

**Charakterisierung der
Omega-Glutathion S-Transferase CeGSTO-1 und
des Elongationsfaktors der Translation CeEF-1 γ bei
Caenorhabditis elegans (Maupas, 1900)**

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
- Dr. rer. nat. -**

des Departments Biologie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Cora Burmeister
aus Hamburg

Hamburg, 2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. E. LIEBAU
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 07. April 2006

Hamburg, den 15. März 2006



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Nematoda	1
1.1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	2
1.2 Oxidativer Stress	4
1.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und ihre Entstehung	4
1.2.2 Oxidative Schäden durch ROS	6
1.2.3 Entgiftung durch Antioxidantien und Biotransformation	6
1.2.4 Entgiftung bei Nematoden	8
1.3 Glutathion (GSH) und Glutathion-Stoffwechsel	8
1.3.1 Glutathion S-Transferasen (GSTs)	10
1.3.2 Klassifikation der GSTs	11
1.3.3 Die Omega-Klasse der cytosolischen GSTs (GSTO)	12
1.3.4 Beschreibung der verwendeten Xenobiotika	13
1.4 Elongation der eukaryotischen Translation	15
1.4.1 Der Elongationszyklus der Translation	15
1.4.2 Die Untereinheiten des Elongationsfaktors 1 (eEF-1)	17
1.5 Zielsetzung	18
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien, Bioreagenzien und Kits	20
2.1.2 Medien für das Arbeiten mit Bakterien	23
2.1.3 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	24
2.1.4 Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten	25
2.1.5 Puffer, Lösungen und Medien für das Arbeiten mit <i>C. elegans</i>	26
2.1.6 Plasmidvektoren	27
2.1.7 Bakterienstämme (<i>E. coli</i>) und Nematodenstämme (<i>C. elegans</i>)	27
2.2 Molekularbiologische Methoden zur Präparation von Nukleinsäuren	28
2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	28
2.2.2 Plasmid-DNA Präparation (Mini-, Midi-, Maxipräparation)	30
2.2.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren	31

2.2.4	Analytische und präparative Agarosegel-Elektrophorese	31
2.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.2.6	DNA-Sequenzierung	32
2.3	Molekularbiologische Klonierungsmethoden	33
2.3.1	Restriktionsverdau	33
2.3.2	Ligation	33
2.3.3	Plasmidtransformation in chemisch-kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	33
2.3.4	TopoTA-Vektor/Blau-Weiß-Selektion	34
2.3.5	Bakterienglycerinstocks	34
2.4	Molekularbiologische Arbeiten mit RNA	34
2.4.1	Präparation von _{gesamt} RNA aus Nematoden mit Trizol	34
2.4.2	Reverse Transkriptase-Reaktion	35
2.4.3	Northern Blot (Transfer von RNA auf eine Nylonmembran)	35
2.4.4	Hybridisierung des Northern Blots mit radioaktiv markierter DNA	36
2.5	Biochemische Methoden	36
2.5.1	Rekombinante Expression verschiedener Proteine	36
2.5.2	Proteinaufreinigung im "Batch"-Verfahren	37
2.5.3	Proteinaufreinigung durch Gelfiltration (mittels FPLC-Säulen)	38
2.5.4	Proteinverdau mit Faktor Xa	39
2.5.5	Proteinbestimmung nach Bradford, 1976	39
2.5.6	SDS-Disk-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.5.7	Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	40
2.5.8	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	40
2.5.9	Western Blot-Analyse und Dot Blot-Analyse	40
2.5.10	Immundetektion transferierter Proteine	41
2.5.11	Enzymaktivitätstests	42
2.5.12	„Surface Plasmon Resonance“ (SPR) Messungen	43
2.5.13	„Hemmhoftest“	44
2.5.14	Kristallisation der PfGST1 nach der Diffusionsmethode	44
2.5.15	Vermessung und Strukturanalyse der PfGST1-Kristalle	45
2.5.16	Ko-Kristallisation von PfGST1 mit S-Hexyl-GSH (Inhibitor)	45
2.6	<i>C. elegans</i>-Methoden	46
2.6.1	<i>C. elegans</i> -Kultivierung	46
2.6.2	Langzeit-Lagerung von <i>C. elegans</i>	46
2.6.3	Aufreinigung der Nematoden über einen Sucrose-Gradienten	46
2.6.4	„Bleaching“	47
2.6.5	Klonierung von Konstrukten für die Mikroinjektion in <i>C. elegans</i>	47
2.6.6	<i>C. elegans</i> -Mikroinjektion	48
2.6.7	„Single-Worm“-PCR	48

2.6.8	Fixierung der Würmer für photographische Aufnahmen	48
2.6.9	„RNA-Interferenz“ (RNAi) durch „Futter“-Bakterien HT115	49
2.6.10	Stressversuche	49
2.6.11	Bestimmung von Lebensdauer und Nachkommenzahlen	50
2.6.12	Immunhistologische Färbung von <i>C. elegans</i>	50
2.6.13	Elektronenmikroskopie	51
3.	Ergebnisse	52
3.1	Sequenzanalyse des Gens <i>cegsto-1</i> und des Proteins CeGSTO-1	52
3.1.1	Lokalisation von <i>cegsto-1</i> im Genom	52
3.1.2	Nukleotidsequenz von <i>cegsto-1</i>	52
3.1.3	Alignment der CeGSTO-1 mit Omega GSTs anderer Organismen	54
3.1.4	Phylogenetische Untersuchungen von CeGSTO-1	55
3.2	Promotoranalyse von <i>cegsto-1</i>	57
3.2.1	Analyse der Promotorsequenz und potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen von <i>cegsto-1</i>	57
3.2.2	Das Expressionsmuster von <i>cegsto-1</i> in transgenen <i>C. elegans</i>	59
3.2.3	Bestimmung des Minimalpromotor von <i>cegsto-1</i> anhand von GFP-Deletionskonstrukten	62
3.2.4	Einfluss der GATA-Box auf die Transkription von <i>cegsto-1</i>	63
3.2.5	RNAi der Transkriptionsfaktoren ELT-2 und ELT-4	64
3.2.6	Stressinduzierbarkeit des <i>cegsto-1</i> -Promotors	65
3.3	Expression und Enzymaktivität rekombinanter CeGSTO-1	66
3.3.1	Herstellung von rekombinanter CeGSTO-1 in <i>E. coli</i>	66
3.3.2	Gelfiltration der CeGSTO-1	67
3.3.3	Herstellung von Anti-CeGSTO-1-Antikörper in der Maus	68
3.3.4	Enzymtests mit rekombinanter CeGSTO-1	69
3.3.5	Schutzfunktion der CeGSTO-1 vor oxidativem Stress in <i>E. coli</i> („Hemmhofstest“)	71
3.4	Charakterisierung der CeGSTO-1 in <i>C. elegans</i>	74
3.4.1	Lokalisation von nativer CeGSTO-1 in <i>C. elegans</i>	74
3.4.2	Rekombinante Überexpression von <i>cegsto-1</i> in <i>C. elegans</i>	75
3.4.3	Blockierung der <i>cegsto-1</i> -Expression durch RNAi	77
3.5	Untersuchung der GSH-Bindungsstelle von CeEF-1γ	80
3.5.1	Sequenzanalyse der GSH-Bindungsstelle von CeEF-1 γ	80
3.5.2	Phylogenetische Analyse von CeEF-1 γ	81
3.5.3	Herstellung von rekombinantem CeEF-1 γ in <i>E. coli</i>	82
3.5.4	Herstellung eines Anti-CeEF-1 γ -Antikörpers im Kaninchen	83

3.5.5	Expression der N-terminalen Domäne von CeEF-1 γ	83
3.5.6	Lokalisation von CeEF-1 γ in <i>C. elegans</i>	85
3.5.7	Überexpression von <i>cegsto-1</i> in <i>C. elegans</i>	86
3.5.8	Herstellung von rekombinantem CeEF-1 β in <i>E. coli</i>	88
3.5.9	Protein-Protein-Interaktionen zwischen CeEF-1 γ und CeEF-1 β	89
3.5.10	GST-Aktivität des CeEF-1-Komplexes	90
3.6	Strukturanalyse der PfGST1 von <i>Plasmodium falciparum</i>	93
3.6.1	Kristallisation der PfGST1	93
3.6.2	Vermessung der PfGST1-Kristalle	94
4.	Diskussion	96
4.1	Diskussion der Sequenz und Phylogenie der CeGSTO-1	96
4.1.1	Analyse der Nukleotidsequenz von <i>cegsto-1</i>	96
4.1.2	Phylogenetische Analyse von CeGSTO-1	97
4.1.3	Diskussion der Aminosäuresequenz der CeGSTO-1	100
4.2	Enzymatische Aktivität rekombinanter CeGSTO-1 <i>in vitro</i>	101
4.3	Analyse des <i>cegsto-1</i>-Expressionsmusters in <i>C. elegans</i>	104
4.4	Promotoranalyse von <i>cegsto-1</i>	106
4.5	Analyse der Schutzfunktion der CeGSTO-1 in <i>E. coli</i>	108
4.6	Funktionelle Analyse von CeGSTO-1 in <i>C. elegans</i>	109
4.6.1	Die Stressresistenz von <i>cegsto-1</i> -Überexpressionswürmern	110
4.6.2	Diskussion der Stresssensitivität von <i>cegsto-1</i> -RNAi-Würmern	111
4.7	Diskussion des CeEF-1γ	113
4.7.1	Diskussion der putativen GSH-Bindungsstelle des CeEF-1 γ	113
4.7.2	Analyse der Interaktionen von CeEF-1 γ und CeEF-1 β am Biacore	114
4.7.3	Diskussion des CeEF-1-Komplexes	116
4.8	Diskussion der Kristall-Struktur von PfGST1	119
5.	Zusammenfassung	121
	Literaturverzeichnis	124
	Danksagung	142

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminoacylreste
ACN	Acetonitril
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	„Antioxidative response element“
AS	Antisense-Oligonukleotidprimer
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy DNA
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
Ci	Curie ($3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle pro s)
COOH	Cumene-Hydroperoxid
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat (RNase-Inhibitor)
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DHA(R)	Dehydroascorbat(-Reduktase)
DMFA	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDC	N-Ethyl-N-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
(e)EF	(eukaryotischer) Elongationsfaktor
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FITC	Fluorescein 5(6)-isothiocyanat
FPLC	Fast-Performance-Liquid-Chromatographie
g	Erdbeschleunigung

GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidiertes Glutathion)
GST(O)	Glutathion S-Transferase (der Omega-Klasse)
HEDS	2-Hydroxyethylidisulfid
His	Histidin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IM	Immunhistologische Mikroskopie
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Km	Michaeliskonstante
L1 – 4	Juvenilstadien 1 – 4
LB	Luria-Bertani
M	molar
mRNA	Messenger-RNA
μ	mikro-
MRP	„Multidrug-Resistance Associated Protein“
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NGM	„Nematode Growth Medium“
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
NTA	Nitriltriacetic Säure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	$-\log c(\text{H}_2)$
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
S	Sense-Oligonukleotidprimer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Spleißleitsequenzen
SPR	„Surface Plasmon Resonance“
SSC	Natriumcitrat
t-BOOH	<i>tert</i> -Butyl-Hydroperoxid
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-NaCl
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TET	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monooleat
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität: Die Menge an Enzym, die ein Mikromol Substrat unter Standardbedingungen pro Minute umsetzt)
ÜK	Über-Nacht-Kultur
ValRS	Valyl-tRNA-Synthetase
v/v	Volumen pro Volumen
WHO	„World Health Organisation“
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

1. Einleitung

1.1 Nematoda

Die Nematoda (Fadenwürmer) stellen die individuenreichste Metazoengruppe dar, wobei von schätzungsweise einer Million Arten lediglich 20.000 beschrieben worden sind. Trotz ihrer einfachen Organisation besiedeln sie vielfältige Lebensräumen, wie feuchte Böden, Sediment, Benthos und Phyto in Salz- und Süßwasser. Während ihres Lebenszyklus häuten sich die Nematoden viermal und entwickeln sich so über vier Juvenilstadien zu adulten, geschlechtsreifen Würmern. Sie besitzen einen langgestreckten, drehrunden Körper, der durch ein leistungsstarkes Hydroskelett und einen Hautmuskelschlauch (aus Längsmuskulatur, Hypodermis und aufgelagerte Cuticula) charakterisiert ist. Die typischen Schlängelbewegungen in dorsaler und ventraler Richtung führen die Nematoden mit Hilfe ihrer Längsmuskeln durch.

Im Laufe der Evolution sind einige Arten zu einer parasitischen Lebensweise übergegangen, wobei die angepasste Lebensweise und das dritte Juvenilstadium (L3) – das als Invasionslarve zur Infektion des Endwirts führt – charakteristisch sind. Heutzutage leben rund 10% aller Nematoden als Pflanzenparasiten und 15% als Tier- und Menschenparasiten, wodurch ihnen eine große ökonomische und medizinische Bedeutung zukommt (Lucius & Loos-Frank, 1997).

Rund 90% aller Menschen werden während ihres Lebens mindestens einmal von parasitischen Nematoden befallen. Zu den humanpathogenen Arten zählen dabei vor allem die Haken-, Spul-, und Peitschenwürmer sowie die Filarien. Nach Angaben der WHO (2002) sind weltweit 3 Milliarden Menschen mit humanpathogenen Nematoden infiziert, wobei etwa 120 Millionen Menschen in tropischen und subtropischen Gebieten unter den Infektionen mit Filarien, wie z.B. *Onchocerca volvulus* (Erreger der Flussblindheit) oder *Wuchereria bancrofti* (Erreger der Elephantiasis) leiden. Zudem beläuft sich der weltweite, landwirtschaftliche Schaden durch pflanzenparasitische Nematoden auf jährlich 80 Milliarden US Dollar (<http://europa.eu.int/comm/research/news-centre/de/agr/01-09-agr03d.html>, Barker *et al.*, 1994).

Aufgrund der engen Verwandtschaft zu den parasitischen Würmern wird der Modellnematode *Caenorhabditis elegans* häufig zu Forschungszwecken eingesetzt.

1.1.1 *Caenorhabditis elegans*

C. elegans ist ein freilebender, terrestrischer Nematode, der sich vorwiegend von Bakterien ernährt (Schierenberg & Cassada, 1986). Er wird in die Klasse der Secernentea und die Familie der Rhabditidae eingeordnet (Nicholas, 1984).

Morphologisch und genetisch ist *C. elegans* ein sehr einfach gebauter Organismus mit einer Lebenserwartung von bis zu drei Wochen. Es lassen sich zwei Geschlechtsformen unterscheiden (vgl. Abb. 1.1.1): Am häufigsten handelt es sich um einen selbstbefruchtenden, bis zu 1,3 mm großen Hermaphroditen (Weibchen, das im späten Juvenilstadium Spermien produziert), der innerhalb von drei Tagen geschlechtsreif wird und während des 4-tägigen, reproduktiven Lebensabschnitts etwa 300 Eier legt.

Bei optimalen Lebensbedingungen (25°C, gute Ernährungsbedingungen) schlüpfen innerhalb von 12 h die 0,2 mm großen Jungtiere. Hierbei treten mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:500 die bis zu 0,9 mm große Männchen auf, die durch spontane Verteilungsfehler während der Meiose nur ein Geschlechtschromosom besitzen (Hodgkins *et al.*, 1979). Die geschlüpften Nachkommen entwickeln sich über vier durch Häutung voneinander abgegrenzte Larvalstadien (L1 – L4) zum adulten Wurm.

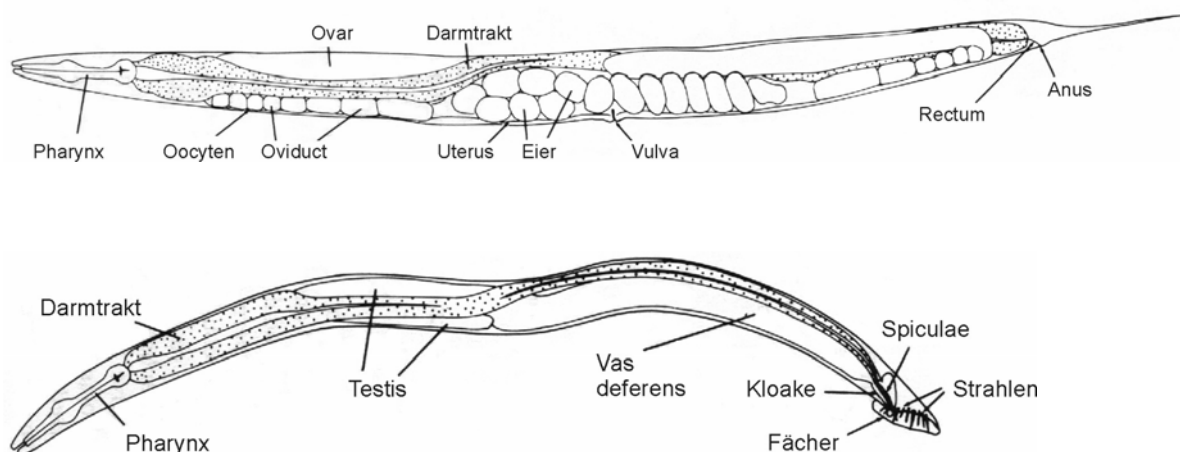


Abb. 1.1.1: Bauplan adulter *C. elegans* (Sulston & Horvitz, 1977)

Die Abbildung zeigt den Aufbau eines adulten Hermaphroditen (oben) und eines Männchen (unten).

Der Lebenszyklus von *C. elegans* kann unter ungünstigen Umweltbedingungen im 2. Juvenilstadium unterbrochen werden und es kann ein alternatives drittes Larvenstadium entstehen: Die Dauerlarve. Sie ist in der Lage, durch ihre verdickte,

widerstandsfähige Cuticula und ihren reduzierten Stoffwechsel bis zu sechs Monate ohne Nahrungsaufnahme zu überleben (Klass & Hirsh, 1976). Ihr Pharynx ist mit einer cuticulären Kapsel verschlossen und zeigt keine Pumpaktivität (Popham & Webster 1979, Albert & Riddle, 1983). Sie entwickelt sich erst unter optimalen Lebensbedingungen weiter und häutet sich dann innerhalb von 12 h zum 4. Juvenilstadium.

Wie alle kleinen Nematoden besitzt *C. elegans* eine konstante Anzahl und Anordnung von Körperzellen (Eutelie). Dabei sind adulte Hermaphroditen aus 959 somatischen Zellen, die Männchen dagegen aus 1.031 Zellen aufgebaut; das Nervensystem besteht aus insgesamt 302 Zellen. Das haploide Genom von *C. elegans* umfasst etwa 100,3 Mio. Basenpaare und liegt auf fünf Autosomen sowie einem Geschlechtschromosom (http://www.ensembl.org/Caenorhabditis_elegans/index.html). Durch das *C. elegans*-Genomprojekt wurde das Gesamtgenom, bestehend aus etwa 20.600 Genen entschlüsselt (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/).

Vor rund 40 Jahren wurde *C. elegans* durch Sydney Brenner als Modellorganismus in die genetische Forschung eingeführt und bietet bis heute eine Vielzahl an Vorteilen: Er besitzt einen einfachen morphologischen Aufbau, eine hohe Transparenz und ein kleines, vollständig sequenziertes Genom. Zudem machen die kurzen Reproduktions- und Lebensphasen sowie die leichte Kultivierbarkeit *C. elegans* zu einem beliebten Forschungsmodell. Durch die selbstbefruchtende Eigenschaft ist es möglich, große Mengen an genetisch identischen Würmern zu züchten. Ergänzt werden diese Vorteile durch eine große Anzahl an experimentellen Möglichkeiten, die *C. elegans* bietet. So lassen sich stabile Transfektanten durch Mikroinjektion erzeugen, genetische „Knock-outs“ herstellen oder „Knock-downs“ von Genen mittels RNA Interferenz herbeiführen.

Aufgrund der nahen Verwandtschaft und hohen Übereinstimmung in Anatomie und Entwicklung, gilt *C. elegans* inzwischen als gutes Modell für die Untersuchung parasitischer Nematoden (Burglin *et al.*, 1998, Nowell *et al.*, 1999, Hashimi *et al.*, 2001).

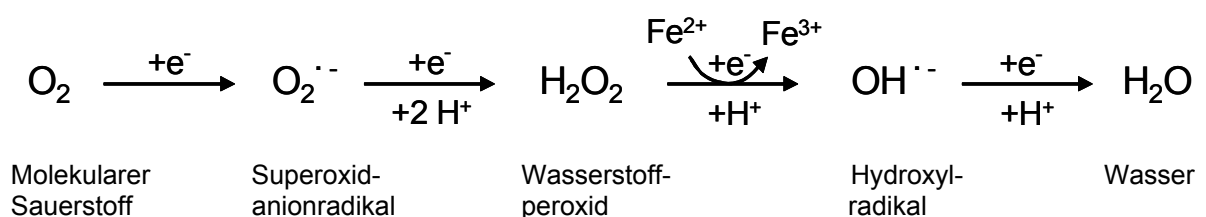
1.2 Oxidativer Stress

Unsere Atemluft besteht zu 21% aus Sauerstoff und ist für die aeroben Organismen unserer Erde überlebenswichtig. Diese nutzen das elektrochemische Potential des Sauerstoffs, um mit Hilfe der mitochondrialen Atmungskette in jeder einzelnen Zelle Energie (in Form von ATP) zu gewinnen. Dabei dient der molekulare Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor und wird in einem mehrschrittigen Prozess zu Wasser reduziert. Hierzu werden vier Elektronen benötigt, die vom Elektronendonator NADH₂ oder Ubichinon (QH₂) nacheinander zur Verfügung gestellt werden. Bei der durch Flavoproteine katalysierten Übertragung dieser Elektronen kommt es häufig zu einer unvollständigen Reduktion des Sauerstoffs („Leck“ in der Atmungskette) und damit zur intrazellulären Entstehung von reaktiven Sauerstoffformen („reactive oxygen spezies“, ROS). Zudem können ROS auf vielen anderen endogenen Wegen z.B. durch phagozytierende Zellen bei der Immunantwort („oxidative burst“) und exogenen Wegen z.B. durch elektromagnetische Strahlung, UV-Licht, Zigarettenrauch, Xenobiotika und kanzerogene Substanzen entstehen. Zu den ROS gehören sowohl radikalische Sauerstoffformen (O₂^{·-}, OH^{·-}, RO[·], RO₂[·]), die mit ihresgleichen oder anderen Molekülen reagieren als auch nicht radikalische Sauerstoffformen (H₂O₂, O₃, HOCl, ¹O₂), die leicht in Radikale überführt werden können.

Diese ROS sind für die irreversible Schädigung von lebensnotwendigen Molekülen (z.B. DNA, Proteine, Lipide) in der Zelle verantwortlich. Zum Schutz vor den ROS besitzt jede Zelle verschiedene Antioxidantien. Ist allerdings das Gleichgewicht zwischen Prooxidantien und Antioxidantien zugunsten der Prooxidantien verschoben, wird von oxidativem Stress gesprochen (Sies 1991).

1.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und ihre Entstehung

Reaktive Sauerstoffspezies entstehen primär durch die partielle Reduktion von molekularem Sauerstoff über reaktive Zwischenprodukte zu Wasser (Fridovich, 1978, Dröge, 2002a):



Das **Superoxidanionradikal ($O_2^{\cdot-}$)** ist ein hochreaktives, jedoch kurzlebiges Radikal, welches aus molekularem Sauerstoff durch die Aufnahme von einem Elektron gebildet wird. Endogen entsteht es hauptsächlich durch das beschriebene „Leck“ in der Atmungskette, aber auch durch Autooxidations-Reaktionen und enzymatische Prozesse wie die flavinabhängige Oxidation und die NADPH-abhängige Sauerstoffreduktion bei der Abwehrreaktion vieler phagozytischer Zellen (Dröge, 2002a). Des Weiteren sind exogene Einflüsse wie Xenobiotika (z.B. Paraquat) oder physikalische Einflüsse (UV-Licht und Ultraschall) für die Bildung von Superoxidanionradikalen verantwortlich. Somit wird rund 2% des vom Menschen eingeatmeten Sauerstoffs in Superoxidradikale umgewandelt (Halliwell, 1994). Da Superoxidanionradikale schwache Oxidantien sind, können sie unter physiologischen Bedingungen zwar keine direkten Schäden an der DNA anrichten, aber sehr schnell weiter zu Wasserstoffperoxid reagieren.

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht durch die spontane Dismutasereaktion von reaktiven Superoxidanionradikalen mit Wasserstoffprotonen und zudem in verschiedenen enzymatischen Reaktionen durch die Übertragung von zwei Elektronen auf molekularen Sauerstoff (Gutteridge, 1994). Wasserstoffperoxid ist relativ stabil und kann so über längere Strecken und sogar durch Zellmembranen diffundieren.

Das **reaktive Hydroxylradikal (OH^{\cdot})** kann durch eine Reduktion von Wasserstoffperoxid mittels reduzierter Übergangsmetalle (Fe^{2+} , Cu^+) entstehen (Cohen, 1994). Die Reduktion mittels Fe^{2+} wurde bereits 1899 als Fenton-Reaktion beschrieben. Hydroxylradikale bilden sich auch endogen durch die Spaltung von Wasser (Radiolyse) durch elektromagnetische Strahlung (Riley, 1994). Diese hochreaktiven und extrem kurzlebigen Hydroxylradikale reagieren mit fast allen organischen Verbindungen und richten immense Schäden in Form von DNA-Strang-Brüchen, Basenmodifikationen und DNA-Protein-Quervernetzungen an.

Singulett-Sauerstoff (1O_2) entsteht durch photochemische Reaktionen. Das stark oxidierende Potential des Singulett-Sauerstoffs resultiert aus seinem veränderten Elektronenspin, wodurch der energetisch höhere Zustand erreicht wurde. Im Vergleich zum Hydroxylradikal ist der Singulett-Sauerstoff zwar weniger aktiv und verursacht daher auch weniger oxidative Schäden, er besitzt aber die Fähigkeit, die aufgenommene Energie an andere Moleküle abzugeben und dadurch als Radikalbildner zu fungieren.

1.2.2 Oxidative Schäden durch ROS

Reaktive Sauerstoffspezies können in der Zelle Proteine, Lipide und DNA oxidieren und sie dabei strukturell und funktionell schädigen (Marnett *et al.*, 2003):

Proteine werden durch die Radikale oxidiert, wobei ihre Aminosäuren auf verschiedene Weise modifiziert oder degradiert werden. Dabei erhalten die Proteine neue funktionelle Gruppen wie Carbonyl- oder Hydroxylgruppen, was in Proteinfragmentierung, Crosslinks, Zerstörung der Tertiärstruktur und Funktionalitätsverlust resultieren kann (Cotgreave & Gerdes, 1998). Die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren in der Membran führt zu einer radikalischen Kettenreaktion, der Lipidperoxidation, wobei verschiedene oxidative Komponenten und Radikale entstehen. Lipidperoxidation hat strukturelle und funktionelle Schädigungen der Membranen zur Folge, was einen Verlust der Membranintegrität, einen gestörten Stoffaustausch mit der Zellumgebung und den Tod der Zelle herbeiführen kann (Sies 1986, Cadet *et al.*, 1997, Girotti, 1998). Eine Schädigung der DNA wird durch ROS direkt (insbesondere durch das Hydroxylradikal) verursacht, indem neben ganzen Strangbrüchen auch die Ringöffnung des Purins vorkommt, die im Templatestrang dann zu einer Blockade der Polymerase führt (Laval, 1996). Zum anderen verursachen ROS häufig eine Modifikation von Basen, was in einem Basenaustausch resultieren kann. So können Angriffe von ROS auf Nukleinsäuren zu Mutationen im Genom, Chromosomenaberrationen und zu Apoptose führen (Burkhardt *et al.*, 2001).

Zudem stehen ROS in direktem Zusammenhang mit Krankheiten wie z.B. Arteriosklerose, Alzheimer, Parkinson und rheumatische Arthritis sowie mit Alterungsprozessen (Galli *et al.*, 2005, Dröge, 2002b) und Kanzerogenese (Wiseman & Halliwell, 1996).

1.2.3 Entgiftung durch Antioxidantien und Biotransformation

Da ein Entstehen von ROS nicht verhindert werden kann, besitzt die Zelle verschiedene Mechanismen, den Schaden durch oxidativen Stress zu minimieren. Einerseits werden ROS durch nicht-enzymatische und enzymatische Antioxidantien abgefangen, andererseits wird der Schaden durch verschiedene Reparaturmechanismen (Lipolyse, Proteolyse und DNA-Reparatur) verringert.

Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören unter anderem das fettlösliche Vitamin E (α -Tocopherol), das die Lipidperoxidation in der Membran unterbricht, indem es mit Peroxylradikalen zu den weniger reaktiven α -Tocopherol Radikalen reagiert, die dann mit Vitamin C zu α -Tocopherol zurückreagieren können (Singh *et al.*, 2005). Das wasserlösliche Vitamin C (Ascorbinsäure) agiert zudem als Radikalfänger für Hydroxylradikale, Superoxidradikale und Singulett-Sauerstoff. Des Weiteren gehört zu dieser Gruppe der Antioxidantien das Bilirubin sowie das Glutathion (GSH), auf das im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

Zu den wichtigsten enzymatischen Antioxidantien zählen u.a. die Superoxid-Dismutasen, die Katalasen, Peroxiredoxine, GSH-Peroxidasen und Thioredoxin-Peroxidasen. Während die Superoxid-Dismutasen Superoxidradikale entfernen, indem sie die Dismutasereaktion beschleunigen, wobei das weniger reaktive Wasserstoffperoxid entsteht, überführen die Katalasen und die Peroxidasen Wasserstoffperoxid in Wasser und O_2 (Andersen, 1996).

Wenn die Sauerstoffspezies dieser Abwehr entgehen, kommt es aufgrund von Radikalmechanismen zu chemischen Veränderungen von Biopolymeren und damit zur Bildung toxischer Sekundärprodukte. Solche toxischen oder radikalischen Produkte können zudem auch durch lipophile, xenobiotische Fremdstoffe entstehen, die ungehindert die Zellmembran passieren und mit ihren elektrophilen Gruppen spontane chemische Reaktionen mit den nukleophilen Gruppen eines Biopolymers eingehen. Für diesen Fall stehen weitere Entgiftungsenzyme wie z.B. die Glutathion S-Transferasen (GST), Aldehyd-Reduktasen, Epoxidhydrolasen, Cytochrom P-450 und verschiedene Dehydrogenasen zur Verfügung.

Die meisten Xenobiotika werden unverändert wieder ausgeschieden oder durch eine enzymkatalysierte Biotransformation umgewandelt. Bei der Biotransformation werden lipophile, schwer ausscheidbare Substanzen in leichter ausscheidbare Stoffe umgebaut (Nuhn, 1993; Jakoby *et al.*, 1983). Dabei lassen sich zwei funktionell aufeinander folgende Phasen unterscheiden: In der Phase 1 werden reaktive, funktionelle Gruppen an die xenobiotischen Verbindungen angebracht (zumeist mittels Cytochrom P450-abhängiger Oxidationsenzyme), so dass die entstehenden Zwischenprodukte in der 2. Phase an endogene Co-Substrate mit breiter Substratspezifität konjugiert werden können. Auf diese Weise entstehen polare, hydrophilere und weniger toxische Verbindungen, deren Transport aus der Zelle mittels ATP-abhängiger Pumpen möglich ist.

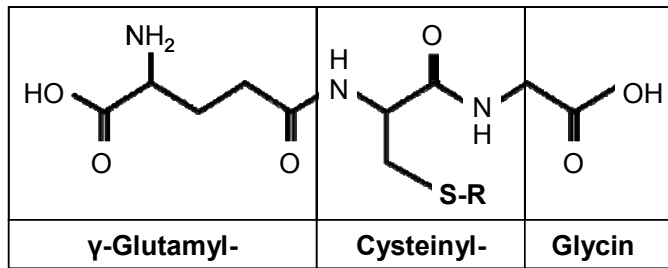
1.2.4 Entgiftung bei Nematoden

Insbesondere die parasitischen Helminthen mussten sich auf die veränderten Lebensbedingungen im Wirt einstellen und Abwehrstrategien gegen das Immunsystem des Wirtes – und die dabei entstehenden ROS – sowie gegen Sekundärmetabolite der Nahrung und Medikamente entwickeln (Callahan *et al.*, 1988). Neben morphologischen Veränderungen wie z.B. der Ausbildung einer schützenden Cuticula adaptierten sie auch ihr enzymatisches Verteidigungssystem auf die parasitische Lebensweise.

Parasitische Nematoden unterscheiden sich von dem Wirtsorganismus insofern, als dass die Entgiftung beim Wirt in der Phase 1 hauptsächlich über oxidative Systeme erfolgt, während bei den untersuchten Helminthen solche Cytochrom P450-abhängigen Entgiftungsenzyme fehlen (Precious & Barrett, 1989). Die Detoxifikation bei parasitischen Nematoden erfolgt daher über reduktive und hydrolytische Mechanismen, wobei die Aktivität von Superoxid-Dismutase, GSH-Peroxidasen und Katalasen nachgewiesen werden konnte (Callahan *et al.*, 1991; Tripp *et al.*, 1998, Eckelt *et al.*, 1998). Da scheinbar auch wichtige Entgiftungsenzyme der Phase 2 bei parasitischen Nematoden fehlen, gewinnen die vorhandenen GSTs an Bedeutung. Diese Enzyme katalysieren die Konjugation von endogenen oder xenobiotischen Substraten mit reduziertem GSH und stellen so einen essentiellen Stoffwechselweg zur Entgiftung dieser Verbindungen (wie beispielsweise Medikamente) in Helminthen dar (Tracy *et al.*, 1995, Brophy *et al.*, 1994). Ein Großteil des Wissens über die Entgiftungssysteme bei parasitischen Nematoden wurde dabei mit Hilfe des Modellnematoden *C. elegans* geschaffen.

1.3 Glutathion (GSH) und Glutathion-Stoffwechsel

Glutathion ist ein ubiquitär vertretenes, wasserlösliches Tripeptid (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin) und neben Cystein das häufigste niedermolekulare Thiol in der Zelle. Es liegt hauptsächlich intrazellulär in relativ hohen Konzentrationen von 0,1 mM bis 10 mM vor (Tate & Meister, 1976). Die Synthese von GSH erfolgt in zwei Schritten und erfordert ein Molekül ATP pro Reaktion. Dabei werden zuerst Glutamat und Cystein durch die γ -Glutamylcystein-Synthetase verknüpft (geschwindigkeitsbestimmend) und anschließend Glycin von der G-Synthetase angefügt.

**Abb. 1.3.: Strukturformel von GSH**

R = Epoxide, Carboxylate, Thiocyanate, organische Nitrate, Peroxide, α,β -ungesättigte Aldehyde und Ketone sowie weitere Verbindungen.

Der Hauptfunktionsträger des Glutathions ist die Sulfhydrylgruppe des Cysteinrestes (vgl. Abb. 1.3). Diese Thiolgruppe kann als Elektronendonator dienen und ist damit sowohl als Nukleophil, Reduktant und auch als Radikalfänger wirksam. Somit wechselt Glutathion zwischen einer reduzierten Thiolform (GSH), bei der die aktive, nukleophile Sulfhydrylgruppe frei vorliegt und einer oxidierten Form (GSSG), bei der zwei Glutathionmoleküle über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Die oxidierte Form kann von der GSH-Reduktase unter Verwendung von NADPH wieder zu GSH reduziert werden (Carmel-Harel & Storz, 2000). Das Verhältnis von GSH zu GSSG liegt dabei im Cytosol der Zelle bei 10:1 – 100:1, abhängig vom Organismus und Gewebe (Sies, 1989). Da ein Ungleichgewicht zugunsten von GSSG toxisch für die Zelle ist, schleusen einige Zellen GSSG auch aus, wenn die GR-Aktivität nicht ausreicht (Atamna & Ginsburg, 1997; Lüersen, 2000).

Dem GSH kommen in der Zelle wichtige Aufgaben zu: Neben seiner Transport- und Speicherfunktion von Cystein, spielt es eine wichtige Rolle als Sulfhydrylpuffer und bei der Aufrechterhaltung des Thiol-Redox-Gleichgewichtes in der Zelle. Dabei hält GSH auch Antioxidantien wie α -Tocopherol oder Ascorbat im reduzierten Zustand (Leedle & Aust, 1990, Ishikawa *et al.*, 1998). Zusätzlich übernimmt GSH wesentliche Aufgaben bei der direkten Detoxifikation der Zelle: Zum einen kann es als Reduktant H_2O_2 und organische Peroxide entgiften, eine Reaktion, die von GSH-Peroxidasen katalysiert wird (Arthur, 2000; Holmgren *et al.*, 2000). Zum anderen kann es als nukleophiles Cosubstrat fungieren und Konjugate mit reaktiven und elektrophilen Substanzen bilden, eine Reaktion, die z.B. durch die Glutathion S-Transferasen katalysiert wird. GSH übernimmt zudem eine wichtige Funktion als Coenzym bei Enzymen wie z.B. der Glyoxalase I (Thornalley, 1998), der Maleylacetoacetat-Isomerase im Tyrosin-Stoffwechsel (Cornett *et al.*, 1999), der Formaldehyd-Dehydrogenase (Duine, 1999) oder der Prostaglandin-Endoperoxid-

Isomerase (Urade & Hayaishi, 2000). Außerdem entgiftet GSH Schwermetallionen (Arthur, 2000) und fungiert als Radikalfänger.

Somit ist GSH eins der stärksten und wichtigsten Abwehrmoleküle der Zelle. Ein Defizit an GSH steht mit vielen Krankheiten wie HIV, Leberzirrhose, Lungenkrankheiten, Diabetes, neurodegenerativen Krankheiten, sowie Alterungsprozessen im Zusammenhang (Wu *et al.*, 2004). GSH wird bereits industriell hergestellt sowie als Nahrungszusatz und in der Kosmetik verwendet (Sies, 1999).

1.3.1 Glutathion S-Transferasen (GSTs)

Die GSTs sind wichtige Phase 2 Entgiftungsenzyme, die die Reaktion von reduziertem GSH mit reaktiven Substanzen katalysieren. Diese Substrate können sowohl endogene als auch xenobiotische Verbindungen sein, die meistens lipophilen Charakter aufweisen und ein elektrophiles Zentrum besitzen (Hayes & Pulford, 1995, Salinas & Wong, 1999). Bei dieser, durch eine GST katalysierten Reaktion, greift GSH als Nukleophil das elektrophile Zentrum des meist toxischen Substrats an. So werden diese zellschädigenden Substanzen zu weniger reaktiven, weniger toxischen, aber weitaus hydrophileren GS-Konjugaten transformiert. Diese Konjugate können entweder über spezielle Transportproteine wie z.B. der ATP-abhängigen GS-X-Pumpe oder Multidrug-Resistance Associated Protein (MRP) – die zur Gruppe der ABC-Transporter gehören – aus der Zelle geschleust (Hayes & McLellan, 1999; van Bladeren 2000, Haimeur *et al.*, 2004) oder weiter abgebaut werden. So konnten GSTs allerdings auch mit der Entstehung von zahlreichen Resistenzen gegen Krebstherapeutika, Herbizide, Insektizide und Antibiotika in Verbindung gebracht werden (Sheehan *et al.*, 2001, Ranson *et al.*, 2001; Enayati *et al.*, 2005). Des Weiteren sind sie an Kanzerogenese beteiligt und werden als zuverlässige prä- und neoplastische Markerenzyme karzinogener Prozesse eingesetzt (Tsuchida & Sato, 1992, Norppa, 2004).

Zusätzlich zu ihrer Entgiftungsfunktion spielen GSTs eine wichtige Rolle als passive Bindungsproteine für den intrazellulären Transport und die Speicherung von einigen Steroid- und Thyroidhormonen, von endogenen Metaboliten und exogenen Verbindungen (Listowski, 1993). Außerdem sind sie an der Synthese von Steroidhormonen (wie Testosteron und Progesteron) sowie Prostaglandinen und an der Signaltransduktion beteiligt (Johansson *et al.*, 2001, Jowsey *et al.*, 2001).

1.3.2 Klassifikation der GSTs

Bei der multigenen Enzymfamilie der GSTs handelt es sich um Isoenzyme, die eine breite, überlappende Substratspezifität aufweisen (Armstrong, 1997; Eaton & Bammler, 1999, Hayes *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Substratspezifität und ihrer Primärstruktur lassen sich cytosolische GSTs in sieben Klassen unterteilen. Hierzu gehören die Alpha-, Mu-, Pi-, Sigma- und Theta-Klassen und die erst kürzlich beschriebenen Zeta- und Omega-Klassen (Eaton & Bammler, 1999; Townsend & Tew, 2003). Zudem wurden bei Insekten noch die Delta- und Epsilon-Klassen beschrieben (Ranson *et al.*, 2001, Ranson *et al.*, 2002), während bei Pflanzen die Phi-, die Tau- und die Lambda-Klassen vorkommen (Dixon *et al.*, 2002, Dulhunty *et al.*, 2001, Edwards *et al.*, 2000) und einige Bakterien die Beta-Klasse aufweisen (Vuilleumier *et al.*, 1997). Des Weiteren ist eine mitochondrielle Kappa-Klasse bekannt (Morel *et al.*, 2004, Lander *et al.*, 2004) sowie drei verschiedene mikrosomale GST-Formen ("membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism, MAPEG"), die die LTC₄-Synthase, die Glutathion S-Transferase 1 und eine Prostaglandin E-Synthase beinhalten (Jakobsson *et al.*, 1999). Obwohl sich cytosolische und mitochondrielle GSTs (Dimere) strukturell stark von den trimeren MAPEG-Enzymen unterscheiden (Holm *et al.*, 2002), weisen alle drei GST-Familien CDNB-Aktivität auf. Zusätzliche Charakteristika sind die Bindungsfähigkeit der GSTs an eine GSH-Matrix und die konservierte Struktur der GSH-Bindungsstelle.

Die größte Familie ist die der cytosolischen GSTs. Dabei handelt es sich um ca. 25 kDa große, hetero- oder homodimere Proteine, die die charakteristische GST-Struktur aufweisen. Diese Struktur besteht aus einer N-terminalen, GSH-bindenden Domäne aus vier Beta-Faltblättern und drei flankierenden Alpha-Helices sowie einer helicalen, C-terminalen Domäne, die einen Großteil der variablen, hydrophoben Bindungstasche beinhaltet (Sheehan *et al.*, 2001). Aufgrund der Homologie der Tertiärstruktur des N-Terminus cytosolischer GSTs wird vermutet, dass die Struktur von einem gemeinsamen Thioredoxin/Glutaredoxin Vorfahren abstammt (Martin, 1995, Armstrong, 1997). Dabei scheinen alle cytosolischen Enzyme durch die Addition einer durchweg helikalen Domäne an die Thioredoxinstruktur $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ entstanden zu sein. Diese Domäne ist für die Bindung elektrophiler Substrate notwendig.

1.3.3 Die Omega-Klasse der cytosolischen GSTs (GSTO)

Zu den cytosolischen GST-Klassen gehört auch die Omega-Klasse, die erstmals beim Menschen näher charakterisiert wurde. (Board *et al.*, 2000). Des Weiteren wurden Omega-GSTs beim Schwein (Rouimi *et al.*, 2001) der Ratte (Ishikawa *et al.*, 1998), der Maus (Kodym *et al.*, 1999), *Schistosoma mansoni* (Girardini *et al.*, 2002) und *Onchocerca volvulus* (Kampkötter *et al.*, 2003) näher untersucht.

Die Omega-GSTs treten dabei – wie alle cytosolischen GSTs – als Dimere auf und zeigen die charakteristische GST-Struktur aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne. Dabei weist die C-terminale Domäne die fünf GST-typischen Alpha-Helices sowie noch zwei zusätzliche Helices auf, die das N-terminale Ende überlappen. Dadurch bildet sich eine strukturelle Einheit, deren Funktion derzeit noch nicht bekannt ist (Board *et al.*, 2000). Es fallen noch weitere strukturelle und funktionelle Besonderheiten bei den Omega-GSTs auf: Das Dimer zeigt eine viel offenere V-Form und das N-terminale Ende unterscheidet sich von anderen GSTs durch eine N-terminale Verlängerung von 19 – 20 Aminosäureresten sowie einen charakteristischen aktiven Cysteinrest. Funktionell lassen sich die Omega-GSTs von den übrigen GST-Klassen dadurch abgrenzen, dass sie lediglich eine geringe Aktivität mit dem GST-Substrat CDNB und eine geringe Bindungseigenschaft an GSH-Agarose aufweisen (Girardini *et al.*, 2002). Stattdessen lässt sich eine charakteristische Thioltransferase-Aktivität und die Fähigkeit Dehydroascorbat zu reduzieren feststellen (Board *et al.*, 2000, Girardini *et al.*, 2002). Aufgrund dieser strukturellen und funktionellen Besonderheiten wird eine nahe Verwandtschaft zu den Thioredoxinen und Glutaredoxinen postuliert.

Die physiologische Funktion der Omega-GSTs ist bei weitem noch nicht erforscht. Bemerkenswert ist die Ähnlichkeit der humanen Omega-GST zu einem Chlorid-Kanal-Protein (NCC27, CLIC1), wobei vor allem der N-Terminus und das aktive Cystein konserviert vorliegen (Dulhunty *et al.*, 2001). Die humane GSTO1-1 zeigte zwar alleine keine Fähigkeit Ionenkanäle zu bilden, besitzt allerdings modulatorische Fähigkeiten bzgl. Ryanodin-Rezeptoren (RyRs). Daher wird vermutet, dass die GSTO1-1 eine wichtige Rolle bei der Regulation von intrazellulärem Calcium und damit beim Schutz der Zelle gegen Strahlung und Apoptose spielen könnte. Zudem werden Omega-GSTs in Krebszellen überexprimiert (Dulhunty *et al.*, 2001) und im Zusammenhang mit den Krankheiten Parkinson und Alzheimer diskutiert (Li *et al.*, 2003/ 2005).

1.3.4 Beschreibung der verwendeten Xenobiotika

Zur Untersuchung der Funktion der CeGSTO-1 *in vivo* in *C. elegans* bzw. in *E. coli*, wurden verschiedene Giftstoffe eingesetzt (vgl. Abb. 1.3.4.A), die die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies fördern und dadurch oxidativen Stress in den Organismen induzieren. So ist es mit diesen Xenobiotika möglich, die Entgiftungsfunktion bzw. die Schutzfunktion der CeGSTO-1 in Bezug auf oxidativen Stress zu untersuchen. Zusätzlich kann überprüft werden, ob sich der Promotor durch oxidativen Stress induzieren lässt und eine gesteigerte Expression von *cegsto-1* herbeigeführt wird. Die Xenobiotika unterscheiden sich dabei in der Art und Weise, wie sie oxidativen Stress produzieren, wie gut sie sich innerhalb der Zelle bewegen können und wie toxisch und stabil sie sind.

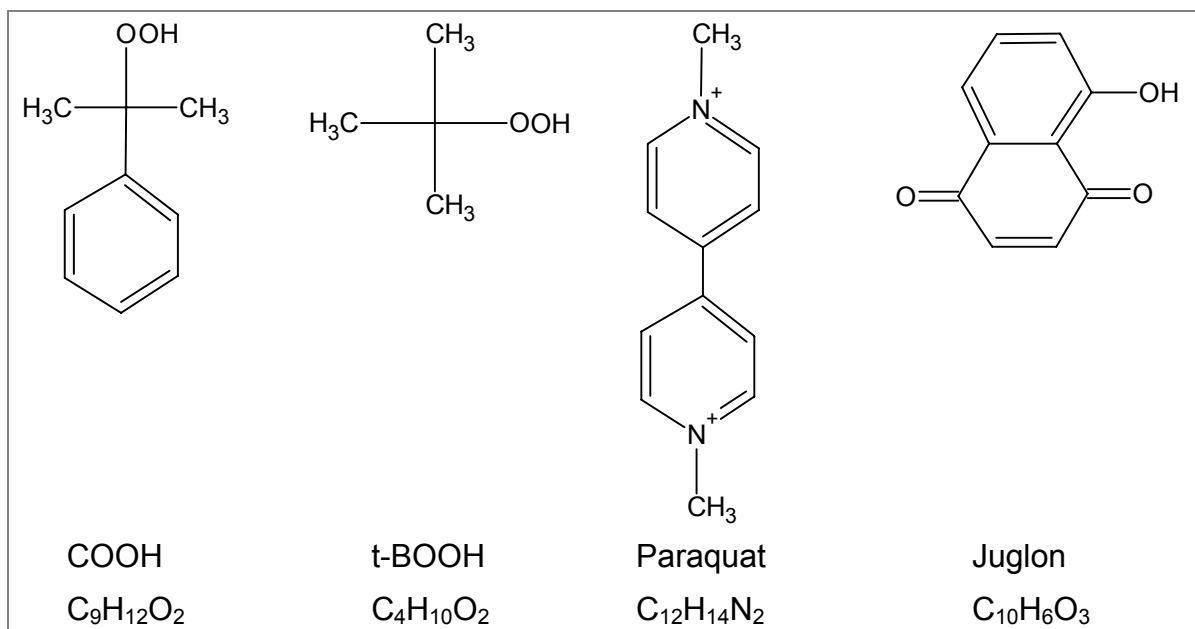


Abb. 1.3.4.A: Strukturformel einiger Xenobiotika zur Induktion von oxidativem Stress

Cumene-Hydroperoxid (COOH; α,α -Dimethylbenzylhydroperoxid) ist ein Katalyst für schnelle Polymerisation und wird in der Produktion von Styrenen, Acrylmonomeren, Acetonen und Phenolen benutzt. Wie unter Einfluss des organischen Peroxids *tert*-Butyl-Hydroperoxid (*t*-BOOH; 1,1-Dimethylethyl-hydroxiperoxid) findet ein Anstieg an ROS und an Lipidperoxidation statt, was zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials führt (Kmonickova, *et al.*, 2001). Zudem wird das Calciumgleichgewicht der Zelle gestört (Nicotera *et al.*, 1988) und die NADPH Oxidation reduziert. Somit ist zusätzlich eine Reduktion des GSH-Gehalts und daraus folgend ein Anstieg in der Oxidation funktioneller SH-Gruppen zu verzeichnen (Alia *et al.*, 2005, Shvedova *et al.*, 2004).

Das Nitrogen Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid, Methylviologen) ist eins der giftigsten Breitspektrum-Herbizide, das Pflanzengewebe dadurch zerstört, dass es die Reduktion von NADP zu NADPH während der Photosynthese stört. Auch für Mensch und Tier ist Paraquat hochtoxisch und verursacht u.a. schwere Lungenkrankheiten bis hin zum Atemstillstand durch die Zerstörung der Lungenbläschen (Pasi, 1978). Diese Toxizität beruht hauptsächlich auf einem Anstieg an Oxidantien (Paraquatradikale und ROS) und einem Mangel an NADPH.

Das pflanzliche Chinon Juglon (5-hydroxy-1,4-naphthoquinon) aus der Schale der Walnuss (*Juglans nigra*) kann z.B. mittels NAD(P)H von Flavoenzymen zu Semi-chinonradikalen reduziert werden, welche dann ihrerseits wieder molekularen Sauerstoff in Superoxidanionradikale umsetzen. *C. elegans* ist dabei permeabler für Juglon als z.B. für Paraquat, daher ist die Wirkung von Juglon noch toxischer als von Paraquat (Blum & Fridovich, 1983).

Anorganisches Arsen ist als pentavalentes Arsenat und als trivalentes Arsenit in Boden und Trinkwasser weit verbreitet und stellt ein weltweites Gesundheitsproblem für 200 Mio. Menschen dar (NRC, 2001, Abernathy *et al.*, 2003). Die cytotoxischen, genotoxischen und karzinogenen Eigenschaften des Arsens beruhen hauptsächlich auf der Induktion von oxidativem Stress durch die vermehrte Produktion von Oxidantien und gleichzeitiger Abnahme an Antioxidantien wie GSH (Jimi *et al.*, 2004; Kitchin & Ahmad, 2003; Valko *et al.*, 2005). Das Auftreten von verschiedenen ROS steht dabei in direktem Zusammenhang mit einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials und einem erhöhten Calciumspiegel (Miller *et al.*, 2002). *In vivo* wird das fünfwertige Arsen schnell zu dreiwertigem reduziert und anschließend zu der weniger toxischen Monomethylarsonsäure (MMA(V)) und Dimethylarsonsäure (DMA(V)) methyliert (Valenzuela *et al.*, 2005; vgl. Abb.

1.3.4.B). Dabei ist die humane Omega-GST in Struktur und Funktion der MMA^(V)-Reduktase fast identisch und scheint eine entscheidende Rolle bei der Detoxifikation von Arsen zu spielen (Zakharyan *et al.*, 2001, Tanaka-Kagawa *et al.*, 2003).

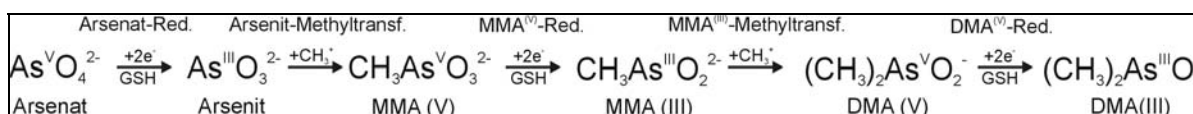


Abb. 1.3.4.B: Reduktion und enzymatische Methylierung von anorganischem Arsen zu Monomethylarsonsäure (MMA) und Dimethylarsonsäure (DMA) bei der Detoxifikation *in vivo*.

1.4 Elongation der eukaryotischen Translation

Ein essentieller Prozess in allen Zellen ist die Umsetzung der genetischen Information von der mRNA in die Aminosäuresequenz der Proteine. Die Proteinbiosynthese (Translation) findet an den Ribosomen im Cytoplasma statt. Dabei wird die Verlängerung der neu entstehenden Polypeptidkette um jeweils eine Aminosäure pro Elongationszyklus durch die Elongationsfaktoren der Translation katalysiert. Eine Untereinheit des Elongationsfaktors 1 – der eEF-1 γ – steht hierbei im engen Zusammenhang mit GSTs, da er im N-terminalen Bereich eine starke Homologie zu der GSH-Bindungsstelle dieser Entgiftungsenzyme aufweist. Daher wird vermutet, dass er neben seinen Aufgaben in der Elongation noch an anderen Prozessen in der Zelle, wie beispielsweise der Detoxifikation von Xenobiotika, beteiligt ist (Billaut-Mulot *et al.*, 1997).

1.4.1 Der Elongationszyklus der Translation

Die Elongation erfolgt mit einer Geschwindigkeit von 10 – 20 Zyklen pro Sekunde, dabei wird während eines jeden Elongationszyklus die Polypeptidkette vom N-terminalen zum C-terminalen Ende hin um eine Aminosäure verlängert.

Diese Proteinbiosynthese findet an den Ribosomen statt, die aus zwei zusammengelagerten Untereinheiten bestehen. Bei Eukaryoten bindet die kleine 40S-Untereinheit (18S rRNA und 30 Proteine) die mRNA und das Anticodon der tRNA, während die große 60S-Untereinheit (28S, 5,8S, 5S rRNA und 40 Proteine) die Bildung der Polypeptidkette katalysiert (Lake, 1985). Dabei befindet sich zwischen den beiden Untereinheiten ein Kanal, durch den die tRNAs während der Elongation ein- und austreten und eine Öffnung, durch die die mRNA hindurchläuft (Spirin, 2002). Nach dem „allosterischen Drei-Seiten-Modell“ (Nierhaus, 1990; Rheinberger *et al.*, 1990) besitzt jede Untereinheit drei tRNA-Bindungsstellen: Den Erkennungsort für neue Aminoacyl-tRNAs (A-Ort), den Bindungsstelle, an dem die Polypeptidkette gebildet wird (P-Ort) und den Ausgangsort, an dem die deacylierte tRNA entlassen wird (E-Ort). Beim „Hybrid-Seiten-Modell“ wird noch eine vierte Transfer-Bindungsstelle (T-Ort) vor dem A-Ort vermutet (Moazed & Noller, 1989).

Bei dem Heranführen und Binden der Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) an den A-Ort (bzw. an den T-Ort) spielt der eukaryotische Elongationsfaktor eEF-1 – bestehend aus den vier Untereinheiten α , β , δ und γ – eine wesentliche Rolle:

Der eEF-1 α (Prokaryoten: EF-Tu) bindet GTP und die Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) als „ternären Komplex“ und leitet die aa-tRNA zum A-Ort des Ribosoms (vgl. Abb. 1.4.1). Durch eine feste, komplementäre Bindung des tRNA-Anticodons an das mRNA-Codon im A-Ort wird eine Konformationsänderung im Ribosom herbeigeführt. Dadurch wird die tRNA stabilisiert und das GTP mit Hilfe der GTPase-Aktivität vom eEF-1 α hydrolysiert, wodurch das Aminoacyl-Ende von der tRNA abgelöst wird und im P-Ort der 60S-Ribosom-Untereinheit an die Carboxylgruppe der Peptidkette bindet (Nolan *et al.*, 1975).

Der eEF-1 α /GDP verlässt das Ribosom und muss durch einen Guanin-Nukleotid-Austausch regeneriert werden, damit er für den nächsten Elongationszyklus wieder als eEF-1 α /GTP zur Verfügung steht (vgl. Abb. 1.4.1). Da der eEF-1 α dabei eine höhere Affinität zu GDP als zu GTP besitzt (Legocki *et al.*, 1974) sind die eEF-1 $\beta\gamma\delta$ für den Nukleotid-Austausch von eEF-1 α /GDP zu eEF-1 α /GTP nötig (Carvalho *et al.*, 1984, Merrick, 1992).

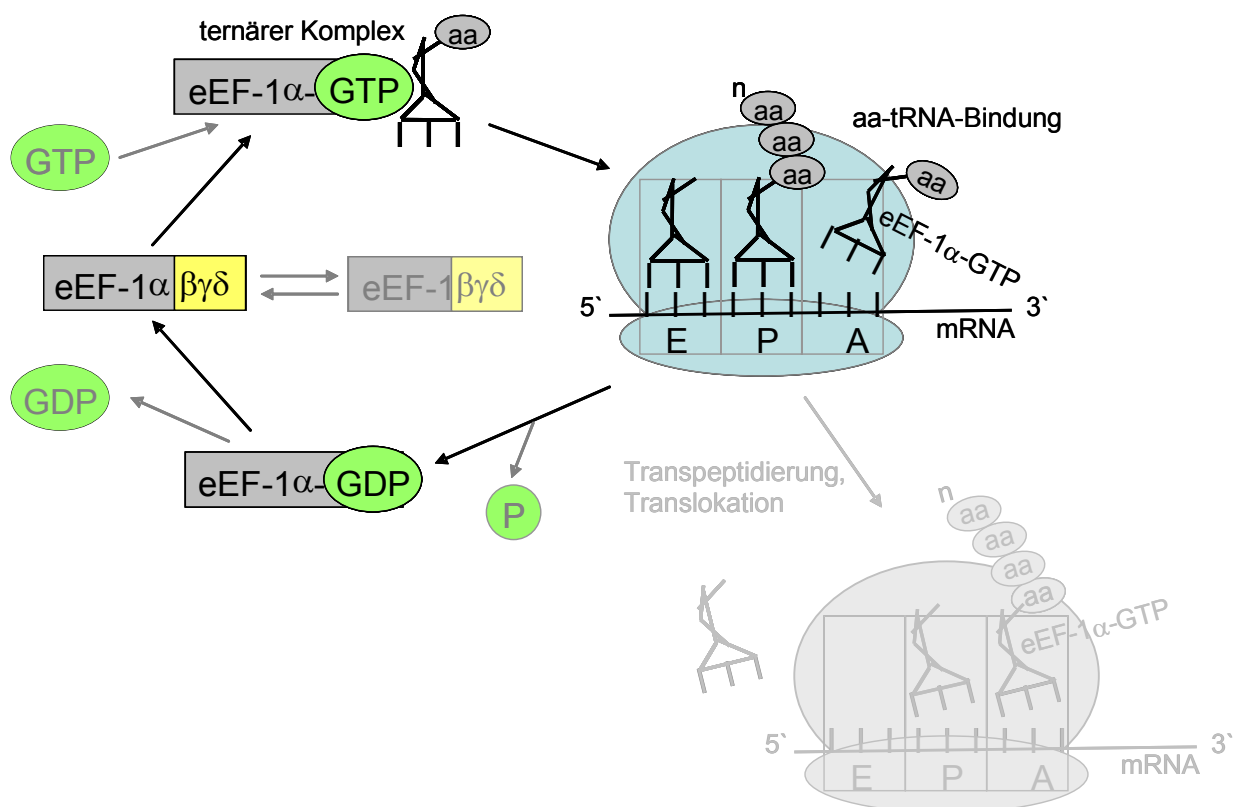


Abb. 1.4.1: Der eEF- α -GDP/GTP-Austausch durch eEF-1 $\beta\gamma\delta$ während der Elongation

Der ternäre Komplex aus eEF-1 α /GTP/aa-tRNA bindet komplementär an das mRNA-Codon im A-Ort des Ribosoms. Die Transpeptidase-Aktivität der 60S-Ribosomen-Untereinheit katalysiert danach die Peptidbindung zwischen der Polypeptidkette und der neuen Aminosäure. Die Regeneration von eEF- α /GDP zu eEF- α /GTP erfolgt mittels eEF- $\beta\gamma\delta$.

Der Mechanismus des Guanin-Nukleotid-Austauschs wurde anhand der Kristallstruktur vom prokaryotischen EF-Ts (dem Analoga zu eEF-1 $\beta\gamma\delta$) hergeleitet. EF-Ts inseriert mit einem Phenylalanin-Rest (Phe-81) in die hydrophobe Bindungstasche von EF-Tu (dem Analoga zu eEF-1 α), löst dadurch die GDP-Bindung und „verdrängt“ das GDP (Kawashima *et al.*, 1996). Bei Eukaryoten scheint ein konservierter Tyrosin-Rest (Tyr-181) von eEF-1 β diese Insertion am eEF-1 α durchzuführen (Pérez *et al.*, 1999). In Gegenwart von GTP dissoziiert eEF-1 $\beta\gamma\delta$ dann von eEF-1 α und es entsteht wieder aktives eEF-1 α /GTP.

1.4.2 Die Untereinheiten des Elongationsfaktors 1 (eEF-1)

Seit der Entdeckung von löslichen Elongationsfaktoren vor über 40 Jahren (Fessenden & Moldave, 1961/1963) ist heute bekannt, dass den Faktoren eine wichtige katalytische und regulatorische Funktion zukommt (Kielbassa *et al.*, 1995, Anvi, *et al.* 1997, Mamoun & Goldberg, 2001), wobei eine nicht-enzymatische Elongation in langsamer Form auch ohne ihre Anwesenheit ablaufen kann (Gavrilova *et al.*, 1976, Spirin, 2002). Es ist mittlerweile bekannt, dass der eEF-1 aus den Untereinheiten eEF-1 $\alpha\beta\gamma$ bei Pflanzen (Ejiri, 1986), eEF-1 $\alpha\beta\delta\gamma$ bei Tieren (Janssen *et al.*, 1994) sowie eEF-1 $\alpha\beta\gamma$ bei Hefen (Miyazaki *et al.*, 1988) besteht.

Der eEF-1 α ist mit 1 – 5% des Gesamtproteins in einer normal wachsenden Zelle vertreten (Condeelis, 1995, Browning *et al.*, 1990) und besitzt scheinbar den stärksten je beschriebenen Promotor (Uetsuki *et al.*, 1989). Der eEF-1 α gehört zu den regulatorischen GTPasen (G-Proteinen): Durch die Bindung von GTP an der N-terminalen Guanin-Bindungs-Domäne nimmt eEF-1 α eine aktive, kompakte Konformation ein, die seine Affinität zum Ribosom und zu Liganden wie aa-tRNA erhöht (Sprinzl, 1994). Neben seiner Hauptaufgabe, die Bindung von aa-tRNA an das Ribosom zu katalysieren (Merrick, 1992) ist der eEF-1 α auch an der Actinbündelung (Yang *et al.*, 1990), der Signaltransduktion (Rhoads, 1999, Kim *et al.*, 1999, Wang & Poovaiah, 1999), der Apoptosis (Kato *et al.*, 1997) sowie der Oncogenese und der Tumorgenese (Grant *et al.*, 1992, Edmonds *et al.*, 1996, Kato, 1999) beteiligt.

In dem Komplex eEF-1 $\beta\gamma\delta$ besitzen die beiden Untereinheiten eEF-1 β und eEF-1 δ *in vitro* Guanin-Austauschaktivität (Janssen & Möller, 1988b, van Damme *et al.*, 1990), wobei aufgrund fehlender homologer Faktoren zu eEF-1 δ in Prokaryoten und

in Hefe angenommen wird, dass *in vivo* alleine eEF-1 β den Nukleotid-Austausch am eEF-1 α vornimmt (Carr-Schmid *et al.*, 1999). Der eEF-1 γ besitzt selber keine Nukleotid-Austauschaktivität (Kambouris *et al.*, 1993, Kinzy *et al.*, 1993), scheint aber die Nukleotid-Austauschaktivität von eEF-1 β zu stimulieren (Janssen & Möller, 1988b, Bec *et al.*, 1994). Dabei liegen die beiden Untereinheiten eng assoziiert vor (Janssen *et al.*, 1994). Weiter Aufgaben von eEF-1 γ könnten darin bestehen, den Proteinbiosynthesekomplex an Membranen zu verankern (Monnier *et al.*, 2001), für die Organisation der Untereinheiten im eEF-1-Komplex zu sorgen (Janssen *et al.*, 1994) oder regulatorisch, durch seine Phosphorylierung mittels Casein Kinase 2 bzw. Autophosphorylierung, auf die Proteinbiosynthese zu wirken (Janssen *et al.*, 1988a, Marcinkiewicz, *et al.*, 1992).

Interessanterweise liegt im N-terminalen Bereich von eEF-1 γ die Konsensus-Sequenz, die für eine GST-Aktivität notwendig ist, nahezu konserviert vor. Obwohl die genaue Bedeutung dieser GSH-Bindungsstelle beim eEF-1 γ noch unbekannt ist, wird vermutet, dass sie eine Rolle in der Detoxifikation von Xenobiotika spielt (Koonin *et al.*, 1994, Billaut-Mulot *et al.*, 1997). Weitere Hypothesen postulieren, dass die GSH-Bindungsstelle an der Regulation des Zusammenschlusses der eEF-1-Untereinheiten beteiligt sein könnte (Koonin *et al.*, 1994, Kobayashi *et al.*, 2001) oder den Redoxstatus der Zelle ermittelt und ihn an die Proteinsynthesemaschinerie signalisiert (Ejiri, 2002). Diese Theorie beruht auf der Feststellung, dass reduziertes GSH die Translation aktiviert, wohingegen oxidiertes GSH die Translation inhibiert. Nähere Untersuchungen des eEF-1 γ ergaben, dass die Untereinheit alleine – trotz ihrer GSH-Bindungsstelle – keine GST-Aktivität aufweist, aber zusammen mit den anderen Untereinheiten des Elongationkomplexes aktiv vorliegt (Vickers & Fairlamb, 2004).

1.5 Zielsetzung

Glutathion S-Transferasen (GSTs) bilden eine multigene Enzymfamilie, die in fast allen Organismen vertreten ist und eines der Abwehrsysteme gegen toxische, endogene und xenobiotische, elektrophile Verbindungen darstellt. Eine erst kürzlich entdeckte GST-Klasse ist die Omega-Klasse, die sich strukturell und funktionell von den anderen GST-Klassen unterscheidet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Omega-GST (CeGSTO-1) des Nematoden *C. elegans* charakterisiert werden. Durch die Mikroinjektion von Reportergenkonstrukten sollten dabei transgene *C. elegans* erstellt und anhand dieser Tiere das Expressionsmuster von CeGSTO-1 bestimmt werden. Zudem war geplant, eine Analyse der putativen Promotorregion von CeGSTO-1 durchzuführen, um mögliche Regulationsmechanismen aufzudecken.

Um Hinweise auf die physiologische Bedeutung der Omega-GST zu erhalten, sollte die CeGSTO-1 rekombinant in *E. coli* exprimiert und ihre katalytische Aktivität mit Hilfe von Enzymtests untersucht werden. Des Weiteren sollte die Funktion der CeGSTO-1 im Zusammenhang mit oxidativem Stress analysiert werden, wobei geplant war, eine mögliche Schutzfunktion des Enzyms sowohl in *E. coli* als auch in *C. elegans* zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollte mit Hilfe von RNA-Interferenz ein „knock-down“ der CeGSTO-1 in *C. elegans* erzeugt und unter Einfluss von verschiedenen Stressoren charakterisiert werden. Außerdem war vorgesehen, transgene *C. elegans* zu erstellen, die die CeGSTO-1 überexprimieren, um eine Analyse ihrer Stressresistenz vornehmen zu können.

Der eukaryotische Elongationsfaktor 1 gamma (eEF-1 γ) besitzt eine fast vollständig konservierte GSH-Bindungsstelle, so dass ihm neben seiner noch weitgehend unerforschten Funktion in der Proteinbiosynthese auch eine GSH-abhängige Entgiftungsfunktion zugesprochen wird. Eine erste Charakterisierung des CeEF-1 γ von *C. elegans* wurde während meiner Diplomarbeit (August 2002) vorgenommen.

Eine Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit bestand darin, den CeEF-1 γ näher zu charakterisieren und eine mögliche Entgiftungsfunktion des CeEF-1 γ unter Beteiligung der anderen Untereinheiten zu untersuchen. Um zu überprüfen, ob der CeEF-1 γ aus *C. elegans* GST-Aktivität ausweist, sollte er zuerst in *C. elegans* überexprimiert und anschließend mit Hilfe von angefügten Tags aus den Würmern aufgereinigt werden. Des Weiteren war der Nachweis einer möglichen Protein-Protein-Interaktionen des rekombinanten CeEF-1 γ mit der rekombinanten Untereinheit CeEF-1 β geplant. Außerdem sollte der gesamte eEF-Komplex aus *C. elegans* aufgereinigt werden, um auch hier eine Aktivitätsbestimmung durchzuführen und eventuell Hinweise auf eine interne Entgiftungsfunktion des eEF-1-Komplexes zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Bioreagenzien und Kits

Amersham Biosciences:	5'α [³⁵ S]- Desoxyadenosintriphosphat (dATP) (1000 ci/mmol), α [³² P]-dATP, ECL plus Western Blotting Detection System, "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit", "GFX™ Plasmid Preparation Kit", Glutathion Sepharose™ 4B, MicroSpin S-200 HR Columns, Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing-Kit"
Biacore (Uppsala, Schweden):	CM5-Sensorchip, 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) (EDC), HBSEP-Puffer, N-Hydroxy-succinimid (NHS)
Biomol (Hamburg):	Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Imidazol, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), Lysozym, Tris-Puffer
Bio-Rad (München):	„Precision Plus Protein Standards" (Dual Color), Goat Anti-Mouse-IgG (H+L)-HRP konjugiert
Boehringer Mannheim:	Ampicillin (AMP), Anti-Mouse-IgG (alkalische-Phosphatase-konjugiert), Desoxyribonukleotide (dNTP), „Expand™ High Fidelity PCR System"
DAKO Diagnostica GmbH:	Mouse Anti-Rabbit (Mouse-to-Rabbit), Rabbit Anti-Mouse (Rabbit-to-Mouse), Anti-Alkalische Phosphatase-Komplex (APAAP Mouse, monoclonal)
Eppendorf (Hamburg):	Femtotips I Mikroinjektionsnadeln, Mikroloader
Eurogentec (Köln):	Agarose

Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz):	Formaldehyd, Juglon
Fotochemische Werke GmbH:	Röntgenfilm x-ray Retina
Gerbu Biochemicals GmbH:	Dextransulfat
Invitrogen (GibcoBRL):	5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Elongase, PCR-SuperMix, „Low Melting“ Agarose, Taq-Polymerase, RNA-Leiter (0,24 – 9,5 kb) TopoTA Cloning-Kit 2.1“, Trizol
Hampton Research (USA):	„Crystal Screen“-Kit I, Ethylquecksilberphosphat, VDX 24-Well Platten
IBA GmbH (Göttingen):	Buffer E (10x, D-Desthiobiotin), Strep-Tactin Sepharose
Jackson Immuno-Research:	Donkey Anti-Rabbit-IgG (H+L, alkalische-Phosphatase-konjugiert)
Kodak:	Entwickler- und Fixiererlösung
MBI Fermentas (St. Leon-Roth):	1 kb DNA Leiter GeneRuler™
Merck (Darmstadt):	Ammoniumchlorid, Ammoniumpersulfat (APS), Aquatex, Arsen-Trioxid, Borat, Bromphenolblau, Calciumchlorid, Chloroform, Cholesterol, Chloralhydrat, N,N-Dimethylformamid (DMFA), Dimethylsulfoxid (DMSO), Essigsäure, Ethanol, Ethanolamin, Formalin, Formamid, Gelantine, Glutaraldehyd, Guanidiniumthiocyanat, Glucose, Glycerin, Glycin, Haematoxylin, Isopropanol, Kalialaun, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogencarbonat, Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Leucin, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Methanol, Methionin, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Natriumdisulfit, Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydrogenphosphat, Natriumhydroxid, Natriumjodat, Pepton (aus

	Sojabohnen), Phosphorsäure, Prolin, Salzsäure, Silbernitrat, Sucrose, N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED), Tetracyclin, Xylencyanol, Xylol, Zitronensäure (krist.)
Millipore (Bradford, MA, USA):	Amicon Ultra 10/30/100 kDa, Centricon-3/10/30/50 Microconcentratoren, Ultrafree-MC Centrifugal Filter Unit < 0,5 ml,
New England Biolabs (NEB):	Faktor Xa, Restriktionsenzyme, Reverse Transkriptase
Otto Nordwald GmbH (Hamburg):	Agar, Bacto-Trypton, Bacto-Hefeextrakt
Perkin Elmer (Wellesley, MA, USA):	„Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“
Pierce:	Dialysekassette Slide-A-Lyzer, 10.000 MW (0,1 – 0,5 ml bzw. 0,5 – 3 ml)
Promega (Mannheim):	Pfu-DNA-Polymerase, T4-DNA-Polymerase
Operon Biotechnologies:	Oligonukleotide
Qiagen (Hilden):	Ni ²⁺ -NTA-Agarose-Matrix, „Plasmid Maxi Kit“, „Plasmid Midi Kit“
Roche Diagnostics (Mannheim):	DNA Restriktionsenzyme, Natriumjodid, Nylonmembran (positiv geladen), Proteinase K, Proteinasemix „complete“, „Random Primed Labeling Kit“, Taq-DNA Polymerase
Roth (Karlsruhe):	Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40%), Oligonukleotide, Roti®-Mark Proteinleiter, Roti-Histol
Serva (Heidelberg):	Dialyseschläuche (8/32, Ø 6 mm), Natriumdodecylsulfat (SDS)
Sigma (Deisenhofen):	Acetonitril (ACN), Acrylamid, BCIP, BSA, „Coomassie Brilliant Blue G-250“, Cholesterol, Cumene-Hydroperoxid, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Dithiothreitol (DTT), Ethanolamin, Ethidiumbromid, Fast Red TR, Glutathion-Reduktase, L-Glutathion reduziert, Hämoglobin

	(vom Rind), Kalium-Tetracyanoplatin, Kodak Biomax MR, Mineralöl, Naphtholphosphat, Natriumhypochlorid (5% aktives Chlor, Chlorox), Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT), Nystatin, Oligonukleotide, Paraquat (Methylviologen), Phenolchloroform, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Poly-L-Lysin, S-Hexyl-GSH, S-Hexyl-GSH-Agarose, Siliciumoxid (Glasmilch), <i>tert</i> -Butyl-Hydroperoxid (t-BOOH), Thiamin-HCl, Trifluoressigsäure (TFA), Triton-X-100, Tween 20 (Polysorbat), β -Mercaptoethanol
Stratagene (La Jolla, CA, USA):	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-GAL), <i>C. elegans</i> λ Uni Zap cDNA Bibliothek
Schleicher und Schuell (Dassel):	Nitrocellulosemembran PROTRAN BA-85

2.1.2 Medien für das Arbeiten mit Bakterien

LB-Medium (Luria-Bertani-Broth):	1,0% Bacto-Trypton, 0,5% Bacto-Hefeextrakt, 1% NaCl in dH ₂ O
LB-Agar:	LB-Medium, 1,5% Agar
LB-AMP-Medium/-Agar:	Zugabe von 50 μ g/ml Ampicillin
Minimal-Medium:	200 ml 5 x M9 (42,5 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 15 g KH ₂ PO ₄ , 2,5 g NaCl, 5 g NH ₄ Cl, H ₂ O ad 1 l, autoklaviert), 20 ml 20% Glucose, 1 ml 100 mM Leucin, 3 ml 100 mM Prolin, 0,5 ml 1% Thiamin, 3 ml 100 mM Methionin, 1 ml 0,1 M CaCl ₂ , 1 ml 1 M MgSO ₄ , 50 mg/ml AMP, H ₂ O ad 1 l

2.1.3 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

DEPC-Wasser:	500 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) ad 1 l dH ₂ O, über Nacht stehen lassen, autoklavieren
TBS-Puffer:	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 8,0

Plasmidpräparation

Glasmilch	30 g Silizium Dioxid 2-3 mal mit 250 ml dH ₂ O waschen, in 30 ml dH ₂ O und 300 µl HCl (37%) aufnehmen.
New Wash:	50% Ethanol, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,05 mM EDTA, pH 8,0, 50 mM NaCl
STET-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 5% (v/v) Triton-X-100, 8% (v/v) Sucrose

Agarose-Gelelektrophorese

6 x DNA-/RNA-Beschwerungspuffer:	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 40% (w/v) Glycerol
5 x TAE-Puffer:	200 mM Tris-Base, 1,5 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, pH 8,0
5 x TBE-Puffer:	450 mM Tris-Base, 450 mM Borat, 10 mM EDTA, pH 8,0

Northern Blot

20 x SSC:	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
Prähybridisierungslösung:	7% SDS, 0,5 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,2 2% Dextransulfat
Waschpuffer:	2 x SSC, 0,1% SDS
„Strip“-Puffer:	0,1% SDS, 2 mM EDTA

2.1.4 Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung 150 mM NaCl, 19 mM Na₂HPO₄,
(PBS): 4 mM NaH₂PO₄, pH 7,3

Proteinbestimmung

Bradford-Reagenz: 0,01% (w/v) "Coomassie Brilliant Blue G-250",
4,7% Ethanol (w/v), 8,5% H₃PO₄ (w/v)

Proteinaufreinigung (über Nickel-Säule)

Lysispuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl,
10 mM Imidazol, pH 8,0

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl,
20 mM Imidazol, pH 8,0

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl,
250 mM Imidazol, pH 8,0

SDS-Gelelektrophorese

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl in 100 ml dH₂O, pH 6,7

1 x SDS-Laufpuffer: 3 g Tris/HCl, 14,4 g Glycin, 10 ml SDS (10%),
ad 1 l dH₂O

2 x SDS-Probenpuffer: 1,52 g Tris, 2 g SDS, 25,8 g Glycerin,
5 ml β-Mercaptoethanol, 1 Spatelspitze
Bromphenolblau ad 100 ml dH₂O, pH 6,8

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl in 100 ml dH₂O, pH 8,9

Ammoniumpersulfat (APS): 10% (w/v) in dH₂O

Coomassie Färbung

Fixier-Lösung: 20% Essigsäure

Färbe-Lösung: Färbelösung A und B im Verhältnis 1:1
Färbelösung A: 0,2% „Coomassie Brilliant
Blue G-250“ in 96% Ethanol
Färbelösung B: 20% Eisessig in dH₂O

Entfärber-Lösung: 20% Ethanol (v/v), 10% (v/v) Eisessig in dH₂O

Silberfärbung

Fixier-Lösung (1): 30% Ethanol, 10% Essigsäure

Inkubations-Lösung (2): 20% Ethanol, 0,5 M Natriumacetat,
0,5% Glutaraldehyd, 0,2% Na₂S₂O₃

Färbe-Lösung (3): 0,1% AgNO₃, 0,02% Formaldehyd

Entwickler-Lösung (4): 2,5% Na₂CO₃, 0,01% Formaldehyd

Stop-Lösung (5): 0,05 M EDTA

Western Blot

Protein-Transferpuffer: 0,3 M (3,03 g) Tris/HCl, 14,4 g Glycin,
20% Methanol, pH 10,4 ad 1 l dH₂O

Blockierungslösung: 3% BSA in 1 x PBS

Immundetektion von Proteinen

Waschpuffer: 0,05% Tween 20 in 1 x PBS

BCIP: 50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid

NBT: 50 mg NBT in 70% Dimethylformamid

Substratpuffer: 0,1 M Tris-Base, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂,
pH 9,5

Stop-Puffer: 20 mM Tris/HCl, 1 mM Na-EDTA, pH 2,9

2.1.5 Puffer, Lösungen und Medien für das Arbeiten mit *C. elegans*

„Axenisches Medium“: 3% (w/v) Hefeextrakt, 3% (w/v) Pepton (aus
Sojabohne, 5 µg/ml Cholesterol. Nach dem
Autoklavieren hinzufügen: 0,5 mg/ml
Hämoglobin in 0,1 N KOH (10 min bei 121°C
autoklaviert)

„Freezing-Solution“: 5,85 g NaCl, 6,8 g KH₂PO₄, 300 g Glycerol, 5,6
ml 1 M NaOH, ad 1 l dH₂O, nach dem
Autoklavieren: 3 ml 0,1 M MgSO₄

M9-Puffer:	3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, 1 ml 0,1 M MgSO_4 , ad 1 l H_2O , autoklaviert
„Nematode growth medium“ (NGM) und NGM-Agar:	3 g NaCl, 2,5 g Pepton (aus Sojabohnen), ggf. Agar ad 975 ml H_2O , nach dem Autoklavieren hinzufügen: 1 ml Cholesterol (5 mg/ml in Ethanol), 0,5 ml 1 M CaCl_2 , 1 ml 1 M MgSO_4 , 25 ml 1 M KH_2PO_4 , pH 6,0

2.1.6 Plasmidvektoren

Clos & Brandau, 1994:	Vektoren: pJC40
Invitrogen:	Vektoren: pJC20, TOPO pCR TM 2.1
Fire, 1986 (Carnegie Institution of Washington, Baltimore, MD):	Vektoren: pPD49.26, pPD95.77, pPD103.05, pPD129.36
Schnabel & Schnabel, 1990 (Universität Braunschweig):	Vektoren: pBX

2.1.7 Bakterienstämme (*E. coli*) und Nematodenstämme (*C. elegans*)

Greenberg & Demble, 1986	<i>Escherichia coli</i> -Zellen: JTG10
Novagen:	<i>E. coli</i> -Zellen: Rosetta gami
Stratagene:	<i>E. coli</i> -Zellen: BL21(DE3), BL21(pLys), DH5 α , HT115(DE3), OP50
Schnabel & Schnabel, 1990 (Universität Braunschweig):	<i>C. elegans</i> -Wildtyp: N2 Bristol <i>C. elegans</i> -Mutante: pha-1

2.2 Molekularbiologische Methoden zur Präparation von Nukleinsäuren

2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht eine *in vitro*- Amplifikation bestimmter Nukleinsäuresequenzen, sie wurde im Thermocycler (Uno II, Biometra) nach Saiki *et al.* (1989) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 50 µl enthielt die DNA-Konzentration von 50 -100 ng, sowie 10 pM von jedem Oligonukleotidprimer und wurde mit je einer Einheit Taq-Polymerase (Invitrogen), Pfu-Polymerase (Promega) oder High Fidelity Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim) und den entsprechenden Puffersystemen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Nach einer einleitenden Denaturierung der zu amplifizierenden DNA (bei 95°C) wurden die PCR-Proben 35 Amplifizierungszyklen unterzogen. Jeder Zyklus bestand dabei aus einem Denaturierungsschritt (95°C), einem Annealingschritt (52 – 57°C, abhängig von der gewünschten Spezifität) und einem Extensionsschritt (68°C bzw. 72°C, abhängig vom jeweiligen Enzymoptimum). Abschließend erfolgte ein letzter Extensionsschritt von 5 min. Zur Entfernung des DNA Templates nach der PCR wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C mit *Dpn I* verdaut.

Für die PCRs wurden Oligonukleotidprimer mit folgenden Sequenzen verwendet:

Allgemeine Primer zur Sequenzierung

pJC20 S:	5'-CTCTAGAAATAATTTTGTT-3'
pPD95.77, Fire5AS:	5'-GGACAACTCCAGTGAAAAGTTCTTCTC-3'
pPD49.26, 10489AS:	5'-GAGGCACGGGCGCGAGATGG-3'
pPD49.26, 10571S:	5'-GTATATAAGGAAAGCGGGCTC-3'
pPD103.05, 5940AS:	5'-GTTCCCTCACTGGCTGCCTTTGGAGTTTCAGG-3'
pPD103.05, 8284S:	5'-GGAGGCGACAACGGTATTTTCGAAATT-3'
SL1:	5'-GGTTTAATTACCCAAGTTTGAG-3'
SL2:	5'-GGTTTTAACCAGTTACTCAAG-3'
T7-Prom, AS:	5'-CATTATGCTGAGTGATATCCCG-3'
TOPO, AS (Forw.):	5'-GGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAA-3'
TOPO, S (Rev.):	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

Klonierung von *cegsto-1* in pJC40 bzw. in pPD103.05 und Cys33Ala-Mutagenese

4660 S, <i>Hind</i> III:	5'-CCCA [↓] AGCTTATGGTTTTAACCGGAGTAAC-3'
4661 AS, <i>Bam</i> H I:	5'-CGCG [↓] GATCCTCAAAGGCCCAAATCATAATT-3'
6502 S, <i>Sma</i> I:	5'-TCCC [↓] CCC [↓] GGGATGGTTTTAACCGGAGTAACA-3'
6503 AS, <i>Apa</i> I:	5'-ACGAGGGCC [↓] CTCAGTGGTGGTGGTGGTGG TGGTGGTGAAGGCCCAAATCATAATTCAATT-3'
7360S-Cys33Ala	5'-GTCTACAACATGAGATTCGCTCCATGGG [↓] CTG AAAGAGCAATG-3'
7361AS-Cys33Ala	5'-CATTGCTCTTTTCAGCCCATGGAG [↓] CGAATCTCATG TTGTAGAC-3'

Klonierung von *cegsto-1* in pPD95.77, Promotordeletionen, GATA-Mutagenese

6141 S, <i>Hind</i> III:	5'-CCCA [↓] AGCTTCCAAAATATTA [↓] AAACTTGCGTG-3'
6246 AS, <i>Sma</i> I:	5'-TCCC [↓] CCC [↓] GGGTCAGTTACGTTGAGATTGACTACCTCCGC-3'
6484 S1-Del, <i>Hind</i> III:	5'-CCCA [↓] AGCTTGCTATTTAAAGACTGAAAG-3'
6486 S2-Del, <i>Hind</i> III:	5'-CCCA [↓] AGCTTCTCCTAATTTGATGTGTTTAC-3'
6487 S3-Del, <i>Hind</i> III:	5'-CCCA [↓] AGCTTCTATATTTCTTTCTTATC-3'
6488 S4-Del, <i>Hind</i> III:	5'-CCCA [↓] AGCTTCACTGCTGTTTGAATTCAAAT-3'
6485 AS-Del:	5'-CGGGATCCGTTTTCTATATTTCTTTCTTATC-3'
7253 S, <i>Bam</i> H I:	5'-CGG [↓] GATCCGTTTTCTATATTTCTTTCTTATC-3'
7254 AS, <i>Bam</i> H I:	5'-CGG [↓] GATCCGAATTACAAGAAGTGAAAAATG-3'

Klonierung von *elt-2*, *elt-4* bzw. *cegsto-1* in pPD129.36 (RNAi)

8038 S- <i>elt-2</i> , <i>Nco</i> I:	5'-CATGC [↓] CATGGATGGATAATAACTACAATGATAATG-3'
8039 AS- <i>elt-2</i> , <i>Xho</i> I:	5'-CCGC [↓] TCGAGAAAGTTCCAAGAGTGTTTACG-3'
8040 S- <i>elt-4</i> , <i>Nco</i> I:	5'-CATGC [↓] CATGGATGGATAATAACTACTTAGATGCTTC-3'
8041 AS- <i>elt-4</i> , <i>Xho</i> I:	5'-CCGC [↓] TCGAGTTACAGTTTCGAAATGCCAGG-3'
6740 S, <i>Hind</i> III:	5'-CCCA [↓] AGCTTATGGTTTTAACCGGAGTAAC-3'
6741 AS, <i>Xho</i> I:	5'-CCGC [↓] TCGAGTGACGGCGAAGAGCAATGGAA-3'

Klonierung von *ceef-1γ* in pJC40/pJC20 bzw. in pPD49.26 und pPD103.05

1466 S, <i>Nde</i> I:	5'-GGAATTCCA [↓] TATGACCGGAAA [↓] ACTGTATGGAAACAA-3'
1467 AS, <i>Xho</i> I:	5'-GATCCGC [↓] TCGAGTACTTGAAAATCTTTCCTTGGTTGAA-3'
9944 AS, <i>Xho</i> I:	5'-GATCCGC [↓] TCGAGTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCC AAGCGCTCTTGAAAATCTTTCCTTGGTT-3'
1116 S, <i>Hind</i> III:	5'-CCCA [↓] AGCTTCTGAAAACAATGGAATTACGAGTG-3'
6186 S, <i>Nhe</i> I:	5'-CTAG [↓] CTAGCATGACCGGAGTAAGTTTATAA-3'
6776B07 AS, <i>Xba</i> I: (Strep-Tag)	5'-CTAGT [↓] CTAGATTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCC AAGCGCTCTTGAAAATCTTTCCTTGGTTG-3'

6776B08 AS, *Xba* I: 5'-CTAGT[↓]CTAGATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
(His-Tag) TGCTTGAAAATCTTTCCTTGGTTG-3'

Klonierung von *ceef-1γ* in pPD129.36 (RNAi)

3659 S, *Hind* III: 5'-CCCA[↓]AGCTTATGACCGGAAAACACTGTATGG-3'
3660 AS1, *Xho* I: 5'-CCGC[↓]TCGAGGTTCCAGTCAGGTGAAGTCCG-3'
3661 AS2, *Xho* I: 5'-CCGC[↓]TCGAGGTTCTCCAACCAAGTAGGTC-3'

Klonierung der N-terminalen Domäne von *ceef-1γ* in pJC40

1466 S, *Nde* I: 5'-GGAATTCCA[↓]TATGACCGGAAAACACTGTATGGAAACAA-3'
6780 AS, *Xho* I: 5'-CCGC[↓]TCGAGTTGGTTGAATTGAGCAACCGATG-3'

Klonierung von *ceEF-1β* in pJC40

5860 S, *Nde* I: 5'-CGCCA[↓]TATGGTTGCCGACGTCAAGAGCCCA-3'
5861 AS, *Eco*R I: 5'-CCGG[↓]AATTCCTAGATCTTGTTGAAGGCGAC-3'

Die Erkennungssequenzen der jeweiligen Restriktionsenzyme sind unterstrichen und die Schnittstellen der Enzyme jeweils mit einem Pfeil (↓) gekennzeichnet.

2.2.2 Plasmid-DNA Präparation (Mini-, Midi-, Maxipräparation)

Die Extraktion rekombinanter Plasmid-DNA aus eine Über-Nacht-Kultur (ÜK) einer Bakterienkolonie mittels Minipräparation (nach Sambrook *et al.*, 1989) diente hauptsächlich der schnellen Identifikation von Bakterientransformanten.

Hierzu wurden Zellen einer 2 ml ÜK für 2 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 250 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Lysozym aus Hühnereiweiß (10 mg/ml) wurde der Ansatz für 10 min auf Eis gestellt, dann 2 min im Wasserbad gekocht und die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm/4°C entfernt. Der Überstand wurde anschließend mit 500 µl 6 M NaJ und 5 µl Glasmilch versetzt, 5 min bei RT geschüttelt und abzentrifugiert.

Danach wurde die DNA/Glasmilch 2 x mit 500 µl New Wash gewaschen, bei 56°C getrocknet und mit 80 µl dH₂O für 5 min bei 56°C eluiert. Zum Schluss wurde die Glasmilch abzentrifugiert. Glasmilchfreie Minipräparation für Mikroinjektion in *C. elegans* oder für automatische Sequenzierung erfolgte mit dem „GFX™ Plasmid Preparation Kit“ nach Angaben des Herstellers (Amersham).

Die Präparation großer Plasmid-DNA-Mengen erfolgte mit den Kit-Systemen „Plasmid Midi“ und „Plasmid Maxi“ nach Angaben des Herstellers (Qiagen).

2.2.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

PCR-Purification Kit

Durch eine Aufreinigung von Nukleinsäuren, z.B. nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau wurden Salze und Oligonukleotide entfernt bzw. Nukleinsäuren umgepuffert oder konzentriert. Hierzu erfolgte die DNA-Aufreinigung mit dem „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ genau nach Angaben des Herstellers (Amersham).

Ethanolfällung

Bei einer hohen Konzentration einfach geladener Kationen führt Ethanol zu einer Aggregation und Präzipitation der Nukleinsäure-Moleküle, wobei Oligonukleotide und Salze in Lösung bleiben. Die Ethanolfällung erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989). Hierfür wurde die DNA-Probe (z.B. PCR, Minipräparation) mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und dem 3-fachen Volumen 96% Ethanol versetzt und 5 min in flüssigem Stickstoff inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (20 min/14.000 rpm) wurde das Pellet mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen (5 min/14.000 rpm), für 5 min/56°C getrocknet und in 20 µl dH₂O aufgenommen.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Extraktion wurde mit Tris-gesättigtem Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) durchgeführt. Dazu wurde die Nukleinsäure mit einem Volumen Phenol-Chloroform für 5 min bei RT inkubiert, 5 min bei 12.000 rpm/4°C zentrifugiert und anschließend die Nukleinsäure aus der Oberphase mit einem Volumen Isopropanol präzipitiert (5 min flüssiger Stickstoff, 20 min/12.000 rpm/4°C).

2.2.4 Analytische und präparative Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe und wurde in horizontalen Flachgelapparaturen (Horizon 11.14, GibcoBRL) durchgeführt. Abhängig von der jeweiligen Fragmentgröße wurden 0,8 – 1,5%ige Agarosegele eingesetzt. Zu analytischen Zwecken wurde das Agarosegel mit 1 x TBE-Puffer angesetzt und die Auftrennung bei 120 V vorgenommen. Die präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten zu ihrer Isolierung und anschließender Extraktion erfolgte mittels „Low-Melting“-Agarosegel in 1 x TAE-Puffer bei 80 V. Die DNA-Proben wurden immer mit 1/10 Volumen Probenpuffer beschwert und als

Marker-DNA eine 1 kb Leiter verwendet, die die Größenbestimmung der DNA-Fragmente zulässt. Die Agarosegele enthielten 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, das in die aufgetrennte DNA eingebaut wird und sie unter UV-Licht sichtbar macht. Für die DNA-Extraktion aus „Low-Melting“-Agarosegelen wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht aus dem TAE-Gel ausgeschnitten und die DNA mittels „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers (Amersham) extrahiert.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in DNA-Lösungen und RNA-Lösungen wurde die Extinktion bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ photometrisch bestimmt. Der Quotient der beiden OD-Werte stellt ein Maß für die Reinheit der DNA dar ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} > 1,8$).

Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]:

$\frac{\text{Extinktion} \times \text{Verdünnung} \times \text{Faktor } 50 \text{ (Faktor } 40 \text{ bei RNA)}}{1.000}$
--

2.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Kettenabbruch-/Didesoxynukleotidmethode nach Sanger *et al.* (1977) wurde zur Überprüfung des Leserahmens rekombinanter DNA angewandt. Sie wurde mit Reagenzien des „Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing-Kit“ (Amersham) durchgeführt, wobei als radioaktiv markiertes Nukleotid Desoxyadenosin 5'α [^{35}S]-Desoxyadenosintriphosphat verwendet wurde. Pro Sequenzreaktion wurden 20 µl Plasmid-DNA einer Minipräparation mit 2 µl 2 N NaOH denaturiert (10 min/37°C), mit 2 µl 3 N Natriumacetat/100% Ethanol gefällt (siehe Ethanol-fällung 2.5.3.2), mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen für die Sequenzreaktion in 7 µl dH₂O aufgenommen. Die elektrophoretische Auftrennung der denaturierten Proben erfolgte in einem 8% Polyacrylamidgel (mit 7 M Urea) für 2 – 4 h in einer vertikalen Elektrophoresekammer (S2, GibcoBRL) bei 80 W. Das Gel wurde auf Whatman Papier für 2 h bei 80°C getrocknet (Vakuumtrockner S83, Bio-Rad). Anschließend wurde ein Biomax-Röntgenfilm (Kodak) über Nacht auf dem Gel exponiert und im Entwickler Curix 60 (Agfa) entwickelt.

Bei der automatischen Sequenzierung können ca. 400 bp gelesen werden, daher wurde sie eingesetzt um längere Nukleotidsequenzen zu bestimmen. Hierzu wurde 1 µg DNA-Probe in einer PCR mit dem „Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ nach Angaben des Herstellers (Perkin Elmer) vorbereitet und in einer darauf folgenden Ethanolfällung gereinigt. Die anschließende Sequenzierung wurde mit dem Gerät ABI 373 der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

2.3 Molekularbiologische Klonierungsmethoden

2.3.1 Restriktionsverdau

Für einen Restriktionsverdau wurden 1 – 10 µg DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen und Pufferkomponenten nach den jeweiligen Herstellerangaben (NEB, Roche) für 1 – 16 h inkubiert. Das Reaktionsvolumen lag dabei zwischen 10 µl für analytische und 100 µl für präparative Versuche.

2.3.2 Ligation

Bei einer Ligation werden die 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle mittels der T4-Ligase verknüpft. Dazu wurden die Restriktionsansätze mit dem „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ (Amersham) gereinigt und 30 ng Plasmidvektor-DNA mit 3 bzw. 6 molarem Überschuss an Fragment-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Nach Herstellerangaben (NEB) erfolgte die Ligation mit der T4 DNA-Ligase und dem entsprechenden T4-Ligase-Puffer bei 14°C über Nacht im Wasserbad. Der Ligationsansatz wurde am folgenden Tag in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

2.3.3 Plasmidtransformation in chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine ÜK entsprechender Zellen 1:100 in 100 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in Falcongefäßen 10 min bei 4.000 rpm/4°C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus) und das Bakterienpellet vorsichtig in 50 ml kalter 80 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde das Pellet nach erneuter Zentrifugation (10 min/4.000 rpm/4°C) vorsichtig in 6 ml kalter 100 mM CaCl₂-Lösung + 20% Glycerol resuspendiert und nach dem Aliquotieren bei -70°C gelagert.

Für die Plasmidtransformation in kompetente Zellen (nach Cohen *et al.*, 1972) wurden 100 µl kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA (z.B. Ligationsansatz oder 1 µl Minipräparation) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42°C und einem Kälteschock für 5 min auf Eis wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und die Zellen für 30 min im 37°C-Inkubator geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf Platten mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.3.4 TopoTA-Vektor/Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion (nach Langeley *et al.*, 1975) wurde mit dem „TopoTA Cloning-Kit 2.1“ nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Bei dieser Methode wird durch die Klonierung eines DNA-Fragments in den TopoTA-Vektor das lac Z-Gen des Vektors zerstört. Bakterienkolonien, die DNA-Plasmide mit Insert aufgenommen haben, können in Gegenwart des Farbstoffs X-Gal keine blauen Kolonien mehr bilden und sind somit leicht zu selektieren.

Nach der Ligation des PCR-Produkts in den Topo-Vektor und der Transformation in One-Shot-Zellen erfolgte die 37°C-Inkubation auf LB-AMP-Platten mit 0,1 M X-GAL/IPTG (2% (w/v) gelöst in N,N-Dimethylformamid).

2.3.5 Bakterienglycerinstocks

800 µl Bakterien einer ÜK wurden zu 200 µl Glycerol gegeben, gut vermischt und bei -70°C eingefroren.

2.4 Molekularbiologische Arbeiten mit RNA

2.4.1 Präparation von _{gesamt}RNA aus Nematoden mit Trizol

Das Nematodenpellet wurde mit 5 – 10-fachem Überschuss (w/v) Trizol versetzt, bis die Würmer durch Vortexen vollständig homogenisiert waren. Durch Zugabe von 0,2 ml Chloroform/ml Trizol, 3 min Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation bei 12.000 rpm/4°C für 15 min konnte die RNA mit der wässrigen Oberphase in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden. Mit Hilfe von 0,5 ml Isopropanol/ml Trizol wurde die RNA bei -70°C präzipitiert und anschließend für 30 min bei 12.000 rpm/4°C zentrifugiert. Nach dem Waschen des RNA-Pellets mit 1 ml 75%

Ethanol (in DEPC-Wasser) pro ml Trizol wurde es bei 37°C leicht getrocknet und in 30 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Nach dem vollständigen Lösen der RNA bei 60°C konnte die Konzentration photometrisch bestimmt werden.

2.4.2 Reverse Transkriptase-Reaktion

Das Umschreiben von RNA in cDNA (Erststrangsynthese) erfolgte nach Herstellerangaben mit der Reverse Transkriptase Super Skript™II RT (Kit: 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Invitrogen). Für die Synthese wurden 1 – 5 µg frisch präparierte _{gesamt}RNA mit 20 mM Tris/HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 2 mM dNTP-Mix und 0,1 µM "GSP1" Oligo-(dT) Primer eingesetzt. Nach einer kurzen Denaturierung bei 70°C und der Anlagerung des Primers bei 37°C für 10 min, wurde die Synthese durch Zugabe von 200 Einheiten "Reverse Transkriptase Super Skript™II RT" gestartet. Nach 45 min bei 42°C wurde das Enzym 10 min bei 70°C inaktiviert, die noch vorhandene RNA mit RNaseH entfernt und die cDNA bei -20°C gelagert.

2.4.3 Northern Blot (Transfer von RNA auf eine Nylonmembran)

Alle wässrigen Lösungen für den Northern Blot wurden mit DEPC-behandeltem dH₂O angesetzt. Für die elektrophoretische Auftrennung der RNA wurde die Elektrophoresekammer 30 min in 3% H₂O₂ inkubiert und anschließend ein 2%iges TBE-Gel mit 0,5 ml frischem 1 M Guanidiniumthiocyanat gegossen. Auf diesem Gel wurden dann 10 – 20 µg RNA pro Bahn (mit 10 µl Formamid beschwert und für 2 min bei 60°C denaturiert) und zusätzlich ein Größenstandard (Invitrogen) sowie Loading Dye (1 µl + 10 µl Formamid) aufgetragen. Nach dem Lauf bei 70 V wurde das Agarosegel kurz in 0,5 µl/ml Ethidiumbromid geschwenkt und unter UV-Licht fotografiert. Vor dem Blotten wurde es 2 x 10 min in 7,5 mM NaOH inkubiert und im Kapillarverfahren über Nacht mit 7,5 mM NaOH als Transferpuffer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Millipore) übertragen (Sambrook *et al.*, 1989). Dieser RNA-Blot wurde danach 4 min in 2 x SSC gewaschen, leicht luftgetrocknet und im UV-Stratalinker™1800 (Stratagen) bei 1.200 µJoules x 100 fixiert.

2.4.4 Hybridisierung des Northern Blots mit radioaktiv markierter DNA

Zur α -[³²P]-dATP-Markierung von 50 ng denaturierter DNA wurde das „Random Primed Labeling Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben verwendet. Nach Zugabe von 3 μ l Nukleotiden (je 1 μ l von CTP, GTP, TTP), 2 μ l Reaktionsgemisch Random Primer, 5 μ l α -[³²P]-dATP (50 μ Ci) und einer Einheit Klenow-Enzym wurde der Reaktionsansatz 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die nicht eingebauten, radioaktiven Nukleotide über eine Säule (MicroSpin S-200 HR, Amersham) abgetrennt (1 min/3.000 rpm). Die DNA wurde dann in 330 μ l TE-Puffer aufgenommen und die Radioaktivität mittels eines Scintillationszählers (2000 CATRI-CARB, Packard) bestimmt.

Zur Hybridisierung der RNA mit der radioaktiv markierten DNA wurde die Nylonmembran mit 2 x SSC befeuchtet und im Rollofen (OV2, Biometra) für mindestens 2 h bei 55°C mit 40 ml Prähybridisierungslösung inkubiert. Die α -[³²P]-dATP markierte DNA-Sonde wurde 5 min bei 100°C denaturiert, zu dem Blot gegeben und über Nacht bei 55°C hybridisiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 20 min mit 60°C warmen 2 x SSC + 0,1% SDS gewaschen und ein Röntgenfilm auf diesem radioaktiven Blot bei -70°C für 3 – 48 h exponiert.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Rekombinante Expression verschiedener Proteine

Das Plasmid mit dem zu exprimierenden Gen wurde in die *E. coli*-Expressionszellen transformiert, die $\ddot{U}K$ 1:100 (v/v) in LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde dann durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und erfolgte für 4 h bei 37°C bzw. über Nacht bei RT. Nach dem Abzentrifugieren der Kultur (20 min/4.000 rpm/4°C in der Megafuge 1.0R, Heraeus) wurde das Pellet in 5 – 10 ml des entsprechenden Bindungspuffer aufgenommen und zum Aufbrechen der Bakterienzellwand bei 30 W für 8 x 30 s auf Eis sonifiziert (Sonifier 250, Branson). Nach anschließender Ultrazentrifugation für 1 h bei 100.000 x g (Centricon T1065, TFT 55.38 Rotor, Kontron) wurde der Überstand affinitätschromatographisch aufgereinigt.

2.5.2 Proteinaufreinigung im "Batch"-Verfahren

Die Proteinbindung der sonifizierten Bakterienüberstände bzw. der homogenisierten *C. elegans*-Überstände an die äquilibrierten Affinitätsmatrices wurde durch Inkubation unter Drehen für mind. 2 h bei 4°C durchgeführt. Die Matrices wurden anschließend 4 x 15 min/4°C mit dem entsprechenden Waschpuffer gereinigt und mit 2 x 200 – 500 µl Elutionspuffer für 30 min/4°C eluiert. Alle Zentrifugationsschritte der Matrices wurden bei 700 rpm/4°C durchgeführt. Eine anschließende Dialyse der rekombinanten Proteine erfolgte mittels Dialyseschlauch über Nacht, für die Kristallisationsansätze mittels Dialysekassette (Pierce) für 1 h und bei Proteinen aus *C. elegans* mittels Zentrifugationsröhrchen (Millipore).

His-Bind-Resin-Agarose

- Bindungspuffer: 10 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,9
- Waschpuffer: 20 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,9
- Elutionspuffer: 250 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,9

Streptavidin-Sepharose

- Bindungspuffer: Puffer W (100 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)
- Waschpuffer: Puffer W (100 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)
- Elutionspuffer: Puffer E (Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin)

GSH-Sepharose

- Bindungspuffer: PBS, pH 7,4
- Waschpuffer: PBS, pH 7,4
- Elutionspuffer: PBS, pH 7,4, 5 mM GSH

S-Hexyl-GSH-Agarose

- Bindungspuffer: PBS, pH 7,4
- Waschpuffer: PBS, pH 7,4
- Elutionspuffer: PBS, pH 7,4, 3 mM S-Hexyl-GSH, 5 mM GSH

2.5.3 Proteinaufreinigung durch Gelfiltration (mittels FPLC-Säulen)

High Load 26/60 Superdex 200 bzw. High Load 16/60 Superdex 75

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe über Fast-Performance-Liquid-Chromatographie (FPLC) wurde für Proteine >75 kDa eine High Load 26/60 Superdex 200 Säule (Pharmacia Biotech) verwendet. Nach der Äquilibration der Säule mit dem jeweiligen Puffer (wenn nicht anders erwähnt: 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM DTT) wurden 2 ml Ni²⁺-Chelatchromatographie gereinigtes Protein (dialysiert in dem Bindungspuffer) bzw. 100.000 x g Überstand von *C. elegans* (in 75 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, Proteinasemix) auf die Säule geladen und bei einer Durchflussrate von 2 ml/min in 4 ml Fraktionen aufgefangen. Um das Molekulargewicht des rekombinanten Proteins zu bestimmen, wurde die Säule mit folgenden Proteinstandards kalibriert: Ferritin (440.000), Katalase (232.000), Aldolase (158.000), BSA (66.000), Ovalbumin (45.000) und Cytochrom C (12.400). Das Ausschuss-Volumen, dass die Säule durchläuft, bevor die ersten Proteine in den Fraktionen zu messen sind, lag bei 118 ml.

Für Proteine < 75 kDa (wie CeGSTO-1 oder der CeEF-1 β), wurde die High Load 16/60 Superdex 75 analog zu der großen Säule verwendet. Hierbei wurden allerdings 2 ml Fraktionen gesammelt und die Eichgerade wurde mit BSA (66.000), Ovalbumin (45.000) und Carbon Anhydrase (29.000) erstellt.

Mono-Q-Sepharose-Säule und Phenyl-Sepharose-Säule

Die Aufreinigung des EF-1-Komplexes (nach Vickers & Fairlamb, 2004) aus axenischen *C. elegans* erfolgte über zwei FPLC-Säulen. Dazu wurden 1,5 g Würmer im Puffer A (25 mM Na²⁺-Bis-Tris, pH 6,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, Proteinasemix) homogenisiert und der 100.000 x g Überstand an die äquilibrierte Mono-Q-Sepharose (6 ml, Amersham Bioscience) gebunden. Nach dem Waschen mit 10 ml desselben Puffers wurde der Anionenaustauscher mit einem linearen Gradienten von 30 ml 0 – 500 mM NaCl/Puffer A in 1 ml-Fraktionen eluiert (Durchflussrate 0,5 ml/min). Die positiven Fraktionen wurde mittels Dot Blot-Analyse identifiziert, gepoolt, auf 1 ml eingeeengt und das Natriumchlorid mit Amicon-Zentrifugationsröhrchen (Millipore) herausgewaschen. Anschließend erfolgte eine Analyse dieser Fraktionen mittels GST-Enzymtest, SDS-PAGE (Silberfärbung) und Western Blot. Die verbleibenden 800 μ l wurde in 550 mM (NH₄)₂SO₄/Puffer B

(25 mM Na²⁺-Hepes, pH 7,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) aufgenommen und mit 0,5 ml/min über eine mit (NH₄)₂SO₄/Puffer B äquilibrierte Phenyl-Sepharose-Säule (HiPrep 16/10 Phenyl FF, low sub, 20 ml, Amersham Bioscience) gegeben. Das Waschen der Säule erfolgte mit 80 ml desselben Puffers (0,5 ml/min, 2 ml Fraktionen), die Elution anschließend mit 80 ml Puffer B (0,5 ml/min, 1 ml Fraktionen). Die Analyse der positiven Fraktionen wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2.5.4 Proteinverdau mit Faktor Xa

Zum Abtrennen des His-Tags rekombinanter Proteine wurde ein Verdau mit der Proteinase Faktor Xa nach Herstellerangaben durchgeführt (NEB). Dazu wurde das entsprechende Protein in den Restriktionspuffer (50 mM Tris, pH 8,0; 2 mM CaCl₂, 200 mM NaCl) dialysiert und mit Faktor Xa (1 : 50) für 18 h bei 25°C inkubiert.

2.5.5 Proteinbestimmung nach Bradford, 1976

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue bindet in ethanolhaltiger Phosphorsäure-Lösung an Proteine, wobei ein blauer Komplex entsteht. Da die Menge an gebundenem Farbstoff mit dem Gehalt an basischen Aminosäuren im Protein korreliert, ist eine Proteinbestimmung durch photometrische Messung (Uvikon Spectrometer 933, Kontron Instruments) bei 595 nm möglich (100 µl Proteinprobe in 1 ml Bradford-Lösung). Bei geringeren Proteinkonzentrationen wurde die OD₂₈₀ bestimmt. Als Referenzprotein diente jeweils Rinderserumalbumin.

2.5.6 SDS-Disk-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli *et al.* (1970) durchgeführt. Dazu wurde die Protein-Proben mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min denaturiert und 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen in einer vertikalen Kammer (Mighty Small II/SE 260, Höfer) bei 25 mA. Dabei wurden ein Sammelgel (5%) und ein Trenngel (12,5%) verwendet. Als Molekulargewichtsstandard dienten Marker im Molekulargewichtsbereich 10 – 250 kDa („Precision Plus Protein Standards“/Dual Color, Bio-Rad) und 10 – 150 kDa (Roti-Marker, Roth). Die anschließende Färbung der Proteine wurde mittels Coomassie-Blau-Färbung oder Silberfärbung durchgeführt.

2.5.7 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Bei der Coomassie-Färbung nach Jany *et al.* (1991) wurden die Polyacrylamidgele für 1 h in der Färbelösung inkubiert und bis zum Erhalt eines transparenten Hintergrundes entfärbt.

Die Silberfärbung (Lösungen siehe 2.1.4) erfolgte nach der Methode von Heukeshoven & Dernick, 1986. Die Polyacrylamidgele wurden für 15 min in Lösung 1 fixiert, dann 15 min in Lösung 2 inkubiert und nach 3 x Waschen mit dH₂O in Lösung 3 für 15 min gefärbt. Die Entwicklung der Gele erfolgte in Lösung 4 bis die Proteinbanden deutlich hervortraten und wurde dann durch Zugabe von Lösung 5 gestoppt.

2.5.8 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Eine Probe des zu analysierenden Proteins wurde aus dem SDS-Gel ausgestochen, über Nacht mit Trypsin verdaut („Montage In-Gel-DigestZP Kit“, Millipore), über eine C18 reverse Phasen-Matrix aufgereinigt und mit 60% ACN/0,1% TFA eluiert. Von dieser Peptidfragment-Lösung wurden 2,5 µl auf eine 378-Well, 400 µm Anchor-Platte (Bruker Daltonics) überführt, luftgetrocknet und in 1,5 µl Matrixlösung (gesättigte α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure in 50% ACN/0,1% TFA) aufgenommen. Die molekulare Masse der Peptidfragmente wurden anschließend mit MALDI-TOF („Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight“, Autoflex Mass Spectrometer von Bruker Daltonica, Bremen) analysiert. Die Messungen erfolgte dabei unter folgenden Einstellungen: Ionquelle 1: 19 kV, Ionquelle 2: 16,5 kV, Reflektor: 20 kV, Linse: 8 kV, Impuls-Extraktions-Zeit: 120 ns, Matrix Suppression < 500 Da. Die Analyse und Auswertung mittels Datenbank-Abgleich wurde von Priv.-Doz. Dr. Joachim Clos durchgeführt. Dabei wurde die Analysesoftware „Xmass“ (Bruker Daltonica) verwendet.

2.5.9 Western Blot-Analyse und Dot Blot-Analyse

Beim Semi Dry-Blotverfahren wurden die Proteine aus der SDS-PAGE in einer horizontalen Blotkammer (LKB Bromma 2117 Multiphor II, Firma Pharmacia) vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (PROTRAN BA-85, Schleicher & Schuell) transferiert. Dazu wurde das Gel vor dem Blotten kurz in Protein-Transferpuffer (siehe 2.1.4) äquilibriert. Das Polyacrylamidgel und die Nitro-

cellulosemembran wurden zwischen je 4 Lagen Whatmanpapier (getränkt in Protein-Transferpuffer) aufgebaut und für 1:15 h bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² geblottet.

Für die Dot Blot-Analyse wurde eine Dot Blot-Kammer (Bio-Rad) verwendet, mit der 50 – 500 µl der einzelnen FPLC-Fractionen punktförmig auf die Nitrocellulosemembran übertragen wurden. Anschließend erfolgte die Immundetektion.

2.5.10 Immundetektion transferierter Proteine

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Protein-Transfer für 1 h mit 3% BSA/PBS bei RT blockiert und anschließend für 1 h mit dem 1. Antikörper inkubiert. Nach 3 x Waschen mit PBS/0,05% TWEEN 20 wurde der Blot in der Lösung mit dem 2. Antikörper für 1 h geschwenkt und erneut 3 x mit PBS/0,05% TWEEN 20 und 1 x mit dH₂O für je 5 min gewaschen.

Die Detektion der immunmarkierten Proteine erfolgte bei alkalischer Phosphatase durch die Färbung des Blots mit frischer Färbelösung (66 µl von 50 mg/ml NBT, 33 µl von 50 mg/ml BCIP in 10 ml Substratpuffer), wobei die Reaktion nach dem Sichtbarwerden der Proteinbanden durch Stop-Puffer beendet wurde. Bei der Detektion mittels ECL wurde nach Herstellerangaben (Amersham) vorgegangen.

Verwendete Antikörper:

- selber hergestellte polyklonale AK gegen rekombinantes Protein:
Anti-EF-1 γ aus Kaninchen, 1:1000 (v/v) in 3% BSA/PBS
Anti-GSTO-1 aus Mäusen, 1:1000 (v/v) in 3% BSA/PBS
- Donkey Anti-Rabbit-IgG (H+L, alkalische-Phosphatase-konjugiert), Jackson Immuno-Research
- Goat Anti-Mouse-IgG (H+L)-HRP konjugiert, Bio-Rad
- Rabbit Anti-Mouse-IgG (alkalische-Phosphatase-konjugiert), Boehringer Mannheim

2.5.11 Enzymaktivitätstests

- GST-Aktivität: Durch das Enzym wird das Substrat CDNB mit reduziertem GSH zu einem gelblichen Komplex umgesetzt. Für die Bestimmung der GST-Enzymaktivität wurde diese Extinktionszunahme bei 340 nm im Abstand von 20 s über einen Zeitraum von 10 min am Photometer (Uvikon Spectrometer 933, Kontron) verfolgt.

Testansatz: 100 mM Na₂HPO₄ (pH 6,5), 1 mM GSH, 5 – 50 µg Enzym,
1 mM CDNB (in 80% Ethanol)

- Thioltransferase-Aktivität: Für den Thioltransferase-Test (Denton *et al.*, 2004) wird der Reaktionsansatz 10 min bei 30°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet. Die NADPH-Abnahme wird alle 20 s photometrisch bei 340 nm bestimmt. Für die Berechnung der spezifischen Aktivität bzw. der Km-Werte werden die ersten 2 min nach Reaktionsstart betrachtet.

Testansatz: 50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 1 mM GSH, 5 mM EDTA,
300 µM NADPH, 1 U GR, 750 µM HEDS, 5 – 50 µg Enzym

Reduktion von Proteindisulfiden (Moutiez *et al.*, 1997): 200 mM Na²⁺-Puffer, 8 mM GSH, 5 mM EDTA, 120 µM NADPH, 1 U GR, 15 µM Insulin bzw. Kollagen, 5 – 50 µg Enzym

- Dehydroascorbat-Reduktase-Aktivität: Bei dem DHAR-Test (Denton *et al.*, 2004) wird die Bildung von Ascorbinsäure durch Extinktionszunahme alle 20 s photometrisch bei 285 nm gemessen. Der Testansatz wird dazu ohne Enzym 10 min bei 30°C inkubiert und die Reaktion dann durch Enzymzugabe gestartet. Da die Reaktion sehr schnell abläuft, werden nur die ersten 100 s der Reaktion für die Aktivitätsberechnung verwendet.

Testansatz: 50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 2 mM GSH, 1,5 mM DHA,
5 – 50 µg Enzym

- Cumene-Hydroperoxid-Aktivität: Die Extinktionsabnahme wird alle 20 s bei 340 nm am Photometer bestimmt. Für die Aktivitätsberechnung wurden die ersten 2 min nach Reaktionsstart gewählt.

Testansatz: 50 mM KH₂PO₄, pH 7,5, 1 mM GSH, 4 U GR, 0,2 mM NADPH,
1 mM Cumene-Hydroperoxid, 5 – 50 µg Enzym

2.5.12 „Surface Plasmon Resonance“ (SPR) Messungen

Die „Surface Plasmon Resonance“ wurde erstmals von Kretschmann & Raether (1967) beschrieben und wird hier für die Messung von Protein-Protein-Interaktionen genutzt. Die Methode beruht auf der Reflexion monochromatischen Lichtes, das an der metallbeschichteten Grenzfläche zweier transparenter Stoffe auftritt. Die Intensität des reflektierten Lichtes wird bei einem bestimmten Einstrahlwinkel (SPR-Winkel) herabgesetzt, so dass ein Schatten im Emissionsspektrum hervorgerufen wird. Dieser SPR-Winkel hängt u.a. vom Brechungsindex des Stoffes an der nicht beleuchteten Seite ab, wodurch sich dort Konzentrationsänderungen messen lassen. SPR Messungen zur Bestimmung von Interaktionen zwischen rekombinantem CeEF-1 γ und CeEF-1 β wurden am Biacore 1000 nach Herstellerangaben (Biacore) bei 25°C durchgeführt. Die Messzelle (CM5-Sensorchip, Biacore) besteht aus einer Glasoberfläche, die mit einer Dextran behafteten Goldschicht überzogen ist und für die Messungen in vier Flusszellen unterteilt wird. Das Messsignal wird in Resonanz Units (RU; 1 RU = 1 pg/mm²) angegeben.

Nach der Aktivierung der Carboxylgruppen der Chipoberfläche mit EDC/NHS (1:1) wurde rekombinanter, aufgereinigter CeEF-1 γ in 1 mM Natriumacetat-Puffer, pH 4,0 für 8 min kovalent an die negative Matrix gekoppelt. Die Absättigung noch vorliegender, aktiver Carboxylgruppen erfolgte mit 1 M Ethanolamin, pH 8,5 durch 6 minütige Injektion. Alle Schritte der Immobilisierung des Liganden wurden bei einer Flussrate von 5 μ l/min vorgenommen. Die Chipoberfläche wurde mit 50 mM HCl und 100 mM HCl über das Wochenende gewaschen. Zur anschließenden Analyse der Interaktionen des Bindungspartners CeEF-1 β an den gekoppelten CeEF-1 γ , wurde CeEF-1 β in HBSEP-Puffer (20 mM Hepes, pH 7,4; 150 mM NaCl, 0,005% P20, Biacore) in einer 6 minütigen Assoziations- und 6 minütigen Dissoziationsphase über den Chip gegeben. Um verschiedene Konzentrationen von CeEF-1 β (0,05 μ g – 2,4 μ g) messen zu können, war es nötig, den Sensorchip nach jeder Messung zu regenerieren (3 x Waschen mit 1 mM NaOH). Als Kontrollen wurden zum einen dieselben CeEF-1 β -Proben über eine BSA-gekoppelte Chipoberfläche gegeben, zum anderen das Bindungsverhalten äquivalenter BSA Konzentrationen an die CeEF-1 γ -gekoppelte Chipoberfläche überprüft. Die unspezifische Bindung von CeEF-1 β an BSA wurde anschließend in der entsprechenden Konzentration von den Messwerten abgezogen.

2.5.13 „Hemmhoftest“

In dem „Hemmhoftest“ wurde die protektive Funktion von CeGSTO-1 in *E. coli* unter oxidativen Stress-Bedingungen untersucht. Dazu wurde das Expressionsplasmid aus pJC40 und dem Gen *cegsto-1* in kompetente BL21(DE3)-Zellen transformiert und 200 µl dieser ÜK mit 3 ml Top-Agar (50% LB-Medium, 50% LB-Agar, 0,5 mM AMP, 1 mM IPTG) auf LB-AMP-Agar-Platten ausgestrichen. Als Kontrollen dienten pJC40 alleine bzw. pJC40 mit *ceef-1 γ* in BR21(DE3). Nach dem Abkühlen wurden Filterscheiben auf den Top-Agar aufgelegt (\varnothing 0,8 mm), die mit 5 µl verschiedener 10 – 200 mM Giftlösungen (Paraquat, *tert*-Butyl-Hydroperoxid, Cumene-Hydroperoxid, Juglon) getränkt waren. Nach der Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht wurden die Hemmzonen um die Giftplättchen herum, in denen keine Bakterien gewachsen sind, ausgemessen. Um festzustellen, ob es sich um einen GSH-abhängigen Entgiftungsprozess handelt, wurde derselbe Versuch mit den GSH-defizienten Bakterien JTG10 in GSH-reduziertem Medium (90% Minimalmedium, 10% LB-AMP-Medium) durchgeführt. JTG10-Zellen sind mutierte *E. coli*, die keine intakte γ -Glutamylcystein-Synthetase besitzen und somit nicht in der Lage sind GSH zu synthetisieren.

2.5.14 Kristallisation der PfGST1 nach der Diffusionsmethode

Zur Kristallstrukturanalyse der PfGST1 wurde das Konstrukt aus PfGST1 und dem Vektor pJC20 (Liebau *et al.*, 2002) für 4 h/37°C in BR21(DE3)pLys-Zellen exprimiert, über GSH-Sepharose aufgereinigt sowie in einem GST-Aktivitätstest und mittels SDS-PAGE überprüft. Für den Kristallisationsansatz wurde das Protein für eine Stunde gegen Tris/HCl, pH 8,5 dialysiert (Dialysekassette Slide-A-Lyzer, Pierce) und auf 7 mg/ml konzentriert (Centricon, Millipore). Nach Filtration des Proteins mittels Ultrafree-MC Säulchen nach Herstellerangaben (Millipore) wurde es durch „dynamic light scattering“ (DLS) im Spectroscatter 201 (RiNA GmbH) auf seine Monodispersität überprüft.

Die Kristallisation erfolgte nach der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen (McPherson, 1982). Dabei wurden die ersten Screens mit den Kristallisationskits „Crystal Screen I“ von Hampton Research durchgeführt (Jancarik & Kim, 1991, Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA) und die darauf folgenden Großansätze mit dem optimierten Puffer von 100 mM Cacodylat-Puffer, pH 6,0, 2 mM GSH, 2,1 M (NH₄)₂SO₄ als Reservoirlösung durchgeführt. Für den

Kristallisationsansatz wurde eine VDX 24-Well Platte (HR3-140, Hampton Research) mit Silikon (Bayer) umrandet und 1000 μl Reservoirlösung pro Well vorgelegt. Die Kristallisation erfolgte im 4 μl Kristallisationstropfen (2 μl Proteinlösung + 2 μl Reservoirlösung) auf einem silikonisierten Deckgläschen (Hampton Research). Dabei wurde das Well so mit dem Deckgläschen verschlossen, dass der Kristallisationstropfen über der Reservoirlösung hing. Während der 3-tägigen Inkubationszeit bei RT diffundierte Flüssigkeit aus dem hängenden Tropfen in die Mutterlösung, so dass sich das Protein im Tropfen anreicherte und kristallisierte.

2.5.15 Vermessung und Strukturanalyse der PfGST1-Kristalle

Zur Analyse der Brechungsdaten wurde ein nativer Kristall in eine Glaskapillare ($\varnothing = 0,7 \text{ mm}$) überführt und an der Drehanode (Rigaku RU-200, Cu $K\alpha$ -Strahlung, 50 kV, 100 mA) am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) bei RT vermessen. Dabei lenken die Elektronen der Atome die Röntgenstrahlung so ab, dass ein spezifisches Ablenkungsmuster auf dem Detektorschirm (MAR Research, 300 mm) dargestellt wird. Der Abstand des Kristalls zum Detektor betrug dabei 150 mm und der Vermessungswinkel 120° bei einer Drehgeschwindigkeit von $\Delta\varphi = 1^\circ$ pro 20 min. Aus den dazugehörigen Brechungsdaten konnten mit Hilfe der Programme DENZO und SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) erste Strukturdaten gewonnen werden. Die Entschlüsselung der kompletten Proteinstruktur und die Analyse von Bindungsstellen erfolgte mit der Methode des isomorphen Ersatzes durch Schweratomderivate. Dazu wurden die Kristalle in Quecksilber- (Ethylquecksilberphosphat) bzw. Platinlösung (Kalium-Tetracyanoplatin) für 8 Stunden inkubiert und anschließend vermessen. Die Strukturanalysen wurde von Dr. M. Perbandt, DESY unter zu Hilfenahme verschiedener Computerprogramme durchgeführt (Perbandt *et al.*, 2004).

2.5.16 Ko-Kristallisation von PfGST1 mit S-Hexyl-GSH (Inhibitor)

Zur Einbindung des Inhibitors S-Hexyl-GSH in die PfGST1-Kristalle wurden die nativen Kristalle 16 Stunden in Reservoirlösung mit 5 mM S-Hexyl-GSH inkubiert, kurz in eine Reservoirlösung mit 20% Glycerol überführt und anschließend bei -173°C am Synchrotron (Beamline X13, HASYLAB, DESY) vermessen.

2.6 *C. elegans*-Methoden

2.6.1 *C. elegans*-Kultivierung

Der *C. elegans*-Stamm WT (Bristol N2) sowie transgene Wurmlinien wurden auf NGM-Agarplatten, für Großansätze in NGM-Flüssigkultur bzw. für bakterienfreie Zucht in axenischer Kultur bei 25°C gehalten. Der für Transfektionsversuche verwendete Stamm pha-1 wurde bei 15°C auf NGM-Platten kultiviert.

Als „Futter“-Bakterien für *C. elegans* diente der *E. coli* Stamm OP 50. Eine ÜK dieser Bakterien wurde durch Zentrifugation konzentriert und auf die NGM-Platten bzw. zu dem NGM-Medium gegeben. Für die Unterbindung von Pilzbefall wurde den NGM-Platten/NGM-Medium ggf. Nystatin (1:100) zugesetzt.

Für die bakterienfreie Kultivierung wurden *C. elegans* mit 40% Chlorox, 5% 10 N NaOH für 7 min axenisiert, 3 x mit sterilem M9-Puffer gewaschen und am nächsten Tag in 25 ml axenischem Medium/Sterilkolben überführt.

2.6.2 Langzeit-Lagerung von *C. elegans*

Zum Einfrieren der Nematoden wurden diese von der NGM-Platte mit 1,5 ml M9-Puffer abgespült, im gleichen Verhältnis mit „Freezing Solution“ gemischt und in Cryo-Gefäße aliquotiert. Die Ansätze wurden bei -70°C in einer Styroporbox langsam heruntergekühlt und nach einem Tag in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei Bedarf wurden die Proben bei RT aufgetaut und auf NGM-Agar-Platten gegeben.

2.6.3 Aufreinigung der Nematoden über einen Sucrose-Gradienten

Die *C. elegans* der NGM-Flüssigkultur wurde von Bakterien getrennt, indem die Kultur auf 4°C gekühlt und für 10 min bei 1.200 rpm/4°C zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde einmal mit 50 ml 0,1 M NaCl gewaschen, anschließend mit 7 ml 0,1 M NaCl/7 ml 60% Sucrose gemischt und der Gradient für 5 min bei 2.000 rpm/4°C zentrifugiert. Die in einem Ring angesammelten Würmer wurden abgenommen und 2 x mit 50 ml 0,1 M NaCl gewaschen.

2.6.4 „Bleaching“

Durch „Bleaching“ werden die adulten Würmer getötet und dabei ihre widerstandsfähigen Eier freigesetzt. Es diente dem Synchronisieren einer *C. elegans*-Kultur bzw. dem Eliminieren von hartnäckigem Pilzbefall. Dazu wurden 5 µl „Bleaching“-Lösung (12% NaOCl, 2 N NaOH im Verhältnis 1:1) auf eine kleine NGM-Platte (Ø 35 mm) mit den „Futter“-Bakterien OP50 gegeben, 10 adulte Würmer mit Hilfe einer Wimper hineingelegt und bei RT inkubiert.

2.6.5 Klonierung von Konstrukten für die Mikroinjektion in *C. elegans*

Für die Überexpression von *cegsto-1* bzw. *ceef-1γ* mit dem konstitutiven *let-858* Promotor in *C. elegans* wurde die gesamte cDNA des jeweiligen Gens in den Vektor pPD103.05 kloniert. Die Überexpression mit eigenem Promotor erfolgte mittels Ligation der entsprechenden gDNA mit Promotorbereich in den Vektor pPD49.26. Für die Aufreinigung der Proteine mittels Tag wurden die Sense-Primer so hergestellt, dass ein N-terminaler His- bzw. Strep-Tag die Proteine markiert.

Für die GFP-Reportergenexpression wurde der Promotorbereich des Gens in den Vektor pPD95.77 so kloniert, dass der offene Leserahmen des GFPs erhalten blieb. Dieses Konstrukt diente als Template für die Analyse des Minimalpromotors, hierbei wurde der Promotorbereich mittels PCR und anschließender Religation gezielt verkleinert. Die Mutagenese der GATA-Box (GGATAA) von *cegsto-1* zu der *BamH* I-Schnittstelle (GGATCC) erfolgte ebenfalls mittels PCR auf diesem Template. Dabei wurde Pfu-Polymerase verwendet sowie zwei Oligonukleotide, die statt der GATA-Box *BamH* I-Schnittstellen trugen, so dass sich der Plasmidring durch *BamH* I-Verdau mit darauf folgender Religation wieder schließen ließ. Alle DNA-Konstrukte wurden mittels Sequenzierung kontrolliert und die, durch Mikroinjektion erstellten transgene *C. elegans* durch „Single-Worm“-PCR überprüft. Daraufhin wurden die transgenen Wurmlinien in axenischer Kultur vermehrt und für Phänotypanalysen, Stressversuche bzw. nach Homogenisierung für die Proteinaufreinigung, SDS-PAGE und Western Blot-Analyse eingesetzt.

2.6.6 C. elegans-Mikroinjektion

Die Mikroinjektion (nach Mello & Fire, 1995) der DNA-Konstrukte erfolgte mit einer Glaspipette (\varnothing 0,1 – 0,5 μm , Femtotips I, Eppendorf) in die Gonaden von L4-Larven der *C. elegans* pha-1-Mutanten (genetischer Knock-out des pha-1-Gens, das einen Transkriptionsfaktor codiert, der die normale Entwicklung des Pharynx steuert). Nur bei 15°C sind die Mutanten in der Lage einen funktionsfähigen Pharynx auszubilden (Granato *et al.*, 1994). Nach Coinjektion des DNA-Konstrukts und des Markerplasmids pBX, das das dominante pha-1-Gen trägt (DNA-Konzentration jeweils 80 ng/ μl) werden die Würmer bei 25°C kultiviert. Da die Folgegeneration bei erfolgreicher Injektion Träger des Markerplasmids und DNA-Konstrukts ist, sind diese Tiere auch bei 25°C lebensfähig.

2.6.7 „Single-Worm“-PCR

Eine „Single-Worm“-PCR (nach Jansen *et al.*, 1997) wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob nach einer Mikroinjektion das DNA-Konstrukt in die Zellen von *C. elegans* aufgenommen worden ist und somit die nachfolgenden Generationen transgen sind. Dazu wurden 2,5 μl Lysis-Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,2, 2,5 mM MgCl_2 , 0,45% NP 40, 0,45% Tween, 0,01% Gelatine, 1% von 10 mg/ml Proteinase K) mit einem Wurm einer Wurmlinie für 20 min auf Trockeneis inkubiert, 1 h bei 60°C lysiert und die Proteinase für 15 min bei 95°C inaktiviert. Es folgte eine PCR mit einem genspezifischen AS-Primer und einem vektorspezifischen S-Primer unter Verwendung von PCR-Supermix.

2.6.8 Fixierung der Würmer für photographische Aufnahmen

Für photographische Aufnahmen wurden Wurmulturen mit M9-Puffer von NGM-Platten abgeschwemmt bzw. der Flüssigkultur entnommen und im gleichen Verhältnis mit 1 M Natriumazid vermischt. Nach 5 – 10 min/4°C waren die Würmer bewegungslos und konnten durch Zentrifugation (5 min/2.000 rpm) eingeeengt werden. Ein Tropfen dieser Nematoden-Lösung wurde auf einen Objektträger überführt und ein Deckglas aufgelegt. Die Aufnahmen erfolgten dann bei 200-facher bzw. 400-facher Vergrößerung am Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DMLS, FITC-Filter).

2.6.9 „RNA-Interferenz“ (RNAi) durch „Futter“-Bakterien HT115

Die Methode der „RNA-Interferenz“ dient der posttranskriptionellen Blockierung der Genexpression für das jeweilige von der RNA codierte Protein in *C. elegans* (Carthew, 2001). Dazu werden 200 bp bis 400 bp des 5'-Bereichs des zu untersuchenden Gens zwischen die zwei T7-Promotoren des Vektors pPD129.36 kloniert und in HT115-Zellen (*E. coli*) transformiert.

Für diese Klonierung wurden 400 bp der cDNA von *cegsto-1* bzw. 350 bp des Transkriptionsfaktors *elt-2* bzw. die gesamten 219 bp des Gens *elt-4* in einer PCR amplifiziert. Eine positive Bakterienkolonie wurde dann als ÜK bei 37°C im LB-AMP-TET-Medium (50 mg/ml AMP, 12,5 mg/ml TET) hochgezogen, 1:100 in demselben Medium verdünnt und bei einer $OD_{650} = 0,5$ die Expression der RNAi mit 0,8 mM IPTG für 4 h induziert. Nach dem Einengen dieser Expressionskultur bis auf wenige ml durch Zentrifugation bei 4.000 rpm für 5 min, wurden 2 Tropfen davon auf eine NGM-AMP-TET-IPTG-Platte (\varnothing 35 mm, 50 mg/ml AMP, 12,5 mg/ml TET, 1 mM IPTG) gegeben. Nach dem Eintrocknen der Bakterien konnten aufgereinigte *C. elegans* auf die Platte gesetzt werden, die die RNAi durch das Fressen der „Futter“-Bakterien aufnahmen. Die Inkubation der Platten erfolgte dann bei 25°C für die Dauer von drei Tagen. Als Positivkontrolle diente ein Plasmidkonstrukt mit cDNA von DuoX („Dual Oxidase“, für die Kollagenvernetzung der Cuticula durch Di- und Tryptosine) in pPD129.36. Als Negativkontrolle wurde der Vektor pPD129.36 ohne Insert bzw. *C. elegans*-WT verwendet.

2.6.10 Stressversuche

Um die Entgiftungsfunktion von CeGSTO-1 in *C. elegans* zu analysieren, wurden Stressversuche mit RNAi-Würmern (*cegsto-1::pPD129.36*) und Überexpressionswürmern (*cegsto-1::pPD103.05*) im Vergleich zu WT-Würmern durchgeführt. In Stresstests auf NGM-Platten bzw. in Flüssigkultur wurde dabei ermittelt, wie lange die *C. elegans* unter Einfluss von oxidativem Stress lebensfähig sind.

Bei Stressversuchen auf NGM-Platten wurde der NGM-Agar mit dem jeweiligen Stressor versetzt und die Platten (\varnothing 35 mm) frisch gegossen. In drei unabhängigen Versuchen pro Stressor (4 mM Cumene-Hydroperoxid, 50 mM Paraquat, 0,05 mM Juglon 4,5 mM Arsen) wurden je 150 Würmer, verteilt auf zehn NGM-Platten, für

16 h bei 25°C inkubiert. Die Stressversuche in Flüssigkultur wurden für bis zu 5 h in 96-Well-Platte mit 5 mM Cumene-Hydroperoxid in M9-Puffer durchgeführt.

Für eine Bewertung der Stressinduzierbarkeit des *cegsto-1*-Promotors wurden transgene, axenische Würmer (mit *cegsto-1*-Promotor::Reportergenkonstrukt) für 3 h mit 4 mM Cumene-Hydroperoxid bzw. 5 mM *tert*-Butyl-Hydroperoxid in Petrischalen inkubiert und die Intensität des GFP-Signals unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Ein Vergleich der RNA-Menge von CeGSTO-1 in gestressten und ungestressten *C. elegans* wurde anschließend in einem Northern Blot mit α -[³²P]-dATP markierter GFP-DNA-Sonde vorgenommen.

2.6.11 Bestimmung von Lebensdauer und Nachkommenzahlen

Die Bestimmung der Lebensdauer und der Nachkommenzahl wurde im Rahmen der Phänotypanalyse bei den RNAi- und Überexpressionswürmern der CeGSTO-1 durchgeführt. Als Kontrolle dienten Würmer, die nur Vektor enthielten bzw. WT-Würmer. Hierzu wurden in drei unabhängigen Versuchen pro Wurmlinie 15 kleine NGM-Platten (\varnothing 35 mm) mit jeweils einer L2-Larve bestückt und die Tiere während ihrer reproduktiven Phase täglich auf frische Platten umgesetzt. Die NGM-Platten enthielten als „Futter“-Bakterien OP50 bzw. bei den RNAi-Versuchen entsprechende HT115. Die Nachkommenzahl wurde durch Zählen unter dem Mikroskop bestimmt.

2.6.12 Immunhistologische Färbung von *C. elegans*

Nach der Fixierung der axenischen *C. elegans* für 48 h in 4% Formalin wurden sie mit Hilfe eines Einbettungsgerätes (Tissue-Tek Consolen, Miles Scientific) in Paraffin eingelegt. Am Mikrotom (1150 Autocut, Reichert-Jung) wurden bei -20°C 4 μ m dünne Schnitte hergestellt, in kaltem H₂O voneinander getrennt, in 40°C H₂O gestreckt und auf Poly-L-Lysin (Sigma) behandelte Objektträger überführt. Nach dem Trocknen der Schnitte bei 40°C über Nacht wurden sie durch Waschen mit 4 x 5 min Roti-Histol, 2 x 10 min Xylol, 2 x 3 min 100% Ethanol, 2 x 3 min 95% Ethanol entparaffiniert und rehydriert. Nach einem 5 min Waschschrift mit TBS-Puffer, 30 min Inkubation in 1% NH₄Cl₂, nochmaligem Waschen mit TBS und 15 min Behandlung mit 50 mM Glycin erfolgte die Immunfärbung der Schnitte.

Die Immunreaktion und die Färbung wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach Inkubation der Schnitte für 30 min mit 10% BSA/TBS und weiteren

5 min in 0,1% BSA/TBS wurden 100 µl des primären Antiserums (verdünnt in 0,1% BSA) für 60 min auf dem Schnitt inkubiert. Jeweils von TBS-Waschschritten getrennt wurde 30 min mit Mouse Anti-Rabbit (DAKO Diagnostika GmbH), 30 min mit Rabbit Anti-Mouse (DAKO Diagnostika GmbH) und 30 min in Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase-Komplex (APAAP Mouse, monoclonal, DAKO Diagnostika GmbH) bei RT inkubiert. Die Färbung erfolgte anschließend für 15 min mit frisch angesetzter Substrat-Chromogen-Gebrauchslösung (9,8 ml 100 mM Tris/HCl, pH 8,2, 0,2 ml DMFA, 2 mg Naphtholphosphat, 10 mg Fast Red). Nach 5 min Waschen mit TBS-Puffer wurde die Gegenfärbung für 10 min mit Hämalun (1 g Hämatoxylin, 1 l H₂O, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Kalialun, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure) durchgeführt und die Schnitte anschließend 20 min unter fließend Wasser gespült. Die Deckgläser wurden unter Verwendung von 2 Tropfen Aquatex aufgelegt.

2.6.13 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde am Bernhard-Nocht-Institut von Frau Schmetz durchgeführt. Dabei wurde zuerst die Fixierung der axenischen *C. elegans*-WT mit 2% Paraformaldehyd + 2,5% Glutaraldehyd/100 mM Natriumcacodylatpuffer pH 7,2 (nach Karnovsky, 1965) für 1 h bei RT vorgenommen. Nach dem Waschen mit Natriumcacodylat-Puffer, der Stabilisierung in Agar und der Dehydratation mittels ansteigender Ethanolreihe wurden die Agarstücke mit den Würmern in einer Gelatine-Kapsel überführt und in LR-White eingebettet. Nach der Polymerisierung des Kunstharzes (3 Tage/4°C) wurden Ultradünnschnitte (70 nm) am Ultramikrotom (Ultracut, Reichert) angefertigt. Diese Ultradünnschnitte wurden mit dem 1. Antikörper (Mouse Anti-CeGSTO-1, Herstellung vgl. 3.3.3, Verdünnung 1:1000 in PBS/2% BSA) für 1 Std/37°C und anschliessend über Nacht/4°C inkubiert und nach dem Waschen der Schnitte mit dem 2. Antikörper (Rabbit Anti-Mouse, DAKO Diagnostik, Verdünnung 1:1000 in PBS/2% BSA) für 1 h bei RT versetzt. Die Kontrastierung der Schnitte erfolgte dann mit 2% Uranylacetatlösung für 2 – 5 min unter Lichtausschluss und die darauf folgende Färbung mit Bleicitrat nach Reynolds (1963). Dabei wurde Protein-A-Gold der Partikelgröße Ø 10 nm verwendet. Die fotografischen Aufnahmen wurden anschließend am Transmissions-Elektronenmikroskop (CM-10, Philips) vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Sequenzanalyse des Gens *cegsto-1* und des Proteins CeGSTO-1

3.1.1 Lokalisation von *cegsto-1* im Genom

Im Genom von *C. elegans* konnte mit Hilfe der Datenbanken „Wormbase“ (<http://www.wormbase.org>) und „NCBI“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) das Gen der CeGSTO-1 (*cegsto-1*, Cosmidnummer C29E4.7) identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass *cegsto-1* auf dem (-)-Strang des Chromosoms 3 zwischen 7.945.519 bp und 7.946.942 bp liegt. Die genomische DNA (1.424 bp) teilt sich in 4 Exons und in 3 Introns (vgl. Abb. 3.1.1), wobei die 4 Exons die 250 Aminosäuren des 28,5 kDa Proteins (Genbank-Nr. AAA27959/NM_066327, PI = 5,19) codieren. Die Größe der cDNA von *cegsto-1* beträgt dabei 753 bp.

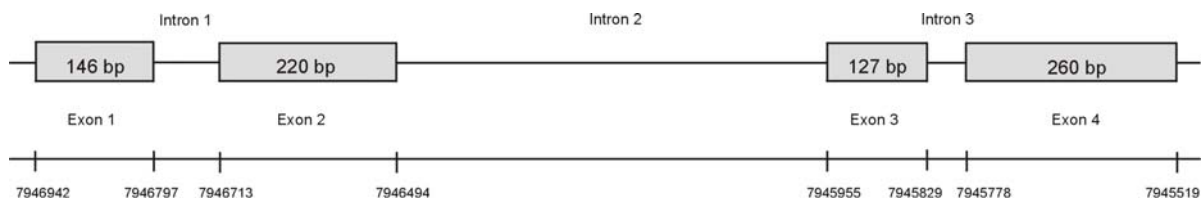


Abb. 3.1.1: Struktur von *cegsto-1* und seine Lage auf dem Chromosom 3

Die vier Exons von *cegsto-1* sind als graue Kästen dargestellt; die Skala darunter gibt ihre Lage auf dem Chromosom 3 an.

3.1.2 Nukleotidsequenz von *cegsto-1*

Die cDNA von *cegsto-1* wurde mit verschiedenen S- und AS-Primern sequenziert. Die Sequenzierung ergab keine Abweichung zu den in den Datenbanken „Wormbase“ und „NCBI Sequence Viewer“ angegebenen Sequenzen. In der 3'-flankierenden Region konnte 33 bp hinter dem Stopcodon eine potentielle Polyadenylierungsstelle (aataaa) identifiziert werden. Ein Signalpeptid ist bei der *cegsto-1* nicht vorhanden.

M V L T G V T S K A I R K G D A E	17
ATG GTT TTA ACC GGA GTA ACA TCA AAA GCA ATT CGA AAA GGA GAT GCG GAA	51
P P L S K G S F R V Y N M R F C P	34
CCT CCG CTA TCA AAG GGA TCT TTT CGT GTC TAC AAC ATG AGA TTC TGT CCA	102
W A E R A M L Y V A A K G I E	49
TGG GCT GAA AGA GCA ATG CTT TAT GTT GCA GCT AAA GGA ATT <i>GAgtgagtagt</i>	155
ttattttattttattagtttctaaaaatagacatatgaaaagtacttttttaagaaaaaaaccattgaa	222
A E V V N L N V T D K L E W Y	64
ttttcagAGCG GAG GTA GTC AAT CTC AAC GTA ACT GAC AAA CTT GAA TGG TAC	275
W T K H Y Q G K A P A V E H N G K	81
TGG ACA AAA CAT TAT CAG GGA AAG GCT CCA GCA GTA GAG CAC AAT GGA AAA	326
V V I E S G F I P E Y L D D A F P	98
GTG GTC ATT GAG TCT GGA TTT ATT CCT GAA TAT TTG GAT GAT GCA TTT CCA	377
E T R I L P T D P Y E K V Q Q K L	115
GAA ACT CGT ATT CTT CCA ACT GAC CCG TAC GAA AAG GTG CAA CAA AAG CTG	428
L A D R L T A	122
CTA GCG GAC AGG TTA ACT GCGgtttggttttattttgtttttcaaaagaaataaaaaagtgt	489
tatatataaaaaacaataaacatgggttaagactaatgcaatggcaattatttaccattagtttcctt	556
ctatcctaattttggaagtcgtccaaaaaatgattgttttatcagagttctaaatttcactttccga	623
aatgctcgaatataactaaaagcacattattcgaatttgccaatttaccagaactttaactaaaact	690
tttaaaataaaaaaaaaaagatctgcacgtctctacagttgttttgaaggcgcagcgataccaatacct	757
ttaaaaatggaaggaacatacatagttttctaattcccctttttgaaacttctctaatataaaaaatc	824
agttattcgcctccgccatttttcaaccaatcagatgagtggttgaggagccaaaactctgattgggt	891
tgagagtgggcgctggctatttcattttggaggaaattcaaatatgatcttgaatttttctattttcta	958
V A H A V P L L F	131
aactattttgttttaataagcaattcagGTA GCC CAT GCA GTT CCA TTG CTC TTC	1014
A V M R D R T L K D E K Q R K V F	148
GCC GTC ATG CGA GAC CGA ACT TTG AAA GAT GAA AAG CAG CGA AAA GTT TTT	1065
E V L K Q A E N L L A N D F Y A	164
GAA GTT TTG AAA CAA GCT GAA AAT CTC TTG GCC AAT GAT TTT TAT GCT <i>Ggt</i>	1116
G S Q P G	169
gagttcaattaatcgatacaattttttgaccaaatcaaaactattcagGA TCT CAA CCA GGT	1178
Y P D Y L S F P F F E K I W W S A	186
TAT CCA GAC TAC TTA TCA TTT CCA TTT TTT GAG AAA ATT TGG TGG TCA GCT	1229
S L D G V V D L P T I E F P G E E	203
AGT TTG GAT GGA GTT GTC GAT TTA CCA ACA ATT GAA TTC CCA GGA GAA GAA	1280
E Y P K L T K W F Q K M I S S D V	220
GAA TAT CCT AAA TTG ACA AAA TGG TTC CAG AAA ATG ATT TCT TCA GAT GTT	1331
V Q S V T Q S L E H G A A F M N A	237
GTT CAA TCC GTC ACC CAA TCT TTG GAA CAT GGC GCT GCA TTC ATG AAC GCA	1382
Y A T H Q E L N Y D L G L #	250
TAT GCC ACG CAC CAG GAA TTG AAT TAT GAT TTG GGC CTT TGA tatttaaaccag	1435
tcgatttttttttaagattg aat aaaaaatgaaggacgtaattaaaaaacaatcaaagaaatagtgg	1502

Abb. 3.1.2: Nukleotidsequenz von *cegsto-1*

Start- und Stopcodon sind fett, Introns mit Kleinbuchstaben dargestellt und eine potentielle Polyadenylierungsstelle (*aataaa*) ist fett-kursiv gekennzeichnet. Im Einbuchstaben-Code sind die abgeleiteten Aminosäuren über der Nukleotidsequenz angegeben.

Die Exons und Introns von *cegsto-1* wurden analysiert und sind mit ihrer Länge und den dazugehörigen Exon-/Intron-Grenzen in Tab. 3.1.2 aufgeführt. Die Exon-/Intron-Grenzen sind nach der 5'-gt – ag-3'-Regel konserviert.

Nr.	Exon Größe (bp)	Exon-/Intron-Grenze		Intron Größe (bp)
		5'-Donorsequenz	3'-Akzeptorsequenz	
1.	146		ATGGTTTTTA	
2.	220	AGGAATTGA	<i>gtgagtag</i> - <i>attttcag</i>	AGCGGAGGT 83
3.	127	TTAACTGCG	<i>gtttggtt</i> - <i>caattcag</i>	GTAGCCCAT 538
4.	260	TTTATGCTG GGCCTTTGA	<i>gtgagttc</i> - <i>ctattcag</i>	ATCTCAACC 50

Tab. 3.1.2: Länge der Exons und Introns und die Exon-/Intron-Grenzen von *cegsto-1*.

Introns sind durch Kleinbuchstaben und die Exon-/Intronübergänge sind kursiv dargestellt.

Mittels PCR-Analyse wurde überprüft, ob *cegsto-1* Spleißleitsequenzen (SL) besitzt. PCRs mit den Oligonukleotidprimern der bekannten Sequenzen SL1 und SL2 (Krause & Hirsh, 1987) blieben negativ, so dass davon auszugehen ist, dass das Transkript von *cegsto-1* keine SL besitzt.

3.1.3 Alignment der CeGSTO-1 mit Omega GSTs anderer Organismen

Ein Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenz der CeGSTO-1 mit den Sequenzen von Omega-GSTs anderer Organismen zeigt hohe Homologien. Die höchste Aminosäureidentität besitzt CeGSTO-1 mit der CbGSTO-1 des nächsten Verwandten *Caenorhabditis briggsae*. Hierbei zeigt sich, dass die *cbgsto-1* zwar sehr viel größere Introns aufweist als *cegsto-1* (Intron 1: 1263 bp statt 83 bp, Intron 2: 1014 bp statt 538 bp, Intron 3: 225 bp statt 50 bp) aber eine hohe Sequenzidentität von 72% auf cDNA-Ebene und 81% auf Aminosäureebene besitzt (Alignment nicht gezeigt). Eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von 26% bzw. 34% wurde zu dem parasitischen Nematoden *O. volvulus* (OvGST3) und dem Menschen (*HsGSTO1-1*) festgestellt und in einem Alignment dargestellt (vgl. Abb 3.1.3). Konservierte Aminosäurereste, die bei allen drei Organismen übereinstimmen, sind in der Abb. 3.1.3 schwarz hinterlegt und homologe mit grauem Hintergrund hervorgehoben. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass Aminosäurereste der GSH-Bindungsstelle (mit einem Stern markiert) konserviert ist.

CeGSTO	1	-----MVLTVTSKAIRK	GDAEP	PLSKGSFRVY	NM
OvGST3	1	MFGSLLILCFSFADIATAISLNQFMSRFPQQ	GNKKQKQDL	STEYPEP	SSNSVRIYSL
HsGSTO	1	-----MSGESARSLGK	GSAPP	PGVPEGS	IRIYISM
Hs1eem	30				BBBBBB
					+
CeGSTO	31	RFCPWAERAMLYVAAKGL	EAEVNVN	LNVDKLEWY	WTKHYQ
OvGST3	60	PFCPYGESVILAAAYKKGI	QFDIGY	INHPYQMNWFLAKN	PEGALPSVEHN
HsGSTO	30	RFCPFABERTRVLKAKGIR	HEVIN	INLNKNKPEW	FFKKNPFGLV
Hs1eem	30	HHHHHHHHHHHHH	BBBBB	HHHHHHH	BBBBBB
					+
CeGSTO	90	PEYLDDAEP	PETRI	LPTDPY	EKVQQ
OvGST3	119	MEYLDDV	SENSI	LPDEPY	LRAKQR
HsGSTO	90	CEYLDEA	YPGKK	LDPDPEY	EKACQ
Hs1eem	90	HHHHHHHH		HHHHHHHHHHHHHHHHHH	---
					+
CeGSTO	145	RKVFEV	LKQ	AENLLAN	DFFYA
OvGST3	170	TMLTMB	ELTE	AEQMLE	SPFYS
HsGSTO	147	RKEFTK	LEE	VLTNK	KTTF
Hs1eem	147	HHHHHHHHH	◆	HHHHH	
					+
CeGSTO	203	EEYPK	LTKWF	QKMISS	DVVS
OvGST3	225	DHF	PKLSE	WFTRM	QTLREI
HsGSTO	195	-HTPK	LKLWM	AAMKED	PTVS
Hs1eem	195	HHHHHHHHHHH	HHHHH	HHH	---
					+
CeGSTO	203	EEYPK	LTKWF	QKMISS	DVVS
OvGST3	225	DHF	PKLSE	WFTRM	QTLREI
HsGSTO	195	-HTPK	LKLWM	AAMKED	PTVS
Hs1eem	195	HHHHHHHHHHH	HHHHH	HHH	---

Abb. 3.1.3: Alignment von CeGSTO-1 mit der humanen GSTO1-1 und der *O. volvulus* GST3

Identische Aminosäurereste aller drei Sequenzen sind schwarz hinterlegt (26% Identität zu OvGST3, 34% zu HsGSTO1-1), ähnliche Aminosäurereste sind grau hinterlegt. Mit einem Stern (*) sind die Aminosäurereste gekennzeichnet, die bei der HsGSTO bei einer GSH-Bindung direkt mit dem GSH in Kontakt stehen, mit einer Kreuz (+) die Reste, die eine GSH-Bindung mit beeinflussen (Board *et al.*, 2000). Eine Raute (◆) markiert die Stellen der Sequenz, an denen jeweils ein Intron inseriert ist (Whitbread *et al.*, 2003). Die Lage der α -Helices (H) und der β -Faltblätter (B) in der humanen Omega-GST (Kristallstruktur 1eem, Board *et al.*, 2000) sind unter der Sequenz eingetragen.

3.1.4 Phylogenetische Untersuchungen von CeGSTO-1

Um festzustellen, ob die CeGSTO-1 tatsächlich zu der Omega-Klasse der GSTs gehört, wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt. Dazu wurde ein multiples Alignment der Aminosäuresequenzen von GSTs verschiedener Klassen und Organismen erstellt (Programm ClustalX 1.8). Unter Zuhilfenahme der Sekundärstruktur von humanen GSTs der Klassen μ (1HNA), ω (1EEM), π (1GTI), θ (2LJR), ζ (1FW1) wurde das Alignment optimiert (Programm Bioedit) und ein Stammbaum erstellt (Programm MEGA 2.1, Methode „Minimal Evolution“). Der phylogenetische Vergleich zeigt die Gruppierung der GSTs innerhalb der verschiedenen Klassen aufgrund ihrer evolutionären Verwandtschaft und bestätigt die Zugehörigkeit der CeGSTO-1 zu der Omega-Klasse. Außerdem verdeutlicht der Stammbaum die enge Verwandtschaft der CeGSTO-1 zu der Omega-GST des parasitischen Nematoden *O. volvulus* (vgl. Abb. 3.1.4).

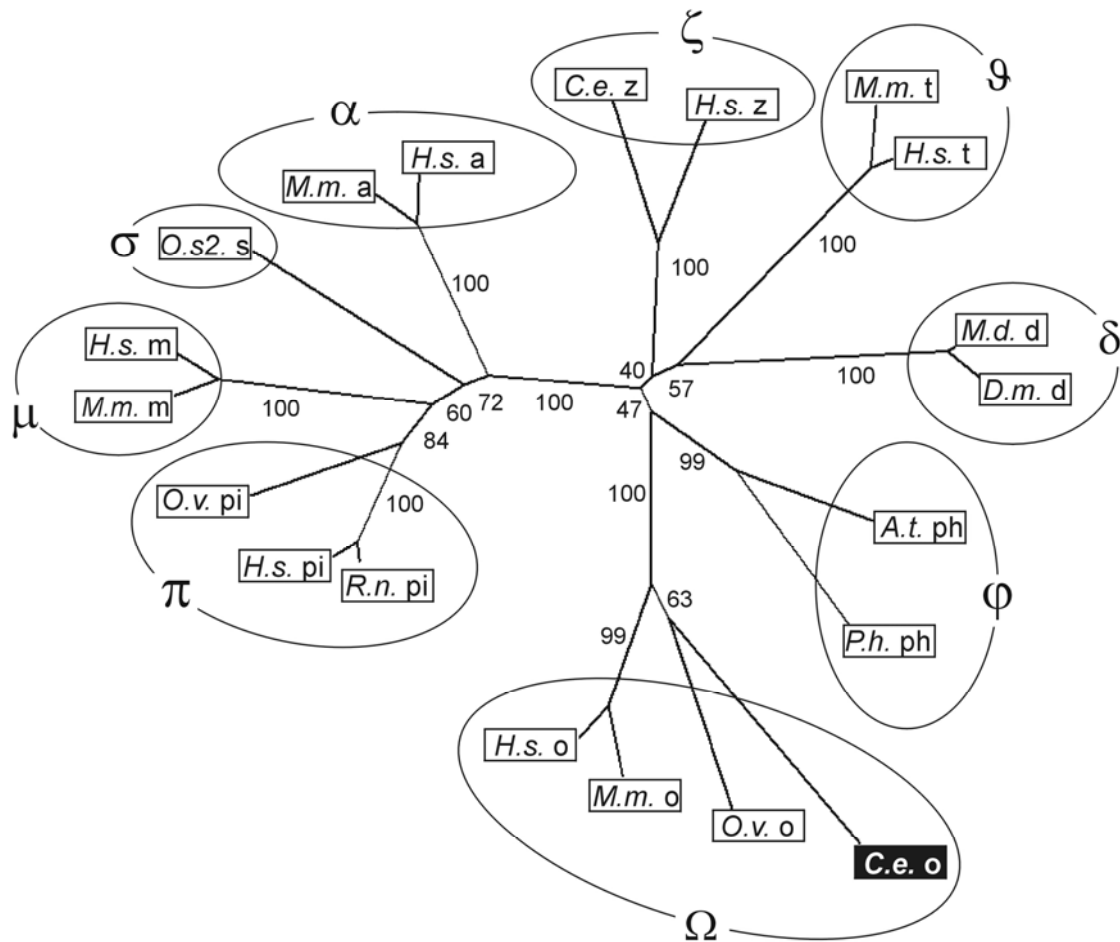


Abb. 3.1.4: Phylogenetische Analyse der CeGSTO-1 und GSTs anderer Klassen/Organismen

Die CeGSTO-1 wurde phylogenetisch mit GSTs verschiedener Klassen und Organismen analysiert. Sie ist in dem radiären Stammbaum durch einen schwarzen Hintergrund hervorgehoben. Die Länge des Äste stellt die Wahrscheinlichkeit der evolutionären Veränderung dar, die „bootstrap“-Zahlen an den Verzweigungen geben Auskunft über die Zuverlässigkeit des Stammbaums an dieser Stelle.

Klassen: Alpha (a), Delta (d), Mu (m), Omega (o), Phi (ph), Pi (pi), Sigma (s), Theta (t), Zeta (z);
Organismen: *Arabidopsis thaliana* (A.t.ph, Genbank-Nr. D17672, Ackerschmalwand), *Caenorhabditis elegans* (C.e.o, AAA27959; C.e.z, CAA91449), *Drosophila melanogaster* (D.m.d, X14233, Fruchtfliege), *Homo sapiens* (H.s.a, NM_000846; H.s.m, NM_000839; H.s.o, AF212303; H.s.pi, NM_000852; H.s.t, NM_000854; H.s.z, NM_001513), *Mus musculus* (M.m.a, M73483, M.m.m, J03952, M.m.o, U80819, M.m.t, U48419, Maus), *Musca domestica* (M.d.d, X61302, Stubenfliege), *Ommastrephens sloanei*, (O.s.pi, M36938, Tintenfisch), *Onchocerca volvulus* (O.v.3o AAF99575; O.v.2pi, p46427), *Petunia hybrida* (P.h.ph, Y07721, Petunie), *Rattus norvegicus* (R.n.pi, L29427, Ratte).

3.2 Promotoranalyse von *cegsto-1*

Da das Enzym CeGSTO-1 eine wichtige Rolle bei Entgiftungsprozessen in der Zelle spielt, ist seine Promotorregion von besonderem Interesse. In der folgenden Promotorstudie wurde der Promotor des Gens *cegsto-1* analysiert, potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen identifiziert und sowohl das Expressionsmuster als auch der Minimalpromotor von *cegsto-1* bestimmt. Es konnte zudem die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren an einer Expression und die Induzierbarkeit des *cegsto-1*-Promotors durch oxidativen Stress gezeigt werden.

3.2.1 Analyse der Promotorsequenz und potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen von *cegsto-1*

Die Sequenzanalyse der Promotorregion vom *cegsto-1* zeigt, dass sich die beiden Nachbargene von *cegsto-1* auf dem gegenläufigen (+)-Strang befinden und funktionell keinen Zusammenhang zu der CeGSTO-1 erkennen lassen. Das Gen C29E4.1 stromaufwärts codiert für ein cuticuläres Kollagen (col-90) wohingegen das Gen C29E4.2 stromabwärts noch nicht charakterisiert wurde (tag-261). Daraus lässt sich schließen, dass sich *cegsto-1* in keinem Operon befindet (3.2.2.A).

In einem Alignment der Promotorregionen von *C. elegans* und dem nahen Verwandten *C. briggsae* wurden übereinstimmende Bereiche in der Nukleotidsequenz festgestellt (vgl. Abb. 3.2.1). Dabei liegt die Sequenzidentität beider Promotorregionen bei 53%. Die konservierten Nukleotide sind oftmals von besonderem Interesse, da sie potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren darstellen könnten und so eventuell Rückschlüsse auf mögliche transkriptionelle Regulationsmechanismen zulassen. Diese Analyse der Bindungsstellen erfolgte mit den Programmen MatInspector (<http://www.genomatix.de/products/MatInspector/index.html>) und Tess (<http://www.cbil.upenn.edu/tess/>). Dabei wurden nur Bindungsstellen betrachtet, die mit der Kernsequenz für die Bindung der Faktoren zu 100% übereinstimmen und deren Funktionen in Zusammenhang mit den Eigenschaften der CeGSTO-1 stehen könnten. Die so identifizierten Bindungsstellen wurden in der Promotorsequenz lokalisiert (vgl. Abb. 3.2.1) und in der Tab. 3.2.1 aufgeführt.

Überraschenderweise konnten in vielen hochkonservierten Bereichen beider Sequenzen keine Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen identifiziert werden, statt-

dessen wurden bei *C. elegans* zwei GATA-Boxen im Bereich -232 – -243 und -257 – -268 festgestellt, die in der Sequenz von *C. briggsae* an anderer Stelle (-74 – -81, -94 – -106) vorhanden sind. GATA-Boxen sind häufig an einer generellen Induktion der Expression von Genen in gastrointestinalen Geweben beteiligt.

Andere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die identifiziert wurden, wie z.B. NFAT und OCT-1 kontrollieren die unterschiedliche Expression von Genen in verschiedenen Zelltypen bzw. auch während verschiedener Entwicklungsstadien.

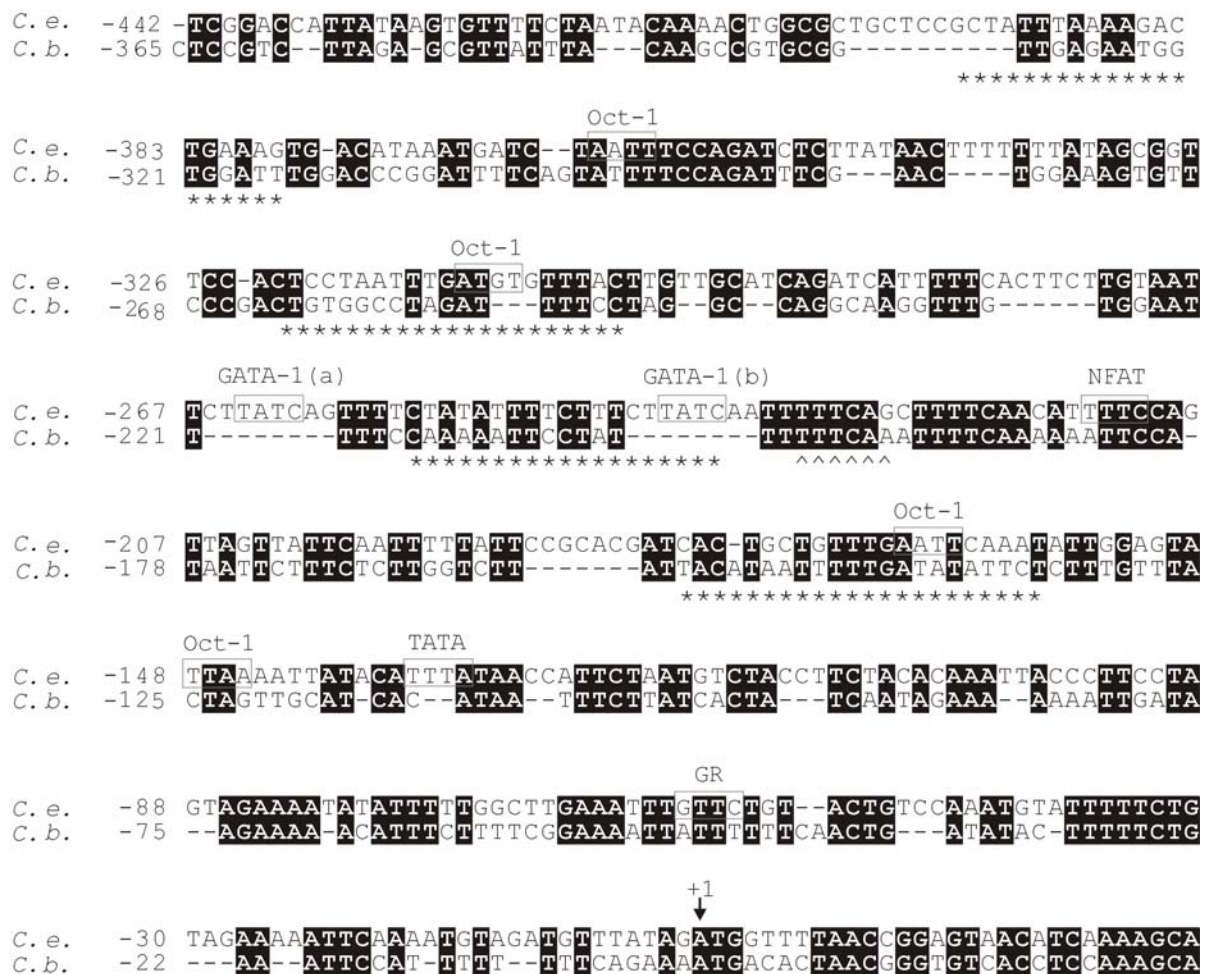


Abb. 3.2.1: Sequenzalignment der *gsto-1*-Promotorbereiche von *C. elegans* (C.e.) und *C. briggsae* (C.b.)

Die Startcodons der Sequenzen von C.e. und C.b. sind mit +1 gekennzeichnet. Übereinstimmungen beider Sequenzen (53%) sind schwarz hinterlegt, potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren sind grau umrandet. Die Lage der S-Primer für die Deletionskonstrukte (siehe 3.2.3) sind in der C.e. Sequenz mit Sternchen (*) und eine 3'-Spleiß-Akzeptorssequenz (TTTCAG) mit Spitzen (^) unterlegt.

Transkriptionsfaktor	Bedeutung	Sequenz bei <i>cegsto-1</i>	Position (nt)
GATA-1(b)	GATA-Box	aattGATAagaa	-232 – -243
GATA-1(a)	GATA-Box	aactGATAagaa	-257 – -268
GR	“Glucocorticoid receptor”	aaatttGTTctgt	-53 – -65
NFAT	“Nuclear factor of activated T-cells”	actgGAAatg	-207 – -217
OCT-1	“Octamer-binding-factor 1“	tattaaAATTata	-139 – -151
		tatttgAATTcaa	-157 – -169
		cACATcaaatta	-307 – -318
		tctggaAATTaga	-353 – -365
TATA	TATA-Box	ggttaTAAAtgtat	-127 – -140

Tab. 3.2.1: Putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der 5´-flankierenden Region von *cegsto-1*. Die Kernsequenzen der putativen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sind in Großbuchstaben dargestellt; die Angabe ihrer Position bezieht sich auf die Nukleotide vor dem ATG von *cegsto-1* (vgl. Abb. 3.2.1).

Um die möglichen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen etwas einzugrenzen, wurde sowohl das Expressionsmuster als auch der Minimalpromotor von *cegsto-1* bestimmt (vgl. Kapitel 3.2.2/3.2.3).

3.2.2 Das Expressionsmuster von *cegsto-1* in transgenen *C. elegans*

Um die stadien- und gewebespezifische Expression von *cegsto-1* in *C. elegans* verfolgen zu können, wurden Reporter-genkonstrukte bestehend aus dem GFP-Gen („Green Fluorescence Protein“) unter Kontrolle des *cegsto-1*-Promotors mikroinjiziert. Das Expressionsmuster dieser transgenen Tiere lässt sich unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysieren.

Zur Erstellung des DNA::GFP-Konstrukts wurden Oligonukleotidprimer auf der Grundlage der genomischen Sequenz von *cegsto-1* synthetisiert. Mit ihnen war es möglich, in einer PCR mit High Fidelity-Polmerase, ein Fragment zu amplifizieren,

dass 1.321 bp des Promotorbereich und 260 bp des Gens *cegsto-1* enthält. (vgl. Abb. 3.2.2.A).

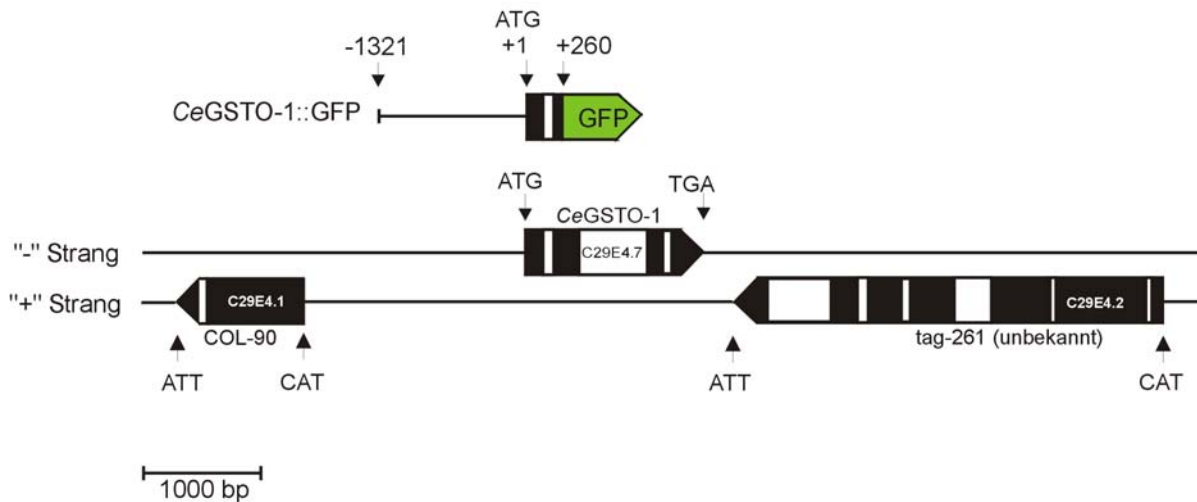


Abb. 3.2.2.A: Das *cegsto-1::GFP*-Konstrukt und die Sequenzumgebung von *cegsto-1*

Die schematische Darstellung zeigt die Größe des klonierten *cegsto-1::GFP*-Konstrukts in Bezug auf die Sequenzumgebung von *cegsto-1*. Exons sind in schwarz, Introns in weiß dargestellt. +1 bezeichnet das Startmethionin und +260 das 3'-Ende des PCR-Produkts. Der Vektor pPD95.77 ist grau dargestellt, er enthält das GFP-Gen (GFP) und ist 4.493 bp groß.

Nach erfolgreicher Klonierung des PCR-Produkts in den GFP-Vektor pPD95.77 wurde die Plasmid-DNA zusammen mit dem Markerplasmid pBX in die Gonaden von jungen *C. elegans* (*pha-1*-Mutanten) coinjiziert und die transgenen Nachkommen bei 25°C selektiert. Aufgrund der schwachen Expression von *cegsto-1* war es nötig, die transgenen *C. elegans* in axenischer Kultur zu halten, um das Expressionsmuster ohne die Hintergrundfluoreszenz von Bakterien bestimmen zu können.

Eine Expression von *cegsto-1* konnte bei adulten Würmern eindeutig in den Zellen des Intestinaltrakts lokalisiert werden (vgl. Abb. 3.2.2.B). Eine stadienspezifische Analyse ließ keine Expression in den Eiern und Embryonalstadien erkennen. Erst ab dem Entwicklungsstadium der L1-Larve wurde eine Expression von *cegsto-1* in den Intestinalzellen festgestellt, wobei die stärkste Fluoreszenz in L3- und L4-Larven zu beobachten ist. Die transgenen Larvenstadien zeigen dabei ein nahezu identisches Expressionsmuster wie die adulten *C. elegans* (vgl. Abb. 3.2.2.C).



Abb. 3.2.2.B: Lokalisation der CeGSTO-1 in den Intestinalzellen von adulten *C. elegans*

Die Expression von GFP unter Kontrolle des *cegsto-1*-Promotors kann im Intestinalbereich (int) von adulten *C. elegans* zu lokalisieren werden. Eier und Embryonen (emb) zeigen dabei keine Expression.

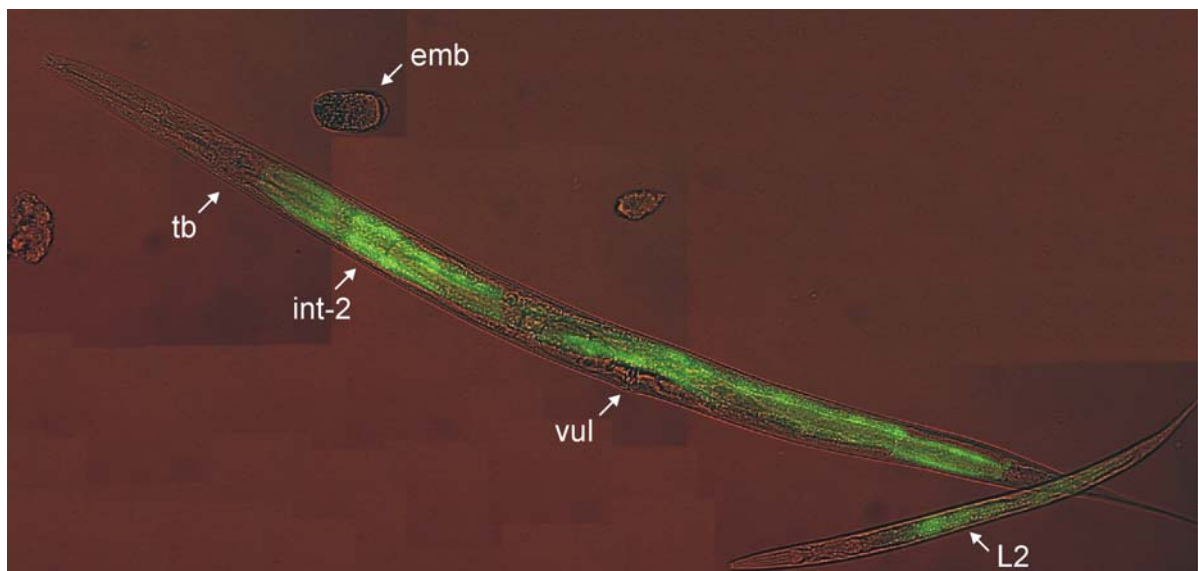


Abb. 3.2.2.C: Expression des *cegsto-1*-Promotor::Reportergenkonstrukts in den Intestinalzellen von L2 und L4-Larven von *C. elegans*

Eine verstärkte Expression von *cegsto-1* findet in den Intestinalzellen (int) von L4-Larven statt. Vor allem die int-2 Zelle zeigt eine ausgeprägte Expression. Gekennzeichnet sind außerdem ein Ei mit Embryo (emb) sowie terminaler Bulbus (tb) und Vulva (vul) der L4-Larve.

Diese Ergebnisse konnten mittels immunhistologischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen bestätigt werden (vgl. Kapitel 3.4.1).

3.2.3 Bestimmung des Minimalpromotor von *cegsto-1* anhand von GFP-Deletionskonstrukten

Der Minimalpromotor von *cegsto-1* wurde durch eine schrittweise Verkleinerung des Promotorbereichs in den GFP-Konstrukten bestimmt. Unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wurde dabei jeweils die GFP-Fluoreszenz der transgenen *C. elegans* beobachtet und untersucht, welcher minimale Promotorbereich für die basale Expression notwendig ist. In diesem Bereich befinden sich essentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen. Da die GATA-1-Boxen eine wichtige Rolle bei der Expression von Genen im Intestinalbereich spielen, wurden die S-Primer so synthetisiert, dass sich die Größe des Promotorbereichs der hergestellten GFP-Konstrukte jeweils um eine GATA-Box unterscheiden. Mit diesen Sense-Primern und dem Antisense-Primer (+260 bp 3'wärts vom ATG) war es möglich, verschieden große Bereiche des *cegsto-1*-Promotors zu amplifizieren und durch Ligation vier verschieden große GFP-Deletionskonstrukte zu erhalten, die in Anlehnung an die Größe des *cegsto-1*-Promotorbereichs benannt wurden (vgl. Abb. 3.2.3.A – B).

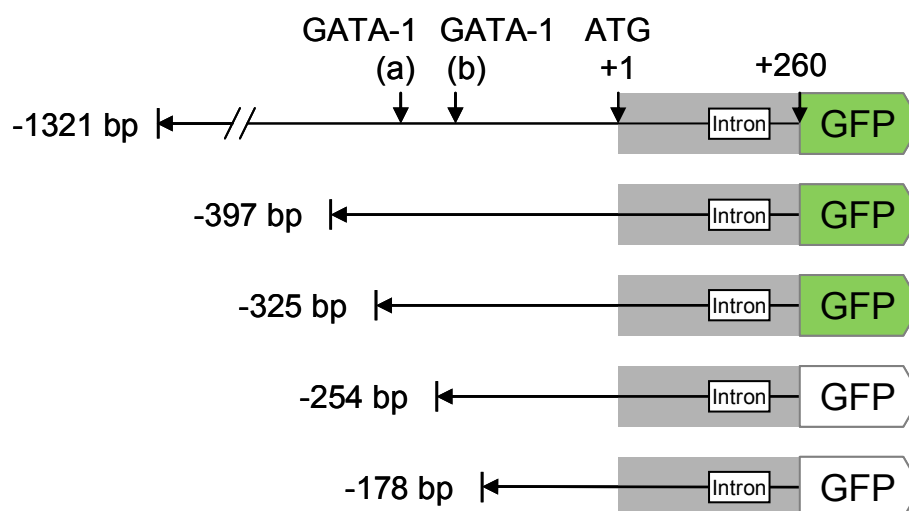


Abb. 3.2.3.A: Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte des *cegsto-1*-Promotors

Die Abbildung zeigt die Größe der GFP-Deletionskonstrukte, die sich aus dem Promotorbereich, 260 bp des Gens *cegsto-1* und dem GFP-Vektor pPD95.77 zusammensetzen. GATA-1 (a)/(b) stellen die Lage der GATA-1 Boxen im Promotorbereich dar, +1 zeigt das Startmethionin und +260 den AS-Primer. Die Deletionskonstrukte wurden so erstellt, dass ihr Promotorbereich eine unterschiedliche Anzahl an GATA-Boxen enthält. Die grün markierten Konstrukte wiesen GFP-Fluoreszenz auf.

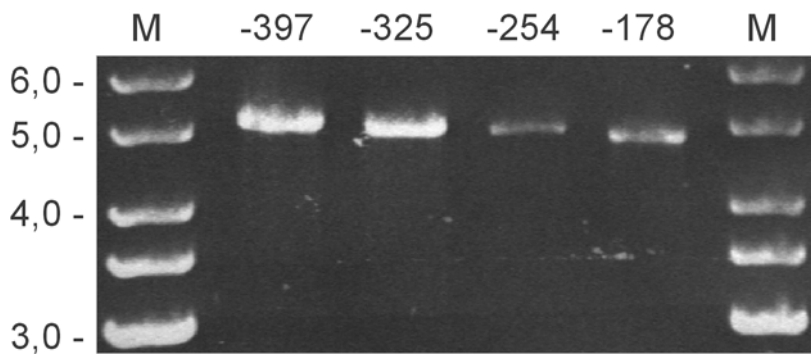


Abb. 3.2.3.B: Agarosegel der GFP-Deletionskonstrukte

Das Agarosegel zeigt die vier GFP-Deletionskonstrukte (GFP-397, GFP-325, GFP-254, GFP-178) nach einem *Hind* III-Verdau. Dabei ist die schrittweise Verkleinerung des Promotorbereichs zu erkennen. Die Größe der DNA setzt sich jeweils aus dem Vektor pPD95.77 (4,5 kb) und den verschieden großen Promotor::*cegsto-1*-Fragmenten zusammen.

Nach erfolgreicher Mikroinjektion der GFP-Deletionskonstrukt-DNA mit dem pBX-Markerplasmid wurde festgestellt, dass transgene *C. elegans* mit den GFP-Deletionskonstrukten GFP-397 und GFP-325 eine Expression von *cegsto-1* zeigen, wohingegen bei den Konstrukten GFP-254 und GFP-178 der Promotorbereich von *cegsto-1* nicht mehr ausreicht, um eine grüne Fluoreszenz in den Würmern hervorzurufen.

Somit liegen essentielle Bindungsstellen für eine Expression 5'-wärts des Nukleotids -254 (vgl. Abb. 3.2.2). Da sich in diesem Bereich die GATA-Box GATA-1(a) befindet wurde eine direkte Beteiligung dieses Bindungsmotivs an der Expression von *cegsto-1* im Darm vermutet und sollte nachfolgend mittels GATA-Box-Mutagenese überprüft werden.

3.2.4 Einfluss der GATA-Box auf die Transkription von *cegsto-1*

Die direkte Beteiligung des Transkriptionsfaktor-Bindungsmotivs GATA-1(a) im Promotorbereich (-257 – -268) an einer Expression von *cegsto-1* wurde analysiert, indem die GATA-Sequenz (5'-TGATAA-3') zu einer *Bam*H I-Schnittstelle (5'-GGATCC-3') mutiert wurde. Dazu wurden zwei Primer mit *Bam*H I-Schnittstelle anstelle der GATA-Box konstruiert (vgl. Abb. 3.2.4) und das mutierte GFP-Konstrukt in einer PCR auf dem Template des *cegsto-1*-Promotor::*Reporter*genkonstrukts amplifiziert. Nach der Religation des Plasmids wurden transgene Würmer durch Mikroinjektion erzeugt.

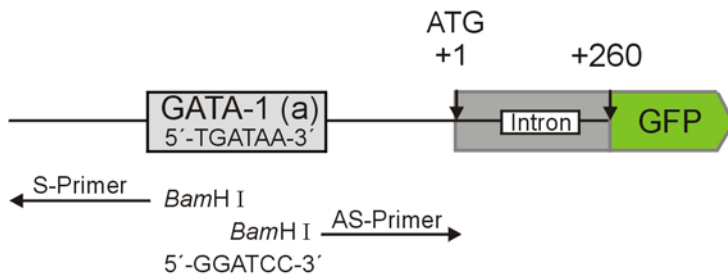


Abb. 3.2.4: Übersicht zur Mutation der GATA-Box in eine *BamH* I-Schnittstelle

Dargestellt ist die Lage des S- und AS-Primers auf dem *cegsto-1*-Promotor::GFP-Konstrukt. Nach der Amplifikation erfolgte eine Religation des PCR-Produkts mittels *BamH* I-Schnittstelle.

Die Würmer mit mutierter GATA-Box im 5'-Bereich von *cegsto-1* zeigten keine GFP-Fluoreszenz mehr und waren damit nicht in der Lage, *cegsto-1* zu exprimieren. Es konnte also festgestellt werden, dass die Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle GATA-1(a) eine essentielle Rolle bei der Transkription von *cegsto-1* spielt.

3.2.5 RNAi der Transkriptionsfaktoren ELT-2 und ELT-4

Die Transkriptionsfaktoren ELT-2 und ELT-4 binden an das GATA-Motiv und spielen daher bei der Transkription von intestinalen Proteinen eine entscheidende Rolle. Die Beteiligung dieser beiden Faktoren an der Transkription von *cegsto-1* sollte in einem RNAi-Versuch untersucht werden. Dabei wurde die Proteinbiosynthese von ELT-2 bzw. ELT-4 in den transgenen *C. elegans* (GFP-325) durch doppelsträngige RNAi auf mRNA-Ebene blockiert („gene silencing“).

Da sich RNAi über Zellgrenzen hinweg in *C. elegans* verteilen kann, wurde den Würmern die doppelsträngige RNA über RNAi-exprimierende „Futter“-Bakterien (HT115) angeboten. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde nach drei Tagen Inkubationszeit beobachtet, ob eine Expression von *cegsto-1*::GFP auch ohne diese Transkriptionsfaktoren möglich ist. Dabei wurde festgestellt, dass der „Knock-down“ von ELT-2 keine offensichtlichen Veränderung bei den Würmern hervorruft, wohingegen der „Knock-down“ von ELT-4 zu einer geringeren Reproduktionsrate und einem Erliegen der GFP-Fluoreszenz führt. Diese Beobachtung, dass in Abwesenheit des Transkriptionsfaktors ELT-4 keine Expression von *cegsto-1* stattfindet, lässt vermuten, dass ELT-4 wesentlich an der Transkription von *cegsto-1* beteiligt ist.

3.2.6 Stressinduzierbarkeit des *cegsto-1*-Promotors

In einem Stresstest wurde die Induzierbarkeit des *cegsto-1*-Promotors durch oxidativen Stress analysiert. Da die mRNA der *cegsto-1* in WT-Würmern in so geringem Maße bzw. so instabil vorliegt, dass keine Detektion mittels Northern Blot möglich war, wurden für diesen Versuch die transgenen Würmer GFP-325 (vgl. Abb. 3.2.3.A) verwendet, deren GFP-Expression unter der Kontrolle des *cegsto-1*-Promotors steht. Somit kann eine ansteigende GFP-Expression in direktem Zusammenhang mit einer gesteigerten Aktivität des *cegsto-1*-Promotors gesehen werden.

Nach der Inkubation der axenischen GFP-Würmer für 3 h mit 4 mM Cumene-Hydroperoxid bzw. 5 mM *tert*-Butyl-Hydroperoxid wurde die GFP-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop und in einem Northern Blot untersucht. Unter dem Mikroskop ließ sich nach der Stressbehandlung ein deutlicher Fluoreszenzanstieg und damit einhergehend eine gesteigerte Promotoraktivität von *cegsto-1* feststellen (vgl. Abb. 3.2.6.A).

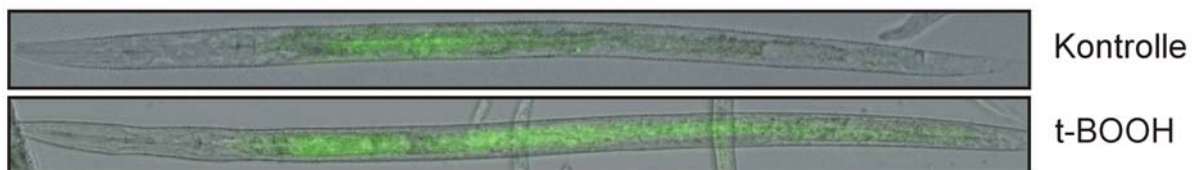


Abb. 3.2.6.A: Induktion der *cegsto-1*-Promotoraktivität durch oxidativen Stress

Transgene *C. elegans* mit *cegsto-1*-Promotor::Reportergenkonstrukt wurden für 3 h mit 5 mM *tert*-Butyl-Hydroperoxid (t-BOOH) inkubiert. Dabei ließ sich unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Zunahme des GFP-Signals und damit der Promotoraktivität von *cegsto-1* erkennen.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde die Zunahme des Gehalts an GFP-mRNA nach einer solchen Stressbehandlung in einem Northern Blot analysiert. Dazu wurde die $_{gesamt}$ RNA von gestressten und ungestressten *C. elegans* gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der α - $[^{32}P]$ -dATP markierten GFP-cDNA-Sonde hybridisiert. Als Ladekontrolle diente zum einen das Agarosegel, das die gleiche Menge an aufgetragener $_{gesamt}$ RNA zeigt (vgl. Abb. 3.2.6.B), zum anderen eine Kontrollsonde (Spermidin-Synthase) mit der der Blot zusätzlich hybridisiert wurde. Das resultierende Autoradiogramm zeigt die Transkriptgröße von ca. 1,5 kb, die sich aus dem codierenden Bereich von *cegsto-*

1::GFP und den 5'- und 3'-flankierenden Regionen zusammensetzt (vgl. Abb. 3.2.6.C). Nach der Inkubation der Würmer mit 4 mM Cumene-Hydroperoxid bzw. 5 mM *tert*-Butyl-Hydroperoxid ist die Transkriptmenge signifikant gestiegen. Im Gegensatz dazu zeigt das Transkript der Kontroll-DNA (1 kb) keine Hochregulation durch oxidativen Stress. Es kann also festgestellt werden, dass *cegsto-1* einen stressinduzierbaren Promotor besitzt.

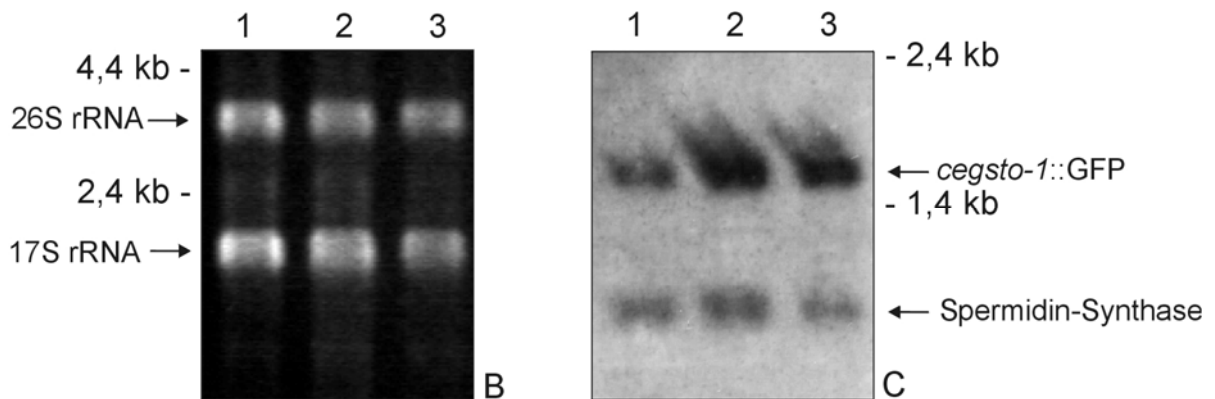


Abb. 3.2.6.B – C: Northern Blot-Analyse von *cegsto-1*-Promotor::GFP nach Stressinduktion

20 µg *gesamt*RNA transgener *C. elegans* (mit *cegsto-1*-Promotor::GFP-Konstrukt) pro Spur wurden in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt (B), auf eine Nylonmembran transferiert und mit α -[32 P]-dATP-markierter GFP-cDNA hybridisiert (C). Dabei wurden die Würmer ungestresst (Spur 1), nach 4 mM Cumene-Hydroperoxid-Stress (Spur 2) bzw. nach 5 mM *tert*-Butyl-Hydroperoxid-Stress (Spur 3) verwendet. Die detektierte Bande von *cegsto-1*-Promotor::GFP ist erwartungsgemäß 1,5 kb groß und zeigt eine deutliche Zunahme der RNA-Menge nach der Stressbehandlung. Als Ladekontrolle wurde der Blot mit einer radioaktiv markierten Spermidin-Synthase hybridisiert, die keine Hochregulation der RNA erkennen lässt.

3.3 Expression und Enzymaktivität rekombinanter CeGSTO-1

3.3.1 Herstellung von rekombinanter CeGSTO-1 in *E. coli*

Um die Enzymaktivität der CeGSTO-1 bestimmen zu können, wurde *cegsto-1* rekombinant in *E. coli* exprimiert. Dazu wurde die cDNA von *cegsto-1* amplifiziert und in den Expressionsvektor pJC40 kloniert. Nach der Transformation in den *E. coli*-Stamm Rosetta gami und der Expression bei 25°C über Nacht konnte ein 31 kDa-Protein im SDS-Page festgestellt werden. Als Ergebnis zeigt sich, dass die Größe dieses Proteins mit der kalkulierten Masse der CeGSTO-1 von 28,5 kDa zuzüglich seiner N-terminalen Histidin-Verlängerung („His-Tag“) übereinstimmt. Aufgrund des „His-Tags“ war es möglich, CeGSTO-1 über Ni²⁺-Chelatchromato-

grafie im „Batch“-Verfahren aufzureinigen (vgl. Abb. 3.3.1.A), dabei wurde aus einem Liter *E. coli*-Kultur ca. 1 mg rekombinante CeGSTO-1 gewonnen. Des Weiteren konnte eine starke Bindung der CeGSTO-1 an S-Hexyl-GSH-Agarose festgestellt und diese Eigenschaft in späteren Versuchen für die Aufreinigung und Anreicherung des nativen Proteins genutzt werden. Eine Bindung der CeGSTO-1 an GSH-Agarose konnte nicht detektiert werden. Zur Überprüfung des rekombinanten Proteins CeGSTO-1 wurde der His-Tag durch einen Verdau mit Faktor Xa entfernt. Die Proteingröße verringert sich dadurch um 2,5 kDa auf 28,5 kDa und entspricht damit der Größe der nativen CeGSTO-1 (vgl. Abb. 3.3.1.B).

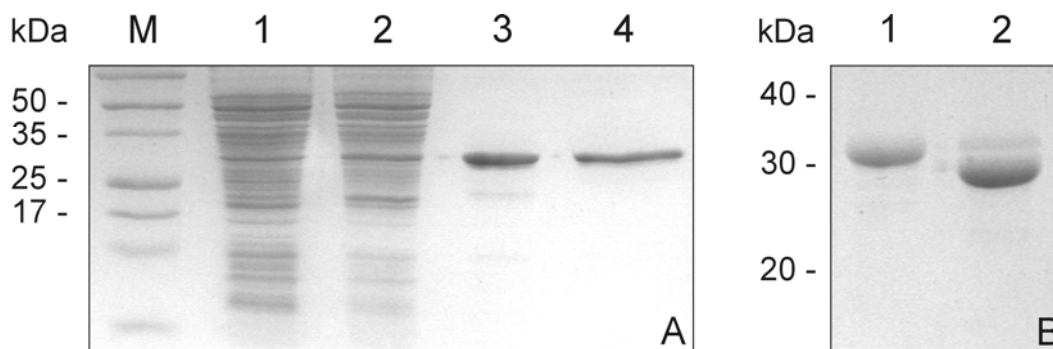


Abb. 3.3.1.A – B: SDS-PAGE rekombinant überexprimierter CeGSTO-1 aus *E. coli*

A: Die vier Spuren zeigen den „Precision Plus“ Marker (M), *E. coli* Überstand vor der Induktion mit IPTG (1) und nach der Induktion mit IPTG (2), die Elution der rekombinanten CeGSTO-1 (31 kDa) nach der Aufreinigung über Ni²⁺-Chelatchromatografie (3) und über S-Hexyl-GSH-Agarose (4).

B: Nach einem Restriktionsverdau der rekombinanten CeGSTO-1 (31 kDa, Spur 1) mit Faktor Xa verringert sich die Größe des Proteins um den His-Tag (28,5 kDa, Spur 2).

3.3.2 Gelfiltration der CeGSTO-1

Die rekombinante CeGSTO-1 wurde im Anschluss an die Ni²⁺-Chelatchromatografie über die FPLC-Gelfiltration nach ihrer Größe aufgereinigt. Bei einer Laufgeschwindigkeit von 2 ml/min und 2 ml/Fraktion lässt sich der Peak der CeGSTO-1 (31 kDa) in den Fraktionen 25 und 26 erkennen, das entspricht einem Molekulargewicht von 63 kDa bzw. 58 kDa (vgl. Abb. 3.3.2). Somit kann festgestellt werden, dass CeGSTO-1 unter nicht denaturierten Bedingungen als Dimer auftritt.

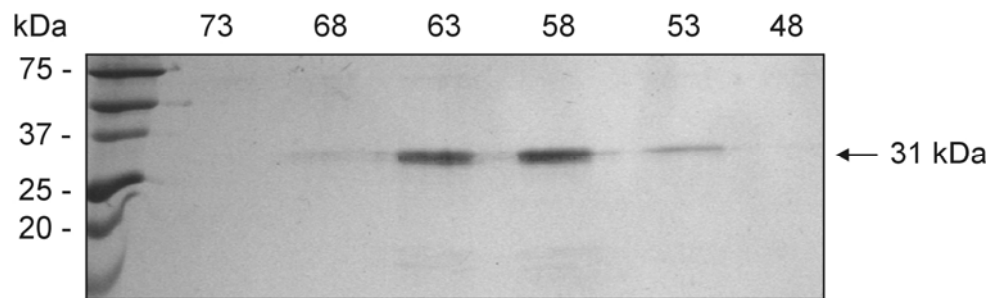


Abb. 3.3.2: SDS-PAGE der FPLC-Gelfiltration von CeGSTO-1

Die sechs Spuren (FPLC-Fraktionen 23 – 28) der Coomassie gefärbten 12,5% SDS-PAGE zeigen die rekombinante CeGSTO-1 (31 kDa) mit einem Peak in Fraktion 25/26. Das entspricht einem Molekulargewicht von 63 kDa bzw. 58 kDa. Somit liegt CeGSTO-1 im nativen Zustand als Dimer vor.

3.3.3 Herstellung von Anti-CeGSTO-1-Antikörper in der Maus

Zur Herstellung eines Anti-CeGSTO-1-Antikörpers wurden Mäuse viermal mit jeweils 40 µg rekombinanter, Ni²⁺-chelatchromatografisch aufgereinigter CeGSTO-1 injiziert. Das Mäuse-Serum wurde anschließend mittels Western Blot gegen rekombinantes CeGSTO-1-Protein getestet und ließ eine gute Detektion des Proteins bei einer Verdünnung von 1:1000 erkennen (vgl. Abb. 3.3.3.A). Im *C. elegans*-Extrakt konnte die native CeGSTO-1 nur dann detektiert werden, wenn der Extrakt zuvor über eine S-Hexyl-GSH-Agarose aufgereinigt und damit konzentriert wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass die CeGSTO-1 nur in sehr geringen Mengen im Wurm vorliegt. (vgl. Abb. 3.3.3.B).

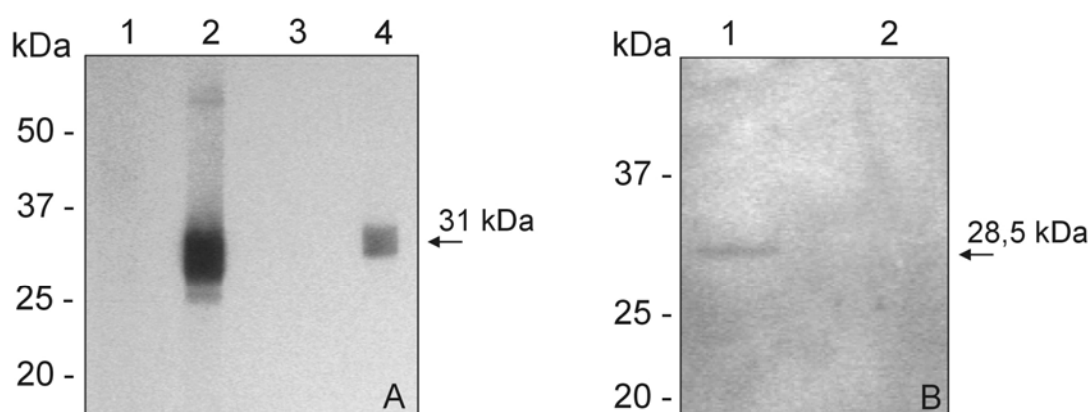


Abb. 3.3.3.A – B: Western Blot mit CeGSTO-1 aus *E. coli* und aus *C. elegans*

A: Der Anti-CeGSTO-1-Antikörper aus der Maus detektiert das rekombinante Protein bei einer Verdünnung von 1:100 (Spur 2) und 1:1000 (Spur 4). Das Präimmunserum in den Verdünnungen 1:100 und 1:1000 diente als Kontrolle (Spur 1 und 3). **B:** Eine Immundetektion der nativen CeGSTO-1 war erst nach einer Aufreinigung des *C. elegans* Extrakts über S-Hexyl-GSH-Agarose möglich (Spur 1). Ohne diese Konzentration konnte CeGSTO-1 im Extrakt nicht detektiert werden (Spur 2).

3.3.4 Enzymtests mit rekombinanter CeGSTO-1

Die Enzymtests wurden mit rekombinanter, über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigter CeGSTO-1 durchgeführt. Es wurden verschiedene synthetische Substrate getestet (vgl. Tab. 3.3.4), wobei als höchste spezifische Aktivität die Thioltransferase-Aktivität (192 ± 14 nmol/min*mg) und die Dehydroascorbat-Reduktase-Aktivität (DHAR, 186 ± 37 μ mol/min*mg) festgestellt werden konnte. Die GST-Aktivität wurde mit CDNB als Substrat gemessen und lag bei 106 ± 10 μ mol/min*mg. Die dazugehörigen Michaeliskonstanten (Km-Werte) wurden in Versuchsreihen mit unterschiedlichen Substratmengen bestimmt, mit Hilfe des Computerprogramms „Graph Pad Prism“ ausgewertet (vgl. Abb. 3.3.4) und ebenfalls in Tab. 3.3.4 aufgeführt. Ein Vergleich der Km-Werte lässt eine höhere Affinität der CeGSTO-1 zu HEDS und zu CDNB erkennen, als zu dem Substrat DHA.

Substrat v. GSTO-1	Enzymaktivität [nmol/min*mg]	Km-Wert [μ M]
HEDS	192 ± 14	$70,77 \pm 7,71$
DHA	186 ± 37	$184,1 \pm 25,45$
CDNB	106 ± 10	$51,52 \pm 6,92$
Cumene	32 ± 4	n.b.
Ethacrynsäure	n.d.	
DCNB	n.d.	
p-Nitrophenylacetat	n.d.	
trans-2-nonenal	n.d.	

Tab. 3.3.4: Enzymaktivität der rekombinanten CeGSTO-1

Als höchste spezifische Enzymaktivität der CeGSTO-1 konnte Thioltransferase-Aktivität und Dehydroascorbat-Reduktase-Aktivität bestimmt werden. Die GST-Aktivität der CeGSTO-1 war etwas geringer. Bei der niedrigen Cumene-Aktivität wurden keine Km-Werte bestimmt (n.b. = nicht bestimmt, n.d. = nicht detektiert).

Des Weiteren wurde getestet, ob die CeGSTO-1 die Reduktion von Protein-Disulfiden katalysieren kann. Dazu wurde der Thioltransferase-Test mit Kollagen bzw. Insulin als Substrate durchgeführt und eine geringe spezifische Aktivität von $25,2 \pm 0,3$ nmol/min*mg (Kollagen) bzw. $24,1 \pm 0,7$ nmol/min*mg (Insulin) festgestellt.

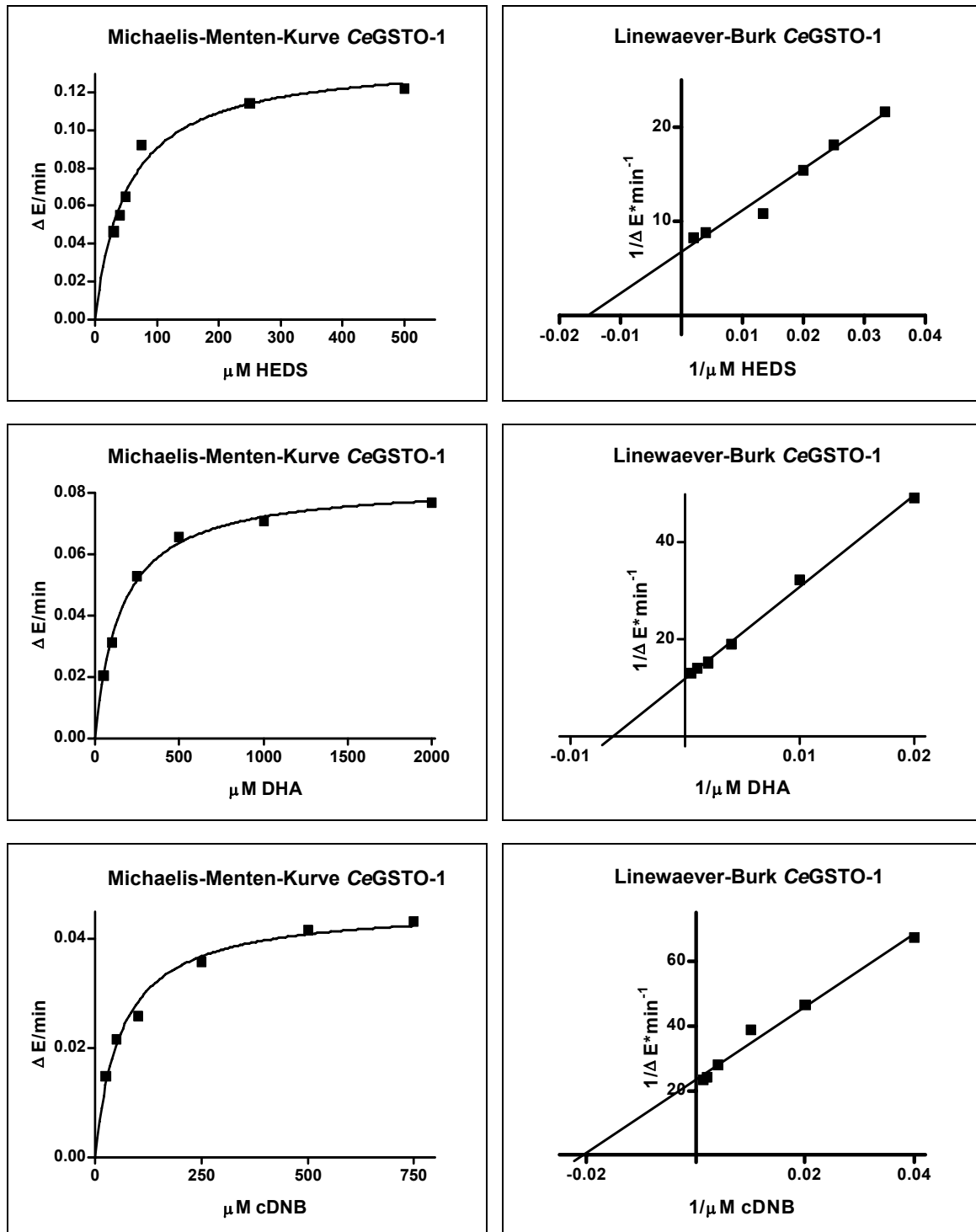


Abb. 3.3.4: Bestimmung der K_m -Werte für verschiedene Substrate der CeGSTO-1

Für die K_m -Werte-Bestimmung der Substrate HEDS, DHA und CDNB wurden Enzymtests mit jeweils verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt. Diese Daten dienen als Grundlage für die jeweilige Michaelis-Menten-Kurve und das entsprechende Lineweaver-Burk-Diagramm.

3.3.5 Schutzfunktion der CeGSTO-1 vor oxidativem Stress in *E. coli* („Hemmhofstest“)

In „Hemmhofstests“ wurde untersucht, ob rekombinante CeGSTO-1 in *E. coli* Schutz gegenüber oxidativem Stress vermittelt. Dazu wurden Expressionszellen BL21(DE3), die rekombinante CeGSTO-1 exprimieren, auf LB-AMP-Platte ausgestrichen und Filterplättchen mit verschiedenen Konzentrationen von stress-induzierenden Giften aufgelegt. Nach der Inkubation der Bakterien über Nacht wurde der klare Hemmhof um die Filterplättchen herum, in dem die Bakterien nicht wachsen konnten, vermessen. Alle Tests zeigten signifikant ($P < 0,05$ bei 100 mM und 200 mM Konzentrationen), dass CeGSTO-1 diese Reagenzien entgiften kann und den Bakterien Schutz gegenüber oxidativem Stress vermittelt. Im Vergleich zu den Kontrollbakterien lag die Reduktion der Hemmhofdurchmesser bei einer Konzentration von 200 mM bei 77% für *tert*-Butyl-Hydroperoxid, 42% für Cumene-Hydroperoxid, 25% für Juglon und 21% für Paraquat (vgl. Abb. 3.3.5.A).

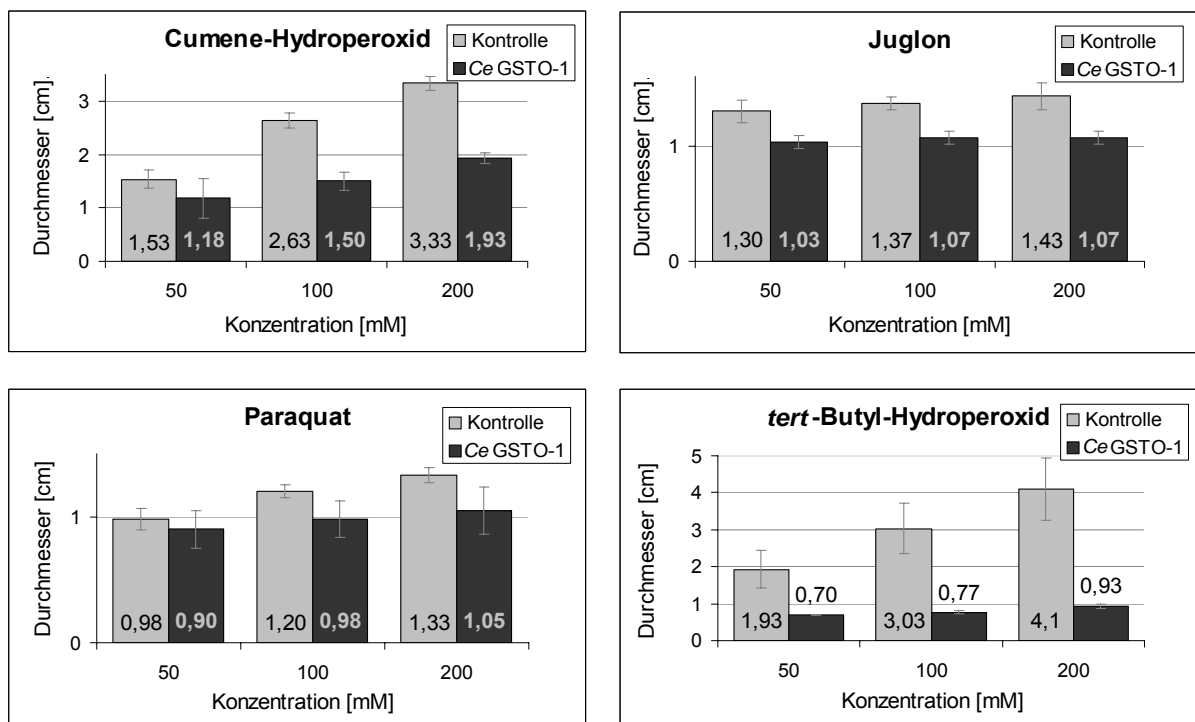


Abb. 3.3.5.A: Schutzfunktion von CeGSTO-1 vor oxidativem Stress in *E. coli* („Hemmhofstest“)

CeGSTO-1 wurde in *E. coli* BL21(DE3) auf LB-AMP-Platten exprimiert. Dabei wurden am nächsten Tag die Wachstumshemmung um die aufgelegten Giftplättchen vermessen. Ein Vergleich dieser Hemmhöfe mit Kontrollbakterien zeigt dabei eine signifikante Reduktion des Durchmessers bei Cumene- und *tert*-Butyl-Hydroperoxid, Juglon und Paraquat.

Um festzustellen, ob der Entgiftungsprozess GSH-abhängig ist, wurde der „Hemmhoftest“ mit den GSH-defizienten Bakterien JTG10 in GSH-reduziertem Medium (90% Minimal-Medium, 10% LB-Medium) mit Cumene-Hydroperoxid durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten Rosetta gami-Zellen, die ebenso wie BL21(DE3)-Zellen in der Lage sind, GSH zu synthetisieren. Vor der Durchführung der Tests wurde die Expressionsfähigkeit der Rosetta gami-Zellen und der JTG10-Zellen bestätigt, wobei jeweils nach IPTG-Induktion die rekombinante CeGSTO-1 in einem Western Blot immundetektet wurde. Als Ergebnis der „Hemmhoftests“ konnte eindeutig gezeigt werden, dass bei den GSH-defizienten Bakterien keine Reduktion der Hemmhöfe und somit auch keine Entgiftung durch CeGSTO-1 stattfand. Bei Rosetta gami dagegen konnte CeGSTO-1 bei gleichen Bedingungen eine Protektion gegen Cumene-Hydroperoxid vermitteln. Damit handelt es sich also bei der Entgiftungsfunktion der CeGSTO-1 um eine GSH-abhängige Funktion.

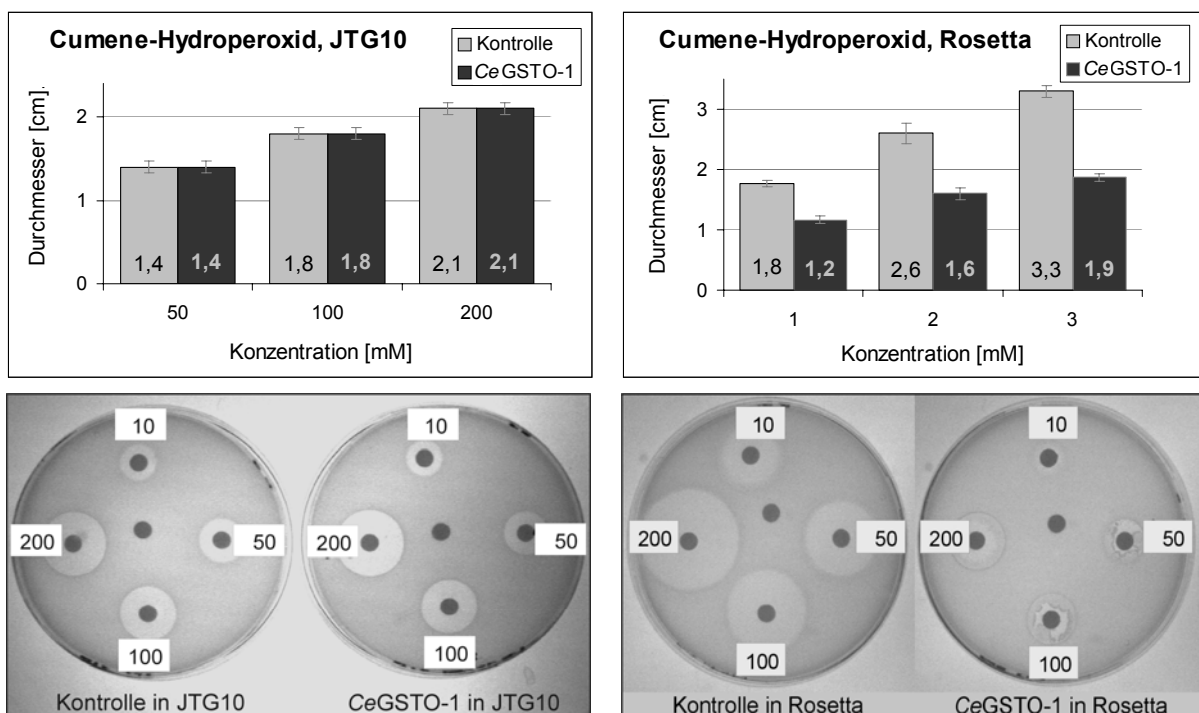


Abb. 3.3.5.B: „Hemmhoftest“ unter GSH-reduzierten Bedingungen

Die beiden oberen Diagramme zeigen, dass die CeGSTO-1 in GSH-defizienten JTG10-Zellen keine Schutzfunktion gegen Cumene-Hydroperoxid vermittelt (linkes Diagramm). In GSH-haltigen Rosetta gami-Zellen dagegen ist eine Reduktion der Hemmhöfe und damit eine Schutzfunktion messbar (rechtes Diagramm). Die unteren Grafiken zeigen die unterschiedlich großen Hemmhöfe auf LB-AMP-Platten, die nach der Bakterieninkubation über Nacht um die Giftplättchen herum sichtbar werden. Die Zahlen geben die Giftkonzentration (10 mM – 200 mM) auf den Filterplättchen an.

3.3.6 Mutagenese des aktiven Cysteins der CeGSTO-1 (Cys33Ala)

Bei der Schutzfunktion gegen oxidativen Stress spielt das Cystein im aktiven Zentrum der CeGSTO-1 eine entscheidende Rolle, da es direkt mit GSH interagiert. Die Bedeutung des Cysteinrestes wurde nachfolgend untersucht, indem er mittels PCR zu einem Alaninrest mutiert und in anschließenden Hemmhof- und Enzymtests analysiert wurde.

Als Ergebnis der „Hemmhoftests“ ist zu erkennen, dass die Schutzfunktion der CeGSTO-1 gegenüber oxidativem Stress durch die Mutation des Cysteins deutlich herabgesetzt wurde (vgl. Abb. 3.3.6.A). Des Weiteren findet nur noch eine schwache Bindung der rekombinanten, mutierten CeGSTO-1 an S-Hexyl-GSH-Agarose statt (vgl. Abb. 3.3.6.B) und in durchgeführten Enzymtests konnte eine Aktivität mit den Substraten CDNB, HEDS und DHA nicht mehr festgestellt werden.

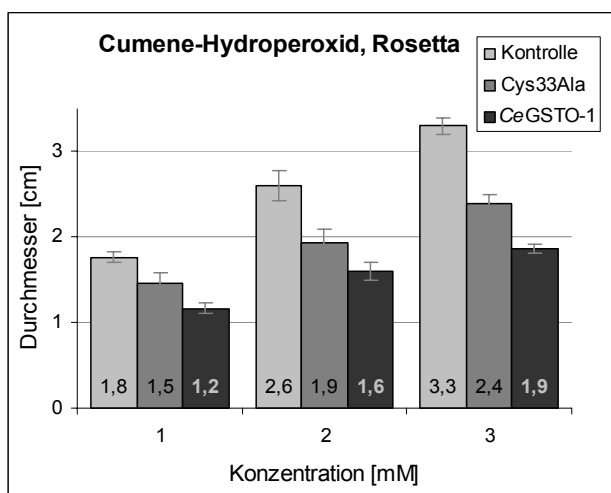


Abb. 3.3.6.A: Einfluss der Cys33Ala-Mutation auf die Schutzfunktion von CeGSTO-1 in *E. coli* („Hemmhoftest“)

Eine Mutation des aktiven Cysteinrestes in der GSH-Bindungsstelle der CeGSTO-1 (Cys33Ala) reduzierte die Schutzfunktion des Enzyms gegenüber Cumene-Hydroperoxid. Die *E. coli* Rosetta-Zellen mit dem mutierten Enzym wiesen größere Hemmhöfe auf als welche, die aktive CeGSTO-1 enthielten.

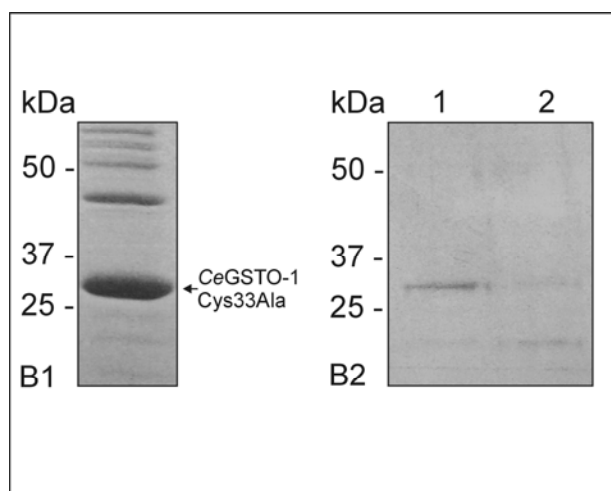


Abb. 3.3.6.B: Rekombinante Expression und Bindungseigenschaften an S-Hexyl-GSH der Cys33Ala-mutierten CeGSTO-1

B1: Die Bande in der SDS-PAGE zeigt die mutierte, in *E. coli* exprimierte und über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigte CeGSTO-1.

B2: Die SDS-PAGE zeigt, dass die Bindungseigenschaft der CeGSTO-1 (Spur 1) an S-Hexyl-GSH-Agarose nach der Mutagenese des Cysteinrestes (Cys33Ala, Spur 2) stark reduziert ist.

3.4 Charakterisierung der CeGSTO-1 in *C. elegans*

3.4.1 Lokalisation von nativer CeGSTO-1 in *C. elegans*

Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IM) und Elektronenmikroskopie (EM) konnte die CeGSTO-1 in *C. elegans* lokalisiert werden. Bei der EM zeigen die Goldpartikel eindeutig und ausschließlich eine Lokalisation der CeGSTO-1 in den Intestinalzellen (vgl. Abb. 3.4.1) und bestätigen damit die Ergebnisse der CeGSTO-1::GFP-Lokalisation (vgl. Kapitel 3.2.2). Eine weitere Verfestigung dieser Resultate konnte durch die immunhistologische Färbung von *C. elegans*-Schnitten erhalten werden (Daten nicht gezeigt).

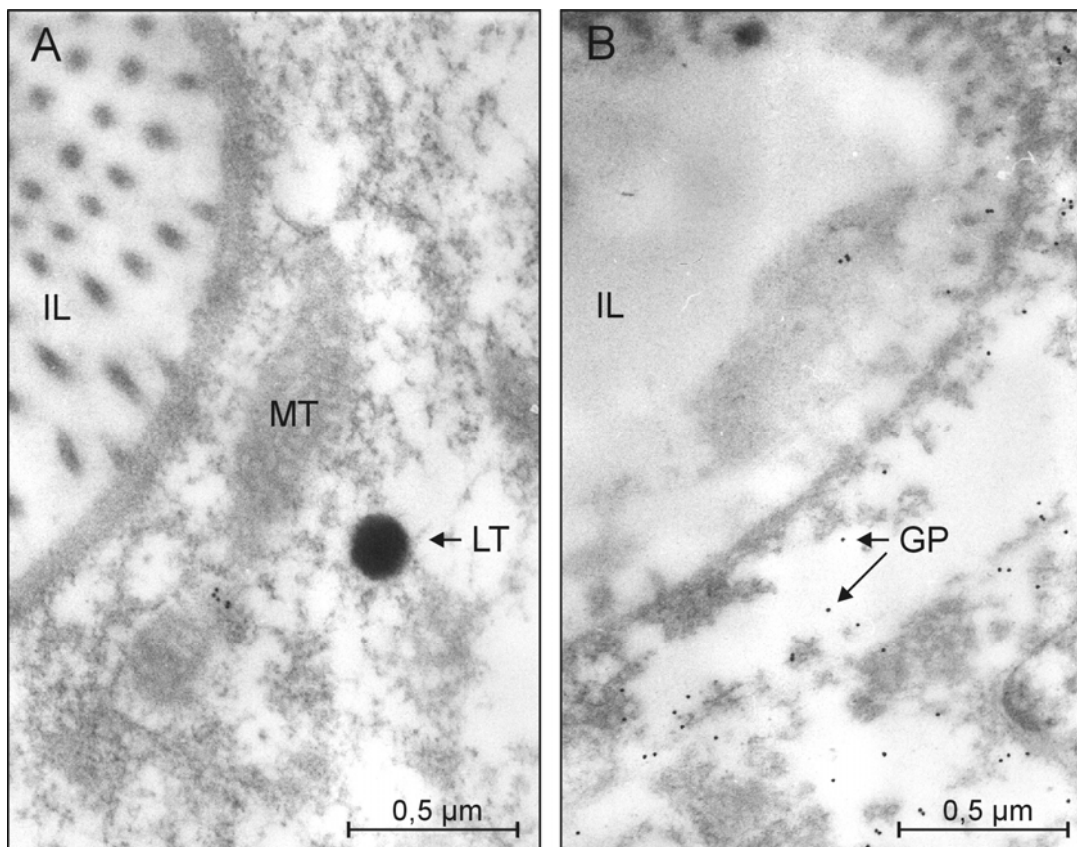


Abb. 3.4.1.A – B: Lokalisation von CeGSTO-1 in *C. elegans* mittels Elektronenmikroskopie

Die Goldpartikel (GP) zeigen eine Lokalisation der CeGSTO-1 in den Intestinalzellen (Abb. B). Schnitte, die mit Präimmunserum behandelt worden sind weisen keine Goldpartikel auf (Abb. A). (Intestinale Lumen (IL), Mitochondrien (MT) und Lipidtröpfchen (LT)).

3.4.2 Rekombinante Überexpression von *cegsto-1* in *C. elegans*

Da eine ektopische Überexpression von *cegsto-1* Nachkommen erzeugte, die kaum reproduktionsfähig waren und bereits in der dritten Generation ausstarben, wurde die Überexpression mit dem *let-858*-Promotor durchgeführt. Dazu wurde die cDNA von *cegsto-1* mit „His-Tag“ in den Vektor pPD103.05 kloniert und das Plasmid anschließend mit dem pBX-Marker in *C. elegans* coinjiziert. Die thermoselektierten Nachkommen wurden in einer Wurm-PCR mit dem geninternen AS-Primer 4661 sowie dem vektorspezifischen S-Primer 8284 (ca. 100 bp vor der „Multiple-Cloning-Site“) überprüft. Als Ergebnis zeigt das Agarosegel eine ca. 920 bp Bande, die bestätigt, dass die Wurmlinie der Überexpressionswürmer (CeGSTO-1-Würmer) zusätzliche Plasmid-DNA von *cegsto-1* enthält (vgl. Abb. 3.4.2.A1).

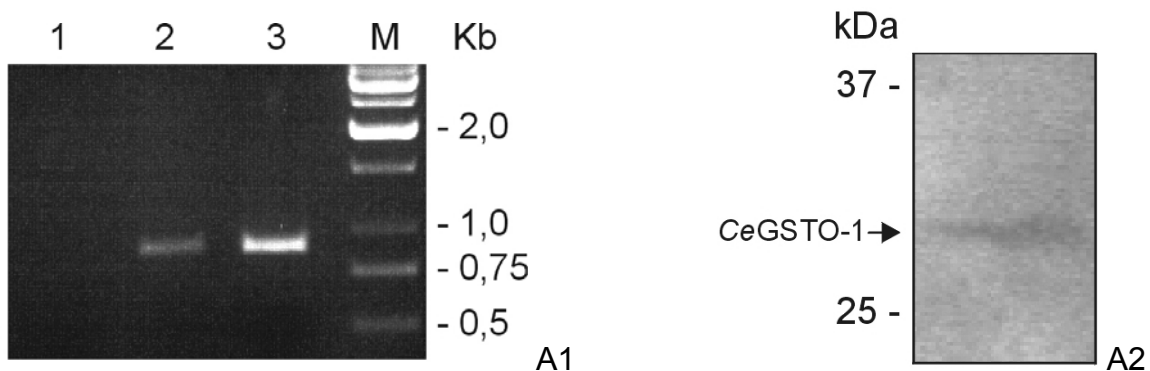


Abb. 3.4.2.A1 – A2: „Single-Worm-PCR“ und Western Blot von CeGSTO-1-Würmern

A1: Die Wurm-PCR zeigt eine 920 bp Bande (Spur 2), die bestätigt, dass die transgenen *C. elegans* zusätzliche Plasmid-DNA mit dem Gen *cegsto-1* enthalten. Als Negativkontrolle (Spur 1) wurden WT-Würmer verwendet, als Positivkontrolle (Spur 3) Plasmid-DNA der injizierten Midipräparation. Als Marker (Spur M) wurde eine 1 kb DNA Leiter aufgetragen. **A2:** Nach der Aufreinigung der Überexpressionswürmer über S-Hexyl-GSH-Agarose lässt sich die CeGSTO-1 im Western Blot detektieren. Dabei ist nur eine Bande zu erkennen, da sich die native CeGSTO-1 von der rekombinanten nur durch 6 Histidine (0,84 kDa) unterscheidet.

Um die rekombinante CeGSTO-1 aus *C. elegans* aufzureinigen, wurden die transgenen CeGSTO-1-Würmer in axenischer Kultur vermehrt, das Wurmpellet homogenisiert und die CeGSTO-1 über S-Hexyl-GSH-Agarose konzentriert. Nach der Auftrennung des Eluats in einer 12,5% (w/v) SDS-PAGE konnte die CeGSTO-1 immundetektiert werden. Dabei lässt sich nur eine Bande erkennen, da sich die native CeGSTO-1 von der rekombinanten nur durch 6 Histidine (0,84 kDa) unterscheiden, die mittels Oligonukleotid eingefügt worden sind (vgl. Abb. 3.4.2.A2).

Eine Aufreinigung der rekombinanten CeGSTO-1 mittels Nickel-Chelatchromatografie war nicht möglich. Die transgenen CeGSTO-1-Würmer zeigten z. T. eine große Ansammlung an Eiern in den Gonaden („bag-of-worms“), wobei einige L1-Larven bereits im Mutterleib schlüpften (Fotos nicht gezeigt). Zudem wiesen die Überexprimierer eine Reduktion der Lebensdauer um 27,3% sowie eine Reduktion der Nachkommenzahl um 66,6% auf.

Eine Untersuchung der Schutzfunktion von CeGSTO-1 vor oxidativem Stress in *C. elegans* erfolgte durch die Inkubation von CeGSTO-1- bzw. WT-Würmern auf NGM-Platten mit dem oxidativen Stressor Cumene-Hydroperoxid bzw. Paraquat und den Futterbakterien OP50. Nach 18 Stunden bei 25°C wurden die überlebenden Würmer gezählt. Als signifikantes Ergebnis konnte dabei eine 3-fach höhere Überlebensrate von gestressten CeGSTO-1-Würmern gegenüber gestressten WT-Würmern festgestellt werden (vgl. Abb. 3.4.2.B). Damit wurde eine Schutzfunktion von CeGSTO-1 gegen oxidativen Stress *in vivo* nachgewiesen.

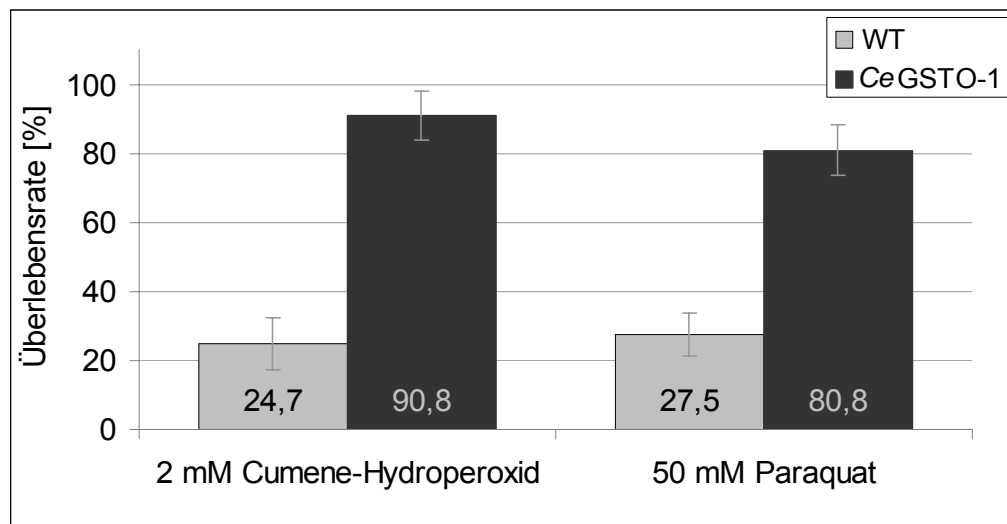


Abb. 3.4.2.B: Überlebensrate von CeGSTO-1-Würmern nach Inkubation mit oxidativem Stress

Unter Einfluss von oxidativem Stress zeigen die transgenen CeGSTO-1-Würmer eine höhere Überlebensrate als die WT-Würmer. Auf NGM-Platten mit 2 mM Cumene-Hydroperoxid war die Überlebensrate der Überexprimierer um das 3,7-fache höher ($P < 0,0001$) bzw. mit 50 mM Paraquat um das 3-fache ($P = 0,0002$).

3.4.3 Blockierung der *cegsto-1*-Expression durch RNAi

Um weiteren Aufschluss über die Funktion von CeGSTO-1 *in vivo* zu bekommen, wurde die Expression von *cegsto-1* in *C. elegans* blockiert, indem die mRNA des Gens mittels doppelsträngiger RNA degradiert wurde. Die WT-Würmer nahmen über drei Tage die doppelsträngige *cegsto-1*-RNA durch die „Fressbakterien“ HT115 auf und konnten anschließend analysiert werden. Als Negativkontrolle (Kontrollwürmer) wurden WT-Würmer mit HT115 gefüttert, die nur den Vektor pPD129.26 ohne Insert enthielten. Als Positivkontrolle dieser Methode wurde eine Blockierung der mRNA von DuoX auf dieselbe Weise durchgeführt. Dabei zeigte eine Vielzahl der Positivkontroll-Tiere die erwartete Störung der Vernetzung der Cuticula, die sich in blasenförmigen Ausstülpungen darstellt (Fotos nicht gezeigt).

Die Wirksamkeit des „Knock-downs“ von *cegsto-1* wurde mittels Western Blot-Analyse bestätigt. Dazu wurden gleiche Mengen der „Knock-down“-Würmer wie auch der Kontrollwürmer homogenisiert, über S-Hexyl-GSH-Agarose aufgereinigt, die Proteine mittels 12,5% (w/v) SDS-PAGE aufgetrennt und die CeGSTO-1 in einem Western Blot detektiert. Dabei konnte eine fast vollständige Blockierung der Proteinsynthese von *cegsto-1* in „Knock-down“-Wümmern festgestellt werden (vgl. Abb. 3.4.3.A).

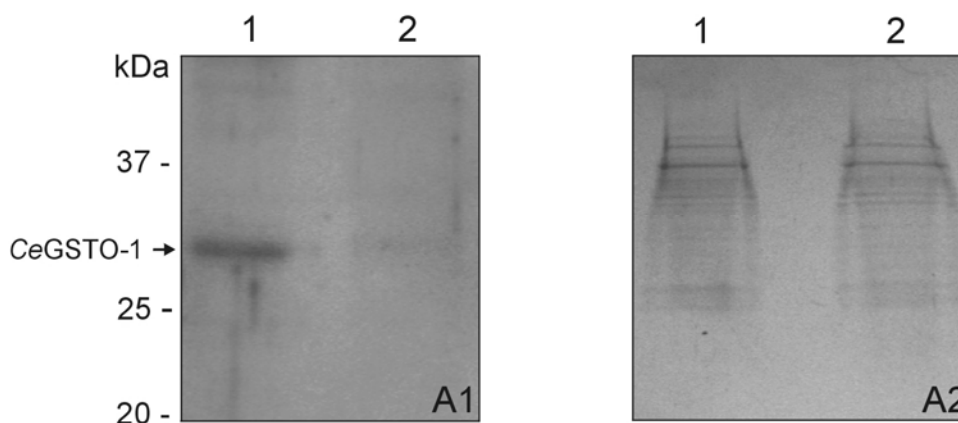


Abb. 3.4.3.A1 – A2: Western Blot-Analyse des „Gene silencing“ von *cegsto-1* in *C. elegans*

A1: Die Western Blot-Analyse mit Anti-CeGSTO-1-Antikörper zeigt, dass die Expression von *cegsto-1* (Kontrollwürmer, Spur 1) durch RNAi fast vollständig blockiert werden konnte (Spur 2).

A2: Die 12,5% (w/v) SDS-PAGE mit denselben Proben dient als Ladekontrolle und zeigt, dass gleiche Proteinmengen von aufgereinigten Kontrollwürmern (Spur 1) und „Knock-down“-Wümmern (Spur 2) aufgetragen wurden.

Die Effizienz von RNAi wurde zusätzlich bestätigt, indem auf gleiche Weise die Expression des *cegsto-1::GFP*-Genkonstrukts unter Kontrolle des *cegsto-1*-Promotors (GFP-325) mit RNAi blockiert wurden. Die GFP-325-Würmer nahmen über drei Tage die *cegsto-1*-RNA-Doppelstränge mittels der Fressbakterien HT115 auf und wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dabei zeigten die RNAi-Würmer keine GFP-Fluoreszenz mehr.

In Stressversuchen wurde analysiert, ob das posttranskriptionelle Blockieren der *cegsto-1*-Expression durch RNAi einen Einfluss auf die Stresssensitivität der *C. elegans* ausübt. Dazu wurden „Knock-down“-Würmer sowie Kontrollwürmer jeweils für 18 Stunden auf NGM-Platten mit verschiedenen Giften bzw. unter Hitzeschock inkubiert und die überlebenden Tiere gezählt (vgl. Abb. 3.4.3.B1 – B2).

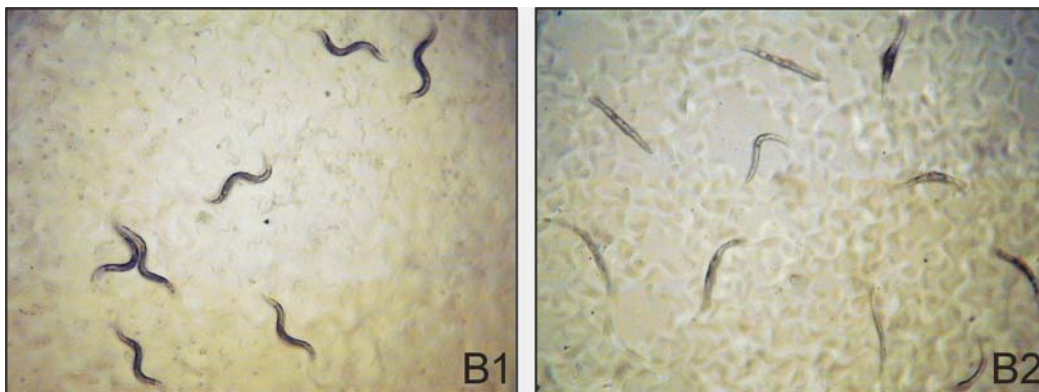


Abb. 3.4.3.B1 – B2: *cegsto-1*-RNAi-Würmer auf NGM-Platte unter Stresseinfluss

Im Vergleich zu Kontrollwürmern (**B1**), zeigten die *C. elegans* mit stillgelegter *cegsto-1*-Expression (**B2**) eine erhöhte Stresssensitivität gegenüber verschiedenen Stressoren. Die Würmer wurden dazu jeweils für 18 Stunden auf NGM-Platten mit dem entsprechenden Gift inkubiert.

Das Ergebnis ist signifikant und zeigt eine stark erhöhte Sensitivität der RNAi-Würmer gegenüber verschiedenen Stressoren im Vergleich zu den Kontrollwürmern. Es konnte dabei eine Reduktion der Überlebensrate von 95,6% mit Cumene-Hydroperoxid ($P < 0,0001$), 82,2% mit Juglon ($P < 0,0001$), 68,6% mit Paraquat ($P < 0,0001$), 25,9% mit Arsen ($P = 0,0191$) bzw. 44% bei 33°C Hitzeschock ($P = 0,0004$) festgestellt werden (vgl. Abb. 3.4.3.C). Des Weiteren wurde eine 16%ige Reduktion ($P = 0,0392$) der Nachkommenzahl der RNAi-Würmer beobachtet. Im Vergleich zu den Kontrollwürmern waren keine Unterschiede in Lebensdauer, Morphologie, Pharynxpumpen, Defäkationsrate und Bewegungen zu erkennen.

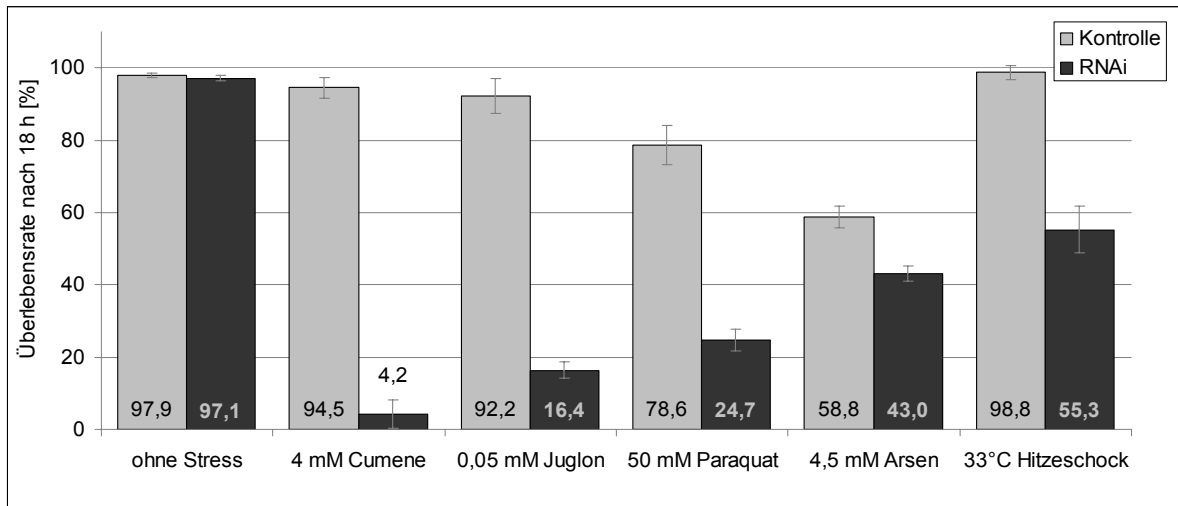


Abb. 3.4.3.C: *cegsto-1*-RNAi-Würmer unter Einfluss verschiedener Stressoren

Nach Inkubation der RNAi-Würmer für 18 Stunden auf NGM-Platten mit verschiedenen Stressoren sank ihre Überlebensrate gegenüber Kontrollwürmern um 95,6% mit Cumene-Hydroperoxid ($P < 0,0001$), 82,2% mit Juglon ($P < 0,0001$), 68,6% mit Paraquat ($P < 0,0001$), 25,9% mit Arsen ($P = 0,0191$) bzw. 44% bei 33°C Hitzeschock ($P = 0,0004$).

Um diese Ergebnisse zu verfestigen und zeitabhängig darstellen zu können, wurde der Stressversuch mit 5 mM Cumene-Hydroperoxid in Flüssigkultur über einen Zeitraum von 5 Stunden durchgeführt. Der Test wurde dazu 7 mal mit 20 RNAi-Würmern bzw. Kontrollwürmern wiederholt. Dabei konnte bereits nach drei Stunden eine Reduktion der Überlebensrate der RNAi-behandelten Würmer um 20% ($P = 0,017$) festgestellt werden (vgl. Abb. 3.4.3.D).

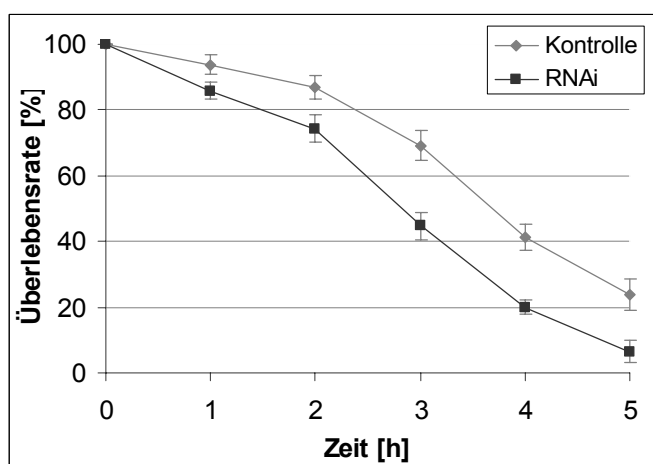


Abb. 3.4.3.D: Zeitabhängiger Stressversuch der RNAi-Würmer mit Cumene-Hydroperoxid

Eine Inkubation von *cegsto-1*-RNAi-Würmern mit 5 mM Cumene-Hydroperoxid/M9-Puffer führte bereits nach drei Stunden zu einer Reduktion der Überlebensrate um 20% ($P = 0,017$) im Vergleich zu den Kontrollwürmern.

3.5 Untersuchung der GSH-Bindungsstelle von CeEF-1 γ

Der CeEF-1 γ besitzt eine N-terminale GSH-Bindungsstelle und wird daher im Zusammenhang mit Detoxifikation und GSTs diskutiert (Billaut-Mulot *et al.*, 1997). Eine erste Charakterisierung des CeEF-1 γ wurde in meiner Diplomarbeit (August 2002) vorgenommen und in den nachfolgenden Versuchen weitergeführt. Dabei wurden u.a. Protein-Protein-Interaktionen mit der Untereinheit CeEF-1 β analysiert und der gesamte EF-1-Komplex nativ aus *C. elegans* aufgereinigt, um GST-Aktivität und eine mögliche Beteiligung an Detoxifikationsprozessen nachzuweisen.

3.5.1 Sequenzanalyse der GSH-Bindungsstelle von CeEF-1 γ

Ein Alignment des N-terminalen Bereichs der abgeleiteten Aminosäuresequenz von CeEF-1 γ mit Elongationsfaktoren und GSTs anderer Organismen zeigt eine signifikante Homologie im Bereich der putativen GSH-Bindungsstelle (Abb. 3.5.1).

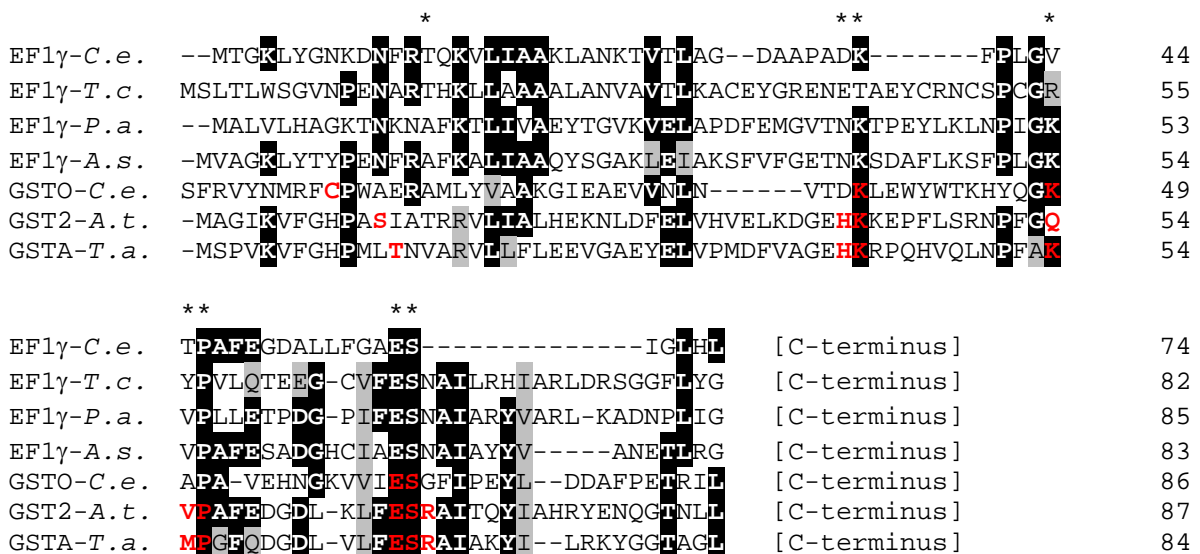


Abb. 3.5.1: Alignment des CeEF-1 γ mit eEF-1 γ und GSTs verschiedener Organismen

Die N-terminalen Aminosäuren des eEF-1 γ von *Caenorhabditis elegans* (*C.e.*, P54412), *Trypanosoma cruzi* (*T.c.*, S41648), *Prunus avium* (*P.a.*, AF297712) und *Artemia salina* (*A.s.*, P12261) sowie die GSTO-1 von *C. elegans* (*C.e.*, P34345), die GST2 von *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*, P46422) und die GSTA1 von *Triticum aestivum* (*T.a.*, CAA39487) wurden verglichen. Schwarze Kästen weisen auf einen übereinstimmenden Aminosäurerest, graue Kästen auf einen homologen Rest hin. Die konservierten, an einer GSH-Bindung beteiligten Aminosäuren sind in rot dargestellt und Aminosäurereste, die bei einer GSH-Bindung an CeEF-1 γ beteiligt sein könnten, sind mit einem Stern (*) markiert.

Die für eine GSH-Bindung notwendigen Aminosäurereste sind in den GST-Sequenzen des Alignments rot hervorgehoben und zeigen in einem Vergleich mit dem CeEF-1 γ , dass viele dieser Aminosäurereste auch im CeEF-1 γ konserviert vorliegen. Eine Bindung von GSH an CeEF-1 γ ist daher denkbar.

3.5.2 Phylogenetische Analyse von CeEF-1 γ

Die Aminosäuresequenzen von eEF-1 γ verschiedener Organismen wurde unter Zuhilfenahme der Sekundärstrukturelemente des *Saccharomyces cerevisiae* EF-1 γ in einem Alignment verarbeitet und der phylogenetische Stammbaum mit dem Programm MEGA 2.1 nach der Methode „Minimal Evolution“ erstellt (vgl. Abb. 3.5.2).

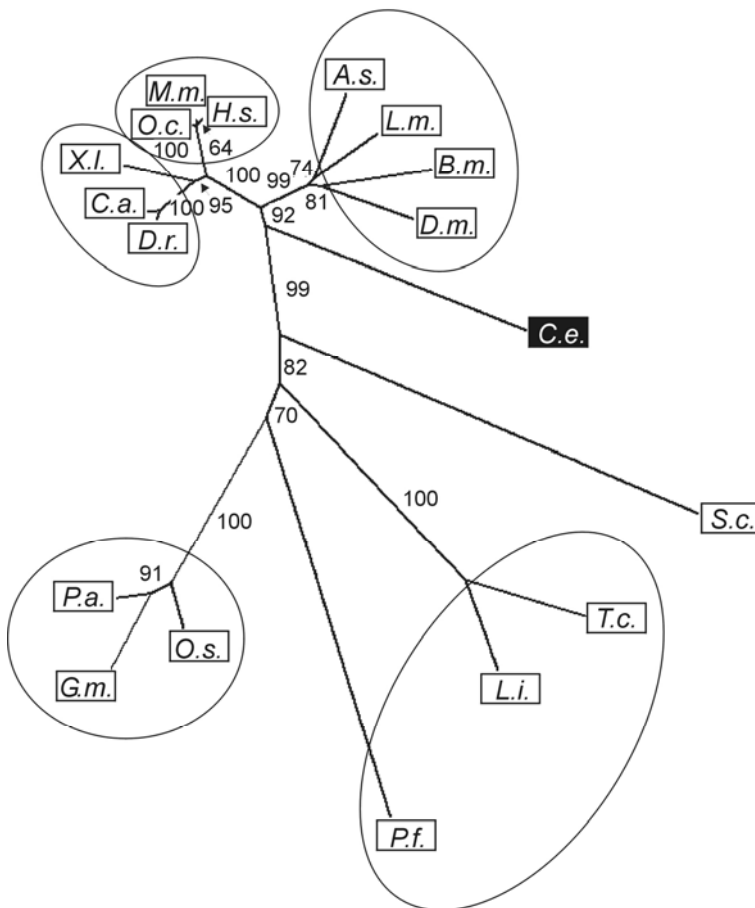


Abb. 3.5.2: Phylogenetische Analyse des CeEF-1 γ mit eEF-1 γ anderer Organismen

Der CeEF-1 γ wurde mit eEF-1 γ anderer Organismen verglichen. Der radiäre Stammbaum zeigt eine Eingliederung des CeEF-1 γ in der Nähe der Wirbellosen. Die Zweiglängen stellen die Wahrscheinlichkeit der evolutionären Veränderung dar, die „boot-strap“-Zahlen an den Verzweigungen geben Auskunft über die Zuverlässigkeit des Stammbaums an dieser Stelle.

Organismen: *Artemia salina* (A.s., Genbank-Nr. P12261, Salinenkrebs), *Bombyx mori* (B.m., JC7823, Seidenwurm), *Caenorhabditis elegans* (C.e., NP_505800), *Carassius auratus*

(C.a., BAB64568, Goldfisch), *Danio rerio* (D.r., AAQ94595, Zebrafisch), *Drosophila melanogaster* (D.m., AF26671, Fruchtfliege), *Glycine max* (G.m., AAL82617, Sojabohne), *Homo sapiens* (H.s., AAH67738), *Leishmania infantum* (L.i., CAC35543), *Locusta migratoria* (L.m., AAL78751, Feldheuschrecke), *Mus musculus* (M.m., Q9D8N0, Maus), *Oryctolagus cuniculum* (O.c., S26649, Hase), *Oryza sativa*, (O.s., BAA34206, Reis), *Plasmodium falciparum* (P.f., NP_705282), *Prunus avium* (P.a., AAG17901, Kirschbaum), *Saccharomyces cerevisiae* (S.c., NP_015277, Bäckerhefe), *Trypanosoma cruzi* (T.c., S41648), *Xenopus laevis* (X.l., AAB29958, Krallenfrosch).

Der Stammbaum zeigt die grobe Gruppierung der verschiedenen eEF-1 γ in die Gruppe der Pflanzen, der Einzeller, der Wirbellosen, der niederen Wirbeltieren und der Säugetieren. Der eEF-1 γ von *C. elegans* lässt sich keiner Gruppe direkt zuordnen, befindet sich aber in verwandtschaftlicher Nähe zu den Wirbellosen.

3.5.3 Herstellung von rekombinantem CeEF-1 γ in *E. coli*

Der rekombinante CeEF-1 γ (berechnete Masse 44,4 kDa + His/Strep-Tag) wurde in *E. coli* hergestellt, um einen Antikörper in Kaninchen zu produzieren und um Bindungsstudien von CeEF-1 γ mit CeEF-1 β *in vitro* durchzuführen. Zur Herstellung von CeEF-1 γ ::His wurde das Plasmid aus pJC40 und dem Gen *ceef-1 γ* (Cosmidnr. F17C11.9, Klonierung vgl. meine Diplomarbeit, August 2002) in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und bei 25°C über Nacht exprimiert. Die Aufreinigung des rekombinanten 46 kDa Proteins erfolgte über Ni²⁺-NTA-Agarose sowie S-Hexyl-GSH-Agarose (vgl. Abb. 3.5.3.A). Ein Abtrennen des His-Tags war mittels Faktor Xa möglich und das Protein konnte mittels MALDI-TOF-Analyse eindeutig als CeEF-1 γ identifiziert werden. Für die Herstellung von CeEF-1 γ ::Strep wurde das Gen *ceef-1 γ* mit einem Strep-Tag amplifiziert, in den Vektor pJC20 kloniert und bei 25°C über Nacht in BL21(DE3)-Zellen exprimiert. Eine Aufreinigung des CeEF-1 γ war dann über eine Streptavidin-Sepharose möglich (vgl. Abb. 3.5.3.B).

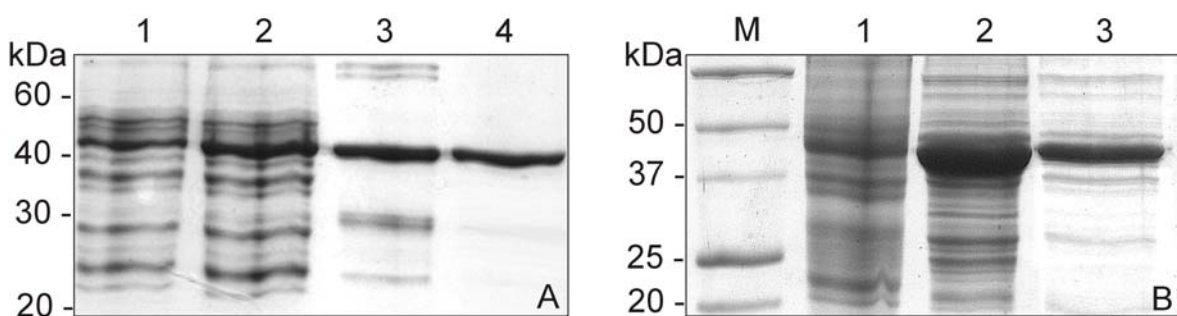


Abb. 3.5.3.A – B: Rekombinante Expression von CeEF-1 γ mit His-Tag bzw. Strep-Tag in *E. coli*

A: Expression von CeEF-1 γ mit His-Tag: Die vier Spuren der SDS-PAGE zeigen den Überstand der Expressionsbakterien BL21(DE3) vor IPTG-Induktion (1), nach IPTG-Induktion (2) sowie das Eluat der Ni²⁺-Chelatchromatographie (3) und der Aufreinigung über S-Hexyl-GSH-Agarose (4). Die 46 kDa-Bande setzt sich aus dem 44,4 kDa CeEF-1 γ und seiner N-terminalen Histidin-Verlängerung zusammen. **B:** Expression von CeEF-1 γ mit Strep-Tag: In der SDS-PAGE ist der „Precision Plus Standard“ (M), Überstand der Expressionsbakterien BL21(DE3) vor IPTG-Induktion (1) und nach IPTG-Induktion (2) sowie die 46 kDa-Bande des CeEF-1 γ nach der Aufreinigung über Streptavidin-Sepharose (3) gezeigt.

Durch Gelfiltration konnte ermittelt werden, dass es sich bei dem CeEF-1 γ um ein trimeres Protein handelt. Enzymtests wurden mit dem rekombinanten CeEF-1 γ durchgeführt und zeigten keine GST-Aktivität mit herkömmlichen GST-Substraten. Zudem wurde festgestellt, dass das hydrophobe Protein sehr leicht denaturiert, was sich auch durch saure Pufferbedingungen nur mäßig verbessert.

3.5.4 Herstellung eines Anti-CeEF-1 γ -Antikörpers im Kaninchen

Zur Erstellung eines Antikörpers wurde ein Kaninchen 4 x mit 300 μ g des rekombinanten, aufgereinigten CeEF-1 γ ::His immunisiert. Das Kaninchenserum wurde nach der Immunisierung auf einem Western Blot mit *C. elegans*-Extrakt getestet und konnte bei einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt werden. Der hergestellte Antikörper detektiert den CeEF-1 γ sehr spezifisch (vgl. Abb. 3.5.4).

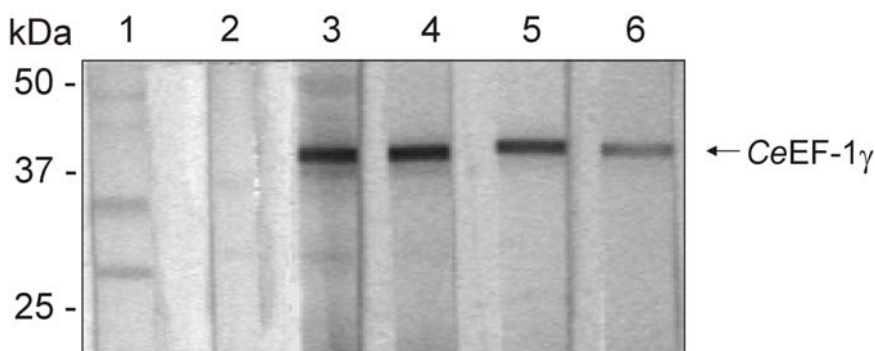


Abb. 3.5.4: Anti-CeEF-1 γ -Antikörper auf *C. elegans*-Extrakt

Die sechs Streifen eines Western Blots mit *C. elegans*-Extrakt wurden mit folgenden Antikörpern inkubiert: Präimmunsersum vom Kaninchen 1:100 (1) und 1:1000 (2), sowie Anti-CeEF-1 γ -Antikörper 1:100 (3), 1:1000 (4), 1:5.000 (5) und 1:10.000 (6).

3.5.5 Expression der N-terminalen Domäne von CeEF-1 γ

Aufgrund der denaturierenden Eigenschaft des CeEF-1 γ war eine Kristallisation des gesamten Proteins und eine Röntgenstrukturanalyse nicht möglich. Um näheren Aufschluss über die Struktur der N-terminalen, GSH-bindenden Domäne des CeEF-1 γ zu erhalten, wurde die Domäne separat in *E. coli* exprimiert. Wie Jeppesen *et al.* (2003) ermitteln konnte, liegt die N-terminale Domäne des eEF-1 γ der Bäckerhefe alleine stabiler in Lösung und ist für eine Kristallisation besser geeignet als der gesamte eEF-1 γ .

Für die rekombinante Expression der Domäne wurden 588 bp des N-Terminus von *ceef-1 γ* in pJC40 kloniert und in den Expressionszellen BL21(DE3) bei 25°C über Nacht exprimiert. Eine Aufreinigung des ca. 24 kDa (21,2 kDa + His-Tag) großen Proteins erfolgte mittels His-Tag über Ni²⁺-NTA-Agarose (vgl. Abb. 3.5.5.A). Bei einer anschließenden Gelfiltration wurde festgestellt, dass die Domäne – wie auch der gesamte CeEF-1 γ – nativ als Trimer vorliegt (Daten nicht gezeigt). Der im Kaninchen hergestellte Anti-CeEF-1 γ -Antikörper erkennt auch spezifisch die N-terminale 588 bp-Domäne des Faktors. In einer Bindungsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Domäne sowohl an S-Hexyl-GSH-Agarose als auch etwas schwächer an GSH-Agarose bindet. Dabei wurde dieser Versuch in einem Western Blot sowohl mit induziertem Überstand von Domäne-exprimierenden Bakterien als auch mit Nickeleluat der N-terminalen Domäne bestätigt (vgl. Abb. 3.5.5.B).

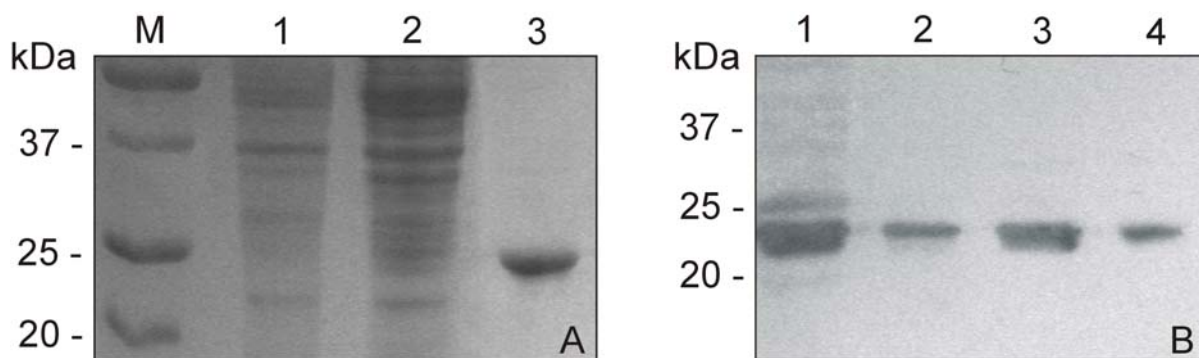


Abb. 3.5.5.A – B: Rekombinante Expression und Aufreinigung der N-terminalen Domäne

A: Die 12,5% (w/v) SDS-PAGE zeigt den Bakterienüberstand von BL21(DE3)-Zellen, die die N-terminale Domäne von CeEF-1 γ (24 kDa) exprimieren vor der Induktion mit IPTG (1), nach der Induktion mit IPTG (2) und nach Ni²⁺-Chelatchromatografie. Als Längenmarker wurde „Precision Standard“ (M) verwendet. **B:** Der Western Blot einer 12,5% (w/v) SDS-PAGE zeigt die Aufreinigung der N-terminalen Domäne aus induziertem Bakterienüberstand mittels S-Hexyl-GSH-Agarose (1) und GSH-Agarose (2) sowie Nickeleluat der CeEF-1 γ -Domäne über S-Hexyl-GSH-Agarose (3) und GSH-Agarose (4). Die Immundetektion erfolgte mit dem Anti-CeEF-1 γ -Antikörper aus Kaninchen.

Genau wie der gesamte CeEF-1 γ wies auch die Domäne keine GST-Aktivität auf und behielt zudem die Eigenschaft in Lösung leicht auszufallen. Daher war es auch auf diesem Wege nicht möglich die GSH-bindende Domäne zu kristallisieren und die Struktur näher zu charakterisieren.

3.5.6 Lokalisation von CeEF-1 γ in *C. elegans*

In meiner Diplomarbeit (August 2002) wurde der CeEF-1 γ als GFP-Fusionsprotein in *C. elegans* lokalisiert. Zusätzlich zu einer Expression im Intestinaltrakt ist der CeEF-1 γ im Pharynxbereich (Drüsenzellen G1, G2) und im exkretorisch-sekretorischen System (biluminale Drüsenzelle, H-Zelle, Kanalzelle) zu lokalisieren (vgl. Abb. 3.5.6.B1 – 3). Mittels immunhistologischer Färbung von *C. elegans*-Schnitten konnte die Expression von CeEF-1 γ in den Intestinalzellen und im Pharynxbereich bestätigt werden (vgl. Abb. 3.5.6.A1 – A3).

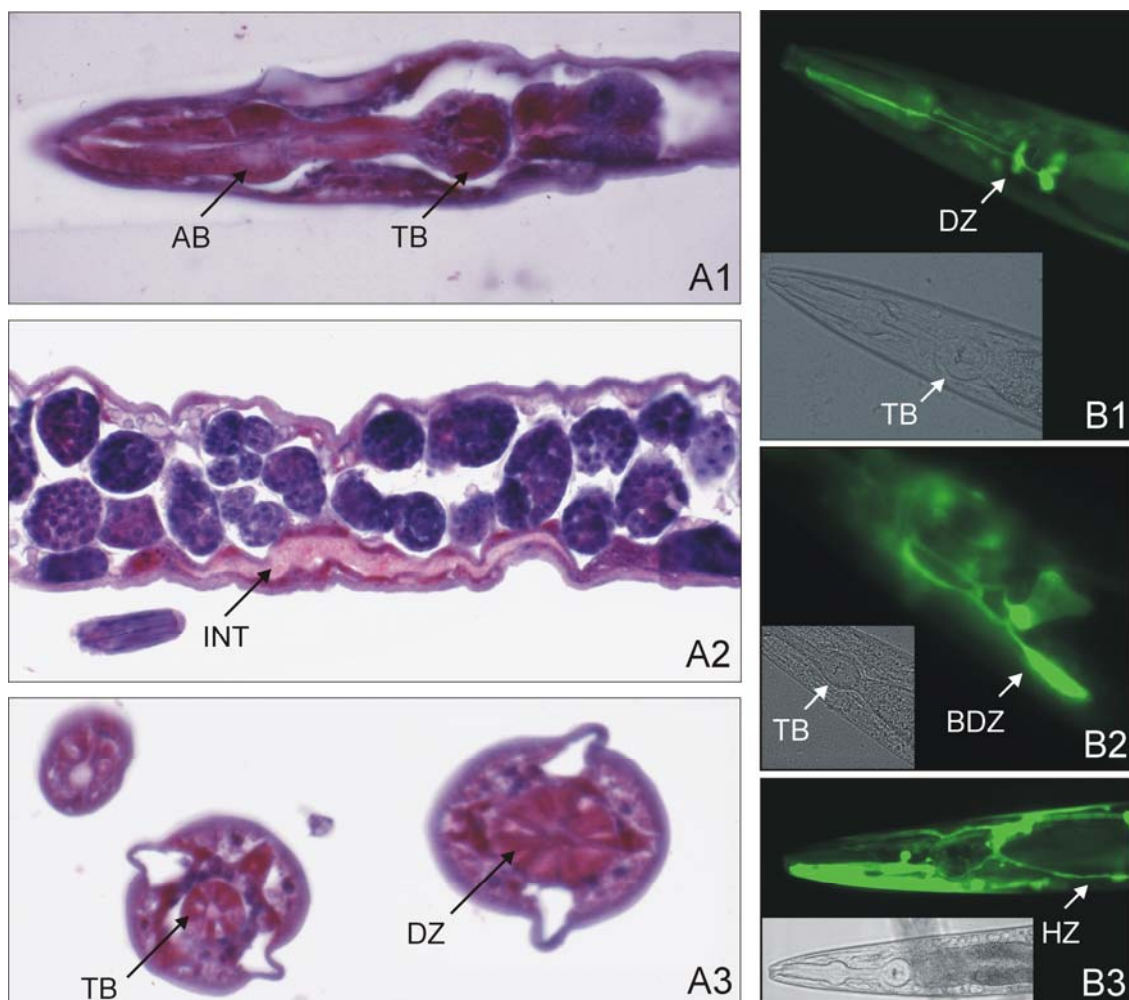


Abb. 3.5.6.A – B: Lokalisation von CeEF-1 γ in *C. elegans*

Die immunhistologische Färbung von *C. elegans* (A1 – A3) lokalisiert den CeEF-1 γ in den Drüsenzellen (DZ) des terminalen Bulbus (TB), im anterioren Bulbus (AB) sowie im Intestinaltrakt (INT). Die Lokalisation des CeEF-1 γ ::GFP-Fusionsproteins (B1 – B3) in den Intestinalzellen (Foto nicht gezeigt) und den Drüsenzellen im Pharynxbereich (DZ, B1) wird damit bestätigt. Zusätzlich ist auf den Fluoreszenzbildern noch eine Expression von CeEF-1 γ in der biluminale Drüsenzelle (BDZ, B2) und der H-Zelle (HZ, B3) des exkretorisch-sekretorischen Systems zu erkennen.

3.5.7 Überexpression von *cegsto-1* in *C. elegans*

Da im prokaryotischen Expressionssystem keine GST-Aktivität des CeEF-1 γ messbar war, sollte der Faktor mit verschiedenen Tags in *C. elegans* überexprimiert und nach der Aufreinigung die Aktivität bestimmt werden. Zur Erstellung von den transgenen Wurmlinien wurden zwei verschiedene Überexpressionsvektoren verwendet, die sich darin unterscheiden, dass der Vektor pPD103.05 einen *let-858*-Promotor besitzt, wohingegen in den Expressionsvektor pPD49.26 das Gen mit seinem eigenen Promotor kloniert wird. Das Gen *ceef-1 γ* wurde mit der Sequenz für einen His-Tag bzw. Strep-Tag in einer PCR amplifiziert und in die entsprechenden Vektoren kloniert. Somit konnte der überexprimierte CeEF-1 γ über verschiedene Tags aufgereinigt und ein Vergleich zwischen der Expression mit geneigenem bzw. *let-858*-Promotor gezogen werden. Nach der Mikroinjektion der Konstrukte wurden die transgenen Wurmlinien in einer „Single-Worm-PCR“ mit einem gen- und einem vektorspezifischen Oligonukleotid überprüft. Die Banden in dem Agarosegel lassen erkennen, dass die Würmer zusätzliche Plasmid-DNA enthalten (vgl. Abb. 3.5.7.A).

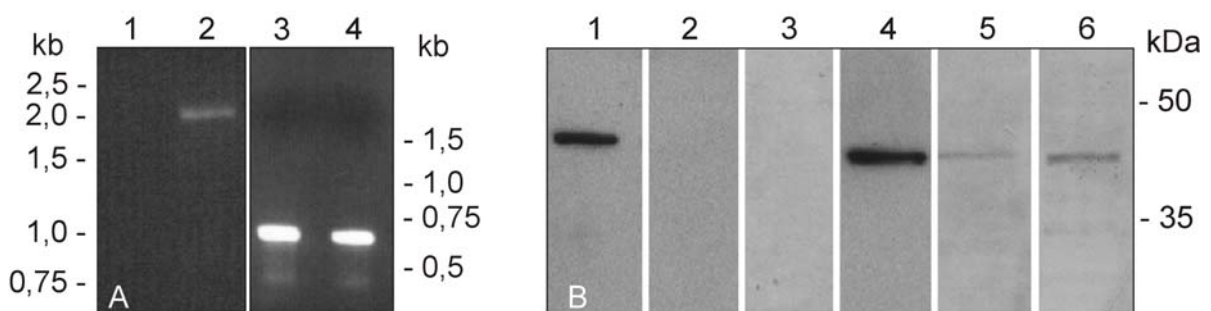


Abb. 3.5.7.A – B: „Single-Worm-PCR“ und Western Blot der CeEF-1 γ Überexprimierer

A: Das Agarosegel zeigt, dass die Wurm-PCR mit einem gen- und einem vektorspezifischen Oligonukleotid positiv ist, die Negativkontrolle ohne Wurm dagegen keine Bande aufweist (Spur 1). Somit enthalten die durch Mikroinjektion entstandenen transgenen Wurmlinien das Plasmid pPD103.05 mit dem Gen *ceef-1 γ His* (Spur 2) bzw. das Plasmid pPD49.26 mit *ceef-1Strep* (Spur 3) sowie pPD49.26 mit *ceef-1His* (Spur 4). **B:** Der Western Blot zeigt die Immundetektion von CeEF-1 γ aus *C. elegans* mittels Anti-CeEF-1 γ -Antikörper aus Kaninchen: Als Positivkontrolle wurde rekombinanter CeEF-1 γ aus *E. coli* verwendet (Spur 1), als Negativkontrolle wurden Streptavidin- bzw. Ni²⁺-NTA-aufgereinigte WT-Würmer eingesetzt (Spur 2 bzw. Spur 3). Spur 4 – 6 zeigen die Aufreinigung des CeEF-1 γ aus transgenen Überexpressionswürmern mit Hilfe des eingefügten His- bzw. Strep-Tags. Dabei ist zu erkennen, dass CeEF-1 γ sowohl mit eigenem Promotor (Spur 4, Strep-Aufreinigung und Spur 6, His-Aufreinigung) als auch mit *let-858*-Promotor (Spur 5, His-Aufreinigung) in den Transfektanten exprimiert wird.

Der Western Blot zeigt, dass sich der zusätzlich exprimierte CeEF-1 γ mittels angefügten Tags aus den Würmern aufreinigen lässt (vgl. Abb. 3.5.7.B). Als Positivkontrolle wurde rekombinanter CeEF-1 γ aus *E. coli* verwendet, der etwas größer ist als der native CeEF-1 γ aus *C. elegans* (vgl. 3.5.7.B und C). Dieser Größenunterschied beruht darauf, dass zusätzlich zu dem CeEF-1 γ und der Histidin-Verlängerung noch Teile der „Multiple-Cloning-Site“ abgelesen wurden, die beispielsweise auch die Schnittstelle für den Faktor Xa enthalten. Eine Quantifizierung der Menge des mit eigenem Promotor exprimierten CeEF-1 γ ergibt, dass etwa 4 $\mu\text{g/g}$ Überexprimierer mittels Ni²⁺-NTA-Agarose bzw. 16 $\mu\text{g/g}$ mittels Streptavidin-Sepharose aufgereinigt werden konnten. Des Weiteren konnte bei der Aufreinigung des CeEF-1 γ über Ni²⁺-Chelatchromatographie beobachtet werden, dass die Überexprimierer mit eigenem Promotor mehr CeEF-1 γ produzieren als mit dem *let-858* Promotor. Der mit unterschiedlichen Tags versehene, aus *C. elegans* aufgereinigte CeEF-1 γ wurde auf GST-Aktivität überprüft. Dabei konnte keine GST-Aktivität festgestellt werden.

Um die gesamte Menge an CeEF-1 γ in den Überexprimierern direkt mit der Menge in WT-Würmern vergleichen zu können, wurden gleiche Proteinkonzentrationen unaufgereinigter Wurmüberstände der beiden Kulturen in einem Western Blot gebロットet und immundetektiert. Dabei ist zu erkennen, dass die Überexpressionswürmer mehr CeEF-1 γ besitzen als die Wildtypen (vgl. Abb. 3.5.7.C).

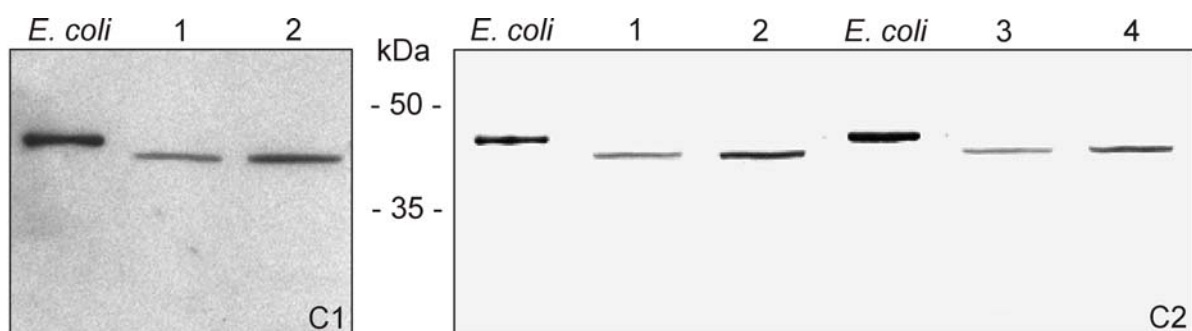


Abb. 3.5.7.C: Immundetektion von CeEF-1 γ in Überexpressionswürmern bzw. in WT-Würmern

Die beiden Western Blots (C1: ECL-Nachweis; C2: Alkalische Phosphatase Färbung) zeigen den mittels Anti-CeEF-1 γ -Antikörper detektierten CeEF-1 γ aus unaufgereinigtem Extrakt von WT-Würmern (C1: Spur 1; C2: Spur 1 und Spur 3) und die jeweils erhöhte Menge an CeEF-1 γ aus dem Extrakt der Überexpressionswürmer (C1, Spur 2: *ceef-1 γ Strep::pPD49.26*; C2, Spur 2: *ceef-1 γ His::pPD103.05*; C2, Spur 4: *ceef-1 γ His::pPD49.26*). Als Positivkontrolle wurde rekombinanter, mittels Ni²⁺-NTA-Agarose und Gelfiltration aufgereinigter CeEF-1 γ aus *E. coli* verwendet.

3.5.8 Herstellung von rekombinantem CeEF-1 β in *E. coli*

Der CeEF-1 γ stabilisiert vermutlich den CeEF-1 β während seiner GDP-GTP-Austauschfunktion (Janssen & Möller, 1988b, Bec *et al.*, 1994, Janssen *et al.*, 1994). Diese Protein-Protein-Interaktion sollte am Biacore 1000 bestimmt und zudem untersucht werden, ob beide Faktoren zusammen GST-Aktivität aufweisen.

Dazu wurde das Konstrukt aus dem Gen *ceef-1 β* (Cosmidnr. F54H12.6) und dem Expressionsvektor pJC40 (Klonierung in meiner Diplomarbeit, August 2002) in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und bei 37°C für 3 Stunden exprimiert. Die Aufreinigung des 26 kDa großen Proteins CeEF-1 β (Genbank-Nr. NP_498737) erfolgte mit Hilfe seines His-Tags über Ni²⁺-Chelatchromatografie (vgl. Abb. 3.5.8).

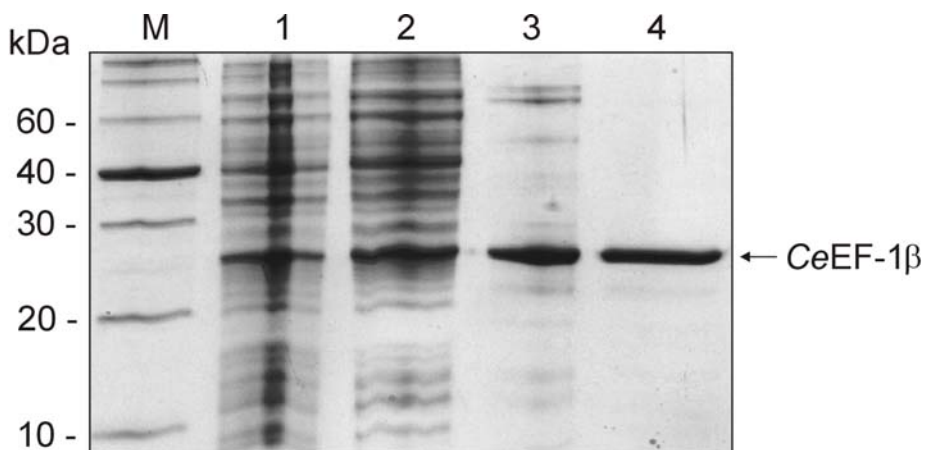


Abb. 3.5.8: Rekombinante Expression und Aufreinigung von CeEF-1 β aus *E. coli*

Die vier Spuren der 10%igen SDS-PAGE zeigen den Roti-Längenstandard (M), den Überstand der CeEF-1 β -exprimierenden Bakterien vor IPTG-Induktion (1), nach IPTG-Induktion (2) sowie CeEF-1 β nach Aufreinigung über Ni²⁺-Chelatchromatografie (3) und mittels Gelfiltration (4).

Die Gelfiltration von CeEF-1 β mittels FPLC (High Load 16/60 Superdex 75) ergab, dass der Faktor in Fraktion 27/28 (ca. 52/48 kDa) eluiert und damit unter nicht denaturierenden Bedingungen als Dimer vorliegt.

3.5.9 Protein-Protein-Interaktionen zwischen CeEF-1 γ und CeEF-1 β

Die Protein-Protein-Interaktionen zwischen den rekombinanten, aufgereinigten Untereinheiten CeEF-1 γ und CeEF-1 β wurden am Biacore 1000 analysiert. Dazu wurden 40 ng CeEF-1 γ in 1 mM Na²⁺-Acetat-Puffer an die Chipoberfläche des CM5-Sensorchips gekoppelt und zur Analyse der Bindungseigenschaft verschiedene Konzentrationen des CeEF-1 β nacheinander gemessen. Dabei wurden dieselben CeEF-1 β -Proben an BSA gebunden und als Hintergrund von den Messwerten abgezogen. Als Kontrolle wurde zudem überprüft, dass keine Bindung von BSA an CeEF-1 γ stattfindet. Als Ergebnis zeigte sich, dass CeEF-1 β spezifisch und konzentrationsabhängig an CeEF-1 γ bindet (vgl. Abb. 3.5.9).

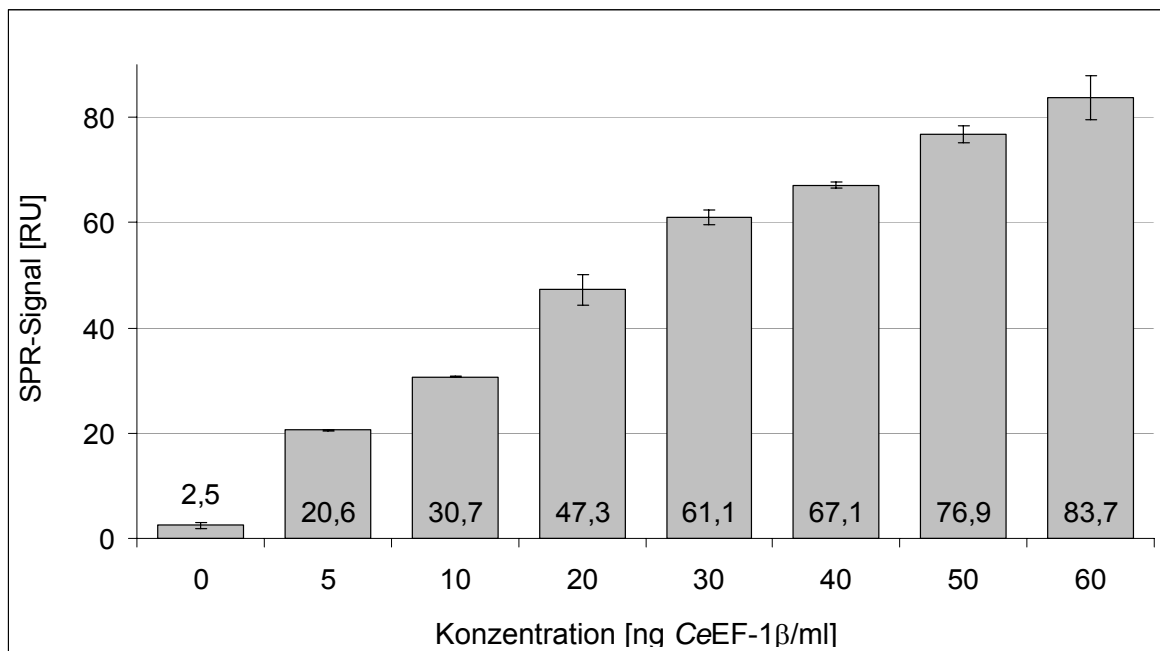


Abb. 3.5.9: Protein-Protein-Interaktionen zwischen CeEF-1 γ und CeEF-1 β

Im Biacore 1000 wurde rekombinanter CeEF-1 γ an einen CM5-Sensorchip gekoppelt und verschiedene Konzentrationen von rekombinantem CeEF-1 β an ihm gebunden. Das Diagramm zeigt die spezifische, konzentrationsabhängige Bindung zwischen den beiden Untereinheiten. Dabei wurde das „Surface Plasmon Resonance“ (SRP)-Signal der unspezifischen Bindung (CeEF-1 β an BSA) von den gemessenen Resonanz Units (RU) der CeEF-1 β -CeEF-1 γ -Bindung abgezogen.

Zur Bestimmung von GST-Aktivität wurden die beiden rekombinanten Untereinheiten CeEF-1 γ und CeEF-1 β in PBS dialysiert und für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. In dem anschließenden Enzymtest mit dem Substrat CDNB konnte keine GST-Aktivität festgestellt werden.

3.5.10 GST-Aktivität des CeEF-1-Komplexes

Da der rekombinante CeEF-1 γ weder alleine noch mit dem Elongationsfaktor CeEF-1 β zusammen GST-Aktivität aufweist, sollte er im nativen Komplex aus *C. elegans* aufgereinigt und untersucht werden.

Dazu wurde zuerst ein Vorversuch durchgeführt, in dem 0,1 g *C. elegans* über eine FPLC Superdex 200 aufgereinigt wurden und der CeEF-1-Komplex in einem Dot Blot mit Hilfe des Anti-CeEF-1 γ -Antikörpers in Fraktion 32 (500 – 700 kDa) lokalisiert werden konnte. Die detektierte Größe stimmt ungefähr mit der des gesamten Komplexes von 650 kDa überein (Vickers & Fairlamb, 2004a). Diese Fraktion 32 wurde in einem Western Blot überprüft und es konnte unter denaturierten Bedingungen die 44,4 kDa-Bande des CeEF-1 γ immundetektieren werden (Daten nicht gezeigt). In einem Enzymtest wies die Fraktion 32 eine GST-Aktivität von 120 nmol/min*mg auf.

Um die GST-Aktivität eindeutig dem Komplex zuordnen zu können und die verschiedenen Untereinheiten in einer 12,5% (w/v) SDS-PAGE lokalisieren zu können, wurde der CeEF-1-Komplex in einem weiteren Versuch aus *C. elegans* aufgereinigt. Dazu wurde Wurm-Homogenat von 1,5 g Würmern über eine Mono-Q-Sepharose- und eine Phenyl-Sepharose-Säule aufgetrennt (nach Vickers & Fairlamb, 2004a). Die 1 ml-Eluat der Mono-Q-Sepharose wurden mittels Anti-CeEF-1 γ -Antikörper in einem Dot Blot-Verfahren kontrolliert und zeigten eine Färbung in den Fraktionen 32 – 36 (vgl. 3.5.10.A).

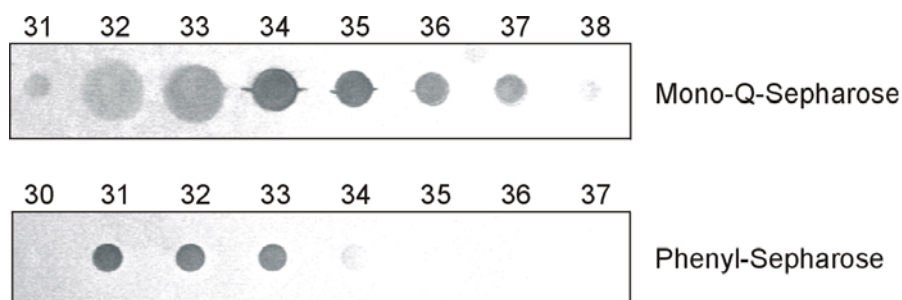


Abb. 3.5.10.A: Dot Blot-Analyse der FPLC-Fractionen von Mono-Q- und Phenyl-Sepharose

In den Eluat 32 – 36 der Mono-Q-Sepharose konnte der CeEF-1 γ des Komplexes mittels Anti-CeEF-1 γ -Antikörper detektiert werden. Diese Fraktionen wurden gepoolt und über Phenyl-Sepharose aufgereinigt. Dabei eluiert der Komplex in Fraktion 31 – 33.

Die positiven Fraktionen 32 – 36 der Mono-Q-Sepharose wurden gepoolt und es konnte eine GST-Aktivität von 43 nmol/min*mg bestimmt werden.

Zur weiteren Aufreinigung des CeEF-1-Komplexes wurden die gepoolten Fraktionen 32 – 36 der Mono-Q-Sepharose dialysiert und über eine Phenyl-Sepharose-Säule geschickt. Dabei konnte der Komplex mittels Dot Blot-Verfahren in den Fraktionen 31 – 33 detektiert werden (vgl. 3.5.10.A). Die Enzymaktivität dieser gepoolten Fraktionen beträgt 257 nmol/min*mg. Die Eluate beider Säulen wurden in einer SDS-PAGE unter denaturierten Bedingungen und in einem Western Blot mit Anti-CeEF-1 γ -Antikörper analysiert. Dabei konnten in der SDS-PAGE eindeutig vier Banden detektiert werden, die in ihrer Größe den vier Untereinheiten des CeEF-1-Komplexes entsprechen (vgl. Abb. 3.5.10.B – C).

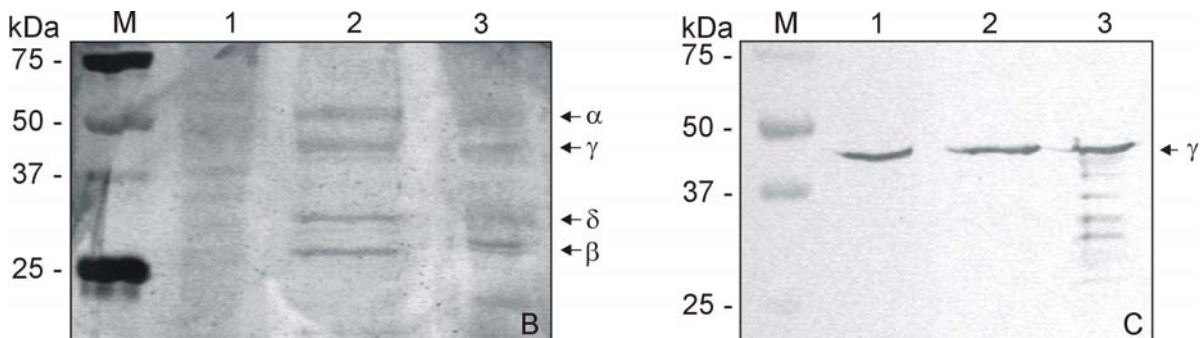


Abb. 3.5.10.B – C: SDS-PAGE und Western Blot-Analyse des CeEF-1-Komplexes

B: In einer 12,5% SDS-PAGE (Silberfärbung) wurde *C. elegans*-Extrakt (1), die Mono-Q-Sepharose Eluate (2) und die Eluate der Phenyl-Sepharose (3) aufgetragen. Die beiden Eluate zeigen die vier putativen Untereinheiten CeEF-1 α (50,7 kDa), CeEF-1 β (22,7 kDa), CeEF-1 γ (44,4 kDa) und CeEF-1 δ (28,3 kDa) des CeEF-1-Komplexes. Als Längenstandard (M) dient der „precision“-Marker (Bio-Rad). **C:** Der dazugehörige Western Blot wurde mit Anti-CeEF-1 γ inkubiert und bestätigt, dass es sich bei der detektierten 44,4 kDa-Bande um den CeEF-1 γ handelt. Er konnte sowohl in dem *C. elegans*-Extrakt (1) als auch in den Eluaten der Mono-Q-Sepharose (2) und der Phenyl-Sepharose detektiert werden. Als Längenstandard (M) wurde der „precision“-Marker (Bio-Rad) verwendet.

Der Western Blot bestätigt, dass es sich bei der 44,4 kDa-Bande um den CeEF-1 γ handelt und zeigt eine leichte Degradation der Proteine nach der Aufreinigung über die Phenyl-Sepharose-Säule. Um zu überprüfen, ob es sich bei den anderen drei Banden tatsächlich um die Untereinheiten CeEF-1 α (50,7 kDa), CeEF-1 β (22,7 kDa), und CeEF-1 δ (28,3 kDa) handelt, wurden die Proteinproben aus der SDS-PAGE ausgestochen, Trypsin-verdaut und mittels MALDI-TOF analysiert.

Die MALDI-TOF-Analyse wurde von Priv.-Doz. Dr. Joachim Clos am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin durchgeführt. Als Ergebnis konnte der CeEF-1 β mit einem signifikanten „Mouse-Score“ von 85 ($P < 0,0001$) nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.5.10.D). Die Analyse des putativen CeEF-1 α ergab überraschenderweise signifikante Übereinstimmungen des Proteins mit der Alpha-2-Kette von Tubulin. Dabei konnten 6 Polypeptide, die durch den Trypsin-Verdau des Proteins entstanden sind, der Sequenz des Tubulins zugeordnet werden, was einer Sequenzabdeckung von 22% entspricht. Somit wurde ein „Mouse-Score“ von 73 ($P < 0,0017$) bestimmt (vgl. Abb. 3.5.10.E). Der Trypsin-Verdau des putativen CeEF-1 δ ergab keine ausreichenden Polypeptide, um eine Zuordnung durchführen zu können.

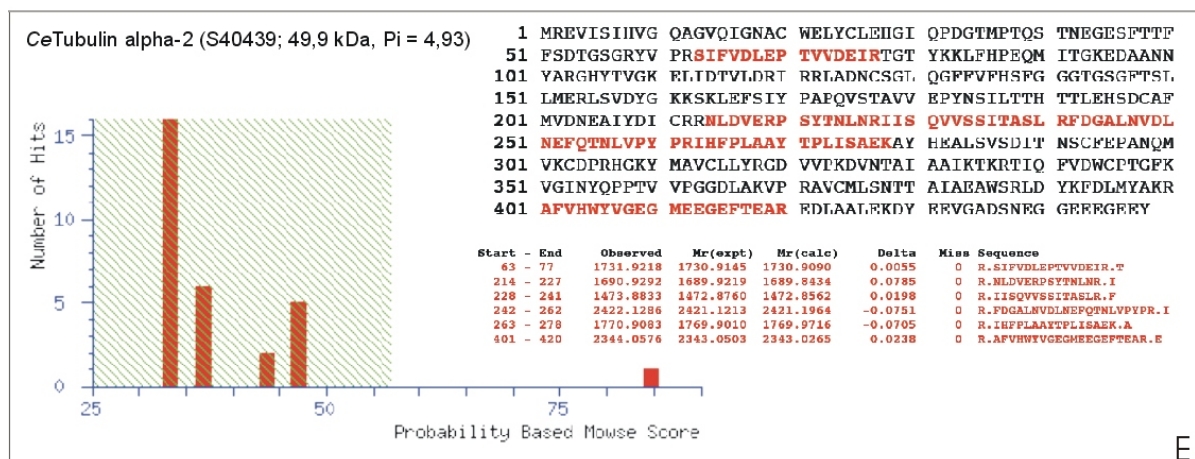
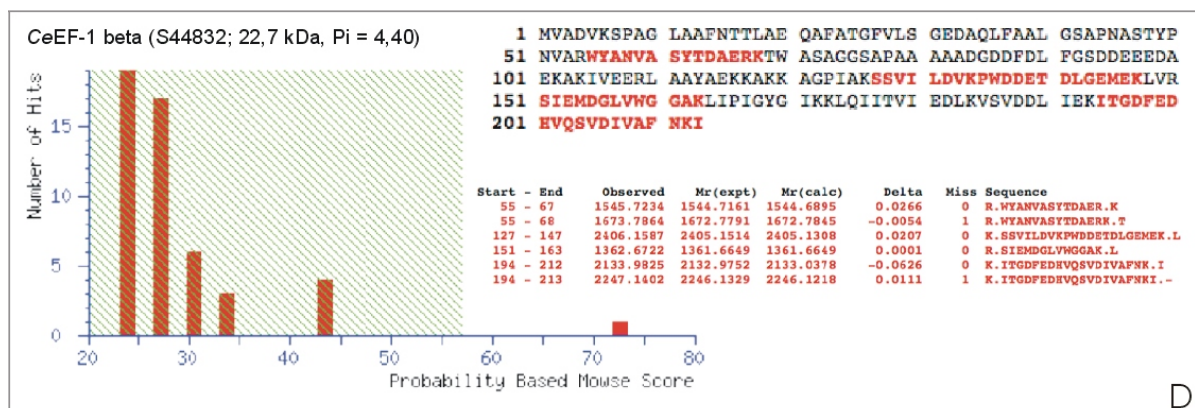


Abb. 3.5.10.D – E: MALDI-TOF-Analyse der putativen Untereinheiten des CeEF-1-Komplexes

D: Mit einem signifikanten „Mouse-Score“ von 85 ($P < 0,0001$) konnte das putative Protein CeEF-1 β mittels MALDI-TOF-Analyse als CeEF-1 β bestätigt werden. Die mit der Sequenz übereinstimmenden Polypeptide sind dabei in rot dargestellt. **E:** Die MALDI-TOF-Analyse des putativen CeEF-1 α ergab mit einem „Mouse-Score“ von 73 ($P < 0,0017$) eine signifikante Übereinstimmungen des Proteins mit der Alpha-2-Kette von Tubulin. Dabei wurde mit den 6 identifizierten Polypeptiden (in rot dargestellt) eine Sequenzabdeckung von 22% erreicht.

3.6 Strukturanalyse der PfGST1 von *Plasmodium falciparum*

3.6.1 Kristallisation der PfGST1

Durch die Röntgenstrukturanalyse von Kristallen ist es möglich, den dreidimensionalen Aufbau von Proteinen darzustellen und so Rückschlüsse auf ihre Funktionalität zu ziehen.

Die Spectroscatter-Analyse der CeGSTO-1 zeigte, dass sich das rekombinante Protein nicht als reines Homodimer in Lösung befand. Sowohl Veränderungen der Salz- und pH-Werte des Puffers als auch ein Entfernen des Histidin-Tags mittels Faktor Xa-Verdau verbesserte die Messwerte nicht. Somit war eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Kristallisation nicht gegeben und auf eine Kristallisation der Omega-GST wurde aus Zeitgründen verzichtet. Daher wurde für nähere Untersuchungen der GST-Struktur und GSH-Bindungstasche mittels Röntgenstrukturanalyse eine cytosolische GST gewählt, die bereits in der Arbeitsgruppe vorlag. Dabei handelt es sich um die PfGST1, eine GST der Mu-Klasse des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*. Diese plasmodiale GST (Genbank-Nr. AAL25087, 23,5 kDa) lässt sich in großen Mengen rekombinant in *E. coli* BL21(DE3)pLys exprimieren und sehr sauber, ohne störende Tags über GSH-Sepharose aufreinigen (vgl. Abb. 3.6.1.A, Liebau *et al.*, 2002).

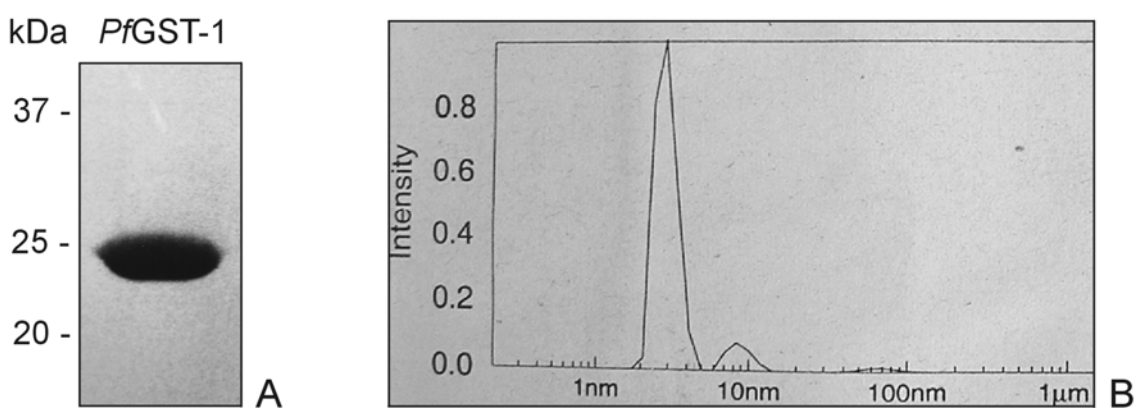


Abb. 3.6.1.A – B: Aufgereinigte PfGST1 und ihre Spectroscatter-Analyse

A: Die 12,5% (w/v) SDS-PAGE zeigt, dass die rekombinant in *E. coli* BL21(DE3)pLys exprimierte PfGST1 nach ihrer Aufreinigung über GSH-Sepharose in sehr sauberer Form vorliegt. **B:** Mittels „dynamic light scattering“ (DLS) im Spectroscatter 201 (RiNA GmbH) wurde die Monodispersität der rekombinanten PfGST1 überprüft. Der monomerische Radius (R_h) von 2,9 nm zeigt, dass das Protein fast ausschließlich als Homodimer vorliegt.

Die rekombinant hergestellte *PfGST1* weist GST-Aktivität auf und liegt fast ausschließlich als Dimer vor, wie die Spectroscatter-Analyse zeigt (vgl. Abb. 3.6.1.B).

Die Kristallisation erfolgte mit *PfGST1* (7 mg/ml in 100 mM Tris/HCl, pH 8,5; 2 mM GSH) nach der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen bei RT und zeigte bereits nach drei Tagen erste orthorhombische Kristalle (Mutterlösung: 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Nach einer Optimierung der Ammoniumsulfatkonzentration und des pH-Wertes (Mutterlösung: 100 mM Cacodylat-Puffer, pH 6,0, 2 mM GSH, 2,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) konnten native *PfGST1*-Kristalle mit einer Kantenlänge von 0,4 x 0,4 x 0,3 mm geerntet und vermessen werden (vgl. Abb. 2.6.1.C; Burmeister *et al.*, 2003).

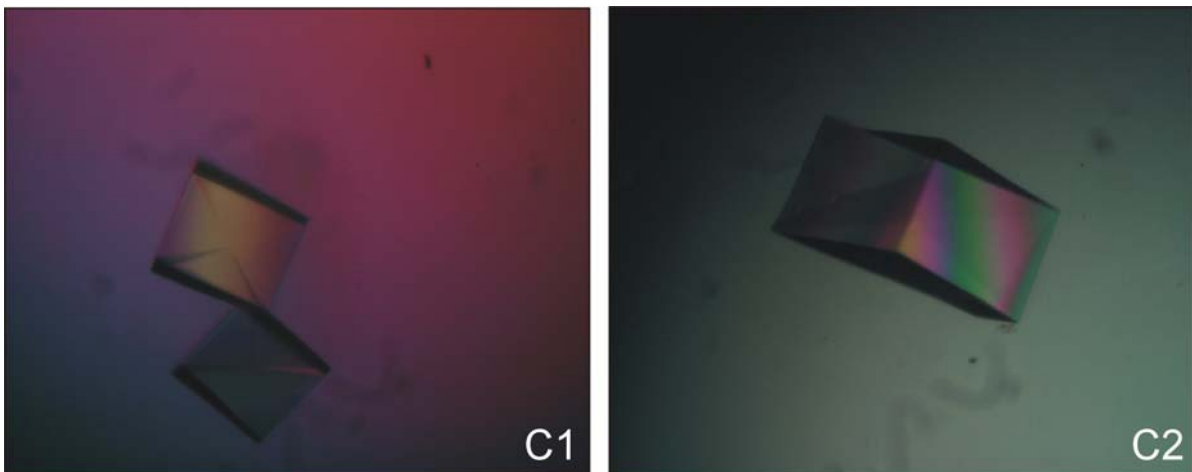


Abb. 3.6.1.C: Native Kristalle der *PfGST1*

Die anfänglich kleinen orthorhombischen Kristalle der *PfGST1* (C1) erreichten nach einer Optimierung der Kristallisationsbedingungen eine Kantenlänge von 0,4 x 0,4 x 0,3 mm (C2).

3.6.2 Vermessung der *PfGST1*-Kristalle

Bei der Vermessung der nativen *PfGST1*-Kristalle an der Drehanode wurden die Röntgenstrahlen an den Elektronen der Atome spezifisch abgelenkt und auf einem Schirm detektiert. Es konnte eine Auflösung von bis zu 2,5 Å erreicht werden, wobei der gesamte Datensatz mit einer Auflösung von 2,8 Å gesammelt wurde.

Die Parameter der Einheitszelle betragen $a = 62,2 \text{ \AA}$, $b = 88,3 \text{ \AA}$, $c = 75,3 \text{ \AA}$ mit $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Das Kristallgitter ist orthorhombisch und gehört zu der Raumgruppe $P2_12_12$ (vgl. Tab. 3.6.2; Burmeister *et al.*, 2003, Perbandt *et al.*, 2004).

Die asymmetrische Einheit enthält zwei Moleküle der PfGST1 (Matthew's Koeffizient = $2,1 \text{ \AA}^3/\text{Da}$) und weist damit eine homodimere Struktur auf. Der Wassergehalt des PfGST1-Kristalls liegt bei 40 – 44%. Die gemessenen Daten boten die Voraussetzung für eine Strukturanalyse, wobei die Auswertung der Daten und die Ermittlung der 3D-Struktur von Dr. M. Perbandt, DESY durchgeführt wurden (vgl. Kap. 4.8).

Tab. 3.6.2: Daten der Röntgenbeugung von PfGST1-Kristallen
(Werte in Klammern stammen von der letzten Messung bei $2,8 \text{ \AA}$)

	nativ	S-Hexyl-GSH
Strahlung	CuK α (50 kV, 100 mA)	Synchrotron
Gerät	Rigaku RU-200 Drehanode, RT	Consortium Beamline X13, HASYLAB, DESY, -173°C
Raumgruppe	$P2_12_12$	$P2_12_12$
Einheitszelle (\AA)	a=62,2, b=88,3, c=75,3	a=61,2, b=86,9, c=74,8
Wellenlänge (\AA)	1,54	0,802
Auflösungsbereich (\AA)	2,5 – 2,8	2,15
Anzahl einzelner Reflexionen	10.529	22.273
$I/\sigma I$	10,8 (3,8)	12,3 (4,1)
R_{sym} (%)	11,6 (37,5)	5,5 (31,0)
Vollständigkeit der Daten (%)	98,1 (97)	99,4 (99,8)

$R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl)|}{\sum_{hkl} \sum_i I(hkl)}$, wobei $I_i(hkl)$ die Intensität einer individuellen Messung und $I(hkl)$ die Durchschnittsintensität dieser Reflexion ist.

Um die Strukturveränderungen nach der Bindung des Inhibitors S-Hexyl-GSH zu untersuchen, wurden native Kristalle für 16 Stunden in der Reservoirolösung mit 5 mM S-Hexyl-GSH inkubiert und anschließend bei -173°C am Synchrotron (Beamline X13, HASYLAB, DESY) vermessen. Hierbei wurde eine Auflösung von $2,15 \text{ \AA}$ erreicht (vgl. Tab. 3.6.2).

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Sequenz und Phylogenie der CeGSTO-1

4.1.1 Analyse der Nukleotidsequenz von *cegsto-1*

Die Sequenz von *cegsto-1* wurde bereits während des Sequenzierungsprojektes des Genoms von *C. elegans* gefunden (Wilson *et al.*, 1994). Später konnte durch Sequenzalignments festgestellt werden, dass dieses hypothetische 28,5 kDa Protein „p29“ die höchste Aminosäureidentität von 33% zu der Omega-GST der Maus besitzt (Kodym *et al.*, 1999). Mittlerweile sind Sequenzen von Omega-GSTs bei verschiedenen Organismen bekannt, wie z.B. beim Menschen (Genbanknr. AF212303), Schwein (Genbanknr. Q9N1F5), Ratte (Genbanknr. AB008807), Maus (Genbanknr. U80819), Pufferfisch (Genbanknr. Q90XY6), *Anopheles gambiae* (AAP13482), *Drosophila melanogaster* (Genbanknr. AAF50405), *S. mansoni* (Genbanknr. AF48494) und *O. volvulus* (Genbanknr. AF203814). Das Wissen über die genaue Funktion dieser relativ neuen GST-Klasse ist allerdings noch sehr begrenzt und bedarf noch einiger Untersuchungen.

Das Gen *cegsto-1* besteht aus 1.424 bp und wird von drei Introns unterbrochen, wobei die 5'-gt-ag-3'-Regel konserviert ist. Die Introns sind sehr viel kürzer als bei dem nahen Verwandten *C. briggsae*, was sich besonders bei dem ersten Intron zeigt, dass nur ein fünfzehntel der Größe von dem bei *C. briggsae* aufweist. Diese Beobachtung ist nicht ungewöhnlich, da die Hälfte der Introns bei *C. elegans* weniger als 60 bp umfassen. Eine Spleißleitsequenz konnte bei *cegsto-1* nicht identifiziert werden. Das Trans-Spleißen ist von der Omega-GST in *O. volvulus* bekannt (Kampkötter *et al.*, 2003, Höppner unveröffentlicht) und wird aufgrund von zwei unterschiedlich großen Transkripten im Northern Blot (1,1 kb und 1,3 kb) auch beim Schwein und bei der Maus vermutet (Rouimi *et al.*, 2001, Kodym *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu sind in den verschiedenen Geweben des Menschen keine unterschiedlichen Transkriptgrößen der GSTO1-1 festzustellen (Board *et al.*, 2000; Whitbread *et al.*, 2003).

Das Gen *cegsto-1* liegt in keinem Operon vor und schließt sich damit der Mehrheit der Gene bei *C. elegans* an, denn lediglich 15% der *C. elegans*-Gene sind in

Operons organisiert (Blumenthal *et al.*, 2002). Das Genom von *C. elegans* ist als sehr AT-reich beschrieben worden und enthält insgesamt 64% AT bzw. 50% AT in den Exons (Sulston & Brenner, 1974). Somit lässt sich auch bei der Nukleotidsequenz von *cegsto-1* ein hoher Anteil an AT feststellen, der insgesamt bei 63,3% liegt (57,5% in den Exons, 69,8% in den Introns). Zusätzlich zu der *cegsto-1* konnten bei *C. elegans* noch drei weitere Omega-GSTs identifiziert werden (F13.A7.10/Genbanknr. CAB07572, K10F12.4/Genbanknr. AAB71002 und C02D5.3/Genbanknr. P34277), die noch nicht weiter charakterisiert worden sind. Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus sind zwei Omega-GSTs bekannt, wobei die humanen GSTO1 und GSTO2 in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden, aber ein ähnliches Substratprofil aufzeigen (Wang *et al.*, 2005).

4.1.2 Phylogenetische Analyse von CeGSTO-1

Die phylogenetische Analyse der CeGSTO-1 erfolgte durch die Erstellung eines multiplen Alignments und dessen Auswertung in Form eines radiären Stammbaums. Die Auswertung wurde dabei zum einen nach der Methode „Neighbor-Joining“ vorgenommen (Saitou *et al.*, 1987, Board *et al.*, 2000, Girardini *et al.*, 2002), zum anderen nach der Methode „Minimum Evolution“ (Kidd *et al.*, 1971, Rzhetsky *et al.*, 1992a, 1992b), eine Methode die immer wieder im Vergleich zu „Neighbor-Joining“ diskutiert wird (Willson, 2004, Gascuel *et al.*, 2001).

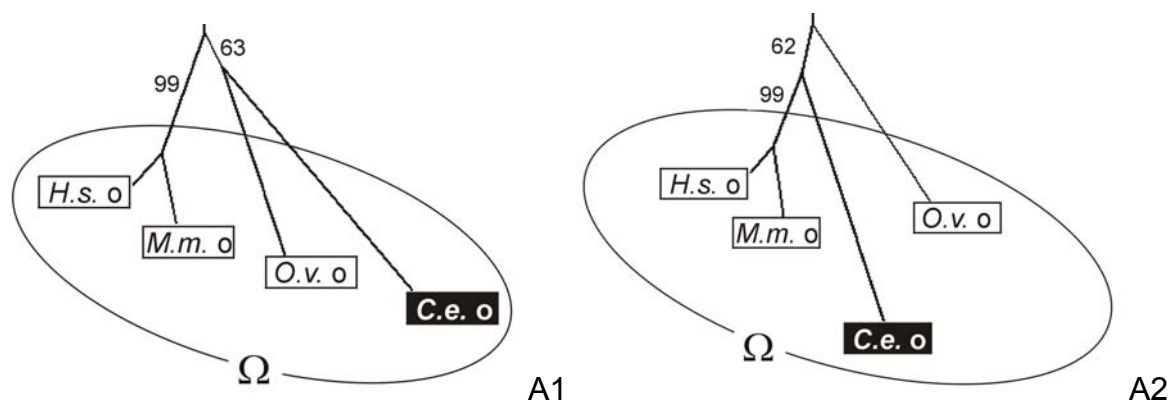


Abb. 4.1.2.A: Vergleich der phylogenetischen Einordnung von CeGSTO-1 in die Omega-Klasse nach zwei verschiedenen Methoden

Bei der phylogenetische Analyse nach der Methode „Minimum Evolution“ (**A1**) ergibt sich eine evolutionäre Spaltung der Omega-GSTs in die Gruppe der Säugetier-GSTs und in die Gruppe der Nematoden-GSTs. Im Vergleich dazu gruppiert sich die CeGSTO-1 nach der Methode „Neighbor Joining“ (**A2**) näher zu den Omega-GSTs der Säugetiere als zu der OvGST3 von *O. volvulus*.

Mit beiden Methoden wurde jeweils der wahrscheinlichste Stammbaum berechnet und es konnte eine Gruppierung der verschiedenen GSTs in ihren jeweiligen Klassen festgestellt werden. Die CeGSTO-1 lässt sich dabei eindeutig der Omega-Klasse zuordnen. Dieses Ergebnis wird durch die Stammbaumanalysen von Board *et al.* (2000) und Girardini *et al.* (2002) bestätigt. Dabei ist erwartungsgemäß eine sehr enge Verwandtschaft innerhalb der Omega-GSTs der Säugetiere (Maus, Ratte, Mensch) zu erkennen. Überraschenderweise zeigte sich allerdings eine Abweichung bei der Anwendung der beiden Methoden innerhalb der Gruppe der Omega-GSTs: Die Nematoden-GSTs spalten sich in der Evolution nach der Methode „Minimal Evolution“ von den Säugetier-GSTs ab, so dass sich zwei Gruppen innerhalb der Omega-GSTs bilden. Dahingegen gruppiert sich die CeGSTO-1 nach der „Neighbor-Joining“ Methode näher zu den Säugetier-GSTs als zu der OvGST3 von *O. volvulus* (vgl. Abb. 4.1.2.A).

Eine enge Verwandtschaft der Omega-GSTs innerhalb der Nematoden und innerhalb der Säugetiere scheint auf den ersten Blick schlüssig, wohingegen eine Betrachtung der hohen Sequenzidentität auf Aminosäureebene der CeGSTO-1 zu der HsGSTO1-1 (34%) im Gegensatz zu der OvGST3 (26%) auf eine nahe Verwandtschaft der CeGSTO-1 zur humanen GST deuten könnte. Die Aminosäureidentität zwischen der OvGST3 und der HsGSTO1-1 liegt sogar nur bei 23%.

Zur näheren Untersuchung der phylogenetischen Anordnung innerhalb der Omega-Klasse wurde ein Alignment und ein Stammbaum ausschließlich mit Omega-GSTs verschiedener Organismen erstellt. Dabei zeigt das Alignment, dass die Sequenzidentität der CeGSTO-1 zu den GSTs der Säugetiere höher ausgeprägt ist als zu den der Helminthen (vgl. Abb. 4.1.2.B). Trotzdem verdeutlicht die folgende Stammbaumanalyse – durchgeführt nach beiden Methoden – eine Gruppierung der Omega-GSTs in die Gruppe der Säugetiere sowie in die Gruppe der Omega-GSTs von Nematoden (vgl. Abb. 4.1.2.C).

Somit wird in dieser Arbeit postuliert, dass die CeGSTO-1, trotz der hohen Sequenzidentität zu den Säugetieren, evolutionär den Omega-GSTs der Nematoden näher steht.

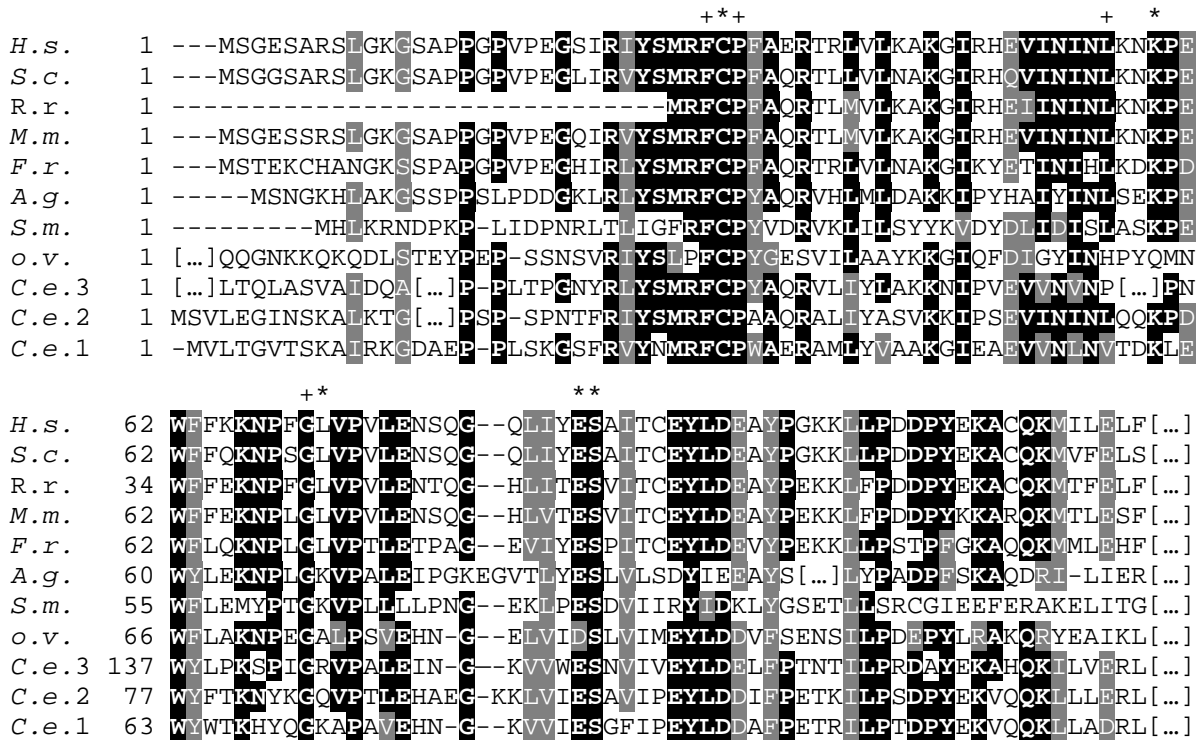


Abb. 4.1.2.B: Alignment der N-terminalen Sequenzen verschiedener Omega-GSTs

Identische Aminosäurereste sind schwarz, ähnliche Aminosäurereste grau hinterlegt. Ein Stern (*) kennzeichnet die Aminosäurereste der *HsGSTO1-1*, die direkt mit dem GSH in Kontakt treten, ein Kreuz (+) markiert die Reste, die eine GSH-Bindung beeinflussen (Board *et al.*, 2000). **Organismen:** *A.g.* (*Anopheles gambiae*, AAP13482), *C.e.1 – 3* (*Caenorhabditis elegans*, (C29E4.7/AAA27959, F13.A7.10/CAB07572, K10F12.4a/AAB71002), *F.r.* (*Fugu rubripes*, Q90XY6), *H.s.* (*Homo sapiens*, Genbanknr. AF212303), *M.m.* (*Mus musculus*, U80819), *O.v.* (*Onchocerca volvulus*, AF203814), *R.r.* (*Rattus rattus*, AB008807), *S.c.* (*Sus crofa*, Q9N1F5), *S.m.* (*Schistosoma mansoni*, AF484940).

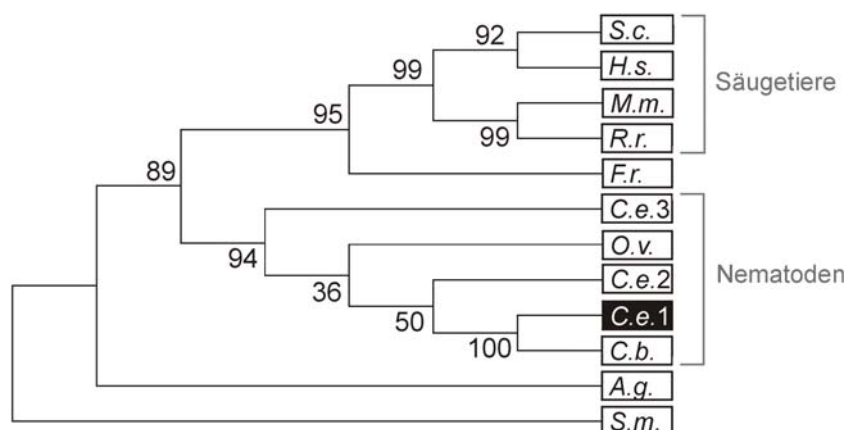


Abb. 4.1.2.C: Phylogenetische Analyse der Omega-GSTs verschiedener Organismen

Die *CeGSTO-1* (schwarz hervorgehoben) wurde phylogenetisch mit Omega-GSTs verschiedener Organismen analysiert. Die „bootstrap“-Zahlen geben Auskunft über die Zuverlässigkeit des Stammbaums an der jeweiligen Verzweigung. Abkürzungen siehe Abb. 4.1.2.B. Der Stammbaum zeigt eine deutliche Gruppierung der Omega-GSTs von Säugetieren und von Nematoden.

4.1.3 Diskussion der Aminosäuresequenz der CeGSTO-1

Bei der Analyse der Aminosäuresequenz der CeGSTO-1 mittels Alignment mit anderen GSTs fallen neben dem hochkonservierten N-Terminus, der die GSH-Bindungsdomäne enthält, noch zwei Besonderheiten auf, die für Omega-GSTs charakteristisch sind. Zum einen besitzt die CeGSTO-1, genau wie die anderen GSTs der Omega-Klasse, eine N-terminale Verlängerung, zum anderen ist bei ihr auch das Cystein im aktiven Zentrum konserviert.

Andere eukaryotische GSTs weisen im Gegensatz zu der Omega-Klasse i.d.R. statt eines aktiven Cysteinrestes charakteristische Tyrosin- (Alpha-, Mu-, Pi-, Sigma-Klasse) bzw. Serinreste (Delta-, Tau-, Theta-, Phi-, Zeta-, Klasse) auf. Es wird generell vermutet, dass hierbei eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem GSH und der OH-Gruppe des Tyrosin- bzw. Serinrestes ausgebildet wird, um das GSH in seiner reaktiven Thiolform zu stabilisieren (Armstrong, 1997). Ein aktives Cystein wurde nur bei wenigen GSTs anderer Klassen beschrieben (Beta-, Lambda-Klasse) und ist hauptsächlich von Thioltransferasen (Glutaredoxinen) bekannt. Das verdeutlicht die nahe Verwandtschaft der Omega-GSTs zu den Glutaredoxinen.

Strukturanalysen der humanen Omega-GST GSTO1-1 ergaben, dass das nukleophile Cys-32 am N-Terminus der alpha-Helix 1 genauso angeordnet ist, wie in dem Thiothioninmotiv von Thiothionin, Glutaredoxin und DsbA. Dabei wird es vermutlich durch ein Pro-33 in der optimalen Position gehalten und stabilisiert (Kortemme & Creighton, 1995). Bei der humanen GSTO-1-1 scheint es, als könne der Cysteinrest Disulfidbrücken mit dem GSH bilden (Board *et al.*, 2000). Die Primärstruktur der CeGSTO-1 weist diese beiden konservierten Aminosäurereste ebenfalls auf. Somit lässt sich vermuten, dass das aktive Cys-33 bei der GSH-Bindung durch das Pro-34 in einer optimalen Position stabilisiert wird.

Die Bedeutung der N-terminalen Verlängerung ist derzeit noch unbekannt. Board *et al.* (2000) untersuchten die Struktur der humanen Omega-GST mittels Kristallstruktur-Analyse und stellten fest, dass die 19 Prolin-reichen Aminosäurereste der N-terminalen Verlängerung den C-Terminus der GSTO1-1 binden. Dabei bildet sich eine neuartige Struktur aus, deren Funktion noch nicht bekannt ist.

4.2 Enzymatische Aktivität rekombinanter CeGSTO-1 *in vitro*

Die berechnete molekulare Masse der CeGSTO-1 beträgt 28,5 kDa. Damit ist die CeGSTO-1 von *C. elegans* nur geringfügig größer als Omega-GSTs von anderen Organismen, wie *S. mansoni* (27,6 kDa, Girardini *et al.*, 2002), Maus (27,5 kDa, Kodym *et al.*, 1999), Schwein (27,3 kDa, Rouimi *et al.*, 2001) oder dem Menschen (27,6 kDa, Board *et al.*, 2000).

Ein Substratprofil der CeGSTO-1 wurde erstellt, um die Einordnung der CeGSTO-1 in die Omega-Klasse und die nahe Verwandtschaft zu den Glutaredoxinen zu bestätigen und die Funktion der CeGSTO-1 näher zu erschließen. Für die Untersuchungen der katalytischen Eigenschaften *in vitro* wurde die CeGSTO-1 rekombinant in *E. coli* hergestellt. Das mittels Gelfiltration bestimmte Molekulargewicht der rekombinanten, enzymatisch aktiven CeGSTO-1 von ca. 60 kDa lässt darauf schließen, dass das Enzym als Homodimer vorliegt.

Zudem war keine Bindung der CeGSTO-1 an GSH-Agarose festzustellen. Diese Eigenschaft ist für Enzyme der Omega-Klasse charakteristisch und wurde sowohl für die Omega-GST von *O. volvulus* (Kampkötter *et al.*, 2003) als auch für die Omega-GST von *S. mansoni* (Girardini *et al.*, 2002) und dem Menschen (Board *et al.*, 2000) beschrieben. Die einzige derzeit bekannte Ausnahme in der Omega-Klasse ist dabei die GST p28 der Maus, die sich an Agarose-gekoppeltes GSH binden ließ (Kodym *et al.*, 1999). Dabei wird allerdings vermutet, dass diese Bindung durch die Verwendung einer GSH-Agarose (Sigma G-9761) zustande gekommen ist, bei der GSH über seine Aminogruppe an die Agarose gekoppelt wurde. Dadurch liegt die Thiolgruppe des GSHs frei vor und kann eine Disulfidbindung mit dem aktiven Cystein der Omega-GST eingehen. Im Gegensatz dazu wurden sonst Agarosen verwendet, an die das GSH über seine Thiolgruppe gekoppelt wurde, so dass keine kovalente Bindung der Omega-GST an die GSH-Agarose möglich war (Board *et al.*, 2000). Die CeGSTO-1 zeigt allerdings eine sehr starke Bindung an S-Hexyl-GSH-Agarose, eine Eigenschaft, die auch für die Omega-GSTs von *S. mansoni* und vom Schwein beschrieben wurde (Girardini *et al.*, 2002, Rouimi *et al.*, 2001). Dieses Bindungsverhalten war für eine Aufreinigung der nativen CeGSTO-1 aus *C. elegans* von großem Vorteil, da sich das native Enzym ohne eine Konzentration über S-Hexyl-GSH-Agarose im Western Blot nicht nachweisen ließ.

Bei Untersuchungen der katalytischen Fähigkeiten von rekombinanter CeGSTO-1 zeigte das Enzym als höchste Enzymaktivitäten eine GSH-abhängige Thioltransferaseaktivität von $0,192 \pm 0,014 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ und eine DHAR-Aktivität von $0,186 \pm 0,037 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$. Dahingegen konnte nur eine verhältnismäßig geringe bzw. gar keine Aktivität mit herkömmlichen GST-Substraten, wie z.B. dem Substrat CDNB, das von GSTs der Klassen Alpha, Mu und Pi bevorzugt umgesetzt wird oder dem *trans*-2-nonenal, einem beliebten Substrat der Alpha-Klasse, festgestellt werden (vgl. Tab. 4.2). Eine Betrachtung der dazugehörigen K_m -Werte zeigt, dass die CeGSTO-1 eine höhere Affinität zu HEDS ($70,77 \pm 7,71 \mu\text{M}$) als zu dem Substrat DHA ($184,1 \pm 25,45 \mu\text{M}$) besitzt. Ähnliche Präferenzen sind von der Omega-GST von *S. mansoni* bekannt, wobei die K_m -Werte mit $230 \mu\text{M}$ für HEDS und $2300 \mu\text{M}$ für DHA eine viel geringere Substrataffinität erkennen lassen als bei der CeGSTO-1 (Girardini *et al.*, 2002).

Substrat	CeGSTO-1 [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$] (diese Arbeit)	SmGSTO [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$] (Girardini <i>et al.</i> , 2002)	HsGSTO1-1 [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$] (Board <i>et al.</i> , 2000)
HEDS	$0,192 \pm 0,014$	0,11	$2,92 \pm 0,120$ ($1,12 \pm 0,06$ Tanaka-Kagawa <i>et al.</i> , 2003)
DHA	$0,186 \pm 0,037$	0,20	$0,16 \pm 0,005$
CDNB	$0,106 \pm 0,010$	0,02	$0,18 \pm 0,006$ ($0,14 \pm 0,01$ Tanaka- Kagawa <i>et al.</i> , 2003)
Ethacrynsäure	n.d.	0,02	n.d.
DCNB	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -Nitrophenylacetat	n.d.	n.b.	$0,06 \pm 0,012$
COOH	$0,032 \pm 0,004$	n.b.	n.d.
<i>trans</i> -2-nonenal	n.d.	n.b.	$0,03 \pm 0,003$

Tab. 4.2: Die katalytischen Fähigkeiten der CeGSTO-1 im Vergleich zu der Omega-GST von *S. mansoni* (SmGSTO) und *H. sapiens* (HsGSTO1-1). n.b. = nicht bestimmt, n.d. = nicht detektiert.

Die Thioltransferase- und DHAR-Aktivitäten kommen i.d.R. bei anderen GST-Klassen nicht vor, als Ausnahmen sind hier lediglich die Lambda-Klasse der Pflanzen und die Beta-Klasse der Bakterien zu nennen sowie eine Mu-GST GSTM1-1 vom Rind, die eine geringe Thioltransferaseaktivität von $0,074 \mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ aufweist (Dixon *et al.*, 2002, Caccuri *et al.*, 2002, Dal Monte *et al.*, 1998).

Da diese Enzymaktivitäten unter den anderen GST-Klassen nicht weit verbreitet sind, gelten sie als charakteristisch für GSTs der Omega-Klasse. Die Thioltransferase- und die DHAR-Aktivität konnten bereits bei Omega-GSTs von *S. mansoni* (Girardi *et al.*, 2002), Ratte (Ishikawa *et al.*, 1998), Schwein (nur DHAR, Rouimi *et al.*, 2001), und Mensch (Board *et al.*, 2000) beschrieben werden. Dabei zeigt die GSTO1-1 des Menschen ebenfalls als höchste Aktivität eine Thioltransferase-Aktivität und auch die *SmGSTO* von *S. mansoni* setzt die Substrate HEDS und DHA um (vgl. Tab. 4.2). Die humane GSTO2 besitzt ebenfalls diese beiden Enzymaktivitäten, sie weist allerdings noch zusätzlich eine hohe katalytische Aktivität mit CDNB auf (Wang *et al.*, 2005).

Die Thioltransferase- und die DHAR-Aktivität sind seit langem bei Glutaredoxinen bekannt und in verschiedenen Organismen und Geweben nachgewiesen worden (Wells *et al.*, 1990, Washburn *et al.*, 1999). Die DHAR-Aktivität des Glutaredoxins der Schweineleber liegt beispielsweise in einer Größenordnung von $134 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ (Wells *et al.*, 1995). Glutaredoxine sind kleine, saure Moleküle mit dem aktiven CXXC-Motiv, die als „Reparatur-Enzyme“ wirken. Sie katalysieren u.a. die Reduktion von Protein-Disulfiden mit GSH (Protein-S-S-GSH) oder Cystein, ein Vorgang, der als Dethiolation bezeichnet wird (Gravina *et al.*, 1992; Lou, 2003). Da die Entstehung von gemischten Protein-Disulfiden (Thiolation) häufig zu einer Bildung von Protein-Protein-Disulfiden und einer Konformationsänderung sowie Inaktivierung der Proteine führt, ist die Reduktion der Protein-Disulfide durch Thioltransferasen ein wichtiger Redoxmechanismus in der Zelle. Zusätzlich sind Thioltransferasen an der DNA-Synthese beteiligt, indem sie die Reduktion der Ribonukleotid Reduktase in Gegenwart von GSH-Reduktase, NADPH und GSH katalysieren (Cotgreave *et al.*, 1998). Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion und Detoxifikation.

Die CeGSTO-1 wurde in einem Thioltransferasetest mit den Proteinen Kollagen und Insulin als Substrate untersucht, um festzustellen, ob CeGSTO-1 die Reduktion von Protein-Disulfiden katalysieren kann. Dabei wurde eine geringe Thioltransferaseaktivität von 25 nmol/min*mg festgestellt. Untersuchungen an GSTs der Mu- und Pi-Klasse zeigten am Beispiel von Crystallin-Disulfiden, dass auch GSTs die Fähigkeit der Dethiolation besitzen. Dabei ist ihre Aktivität allerdings um 60% geringer als die von Thioltransferasen (Raghavachari *et al.*, 1999). Die Ergebnisse der CeGSTO-1 weisen darauf hin, dass es sich bei Kollagen und Insulin zwar nicht um die natürlichen Substrate der CeGSTO-1 handelt, aber dass das Enzym grundsätzlich in der Lage ist, die Reduktion von Protein-Disulfiden zu katalysieren.

Damit weist die Omega-Klasse der GSTs sowohl strukturelle als auch funktionelle Übereinstimmungen zu den Glutaredoxinen auf. Daher lässt sich vermuten, dass die Omega-Klasse eine intermediäre Stellung zwischen der GST Superfamilie und den Thioldisulfid-Oxidoreduktasen einnimmt. Neben der Omega-Klasse gibt es noch zwei GST-Klassen, die sowohl Thioltransferase-Aktivität aufweisen als auch einen Cysteinrest in ihrem aktiven Zentrum enthalten. Dabei handelt es sich um die prokaryotische GSTB1-1 der Beta-Klasse von *Proteus mirabilis*, die ein aktives Cys-10 und CDNB- sowie Thioltransferaseaktivität besitzt und die Lambda-GST von *Arabidopsis thaliana*, die ebenfalls ein aktives Cystein (Cys-20) und Thioltransferaseaktivität aufweist (Caccuri *et al.*, 2002; Dixon *et al.*, 2002). Somit wäre auch bei diesen Enzymen eine intermediäre Stellung denkbar.

4.3 Analyse des *cegsto-1*-Expressionsmusters in *C. elegans*

Eine gewebsspezifische Expression von *cegsto-1* konnte mittels CeGSTO-1::GFP-Fusionsprotein in allen 20 Zellen des Darmtrakts von *C. elegans* festgestellt werden. Diese Lokalisation wurde immunhistologisch und elektronenmikroskopisch bestätigt. Die Primärfunktionen aller Intestinalzellen sind die Sekretion von Verdauungsenzymen ins Lumen und die Resorption von Nährstoffen. Zusätzlich kommen den Intestinalzellen adulter Hermaphroditen noch Funktionen zu, wie das Synthetisieren von Eidotterproteinen, die in das Pseudocoel sekretiert und zu den Gonaden transportiert werden sowie die Speicherung von Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen (Kimble & Sharrock, 1983, Wood *et al.*, 1985).

Da es sich bei dem Darm um ein Organ handelt, das eine Außenwelt-Barriere zwischen dem Organismus und seiner Umwelt darstellt, wird er permanent mit Giftstoffen wie Mutagenen, Karzinogenen und Oxidantien aus der Nahrung bzw. mit endogen entstandenen, reaktiven Stoffwechselprodukten und Sauerstoffradikalen konfrontiert. Um Schäden bei der Entwicklung und Funktion des Darms z.B. durch Lipidperoxidation zu verhindern, besitzt der Darm verschiedene Verteidigungsmechanismen und eine große Menge an GSH und antioxidativen Enzymen (Aw, 2005). Die Lokalisation der CeGSTO-1 in den Darmzellen weist darauf hin, dass der Bedarf an der Omega-GST im Darm besonders hoch ist und ihr eine wichtige Entgiftungsfunktion im Darm zukommen könnte.

Betrachtet man die Lokalisation der Omega-GST im Menschen, konnte die humane GSTO1-1 mittels Northern Blot, Immunhistologie und EST-Screen in sämtlichen menschlichen Geweben – insbesondere in Leber und Herz sowie in Pankreas, Prostata, Niere, Lunge und Darm – festgestellt werden (Board *et al.*, 2000, Yin *et al.*, 2001). Laut Yin *et al.* (2001) kann dabei eine Expression der Omega-GST in Endothelzellen, Lymphocyten und glatten Muskelzellen ausgeschlossen werden. Die Omega-GST der Maus zeigte ebenfalls eine starke Expression in Leber, Lunge und Herz sowie eine schwächere Expression in Niere, Milz, Muskulatur und Gehirn (Kodym *et al.*, 1999) und auch die Omega-GSTs von Ratte und Schwein werden vermehrt in der Leber nachgewiesen (Ishikawa *et al.*, 1998, Rouimi *et al.*, 2001). Die humane GSTO2 wird vermehrt in Pankreas und Prostata exprimiert (Wang *et al.*, 2005).

Die stadienspezifische Lokalisation der CeGSTO-1 zeigte keine Expression in den Eiern/Embryonen von *C. elegans* und eine stärkere Expression in L3-Larven als in adulten Würmern. Dieses Ergebnis konnte mit immunhistologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit Hilfe des Anti-CeGSTO-1-Antikörpers gestützt werden und stimmt mit der stadienspezifischen Lokalisation der Sigma-GST p24 von *C. elegans* überein (Leiers *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2001). Es deutet daraufhin, dass CeGSTO-1 in Embryonalstadien noch nicht exprimiert wird, was mit Differenzierungsvorgängen im Darm zusammenhängen könnte (vgl. Kapitel 4.4).

4.4 Promotoranalyse von *cegsto-1*

Mittels Promotordeletionen bei *cegsto-1* wurde festgestellt, dass der Minimalpromotor ca. 300 bp groß ist und dass sich 5'-wärts des Nukleotids -254 bp (vor dem ATG) essentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für eine Expression von *cegsto-1* befinden. In diesem Bereich befinden sich GATA-Boxen und Oct-1-Bindungsmotive. GATA-Boxen sind für die Regulation von gastrointestinalen Proteinen zuständig und Oct-1 ist an entwicklungsspezifischer Genexpression beteiligt. Mittels Deletionkonstrukten und Mutagenese der Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle GATA-1(a) (-257 – -268 bp vor dem ATG) konnte festgestellt werden, dass diese GATA-Box für eine Expression von *cegsto-1* im Darm essentiell ist. Ein ähnliches Ergebnis konnten auch Britton *et al.* (1998) erzielen, die die GATA-Box (212 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt) einer Cystein-Protease von *Haemonchus contortus* untersuchten und feststellten, dass die GATA-Box essentielle für die Transkription des Gens im Darm ist.

Für die weiterführende Untersuchung der Promotorregion von *cegsto-1* wurden GATA-bindende Transkriptionsfaktoren näher analysiert und die Faktoren ELT-2 und ELT-4 mittels RNAi blockiert, um ihre Beteiligung an einer Expression von *cegsto-1* zu analysieren. Dabei wurde festgestellt, dass sich Würmer ohne ELT-4 schlechter vermehrten und keine *cegsto-1*-Expression mehr zeigten, was auf eine mögliche Interaktion des Transkriptionsfaktors mit der essentiellen GATA-1(a)-Box hindeuten könnte.

Die 20 Darmzellen von *C. elegans* haben ihren Ursprung von einer E-Zelle im 8-Zell-Stadium des Embryos (Sulston *et al.*, 1983). An der Zelldifferenzierung des Endoderms sind dabei verschiedene GATA-bindende Transkriptionsfaktoren, wie MED-1/2, END-1/3 und ELT-2/7/4 beteiligt (Maduro & Rothman, 2002). Insbesondere die Transkriptionsfaktoren ELT-2, ELT-7 und ELT-4 sind für die Differenzierung und Entwicklung des Darms zuständig. ELT-2 bindet an Tandem-GATA-Boxen und besitzt wie ELT-7 die Fähigkeit, an seinen eigenen Promotor zu binden (Fukushige *et al.*, 1998). Beide zusammen sind synergistisch an der Ausbildung eines funktionstüchtigen Darms beteiligt, indem sie die Fähigkeit besitzen, nicht-endodermale Vorläuferzellen in Darm-Stammzellen umzuwandeln. So wird vermutet, dass sie für die Aufrechterhaltung des differenzierten Zustandes des Darms verantwortlich sind und die Darmfunktion während des gesamten

Lebens eines Organismus gewährleisten (Maduro & Rothman, 2002). Ein gleichzeitiger „Knock-down“ beider Faktoren resultiert in einem unterentwickelten bzw. nicht funktionsfähigen Darm. Der kleine GATA-bindende Transkriptionsfaktor ELT-4 (8,1 kDa) weist genauso wie ELT-2 das Zinkfinger-Motiv auf und könnte daher ähnliche Eigenschaften besitzen. Allerdings wird ELT-4 erst später exprimiert und kann keine Darmdifferenzierung induzieren. Somit scheint ELT-4 etwas abweichende Funktionen zu ELT-2 zu übernehmen und nicht redundant zu ELT-2/7 zu sein. In Eiern und Embryostadien konnte keine *cegsto-1*-Expression lokalisiert werden, was möglicherweise damit zusammenhängen könnte, dass die Transkriptionsfaktoren ELT-2/7 erst im E4-Stadium und der ELT-4 noch später exprimiert werden und damit im undifferenzierten, embryonalen Darm noch nicht vorzufinden sind (Maduro & Rothman, 2002).

Eine dreistündige Inkubation der Würmer mit den ROS-erzeugenden Stressoren Cumene-Hydroperoxid bzw. *tert*-Butylhydroperoxid ließ sowohl einen Anstieg der CeGSTO-1-Menge unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennen als auch einen Anstieg – um schätzungsweise das 3-fache – der mRNA-Menge im Northern Blot. Damit konnte gezeigt werden, dass der Promotor von *cegsto-1* durch oxidativen Stress induzierbar ist.

Das Verhältnis des mRNA-Anstiegs steht dabei im Einklang zu anderen enzymatischen Antioxidantien in *C. elegans*, wie der Superoxid-Dismutasen oder Katalasen, die nach zweistündigem oxidativen Stress um das 2-fache hinaufreguliert wurden (Tawe *et al.*, 1998, Eckelt, *et al.*, 1998). Dabei konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Menge der Katalasen nach 4 – 20 stündigem Stress sogar bis auf das 3 – 4-fache anstieg (Eckelt, *et al.*, 1998). Des Weiteren zeigten Versuche an der GST p24 der Sigma-Klasse bei *C. elegans* mittels GFP-Fluoreszenz einen Anstieg der Promotoraktivität um das 2 – 3-fache nach der Behandlung mit Plumbagin bzw. Paraquat und um das 4 – 6-fache nach der Behandlung mit Juglon (Leiers *et al.*, 2003). Betrachtet man GSTs verschiedener Klassen, kann eine Hochregulation der GST-Expression nach oxidativem Stress bei verschiedenen Organismen wie Mikroorganismen, Würmern, Pflanzen, Insekten, Fischen und Säugern festgestellt werden (Allocati *et al.*, 2003, Leiers *et al.*, 2003, An *et al.*, 2003, Veal *et al.*, 2002, Desikan *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2003, Kobayashi *et al.*, 2002). Daraus lässt sich schließen, dass die Induktion von GSTs durch oxidativen Stress ein evolutionär konservierter Prozess ist.

4.5 Analyse der Schutzfunktion der CeGSTO-1 in *E. coli*

Zur Untersuchung der Schutzfunktion der CeGSTO-1 im lebenden Organismus, wurden „Hemmhoftests“ mit *E. coli* durchgeführt. Hierbei war signifikant zu erkennen, dass Bakterien, die *cegsto-1* exprimierten, resistenter gegen die verschiedenen Stressoren (Cumene-Hydroperoxid, Juglon, Paraquat, *tert*-Butyl-Hydroperoxid) waren als Kontrollbakterien. So zeigten diese Versuche im prokaryotischen System anschaulich die Schutzfunktion der CeGSTO-1 vor oxidativem Stress und boten gegenüber eukaryotischen Systemen den Vorteil schnell durchführbarer Methoden. Unter GSH-reduzierten Bedingungen zeigten die „Hemmhoftests“ mit Hilfe des GSH-defizienten *E. coli*-Stamms JTG10, dass GSH essentiell an dem Entgiftungsprozess beteiligt ist.

Bei der Schutzfunktion gegen oxidativen Stress kommt dabei dem aktiven Cysteinrest (Cys-33) im aktiven Zentrum der CeGSTO-1 eine besondere Bedeutung zu, da er im direkten Kontakt mit GSH steht und vermutlich Disulfidbrücken mit dem GSH ausbilden kann (Board *et al.*, 2000). In einem Mutagenese-Versuch wurde das Cys-33 mittels PCR in ein Alanin umgewandelt, das Expressionsplasmid in Rosetta-Zellen transformiert und mittels „Hemmhoftests“ mit Cumene-Hydroperoxid untersucht. Dabei ist eindeutig zu erkennen, dass die Schutzfunktion der CeGSTO-1 vor oxidativem Stress durch die Mutation des Cysteins herabgesetzt wurde, wobei allerdings keine komplette Inaktivierung des Enzyms eintrat. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass andere Aminosäurereste – wie das Lys-60, Lys-72, Glu-85, Ser-86, die laut Board *et al.* (2000) ebenfalls in direktem Kontakt mit dem GSH stehen bzw. Phe-32, Pro-34, Val-57 Gly-71, die eine GSH-Bindung mit beeinflussen – bei einer Stabilisierung des GSHs beteiligt sind. Dadurch wäre denkbar, dass das GSH trotz der Mutation des Cysteins von anderen Aminosäureresten in der GSH-Bindungstasche stabilisiert wird, so dass die katalytische Funktion der Omega-GST zum Teil erhalten bleibt.

Um die Bedeutung des aktiven Cysteinrestes in CeGSTO-1 weiter zu untersuchen, wurde das Cys33Ala-mutierte Enzym rekombinant in *E. coli* hergestellt und über Ni²⁺-Chelatchromatografie aufgereinigt. Mit diesem Nickel eluat wurden sowohl die Bindungsfähigkeit des Enzyms an S-Hexyl-GSH-Agarose untersucht als auch Enzymtests durchgeführt. Dabei konnte nur eine sehr geringe Bindung an S-Hexyl-GSH-Agarose und keine Enzymaktivität mit den Substraten CDNB, HEDS und DHA festgestellt werden.

Eine Betrachtung von Mutagenese-Versuchen im aktiven Zentrum anderer GSTs zeigt, dass eine Mutation des aktiven Tyrosin- bzw. Serinrestes in der GSH-Bindungsstelle zu einer erheblichen, zum Teil auch kompletten Inaktivierung des Enzyms führt (Board *et al.*, 1995, Stenberg *et al.*, 1991). Es gibt allerdings auch GSTs, wie die humane GSTT2-2, die ihre Aktivität trotz mutierten Serinrestes behalten. Dabei wurde festgestellt, dass der Aktivitätsverlust sowohl von der Größe der Austausch-Aminosäure abhängt, als auch von dem zweiten Substrat. Die Autoren vermutet, dass andere Aminosäuren für eine Stabilisierung des GSHs sorgen und die Aktivität des Enzyms auch nach der Mutagenese gewährleisten (Flanagan *et al.*, 1999, Tan *et al.*, 1996). Um den Einfluss verschiedener Aminosäuren auf die Aktivität der CeGSTO-1 zu überprüfen sind noch weitere Mutagenese-Versuche notwendig.

4.6 Funktionelle Analyse von CeGSTO-1 in *C. elegans*

Die durchgeführten „Hemmhofstests“ geben einen guten Einblick über die direkte Schutzfunktion gegen oxidativen Stress, die die CeGSTO-1 ausübt. Hierbei handelt es sich allerdings um ein prokaryotisches Versuchssystem, somit war es notwendig, die Funktion der CeGSTO-1 auch in *C. elegans* zu charakterisieren.

Da die CeGSTO-1 jedoch in so geringem Maße in *C. elegans* vorhanden ist, dass sich das native Enzym im Western Blot nur nach einer Konzentration über S-Hexyl-GSH-Agarose nachweisen lässt, waren hier die Mengen zu gering um eine Hochregulation des Proteins nach einer Stressinduktion mittels SDS-PAGE feststellen zu können. Ein ähnliches Problem ergab sich auch bei dem Nachweis der mRNA-Menge mittels Northern Blot Analyse. Hier lässt sich vermuten, dass die mRNA der *cegsto-1* sehr schnell wieder abgebaut wird und sie sich daher nur in stabiler Fusion mit GFP nachweisen lässt. Aus diesem Grund wurde die Induktionsfähigkeit der *cegsto-1* in *C. elegans* durch oxidativen Stress mit Hilfe eines stabileren GFP-Fusionskonstrukts nachgewiesen (vgl. Kap. 4.4.2).

Um zu überprüfen, ob der CeGSTO-1 auch in *C. elegans* eine entgiftende und schützende Funktion gegen ROS zukommt, wurden transgene *cegsto-1*-Überexpressionswürmer sowie „Knock-down“-Würmer erstellt. Diese Würmer wurden mit oxidativen Stressoren induziert und ihr Stressverhalten in den nachfolgenden Kapiteln 4.6.1 und 4.6.2 analysiert.

Über die Auswirkungen von oxidativem Stress auf GSTs der Omega-Klasse ist noch recht wenig bekannt und betrifft vornehmlich die Omega-GST von *O. volvulus* (OvGST3). Dabei ist z.B. eine Hochregulation des Enzyms auf Transkriptionsebene nach oxidativem Stress festgestellt worden (Liebau *et al.*, 2000) und das parasitische Enzym in *C. elegans* – als Modellorganismus – untersucht worden (Kampkötter *et al.*, 2003).

4.6.1 Die Stressresistenz von *cegsto-1*-Überexpressionswürmern

Die Überexpression von *cegsto-1* wurde unter Kontrolle des *let-858* Promotors vorgenommen, der ubiquitär in allen Geweben von *C. elegans* exprimiert wird. Die transgenen Würmer zeigten im Vergleich zu Kontrollwürmern eine reduzierte Nachkommenzahl und Lebensdauer.

Zur Charakterisierung der Funktion der CeGSTO-1 wurde das Verhalten der CeGSTO-1-Würmer unter Einfluss von oxidativem Stress untersucht. Dabei wurden die transgenen *C. elegans* für 18 h den Stressoren Cumene-Hydroperoxid bzw. Paraquat ausgesetzt und zeigten gegenüber den Kontrollwürmern eine jeweils 3-fach höhere Überlebensrate und damit eine signifikante Resistenz gegenüber ROS. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass CeGSTO-1 die Würmer vor Zellschädigung durch oxidativen Stress schützt und ihr eine wichtige Funktion in der Stressverteidigung zukommt.

Der Zusammenhang zwischen der Überexpression von GSTs und oxidativem Stress wurde bei einer GST in SY5Y-Neuroblasten untersucht, deren Überexpression eine Resistenz gegen Wasserstoffperoxid vermittelt (Xie *et al.*, 2001). Die Überexpression der GST p24 (Sigma-Klasse) in *C. elegans* resultierte in einer erhöhten Resistenz der Würmer gegenüber Juglon, Paraquat und Hypoxanthin/Xanthinoxidase (Leiers *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte auch bei der Überexpression von GSTs der Omega-Klasse eine erhöhte Stresstoleranz festgestellt werden, wie beispielsweise bei der GSTO1-1 in Lymphzellen der Maus, deren Überexpression eine gesteigerte Resistenz der Zellen gegenüber cytotoxischen Reagenzien und oxidativem Stress verursachte (Kodym *et al.*, 1999). Zudem zeigte eine Überexpression der Omega-GST OvGST3 in *C. elegans* mittels *let-858*-Promotor die protektive Funktion der OvGST3 gegenüber den Stressoren Juglon und Hypoxanthin/Xanthinoxidase. Dabei lebten nach 7,5 h noch 27% der

Juglon-gestressten bzw. 90% der Hypoxanthin/Xanthinoxidase-gestressten Überexprimierer, wohingegen alle Kontrollwürmer bereits gestorben waren (Kampkötter *et al.*, 2003). Diese Untersuchungen an anderen GSTs stützen die Ergebnisse dieser Arbeit und verdeutlichen die Schutzfunktion der CeGSTO-1 gegenüber oxidativem Stress. Eine weitere Bestätigung dieser Ergebnisse wurde mittels RNAi-Versuchen erzielt.

4.6.2 Diskussion der Stresssensitivität von *cegsto-1*-RNAi-Würmern

Das posttranskriptionelle „gene silencing“ mittels RNAi ist eine häufig gebrauchte Methode zur Funktionsanalyse von Genprodukten, da hierdurch die Funktion eines bestimmten Gens stillgelegt werden kann (Kuwabara *et al.*, 2000, Carthew, 2001). Mit dieser Methode war es möglich, die Expression von *cegsto-1* in *C. elegans* nahezu vollständig zu unterdrücken und den „knock-down“ sowohl mittels Western Blot-Analyse als auch mittels nachlassender GFP-Fluoreszenz nachzuweisen. Bei den *cegsto-1*-RNAi-Würmern wurde im Vergleich zu WT-Würmern unter normalen Bedingungen eine geringfügige Reduktion der Nachkommenzahl beobachtet, allerdings konnte keine Veränderung in der Lebensspanne festgestellt werden. Eine Veröffentlichung an der Sigma-GST p24 zeigte ebenfalls, dass ein „Knock-down“ der GST die Lebensspanne von *C. elegans* nicht reduzierte (Leiers *et al.*, 2003).

In Stressversuchen mit verschiedenen Stressoren, die alle die Bildung von ROS herbeiführen und oxidativen Stress induzieren, konnte gezeigt werden, dass ein Ausschalten der *cegsto-1* in *C. elegans* zu einer signifikant erhöhten Stresssensitivität der Würmer führt. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die CeGSTO-1 Resistenz gegen oxidativen Stress vermittelt. Unter Stressbedingungen wird die Omega-GST vermehrt exprimiert (wie die Versuche an *cegsto-1::GFP*-Würmern zeigten) und bietet den Würmern somit einen Überlebensvorteil. Ist die CeGSTO-1 dagegen nicht vorhanden, sterben die Würmer unter Einfluss von oxidativem Stress sehr viel schneller. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Schutzfunktion der CeGSTO-1 vor oxidativem Stress nicht durch andere GSTs kompensierbar ist und eine wichtige Rolle in *C. elegans* spielt.

Die Betrachtung von Stressversuchen mittels „knock-down“ oder „knock-out“ bei anderen GSTs zeigt, dass die Entgiftungsfunktion in allen GST-Klassen eine wichtige Rolle spielt. Eine Zerstörung der Beta-Klassen GST in *P. mirabilis* führte zu einer erhöhten Sensitivität gegen Wasserstoffperoxid (Allocati *et al.*, 2003) und ein „Knock-down“ der Sigma-GST p24 in *C. elegans* resultiert in einer doppelt so hohen Sensitivität gegenüber 150 µM Juglon im Vergleich zu WT-Würmern (Leiers *et al.*, 2003). Untersuchungen der Alpha-Klasse GSTA4 an KO-Mäusen zeigten, dass die KO-Mäuse sensitiver gegenüber Bakterieninfektionen und Paraquat-Stress sind. Zudem wurde eine Hochregulation der mRNA der GSTA1 – 3 und der GSTM1 sowie von Katalasen, Superoxid-Dismutase 1 und 2 und GSH-Peroxidase 1 festgestellt (Engle *et al.*, 2004). Die Hochregulation geschieht dabei vermutlich über das ARE („Antioxidative response element“, Tjalkens *et al.*, 1999, Nguyen *et al.*, 2003). Dabei werden die ARE-Gene exprimiert und die Expression von anderen GSTs gesteigert, wenn z.B. das GSTA4-Gen ausfällt. ARE (Kernsequenz 5'-GTGACnnnGC-3', Rushmore *et al.*, 1991) wurden in den GST-Klassen Alpha, Mu und Pi gefunden (Pulford & Hayes, 1996, Kelner *et al.*, 2000, Ikeda *et al.*, 2002). Allerdings weist weder die 5'-Region der humanen Omega-GST ARE auf noch ist die ARE-Kernsequenz in der 5'-Region der *cegsto-1* zu finden.

Ein Vergleich der RNAi-Ergebnisse mit Untersuchungen an der Omega-GST OvGST3 zeigt, dass RNAi-Versuche mit der OvGST3 ebenfalls in einer herabgesetzten Stress-Resistenz resultiert (Kampkötter *et al.*, 2003). Genauso wie bei den Überexpressionsversuchen weist die CeGSTO-1 auch bei den RNAi-Experimenten ähnliche Eigenschaften wie die OvGST3 auf. Da bei den Experimenten an dem parasitischen Enzym OvGST3 *C. elegans* als Modellorganismus eingesetzt wurde, zeigt sich, dass *C. elegans* durchaus ein geeignetes Modell für die Untersuchung von Enzymen parasitischer Nematoden darstellt. Somit können im Gegenzug auch Erkenntnisse über die Enzyme des freilebenden Nematoden genutzt werden, um erste Rückschlüsse auf die Funktion parasitischer Enzyme zu ziehen.

Zusammen mit den Stressversuchen an den Überexpressionswürmern lässt sich feststellen, dass CeGSTO-1 eine wichtige Rolle in der Verteidigung von *C. elegans* gegen ROS zukommt.

4.7 Diskussion des CeEF-1 γ

4.7.1 Diskussion der putativen GSH-Bindungsstelle des CeEF-1 γ

Das Gen *ceef-1 γ* besitzt einen offenen Leserahmen von 1.197 bp, 6 Exons und 5 Introns. Es codiert für die 398 Aminosäurereste lange Polypeptidkette des 44,4 kDa großen CeEF-1 γ . In einem Alignment der Aminosäuresequenz von CeEF-1 γ mit verschiedenen GSTs konnte gezeigt werden, dass im N-terminalen Bereich des CeEF-1 γ essentielle Aminosäuren für eine GSH-Bindung konserviert vorliegen (vgl. Kapitel 3.5.1). Dadurch wird vermutet, dass der CeEF-1 γ – neben seiner Funktion in der Proteinbiosynthese – an GSH-abhängigen Entgiftungsversuchen beteiligt sein könnte.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der rekombinant in *E. coli* exprimierte CeEF-1 γ über GSH-Agarose aufreinigen lässt. Allerdings wies der aufgereinigte CeEF-1 γ keine GST-Aktivität auf.

Andere Arbeitsgruppen, die den TcEF-1 γ von *Trypanosoma cruzi* untersuchten, stellten ebenfalls fest, dass eine Aufreinigung von TcEF-1 γ über GSH-Sepharose möglich ist (Billaut-Mulot *et al.*, 1994, Koonin *et al.*, 1994). Bei der Bestimmung von GST-Aktivität konnten Billaut-Mulot *et al.* (1997) bei rekombinantem TcEF-1 γ auch keine Enzymaktivität messen. Weiterhin wurde beim rekombinanten eEF-1 γ von *Leishmania major* keine GST-Aktivität festgestellt (Vickers *et al.*, 2004b). Dahingegen detektierten Plumas-Marty *et al.* (1992) spezifische Aktivität in zellulärer Trypanosomen-Fraktion und Kobayashi *et al.* (2001) konnte GST-Aktivität sowohl bei dem aus Reis aufgereinigten Komplex eEF-1 $\beta\beta'\gamma$ als auch bei rekombinant in *E. coli* exprimiertem Reis-EF-1 γ zeigen.

Zur weiteren Charakterisierung einer möglichen GST-Aktivität des CeEF-1 γ wurde die Untereinheit in *C. elegans* überexprimiert und konnte mit Hilfe des angefügten His- bzw. Strep-Tags aus den Würmern aufgereinigt werden. Dabei war zu erkennen, dass die Würmer mit eigenem Promotor mehr CeEF-1 γ produzierten als mit let-858-Promotor. Dieses Ergebnis verdeutlicht den hohen Bedarf der Zellen an CeEF-1 γ und bestätigt, dass das Gen einen besonders starken Promotor besitzt. Mit den aufgereinigten Fraktionen wurden Aktivitätstests durchgeführt, die allerdings

keine Enzymaktivität mit herkömmlichen GST-Substraten aufwiesen. Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen an dem eEF-1 γ von *C. fasciculata* gestützt, dem nach seiner Aufreinigung aus den Organismen ebenfalls Aktivität fehlte (Vickers *et al.*, 2004a).

Eine erfolgreiche Überexpression von eEF-1 γ *in vivo* konnte bereits in der Hefe *S. cerevisiae* und bei *T. cruzi* gezeigt werden. Allerdings lag bei diesen Arbeitsgruppen der Schwerpunkt auf der Phänotyp-Analyse und nicht auf der Aufreinigung des Faktors zur Bestimmung von GST-Aktivität. Die Versuche an der Hefe zeigten dabei, dass eine Überexpression von eEF-1 γ keine Auswirkungen auf die Wachstumsrate der Hefe-Zellen hat (Carr-Schmid *et al.*, 1999). In der Versuchsreihe an *T. cruzi* wurde bei einer Überexpression von eEF-1 γ eine erhöhte Clomipraminresistenz festgestellt (Billaut-Mulot *et al.*, 1997).

Die katalytischen Versuche an dem CeEF-1 γ – rekombinant in *E. coli* hergestellt bzw. aus *C. elegans* aufgereinigt – wiesen darauf hin, dass für eine GSH-abhängige Entgiftung entweder essentielle Aminosäuren der GSH-Bindungsstelle beim CeEF-1 γ fehlen oder weitere Untereinheiten des CeEF-1-Komplexes benötigt werden.

4.7.2 Analyse der Interaktionen von CeEF-1 γ und CeEF-1 β am Biacore

Die Interaktionen zwischen den rekombinanten Untereinheiten CeEF-1 γ und CeEF-1 β wurden durch SPR-Messungen an einem Biacore 1000 bestimmt und in Form eines Sensorgramms aufgezeichnet (vgl. Abb. 4.7.2). Als Ergebnis konnte eine spezifische und konzentrationsabhängige Bindung zwischen den beiden Proteinen bestimmt werden. Da bei der Kopplung von CeEF-1 γ nur ca. 10% des Proteins an der Oberfläche gebunden haben, lag der CeEF-1 γ vermutlich noch nicht im optimalen Aktivitätszustand vor. Zur Durchführung einer umfassenden kinetischen Analyse und der genauen Bestimmung von Assoziations- sowie Dissoziationsraten wären daher noch Optimierungen der Bedingungen und weitere Versuche nötig, was allerdings für die vorliegende Aufgabenstellung nicht von Bedeutung war.

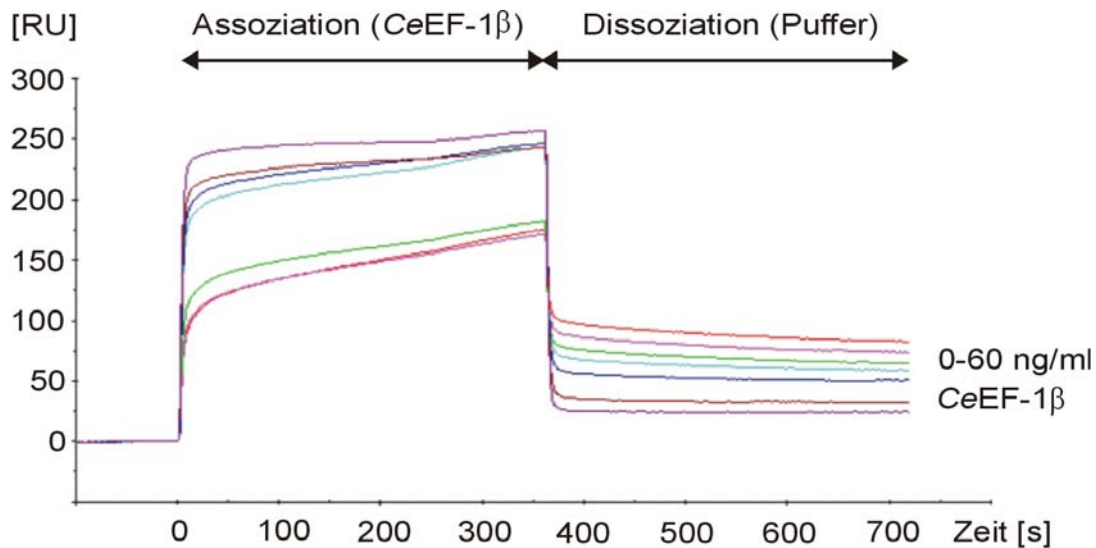


Abb. 4.7.2: Sensorgramm von der Bindung von CeEF-1 β an immobilisiertes CeEF-1 γ

Im Biacore 1000 wurde CeEF-1 γ an die Dextranmembran eines CM5-Sensorchips gekoppelt und für 6 min CeEF-1 β über den immobilisierten CeEF-1 γ gegeben (Assoziation). Danach erfolgte die Dissoziation für 6 min. Die konzentrationsabhängige Bindung wurde in Resonanz Units (RU) gemessen.

Die aufgezeigte Protein-Protein-Interaktion zwischen den beiden Untereinheiten gibt einen Hinweis darauf, dass die beiden Proteine miteinander interagieren. Daraufhin wurden die beiden rekombinanten Untereinheiten gemeinsam inkubiert und sie zeigten keine Enzymaktivität mit dem GST-Substrat CDNB.

Interessant sind die verschiedenen Ergebnisse und konträren Theorien, die durch Untersuchungen an eEF-1-Untereinheiten bei verschiedenen Organismen erlangt wurden. Eine Bindung von eEF-1 γ des Kaninchens konnte mit Hilfe von Gelfiltration sowohl an eEF-1 β als auch an eEF-1 δ gezeigt werden (Sheu & Traugh, 1997). Dabei stellte diese Arbeitsgruppe fest, dass eine Bindung von eEF-1 $\beta\delta$ jedoch nicht stattfindet. Dagegen wurde bei Versuche an *Leishmania major* eine Bindung der rekombinanten Untereinheiten eEF-1 $\alpha\beta$ festgestellt, wobei keine Rekonstruktion von eEF-1 $\gamma\alpha$ bzw. eEF-1 $\gamma\beta$ gelang (Vickers *et al.*, 2004b). Dabei vertritt diese Arbeitsgruppe die Theorie, dass zuerst eine Bildung des oktamerischen eEF-1 $\alpha\beta$ -Komplexes nötig ist, um eEF-1 γ binden zu können.

In allen Fällen konnte allerdings keine GST-Aktivität gemessen werden, wenn nur zwei Untereinheiten zusammengelagert waren.

4.7.3 Diskussion des CeEF-1-Komplexes

Eine Auftrennung der Proteine aus *C. elegans*-Extrakt nach ihrer Größe wurde mittels Gelfiltration vorgenommen. Dabei konnte der gesamte CeEF-1-Komplex mit einer Größe von ca. 600 kDa detektiert und eine GST-Aktivität mit dem Substrat CDNB von 120 nmol/min*mg gemessen werden.

Die Größe des CeEF-1-Komplexes liegt in dem Bereich der eEF-1-Komplexe anderer Organismen. Hierbei ist der eEF-1-Komplex von *L. major* (540 kDa) zu erwähnen sowie der eEF-1-Komplex von *C. fasciculata* (650 kDa; Vickers *et al.*, 2004a/b). Dabei postulieren die Autoren, dass die Untereinheiten eEF-1 α , β und γ im Verhältnis 1:1:2 in dem $[\alpha\beta(\gamma)_2]_4$ -Komplex vorliegen. Der hexadekamerische Komplex aus rekombinanten Untereinheiten von *L. major* zeigte dabei eine Trypanothion S-Transferase-Aktivität mit den Substraten CDNB (96 ± 8 nmol/mg*min) und Cumene-Hydroperoxid (285 ± 1 nmol/mg*min) und auch bei dem nativen Komplex aus *C. fasciculata* konnte eine Aktivität mit CDNB gemessen werden. Voraussetzung hierbei war allerdings immer, dass alle drei Untereinheiten gemeinsam in einem Komplex vorlagen.

Zur weiteren Analyse des CeEF-1-Komplexes und der beteiligten Untereinheiten wurde der Komplex aus *C. elegans* mittels Mono-Q- und Phenyl-Sepharose-Säule aufgereinigt. Die positiven Fraktionen zeigten GST-Aktivität von 43 nmol/min*mg nach der Mono-Q bzw. 257 nmol/min*mg nach der Phenyl-Sepharose-Säule und wurden in einem SDS-Gel analysiert. Dabei waren vier Banden zu erkennen, von denen CeEF-1 β und CeEF-1 γ eindeutig bestätigt werden konnten. Aufgrund der Größe der beiden anderen Banden wird vermutet, dass es sich um CeEF-1 α und δ handeln könnte. Eine MALDI-TOF-Analyse identifizierte allerdings die Alpha-2-Kette von Tubulin in der putativen CeEF-1 α -Bande. Dieses Protein liegt eng assoziiert mit dem eEF-1-Komplex vor und könnte gemeinsam mit ihm aufgereinigt worden sein. Da es nahezu dieselbe Größe besitzt wie CeEF-1 α , wäre eine Überlagerung der beiden Proteine in der SDS-Bande nicht auszuschließen.

Diese Versuche zeigen, dass die Anwesenheit weiterer Untereinheiten aus *C. elegans* in einem Komplex mit CeEF-1 γ essentiell ist, um eine GST-Aktivität nachzuweisen. Um näheren Aufschluss über die beteiligten Proteine zu erhalten, sind weitere Studien geplant, die mit Hilfe von HPLC- und anschließender MALDI-

TOF-Analyse bzw. 2-D-Gelelektrophorese eine bessere Auftrennung der Proteine herbeiführen sollen.

Vickers *et al.* (2004a) reinigten den nativen eEF-1-Komplex aus *C. fasciculata* auf und stellten nach dem Phenyl-Sepharose-Aufreinigungsschritt eine 6-fach höhere Enzymaktivität mit dem GST-Substrat CDNB fest als bei dem Komplex aus *C. elegans*. Im denaturierenden SDS-Page konnten die Arbeitsgruppe die drei Untereinheiten eEF-1 α , β und γ mit Hilfe spezifischer Antikörper identifizieren.

Interessanterweise scheint die vierte Untereinheit eEF-1 δ bei der Komplexbildung in *Leishmania* und *Crithidia* keine essentielle Rolle zu spielen, da in beiden Fällen ein aktiver Komplex aus eEF-1 $\alpha\beta\gamma$ nachgewiesen werden konnte.

Da die Funktion dieser vierten Untereinheit noch weitgehend unerforscht ist und es keine homologen Faktoren zu eEF-1 δ in Prokaryoten und in Hefe gibt, stellt sich die Frage, inwieweit eEF-1 δ an dem Aufbau und der Aktivität des eEF-1-Komplexes beteiligt ist.

Ein Vergleich der beiden Untereinheiten CeEF-1 β und CeEF-1 δ von *C. elegans* lässt eine 95%ige Identität ihrer C-terminalen Aminosäuren erkennen, die jeweils eine Nukleotid-Austausch-Domäne enthalten (Perez *et al.*, 1998, Amons *et al.*, 1994). Dabei wird vermutet, dass beide Untereinheiten durch Genduplikation entstanden sind. Die N-Termini von δ und β weichen dagegen stark voneinander ab und könnten an einer Regulation der EF-1 α -Aktivität beteiligt sein (Sheu & Traugh, 1997). Der N-Terminus von CeEF-1 δ zeigt außerdem Ähnlichkeit zu dem N-Terminus von GSTs der Theta-Klasse, enthält zudem einen Leucin-Zipper (Aminosäure 80 – 115), der wahrscheinlich der Dimerisierung dient (Sanders *et al.*, 1993, Amons *et al.*, 1994) und weist eine Domäne für die Bindung von Valyl-tRNA-Synthetase (ValRS) auf (Bec *et al.*, 1994).

Zu der Anordnung der Untereinheiten in einem gemeinsamen eEF-1-Komplex gibt es unterschiedlichste Untersuchungen und Modelle. Janssen *et al.* (1994) stellten beispielsweise ein Modell für *Artemia* dar, in dem eine einzelne eEF-1 γ -Untereinheit sowohl β als auch δ bindet. Dieses Modell hat große Ähnlichkeit mit der Vorstellung von Mansilla *et al.* (2002), der humane Untereinheiten im „yeast two/three-hybrid“-System analysierte. Nach diesen Untersuchungen schlugen die Autoren als Modell

einen Pentamer-Komplex vor, in dem zwei Moleküle eEF-1 α , jeweils mit δ oder β assoziieren und durch ein Molekül eEF-1 γ zusammengehalten werden. Das eEF-1-VaIRS-Modell von Bec. *et al.* (1994) wurde an Untereinheiten des Kaninchens untersucht und geht wiederum von einem eEF-1 δ -Dimer aus, an dem jeweils VaIRS und ein Molekül γ gebunden sind, wobei an dem γ dann wiederum ein Molekül β bindet (Verhältnis 1:1:1). Untersuchungen von Sheu & Traugh (1997) rekonstruierten den Kaninchen-EF-1 $\beta\gamma\delta$ -Komplex (670 kDa) aus rekombinant in *E. coli* exprimierten Untereinheiten und analysierten das Bindungsverhalten mittels Gelfiltration. Dabei postulieren sie, dass die Untereinheiten eEF-1 β , γ und δ im Verhältnis 1:2:1 an dem Komplex beteiligt sind (Sheu & Traugh, 1997). Vickers *et al.* (2004a, 2004b) stellten anhand ihrer Ergebnisse ebenfalls fest, dass eEF-1 γ im doppelten Verhältnis zu den Untereinheiten α und β vorliegt.

Eine Beurteilung der bisherigen Modelle bzw. die Erstellung eines überarbeiteten Modells bedarf noch weiterführender Untersuchungen zur Komplexbildung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten deutlich, dass dem CeEF-1 γ im Komplex mit den anderen Untereinheiten eine GSH-abhängige Entgiftungsfunktion zukommt.

Da oxidativer Stress inhibitorisch auf die Proteinbiosynthese wirkt (Patel *et al.*, 2002) ist eine protektive, antioxidative Abwehr für die Zellen essentiell. Inwiefern allerdings die GSH-Bindungsstelle des CeEF-1 γ und die Entgiftungsfunktion, die dem Komplex damit zukommt tatsächlich an den Entgiftungsprozessen der Zelle beteiligt ist, bleibt noch offen und bietet die Grundlage für weitere Untersuchungen.

Eine weitere Vermutung ist, dass dem CeEF-1 γ durch seine GSH-Bindungsstelle eine wichtige Aufgabe in der Redoxregulation der Zelle zukommt (Ejiri, 2002). Aufgrund der Tatsache, dass reduziertes GSH die Translation aktiviert bzw. oxidiertes GSH die Translation inhibiert, ist ein Zusammenhang zwischen dem Redoxstatus der Zelle und der GSH-Bindungsstelle des CeEF-1 γ denkbar. Dabei wäre es möglich, dass der CeEF-1 γ den Redoxstatus der Zelle ermittelt und ihn an die Proteinsynthesemaschinerie signalisiert.

4.8 Diskussion der Kristall-Struktur von PfGST1

Nach der Kristallisation und Vermessung der PfGST1-Kristalle erfolgte die Auswertung der Daten und die Struktur-Ermittlung durch Dr. M. Perbandt (DESY). Dabei konnte gezeigt werden, dass das monomere 23,5 kDa Molekül der PfGST1 zwei verschiedene Domänen besitzt, die durch eine variable Linker-Region miteinander verbunden sind. Die hochkonservierte, N-terminale Domäne 1 (AS 1 – 80) besteht aus vier β -Faltblättern sowie drei flankierenden α -Helices (α -1 bis α -3) und stellt einen Großteil der GSH-Bindungsstelle („G-site“) dar. Die größere, C-terminale Domäne 2 (AS 87 – 211) besteht aus fünf α -Helices, die durch verschiedene Loops miteinander in Verbindung stehen. Dabei wird die hydrophobe Bindungstasche („H-site“) vor allem durch einen Teil der Helix α -4, den Mu-Loop (zwischen β -2 und α -2), den Loop zwischen α -4 und α -5 und den zwischen α -1 und β -1 sowie dem C-terminalen Ende gebildet (Perbandt *et al.*, 2004).

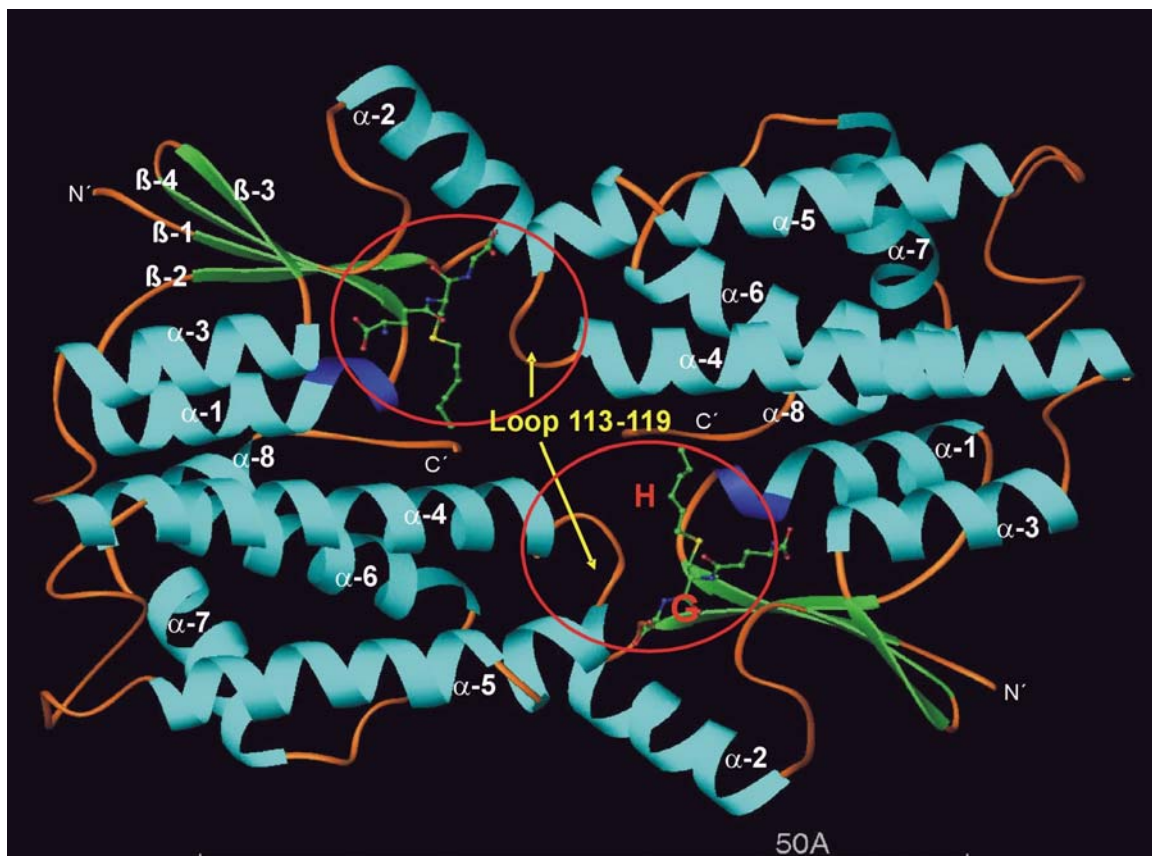


Abb. 4.8: Struktur des asymmetrischen Homodimers der PfGST1

Die konservierte GSH-Bindungsstelle (G) wird durch vier β -Faltblätter und drei flankierende α -Helices gebildet und zeigt die polare Bindung des Inhibitor-moleküls S-Hexyl-GSH. Die hydrophobe Substrat-Bindungstasche (H) wird primär durch verschiedene Loops gebildet.

Das biologische Homodimer der *PfGST1* besteht aus zwei asymmetrisch angeordneten Monomeren (vgl. Abb. 4.8), die durch mehrere hydrophile Interaktionen zusammengehalten werden.

Die *PfGST1* zeigt zwar nur eine geringe Sequenzidentität von 20 – 33% zu anderen GSTs der Mu-Klasse, lässt sich jedoch aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in die Mu-Klasse einordnen. Ein Vergleich der *PfGST1*-Struktur mit der Struktur der humanen Mu-Klasse GSTM2-2 zeigt, dass die „G-site“ in beiden Proteinen fast vollständig konserviert vorliegt, die „H-site“ allerdings starke Abweichungen aufweist. Diese Variabilität der Substrat-Bindungstasche, je nach GST-Klasse und Organismus, ist nötig, damit die Multigenfamilie der GSTs die Entgiftung einer großen Breite an verschiedenen Substraten übernehmen kann.

Bei der Mu-Klasse handelt es sich, ebenso wie bei der Omega-Klasse, um eine cytosolische GST-Klasse, die hohe strukturelle Ähnlichkeiten zueinander aufweisen (Ladner *et al.*, 2004). Eine Analyse der dreidimensionalen Struktur der humanen Omega-GST GSTO1-1 wurde von der Arbeitsgruppe Board *et al.* (2000) vorgenommen. Mittels Röntgenstrukturanalyse bei 2,0 Å stellten sie fest, dass die GSTO-1 ebenfalls aus zwei asymmetrisch angeordneten Monomeren aufgebaut ist und am N-Terminus die typische thioredoxinähnliche GSH-Bindungstasche besitzt, die auch bei der *PfGST1* zu erkennen ist. Der C-Terminus der Omega-GST weist zwar die GST-typischen fünf Alpha-Helices auf, besitzt allerdings noch zwei weitere Helices, die das N-terminale Ende überlappen und mittels Wasserstoffbrückenbindungen fixieren.

Da die GSH-Bindungsstelle bei allen GST-Klassen konserviert vorliegt und eine Bindung von GSH für eine Entgiftungsfunktion essentiell ist, bietet sie einen guten Ansatz für Inhibitorstudien. In diesem Zusammenhang untersuchten wir die Bindung des Inhibitors S-Hexyl-GSH an der Struktur von *PfGST1*. Dabei war eindeutig zu erkennen, dass die N-terminalen „G-site“ nach einer Bindung von S-Hexyl-GSH – genauso wie von GSH – stabil blieb und fast gar keine Konformationsänderungen aufwies. Es war lediglich eine leichte Strukturveränderung am flexiblen C-Terminus und an dem Loop zwischen α -4 und α -5 festzustellen.

5. Zusammenfassung

Zum Schutz vor oxidativem Stress und den dadurch verursachten Schäden besitzen aerob lebende Organismen eine Vielzahl von antioxidativen Systemen. Eines der Hauptabwehrsysteme gegen toxische endogene und xenobiotische Substanzen stellen die Glutathion S-Transferasen (GSTs) dar. Sie sind wichtige Phase 2 Entgiftungsenzyme, die die Biotransformation von lipophilen und schwer ausscheidbaren Substanzen in weniger reaktive, weniger toxische und leichter ausscheidbare Stoffe katalysieren. Diese Reaktion erfolgt durch die Konjugation des elektrophilen Substrats mit dem reduzierten Tripeptid Glutathion (GSH). Neben ihrer Entgiftungsfunktion sind GSTs auch als Bindungsproteine am intrazellulären Transport und der Speicherung verschiedener Substanzen beteiligt.

Die cytosolischen GSTs lassen sich aufgrund ihrer Struktur und ihrer Substratspezifität in sieben ubiquitär verbreitete Klassen einteilen, wobei von Insekten, Pflanzen und Bakterien noch weitere Klassen bekannt sind. Eine dieser sieben Klassen ist die erst kürzlich entdeckte Omega-Klasse, die wesentliche strukturelle und funktionelle Besonderheiten gegenüber anderen GST-Klassen aufweist und Ähnlichkeiten zu Thioredoxinen besitzt. Omega-GSTs wurden bislang beim Menschen, Ratte, Maus, *Schistosoma mansoni* und *Onchocerca volvulus* untersucht.

In dieser Arbeit wurde die Omega-GST CeGSTO-1 des Modellnematoden *Caenorhabditis elegans* charakterisiert. Das 28,5 kDa große, dimere Enzym ließ sich dabei eindeutig der Omega-Klasse zuordnen. Es besitzt sowohl die für Omega-GSTs typische N-terminale Verlängerung als auch einen Cysteinrest (Cys-33) im aktiven Zentrum. Die CeGSTO-1 bindet nicht an Glutathion(GSH)-Agarose, zeigt allerdings eine gute Bindung an S-Hexyl-GSH-Agarose. Mittels Enzymtests konnte festgestellt werden, dass die rekombinant exprimierte CeGSTO-1 als höchste Aktivitäten eine Thioltransferase-Aktivität (0,192 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$) und Dehydroascorbat-Reduktase-Aktivität (0,186 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$) aufweist. Die CeGSTO-1 wurde als Fusionsprotein mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) unter der Kontrolle des *cegsto-1*-Promotors in *C. elegans* exprimiert und konnte in allen postembryonalen Stadien exklusiv in den Darmzellen lokalisiert werden. Dieses Ergebnis wurde durch immunhistologische und elektronenmikroskopische Versuche bestätigt und weist darauf hin, dass der Darm einen hohen Bedarf an dem Entgiftungsenzym besitzt. Mittels GFP-Deletionskonstrukten konnte ein Minimalpromotor von ca. 300 bp

bestimmt werden. Die Deletionsversuche und die Mutagenese der GATA-Box im 5'-Bereich von *cegsto-1* (-257 – -268 bp vor dem ATG) zeigten die direkte Beteiligung dieser Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle an der intestinalen Expression von *cegsto-1*. Untersuchungen von GATA-bindenden Transkriptionsfaktoren ergaben, dass dem Transkriptionsfaktor ELT-4 dabei eine essentielle Bedeutung an der basalen Expression des Enzyms zukommt. Im Rahmen der Promotorstudie konnte außerdem gezeigt werden, dass der *cegsto-1*-Promotor durch oxidativen Stress induzierbar ist.

Um die Schutzfunktion der CeGSTO-1 vor oxidativem Stress nachzuweisen, wurde das Enzym in *Escherichia coli* exprimiert und die Stressresistenz der Bakterien gegenüber verschiedenen Stressoren untersucht. Dabei zeigte der durchgeführte „Hemmhofstest“, dass Bakterien, die CeGSTO-1 enthielten, resistenter gegenüber oxidativem Stress waren. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass GSH essentiell an diesem Entgiftungsprozess beteiligt ist und dass dem aktiven Cysteinrest (Cys-33) in der GSH-Bindungstasche der CeGSTO-1 dabei eine wichtige funktionelle Bedeutung zukommt. Zur Untersuchung der Entgiftungsfunktion der CeGSTO-1 in *C. elegans* wurden transgene Würmer hergestellt, die die Omega-GST überexprimierten. Unter Einfluss oxidativer Stressoren überlebten dreimal so viele Überexpressionswürmer wie Kontrolltiere, was eindeutig zeigte, dass CeGSTO-1 eine erhöhte Resistenz vor oxidativem Stress vermittelt. Diese Ergebnisse wurden durch Versuche mit RNA-Interferenz (RNAi) gestützt, wobei die RNAi-Würmer im Vergleich zu Kontrollwürmern eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress aufwiesen.

Der eukaryotische Elongationsfaktor der Translation eEF-1 γ besitzt im N-Terminus eine hohe Homologie zu der GSH-Bindungsstelle von GSTs. Dabei sind die wichtigen GSH-bindenden Aminosäuren konserviert. Es wird vermutet, dass der eEF-1 γ eine interne Entgiftungsfunktion besitzt bzw. an Redoxprozessen beteiligt ist. Während des Elongationsprozesses der Translation assoziiert der eEF-1 γ mit dem GDP/GTP-Austauschprotein eEF-1 β und der Untereinheit eEF-1 δ , die zusammen Energie in Form von GTP an die Untereinheit eEF-1 α liefern. Dadurch katalysiert der eEF-1-Komplex die Übertragung des Aminosäurerestes der tRNA auf die entstehende Proteinkette.

In meiner Diplomarbeit (August 2002) wurde mit der Charakterisierung des CeEF-1 γ von *C. elegans* begonnen und im Rahmen der vorliegenden Dissertation fortgeführt.

Zur Untersuchung einer möglichen GST-Aktivität wurde das Gen *ceef-1 γ* in *C. elegans* überexprimiert und das Protein CeEF-1 γ aus den Würmern aufgereinigt. Dabei ließ sich feststellen, dass der aus *C. elegans* aufgereinigte Faktor – ebenso wie der rekombinant in *E. coli* exprimierte – keine Enzymaktivität aufzeigte. Des Weiteren wurde die Protein-Protein-Interaktion der beiden rekombinanten Untereinheiten CeEF-1 γ und CeEF-1 β mittels Biacore-Analyse untersucht und es konnte eine spezifische und konzentrationsabhängige Bindung zwischen den beiden Proteinen beschrieben werden. Eine GST-Aktivität ließ sich bei den gemeinsam inkubierten Untereinheiten allerdings nicht nachweisen.

Um zu überprüfen, ob der gesamte CeEF-1-Komplex GST-Aktivität aufweist, wurde er mittels Mono-Q-Sepharose- und Phenyl-Sepharose-Säule aus *C. elegans* aufgereinigt. In einem anschließenden Enzymtest war es möglich, eine moderate GST-Aktivität zu bestimmen. Im SDS-PAGE konnten die vier Banden des aufgereinigten und denaturierten Komplexes gezeigt werden, wobei die Größe der Banden mit der Größe der vier Untereinheiten übereinstimmte. Mit Hilfe von Western Blot-Analyse und MALDI-TOF-Analyse konnten zwei der Banden eindeutig als CeEF-1 γ und CeEF-1 β identifiziert werden.

Somit geben diese Versuche erste Hinweise darauf, dass dem CeEF-1 γ im Zusammenhang mit anderen Untereinheiten eine interne Entgiftungsfunktion zukommt, und sie bilden die Grundlage für weiterführende Studien.

Im Rahmen dieser Arbeit war eine Kristallisation der CeGSTO-1 nicht möglich, daher wurde stellvertretend für sie die GST1 von *Plasmodium falciparum* kristallisiert und ihre Struktur ermittelt. Bei optimalen Bedingungen wuchsen die Kristalle mittels Dampfdiffusionsmethode innerhalb von drei Tagen bis auf eine Größe von 0,4 x 0,4 x 0,3 mm. Sie wurden mit monopolarer Röntgenstrahlung am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg vermessen. Dabei betragen die Parameter der Einheitszelle $a = 62,2 \text{ \AA}$, $b = 88,3 \text{ \AA}$, $c = 75,3 \text{ \AA}$ mit $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, das Kristallgitter ist orthorhombisch und gehört zu der Raumgruppe $P2_12_12$, wobei der Wassergehalt 40 – 44% beträgt.

Diese Kristalle und die ersten gesammelten Daten boten die Voraussetzung für eine umfangreiche und weiterführende Strukturanalyse, die von Dr. M. Perbandt, DESY durchgeführt wurde. Hierbei konnte die GST-typische Struktur beschrieben und eine Bindung des Inhibitors S-Hexyl-GSH an der Kristallstruktur gezeigt werden.

Literaturverzeichnis

- Abernathy, C. O., Thomas, D. J., Calderon, R. L. (2003) Health effects and risk assessment of arsenic. *J. Nutr.*; 133: 1536 – 1538.
- Albert, P. S., Riddle, D. L. (1983) Developmental alterations in sensory neuroanatomy of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva. *J. Comp. Neurol.*; 219: 246 – 481.
- Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L., Goya, L. (2005) Response of the antioxidant defense system to *tert*-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Biochem. Mol. Toxicol.*; 19: 119 – 128.
- Allocati, N., Favaloro, B., Masulli, M., Alexeyev, M. F., Di Ilio, C. (2003) *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stress. *Biochem. J.*; 373: 305 – 311.
- Amons, R., Guerrucci, M. A., Karssies, R. H., Morales, J., Cormier, P., Möller, W., Bellé, R. (1994) The leucin-zipper in elongation factor EF-1 δ , a guanine-nucleotide exchange protein, is conserved in *Artemia* and *Xenopus*. *Biochim. Biophys. Acta*; 1218: 346 – 350.
- An, J. H., Blackwell, T. K. (2003) SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev.*; 17: 1882 – 1893.
- Anvi, D., Biberman, Y., Meyuhos, O. (1997) The 5'-terminal oligopyrimidine tract confers translational control on TOP mRNAs in cell type- and sequence context-dependent manner. *Nucl. Acids Res.*; 25: 995 – 1001.
- Armstrong, R. N. (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.*; 10: 2 – 18.
- Arthur, J. R. (2000) The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.*; 57: 1825 – 1835.
- Atamna, H., Ginsburg, H. (1997) The malaria parasite supplies glutathione to its host cell – investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem.*; 250: 670 – 679.
- Aw, T. Y. (2005) Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 204: 320 – 328.
- Barker, K. R., Hussey, R. S., Krusberg, L. R. (1994) Plant and soil nematodes: Societal impact and focus on the future (Committee on national needs and priorities in nematology, society of nematologists, Marceline, Missouri, USA, 1994).
- Bec, G., Kerjan, P., Waller, J.-P. (1994) Reconstitution *in vitro* of the valyl-tRNA synthetase-elongation factor (EF) 1 $\beta\gamma\delta$ complex. Essential role of the NH₂-terminal extension of valyl-tRNA synthase and of the EF-1 δ subunit in complex formation. *J. Biol. Chem.*; 269: 2086 – 2092.

- Billaut-Mulot, O., Schöneck, R., Fernandez-Gomez, R., Taibi, A., Capron, A., Ouaiissi, A. (1994) Molecular and immunological characterization of a *Trypanosoma cruzi* protein homologous to mammalian elongation factor 1 gamma. *Biol. Cell*; 82: 39 – 44.
- Billaut-Mulot, O., Fernandez-Gomez, R., Ouaiissi, A. (1997) Phenotype of recombinant *Trypanosoma cruzi* which overexpress elongation factor 1 gamma: possible involvement of EF-1 γ GST-like domain in the resistance to clomipramine. *Gene*; 198: 259 – 267.
- Blum, J., Fridovich, I. (1983) Superoxide, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity in two free-living nematode species. *Arch. Biochem. Biophys.*; 222: 35 – 43.
- Blumenthal, T., Evans, D., Link, C. D., Guffanti, A., Lawson, D., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Chiu, W. L., Duke, K., Kiraly, M., Kim, S. K. (2002) A global analysis of *Caenorhabditis elegans* operons. *Nature*; 417: 797 – 798.
- Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L. S., Schulte, G. K., Danley, D. E., Hoth, L. R., Griffor, M. C., Kamath, A. V., Rosner, M. H., Chrunch, B. A., Perregaux, D. E., Gabel, C. A., Geoghegan, K. F., Pandit, J. (2000) Identification, characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.*; 275: 24798 – 24806.
- Board, P. G., Coggan, M., Wilce, M. C., Parker, M. W. (1995) Evidence for an essential serine residue in the active site of the Theta class glutathione transferase. *Biochem. J.*; 311: 247 – 250.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*; 72: 248 – 254.
- Britton, C., McKerrow, J. H., Johnstone, I. L. (1998) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* gut Cysteine protease gene *cpr-1*: requirement for GATA motifs. *J. Mol. Biol.*; 283: 15 – 27.
- Brophy, P. M., Pritchard, D. I. (1994) Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. *Exp. Parasitol.*; 79: 89 – 96.
- Browning, K., Humphreys, J., Hobbs, W., Smith, G. B., Ravel, J. M. (1990) Determination of the amounts of the protein synthesis initiation and elongation factors in wheat germ. *J. Biol. Chem.*; 265: 17967 – 17973.
- Burglin, T. R., Lobos, E., Blaxter, M. L. (1998) *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes. *Int. J. Parasitol.*; 28: 395 – 411.

- Burkhardt, S., Reiter, R. J., Tan, D. X., Hardeland, R., Cabrera, J., Karbownik, M. (2001) DNA oxidatively damaged by chromium (III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*; 33: 775 – 783.
- Burmeister, C., Perbandt, M., Betzel, C., Walter, R. D., Liebau, E. (2003) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*; 59: 1469 – 1471.
- Caccuri, A. M., Antonini, G., Allocati, N., Di Ilio, C., De Maria, F., Innocenti, F., Parker, M. W., Masulli, M., Lo Bello, M., Turella, P., Federici, G., Ricci, G. (2002) GSTB1-1 from *Proteus mirabilis*: a snapshot of an enzyme in the evolutionary pathway from a redox enzyme to a conjugating enzyme. *J. Biol. Chem.*; 277: 18777 – 18784.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Ravanat, J. (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*; 131: 1 – 87.
- Callahan, H. L., Crouch, R. K., James, E. R. (1988) Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitol. Today*; 4: 218 – 225.
- Callahan, H. L., Crouch, R. K., James, E. R. (1991) *Dirofilaria immitis* superoxide dismutase: purification and characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.*; 49: 245 – 251.
- Carmel-Harel, O., Storz, G. (2000) Roles of the glutathione- and thiolredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.*; 54: 439 – 461.
- Carr-Schmid, A., Valente, L., Loik, V. I., Williams, T., Starita, L. M., Kinzy, T. G. (1999) Mutations in elongation factor 1 β , a guanine nucleotide exchange factor, enhance translational fidelity. *Mol. Cell. Biol.*; 19: 5257 – 5266.
- Carthew, R. W. (2001) Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr. Opin. Cell. Biol.*; 13: 244 – 248.
- Carvalho, J. F., Carvalho, M. G. C., Merrick, W. C. (1984) Biological characterization of various forms of elongation factor 1 from rabbit reticulocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*; 234: 591 – 611.
- Clos, J., Brandau, S. (1994) pJC20 und pJC40 – two high copy number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Prot. Express. Purif.*; 5: 133 – 137.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 69: 2110 – 2113.
- Cohen, M. S. (1994) Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. *Clin. Infect. Dis.*; 18: 170 – 179.

- Condeelis, J. (1995) Elongation factor 1 α , translation and the cytoskeleton. *TIBS*; 20: 169 – 170.
- Cornett, R., James, M. O., Henderson, G. N., Cheung, J., Shroads, A. L. and Stacpoole, P. W. (1999) Inhibition of glutathione S-transferase zeta and tyrosine metabolism by dichloroacetate: a potential unifying mechanism for its altered biotransformation and toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 262: 752 – 756.
- Cotgreave, I. A., Gerdes, R. G. (1998) Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 242: 1 – 9.
- Dal Monte, M., Cecconi, I., Buono, F., Vilardo, P. G., Del Corso, A., Mura, U. (1998) Thioltransferase activity of bovine lens glutathione S-transferase. *Biochem. J.*; 334: 57 – 62.
- Denton, H., McGregor, J. C., Coombs, G. H. (2004) Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasitespecific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem. J.*; 381: 405 – 412.
- Desikan, R., A.-H.-Mackerness, S., Hancock, J. T., Neill, S. J. (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.*; 127: 159 – 172.
- Dixon, D. P., Laphorn, A., Edwards, R. (2002) Plant glutathione transferases. *Genome Biol.*; 3: Reviews3004 Epub.
- Dröge, W. (2002a) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*; 82: 47 – 95.
- Dröge, W (2002b) Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of Thiol antioxidants. *Exp. Gerontol.*; 37: 1333 – 1345.
- Duine J. A. (1999) Thiols in formaldehyde dissimilation and detoxification. *Biofactors*; 10: 201 – 206.
- Dulhunty, A., Gage, P., Curtis, S., Chelvanayagam, G., Board, P. (2001) The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J. Biol. Chem.*; 276: 3319 – 3323.
- Eaton, D. L. and Bammler, T. K. (1999) Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.*; 49: 156 – 164.
- Eckelt, V. H., Liebau, E., Walter, R. D., Henkle-Dührsen, K. (1998) Primary sequence and activity analyses of a catalase from *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*; 5: 203 – 214.
- Edmonds, B. T., Wyckoff, J., Yeung, Y. G., Wang, Y., Stanley, E. R., Jones, J., Segall, J., Condeelis, J. (1996) Elongation factor-1 α is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. *J. Cell. Sci.*; 109: 2705 – 2714.

- Edwards, R., Dixon, D. P., Walbot, V. (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.*; 5: 193 – 198.
- Ejiri, S. (1986) Purification and characterization of polypeptide chain elongation factor 1 from plants. *Methods Enzymol.*, Academic Press, Orlando; 118: 140 – 153.
- Ejiri, S. (2002) Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: From actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*; 66: 1 – 21.
- Enayati, A. A., Ranson, H., Hemingway, J. (2005) Insect glutathione transferases and insecticides resistance. *Insect Mol. Biol.*; 14: 3 – 8.
- Engle, M. R., Singh, S. P., Czernik, P. J., Gaddy, D., Montague, D. C., Ceci, J. D., Yang, Y., Awasthi, S., Awasthi, Y. C., Zimniak, P. (2004) Physiological role of mGSTA4-4, a glutathione S-transferase metabolizing 4-hydroxynonenal: generation and analysis of mGsta4 null mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 194: 296 – 308.
- Fessenden, J. M., Moldave, K. (1961) Evidence for two protein factors in the transfer of amino acids from soluble-RNA to ribonucleoprotein particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 6: 232 – 235.
- Fessenden, J. M., Moldave, K. (1963) Studies on aminoacyl transfer from soluble transferring activities. *J. Biol. Chem.*; 238: 1479 – 1484.
- Flanagan, J. U., Rossjohn, J., Parker, M. W., Board, P. G., Chelvanayagam, G. (1999) Mutagenic analysis of conserved arginine residues in and around the novel sulfate binding pocket of the human Theta class glutathione transferase T2-2. *Protein Sci.*; 8: 2205 – 2212.
- Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science*; 201: 875 – 880.
- Fukushige, T., Hawkins, M. G., McGhee, J. D. (1998) The GATA-factor elt-2 is essential for formation of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev. Biol.*; 198: 286 – 302.
- Galli, F., Piroddi, M., Annetti, C., Aisa, C., Floridi, E., Floridi, A. (2005) Oxidative stress and reactive oxygen species, *rev. Contrib. Nephrol.*; 149: 240 – 260.
- Gascuel, O., Bryant, D., Denis, F. (2001) Strengths and limitations of the minimum evolution principle. *Syst. Biol.*; 50: 621 – 627.
- Gavrilova, L. P., Kostiashekina, O. E., Koteliansky, V. E., Rutkevitch, N. M., Spirin, A. S. (1976) Factor-free ("non-enzymic") and factor-dependent systems of translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.*; 101: 537 – 552.
- Girardini, J., Amirante, A., Zemzoumi, K., Serra, E. (2002) Characterization of an omega-class glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* with glutaredoxin-like dehydroascorbate reductase and thiol transferase activities. *Eur. J. Biochem.*; 269: 5512 – 5521.

- Girotti, A. W. (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.*; 39: 1529 – 1542.
- Granato, M., Schnabel, H., Schnabel, R. (1994) Genesis of an organ: molecular analysis of the pha-1 gene. *Development*; 120: 3005 – 3017.
- Grant, A. G., Flomen, R. M., Tizard, M. L., Grant, D. A. (1992) Differential screening of a human pancreatic adenocarcinoma λ gt11 expression library has identified increased transcription of elongation factor EF-1 α in tumor cells. *Int. J. Cancer*; 50: 740 – 745.
- Gravina, S. A., Mieyal, J. J. (1993) Thioltransferase is a specific glutathionyl mixed disulfide oxidoreductase. *Biochemistry*; 32: 3368 – 3376.
- Greenberg, J. T., Demple, B. (1986) Glutathione in *Escherichia coli* is dispensable for resistance to H₂O₂ and gamma radiation. *J. Bacteriol.*; 168: 1026 – 1029.
- Gutteridge, J. (1994) Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemo. Biol. Int.*; 91: 133 – 140.
- Haimeur, A., Conseil, G., Deeley, R. G., Cole, S. P. (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab.*; 5: 21 – 53.
- Halliwell, B. (1994) Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet*; 344: 721 – 724.
- Hashimi, S., Tawe, W., Lustigman, S. (2001) *Caenorhabditis elegans* and the study of gene function in parasites. *Trends Parasitol.*; 18: 135 – 393.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 45: 51 – 88.
- Hayes, J. D., McLellan, L. I. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31: 273 – 300.
- Hayes, J. D., Pulford, D. J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzyme to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*; 30: 445 - 600.
- Heukeshoven, J., Dernick, R. (1986) Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamid: Bemerkungen zum Mechanismus der Silberfärbung. LKB-Application Note RE-034.
- Hodgkin, J., Horvitz, H. R., Brenner, S. (1979) Nondisjunction mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*; 91: 67 – 94.

- Holm, P. J., Morgenstern, R., Herbert, H. (2002) The 3-D structure of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution as determined by electron crystallography of p22₁2₁ crystals. *Biochim. Biophys. Acta*; 1594: 276 – 285.
- Holmgren, A. (2000) Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid. Redox Signal.*; 2: 811 – 820.
- Ikeda, H., Serria, M. S., Kakizaki, I., Hatayama, I., Satoh, K., Tsuchida, S., Muramatsu, M., Nishi, S., Sakai, M. (2002) Activation of mouse Pi-class glutathione S-transferase gene by Nrf2 (NF-E2-related factor 2) and androgen. *Biochem. J.*; 364: 563 – 570.
- Ingold, K. U., Webb, A. C., Witter, D., Buton, G. W., Metcalfe, T. A., Muller, D. P. R. (1987) Vitamin E remains the major soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. *Arch. Biochem. Biophys.*; 259: 224 – 225.
- Ishikawa, T., Casini, A. F., Nishikimi, M. (1998) Molecular cloning and functional expression of rat liver glutathione-dependent dehydroascorbate reductase. *J. Biol. Chem.*; 273: 28708 – 28712.
- Jakobsson, P. J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B. (1999) Common structural features of MAPEG – a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.*; 8: 689 – 692.
- Jakoby, B. W., Bend, J. R., Cadwell, J. (1983) *Metabolic basis of detoxification*. Academic Press London; 1 – 375.
- Jancarik, J., Kim, S. H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*; 24: 409 – 411.
- Janssen, G. M. C., Maessen, G. D. F., Amons, R., Möller, W. (1988a) Phosphorylation of elongation factor 1 β by an endogenous kinase affects its catalytic nucleotide exchange activity. *J. Biol. Chem.*; 263: 11063 – 11066.
- Janssen, G. M. C., Möller, W. (1988b) Elongation factor 1 $\beta\gamma$ from *Artemia*. Purification and properties of its subunits. *Eur. J. Biochem.*; 171: 119 – 129.
- Janssen, G. M. C., van Damme, H. T. F., Kriek, J., Amons, R., Möller, W. (1994) The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia*: Why two α -chains in this complex? *J. Biol. Chem.*; 269: 31410 – 31417.
- Jany, K.-D., Hahn, H., Kanth, B. (1991). Gelelektrophoresen. In: Bertram, S., Gassen, H. (Hrsg.): *Gentechnologische Methoden*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 1991.

- Jeppesen, M. G., Ortiz, P., Shepard, W., Kinzy, T. G., Nyborg, J., Andersen, G. R. (2003) The crystal structure of the glutathione S-transferase-like domain of elongation factor 1Bgamma from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*; 278: 47190 – 47198.
- Jiang, M., Ryu, J., Kiraly, M., Duke, K., Reinke, V., Kim, S., K. (2001) Genome-wide analysis of the developmental and sex-regulated gene expression profiles in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 98: 218 – 223.
- Jimi, S., Uchiyama, M., Takaki, A., Suzumiya, J., Hara, S. (2004) Mechanisms of cell death induced by cadmium and arsenic. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 1011: 325 – 331.
- Johansson, A. S., Mannervik, B. (2001) Human glutathione S-transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *J. Biol. Chem.*; 276: 33061 – 33065.
- Jowsey, I. R., Thomson, A. M., Flanagan, J. U., Murdock, P. R., Moore, G. B., Meyer, D. J., Murphy, G. J., Smith, S. A., Hayes, J. D. (2001) Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D2 synthases. *Biochem. J.*; 359: 507 – 516.
- Kambouris, N. G., Burke, D. J., Creutz, C. E. (1993) Cloning and genetic characterization of a calcium and phospholipid binding protein from *Saccaromyces cerevisiae* that is homologous to translation elongation factor-1 γ . *Yeast*; 9: 151 – 163.
- Kampkötter, A., Volkmann, T. E., de Castro, S. H., Leiers, B., Klotz, L. O., Johnson, T. E., Link, C. D., Henkle-Dührsen, K. (2003) Functional analysis of the glutathione S-transferase 3 from *Onchocerca volvulus* (Ov-GST3): A parasite GST confers increased resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.*; 325: 25 – 37.
- Karnovsky, M. J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*; 27: 137A – 138A.
- Kato, M. V., Sato, H., Nagayoshi, M., Ikawa, Y. (1997) Up-regulation of the elongation factor-1 α gene by p53 in association with death of an erythroleukemic cell line. *Blood*; 90: 1373 – 1378.
- Kato, M. V. (1999) The mechanisms of death of an erythroleukemic cell line by p53: involvement of the microtubule and mitochondria. *Leuk. Lymphoma*; 33: 181 – 186.
- Kawashima, T., Berthet-Colominas, G., Wulff, M., Cusack, S., Leberman, R. (1996) The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu/EF-Ts complex at 2.5 Å resolution. *Nature*; 379: 511 – 518.
- Kelner, M. J., Bagnell, R. D., Montoya, M. A., Estes, L. A., Forsberg, L., Morgenstern, R. (2000) Structural organization of the microsomal glutathione S-transferase gene (MGST1) on chromosome 12p13.1-13.2. Identification of the correct promoter region

- and demonstration of transcriptional regulation in response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.*; 275: 13000 – 13006.
- Kidd, K. K., Sgaramella-Zonta, L. A. (1971) Phylogenetic analysis: concepts and methods. *Am. J. Human. Genet.*; 23: 235 – 252.
- Kielbassa, K., Muller, H. J., Meyer, H. E., Marks, F., Gschwendt, M. (1995) Protein kinase C δ -specific phosphorylation of the elongation factor eEF-1 α and an eEF-1 α peptide at threonine 431. *J. Biol. Chem.*; 270: 6156 – 6162.
- Kim, M. J., Si, F., Kim, S. J., Hong, S. B., Hwang, J. I., Lee, H. J., Lee, S. J., Chang, J. S., Lee, Y. H., Rye, S. H., Suh, P. G. (1999) The SH2-SH2-SH3 domain of phospholipase C- γ 1 directly binds to translational elongation factor-1 α . *Mol. Cells*; 9: 631 – 637.
- Kimble, J., Sharrock, W. J. (1983) Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*; 1: 189 – 196.
- Kinzy, T. G., Ripmaster, T. L., Woolford Jr., J. L. (1993) Multiple genes encode the translation elongation factor EF-1 γ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.*; 22: 2703 – 2707.
- Kitchin, K. T., Ahmad, S. (2003) Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*; 137: 2 – 13.
- Klass, M. Hirsh, D. (1976) Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*; 260: 523 – 525.
- Kmonickova, E., Drahotka, Z., Kamenikova, L., Cervinkova, Z., Masek, K., Farghali, H. (2001) Modulatory effect of cyclosporin A on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in hepatocytes. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*; 23: 43 – 54.
- Kobayashi, S., Kidou, S., Ejiri, S. (2001) Detection and characterization of glutathione S-transferase activity in rice EF-1 $\beta\beta'\gamma$ and EF-1 γ expressed in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 288: 509 – 514.
- Kobayashi, M., Itoh, K., Suzuki, T., Osanai, H., Nishikawa, K., Katoh, Y., Takagi, Y., Yamamoto, M. (2002) Identification of the interactive interface and phylogenic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells*; 7: 807 – 820.
- Kodym, R., Calkins, P. R., Story, M. D. (1999) The cloning and characterization of a new stress response protein. A mammalian member of a family of theta class glutathione S-transferase-like proteins. *J. Biol. Chem.*; 274: 5131 – 5137.
- Koonin, E. V., Mushegian, A. R., Tatusov, R. L., Altschul, S. F., Bryant, S. H., Bork, P., Valencia, A. (1994) Eukaryotic translation elongation factor 1 γ contains a glutathione transferase domain: study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. *Prot. Sci.*; 3: 2045 – 2054.

- Kortemme, T., Creiton, T. E. (1995) Ionisation of cystein residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to usual thiol pKa values in proteins of the thioredoxin family. *J. Mol. Biol.*; 253: 799 – 812.
- Krause, M., Hirsh, D. (1987) A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. *Cell*; 49: 753 – 761.
- Kretschmann, E., Raether, H. (1968) Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light. *Z. Naturforsch.*; 23: 2135 – 2136.
- Kuwabara, P. E., Coulson, A. (2000) RNAi – prospects for a general technique for determining gene function. *Parasitol. Today*; 16: 347 – 349.
- Ladner, J. E., Parsons, J. F., Rife, C. L., Gilliland, G. L., Armstrong, R. N. (2004) Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry*; 43: 352 – 361.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T₄. *Nature*; 227: 680 – 685.
- Lake, J. A. (1985) Evolving ribosome structure: Domains in Archaeobacteria, Eubacteria, Eocytes, Eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*; 54: 507 – 530.
- Langeley, K. E., Villarejo, M. R., Fowle, A. V., Zamenhof, P. J., Zabin, I. (1975) Molecular bases of β -Galactosidase α -complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 72: 1254 – 1257.
- Laval, J. (1996) Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Path. Biol.*; 1: 14 – 24.
- Leedle, R. A., Aust, S. D. (1990) The effect of glutathione on the vitamin E requirement of inhibition of liver microsomal lipid peroxidation. *Lipids*; 25: 241 – 245.
- Legocki, A. B., Redfield, B., Weissbach, H. (1974) Interactions of the heavy and light forms of elongation factor 1 with guanine nucleotides and aminoacyl-tRNA. *Arch. Biochem. Biophys.*; 161: 709 – 712.
- Leiers, B., Kampkötter, A., Grevelding, C. G., Link, C. D., Johnson, T. E., Henkle-Dührsen, K. (2003) A stress-responsive glutathione S-transferase confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.*; 34: 1405 – 1415.
- Li, Y.-J., Oliveira, S. A., Xu, P., Martin, E. R., Stenger, J. E., Scherzer, C. R., Hauser, M. A., Scott, W. K., Small, G. W., Nance, M. A., Watts, R. L., Hubble, J. P., Koller, W. C., Pahwa, R., Stern, M., Hiner, B. C., Jankovic, J., Goetz, C. G., Mastaglia, F., Middleton, L. T., Roses, A. D., Sauders, A. M., Schmechel, D. E., Gullans, S. R., Haines, J. L., Gilbert, J. R., Vance, J. M., Pericak-Vance, M. A., Hulette, C., Welsh-Bohmer, K. A. (2003) Glutathione S-transferase omega-1 modifies age-at-onset of Alzheimer disease and Parkinson disease. *Hum. Mol. Genet.*; 12: 3259 – 3267.

- Li, Y. J., Scott, W. K., Zhang, L., Lin, P. I., Oliveira, S. A., Skelly, T., Doraiswamy, M. P., Welsh-Bohmer, K. A., Martin, E. R., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Vance, J. M. (2005) Revealing the role of glutathione S-transferase omega in age-at-onset of Alzheimer and Parkinson diseases. *Neurobiol. Aging*; Epub ahead of print.
- Liebau, E., Bergmann, B., Campbell, A. M., Teesdale-Spittle, P., Brophy, P. M., Lüersen, K., Walter, R. D. (2002) The glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*; 124: 85 – 90.
- Liebau, E., Eschbach, M. L., Tawe, W., Sommer, A., Fischer, P., Walter, R. D., Henkle-Dührsen, K. (2000) Identification of a stress-responsive *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase (Ov-GST-3) by RT-PCR differential display. *Mol. Biochem. Parasitol.*; 109: 101 – 110.
- Listowski, I. (1993) Glutathione S-transferases: intracellular binding, detoxication and adaptive responses. In: *Hepatic transport and bile secretion: Physiology and pathophysiology*. N. Tavoloni and D. Berk (Hrsg.); 397 – 405.
- Lou, M. F. (2003) Redox regulation in the lens. *Prog. Retin. Eye Res.*; 22: 657 – 682.
- Lucius, R., Loos-Frank, B. (1997) *Parasitologie: Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner*. Spekt. Akad. Verl.; 213 – 261.
- Lüersen, K., Walter, R. D., Müller, S. (2000) *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells depend on a functional glutathione de novo synthesis attributable to an enhanced loss of glutathione. *Biochem. J.*; 346: 545 – 552.
- Maduro, M. F., Rothman, J. H. (2002) Making worm guts: the gene regulatory network of the *Caenorhabditis elegans* endoderm. *Dev. Biol.*; 246: 68 – 85.
- Mamoun, C. B., Goldberg, D. E. (2001) *Plasmodium* protein phosphatase 2C dephosphorylates translation elongation factor 1 β and inhibits its PKC-mediated nucleotide exchange activity *in vitro*. *Mol. Microbiol.*; 39: 973 – 81.
- Mansilla, F., Friis, I., Jadidi, M., Nielsen, K. M., Clark, B. F. C., Knudsen, C. R. (2002) Mapping the human translation elongation factor eEF1H complex using the yeast two-hybrid system. *Biochem. J.*; 365: 669 – 676.
- Marcinkiewicz, C., Gajko, A., Galasinski, W. (1992) The phosphorylation of elongation factor EF-1 isolated from Guerin epithelioma. *Acta Biochim. Pol.*; 39: 7 – 13.
- Marnett, L. J., Riggins, J. N., West, J. D. (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Invest.*; 111: 583 – 593.
- Martin, J. L. (1995) Thioredoxin – a fold for all reasons. *Structure*; 3: 245 – 250.
- McPherson, A. (1982) *Preparation and analysis of protein crystals*. New York: John Wiley and Sons.

- Mello, C., Fire, A. (1995) DNA transformation. *Methodes Cell. Biol.*; 48: 451 – 482.
- Merrick, W. C. (1992) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Rev.*; 56: 291 – 315.
- Miller, W. H. Jr., Schipper, H. M., Lee, J. S., Singer, J., Waxman, S. (2002) Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.*; 62: 3893 – 3903.
- Miyazaki, M., Uritani, M., Fujimura, K., Yamakatsu, H., Kageyama, T., Takahashi, K. (1988) Peptide elongation factor 1 from yeasts: purification and biochemical characterization of peptide elongation factors 1 α (γ) from *Saccharomyces carlsbergensis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biochem. (Tokyo)*; 103: 508 – 521.
- Moazed, D., Noller, H. F. (1989) Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature*; 342: 142 – 148.
- Monnier, A., Bellé, R., Morales, J., Cormier, P., Boulben, S., Mulner-Lorillon, O. (2001) Evidence for regulation of protein synthesis at the elongation step by CDK1/cyclin B phosphorylation. *Nucl. Acids Res.*; 29: 1453 – 1457.
- Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Piton, A., Theret, N., Coles, B., Guillouzo, A. (2004) Gene and protein characterization of human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J. Biol. Chem.*; 279: 16246 – 16253.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., Pickett, C. B. (2003) Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 43: 233 – 260.
- Nicholas, W. L. (1984) *The biology of free living nematodes*. 2nd Ed. Clarendon Press, Oxford.
- Nicotera, P., McConkey, D., Svensson, S. A., Bellomo, G., Orrenius, S. (1988) Correlation between cytosolic Ca²⁺ concentration and cytotoxicity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicology*; 52: 55 – 63.
- Nierhaus, K. H. (1990) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle: features and future. *Biochemistry*; 29: 4997 – 5008.
- Nolan, R. D., Grasmuk, H., Drews, J. (1975) The binding of tritiated elongation factors 1 and 2 to ribosomes from Krebs II mouse ascites tumor cells. *Eur. J. Biochem.*; 50: 391 – 402.
- Norppa, H. (2004) Cytogenetic biomarkers and gene polymorphisms. *Toxicol. Lett.*; 149: 309 – 334.
- Nowell, M. A., de Pomerai, I. D., Pritchard, D. I. (1999) *Caenorhabditis elegans* as a biomonitor for immunological stress in nematodes. *Parasite Immunol.*; 21: 495 – 505.

- NRC – National Research Council – (2001) Arsenic in drinking water. Washington, DC: National Academy Press.
- Nuhn, P. (1993) The biochemical basis of toxic actions of drugs and other xenobiotics. *Pharm. unserer Zeit*; 22: 119 – 133.
- Otwinowski, Z., Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.*; 276: 307 – 326.
- Pasi, A. (1978) The toxicology of paraquat, diquat and morfamquat. Hans Huber, Bern, Switzerland.
- Patel, J., McLeod, L. E., Vries, R. G., Flynn, A., Wang, X., Proud, C. G. (2002) Cellular stresses profoundly inhibit protein synthesis and modulate the states of phosphorylation of multiple translation factors. *Eur. J. Biochem.*; 269: 3076 – 3085.
- Perbandt, M., Burmeister, C., Walter, R. D., Betzel, C., Liebau, E. (2004) Native and inhibited structure of a Mu class-related glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.*; 279: 1336 – 1342.
- Perez, J. M. J., Siegal, G., Kriek, J., Hard, K., Dijk, J., Canters, G. W., Möller, W. (1999) The solution structure of the guanine nucleotide exchange domain of human elongation factor 1 β reveals a striking resemblance to that of EF-Ts from *Escherichia coli*. *Structure*; 7: 217 – 226.
- Plumas-Marty, B., Verwaerde, C., Loyens, M., Velge, P., Taibi, A., Cesbron, M.-F., Capron, A., Ouaisi, M. A. (1992) *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: immunogenicity during human and experimental Chagas' disease. *Parasitology*; 104: 87 – 98.
- Popham, J. D., Webster, J. M. (1979) Aspects of the fine structure of the dauer larva of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Can. J. Zool.*; 57: 794 – 800.
- Precious, W. Y., Barrett, J. (1989) The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths. *Biochim. Biophys. Acta*; 992: 215 – 222.
- Pulford, D. J., Hayes, J. D. (1996) Characterization of the rat glutathione S-transferase Yc2 subunit gene, GSTA5: identification of a putative antioxidant-responsive element in the 5'-flanking region of rat GSTA5 that may mediate chemoprotection against aflatoxin B1. *Biochem. J.*; 318: 75 – 84.
- Raghavachari, N., Qiao, F., Shinohara, T., Kikuchi, T., Lou, M. F. (1999) Does glutathione-S-transferase dethiolate lens protein-thiol mixed disulfides? – A comparative thioltransferase. *Exp. Eye Res.*; 68: 715 – 724.
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V., Unger, M. F., Collins, F. H., Feyereisen, R. (2002) Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*; 298: 179 – 181.

- Ranson, H., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C. W., Collins, F. H., Hemingway, J. (2001) Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DTT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.*; 359: 295 – 304.
- Reynolds, E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*; 17: 208 – 212.
- Rheinberger, H.-J., Geigenmuller, U., Gnirke, A., Hausner, T.-P., Remmer, J., Saruyama, H., Nierhaus, K. H. (1990) *The Ribosome: Structure, Function and Genetics*. American Society for Mikrobiologie, Washington DC, S. 318.
- Rhoads, R. E. (1999) Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis. *J. Biol. Chem.*; 274: 30337 – 30340.
- Riley, P. A. (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*; 65: 27 – 33.
- Rouimi, P., Anglade, P., Benzekri, A., Costet, P., Debrauwer, L., Pineau, T., Tulliez, J. (2001) Purification and characterization of a glutathione S-transferase Omega in pig: evidence for two distinct organ-specific transcripts. *Biochem. J.*; 358: 257 – 262.
- Rushmore, T. H., Morton, M. R., Pickett, C. B. (1991) The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.*; 266: 11632 – 11639.
- Rzhetsky, A., Nei, M. (1992a) A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol.*; 9: 945 – 967.
- Rzhetsky, A., Nei, M. (1992b) Statistical properties of the ordinary least-squares, generalized least-squares, and minimum-evolution methods of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.*; 35: 367 – 375.
- Saiki, R. K., Walsh, P. S., Levenson, C. H., Erlich, H. A. (1989) Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 86: 6230 – 6234.
- Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*; 4: 406 – 425.
- Salinas, A. E., Wong, M. G. (1999) Glutathione S-transferases. *Curr. Med. Chem.*; 6: 279 – 309.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanders, J., Raggiaschi, R., Morales, J., Moller, W. (1993) The human leucine zipper-containing guanine-nucleotide exchange protein elongation factor-1. *Biochim. Biophys. Acta*; 1174: 87 – 90.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 74: 5463 – 5467.
- Schierenberg, E., Cassada, R. (1986) Der Nematode *Caenorhabditis elegans* – ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus unserer Zeit. *Biologie in unserer Zeit*; 1: 1 – 7.
- Schnabel, H., Schnabel, R. (1990) An organ-specific differentiation gene, Pha-1 from *C. elegans*. *Science*; 250: 686 – 688.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., Dowed, C. A. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.*; 360: 1 – 16.
- Sheu, G.-T., Traugh, J. A. (1997) Recombinant subunits of mammalian elongation factor 1 expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*; 272: 33290 – 33297.
- Sheu, G.-T., Traugh, J. A. (1999) A structural model for elongation factor 1 (EF-1) and phosphorylation by protein kinase CKII. *Mol. Cell. Biochem.*; 191: 181 – 186.
- Shvedova, A. A., Kisin, E. R., Murray, A., Kommineni, C., Vallyathan, V., Castranova, V. (2004) Pro/antioxidant status in murine skin following tropical exposure to cumene hydroperoxide throughout the ontogeny of skin cancer. *Biochemistry (Mosc.)*; 69: 23 – 31.
- Sies, H. (1986) Biochemie des oxidativen Stress. *Angew. Chem.*; 98: 1061 – 1075.
- Sies, H. (1989) Zur Biochemie der Thiolgruppe: Bedeutung des Glutathions. *Naturwissenschaften*; 76: 57 – 64.
- Sies, H. (1991) Oxidative stress. Oxidants and Antioxidants. Academic Press, London.
- Sies, H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.*; 27: 916 – 21.
- Singh, U., Devaraj, S., Jialal, I. (2005) Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu. Rev. Nutr.*; 25: 151 – 174.
- Sprinzl, M. (1994) Elongation factor Tu: a regular GTPase with an integrated effector. *TIBS*; 19: 245 – 250.
- Spirin, A. S. (2002) Ribosome as a molecular machine. *FEBS Lett.*; 514: 2 – 10.
- Stenberg, G., Board, P. G., Mannervik, B. (1991) Mutation of an evolutionarily conserved tyrosine residue in the active site of a human class Alpha glutathione transferase. *FEBS Lett.*; 293: 153 – 155.
- Sulston, J. E., Brenner, S. (1974) The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*; 77: 95 – 104.

- Sulston, J. E., Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineage of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol.; 56: 110 – 156.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., Thomson, J. N. (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol.; 100: 64 – 119.
- Tan, K. L., Chelvanayagam, G., Parker, M. W., Board, P. G. (1996) Mutagenesis of the active site of the human Theta-class glutathione transferase GSTT2-2: catalysis with different substrates involves different residues. Biochem. J.; 319: 315 – 321.
- Tanaka-Kagawa, T., Jinno, H., Hasegawa, T., Makino, Y., Seko, Y., Hanioka, N., Ando, M. (2003) Functional characterization of two variant human GSTO 1-1s (Ala140Asp and Thr217Asn). Biochem. Biophys. Res. Commun.; 301: 516 – 520.
- Tate, S. S., Meister, A. (1976) Subunit structure and isozymic forms of gamma-glutamyl transpeptidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 73: 2599 – 2603.
- Tawe, W. N., Eschbach, M. L., Walter, R. D., Henkle-Dührsen, K. (1998) Identification of stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans* using RT-PCR differential display. Nucleic Acids Res.; 26: 1621 – 1627.
- Thornalley, P. J. (1998) Glutathione-dependent detoxification of alpha-oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors. Chem. Biol. Interact.; 111 – 112: 137 – 151.
- Tjalkens, R. B., Luckey, S. W., Kroll, D. J., Petersen, D. R. (1999) Alpha, beta-unsaturated aldehydes mediate inducible expression of glutathione S-transferase in hepatoma cells through activation of the antioxidant response element (ARE). Adv. Exp. Med. Biol.; 463: 123 – 131.
- Townsend, D., Tew, K. (2003) Cancer drugs, genetic variation and the glutathione-S-transferase gene family. Am. J. Pharmacogenomics; 3: 157 – 172.
- Tracy, J. W., Vande Waa, E. A. (1995) Xenobiotic metabolism. In: Biochemistry and molecular biology of parasites. Marr, J. J., Müller, M. (Hrsg.), Academic Press; 161 – 171.
- Tripp, C., Frank, R. S., Selkirk, M. E., Tang, L., Grieve, M. M., Frank, G. R., Grieve, R. G. (1998) *Dirofilaria immitis*: molecular cloning and expression of a cDNA encoding a selenium-independent secreted glutathione peroxidase. Exp. Parasitol.; 88: 43 – 50.
- Tsuchida, S., Sato, K. (1992) Glutathione transferases and cancer. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.; 27: 337 – 384.
- Uetsuki, T., Naito, A., Nagata, S., Kaziro, Y. (1989) Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide elongation factor 1 α . J. Biol. Chem.; 264: 5791 – 5798.

- Urade, Y. and Hayaishi, O. (2000) Prostaglandin D synthase: structure and function. *Vitam. Horm.*; 58: 89 – 120.
- Valenzuela, O., Borja-Aburto, V. H., Garcia-Vargas, G. G., Cruz-Gonzalez, M. B., Garcia-Montavalo, E. A., Calderon-Aranda, E. S., Del Razo, L. M. (2005) Urinary trivalent methylated arsenic species in a population chronically exposed to inorganic arsenic. *Environ. Health Perspect.*; 113: 250 – 254.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*; 12: 1161 – 1208.
- van Bladeren, P. J. (2000) Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem. Biol. Interact.*; 129: 61 – 76.
- van Damme, H. T., Amons, R., Karssies, R., Timmers, C. J., Janssen, G. M., Möller, W. (1990) Elongation factor 1 β from *Artemia*: localization of functional sites and homology to elongation factor 1 δ . *Biochim. Biophys. Acta*; 1050: 241 – 247.
- Veal, E. A., Toone, W. M., Jones, N., Morgan, B. A. (2002) Distinct roles of glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.*; 277: 35523 – 35531.
- Vickers, T. J., Fairlamb, A. H. (2004a) Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B. *J. Biol. Chem.*; 279: 27246 – 27256.
- Vickers, T. J., Wyllie, S., Fairlamb, A. H. (2004b) *Leishmania major* elongation factor 1B complex has trypanothione S-transferase and peroxidase activity. *J. Biol. Chem.*; 279: 49003 – 49009.
- Vuilleumier, S., Sorribas, H., Leisinger, T. (1997) Identification of a novel determinant of glutathione affinity in dichloromethane dehalogenases/glutathione S-transferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 238: 452 – 456.
- Wang, L., Xu, J., Ji, C., Gu, S., Lv, Y., Li, S., Xu, Y., Xie, Y., Mao, Y. (2005) Cloning, expression and characterization of human glutathione S-transferase Omega 2. *Int. J. Mol. Med.*; 16: 19 – 27.
- Wang, M. C., Bohmann, D., Jasper, H. (2003) JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell.*; 5: 811 – 816.
- Wang, W., Poovaiah, B. W. (1999) Interaction of plant chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase with a homolog of eukaryotic elongation factor-1 α . *J. Biol. Chem.*; 274: 12001 – 12008.
- Washburn, M. P., Wells, W. W. (1999) Identification of the dehydroascorbic acid reductase and thioltransferase (Glutaredoxin) activities of bovine erythrocyte glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 257: 567 – 571.

- Wells, W. W., Xu, D. P., Yang, Y., F., Rocque, P. A. (1990) Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J. Biol. Chem.*; 265: 15361 – 15364.
- Wells, W. W., Xu, D. P., Washburn, M. P. (1995) Glutathione: dehydroascorbate oxidoreductases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 221: 117 – 121.
- Whitbread, A. K., Tetlow, N., Eyre, H. J., Sutherland, G. R., Board, P. G. (2003) Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics*; 13: 131 – 144.
- Willson, S. J. (2004) Minimum evolution using ordinary least-squares is less robust than neighbor-joining. Dpt. of mathematics, Iowa state University, USA <http://www.public.iastate.edu/~swillson/Willson.MinEvolRob.pdf>
- Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., *et al.* (1994) 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature*; 368: 32 – 38.
- Wiseman, H., Halliwell, B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*; 313: 17 – 29.
- Wood, W. B., Meneely, P., Schedin, P., Donahue, L. (1985) Aspects of dosage compensation and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*; 50: 575 – 583.
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., Turner, N. D. (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.*; 134: 489 – 492.
- Xie, C., Lovell, M. A., Xiong, S., Kindy, M. S., Guo, J., Xie, J., Amaranth, V., Montine, T. J., Markesbery, W. R. (2001) Expression of glutathione-S-transferase isoenzyme in the SY5Y neuroblastoma cell line increases resistance to oxidative stress. *Free radic. Biol. Med.*; 31: 73 – 81.
- Yang, F., Demma, M., Warren, V., Dharmawardhane, S., Condeelis, J. (1990) Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* as elongation factor 1 α . *Nature (London)*; 347: 494 – 496.
- Yin, Z. L., Dahlstrom, J. E., Couteur, D. G., Board, P. G. (2001) Immunohistochemistry of omega class glutathione S-transferase in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.*; 49: 983 – 987.
- Zakharyan, R. A., Sampayo-Reyes, A., Healy, S. M., Tsapralis, G., Board, P. G., Liebler, D. C., Aposhian, H. V. (2001) Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione S-transferase superfamily. *Chem. Res. Toxicol.*; 14: 1051 – 1057.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Eva Liebau danke ich herzlich für die langjährige und inspirierende Zusammenarbeit, für die Bereitstellung der interessanten Themen und die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf internationalen Kongressen vorzustellen. Vielen Dank für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und die vielen wissenschaftlichen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Konrad Wiese danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. Rolf D. Walter danke ich für die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Markus Perbandt möchte ich für die spannende Einführung in die Welt der Kristallisation und die erfolgreiche Zusammenarbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Büttner, Frau Ingeborg Albrecht und Frau Schmetz danke ich für die Unterstützung bei der Immunhistologie und Elektronenmikroskopie.

Herrn PD Dr. Joachim Clos gilt mein Dank für die Durchführung der MALDI-TOF-Analysen und Melanie van Yperen danke ich für die Hilfe am Biacore.

Ein ganz besonderer Dank geht an Marzena Domagalski für die gute Zusammenarbeit und vor allem für ihre wertvolle Unterstützung im Labor.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Marie-Luise Eschbach für ihre vielen Tips und Tricks sowie bei den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe „Biochemische Parasitologie“ für die hilfsbereite und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Mein persönlicher Dank geht an Ralf Maier-Reinhardt, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für das Korrekturlesen, die vielen aufbauenden Worte und die schöne, gemeinsame Zeit danke ich Uwe Bernhard.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, ohne deren liebevolle und vielseitige Unterstützung ich dieses Ziel nicht erreicht hätte.