

Waldemar Lutz¹
 Maciej Tarkowski²
 Ewa Nowakowska¹

POLIMORFIZM GENETYCZNY S-TRANSFERAZ GLUTATIONOWYCH JAKO CZYNNIK PREDYSPONUJĄCY DO WYSTĄPIENIA ALERGII SKÓRNEJ*

GENETIC POLYMORPHISM OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE — A FACTOR PREDISPOSING TO ALLERGIC DERMATITIS

¹ Z Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej

Kierownik: prof. dr hab. W. Lutz

² Z Kliniki Chorób Zawodowych

Kierownik: dr C. Pałczyński

Instytutu Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi

STRESZCZENIE W fazie indukcji alergicznego kontaktowego zapalenia skóry proste związki chemiczne (hapteny), tworzą z białkami naskórka addukty prezentowane przez komórki Langerhansa limfocytom T. Związanie z nośnikiem białkowym jest koniecznym warunkiem aby niskocząsteczkowy alergen stał się immunogenem i wywołał reakcję immunologiczną. Powstanie adduktów alergenów z białkami jest uwarunkowane występowaniem w ich cząsteczce ugrupowań elektrofilowych lub ich nabyciem w I fazie biotransformacji. Aktywne metabolity alergenów ulegają dalszym przemianom w fazie II biotransformacji co prowadzi najczęściej do obniżenia ich aktywności chemicznej i szybszego wydalenia z organizmu. Ilość reaktywnych metabolitów (reaktywnych alergenów) dostępnych dla utworzenia adduktów z białkami reprezentuje sobą równowagę pomiędzy reakcjami aktywacji i deaktywacji.

Szczególną rolę w procesie deaktywacji alergenów (lub ich metabolitów) w II fazie biotransformacji pełnią S-transferazy glutationowe. Enzymy te katalizują reakcje, które prowadzą do obniżenia potencjału elektrofilowego alergenów (lub ich metabolitów), a tym samym zmniejszają ilość cząsteczek alergenu zdolnych do tworzenia wiązań kowalencyjnych (adduktów) z białkami. S-transferazy glutationowe występujące w cytoplazmie komórek ludzkich należą do pięciu klas: α (GST A), μ (GST M), θ (GST P), π (GST T) i Z (GST Z) i jednej klasy obecnej w mikrosomach. W skórze wykazano obecność izoenzymów GST T1 i GST M1. Obie izoformy biorą udział w procesie biotransformacji alergenów niskocząsteczkowych. Nosiciele defektywnych genów GST T1 i/lub GST M1, co łączy się z brakiem lub obniżeniem aktywności izoenzymów GST T1 i GST M1, są bardziej podatni na alergizujące działanie niektórych alergenów, np. timerosalu. Med. Pr. 2001; 52; 1; 45–51

SŁOWA KLUCZOWE: S-transferaza glutationowa, polimorfizm genetyczny, biotransformacja, alergeny kontaktowe, timerosal

ABSTRACT In the inductive phase of contact allergic dermatitis, simple chemical compounds (haptens) produce together with epidermic proteins adducts presented by Langerhans cells to T lymphocytes. Binding to protein carrier is a necessary condition of transforming a low-molecular allergen into immunogenic one and evoking immunological reaction. The production of allergen adducts with proteins is conditioned by the presence of electrophilic groups in their molecules, or their acquiring during biotransformation phase I. Active allergen metabolites undergo further alterations during biotransformation phase II which leads most frequently to the decline in their chemical activity and more rapid excretion from the body. The number of reactive metabolites (reactive allergens) available for producing adducts with proteins keeps the balance between activation and deactivation reactions.

Glutathione S-transferases play a particular role in the allergens (or their metabolites) deactivation process in biotransformation phase II. These enzymes catalyse reactions responsible for the declined electrophilic potential of allergens (or their metabolites), and thus for the decrease in the number of allergen molecules able to produce protein covalent bindings (adducts). Glutathione S-transferases, occurring in the human cellular cytoplasm belong to five classes: α (GST A), μ (GST M), θ (GST P), π (GST T) and Z (GST Z), as well as to one class present in microsomes. The study indicated the presence of isoenzymes GST T1 and GST M1 in the skin. Both isoforms participate in the process of low-molecular allergen biotransformation. Carriers of defective genes GST T1 and/or GST M1 are more vulnerable to allergenic effect of some allergens, eg. thimerosal, which is associated with the absence of or decrease in the activity of isoenzymes GST T1 and GST M1. Med Pr 2001; 52; 1; 45–51

KEY WORDS: glutathione-S transferase, genetic polymorphism, biotransformation, contact allergens, thimerosal

Skóra stanowi podstawową barierę obronną organizmu przed urazami chemicznymi, fizycznymi i mechanicznymi. Nie jest ona jedynie tkanką, która w sposób bierny osłania i chroni organizm przed szkodliwymi czynnikami środowiska zewnętrznego. W jej skład wchodzi wiele komórek, które biorą także czynny udział w tworzeniu bariery odpornościowej. Najważniejsze z nich to komórki dendryczne, keratynocyty, limfocyty T, komórki śródbłonna naczyń i inne (makrofagi, granulocyty, komórki tuczne, melanocyty). O aktywnym udziale tkanki skórnej w odporności organizmu decydują między innymi komórki Langerhansa, które

tworzą pulę komórek ogólnie określaną jako prezentującą antygen. Podobnie jak makrofagi, pochłaniają antygen na drodze endocytozy i następnie w węzłach chłonnych, drenujących miejsce ekspozycji, prezentują go razem z głównymi cząsteczkami zgodności tkankowej limfocytom T pomocniczym (Th). Aktywność komórek Langerhansa wyrażająca się zdolnością do endocytozy i prezentacji antygeny oraz związana z tym aktywacja limfocytów Th jest podstawowym mechanizmem, który decyduje o wystąpieniu alergicznego, kontaktowego zapalenia skóry.

W fazie indukcji alergicznego kontaktowego zapalenia skóry proste związki chemiczne (hapteny), tworzą z białkami naskórka kompleksy prezentowane przez komórki Langerhansa limfocytom T (1). Mimo dowodów, iż hapteny mogą się wiązać z endogennymi peptydami i być prezentowane na powierzchni błony tych komórek w połączeniu z cząstecz-

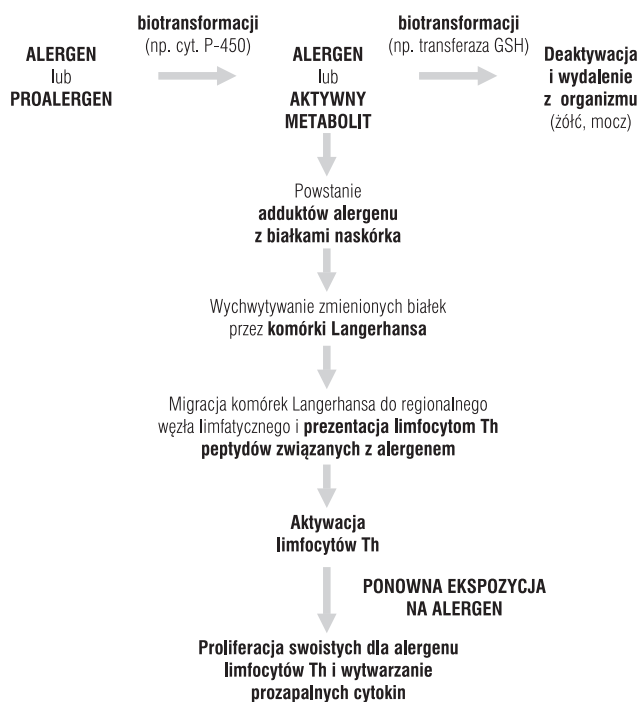
*Praca wykonana w ramach Strategicznego Programu Rządowego pt. „Bezpieczeństwo i ochrona zdrowia człowieka w środowisku pracy” dofinansowywanego przez Komitet Badań Naukowych w latach 1998–2001. Główny koordynator: Centralny Instytut Ochrony Pracy. Zadanie nr SPR-1 04.10.3 pt.: „Charakterystyka układu odpornościowego u osób zawodowo narażonych na czynniki rakotwórcze”. Kierownik zadania: prof. dr hab. W. Lutz.

kami MHC klasy II, nie można pominąć możliwości ich bezpośredniego przyłączenia się do cząsteczek MHC klasy II, co wykazano np. dla niklu (2).

Pierwszy kontakt z czynnikiem szkodliwym jest fazą, w której dochodzi do różnicowania się populacji limfocytów T pamięciowych o receptorze specyficznym dla określonego antygeny. Pula tych komórek stanowi podstawę efektywnej, nabytej odporności komórkowej i humoralnej. W przypadku kontaktowego, alergicznego zapalenia skóry szczególne znaczenie mają efektorowe mechanizmy odporności komórkowej, w których główną rolę odgrywają komórki Th1. Limfocyty pomocnicze, w związku z rodzajem uwalnianych cytokin generalnie podzielono na Th1 i Th2. Limfocyty Th1 przez uwalnianie takich cytokin jak IFN- γ czy limfotoksyna, determinują komórkowe mechanizmy odporności, w tym reakcje zapalne na kontaktowe alergeny skórne (3).

Niskocząsteczkowe alergeny są rozpoznawane przez limfocyty T jako hapteny. Zanim do tego jednak dojdzie w komórkach prezentujących antygen, w tym również komórkach Langerhansa, musi dojść do wchłonięcia antygeny oraz jego aktywacji metabolicznej. Aktywny alergen ulega związaniu z białkami, które po proteolitycznym rozszczepieniu na mniejsze fragmenty i związaniu z elementami cząsteczek zgodności tkankowej są transportowane na powierzchnię komórek. Związanie z nośnikiem białkowym jest koniecznym warunkiem aby niskocząsteczkowy alergen stał się immunogenny i wywołał reakcję immunologiczną. Wiązanie alergenu niskocząsteczkowego (hapten) – białko jest wiązaniem kowalencyjnym. Aby powstały takie kowalencyjne połączenia alergenu z białkami, te pierwsze muszą same mieć właściwości elektrofilowe lub ulegać biotransformacji w metabolity o takich właściwościach (ryc. 1).

Znaczna część alergenu niskocząsteczkowych nie jest wystarczająco reaktywna aby tworzyć wiązania kowalencyjne z białkami. Muszą one ulec aktywacji metabolicznej w procesie biotransformacji z udziałem enzymów komórkowych, co najczęściej odbywa się na drodze dwuelektronowej oksydacji katalizowanej przez cytochromy P-450 (faza I biotransformacji). W reakcjach tych powstają pochodne alergenu zawierające elektrofilowe grupy funkcyjne takie jak: hydroksylowa, aminowa, karboksylowa, czy epoksydowa. Są one lepiej rozpuszczalne w środowisku wodnym i łatwiej wydalane z organizmu. Obecność elektrofilowych grup funkcyjnych powoduje, że reagują one z komórkowymi makrocząsteczkami, np. białkami. Aktywne metabolity alergenu ulegają dalszym przemianom (faza II biotransformacji) z udziałem innych enzymów, które przyłączają do nich ugrupowania glutationowe, glukuronowe, siarczanowe i inne. Przyłączenie stosunkowo dużych polarnych cząsteczek do elektrofilowego metabolitu alergenu (lub do natywnego alergenu mającego takie właściwości) przyczynia się najczęściej do obniżenia ich aktywności chemicznej i szybszego wydalania z organizmu. W ten sposób ilość aktywnego alergenu zdolnego do reakcji z makrocząsteczkami i zapoczątkowania reakcji alergicznej w komórkach docelowych jest uzależniona



W fazie indukcji alergicznego kontaktowego zapalenia skóry proste związki chemiczne (hapteny) penetrują do naskórka. Tam, po aktywacji metabolicznej w I fazie biotransformacji, tworzą addukty z białkami. Aktywne hapteny mogą ulec deaktywacji i eliminacji ze skóry jeśli ulegną metabolizmowi w II fazie biotransformacji.

Ryc. 1. Schemat reakcji towarzyszących nadwrażliwości kontaktowej w stosunku do alergenu (haptenu)

od tego, które z komórkowych procesów biotransformacji, aktywacji czy deaktywacji, są silniej wyrażone. Uruchomienie lub niewystąpienie reakcji alergicznej jest poboczną konsekwencją charakteru przemian jakim alergeny ulegają w komórkach (4). Ilość reaktywnych metabolitów (reaktywnych alergenu) dostępnych dla utworzenia adduktów z białkami reprezentuje sobą równowagę pomiędzy reakcjami aktywacji i deaktywacji (detoksykacji). Działanie alergizujące jest więc wypadkową obu faz procesu biotransformacji (5,6).

Większość enzymów biorących udział w biotransformacji alergenu cechuje polimorfizm, czego konsekwencją jest to, że osoby wykazujące wysoką aktywność enzymów biorących udział w I fazie biotransformacji oraz brak lub niską aktywność enzymów II fazy mogą mieć zwiększone ryzyko wystąpienia u nich alergii związanej z ekspozycją na niskocząsteczkowe alergeny środowiskowe. Dzięki genetycznemu zróżnicowaniu aktywności oraz ekspresji genów kodujących enzymy metabolizujące alergeny, osoby podobnie ekspozowane wykazują osobniczo zmienną wrażliwość na alergizujące działania egzogennych czynników chemicznych (7,8,9,10).

Szczególną rolę w II fazie procesu biotransformacji odgrywiają S-transferazy glutationowe (11). Stanowią one rodzinę enzymów, których funkcja detoksykacyjna polega przede wszystkim na katalizowaniu reakcji sprzęgania endogennego glutationu z elektrofilowymi metabolitami powstającymi

w I fazie procesu biotransformacji. Enzymy te chronią komórki nie tylko przed szkodliwymi oddziaływaniami związków chemicznych o właściwościach elektrofilnych, ale również przed produktami stresu oksydacyjnego. Fakt, że S-transferazy glutationowe katalizują reakcje, które doprowadzają do obniżenia potencjału toksycznego bardzo szerokiego spektrum ksenobiotyków i ich metabolitów zwrócił uwagę na znaczenie tych enzymów w procesach deaktywacji alergenów (12,13).

Związki chemiczne, które są substratami dla S-transferaz glutationowych wykazują trzy główne cechy: 1) struktura chemiczna ich cząsteczki nadaje im charakter hydrofobowy, 2) w cząsteczce obecny jest atom elektrofilowy oraz 3) reagują z mierzalną szybkością z glutationem bez udziału katalizy enzymatycznej. Mechanizm, przez który S-transferaza glutationowa zwiększa szybkość reakcji sprzęgania związku chemicznego związany jest z deprotonacją cząsteczki glutationu ($GSH \rightarrow GS^-$), w czym bierze udział aktywna reszta aminokwasu tyrozyny (Tyr-O⁻), znajdującej się w centrum katalitycznym transferazy. Substraty dla S-transferaz glutationowych można podzielić na dwie grupy: 1) mające silnie wyrażone właściwości elektrofilowe oraz 2) nie mające lub mające słabo wyrażone właściwości elektrofilowe, które uzyskują dopiero po biotransformacji. Ta druga grupa obejmuje aktywne pośredniki metaboliczne powstające zarówno w I jak i w II fazie biotransformacji. Są to tlenki arenowe i epoksydy alkenowe, jony nitreniowe i karboniowe oraz wolne rodniki. W reakcjach sprzęgania katalizowanych przez S-transferazy glutationowe wyróżnić można reakcje wymiany, w których glutation zastępuje atom elektrofilowy lub całe ugrupowanie o takich właściwościach oraz reakcje addycji, w których glutation jest przyłączony do aktywnego wiązania podwójnego lub do naprężonego systemu pierścieniowego jaki może powstawać np. w czasie reakcji oksydacji z udziałem cytochromu P-450, kiedy powstają tlenki arenowe albo epoksydy alkenowe. Reakcje wymiany występują wówczas, kiedy w cząsteczce substratu występują chlorowce, grupy sulfonowe, fosforanowe lub nitrowe, przyłączone do alkilowego lub aromatycznego atomu węgla. Obecność w pierścieniu aromatycznym ugrupowań oddających elektrony, np. grupy aminowej lub hydroksylowej, spowalnia reakcje katalizowane przez S-transferazy glutationowe. Nie wszystkie reakcje sprzęgania glutationu z ksenobiotykami, które są katalizowane przez transferazy glutationowe, prowadzą do obniżenia potencjału toksycznego (zmniejszenia ich właściwości elektrofilowych). Przykładem może być katalizowane przez S-transferazę glutationową sprzęganie dibromometanu z glutationem. Reakcja ta kończy się powstaniem wysoce elektrofilowego jonu episulfoniowego (14).

S-transferazy glutationowe uczestniczą w biosyntezie fizjologicznie aktywnych związków endogennych, takich jak leukotrieny C_4 , prostaglandyny E_2 oraz w metabolizmie hydrofobowych hormonów steroidowych (8).

S-transferazy glutationowe, poza funkcjami katalitycznymi jakie pełnią w metabolizmie kseno- oraz endobiotyków,

funkcjonują również jako białka transportowe. Wychwytywanie elektrofilowych i lipofilnych cząsteczek pochodzenia egzogenne, np. 3-hydroksy-benzo (a) pirenu oraz jego dihydrodioli, umożliwia ich transport między poszczególnymi przedziałami komórkowymi, a także wydalanie ich z komórki. Ligandami S-transferaz glutationowych są również niektóre leki i ich metabolity a także substancje pochodzenia endogenne, np. bilirubina. Poza grupą związków będących substratami i ligandami dla S-transferaz glutationowych, występują również związki chemiczne mające właściwość kowalencyjnego wiązania się z tymi enzymami. Wykazano, że addukty z S-transferazą glutationową mogą tworzyć tlenowe metabolity dimetyloaminoazobenzenu oraz 3-metylocholantrenu (12,13).

W komórkach ssaków S-transferazy glutationowe są zlokalizowane zarówno w cytoplazmie jak i w mikrosomach. S-transferazy glutationowe występujące w cytoplazmie są dimerami, a te obecne w mikrosomach są trimerami. Ciężar podjednostek transferaz cytoplazmatycznych wynosi 25kD, a mikrosomalnych 17 kD. W każdej podjednostce wyróżnić można dwie domeny, które w reakcji katalizowanej przez enzym pełnią różne funkcje. Domena I bierze udział w polarnej interakcji pomiędzy glutationem i enzymem. Domena II jest odpowiedzialna za wiązanie elektrofilowego substratu. Porównując sekwencje aminokwasowe izoenzymów S-transferaz glutationowych zaobserwowano, że w obszarze domeny II występuje większa zmienność tej sekwencji niż w obszarze zajmowanym przez domenę I. Przypisać to można różnym właściwościom katalitycznym jakie izoenzymy S-transferazy glutationowej wykazują w stosunku do różnych elektrofilowych związków chemicznych (15).

Na podstawie różnic w specyficzności substratowej, właściwości immunologicznych, aktywności katalitycznej, homologii sekwencji aminokwasów, homologii sekwencji zasad w genach, lokalizacji genów na chromosomie, ruchliwości elektroforetycznej oraz specyficzności tkankowej w rodzinie S-transferaz glutationowych występujących w komórkach ludzkich wyróżniono pięć klas form cytoplazmatycznych: α (GST A), μ (GST M), π (GST P), θ (GST T) i Z (GST Z) oraz jedną klasę formy mikrosomalnej (MIC1) (16).

W obrębie klas cytoplazmatycznych znanych jest po kilka form izoenzymatycznych. W komórkach ludzkich wykazano dotychczas występowanie ekspresji pięciu genów kodujących cytoplazmatyczne formy S-transferazy glutationowej należące do klasy μ . Geny te oznaczono *GST M1*, *GST M2*, *GST M3*, *GST M4* i *GST M5*. Wszystkie te geny zlokalizowane są na chromosomie 1p13 a występowanie polimorfizmu zostało aktualnie potwierdzone dla dwóch genów: *GST M1* i *GST M3* (17,18).

Gen *GST M1* ma wielkość 5400 par zasad. Zasady są rozmieszczone w 8 eksonach i 7 intronach. Analiza molekularna genu *GST M1* wykazała, że w populacji ludzkiej występują osoby będące nosicielami normalnego allelu dla genu *GST M1* oraz osoby, u których w genomie stwierdza się całkowitą delecję tego genu. Homozygotyczna delecja *GST M1*

(obu alleli), oznaczona jako GST M1 (-), jest równoznaczna z brakiem aktywnego białka enzymatycznego kodowanego przez ten gen (genotyp/fenotyp zerowy). Ponieważ ekspresja genu *GST M1* jest cechą dominującą, dziedziczną autosomalnie, osoby mające w swoim genomie jeden prawidłowy allel genu *GST M1* (heterozygoty) wykazują w swoich komórkach obecność enzymu GST M1. Częstość występowania polimorfizmu *GST M1* wykazuje znaczne zróżnicowanie w zależności od regionów geograficznych z których pochodzi badana populacja. I tak w populacji europejskiej (kaukaskiej) 48,2% osób posiada delecję obu alleli GST M1, podobna częstość występowania tej delecji występuje u białych Amerykanów (52%) oraz w populacji japońskiej (48,6%). Natomiast w populacji afrykańsko-amerykańskiej delecja obu genów *GST M1* stwierdzona została tylko u 27% (10).

Ze względu na to, że GST M1 uczestniczy w metabolizmie dużej liczby potencjalnie toksycznych związków chemicznych przeprowadzono szereg badań mających ustalić w jakim stopniu polimorfizm genetyczny tego enzymu wywiera wpływ na metabolizm ksenobiotyków oraz na toksyczne właściwości ich metabolitów, wynikające z tworzenia adduktów z makrocząsteczkami komórkowymi. Większość z tych dotychczas przeprowadzonych badań wskazuje, że nosiciele zerowego genotypu *GST M1* wykazują znaczące upośledzenie w detoksykacji reaktywnych pośredników metabolicznych (10).

Kolejny polimorfizm genu *GST M1* wynika z obecności dwóch alleli *GST M1*A* i *GST M1*B* różniących się tylko jedną zasadą (G lub C w pozycji 534). Tranzycja ta, występująca w siódmym eksonie, powoduje wystąpienie zamiany lizyny na asparaginę w pozycji 172 cząsteczki enzymu. Zamiana ta nie wpływa w sposób istotny na zróżnicowanie w aktywności katalitycznej izoenzymów GST M1A i GST M1B (19).

Innym genem klasy μ wykazującym polimorfizm jest gen *GST M3*, dla którego zidentyfikowano dwa allele: *GST M3*A* i *GST M3*B*. Analiza sekwencji tego genu pokazała, że mutacja allele *GST M3*B* jest trinukleotydową delecją sekwencji palindromowej (powtórzenia CT poprzedzone powtórzeniami GA) w 6 intronie. Wystąpienie tej mutacji powoduje utworzenie sekwencji 5'-AAGATA-3', która jest rozpoznawana przez negatywny czynnik transkrypcyjny YY1 odpowiedzialny za zmniejszoną ekspresję genu. W niezmutowanym genie czynnik ten nie wywiera wpływu na jego ekspresję. To doprowadza do obniżenia zawartości enzymu GST M3 w komórkach u nosicieli allele *GST M3*B*. Analiza częstości genotypów *GST M3* w populacji brytyjskiej wykazała, że homozygoty *GST M3*A/A* stanowią 71%, heterozygoty *GST M3*A/B* – 26% a homozygoty *GST M3*B/B* – 3% (10).

W klasie S-transferaz glutationowych θ (GST T) zidentyfikowano dwa geny *GST T1* oraz *GST T2*. Oba te geny są obecne na chromosomie 22. Polimorfizm wykazano tylko dla genu *GST T1* i jest on związany z delecją całego genu. Zaobserwowano występowanie znacznego zróżnicowania interetnicznego w występowaniu tego polimorfizmu. Zero-

wy genotyp *GST T1* występuje tylko u około 10% populacji europejskiej, ale przekracza 60% w populacjach daleko-wschodnich (Chiny, Korea). Genotyp *GST T1* wpływa w istotny sposób na reakcje sprzęgania glutationu z niskocząsteczkowymi związkami, jak np. bromek metylu, chlorek metylu, tlenek etylenu, 1,2-dibromoetan czy dichlorometan. Na podstawie szybkości z jaką enzym GST T1 katalizuje sprzęganie glutationu z tymi związkami w erytrocytach populację ludzką można podzielić na dwie subpopulacje, sprzęgających i niesprzęgających. Katalizowana przez GST T1 większa szybkość sprzęgania glutationu wywiera skutek ochronny (detoksykacyjny) wówczas, gdy reakcja ta ma charakter bioinaktywacji, np. reakcja sprzęgania z tlenkiem etylenu. Natomiast wówczas, gdy prowadzi ona do powstania bardziej toksycznych metabolitów, np. reakcja sprzęgania z 1,2-dibromoetanem, ma ona charakter bioaktywacji (20,21).

W klasie π S-transferaz glutationowych (GST P) wykryto dotychczas tylko jeden gen oznaczony jako *GST P1*, który jest zlokalizowany na chromosomie 11q13. Wykazano także obecność w genomie ludzkim nieaktywnego transkrypcyjnie pseudogenu (*GST P1 P*), występującego na chromosomie 12. Gen *GST P1* wykazuje polimorfizm wynikający z tranzykcji A→G w pozycji 313, tranzykcji C→T w pozycji 341 oraz tranzykcji C→T w pozycji 555. Tranzykcje te zmieniają kodon 104 z ATC (izoleucyna) na GTC (walina) i kodon 113 z GCG (alanina) na GTG (walina). Substytucja zasady w pozycji 555 jest mutacją neutralną, która nie powoduje zamiany aminokwasu, którym pozostaje nadal seryna. Mutacja zasady 341 jest zawsze sprzężona z mutacją zasady w pozycji 313. Uwzględniając wzór mutacji lub ich brak dla locus *GST P1* wyróżniono trzy allele: *GST P1*A* (brak mutacji), *GST P1*B* (mutacja zasady w pozycji 313) oraz *GST P1*C* (mutacja zasad w pozycjach 313 i 341). Zamiana aminokwasów w pozycjach 104 (Ile-Val) i 113 (Ala-Val), obecnych w tym fragmencie łańcucha polipeptydowego, który tworzy miejsce aktywne enzymu o wysokim powinowactwie do substancji elektrofilowych, przyczynia się do czterokrotnego obniżenia aktywności katalitycznej. Łączy się to z wystąpieniem fenotypu wolnego sprzęgania w porównaniu z formą niezmutowaną. GST P1 bierze udział w reakcjach sprzęgania elektrofilnych dioloepoksydów policyklicznych węglowodorów aromatycznych. Osoby mające w swoim genomie homozygotyczny zestaw alleli *GST P1*A/A* detoksykują te elektrofilne metabolity znacznie szybciej niż osoby homozygotyczne *GST P1*C/C* i *GST P1*B/B*. Wykazano również, że obecność jednego zmutowanego allele (*GST P1*B* lub *GST P1*C*) u heterozygot przyczynia się do obniżenia zdolności komórek do sprzęgania elektrofilnych metabolitów policyklicznych węglowodorów aromatycznych (22).

W przypadku klasy Z wykazano występowanie dwóch polimorfizmów. W eksonie 3 genu *GST Z1* wykazano obecność mutacji związanej z tranzycją A → G albo w pozycji nukleotydów 94 albo 124. Te mutacje punktowe powodują zmianę w sekwencji aminokwasowej enzymów GST Z1.

W pierwszym przypadku łączy się to ze zmianą kodonu 32 i zamianą Liz na Glu a w drugim zmianą kodonu 42 i zamianą Arg na Gli. Aktualnie potwierdzono występowanie trzech alleli *GST Z1*: *GST Z1*A* (A⁹⁴A¹²⁴) (allel dziki), *GST Z1*B* (A⁹⁴G¹²⁴) oraz *GST Z1*C* (G⁹⁴G¹²⁴). Obecność mutacji przyczynia się do syntezy enzymu o obniżonej aktywności transferazowej (23).

Geny kodujące S-transferazy glutationowe, podobnie jak ogromna większość genów składających się na genom człowieka, ma charakter nieciągły. Tylko kilka genów ma strukturę ciągłą (np. gen *NAT2* kodujący N-acetylotransferazę). Sekwencje kodujące (eksony) są poroizdzielane przez sekwencje niekodujące (introny). Poza tymi sekwencjami w strukturze jednostki genowej wyróżnia się sekwencję promotora, do której przyłącza się polimeraza RNA oraz sekwencje regulatorowe, do których przyłączają się specyficzne białkowe regulatory procesu transkrypcji genu. Zwiększona ekspresja genu S-transferazy glutationowej, wyrażająca się zwiększoną syntezą mRNA w procesie transkrypcji, występuje w odpowiedzi na pojawienie się w komórce ksenobiotyków metabolizowanych z udziałem tego enzymu lub też w warunkach stresu oksydacyjnego (24).

Dotychczas zebrano stosunkowo mało informacji na temat regulacji ekspresji genów S-transferaz glutationowych, a większość tych informacji pochodzi z badań na komórkach zwierzęcych. Te ostatnie mają nieco odmienne regiony regulacyjne dla poszczególnych genów S-transferaz glutationowych od tych obecnych w komórkach ludzkich. Tym niemniej można przyjąć, że podstawowe mechanizmy regulujące ekspresję genów S-transferaz glutationowych w komórkach zwierzęcych są podobne do tych w komórkach ludzkich.

W genach kodujących S-transferazy glutationowe wykazano występowanie szeregu sekwencji (elementów) regulatorowych oraz sekwencji wzmacniających zlokalizowanych w regionie 5'-flankującym tych genów. W hepatocytach szczurzych np. w obszarze sekwencji o długości 1700 par zasad, poprzedzającej miejsce startu transkrypcji, wykazano obecność pięciu elementów regulatorowych (25). Pierwszy z nich to element kontrolujący podstawową ekspresję genu S-transferazy glutationowej *GST A1-1* a drugi kontrolujący (uruchamiający) specyficzną dla wątroby indukcję ekspresji tego genu. W bliskim sąsiedztwie promotora występuje element wrażliwy na glukokortykoidy, podobny do tego jaki występuje w regionie flankującym 5' genu *CYP 1A1* i jest rozpoznawany przez kompleks receptora Ah z planarnymi cząsteczkami węglowodorów aromatycznych (XRE – *xenobiotic responsive element*). Ponadto w sekwencji złożonej z 1700 par zasad wykazano obecność miejsca regulatorowego wrażliwego na antyoksydanty (ARE – *antioxidant responsive element*). Ten element regulacyjny ma podobną sekwencję zasad jak elektrofilowy element regulacyjny znajdujący się w genach S-transferaz glutationowych obecnych w genomie mysim. Indukcja ekspresji tych genów S-transferaz glutationowych za pośrednictwem ARE zachodzi w obecności dwóch

klas induktorów. Do pierwszej należą związki mające ugrupowania elektrofilowe, np. akrylany, fumarany, maleiniany, winyloketony, czy winylosulfony. Do drugiej klasy induktorów należą związki reagujące z grupami wodorosiarczkowymi na drodze oksydoredukcji lub na drodze ich alkilacji, np. peroksydy, dimerkaptany, metale ciężkie, ditiolotioneniny, czy związki arsenowe. XRE oraz ARE, pojedynczo lub razem, biorą udział w regulacji ekspresji genów kodujących S-transferazy glutationowe. Które z tych genów będą ulegały aktywacji, będzie zależało od tego jaka tkanka lub narząd są przedmiotem toksycznych oddziaływań ksenobiotyków (26,27,28).

S-transferazy glutationowe człowieka oprócz tego, że wykazują zróżnicowanie międzyosobnicze, wykazują również zróżnicowanie tkankowe i narządowe. Różnice w tkankowym i narządowym rozmieszczeniu S-transferaz glutationowych mogą wynikać ze zróżnicowanej ekspresji genów kodujących poszczególne izoformy tych enzymów. Charakterystyczny dla każdej tkanki skład izoenzymów S-transferaz glutationowych oraz aktywność katalityczna mogą się zmieniać w rozwoju osobniczym, a także być modulowane przez szereg czynników endogennych (np. hormony) i egzogennych (np. induktory chemiczne) (12, 13).

Ilościowe i jakościowe różnice w dystrybucji tkankowej izoenzymów S-transferazy glutationowej są bardzo istotne dla wrażliwości komórek na toksyczne oddziaływania ksenobiotyków. Izoenzymy klasy μ są grupą najpowszechniej ulegającą ekspresji w komórkach różnych tkanek i narządów człowieka. Ich obecność potwierdzono w wątrobie, mózgu, płucach, sercu, śledzionie, nerkach, mięśniach szkieletowych, żołądku, śluzówce jelit i limfocytach. Ekspresję izoenzymów klasy π wykazano w większości badanych narządów człowieka: płucu, pęcherzu moczowym, okrężnicy, w tkankach jąder i prostaty, erytrocytach i limfocytach krwi obwodowej. Izoenzymy klasy π stanowią główną część (90%) wszystkich S-transferaz glutationowych płuca, ale występują w niewielkiej ilości w wątrobie i nadnerczach. Izoenzymy klasy α wykryto w wątrobie natomiast nie wykazano ich ekspresji w płucach, mózgu, erytrocytach i łożysku (8).

Badania ostatnich lat potwierdziły występowanie izoenzymów GST T1 i GST M1 w skórze (29). To zwróciło uwagę badaczy na możliwy udział tych izoenzymów w reakcjach deaktywacji ksenobiotyków, które wywołują alergię skórą, kontaktową. Ukazało się już kilka prac, które potwierdzają, że nosiciele defektywnego genotypu, związanego z brakiem lub obniżoną aktywnością niektórych izoenzymów S-transferazy glutationowej są bardziej wrażliwi na alergizujące działanie niektórych ksenobiotyków (30). Interesujące wyniki badań uzyskano badając alergizujące działanie timerosalu u osób ze zróżnicowanym genotypem dwóch S-transferaz glutationowych, GST T1 oraz GST M1 (31).

Timerosal (*thimerosal*), sól sodowa kwasu etylortęciotiosalicylowego, jest stosowany jako środek konserwujący w szczepionkach oraz preparatach oftalmologicznych. Związek ten jest znany jako czynnik alergizujący typu IV (32). Za-

obserwowano występowanie reakcji alergicznej zarówno u chorych z alergią kontaktową oraz u zdrowych pracowników służby zdrowia, którzy mieli kontakt ze szczepionkami zawierającymi timerosal (33,34). Uważa się, że w komórkowym metabolizmie timerosalu bierze udział sprzęgający system enzymatyczny związany z glutationem i S-transferazami glutationowymi (31). Te ostatnie katalizują przeniesienie cząsteczki glutationu na sam timerosal lub produkty jego rozpadu, w tym etylortęć. Jeśli komórkowy system glutation – S-transferazy glutationowe wydajnie zobojętnia aktywne pochodne powstające z rozpadu timerosalu nie tworzą one kowalencyjnych połączeń z białkami. Tym samym nie są tworzone obce antygenowo addukty białkowe mogące doprowadzić do powstania reakcji alergicznej. Uważa się, że reakcja alergiczna na timerosal jest spowodowana głównie przez etylortęć, która powstaje w wyniku rozpadu timerosalu w komórkach skóry (35). Są jednak również dane, że timerosal oddziałuje z komórkowymi grupami -SH przed rozszczepieniem cząsteczki na kwas tiosalicylowy i etylortęć (36). Wymienia się także możliwy udział stresu oksydacyjnego w mechanizmie skutków toksycznych powodowanych przez timerosal (37). W komórkowym metabolizmie timerosalu z udziałem S-transferaz glutationowych, który prowadzi do powstania nieaktywnych pochodnych, mogą brać udział dwie izoformy S-transferazy glutationowej: GST M1 i GST T1. Wynika to z tego, że reakcje alergiczne na timerosal występują najczęściej u nosicieli połączonej delecji obu tych genów (31).

Westphal i wsp. (31) wykazali, że w badanej przez nich grupie 44 osób z objawami alergii kontaktowej na timerosal aż 16 osób wykazywało równoległą nadwrażliwość na sole niklu (siarczan niklu). Jest to interesujące z tego względu, że jak wynika z dotychczasowych badań w mechanizmie powstawania alergii kontaktowej na timerosal, o czym wspomniano wcześniej, istotny udział odgrywają zmiany w poziomie glutationu i wynikające z tego zmiany komórkowego potencjału redoks (37). Nikiel należy do grupy metali, które prawdopodobnie swoje działanie alergizujące realizują przez powodowanie zmian w komórkowym potencjale redoks oraz, co się z tym także łączy, tworzeniem trwałych wiązań z grupami SH białek (38,39). Powstanie takich połączeń może sprzyjać powstawaniu zmienionych antygenowo białek, które są rozpoznawane jako obce przez komórki układu odpornościowego. Dotychczas nie ma danych w jakim stopniu zerowy genotyp *GST M1* oraz *GST T1* może wpływać na występowanie alergii kontaktowej na nikiel.

PIŚMIENNICTWO

- Majewski S.: Układ odpornościowy skóry. W: M. Jakubisiak, red. Immunologia. Warszawa, Wydawnictwa Naukowe PWN, 1998.
- Emtestam L., Olerup O.: On T-cell recognition of nickel as a hapten. *Acta Derm. Venerol.* 1996, 76, 344–347.
- Kimber I.: Contact hypersensitivity. W: D.A. Lawrence, red. *Comprehensive Toxicology. Toxicology of the Immune System.* Cambridge, Pergamon Press, Elsevier Science Inc., 1997.
- Pumford N.R., Halmes N.Ch.: Protein targets of xenobiotic reactive intermediates. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997, 37, 91–117.
- Garnier R., Rambourg-Schepens M.O., Muller A., Hallier E.: Glutathione transferase activity and the formation of macromolecular adducts in two cases of acute methyl bromide poisoning. *Occup. Environ. Med.* 1996, 53, 211–215.
- Utrecht J.P.: The role of leukocyte-generated reactive metabolites in the pathogenesis of idiosyncratic drug reactions. *Drug Metab. Rev.* 1992, 24, 299–366.
- Indulski J.A., Lutz W.: Metabolic genotype in relation to individual susceptibility to environmental carcinogens. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2000, 73, 71–85.
- Jaskuła-Sztul R.: Polimorfizm enzymów detoksykacyjnych. *Post. Biochem.* 2000, 46, 50–59.
- Nakajima T., Aoyama T.: Polymorphism of drug-metabolizing enzymes in relation to individual susceptibility to industrial chemicals. *Industrial Health* 2000, 38, 43–152.
- Wormhoudt L.W., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E.: Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: Relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 1999, 29, 59–124.
- Seidegard J., Ekstrom G.: The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ. Health Perspect.* 1997, 105, Supl. 4, 791–799.
- Armstrong R.N.: Glutathione transferases. W: F.P. Guengerich, red. *Comprehensive Toxicology. Biotransformation.* Cambridge, Pergamon Press, Elsevier Science Inc., 1997.
- Armstrong R.N.: Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 1997, 10, 2–35.
- Parkinson A.: Biotransformation of xenobiotics. W: C.D. Klaassen, red. *Casaret and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons.* New York, McGraw-Hill, 1996.
- Commandeur J.N.M., Stijnjes G.J., Vermeulen N.P.E.: Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione-S-conjugates. *Pharmacol. Rev.* 1995, 47, 271–306.
- Blackburn B.P., Jermiin L.S., Chelvanayagam G.: Polymorphism of phase II enzymes: identification of new enzymes and polymorphic variants by database analysis. *Toxicol. Letters* 1998, 102–103, 149–154.
- Anttila S., Luostarinen L., Hirvonen A., Elovaara E., Karjalainen A., Nurminen T. i wsp.: Pulmonary expression of glutathione-S-transferase M3 in lung cancer patients: association with GSTM1 polymorphism, smoking, and asbestos exposure. *Cancer Res.* 1995, 55, 3305–3316.
- Yengi L., Inskip A., Gilford J., Alldersea J., Bailey L., Smith A. i wsp.: Polymorphism at the glutathione-S-transferase locus GSTM3: interactions with cytochrome P450 and glutathione-S-transferase genotypes as risk factors for multiple cutaneous basal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996, 56, 1974–1985.
- Widersten M., Pearson W.R., Engstrom A., Mannervik B.: Heterologous expression of the allelic variant Mu-class glutathione transferases μ and ψ . *Biochem. J.* 1991, 295, 313–317.
- Ploemen J.H.T.M., Wormhoudt L.W., van Ommen B., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E., van Bladeren P.J.: Polymorphism in the glutathione conjugation activity of human erythrocytes toward ethylene

- dibromide and 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propane. *Biochim. Biophys. Acta* 1995, 1243, 469–456.
21. Webb G., Vaska V., Coggan M., Board P.: Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1). *Genomics* 1996, 33, 121–129.
 22. Harries L.W., Stubbins M.J., Forman D., Howard G.C., Wolf C.R.: Identification of genetic polymorphisms at the glutathione-S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997, 18, 641–653.
 23. Blackburn A.C., Tzeng H.F., Anders M.W., Board P.G.: Discovery of a functional polymorphism in human glutathione transferase zeta by expressed sequence tag database analysis. *Pharmacogenetics* 2000, 1, 49–57.
 24. Kensler T.W.: Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes. *Environ. Health Perspect.* 1997, 105, 965–970.
 25. Jaiswal A.K.: Antioxidant response element. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 48, 439–444.
 26. Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A.: Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999, 39, 67–101.
 27. Prestera T., Holtzclaw W.D., Zhang Y., Talalay P.: Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 2965–2970.
 28. Wasserman W.W., Fahl W.E.: Functional antioxidant responsive elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 5361–5366.
 29. Kerb R., Brockmoller J., Reum T., Roots I.: Deficiency of glutathione S-transferase T1 and M1 as heritable factors of increased cutaneous UV sensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 1997, 108, 229–232.
 30. Vereczkey L., Jemnitz K., Gregus Z.: Human drug metabolizing enzymes. II. Conjugation enzymes. *Acta Pharm. Hungar.* 1998, 68, 284–288.
 31. Westphal G.A., Schnuch A., Schultz T.G., Reich K., Aberer W., Brasch J. i wsp.: Homozygous gene deletions of the glutathione S-transferases M1 and T1 are associated with thimerosal sensitization. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2000, 73, 384–388.
 32. Camera E., Cannistraci C., Cristaudo A., Santucci B., Picardo M.: Studies on the mechanism of thimerosal sensitivity. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 1997, 10, 49–51.
 33. Aberer W., Kraenke B.: Thimerosal is a frequent sensitizer but is not in the standard series. *Contact Dermatitis* 1995, 32, 367–368.
 34. Schnuch A., Uter W., Geier J., Frosch P.J., Rustmeyer T.: Contact allergies in healthcare workers. Results from the IVDK. *Acta Derm. Venerol.* 1998, 78, 358–365.
 35. Santucci B., Cannistraci C., Camera E., Cristaudo A., Picardo M.: Thimerosal positives: the role of organomercury alkyl compounds. *Contact Dermatitis* 1998, 38, 325–328.
 36. Santucci B., Cannistraci C., Cristaudo E., Camera E., Picardo M.: Thimerosal positives: the role of SH groups and divalent ions. *Contact Dermatitis* 1998, 39, 123–126.
 37. Bulat P., Dujic I., Potkonjak B., Vidakovic A.: Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in workers occupationally exposed to mercury. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1998, 71, 37–39.
 38. Li W., Zhao Y., Chou I-N.: Alterations in cytoskeletal protein sulfhydryls and cellular glutathione in cultured cells exposed to cadmium and nickel ions. *Toxicology* 1993, 77, 65–79.
 39. WHO. Kryteria Zdrowotne Środowiska: Nikiel. Tom 108. Łódź, Instytut Medycyny Pracy, 1996.
- Adres autorów: Św. Teresy 8, 90-950 Łódź
Nadesłano: 24.11.2000
Zatwierdzono: 11.01.2001