N7-Guanosinyl)-3,4-dihydroxy-butyl]-glutathion postuliert wurde.
Eine Bildung von Addukten zwischen dGuo und DEB konnte erst nach Inkubationen über sehr viel längere Zeiträume beobachtet werden. Damit ist die Reaktionsgeschwindigkeit für diesen gentoxischen Schaden gegenüber der GSH-Konjugation und anschließender Bildung von Episulfoniumionen deutlich langsamer.

Zur Charakterisierung der menschlichen Niere wurden von 21 Nierenzellkarzinom-Patienten sowohl gesundes Gewebe als auch Tumorgewebe mit Hilfe von Western Blots auf CYP2E1 und mit Hilfe von Aktivitätsmessungen auf exprimierte GST-Isoenzyme (Klasse α, Klasse μ, P1-1 und T1-1) untersucht.
Der Nachweis von CYP2E1 in menschlichem Nierengewebe war negativ. Eine intrarenale Bioaktivierung von BD ist somit nicht möglich. Nach inhalativer Resorption besteht die Möglichkeit einer oxidativen Metabolisierung in der Lunge, der Leber oder in den im Blut enthaltenen Lymphocyten. Über das Blut kann DEB dann auch in die Niere gelangen.
Für alle untersuchten hGSTs konnte Aktivität in der Niere nachgewiesen werden. Dieses ist im Hinblick auf eine Bioaktivierung von DEB durch andere hGST-Isoenzyme als hGSTT1-1 von Bedeutung. Im Tumorgewebe war die Aktivität jedoch gegenüber allen Substraten erniedrigt, was unter anderem Konsequenzen für die fortschreitende Malignisierung im Verlaufe der Progression hat. Eine für einen Genotyp eines polymorphen GST-Isoenzyms charakteristische Enzymaktivität konnte nur für hGSTT1-1 festgestellt werden. Die innerhalb des Kollektivs bestimmten Allelfrequenzen polymorpher GST-Isoenzyme entsprachen den Verteilungen in gesunden Populationen mit der Ausnahme einer erhöhten Anzahl homozygot mutierter Patienten in Codon 105 des hGSTP1-Gens.

Das kanzerogene Potential von DEB als Metabolit von BD wird durch die GST-abhängige Bioaktivierung, die kinetisch sehr schnell verläuft, erhöht. Die Ergebnisse deuten in diesem Zusammenhang auf die Entstehung eines intermediären Episulfoniumions hin. GSTT1-1-negative Individuen können diesen Metaboliten nicht bzw. nur zu geringerer Ausbeute bilden. Die Suszeptibilität für eine Initiation gemäß dem Mehrstufenmodell der Kanzerogenese ist damit trotz fehlendem bzw. geringerem Abbau des ebenfalls DNA-

reaktiven Epoxids DEB verringert. Nach extrarenaler Bildung von DEB im Anschluß an BD-Exposition ist ein gentoxischer Schaden durch die in der Niere hoch exprimierten GST-Isoenzyme im Hinblick auf die Nephrokanzerogenese durchaus denkbar.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Adler I-D, Cochrane J, Osterman-Golkar S, Skopek TR, Sorsa M, Vogel E (1995)
1,3-Butadiene working group report.
Mutat Res **330**, 101-114

Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Boulamwini J (1997)
Molecular cloning, characterization and expression in Escherichia coli of full-length cDNA of three glutathione S-transferase pi gene variants: evidence for differential catalytic activity of the encoded protein.
J Biol Chem **272**, 10004-10012

Amet Y, Berthou F, Fournier G, Dreano Y, Bardou L, Cledes J, Menez JF (1997)
Cytochrome P450 4A and 2E1 expression in human kidney microsomes.
Biochem Pharmacol **53**, 765-771

Anderson D, Dobrzynka MM, Jackson LI, Yu T-W, Brinkworth MH (1997)
Somatic germ cell effects in rats and mice after treatment with 1,3-butadiene and its metabolites, 1,2-epoxybutene and 1,2,3,4-diepoxybutane.
Mutat Res **391**, 233-242

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1989)
Current protocols in molecular biology.
John Wiley & Sons, New York

Barrett JC (1993)
Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment.
Environ Health Perspect **100**, 9-20

Becker N und Wahrendorf J (1998)
Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981 – 1990.
Springer Verlag, Berlin, 3. Aufl.

Beckett GJ und Hayes JD (1993)
Glutathione S-transferase: biomedical applications.
Adv Clin Chem **30**, 281-380

Berhane K, Widerstein M, Engström Å, Kozarich JW, Mannervik B (1994)
Detoxication of base propenals and other α, β-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases.
Proc Natl Acad Sci USA **91**, 1480-1484

Bisswanger H (1979)
Theorie und Methoden der Enzymkinetik.
Verlag Chemie, Weinheim

Board PG, Webb GC, Coggan M (1989)
Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-tranferase 3 gene to chromosomal bands 11q13 and 12q13-14.
Ann Hum Genet **53**, 205-213

Board PG, Harris M, Flanagan J, Langton L, Coggan M (1998)
Genetic heterogeneity of the structure and function of GSTT2 and GSTP1.
Chem-Biol Interact **111-112**, 83-89

Bolt HM und Jelitto B (1996a)
Synthesis and characterisation of 1,3-butadiene DNA-adducts.
Fresenius Envir Bull **5**, 511-516

Bolt HM, Capellmann M, Jelitto B, Hindermeier U, Kirkovsky I (1996b)
Differential reactivities of the mono- and di-epoxide of 1,3-butadiene.
Toxicology **113**, 294-296

Boogaard PJ, Sumner SC-J, Bond JA (1996a)
Glutathione conjugation of 1,2:3,4-diepoxybutane in human liver and rat and mouse liver and lung in vitro.
Toxicol App Pharm **136**, 307-316

Boogaard PJ, Sumner SC-J, Turner MJ, Bond JA (1996b)
Hepatic and pulmonary glutathione conjugation of 1,2:3,4-diepoxybutane in human, rat, and mouse in vitro.
Toxicology **113**, 297-299

Brenner BN und Rector FC (1991)
The Kidney.
W. B. Saunders, Philadelphia

Brunnemann KD, Kagan MR, Cox JE, Hoffmann D (1990)
Analysis of 1,3-butadiene and other selected gas-phase components in cigarette mainstream and sidestream smoke by gas chromatography-mass selective detection.
Carcinogenesis **11**, 1863-1868

Büning H und Trenkler G (1978)
Nicht parametrische statistische Methoden.
Walter de Gruyter Verlag, Berlin

Caporaso N und Goldstein A (1995)
Cancer genes: single and susceptibility: exposing the difference.
Pharmacogenetics **5**, 59-63

Carriere V, Berthou F, Baird S, Belloc C, Beaune P, de Waizers I (1996)
Human cytochrome P450 2E1 (CYP2E1): from genotype to phenotype.
Pharmacogenetics **6**, 203-212

Cochrane JE und Skopek TR (1994)
Mutagenicity of butadiene and its epoxide metabolites: I. mutagenic potential of 1,2-epoxybutene, 1,2,3,4-diepoxybutane and 3,4-epoxy-1,2-butanediol in cultured human lymphoblasts.
Carcinogenesis **15**, 713-717

Csanady G, Guengerich FP, Bond JA (1992)
Comparison of the biotransformation of 1,3 butadiene and its metabolite, butadiene monoepoxide, by hepatic and pulmonary tissues from humans, rats and mice.
Carcinogenesis **13**, 1143-1153

Delzell E, Sathiarkumar N, Macalusco M, Hovinga M, Larson R, Barbone F, Beall C, Cole P (1996)
A follow-up study of synthetic rubber workers.
Toxicology **113**, 182-189

Dipple A (1995)
DNA adducts of chemical carcinogens.
Carcinogenesis **16**, 437-441

Divine BJ und Hartmann CM (1996)
Mortality update of butadiene production workers.
Toxicology **113**, 169-181

DFG (1983)
Hexachlorbutadien. In: Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten
Verlag Chemie, Weinheim

DFG (1996)
Trichlorethen. In: Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten
Verlag Chemie, Weinheim

DFG (1997)
Tetrachlorethen. In: Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten
Verlag Chemie, Weinheim

DFG (1998)
1,3-Butadien. In: Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten
Verlag Chemie, Weinheim

Di Ilio C, del Boccio G, Aceto A, Federici G (1987)
Alteration of glutathione transferase isoenzyme concentrations in human renal carcinoma.
Carcinogenesis **8**, 861-864

Doll R und Peto R (1981)
The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today.
J Natl Cancer Inst **66**, 1192-1308

Duescher RJ und Elfarra AA (1994)
Human liver microsomes are efficient catalysts for 1,3-butadiene oxidation: evidence for major roles by cytochrome P450 2A6 and 2E1.
Arch Biochem Biophys **311**, 342-349

Eaton DL und Bammler TK (1999)
Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology.
Toxicol Sci **49**, 156-164

Edwards RJ, Singleton AM, Murray BP, Davies DS, Boobis AR (1995)
Short synthetic peptides exploited for reliable and specific targeting of antibodies to the C-termini of cytochrome P450 enzymes.
Biochem Pharmacol **49**, 39-47

Fairbrother KS, Grove J, de Waziers I, Steimel DT, Day CP, Crespi CL, Daly AK (1998)
Detection and characterization of novel polymorphisms in the CYP 2E1 gene.
Pharmacogenetics **8**, 543-552

Fjellstedt TA, Allen RH, Duncan BK, Jacoby WB (1973)
Enzymatic conjugation of epoxides with glutathione.
J Biol Chem **248**, 3702-3707

Flemming S und Lewi HJW (1986)
Collecting duct carcinoma of the kidney.
Histopathol **10**, 1131-1141

Forth W, Henschler W, Rummel W (1996)
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 7. Aufl.

Foureman GL und Reed DJ (1987)
Formation of S-[2-(N7-guanyl)ethyl] adducts by the postulated S-(2-chloroethyl)cysteinyl and S-(2-chloroethyl)glutathionyl conjugates of 1,2-dibromoethane.
Biochemistry **26**, 2028-2033

Fryer AA, Zhao L, Alldersea J, Pearson WR, Strange RC (1993)
Use of site-directed mutagenesis of allele-specific PCR primers to identify the GSTM1 A, GSTM1 B, GSTM1 AB, and GSTM1 null polymorphisms at the glutathione S-transferase, GSTM1 locus.
Biochem J **295**, 313-315

Glatt H, Protic-Sabljic M, Oesch F (1983)
Mutagenicity of glutathione and cysteine in the Ames test.
Science **220**, 961-963

Glatt H (1989)
Mutagenicity spectra in Salmonella typhimurium strains of glutathione, L-cysteine and active oxygen species.
Mutagenesis **4**, 221-227

Greim H und Deml (1996)
Toxikologie.
Verlag Chemie, Weinheim

Guengerich FP, Thier R, Persmark M, Taylor JB, Pemble SE, Ketterer B (1995)
Conjugation of carcinogens by θ class glutathione S-transferases: mechanism and relevance to variations in human risk.
Pharmacogenetics **5**, 103-107

Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB (1974)
Glutathione S-transferase – The first enzymatic step in mercapturic acid formation.
J Biol Chem **249**, 7130-7139

Habig WH und Jakoby WB (1981)
Assays for differentiation of glutathione S-transferase.
Method Enzymol **77**, 398-405

Hai MA und Diaz-Peres R (1982)
Atypical carcinoma of kidney originating from collecting duct epithelium.
Urology **16**, 89-92

Hall AG, Autzen P, Cattan AR, Malcolm AJ, Cole M, Kernaham J, Reid MM (1994)
Expression of μ class glutathione S-transferase correlates with event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukemia.
Cancer Res **54**, 5251-5254

Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GCW, Wolf CR (1997)
Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer.
Carcinogenesis **18**, 641-644

Harris MJ, Coggan M, Langton L, Wilson SR, Board PG (1998)
Polymorphism of the pi class glutathione S-tranferase in normal populations and cancer patients.
Pharmacogenetics **8**, 27-31

Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ (1994)
Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants.
Hum Mol Genet **3**, 421-428

Hayes JD und Pulford DJ (1995)
The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance.
Crit Rev Biochem Mol Biol **30**, 445-600

Henderson RF, Thornton-Manning JR, Bechtold WE, Dahl AR (1996)
Metabolism of 1,3-butadiene: species differences.
Toxicology **113**, 17-22

Henschler D, Vamvakas S, Lammert M, Dekant W, Kraus B, Thomas B, Ulm K (1995)
Increased incidence of renal cell tumors in a cohort of cardboard workers exposed to trichloroethene.
Arch Toxicol **69**, 291-299

Himmelstein MW, Acquavella JF, Recio L, Medinsky MA, Bond JA (1997)
Toxicology and epidemiology of 1,3-butadiene.
Crit Rev Toxicol **27**, 1-108

Howie AF, Forrester LM, Glancey MJ, Schlager JJ, Powis G, Beckett GJ, Hayes JD, Wolff CR (1990)
Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase expression in normal and tumour human tissues.
Carcinogenesis **11**, 451-458

Huang H, Jemal A, David C, Barker SA, Swenson DH, Means JC (1998)
Analysis of DNA adduct, S-[2-(N^7-guanyl)-ethyl]glutathione, by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry.
Anal Biochem **265**, 139-150

Huff JE, Melnick RL, Solleveld HA, Haseman JK, Powers M, Miller RA (1985)
Multiple organ carcinogenicity of 1,3-butadiene in B6C3F1 mice after 60 weeks of inhalation exposure.
Science **227**, 548-549

IARC (1999)
Hexachlorobutadiene.
IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **73**, 277-294

Inskip A, Elexperu-Camiruga J, Buxton N, Dias PS, Mac Intosh J, Campbell D, Jones PW, Yengi L, Talbot JA, Strange RC, Fryer AA (1995)
Identification of polymorphism at the glutathione S-transferase, GSTM3 locus: evidence for linkage with GSTM1*A.
Biochem J **312**, 713-716

Jaffe DR, Hassall CD, Brendel K, Gandolfi AJ (1983)
In vivo and in vitro nephrotoxicity of the cystein conjugate of hexachlorobutadiene.
J Toxicol Environ Health **11**, 857-867

Johanson G und Filser JG (1993)
A physiologically based pharmacokietic model for butadiene and its metabolite butadiene monoxide in rat and mouse and its significance for risk extrapolation.
Arch Toxicol **67**, 151-163

Kambouris SJ, Chaudhary AK, Blair IA (1996)
Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI MS/MS) analysis of 1,2-epoxybutene adducts of purine deoxynucleotides.
Toxicology **113**, 331-335

Kempkes M, Golka K, Reich S, Reckwitz T, Bolt HM (1996)
Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null genotypes as potential risk factors for urethelial cancer of the bladder.
Arch Toxicol **71**, 123-126

Kharasch ED, Hankins DC, Thummel KE (1995)
Human kidney methoxyflurane and sevoflurane metabolism. Intrarenal fluoride production as a possible mechanism of methoxyflurane nephrotoxicity.
Anesthesiology **82**, 689-699

Kligerman AD, De Marini DM, Doerr CL, Hanley NM, Milholland VS, Tennant AH (1999)
Comparison of cytogenetic effects of 3,4-epoxy-1-butene and 1,2:3,4-diepoxybutane in mouse, rat and human lymphocytes following in vitro G_0 exposures.
Mutat Res **439**, 13-23

Klöne A, Weidner U, Hußnätter R, Harris J, Meyer D, Peter S, Ketterer B, Sies H (1990)
Decreased expression of the glutathione S-transferase alpha and pi genes in human renal cell carcinoma.
Carcinogenesis **11**, 2179-2183

Koga N, Inskeep PB, Harris TM, Guengerich FP (1986)
S-[2-(N7-guanyl)ethyl]glutathione, the major DNA adduct formed from 1,2-dibromo-ethane.
Biochemistry **25**, 2192-2198

Lähdetie J, Peltonen K, Sjöblom T (1997)
Germ cell mutagenicity of three metabolites of 1,3-butadiene in the rat: induction of spermatid micronuclei by butadiene mono-, di- and diolepoxides in vivo.
Environ Mol Mutagen **29**, 230-239

Lämmli UK (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4.
Nature **227**, 680-685

Landi S, Ponzanelli I, Hirvonen A, Norppa H, Barale R (1996)
Repeated analysis of sisterchromatid exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes: effects of glutathione S-transferase T1 and M1 genotype.
Mutat Res **351**, 79-85

Lawley PD (1966)
Effects of some chemical mutagens and carcinogens on nucleic acids.
Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **5**, 89-131

Lawley PD und Brookes P (1967)
Interstrand cross-linking of DNA by bifunctional alkylating agents.
J Mol Biol **25**, 143-160

Lee SH und de Jong J (1999)
Microsomal GST-I: genomic organization, expression and alternative splicing of the human gene.
Biochim Biophys Acta **1446**, 389-396

Lieber CS (1997)
Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role.
Physiol Rev **77**, 517-544

Lottspeich F und Zorbas H (1998)
Bioanalytik.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Malvoisin E und Rubberfroid M (1982)
Hepatic microsomal metabolism of 1,3-butadiene.
Xenobiotica **12**, 137-144

Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J (1989)
Molecular cloning, a laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2nd ed.

Mannervik B, Alin P, Guthenburg C, Jensson H, Tahir MK, Warholm M, Jörnvall H (1985)
Identification of three classes of cytosolic glutathione transferases common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties.
Proc Natl Acad Sci USA **82**, 7202-7206

Marnett LJ und Burcham PC (1993)
Endogenous DNA adducts: potential and paradox.
Chem Res Toxicol **6**, 771-785

Mc Kay JA, Weaver RJ, Murray GI, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD (1995)
Localization of microsomal epoxide hydrolase in normal and neoplastic human kidney.
J Histochem Cytochem **43**, 615-620

Meister A und Anderson ME (1983)
Glutathione.
Ann Rev Biochem **52**, 711-760

Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM, Ketterer B (1991)
Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man.
Biochem J **274**, 409-414

National Toxicology Program (NTP) (1993)
Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of 1,3-butadiene.
NTP TR 434, No. 93-3165, 1-391
Research Triangle Park, NC

Owen PE, Glaister JR, Gaunt IF, Pullinger DH (1987)
Inhalation toxicity studies with 1,3-butadiene. 3. two year toxicity/carcinogenicity study in rats.
Am Ind Hyg Assoc J **48**, 407-413

Ozawa N und Guengerich FP (1983)
Evidence for formation of an S-[2-(N7-guanyl)-ethyl]glutathione adduct in glutathione mediated binding of the carcinogen 1,2-dibromoethane to DNA.
Proc Natl Acad Sci USA **80**, 5266-5270

Pelz N, Dempster AM, Shore PR (1990)
Analysis of low molecular weight hydrocarbons including 1,3-butadiene in engine exhaust gases using an aluminum oxide porous-layer open-tubular fused-silica column.
J Chromatogr Sci **28**, 230-235

Pemble SE, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB (1994)
Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and characterization of a genetic polymorphism.
Biochem J **300**, 271-276

Pemble SE, Wardle AF, Taylor JB (1996)
Glutathione S-transferase class kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue.
Biochem J **319**, 749-754

Peter H, Deutschmann S, Reichel C, Hallier E (1989)
Metabolism of methyl chloride in human erythrocytes.
Arch Toxicol **63**, 351-355

Peterson LA, Harris TM, Guengerich FP (1988)
Evidence for an episulfonium ion intermediate in the formation of S-[2-(N7-guanyl)ethyl]glutathione in DNA.
J Am Chem Soc **110**, 3284-3291

Pingoud A und Urbanke C (1997)
Arbeitsmethoden der Biochemie.
Walter de Gruyter Verlag, Berlin

Pitot HC, Goldworthy T, Moran S (1981)
The natural history of carcinogenesis: implication of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer.
J Supramol Struct Cell Biochem **17**, 133-146

Randerrath K, Randerrath E, Zhou G-D, Li D (1999)
Bulky endogenous DNA modifikations (I-compounds) – possible structural origins and functional implications.
Mutat Res **424**, 183-194

Rannug U, Sundvall A, Ramel C (1978)
The mutagenic effect of 1,2-dichloroethane on Salmonella typhimurium I. Activation through conjugation with glutathione in vitro.
Chem-Biol Interact **20**, 1-16

Raucy JL, Schultz ED, Wester MR, Arora S, Johnston DE, Omdahl JL, Carpenter SP (1997)
Human lymphocyte cytochrome P450 2E1, a putative marker for alcohol-mediated changes in hepatic chlorzoxazone activity.
Drug Metab Dispos **25**, 1429-1435

Ricci G, Caccuri AM, Lo Bello M, Pastore A, Piemonte F, Federici G (1994)
Colorimetric and fluorometric assays of glutathione transferase based on 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole.
Anal Biochem **218**, 463-465

Rodilla V, Benzie AA, Veitch JM, Murray GI, Rowe JD, Hawksworth GM (1998)
Glutathione S-transferase in human renal cortex and neoplastic tissue: enzymatic activity, isoenzyme profile and immunohistochemical localization.
Xenobiotica **28**, 443-456

Rowe JD, Nieves E, Listowsky I (1997)
Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferase: interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera.
Biochem J **325**, 481-486

Sasiadek M, Norppa H, Sorsa M (1991)
1,3-Butadiene and its epoxides induce sister chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro.
Mutat Res **261**, 117-121

Schmidt RF und Thews G (2000)
Physiologie des Menschen.
Springer Verlag, Berlin, 28. Aufl.

Schulz-Schalge T, Koch E, Golor G, Wiesmüller T, Hagenmaier HP, Neubert D (1991)
Comparison of the induction of cytochrome P450 and ethoxyresorufin O-deethylase by a single subcutaneous administration of TCDD in liver microsomes of marmoset (Callithrix jacchus) and rats.
Chemosphere **23**, 1933-1939

Seaton MJ, Follansbee MH, Bond JA (1995)
Oxidation of 1,2-epoxy-3-butene to 1,2:3,4-diepoxybutane by cDNA expressed human cytochrome P450 2E1 and 3A4 and human, mouse and rat liver microsomes.
Carcinogenesis **16**, 2287-2293

Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR (1988)
Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion.
Proc Natl Acad Sci USA **85**, 7293-7297

Sharer JE, Duescher RJ, Elfarra AA (1991)
Formation, stability and rearrangements of the glutathione conjugates of butadiene monoxide: evidence for the formation of stable sulfurane intermediates.
Chem Res Toxicol **4**, 430-436

Sherratt PJ, Pulford DJ, Harrison DJ, Green T, Hayes JD (1997)
Evidence that human class theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. Comparison of the tissue distribution of GSTT1-1 with that of classes alpha, mu and pi GST in human.
Biochem J **326**, 837-846

Shields PG, Harris CC (1991)
Molecular epidemiology and the genetics of environmental cancer.
J Am Med Assoc **266**, 681-687

Shugaev BB (1969)
Concentrations of hydrocarbons in tissues as a measure of toxicity.
Arch Environ Health **18**, 878-882

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985)
Measurement of protein using bicinchonic acid.
Anal Biochem **150**, 76-85

Song B-J, Gelboin HV, Park S-S, Yang CS, Gonzales FJ (1986)
Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the rat enzyme.
J Biol Chem **261**, 16689-16697

Sozzi G und Carney D (1998)
Molecular biology of lung cancer.
Curr Opin Pulm Med **4**, 207-212

Sundberg AGM, Nilsson R, Appelqvist EL, Dallner G (1993)
Immunohistochemical localization of alpha and pi class glutathione transferases in normal human tissues.
Pharmacol Toxicol **72**, 321-331

Swann PF (1990)
Why do O6-alkylguanine and O4-alkylthymine miscode? The relationship between the structure of DNA containng O6-alkylguanine and O4-alkylthymine and the mutagenic properties of these bases.
Mutat Res **233**, 81-94

Sweeney C, Farrow DC, Schwartz SM, Eaton DL, Checkoway H, Vaughan TL (2000)
Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms as risk factors for renal cell carcinoma: a case-control study.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **9**, 449-454

Sweeney LM, Schlosser PM, Medinsky MA, Bond JA (1997)
Physiologically based pharmacokinetic modeling of 1,3-butadiene, 1,2-epoxy-3-butene and 1,2:3,4-diepoxybutane toxicokinetics in mice and rats.
Carcinogenesis **18**, 611-625

Tew KD, Dutta S, Schultz M (1997)
Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents.
Adv Drug Deliv Rev **26**, 91-104

Thier R, Pemble SE, Taylor JB, Humphreys WG, Persmark M, Ketterer B, Guengerich FP (1993)
Expression of mammalian glutathione S-transferase 5-5 in Salmonella typhimurium TA 1535 leads to base-pair mutations upon exposure to dihalomethanes.
Proc Natl Acad Sci USA **90**, 8576-8580

Thier R, Müller M, Taylor JB, Pemble SE, Ketterer B, Guengerich FP (1995)
Enhancement of bacterial mutagenicity of bifunctional alkylating agents by expression of mammalian glutathione S-transferase.
Chem Res Toxicol **8**, 465-472

Thier R, Wiebel FA, Hinkel A, Burger A, Brüning T, Morgenroth K, Senge T, Wilhelm M, Schulz TG (1998a)
Species differences in glutathione transferase GSTT1-1 activity towards the model substrates methyl chloride and dichloromethane in liver and kidney.
Arch Toxicol **72**, 622-629

Thier R, Delbanco EH, Wiebel FA, Hallier E, Bolt HM (1998b)
Determination of glutathione transferase (GSTT1-1) in different tissues based on formation of radioactive metabolites using ^{35}S-glutathione.
Arch Toxicol **72**, 811-815

Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ, Moll R, Baum HP, Werner S (1988)
Chromophobe cell renal carcinoma and its variants – a report on 32 cases.
J Path **155**, 277-278

Thones W, (1990)
Klassifikation der Nierenzellkarzinome/Tumoren und ihre Beziehung zum Nephron-Sammelrohrsystem.
Klin Wochenschr **68**, 1102-1111

Thornton-Manning JR, Dahl AR, Bechtold WE, Griffith WC Jr., Henderson RF (1995)
Disposition of butadiene monoepoxide and butadiene diepoxide in various tissues of rats and mice following low-level inhalation exposure to 1,3-butadiene.
Carcinogenesis **16**, 1723-1731

Toffoli G, Viel A, Tumiotto L, Diannini F, Volpe R, Quaia M Boiocchi M (1992)
Expression of glutathione S-transferase-π in human tumours.
Eur J Cancer **28A**, 1441-1446

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.
Proc Nat Acad Sci **76**, 4350-4354

Tretyakova NY, Chiang S-Y, Walker VE, Swenberg JA (1998)
Quantitative analysis of 1,3-butadiene-induced DNA adducts in vivo and in vitro using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry.
J Mass Spectrom **33**, 363-376

Ulm K, Henschler D, Vamvakas S (1996)
Occupational exposure to perchloroethylene.
Cancer Causes Control **7**, 284-286

Uusküla M, Järventaus H, Hirvonen A, Sorsa M, Norppa H (1995)
Influence of GSTM1 genotype on sister chromatid exchange induction by styrene-7,8-oxide and 1,2-epoxy-3-butene in cultured human lymphocytes.
Carcinogenesis **16**, 947-950

Vamvakas S, Brüning T, Thomasson B, Lammert M, Baumüller A, Bolt HM, Dekant W, Birner G, Henschler D, Ulm K (1998)
Renal cell cancer correlated with occupational exposure to trichloroethene.
J Cancer Res Clin Oncol **124**, 374-382

Vangala RR, Laib RJ, Bolt HM (1993)
Evaluation of DNA damage by alkaline elution technique after inhalation exposure of rats and mice to 1,3-butadiene.
Arch Toxicol **67**, 34-38

Vieira I, Pasanen M, Raunio H, Cresteil T (1998)
Expression of CYP 2E1 in human lung and kidney during development and in full-term placenta: a differential methylation of the genes is involved in the regulation process.
Pharmacol Toxicol **83**, 183-187

Vollmer DM, Thier R, Bolt HM (1998)
Determination of the ethylene oxide adduct S-(2-hydroxyethyl)cysteine by a fluorometric HPLC method in albumin and globin from human blood.
Fresenius J Anal Chem **362**, 324-328

Walker JM (1994)
The bicinchonic (BCA) assay for protein quantitation.
Meth Mol Biol **32**, 5-8

Ward EM, Fajen JM, Ruder AM, Rinsky RA, Halperin WE, Fessler-Flesch CA (1995)
Mortality study of workers in 1,3-butadiene production units identified from a chemical workers cohort.
Environ Health Perspect **103**, 598-603

Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA (1998)
Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution.
Carcinogenesis **19**, 275-280

Wheeler CW, Wrighton SA, Guenthner TM (1992)
Detection of human lung cytochromes P-450 that are immunochemically related to cytochrome P-450IIE1 and cytochrome p-450IIIA.
Biochem Pharmacol **44**, 183-186

Wilce MCJ, Board PG, Feil SC, Parker MW (1995)
Crystal structure of a theta-class glutathione transferase.
EMBO J **14**, 2133-2143

Wilson RH (1944)
Health hazards encountered in the manufacture of synthetic rubber.
J Am Med Assoc **124**, 701-703

Wittekind C und Wagner G (1997)
Klassifikation maligner Tumoren.
Springer Verlag, Berlin, 5. Aufl.

Wogan GN (2000)
Impacts of chemicals on liver cancer risk.
Semin Cancer Biol **10**, 201-210

Zimniak P, Nanduri B, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J, Singhal SS, Srivastava SK, Awasthi S, Awasthi YC (1994)
Naturally occuring human glutathione S-transferase GSTP1-1isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymatic properties.
Eur J Biochem **224**, 893-899

DANKSAGUNG

Diese Dissertation wurde in der Zeit von Dezember 1996 bis August 2000 im Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund durchgeführt und stand unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt danke ich sehr für die Überlassung des Themas, für die Betreuung dieser Arbeit und die großzügige Förderung meiner weiteren beruflichen Laufbahn.

Herrn Prof. Dr. B. Lippert danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. R. Thier für die guten Ideen, die ständige Diskussionsbereitschaft und die durchgehende Unterstützung in allen Bereichen.

Desweiteren gilt mein spezieller Dank Herrn Prof. Dr. M. W. Linscheid und seiner Arbeitsgruppe an der Humboldt-Universität zu Berlin für die Bereitstellung der Massenspektrometer und gute wissenschaftliche Ratschläge, sowie Herrn D. Fischer für die häufige und freundschaftliche Beherbergung in seiner Wohnung.

Herrn Dr. W.W. Huber und Frau S. Beken danke ich für die Hilfe bei der Durchführung einiger spektralphotometrischer GST-Aktivitätsbestimmungen sowie Herrn Dr. T. G. Schulz für die Unterstützung bei den CYP2E1-Western Blots.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich Herrn Dr. J. Lambert.

Bei Herrn F. Geller bedanke ich mich für die verständliche Beratung bei statistischen Fragestellungen.

Frau A. Dommermuth und Frau C. Pütt danke ich für die Hilfe im Labor und die angenehme Zusammenarbeit sowie Herrn G. Zimmermann für den unermüdlichen praktischen Beistand bei der Lösung technischer Probleme.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit.

Schließlich gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meiner Frau Judith, für ihre liebevolle Zuwendung und Geduld während arbeitsreicher Abende und Wochenenden.

LEBENSLAUF

Name:	Evert Harald Delbanco
Geburtsdatum:	7. Mai 1969 in 26441 Jever
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

1975 – 1979	Grundschule Reilschule in Aurich
1979 – 1981	Orientierungsstufe in Aurich-Sandhorst
1981 – 1988	Gymnasium Ulricianum in Aurich
5/1988	Abitur
7/1988 – 9/1989	Grundwehrdienst im Sanitätsbataillon 11 in Leer
10/1989 – 9/1990	Studium der Chemietechnik an der Universität Dortmund
10/1990 – 4/1996	Studium der Chemie an der Universität Dortmund
5/1995 – 4/1996	Diplomarbeit am Institut für Spektrochemie und angewandte Spektroskopie (ISAS) in Dortmund unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. A. C. Broekaert
4/1996	Diplom
12/1996	Beginn der Dissertation am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund (IfADo) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt
seit 4/1997	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Arbeitsphysiologie in den Projekten „Arbeitsmedizinische Prävention bei Gefahrstoffbelastung“ und „Grundlagen und Mechanismen kanzerogener, mutagener und reproduktionstoxischer Wirkungen“