

Molekulare Charakterisierung der
Glutathion S-Transferasen
OvGST1, *OvGST2* und *OvGST3*
aus *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893)

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
- Dr. rer. nat. -
des Departments Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jana Höppner
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: 21. April 2006

Hamburg, den 04. April 2006



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Lieberei'.

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1. NEMATODA	1
1.2. <i>ONCHOCERCA VOLVULUS</i>	1
1.2.1. Lebenszyklus und Entwicklung	2
1.2.2. Parasiten-Wirt-Beziehung und Immunantwort	5
1.3. REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS) UND DEREN BEDEUTUNG	6
1.3.1. Entstehung und Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	7
1.3.2. Antioxidative Schutzmechanismen	8
1.4. GLUTATHION S-TRANSFERASEN	10
1.4.1. Das Ko-Substrat Glutathion	10
1.4.2. Funktion der Glutathion S-Transferasen	11
1.4.3. Struktur und Klassifizierung (Nomenklatur)	12
1.4.4. Bedeutung der Glutathion S-Transferasen in Helminthen	14
1.4.5. Glutathion S-Transferasen von <i>O. volvulus</i>	14
1.5. PRINZIP DER KRISTALLISATION	16
1.5.1. Proteinkristalle	17
1.5.2. Röntgendiffraktion	18
2. ZIELSETZUNG	19
3. MATERIAL UND METHODEN	20
3.1. MATERIALIEN	20
3.1.1. Chemikalien und Biochemikalien	20
3.1.2. Mikroorganismen und Plasmide	23
3.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
3.1.4. Allgemeine Medien, Lösungen und Puffer	24
3.2. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	25
3.2.1. Stammhaltung und Kultivierung der verwendeten Mikroorganismen	25
3.2.2. Herstellung kompetenter Bakterien	25
3.2.3. Transformation von <i>E. coli</i>	26
3.2.4. Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	26

3.2.5.	Rekombinante Expression unter Verwendung eines Fermenters	27
3.3.	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	27
3.3.1.	Gewinnung und Aufbereitung von Onchozerkomen	27
3.3.2.	Aufschluss von weiblichen <i>O. volvulus</i> für Protein-Isolierung	27
3.3.3.	Präparation von gesamt-RNA aus <i>O. volvulus</i>	27
3.3.4.	Reverse Transkriptase-Reaktion	28
3.3.5.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	28
3.3.6.	Mutagenese-PCR	29
3.3.7.	Plasmid-DNA Präparation	29
3.3.8.	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	30
3.3.9.	DNA-Aufreinigung über DNA-Affinitätsäulen (Qiaquick PCR Purifikation Kit, Qiagen)	30
3.3.10.	Auftrennung von DNA über Agarosegel-Elektrophorese	31
3.3.11.	Ligation von DNA-Fragmenten	31
3.3.12.	Dpn1-Verdau	31
3.3.13.	Methoden zur DNA-Sequenzierung	32
3.3.14.	5'- und 3'- „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE)	33
3.3.15.	Amplifikation der unterschiedlich gespleißten mRNA der <i>Ov</i> GST3 cDNA mit Hilfe des Spliced Leads (SL1)	34
3.3.16.	Signalpeptid-Nachweis	36
3.3.17.	Verdau mit dem Faktor Xa	36
3.3.18.	Expression der <i>Ov</i> GST3-Varianten unter Verwendung des pJC40-Vektor	36
3.3.19.	Expression der <i>Ov</i> GST3-Varianten unter Verwendung des pMal-c2X-Vektors	37
3.3.20.	Herstellung des Antikörper-Konstruktes AK-SLC1-7	38
3.4.	BIOCHEMISCHE METHODEN	39
3.4.1.	Reinigung rekombinanter Proteine über Ni ²⁺ -Chelatchromatographie	39
3.4.2.	Reinigung rekombinanter Proteine über StrepTactin	39
3.4.3.	Reinigung rekombinanter Proteine über Amylose/Agarose Matrix	40
3.4.4.	Reinigung rekombinanter Proteine über GSH-Sepharose bzw S-Hexylglutathion-Agarose	40
3.4.5.	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	41
3.4.6.	Gelfiltration mittels „Fast pressure liquid chromatography“ (FPLC)	41
3.4.7.	SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen	41
3.4.8.	Färbung der Proteingele mit Coomassie-Blau	42
3.4.9.	Synthese des Ethacrynsäure-Glutathion-Konjugates	43
3.4.10.	Synthese des S-p-Bromobenzylglutathions	43
3.4.11.	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	43

3.5.	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	44
3.5.1.	Western Blot und Immundetektion von Proteinen.....	44
3.5.2.	Immunisierung eines Huhns.....	45
3.5.3.	Antikörper-Aufreinigung aus Hühnereidotter	45
3.5.4.	Antikörper-Aufreinigung über „CNBr-activated Sepharose 4B“ (Amersham Biosciences)	46
3.5.5.	Herkunft der immunhistologisch untersuchten Würmer	47
3.5.6.	Immundetektion der <i>OvGST3</i> in Paraffinschnitten.....	49
3.5.7.	Detektion der <i>OvGST3</i> durch Elektronenmikroskopie	50
3.5.8.	Nachweis von Antikörpern gegen <i>OvGST3</i> im „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)	51
3.5.9.	Statistische Analyse der ELISA-Ergebnisse	52
3.6.	KRISTALLISATION DER <i>rOvGST1</i> UND <i>rOvGST2</i>	53
3.6.1.	Expression der <i>rOvGST1</i> und <i>rOvGST2</i>	53
3.6.2.	Aufreinigung und Konformationsbestimmung der Proteinlösungen	54
3.6.3.	Derivatisierung mit Schweratomen.....	54
3.6.4.	Ko-Kristallisation mit Inhibitoren	55
3.6.5.	Kristallisation.....	55
3.6.6.	Vorbereitung der Kristalle zur Tieftemperatur-Messung	56
3.6.7.	Kristallographische Datensammlung	20
4.	ERGEBNISSE	58
4.1.	HERSTELLUNG VON <i>OvGST1</i> -INHIBITOREN	58
4.1.1.	Synthese von Brombenzyl-Glutathion	58
4.1.2.	Synthese eines Ethacrynsäure-Glutathion-Konjugat	59
4.2.	KRISTALLSTRUKTURANALYSE DER <i>OvGST1</i> UND <i>OvGST2</i>	60
4.2.1.	Expression und Aufreinigung der rekombinanten <i>OvGST1</i>	60
4.2.2.	Expression und Aufreinigung der rekombinanten <i>OvGST2</i>	61
4.2.3.	Untersuchung der Proteinlösung mittels dynamischer Lichtstreuung.....	61
4.2.4.	Kristallisation der <i>rOvGST1</i>	62
4.2.5.	Strukturanalyse der <i>OvGST1</i>	65
4.2.6.	Primär- und Sekundärstrukturanalyse der <i>OvGST1</i>	65
4.2.7.	Kristallisation der <i>rOvGST2</i>	67
4.2.8.	Strukturanalyse des <i>OvGST2</i> -GSH-Komplexes	70
4.2.9.	Strukturanalyse des <i>OvGST2</i> -S-Hexylglutathion-Komplexes	70
4.2.10.	Primär- und Sekundärstrukturanalyse der <i>OvGST2</i>	71

4.3.	CHARAKTERISIERUNG DER <i>Ov</i> GST3.....	73
4.3.1.	Primär- und Sekundärstrukturanalyse der <i>Ov</i> GST3	73
4.3.2.	Analyse der cDNA der <i>Ov</i> GST3.....	75
4.3.3.	Rekombinante Expression der <i>Ov</i> GST3-Varianten	81
4.4.	HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN DIE <i>Ov</i> GST3.....	84
4.4.1.	Das Antikörper-Konstrukt AK-SLC1_7.....	85
4.4.2.	Antikörperspezifität	86
4.5.	LOKALISATION DER <i>Ov</i> GST3 IN <i>O. volvulus</i> MITTELS LICHTMIKROSKOPIE.....	88
4.5.1.	Spezifität des Anti- <i>Ov</i> GST3 Antikörpers in Schnitten von <i>O. volvulus</i>	88
4.5.2.	Detektion der nativen <i>Ov</i> GST3 in Entwicklungsstadien von unbehandelten <i>O. volvulus</i>	90
4.5.3.	Detektion der nativen <i>Ov</i> GST3 in Schnitten von chemotherapeutisch behandelten <i>O. volvulus</i>	92
4.5.4.	Formen und Strukturen von <i>O. volvulus</i> ohne Antikörperreaktionen.....	94
4.5.5.	Variierende Antikörperreaktionen in Schnitten von <i>O. volvulus</i>	95
4.5.6.	Immundetektion mit dem <i>Ov</i> GST3-AK in Schnitten anderer Onchocerca-Arten	96
4.5.7.	Lokalisation der Omega-GSTs in mit Onchocerca-verwandten Filarien und anderen Helminthen.....	99
4.6.	LOKALISATION DER <i>Ov</i> GST3 IN <i>O. volvulus</i> MITTELS ELEKTRONENMIKROSKOPIE	100
4.6.1.	Immungolddetektion der <i>Ov</i> GST3 in der Eihülle von <i>O. volvulus</i>	101
4.6.2.	Immungolddetektion vom Hitzeschockprotein HSP60 in <i>O. volvulus</i>	103
4.6.3.	Immungolddetektion der Uterus- und Körperwand von <i>O. volvulus</i>	105
4.7.	NACHWEIS VON <i>Ov</i> GST3-ANTI-KÖRPERN IN HUMANSEREN MITTELS ELISA.....	107
4.7.1.	Antikörperantwort von Onchozerkose-Patienten gegen <i>Ov</i> GST3.....	107
4.7.2.	Antikörperantwort gegen <i>Ov</i> GST3 von Patienten mit hyperreaktiver (Sowda-) und generalisierter Form der Onchozerkose	109
4.7.3.	Antikörperantwort gegen <i>Ov</i> GST3 von Onchozerkose-Patienten mit hoher und mit niedriger Mikofilarien-Dichte.....	110
4.7.4.	ELISA gegen <i>Ov</i> GST3 mit <i>O. volvulus</i> verwandter Filarien- und Trematoden infizierter Patientenserum	111
5.	DISKUSSION	114
5.1.	DIE KRISTALLSTRUKTURANALYSE DER <i>Ov</i> GST1	115
5.2.	DIE KRISTALLSTRUKTURANALYSE DER <i>Ov</i> GST2	116
5.3.	DIE <i>Ov</i> GST3 UND IHR VERGLEICH ZU ANDEREN OMEGA-GST	119
5.4.	SPLEIßPROZESSE UND DEREN BEDEUTUNG FÜR DIE <i>Ov</i> GST3.....	122

5.5.	IMMUNHISTOLOGISCHE BEFUNDE UND DEREN INTERPRETATION	125
5.6.	DIE IMMUNOGENEN EIGENSCHAFTEN DER R α IGST3	131
6.	ZUSAMMENFASSUNG	135
7.	LITERATUR	138
	DANKSAGUNG	150

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APAAP	alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosyltriphosphat
BCIP	5-Brom-4-(Chloro-3)-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	„copy“ Desoxyribonukleinsäure
kDa	Kilo-Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DESY	Deutsches-Elektronen-Synchrotron
dH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrophorese Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
EM	Elektronenmikroskopie
g	Gravitationskonstante
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GST	Glutathion S-Transferase
HABA	Hydroxyazophenyl Benzolsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPLC	„High Pressure Liquid Chromatography“
H ₃ PO ₄	Hydrogenphosphat
HO [·]	Hydroxylradikal
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JNK	Jun N-terminal Protein Kinase
K	Grad Kelvin
kb	Kilobasen
KHCO ₃	Kaliumcarbonat
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
λ	Wellenlänge
L1-L4	Larvenstadien
LB	Luria-Bertani
M	molar
mM	millimolar
mA	Milli-Amper
MALDI	„Matrix assisted laser desorption/ionization“
MBP	Maltose-bindendes Protein
Mf	Mikrofilarien
Min.	Minute
mol	Molmasse

mRNA	“messenger” Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Ni ²⁺ -NTA	Nickelchelat-Affinitätschromatographie
nm	Nanometer
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PGDS	Prostaglandin D-Synthetase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rO ₁ GST	rekombinante <i>Onchocerca volvulus</i> Glutathion S-Transferase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase von RNA durch PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Spliced Leader
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Terrific Broth
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	"time-of flight mass"
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumenprozent
V	Volt
w/v	Gewichtsprozent
W	Watt
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-galactosid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1. Einleitung

1.1. Nematoda

Die Nematoden (Fadenwürmer) bilden nach mit schätzungsweise 40 000 Spezies, von denen 16 000 Arten beschrieben sind, eine der vielfältigsten und individuenreichsten Gruppe im Tierreich (Anderson, 1994). Viele Nematoden sind im Laufe der Evolution zur parasitären Lebensweise in Mensch, Tier und Pflanzen übergegangen. Sie haben als parasitische Krankheitserreger für den Menschen human- und veterinärmedizinisch sowie ökonomisch eine überaus große Bedeutung. Etwa 35 Arten parasitieren im Menschen (Anderson, 1994), von denen viele zur Überfamilie der Filarioidea der Ordnung Spirurida zählen. Zu ihnen gehören acht bekannte humanpathogene Arten: *Onchocerca volvulus*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. timori*, *Loa loa*, *Mansonella streptocerca*, *M. ozzardi* und *M. perstans*. Weltweit sind über 150 Millionen Menschen mit diesen Filarienarten infiziert, wobei *O. volvulus* eine der wichtigsten Arten darstellt (WHO 1992; Hall, 1999).

1.2. *Onchocerca volvulus*

Der Nematode *O. volvulus* gehört wie die anderen humanpathogenen Filarien zur Familie der Onchocercidae, die in die obligat parasitisch lebende Überfamilie der Filarioidea eingeordnet wird. *O. volvulus* ist der Erreger der Onchozerkose, die auch als Flussblindheit bekannt ist. Sie ist eine Tropenkrankheit, die in Afrika, aber auch in Latein- und Mittelamerika und im Jemen vorkommt (Abb. 1.2.1.). Weltweit sind mehr als 18 Millionen Menschen betroffen (WHO 1995), von denen 99 % in Afrika leben. In Teilen von Westafrika wurden große fruchtbare Landstriche in Flussnähe verlassen, aus Angst vor Erblindung durch die Onchozerkose. Dies veranlasste im Jahre 1974 die WHO ein auf mindestens 20 Jahre angesetztes Bekämpfungsprojekt zur Eindämmung der Onchozerkose zu beginnen. Dabei wurde zunächst der Vektor bekämpft. Später wurde die Bevölkerung mit dem mikrofilariziden Ivermectin behandelt, was zu einer deutlichen Reduktion der Erblindungen führte. Doch das Fehlen makrofilarizider Medikamente erschwert einen langfristigen Schutz. Eine Eliminierung der

Onchozerkose ist erst durch die Entwicklung effektiv wirkender Medikamente oder eines Impfstoffes zu erwarten. Auch sind diese wegen der absehbaren Gefahr einer Resistenzbildung gegen Ivermectin dringend erforderlich.

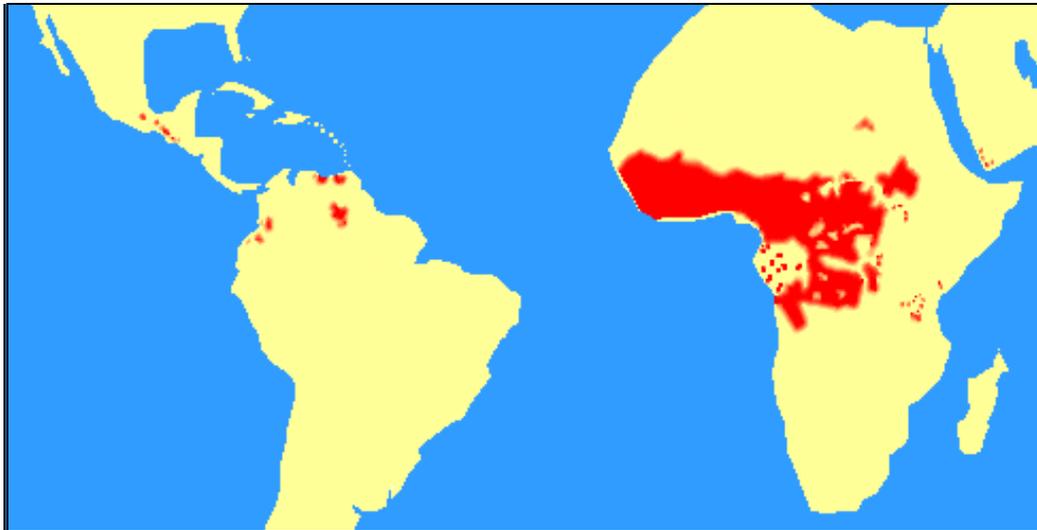


Abb. 1.2.1. Geographische Verbreitung der Onchozerkose

Die weltweite Verbreitung der Onchozerkose beschränkt sich auf die tropischen Gebiete Afrikas, dem Jemen und sechs Länder in Lateinamerika (rote Markierungen). Quelle: Ferris State University, H.P. Dürr, Universität Tübingen.

Das Krankheitsbild der Onchozerkose ist erstmals 1875 mit den Mikrofilarien von *O. volvulus* in Verbindung gebracht worden. Die adulten Würmer wurden jedoch erst 1893 von Leuckart entdeckt und als Erreger der Flussblindheit erkannt. Die Bezeichnung „Flussblindheit“ ist darauf zurückzuführen, dass *Onchocerca*-Infektionen vorwiegend in der Nähe von Fließgewässern vorkommen. Die Überträger, Kriebelmücken der Gattung *Simulium*, sind durch ihre Brutbiologie an rasch fließendes, sauerstoffreiches Wasser gebunden. Das erklärt die geographische Begrenzung von Simuliden-Populationen und damit die Lokalisation der Onchozerkose (McMahon *et al.*, 1988).

1.2.1. Lebenszyklus und Entwicklung

Der Lebenszyklus von *O. volvulus* im Menschen beginnt mit einem Stich der weiblichen *Simulium*-Mücke. Durch die Blutmahlzeit wird das dritte infektiöse Larvenstadium (L3) von *O. volvulus* auf den Menschen übertragen, welches sich durch zweimalige Häutung über das vierte Larvenstadium (L4) zum adulten Wurm entwickelt. Etwa 9 bis 15

Monate nach der Infektion siedeln sich die Würmer in einem Bindegewebsknoten an, dem Onchozerkom. Diese subkutanen Knoten können bis zu 6 cm im Durchmesser werden. Sie enthalten meist ein Wurmpärchen, wobei in einem großen Knoten auch 10 bis 20 und mehr Adulte leben können. Die Weibchen bleiben dort zeitlebens und erreichen eine Länge von 20 bis 60 cm. Die Männchen sind mit 3 bis 8 cm Länge wesentlich kleiner, können ihren Standort verlassen und andere Knoten erreichen, um die dort lebenden Weibchen zu begatten.

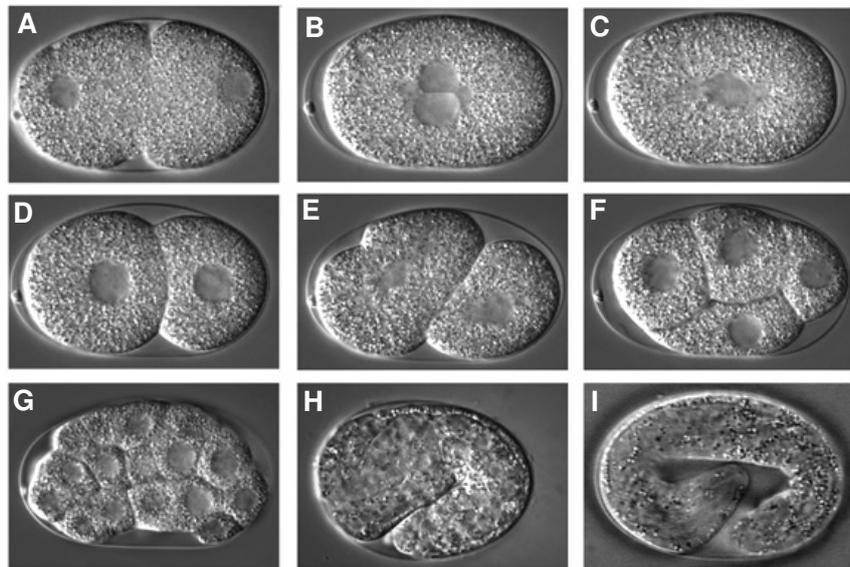


Abb. 1.2.2. Embryonalentwicklung von dem Nematoden *C. elegans* nach E. Schierenberg, Universität Köln

Die Weibchen von *O. volvulus* sind vivipar. Die Embryogenese findet im Gegensatz zu anderen Nematoden, wie z.B. bei Ascariden, vollständig im Uterus statt. Nach der Befruchtung der Eizelle beginnt die Furchung. Die Embryonalentwicklung verläuft bei Nematoden ähnlich und ist am Beispiel von *C. elegans* in der Abbildung 1.2.2. dargestellt. Sie führt von der ungefurchten Zygote über das 2- und 4-Zellstadium (A-F) bis hin zum Morulastadium (Brombeerstadium, G), das aus Dutzenden von Zellen besteht. Dieses geht von dem Kaulquappenstadium (H) in das Brezelstadium (I) über und wandelt sich schließlich nach Streckung und weiterer Zellteilung in einen wurmförmigen Embryo um. Der sich entwickelnde Embryo wird von einer mehrschichtigen Eihülle umgeben, die sowohl vom Embryo als auch von der Uteruswand gebildet wird (Wharton, 1980, 1983). Der Embryo befreit sich bei *O.*

volvulus noch im Uterus von der Eihülle und verlässt aktiv als ungescheidete Larve (L1) das Weibchen über die Vagina.

Die Weibchen produzieren etwa 12 bis 24 Monate nach einer Infektion die Mikrofilarien (Mf), von denen 400 000 bis 700 000 pro annum pro Weibchen in die Umgebung abgegeben werden. Diese haben eine Lebensdauer von bis zu zwei Jahren. Sie durchwandern das Unterhautbindegewebe und lösen so extremen Juckreiz sowie Hautveränderungen aus, wie z. B. Depigmentierung (Leopardenhaut) und epidermale Atrophie (Papierhaut). Mikrofilarien gelangen zum Teil auch ins Auge, wo sie sterben und dadurch eine starke Immunreaktionen auslösen. Diese okuläre Onchozerkose kann bis zur Erblindung des Menschen führen.

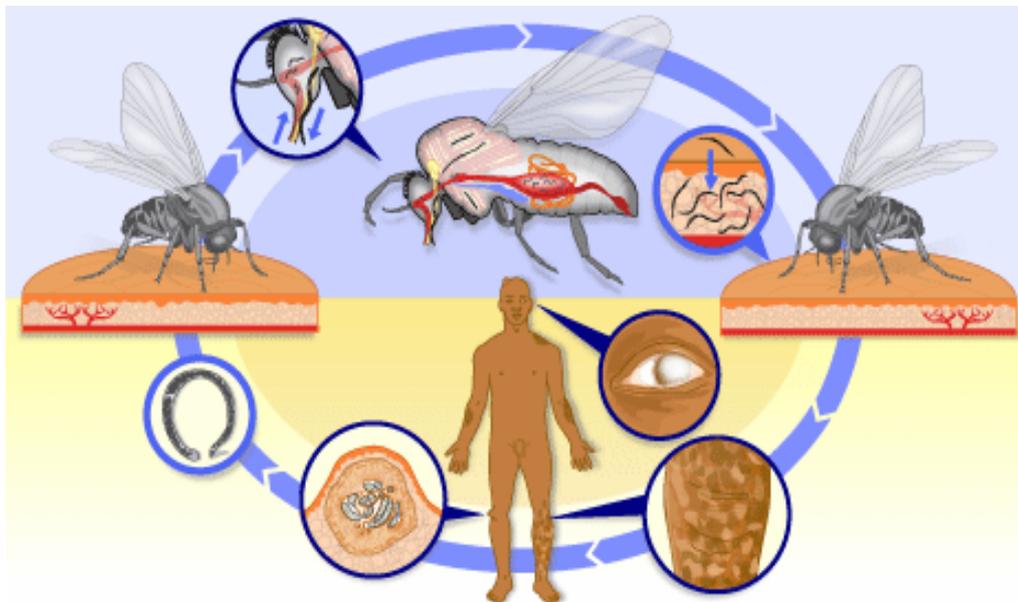


Abb. 1.2.3. Der Lebenszyklus von *O. volvulus*
Quelle: TDR/Wellcome Trust

Für die weitere Entwicklung der Mikrofilarien von *O. volvulus* ist es notwendig, dass die Larven im Stadium L1 von der Kriebelmücke, *Simulium* spp., während einer Blutmahlzeit an einem infizierten Menschen aufgenommen werden (Abb. 1.2.3.). So gelangen die Mikrofilarien in den Zwischenwirt, durchbrechen dort die Darmwand und wandern in die Thoraxmuskulatur ein, wo nach zwei Häutungen die invasionsfähige dritte Larve (L3) heranreift. Bei erneuter Blutmahlzeit wird das Insekt zum Überträger und die L3 durchbricht die äußeren Mundwerkzeuge der Kriebelmücke, wandert aktiv in den Stichkanal ein und gelangt so in einen Menschen. Im Endwirt entwickelt sich die

Larve in 9-14 Monaten zum geschlechtsreifen Tier und lebt bis zu 15 Jahre im Menschen.

1.2.2. Parasiten-Wirt-Beziehung und Immunantwort

Das Persistieren von *O. volvulus* im Menschen ist auf ko-evolutive Prozesse zurückzuführen, die als Adaption und Evasion bezeichnet werden (Maizels, 2005). Sie gewährleisten ein Existieren des Parasiten im Wirt. Ziel dieser Prozesse ist es, das Immunsystem des Wirts zu modulieren bzw. zu hemmen, um so eine immunologische Toleranz zu erlangen (Hoerauf und Brattig, 2002; Gao *et al.*, 2003). Die Abwehrmechanismen des Wirtes und Schutzstrategien (Immunevasionen) des Parasiten befinden sich bei der Onchozerkose in einem relativ stabilen Gleichgewicht. Dies ermöglicht ein über 15jähriges Persistieren des Wurms im menschlichen Gewebe.

Die Interaktion des Parasiten mit dem Immunsystem des Wirtes löst sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort im Wirt aus. So attackieren Effektorzellen wie eosinophile und neutrophile Granulozyten den Parasiten, insbesondere die Mikrofilarien. Über Antikörper und Komplementproteine lagern sich die Immunzellen an Oberflächenproteine der Mikrofilarien an und geben Proteasen oder toxische Produkte ab, wie beispielsweise reaktive Sauerstoffradikale („oxidative burst“). Sie führen beim Erreger zu oxidativem Stress und tragen zur Abtötung der Larven bei, die dann zu Entzündungsreaktionen im Wirt führen und die beschriebenen Krankheitssymptome verursachen.

Diese Immunreaktionen der Granulozyten werden überwiegend von IgG1- und IgG3-Subklassen ausgelöst. Antikörper der IgG4-Subklasse sind nicht dazu in der Lage. Sie blockieren sogar obige Reaktion durch Bindung an dieselben Effektorantigene des Parasiten. Eine verstärkte Produktion blockierender IgG4-Antikörper ist charakteristisch für Wurminfektionen (Kwan-Lim *et al.*, 1990). Sie inhibiert die Entzündungsreaktionen (Finkelman *et al.*, 1991; Hoerauf *et al.*, 2005) und fördert die Persistenz von Wurmparasiten in Wirtsorganismen mit intaktem Immunsystem.

Bei *Onchocerca*-infizierten Menschen kann es zu unterschiedlichen Ausprägungen des Immunstatus kommen. Der Großteil der infizierten Patienten zeigt die so genannte generalisierte Form der Onchozerkose. Diese Form wird durch geringgradige entzündliche Reaktionen in der Haut charakterisiert und ist mit einer stark variierenden -

geringen wie auch sehr hohen - Filariendichte assoziiert (Kwan-Lim *et al.*, 1990). Es wird davon ausgegangen, dass eine erhöhte Mikrofilarienlast eine immunsuppressive Reaktionslage auslöst. Im Gegensatz dazu zeigt eine kleine Population von Infizierten eine hyperreaktive (Sowda-) Form der Onchozerkose. Sie ist durch eine sehr geringe Filariendichte gekennzeichnet (Büttner und Racz, 1983; Gallin *et al.*, 1995). Aufgrund der hyperreaktiven Immunantwort kommt es jedoch zu äußerst stark pathologischen Reaktionen in der Haut.

Helminthen können durch Abgabe von Substanzen die humane Immunantwort modulieren (Pastrana *et al.*, 1998), was zu einer Komplementinaktivierung (Allen und Maizels, 1996), Immunsuppression (Maizels *et al.*, 1998) und Inhibierung der T-Zellproliferation (Hartmann und Lucius, 2003) führen kann. Weiter gehört zu den Evasionsmechanismen von *O. volvulus* eine Vielzahl von Enzymen, die vor Angriffen der meist toxischen Substanzen oder hoch reaktiven Sauerstoffspezies des humanen Immunsystems schützen. Die reaktiven Sauerstoffverbindungen haben jedoch nicht nur in der Parasiten-Wirt-Beziehung eine bedeutende Rolle, sondern jede Zelle eines Organismus muss sich mit diesen toxischen Verbindungen auseinandersetzen.

1.3. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und deren Bedeutung

Vor 2,6 Milliarden Jahren bildete sich durch die photosynthetische Aktivität von Cyanobakterien der erste freie Sauerstoff in der Uratmosphäre. Aus der zuvor reduzierten Umwelt entstanden langsam oxigene Bedingungen. Die Entwicklung der Photosynthese und der damit verbundene Anstieg des Sauerstoffgehaltes der Atmosphäre stellt die Basis für die Entstehung komplexer, hoch entwickelter Lebensformen dar.

Diese haben gelernt, molekularen Sauerstoff als Oxidationsmittel in Mitochondrien zur effektiven Energiegewinnung zu nutzen. Bei diesem Vorgang wird dem Sauerstoff (O_2) stufenweise ein Elektron übertragen und es entsteht Wasser (H_2O). Bei der Reduktion des Sauerstoffs entstehen unvollständig reduzierte, reaktive Zwischenprodukte, die lebensnotwendige Moleküle der Zelle (z.B. DNA, Proteine, Lipide u.a.) angreifen und irreversibel schädigen können (Michelson, 1982). Diese unerwünschten zytotoxischen

Sauerstoffderivate werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) genannt. Der Begriff beinhaltet freie Radikale und Nicht-Radikale, die sich direkt vom Sauerstoff ableiten.

1.3.1. Entstehung und Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

ROS sind aufgrund der ungepaarten Elektronen im Atomorbital bestrebt, das zweite fehlende Elektron einem potenziellen Reaktionspartner zu entziehen, um eine höhere chemische Stabilität zu erreichen. Sie übertragen ihren Radikalcharakter auf andere Verbindungen und können mit allen molekularen Strukturen einer Zelle reagieren. Je nach Lebensdauer des Radikals, Bildungsort und Reaktionspartner kann es im Organismus zu strukturellen und funktionellen Schäden bis hin zur Apoptose der Zelle kommen. In Nukleinsäuren kann es zu Fehlpaarungen, Punktmutationen, Strang- und Chromosomenbrüchen kommen. Biologische Membranen sind aufgrund ihrer mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Membranphospholipide gegenüber Oxidantien empfindlich. Der als Lipidperoxidation bezeichnete Vorgang kann zur vollständigen Zerstörung von Zellmembranen führen. Oxidative Veränderungen des sonst reduzierenden Milieus im Zellinneren stören essentielle biologische Prozesse. Dies gilt besonders für unkontrollierte Oxidationen von Thiolgruppen, die bei vielen Enzymen deren Aktivitätszustand beeinflussen und damit zu funktionellen Störungen in der Zelle führen können.

Der Ausgangspunkt für die Entstehung von ROS können unterschiedliche physikalische, chemische und physiologische Reaktionen sein. Auch attackieren exogene Quellen aus der Umwelt den Organismus, so z.B. diverse Fremdstoffe (Xenobiotika), UV- und radioktive Strahlenbelastung, Zigarettenrauch, Pestizide, Partikel in Dieselabgasen, Asbestfasern und andere chemische Substanzen.

Endogene ROS entstehen größtenteils durch die 1-Elektronen-Übertragung und führen zur Bildung von Superoxidanionen ($\cdot\text{O}_2^-$). Eine Hauptquelle stellt die mitochondriale Elektronentransportkette dar. Ebenso werden Superoxidanionen durch das Cytochrom-P450-System, das Xanthin/Xanthinoxidase-System und die Prostaglandin-Synthase generiert sowie von Proteinen wie Ferredoxin, Hämoglobin, NADPH-Cytochrom und Peroxidasen.

Das Superoxid-Radikal schädigt Makromoleküle, ist aber auch ein wichtiges „Second messenger“ Molekül (Zhang *et al.*, 2001). Es ist sehr kurzlebig und dismutiert leicht zu

Sauerstoffperoxid (H_2O_2). Die mitochondriale Superoxid-Dismutase konvertiert Superoxid-Radikale ebenfalls zu H_2O_2 . Dieses Peroxid entsteht aber auch durch direkte Zwei-Elektronen-Übertragung auf das O_2 -Molekül. Das langlebige H_2O_2 ist membranpermeabel und kann daher von seinem Entstehungsort wegdiffundieren. Dies ist zu berücksichtigen, da H_2O_2 als Vorläufer für das äußerst aggressive Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) dient. Für diese sogenannte Fenton-Reaktion ist ein metallisches Reduktionsmittel (meist Fe^{2+}) nötig (Valko *et al.*, 2005). Die Fenton-Reaktion gilt als Hauptquelle von $\cdot\text{OH}$ in biologischen Systemen, die unter anderem als Hauptinitiatoren für Lipidperoxidation (Blokchina *et al.*, 2003) gelten.

Diese reaktiven Formen von Sauerstoff und ihre zytotoxischen Eigenschaften stellten für frühere aerobe Organismen einen selektierenden Umweltfaktor dar. Parasitisch lebenden Formen müssen sich zusätzlich mit den Sekundärmetaboliten der Wirtsnahrung und dem Immunsystem des Wirts auseinandersetzen. So ermöglicht ein Existieren im Wirt erst die Entwicklung von antioxidativen Mechanismen, die einen Schutz vor der Immunabwehr des Wirts bieten.

1.3.2. Antioxidative Schutzmechanismen

Eine funktionstüchtige Zelle ist mit einer Grundausstattung antioxidativer Schutzmechanismen versehen. Im Idealfall stehen diese mit den anfallenden ROS im Gleichgewicht. Ein Ungleichgewicht zugunsten der reaktiven Sauerstoffspezies und/oder Radikalen führt in der Zelle zu oxidativem Stress. Dieser entsteht immer dann, wenn die ROS-Generierung die antioxidative Kapazität übersteigt. Ein antioxidativer Schutzmechanismus stellt schon das Verpacken der DNA in Chromatinstrukturen oder die Ausbildung bestimmter Quartärstrukturen von Enzymen dar.

Die endogen und exogen gebildeten Elektrophilen führen zur Biotoxifikation und reagieren mit nukleophilen Gruppen von Proteinen und Nukleinsäuren. Bei den Xenobiotika handelt es sich meist um lipophile Stoffe, die ungehindert die Zellmembran durchwandern und chemische Veränderungen von Biopolymeren auslösen, oft über radikale Zwischenstufen. Zum Teil handelt es sich auch um Stoffe elektrophilen Charakters, die mit nukleophilen Gruppen von Biopolymeren reagieren. Auch diese führen zu oxidativem Stress, der bis hin zu Zellschädigung, Mutationen und Krebsentstehung führen kann (Nuhn, 1993; Valko *et al.*, 2006).

Einen antioxidativen Schutz bieten zum einen nicht-enzymatische Verbindungen wie z.B. GSH, Vitamin A, Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E) und Harnstoff. Insbesondere Thiole, wie das in allen Zellen in millimolaren Konzentrationen vorkommende Glutathion (GSH), haben eine zentrale Rolle.

Zum anderen stehen für enzymatische Neutralisation von Oxidantien die Superoxid-Dismutasen (SOD), Katalasen (CAT), Peroxiredoxine (PRX), Glutathion-Peroxidasen (GPx) und die Thioredoxin-Peroxidasen (TRX) zur Verfügung. SODs dismutieren das Superoxidanionradikal, während die Gruppe der Peroxidasen und Katalasen Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff umsetzen.

Desweiteren bieten zusätzliche enzymatische Komponenten Schutz vor oxidativen Schäden. Sie metabolisieren die entstandenen toxischen Substanzen. Dabei werden schwer ausscheidbare unpolare, lipophile Stoffe zu leichter ausscheidbaren polaren, hydrophilen Stoffen metabolisiert. Diese enzymatische Biotransformation von Elektrophilen gliedert sich in zwei Phasen: In der Phase I werden funktionelle, reaktive Gruppen in die zu entgiftenden Moleküle eingefügt, die in der Phase II eine Konjugation von endogenen Co-Substraten erlauben. Insbesondere Cytochrom P450-abhängige Phase I-Enzyme spielen bei der Aktivierung eine entscheidende Rolle, können aber auch Ursache von Biotoxifikation sein und führen u.a. zur Bildung von Epoxiden und Chinonen. Die Umwandlungsprodukte der Phase I-Enzyme werden dann von Entgiftungsenzymen der Phase II metabolisiert. Zu ihnen gehören unter anderem die Epoxid-Hydrolase (EH), die NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase (NQO) und die große Gruppe der Glutathion S-Transferasen (GSTs).

Da sich die Beschaffenheit toxischer Verbindungen ständig ändert, besitzen die Enzyme der Biotransformation eine sehr breite Substratspezifität und unterschiedliche Funktionalitäten. So bieten die Phase II-Enzyme in parasitischen Lebensformen nicht nur Schutz vor endogen entstandenen ROS und toxischen Immuneffektormolekülen sondern detoxifizieren auch makrofilarizide Medikamente. Dies verhindert den beabsichtigten Angriff auf Parasiten und macht deren Bekämpfung weitaus komplizierter. Ein Ausschalten der Entgiftungsenzyme würde die Schutzwirkung unterbinden und so zur Schwächung oder zum Abtöten des Parasiten führen. Voraussetzung für diesen Schritt ist die genaue Charakterisierung der detoxifizierenden Enzyme, wobei in parasitisch lebenden Nematoden die GSTs, eine Superfamilie der Phase II-Entgiftungsenzyme, eine zentrale Rolle einnehmen.

1.4. Glutathion S-Transferasen

1.4.1. Das Ko-Substrat Glutathion

Das Tripeptid Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-Cysteinylglycin) ist ein wichtiges niedermolekulares „Nicht-Protein“-Thiol in der Zelle und besitzt eine zentrale Rolle bei der Detoxifikation von elektrophilen bzw. radikalischen Substanzen innerhalb des Zellmetabolismus. Es dient aber auch der Aufrechterhaltung von Mitochondrien- und Membranstrukturen, sowie der Zelldifferenzierung und -entwicklung. Mit Ausnahme einiger anaerober Mikroorganismen ist es im gesamten Tier- und Pflanzenreich verbreitet (Fahey und Sundquist, 1991). Es liegt intrazellulär in relativ hohen Konzentrationen von 0,1 mM bis 10 mM vor (Astor *et al.*, 1988). In einigen Organismen übernehmen GSH-Analoga, wie Homoglutathion bei *Phaseolus aureus* und Trypanothion bei *Trypanosomen* und *Leishmanien* (Fairlamb *et al.*, 1985; Skipsey *et al.*, 1997) die Funktion von GSH.

GSH entsteht durch einen enzymatisch katalysierten zweistufigen ATP-abhängigen Prozess. Die γ -Glutamylcystein-Synthetase katalysiert zunächst die Ausbildung der Peptidbindung zwischen Glutamat und Cystein, während im zweiten Schritt die Glutathionsynthetase die Kondensation der Carboxylgruppe des Cysteins mit der Aminogruppe der Glycins katalysiert. Die gebildete nukleophile Sulfhydrylgruppe (SH-Gruppe) des Cysteins stellt die funktionelle Gruppe dar und geht als Elektronendonator Verbindungen mit Oxidantien, Radikalen und Elektrophilen ein (Abb. 1.4.1.). Fungierend als Elektronendonator bei der Reduktion toxischer Oxidantien bildet sich die oxidierte Form des GSH, das Glutathiondisulfid GSSG. Das Verhältnis von GSH und GSSG liegt im Zytosol zwischen 30:1 und 100:1 vor (Meister und Anderson, 1983). Die Aufrechterhaltung dieser optimalen GSH-Konzentrationen garantiert intrazellulär ein reduziertes Milieu und wird durch die GSH-Synthase und die NADPH-abhängige Glutathion-Reduktase (GR) katalysiert (Schirmer *et al.*, 1987; Kraut-Siegel *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 1994).

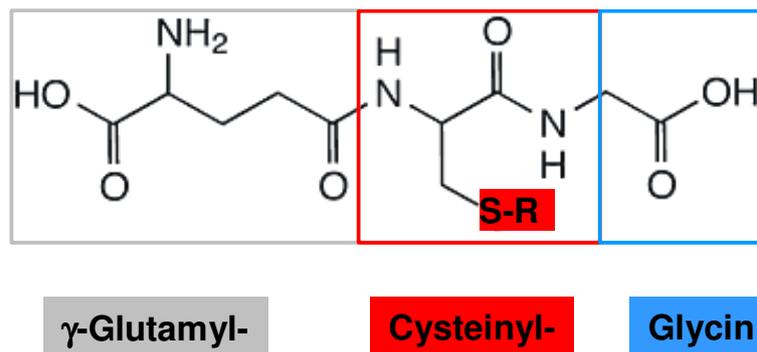


Abb. 1.4.1. Strukturformel von Glutathion

GSH spielt auch eine essentielle Rolle als Ko-Substrat zahlreicher GSH-bindender Enzyme. Sie entgiften reaktive Verbindungen sowohl endogener als auch exogener Herkunft (z.B. Xenobiotika). Die elektrophilen Gruppen dieser reaktiven Moleküle werden über eine kovalente Bindung zum Cystein von GSH durch enzymatische Additions- und Subtraktionsreaktionen zu GSH-Konjugaten umgewandelt. GSH detoxifiziert als Kosubstrat die selenabhängige GPx H_2O_2 und nahezu alle reaktiven Oxidationsprodukte (z.B. Peroxide). GSTs hingegen können Oxidationsprodukte zu GSH-Konjugaten umsetzen und werden durch H_2O_2 gehemmt (Hayes und McLellan, 1999). Die entstandenen hydrophilen GSH-Konjugate werden über spezielle Transporter ausgeschieden oder weiteren Metabolismen zugänglich gemacht.

1.4.2. Funktion der Glutathion S-Transferasen

GSTs stellen eine Superfamilie multifunktionaler Enzyme dar. Sie zählen zu den Phase-II-Enzymen und haben eine zentrale Funktion in der Biotransformation. GSTs katalysieren die Konjugation reaktiver, toxischer endogener und exogener Substanzen mit dem endogenen, wasserlöslichen GSH. Unter Bildung von Thioethern oder -estern bringen sie die Thiolgruppe von GSH an zahlreiche toxische Elektrophile. Bei den Substanzen handelt es sich u.a. um aromatische Verbindungen, α - und β -ungesättigte Ketone und Aldehyde (Michael-Addition), Epoxide und Peroxide (Salinas *et al.*, 1999). Die entstehenden Konjugate sind hydrophiler und weniger toxisch und können durch ATP-abhängige Pumpen, wie das „multidrug-resistance-associated-Protein“ (MRP; GS-X-Pumpe; Ishikawa, 1992), dem Multi-Organic-Anion-Transporter (MOAT; Heijn *et al.*,

1992) oder dem P-Glycoprotein (MDR1; Gottesman und Pastan, 1993) aus der Zelle ausgeschleust werden.

Die GSTs weisen nicht nur entgiftende Funktionen auf. Einige Isoenzyme haben eine katalytische Funktion, die sich nicht auf die Detoxifikation beschränkt. So konnte ein Mitwirken bei der Synthese von Steroiden und Prostaglandinen nachgewiesen werden (Beuckmann *et al.*, 2000; Uchida, 2000; Johansson und Mannervik, 2001; Sommer *et al.*, 2003). Zudem konnte Thioltransferase-Aktivität und Dehydroascorbat-Reduktase-Aktivität nachgewiesen werden, aber auch regulatorische Funktionen der GSTs wurden gefunden (Adler *et al.*, 1999; Girardini *et al.*, 2002). Weiterhin dienen GSTs als Bindungs- und Transportproteine. Die Röntgenstrukturen vieler GSTs weisen auf eine dritte Bindungstasche, für endogene, hydrophobe und nichtpolare Liganden hin. Bei den Liganden handelt es sich unter anderem um Steroide, Produkte des Häm-Stoffwechsels, verschiedene Hormone, Bilirubin und Gallensäuren, die von den GSTs nicht weiter umgesetzt werden (McTigue *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1996; Lederer und Bogen, 2005).

Die Aktivitäten der GSTs haben in medizinischer Sicht auch nachteilige Funktionen. So können Konjugationen von GSH und Xenobiotika zur Resistenzbildung gegenüber Chemotherapeutika bei Krebs (McLellan und Wolf, 1999, Tew und Ronai, 1999; Asakura *et al.*, 2005; Balendiran *et al.*, 2005), gegen Herbizide (Edwards und Dixon, 2005), Insektizide (Ranson *et al.*, 1997; Jumjuan *et al.*, 2005) und Antibiotika (Arca *et al.*, 1990; Rigsby *et al.*, 2005) führen. All diese Befunde deuten auf eine große Bedeutung dieser großen Enzymfamilie hin.

1.4.3. Struktur und Klassifizierung (Nomenklatur)

Die GSTs werden in membrangebundene (mikrosomale) und lösliche (zytosolische) Enzyme eingeteilt. Zu den membrangebundenen Transferasen zählt die Klasse der MAPEGs (membran-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism), die in den Mikrosomen-Membranen lokalisiert sind und bei der Lipidperoxidation eine zentrale Rolle einnehmen (Jakobsson *et al.*, 1999; Bresell *et al.*, 2005). Die zytosolischen GSTs sind nicht nur im Zytosol sondern auch in den Mitochondrien und im Zellkern lokalisiert (Johannsson und Mannervik, 2001).

Die Klassifikation und Nomenklatur dieser GSTs basiert auf den humanen GSTs, die aufgrund ihrer Sekundärstruktur und des Substratprofils in acht Klassen eingeteilt werden: Alpha, Kappa, Mu, Omega, Pi, Sigma, Theta und Zeta (Armstrong, 1997). Diese Klassen-Einteilung wurde von Mannervik *et al.* (1992) auf alle Säugetiere übertragen und ist speziesübergreifend (Hayes und Pulford, 1995). Jede Klasse beinhaltet verschiedene GST-Isoformen, die untereinander eine über 40%ige Identität zeigen. Die Klassen untereinander sind weniger als 25 % identisch (Hayes *et al.*, 2005). Immunologische Kreuzreaktionen zwischen GST-Klassen sind deshalb selten. In anderen Organismen wurden weitere GST-Klassen gefunden, wobei die Beta-Klasse ausschließlich in Bakterien vorkommt, die Phi- und Tau-Klasse für die Pflanzen spezifisch sind und die Delta-Klasse in Invertebraten nachgewiesen wurde (Vuilleumier, 1997; Winayanuwattikun und Ketterman, 2004; Edwards und Dixon, 2005).

Die GSTs weisen überwiegend monodimere, seltener heterodimere Strukturen auf, bestehend aus zwei 23-28 kDa großen Untereinheiten. Jede Untereinheit hat ein vollständiges unabhängiges aktives Zentrum. Es besteht aus einer hochkonservierten Glutathion-Bindungsstelle (G-Bindungsstelle) und einem C-terminalen Bereich, der die hydrophobe Substratbindungstasche (H-Bindungsstelle) und eine Liganden-Bindungsstelle (L-Bindungsstelle) umfasst. Der C-Terminus variiert zwischen den verschiedenen Klassen und Isoformen der GSTs und ist verantwortlich für die unterschiedlichen Substratspezifitäten.

Die hochkonservierte G-Bindungsstelle der Domäne I zeigt die gleiche Tertiärstruktur wie andere Glutathion-bindende Enzyme (z.B. die Glutathion-Peroxidase und Thioltransferasen, Dirr *et al.*, 1994). Sie besitzen alle das charakteristische $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ -Struktur-Motiv und stammen evolutiv vermutlich von einem Vorläufer-Enzym ab (Armstrong, 1997). Die essentielle Aminosäure für die Ausbildung der Bindung mit der Thiolgruppe des GSHs im aktiven Zentrum übernimmt bei den meisten GSTs ein Tyrosin. Bei der Theta- und Zeta-Klasse ist es ein Serin und bei der Omega- und Beta-Klasse ein Cystein (Sheehan, 2001). Die Tertiärstruktur der Domäne II zeigt bei allen GSTs ausschließlich α -helikale Faltungen, die in Anzahl und einigen Details (z.B. dem „mu-loop“) variieren. Diese Variationen wirken selektiv auf die Größe, Struktur sowie Ladungseigenschaften der Substrate.

1.4.4. Bedeutung der Glutathion S-Transferasen in Helminthen

Helminthen stellen eine große Gruppe der Parasiten dar, die in Menschen und Tieren vorkommen. Zu ihnen gehören unter anderem *Schistosoma mansoni*, *Ascaris lumbricoides*, *Fasciola hepatica*, *Brugia malayi* und auch *O. volvulus*. Im Vergleich zu anderen Organismengruppen ist bei Helminthen nur eine geringe Expression an Phase I-Enzymen nachzuweisen. Bei ihnen scheint ein Cytochrom-P450-abhängiges Entgiftungssystem zu fehlen oder stark herunterreguliert zu sein. Es kann jedoch eine starke Induktion von GST-Expressionen, insbesondere als Antwort auf oxidativen Stress, hervorgerufen durch Medikamentenbehandlung oder Immuneffektorzellen des Wirtes, nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer zentralen Rolle im Fremdstoffmetabolismus gelten die GSTs in Helminthen als mögliche chemotherapeutische Angriffspunkte und als potenzielle Vakzinekandidaten (Brophy und Pritchard, 1994). Immunologische und biochemische Untersuchungen von Parasitenenzymen sind aufgrund des häufig begrenzten Materials erst durch rekombinante Expression der jeweiligen Enzyme möglich geworden. Dabei zeigt sich in Immunisierungsstudien gegen Schistosomiasis und Fascioliasis, dass die rekombinant exprimierten GSTs außerordentlich protektive Antigene darstellen (Balloul *et al.*, 1987; Richter *et al.*, 1993; Brophy and Pritchard, 1994; Morrison *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2004).

1.4.5. Glutathion S-Transferasen von *O. volvulus*

In *O. volvulus* sind bisher GSTs drei verschiedener Klassen identifiziert worden (*OvGST1a*, *OvGST1b*, *OvGST2*, *OvGST3*), von denen die ersten drei intensiv untersucht und auf der Gen-, Transkript- und Proteinebene charakterisiert wurden.

Die *OvGST1* wird von zwei Genen (*OvGST1a* und *OvGST1b*) kodiert. Sie unterscheiden sich in nur zehn Aminosäuren. Beide Produkte besitzen ein Signalpeptid, welches die Sekretion der GST bestimmt und diese als extrazellulär aktives Glykoprotein wirken lässt. Die Lokalisation der *OvGST1a* beschränkt sich primär auf die äußeren lamellären Bereiche der Hypodermis und der Epikutikula, ein zum Wirt hin exponiertes Gewebe. Sie scheint direkt am Schutz des Parasiten vor Angriffen des humanen Immunsystems involviert zu sein (Liebau *et al.*, 1998). Basierend auf Sequenzvergleiche mit bekannten humanen GSTs wird die *OvGST1* der Sigma-Klasse zugeordnet.

Die *OvGST2* ist ein zytosolisches Enzym. Ihr wird aufgrund der ubiquitären Lokalisation im Parasiten eine „housekeeping“ Funktion zugesprochen (Liebau *et al.*, 1996). Immunhistologische Untersuchungen lokalisieren die *OvGST2* in der gesamten Hypodermis von männlichen und weiblichen Würmern, wie auch im Uterusepithel. Ebenso sind Mikrofilarien und dritte Larvenstadien immunpositiv. Die *OvGST2* könnte, aufgrund der Fähigkeit mit Sekundärprodukten der Lipidperoxidation Konjugate zu bilden, beim Schutz vor Immuneffektormolekülen involviert sein (Liebau *et al.*, 1996). Sequenzvergleiche mit humanen GSTs ordnen die *OvGST2* der Pi-Klasse zu.

Die *OvGST3* wurde mit Hilfe der „Differential Display“-Analyse identifiziert (Liebau *et al.*, 2000). Ihre Expression wird durch exogenen oxidativen Stress um ein 100faches verstärkt. Im Vergleich zu den beiden anderen *O. volvulus*-GSTs konnte unter denselben Stressbedingungen keine signifikante Erhöhung der mRNA-Menge festgestellt werden. Die *OvGST3* scheint daher eine essentiell wichtige Funktion beim Schutz vor oxidativem Stress zu haben. Von der *OvGST3* konnten bislang drei verschiedene Transkripte als Ergebnis alternativen Spleißens nachgewiesen werden (Sommer, 2000; Kampkötter *et al.*, 2004). Ihr Ursprung liegt jedoch auf einem einzigen Gen. Die Transkripte kodieren für ein putatives Signalpeptid, was auf eine extrazelluläre Funktion hindeutet. Eine Aktivität der *OvGST3* konnte jedoch bis dato nicht nachgewiesen werden. Ein Sequenzvergleich zu humanen Enzymen gruppiert diese GST in die erst kürzlich neu beschriebene Omega-Klasse.

Weitere Untersuchungen aller bislang isolierten GSTs von *O. volvulus* auf Proteinebene sind durch rekombinante Expression möglich und erlauben eine detaillierte Analyse ihrer Strukturen. So erlaubt die Kristallographie mittels Röntgendiffraktion von Proteinkristallen einen Einblick in die dreidimensionale Darstellung von Proteinstrukturen. Deren Kenntnis ist eine unabdingbare Voraussetzung für das Verständnis der Funktion dieser Proteine in physiologischen Prozessen. Eine molekulare Proteinstruktur eröffnet die Möglichkeiten gezielter Arzneimittelentwicklung durch strukturbasierte Suche nach Wirkstoffen und Inhibitoren.

1.5. Prinzip der Kristallisation

Bei der Kristallisation sind zwei Schritte notwendig. Zum einen die Keimbildung (Nukleation) und zum anderen das Kristallwachstum. Unter richtig gewählten Bedingungen erfolgt beides im Übersättigungsbereich (siehe Phasendiagramm Abbildung 1.5.1., Jena Bioscience). Kristallisationskeime bilden sich nur in übersättigter Lösung (labiler Bereich); ein für das Wachstum ungünstiger Bereich. Die Entstehung vieler kleiner Kristalle wäre die Folge. Für die Züchtung großer Kristalle (100 μm Kantenlänge) sollte die Lösung im metabolischen Bereich gehalten werden. Ideal ist ein kurzes Erreichen des labilen Bereiches mit einem anschließenden Abfallen der Proteinkonzentration und dem möglichst langen Aufenthalt der Lösung im metabolischen Bereich (Pfeile im Diagramm in Abbildung 1.5.1.). Der Übergang von einer stabilen zur übersättigten Lösung kann im Wesentlichen durch die Veränderung der Proteinkonzentration oder der Fällungsmittelkonzentration erreicht werden. Weiteren Einfluss haben Salze, organische Lösungsmittel, pH-Werte und Polymere, wie Polyethylenglykol (PEG).

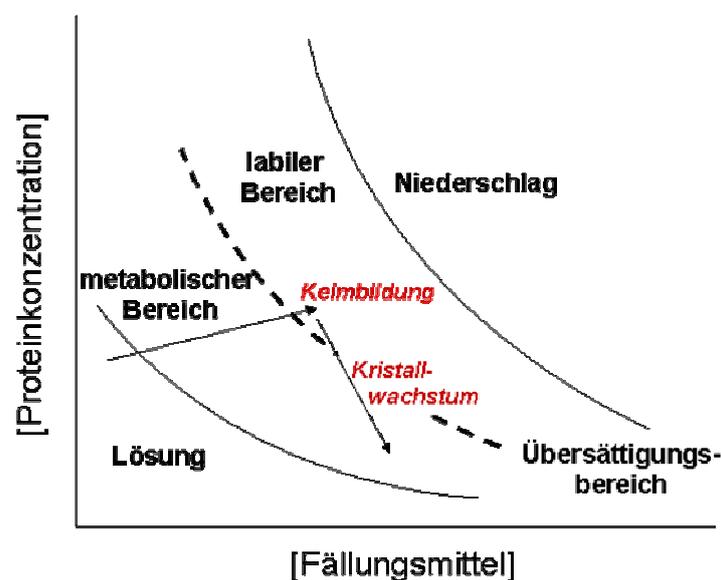


Abb. 1.5.1. Phasendiagramm

Kristallbildung in Abhängigkeit der Proteinkonzentration (Y-Achse) und Präzipitanten-konzentration (X-Achse). Die Pfeile repräsentieren den optimalen Konzentrations-Zeit-Verlauf während des Kristallisationsprozesses. Das Diagramm wurde basierend auf Jena Bioscience (<http://jenabioscience.com>) geändert.

Um eine langsame Konzentrationsänderung herbeizuführen, wird das sehr erfolgreich genutzte Kristallisationsverfahren der Hängenden-Tropfenmethode genutzt. Sie beruht auf dem Prinzip der Dampfdiffusion. Hierbei wird ein Tropfen der Proteinlösung mit einem Tropfen der Kristallisationslösung (Mutterlösung) vermischt. Sie besteht aus einem Fällungsmittel und anderen Zusätzen, die eine Bildung kristalliner Aggregate fördert. Diese vermischten Tropfen werden nun an einem Deckgläschen hängend über ein viel größeres Reservoir derselben Mutterlösung gegenübergestellt. Der gebildete Luftraum wird versiegelt und zwischen Tropfen und Reservoir findet ein langsamer Transport von Wassermolekülen statt. Im Tropfen herrscht aufgrund geringerer Fällungsmittelkonzentrationen ein höherer Dampfdruck als in der Mutterlösung. Im Laufe der Zeit diffundiert Wasser aus dem Tropfen in das Reservoir. Die Protein- und Fällungsmittelkonzentrationen im Tropfen nimmt zu bis eine Keimbildungsbarriere überschritten ist und sich Kristallkeime bilden. Dies führt zur Verringerung der Proteinkonzentration im Tropfen und im Idealfall nähert sie sich dem metabolischen Bereich. Es entstehen keine neuen Keime und die vorhandenen wachsen langsam weiter. Dadurch entstehen wenige große Kristalle.

1.5.1. Proteinkristalle

Proteinkristalle sind im Gegensatz zu Salzkristallen sehr weich und enthalten in der Regel zwischen 30 und 70 % Wasser. Dies ermöglicht im Kristall eine Erhaltung der nativen Proteinstruktur. Die Kristalle bestehen aus einer dreidimensionalen und periodisch angeordneten Struktureinheit, die als Einheitszelle und deren Anordnung als Kristallgitter bezeichnet wird. Atome, Ionen und Moleküle bilden die Bausteine des Kristallgitters, die abstrahiert Gitterpunkte besetzen. Die gleichmäßige Anordnung der Gitterpunkte spiegelt sich in den sechs Gitterkonstanten wider: den Translationsvektoren (Kantenlängen) a , b , und c sowie den Winkeln α , β und γ . Die Einheitszelle enthält alle vorhandenen Symmetrieelemente und ist die kleinste Einheit eines Kristalls. Aufgrund der strengen Periodizität eines Kristalls lässt sich aus einer Elementarzelle durch Translation die Kristallstruktur rekonstruieren.

1.5.2. Röntgendiffraktion

Um an die Information der Gitterkonstanten einer Einheitszelle zu kommen und damit den Aufbau eines Kristalls rekonstruieren zu können, werden die Beugungseigenschaften von Röntgenstrahlen genutzt. Aufgrund ihrer sehr kurzen Wellenlänge von 0,1 pm bis 10 nm können Beugungseffekte am Kristallgitter mit Gitterabständen bzw. Spaltabständen ähnlicher Größenordnung beobachtet werden. Die Beugung wird durch Wechselwirkung der Röntgenstrahlung mit den Elektronen im Kristall verursacht. Es kommt zur Streuung (Diffraktion) der Strahlung.

Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Strahlen, die durch starke Beschleunigung geladener Teilchen (meistens Elektronen) oder durch hochenergetische Übergänge in den Elektronenhüllen von Atomen oder Molekülen entstehen. Die Erzeugung von Röntgenstrahlung ermöglichen die Drehanode oder Teilchenbeschleuniger. Im sog. Synchrotron werden Teilchen mit Hilfe von Magneten auf einer kreisförmigen Bahn beschleunigt. Durch die Auslenkung der Teilchen im Magnetfeld wird Energie in Form von Synchrotronstrahlen frei. Sie enthalten das gesamte elektromagnetische Spektrum, so auch Röntgenstrahlung.

Diese Strahlung wird unter anderem genutzt, um Kristallstrukturanalysen durchzuführen. Sie werden in einem Röntgendiffraktometer an Kristallen gebeugt und die räumliche Anordnung der Atome im Kristall wird aus den Beugungserscheinungen abgeleitet. Die Bragg-Gleichung ist die zugrundeliegende mathematische Beziehung.

Der gebeugte bzw. reflektierte Strahl entspricht einem Reflex auf dem Diffraktionsbild. Aus der Position der Reflexe lassen sich mit Hilfe des Bragg'schen Gesetz die Gitterkonstanten der Elementarzelle berechnen und aus der Intensität der Reflexe die Verteilung der Elektronendichte innerhalb der Elementarzelle ableiten. Geht eine Phaseninformation der am Kristallgitter reflektierten Röntgenwelle verloren, fehlt sie bei der Berechnung der Gitterkonstanten. Zur Lösung dieses Phasenproblems werden zwei Methoden angewendet: Beim molekularen Ersatz wird eine bekannte, ähnliche Struktur als Suchmodell vorausgesetzt. Beim isomorphen Ersatz werden Schweratomderivate in die Struktur eingebaut, über die eine Berechnung möglich ist. Beide Methoden fanden in dieser Arbeit ihren Einsatz.

2. Zielsetzung

Die bisherige Bekämpfung der Onchozerkose seit Anfang der 70er Jahre hat zu einer beträchtlichen Reduktion der Erkrankungen geführt, die Flußblindheit jedoch nicht eliminieren können. Trotz erfolgreicher Vektorkontrolle und Massenbehandlung mit dem Mikrofilarizid Ivermectin sind laut Schätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) weiterhin über 18 Millionen Menschen mit *O. volvulus* infiziert. Die Entwicklung eines makrofilarizid wirksamen oder zumindest permanent sterilisierenden Medikamentes ist dringend erforderlich. Eine Voraussetzung für die gezielte Entwicklung eines parasitenspezifischen Wirkstoffes ist eine genaue Charakterisierung essentieller Molekülen im Stoffwechselweg des Parasiten. Glutathion S-Transferasen (GSTs) von *O. volvulus* nehmen im Detoxifikationssystem des Parasiten eine zentrale Rolle ein und machen sie zu einem geeigneten Angriffspunkt einer möglichen Intervention.

Eine wichtige Rolle beim Schutz vor oxidativem Stress wird der *Ov*GST3 von *O. volvulus* zugesprochen. Der Nachweis von alternativen Spleißprozessen bei der *Ov*GST3 lässt auf ein vielfältiges Funktionsspektrum schließen und könnte auf eine breite Substratspezifität hindeuten. Dieser Spleißprozess soll in dieser Arbeit durch weiterführende Untersuchungen der Expressionsmuster auf cDNA-Ebene nachgegangen werden. Zudem soll die *Ov*GST3 rekombinant in *E. coli* exprimiert werden und die bis dato unbekannt Funktion bestimmt werden. Die Herstellung eines *Ov*GST3-Antikörpers und dessen Einsatz bei der Immundetektion bei *O. volvulus* soll Aufschluss über die Lokalisation dieser GST geben. Andere Onchocerca-Arten und andere Filarien sollen in die Untersuchung einbezogen werden, um Kreuzreaktion zu ermitteln. Darüber hinaus soll in Onchocerca-Patienten die Antikörperbildung gegen *Ov*GST3 in verschiedenen Formen der Onchozerkose untersucht werden.

Sowohl die sekretierte *Ov*GST1 als auch die zytosolische *Ov*GST2 sind mögliche Angriffspunkte für die Entwicklung spezifische Inhibitoren. Daher sollte mittels Kristallisation und Strukturanalyse parasitenspezifische Eigenschaften dieser Enzyme ermittelt werden, die Grundlage für die spezifische Wirkstoffentwicklung darstellen könnten.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien und Biochemikalien

Sämtliche Chemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad und wurden von den Firmen Biomol, Fluka, Merck, Roth, Sigma und Serva bezogen. Desweiteren wurden die folgenden Biochemikalien und molekularbiologischen Kits verwendet:

Tab. 3.1.1. Biochemikalien und Kits

Biochemikalien / Kits	Hersteller
Accu Prime Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase(AP)-konjugiertes Anti-Maus IgG (H+L)	Dianova, Dörentrup
Amylose Resin	New BioLabs/Roche, Mannheim
Anti-Huhn IgG-Konjugat AP-konjugiert	Jackson IRLab, West Grove, USA
Anti-IgG1, Fc-Fragment HP6070 (monoklonal Maus)	CalBiochem-Novabiochem Corporation, Darmstadt
Anti-IgG4, Fc-Fragment HP6025 (monoklonal Maus)	CalBiochem-Novabiochem Corporation, Darmstadt
Anti-Human IgG (H + L) HRD Konjugat	Bio-Rad Laboratories, München
Ziegen-Antikörper Anti-Maus IgG, Peroxidase Konjugat	Immunoresearch, Soham, Cambridgeshire
Anti-Maus IgG-Konjugat APAAP	Dakocytomation, Berlin
“Big Dye Terminator-Cycle” Sequenzierungs Kit	Applied Biosystems, ABI
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	Amersham Phamacia Biotech Buckinghamshire, England
Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP) Set	Roth, Karlsruhe
ECL Plus Western Blotting Detection Reagenz	Amersham Phamacia Biotech Buckinghamshire, England
“Enhanced Avian HS RT-PCR Kit”	Sigma, Taufkirchen
Freud’s Adjuvant	Sigma, Taufkirchen
Glutathion Sepharose TM 48	Amersham Phamacia Biotech, Buckinghamshire, England
„High Fidelity“ PCR System	Roche, Mannheim
Kaninchen Anti-Huhn	Dakocytomation, Berlin
Kristallisationskit „Crystal Screen I und II“	Hampton Research, Aliso Viejo, CA
Maus Anti-Kaninchen	Dakocytomation, Berlin
Mini/Midi-Präparationskit	Qiagen, Hilden
Hunde Microsomen	Promega, Mannheim
5´α [35S]- Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	Amersham Buchler, Braunschweig

1 kb DNA Leiter GeneRuler™	MBI Fermentas, St. Leon
M-MuLV-Reverse Transkriptase Kit	New BioLabs/Roche, Mannheim
“Ni NTA His Bind Resin”	Qiagen, Hilden
Plasmid Prep Kit	Amersham Pharmacia Biotech Buckinghamshire, England
PCR DNA-Purifikation Kit	Amersham Pharmacia Biotech Buckinghamshire, England
PCR Supermix	Invitrogen, Karlsruhe
Pfu DNA Polymerase	Promega, Mannheim
Protease Faktor Xa	New England BioLabs
PROTEINscript R II	Ambion, Frankfurt
Protein Standard „Precision Plus“	Bio-Rad Laboratories, München
Protein Standard „Roti Mark“	Roth, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New BioLabs/Roche, Mannheim
Reduziertes Glutathion	Aldrich, München
RNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
S-Hexylglutathion-Agarose	Sigma, Deisenhoven
Strep Tactin Sepharose	IBA-Göttingen
Sequenase Version 2.0	Amersham Pharmacia Biotech Buckinghamshire, England
T4-Ligase	Promega, Mannheim
Trypsin-Endoprotease	Promega, Mannheim
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
TRIZOL RNA Extraktion Kit	GibcoBRL, Eggenstein
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

Tab. 3.1.2. Chemikalien und Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Agar	Becton Dickinson, Cockeysville
Agarose	Eurogentec
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid (40%)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Deisenhoven
Bovine-Serum-Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhoven
4-Brombenzylbromid, 98 %	Sigma Aldrich, Deisenhoven
5-Bromo-4-(Cholo-3)-Indolyl-β-D-Galactosid (X-Gal)	Biomol, Hamburg
5-Brom-4-(Chloro-3)-Indolylphosphat (BCIP)	Biomol, Hamburg
Bromphenolblau-Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merk, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue	Serva, Deisenhoven
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhoven
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhoven
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhoven

Ethacrynsäure (2,3-Dichlor-4(2'-methylenbutyrol-)phenooxyessigsäure)	Fluka, Ulm
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merk, Darmstadt
Glycin	Merk, Darmstadt
Glykopyranosid	Boehringer, Mannheim
Gold (III) chlorid	Merck, Darmstadt
Hydroxyazophenyl Benzolsäure (HABA)	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Cockeysville
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
Imidazol	Biomol, Hamburg
Kollagenase	Roche, Mannheim
Lysozym	Biomol, Hamburg
LR-White	Plano, Wetzlar
Low Melting Agarose	GibcoBLR, Eggenstein
N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merk, Darmstadt
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Merk, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natrium Cacodylat	Fluka, Ulm
Natriumdodecylsulfat SDS	Merck, Darmstadt
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Biomol, Hamburg
O-Phenylendiamin (OPD)	Sigma, Deisenhoven
Polyethylenglycol (PEG)	Fluka, Serva, Sigma, Merck
Reduziertes Glutathion	Aldrich, München
Paraffin-Öl	Serva, Deisenhoven
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol, 25:24:1	Sigma, Deisenhoven
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Aldrich, München
PROTEINscript R II	Ambion, Frankfurt
Siliciumoxid (Glasmilch)	Sigma, Deisenhoven
Sililkonierungslösung	Serva, Deisenhoven
Silikon-Öl	Sigma, Deisenhoven
Sucrose	Merck, Darmstadt
Tris (Tris-Base)	Roth, Karlsruhe
TritonX100	Merck, Darmstadt
TRIZOL-Reagenz	GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein
Trypticase-Pepton	Becton Dickinson, Cockeysville
Trypsin	Sigma, Deisenhoven
Tween 20	Merck, Darmstadt
Urea	Merck, Darmstadt

3.1.2. Mikroorganismen und Plasmide

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 3.1.3. aufgeführten Mikroorganismen sowie die in Tabelle 3.1.4. aufgelisteten Plasmide als Ausgangsmaterial für Klonierungsarbeiten verwendet.

Tab. 3.1.3. Verwendete Bakterien-Stämme

<i>E.coli</i> -Stamm	Genotyp	Hersteller
BLR(DE3)	F' <i>dcm ompT hsdS_B(r_B-m_B)gal, λ(DE3)</i>	Stratagene
BL21-Gold	E. coli B F- <i>dcm+ Hte ompT hsdS(r_B- m_B-) gal endA Tet</i>	Stratagene
BL21-Star	F' <i>dcm ompT hsdS_B(r_B-m_B-)gal, λ(Star)</i>	Stratagene
DH5α	φ80d/ <i>lacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, (r_K, m_K⁺), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Stratagene
One-Shot TOP10	F- <i>mcrA Δ(murr-hsdRMA-mcrBC) φ80/lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galJ galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen
XL-10 Gold	Tet ^r D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q ZDM15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]	Stratagene

Tab. 3.1.4. Verwendete Plasmide

Plasmid	Referenz / Herkunft
pJC20, pJC40	Clos and Brandau, 1994
TOTO pCR TM II	Invitrogen
pMal CRI (c2x)	New England BioLabs
pASK-IBA2, -IBA6	IBA

3.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 3.1.5. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller / Bezugsquelle
Grids	Nickel-Grids	Plano
Nitrocellulose Membran	Protran R BA 85	Schleicher und Schuell
Röntgenfilme	BIOMAX	Kodak
Millipore-Filter	0,2 µm	Millipore
Mikrotiterplatten (ELISA)	Maxisorb	Nunc
Proteinsäulchen	0,1 µm	Amicon
Silikonfett, hochviskos	Baysilone-Paste	Bayer
Sterilfilter	0,22 µm Sterilfilter	Millipore
Zellkulturplatten für Kristallisation	24 Vertiefungen	Nunc
Zentrikonröhrchen	10.000 MW CO, Ambion Ultra	Ambion

Tab. 3.1.6. Geräte und Messeinrichtungen

Verwendete Geräte	Typbezeichnung	Hersteller-Firma
ELISA-„Reader“	MR5000	Dynatech
FPLC-Säule	High load“ Superdex 200 Säule	Pharmacia
Gelfiltrations-Anlage	Pharmacia LKB Pumpe P500	Pharmacia
MALDI-TOF-Messgerät	Bruker REFLEX time-of-flight	Major Pharma Co
Mikrotom	SM 2000R	Leica
PCR-Maschine	UNO II 96 Thermablock	Biometra
Plattenwascher (ELISA)	MRW	Dynatech
Photometer	UVIKON 932, 933	BIO-TEK Kontron
Röntgenstrahlen-Detektor	MAR CCD, 165 mm	DESY/HASYLAB
Sequenz-Gelelektrophorese	Sequencing System Model S2	GibcoBRL
SpeedVac	SVC 100	Savant
Sonifizierer	Sonifier 250	Branson
Sorvall Zentrifuge	Superspeed RC 2-B	Sorvall
Synchrotron	Consortium Beamline X13	DESY/HASYLAB
Transmissionselektronenmikroskop (TEM)	EM 301, CM10	Philips
Ultramikrotom	Om U3	Reichert
Ultrazentrifuge	Centricon T1065, TFT 55.38 Rotor	Kontron

3.1.4. Allgemeine Medien, Lösungen und Puffer

Sämtliche Medien, Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Die Sterilisation erfolgte durch 20minütiges Autoklavieren bei 121 °C oder durch Sterilfiltration (Porengröße von 0,22 µm). Im Folgenden sind nur allgemein verwendete Lösungen aufgeführt. Alle weiteren Lösungen, Medien und Puffer sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Allgemeine Puffer-Lösungen

1 x TE-Puffer:

1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 x TBE-Puffer:

90 mM Borat, 0,3 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, 90 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 x TAE-Puffer:

0,3 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 x PBS-Puffer:

4 mM NaH₂PO₄, 19 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,3

3.2. Mikrobiologische Methoden

3.2.1. Stammhaltung und Kultivierung der verwendeten Mikroorganismen

Die verschiedenen Stämme von *E. coli* wurden zur kurzfristigen Lagerung auf Agarplatten ausgestrichen und bei 4 °C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden Glycerinstocks von Übernachtskulturen angelegt (30 % Glycerin, 70 % ÜN-Kultur) und bei -70 °C gelagert. Die Anzucht erfolgte aerob in LB-Medium (TB-Medium bei Fermenter-Anzucht) bei 37 °C in Erlenmeyerkolben oder Reagenzgläsern auf Rundschüttlern (150-200 Upm). Die folgenden Antibiotika wurden zur Positivselektion der verwendeten Mikroorganismen bzw. Plasmiden eingesetzt:

Tab. 3.2.1. Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Firma	Arbeitskonzentration
Ampicillin	Roth	100 µg/ml
Chloramphenicol	Sigma	34 µg/ml
Tetracyclin	Beohringer	15 µg/ml
Kanamycin	Roth	10 µg/ml

Allgemeine Medien:

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

1,0 % (w/v) Trypticase-Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,0 % (w/v) NaCl, 1,5 % (w/v) Agar

LB-Agar

LB-Medium, 1,5 % (w/v) Agar

Terrific Broth (TB-Medium)

1,2 % (w/v) Trypticase-Pepton, 9 % (w/v) Hefeextrakt, 50 mM KH₂PO₄, pH 7

3.2.2. Herstellung kompetenter Bakterien

Eine Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes wurde 1:100 in LB-Medium verdünnt (siehe 3.2.1) und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C inkubiert. Die Kulturen wurden für 15 Min. auf Eis gestellt, dann mit 4 000 x g bei 4 °C für 10 Min. zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Bakterienpellet in 50 ml eiskaltem 80 mM CaCl₂ aufgenommen. Nach weiteren 30 – 45 Min. auf Eis wurden unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und die Zellen bei 4°C in 5 ml 20 % kaltem Glycerin/80 mM

CaCl₂ resuspendiert, in 100 µl Aliquoten aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

3.2.3. Transformation von *E. coli*

Die Transformation erfolgte nach der Methode von Cohen *et al.* (1972). Pro Ansatz wurden 100 µl kompetenter Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und zusammen mit 100 pg Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 60 Sek. langer Hitzeschock bei 42 °C und ein 2minütiges Abkühlen auf Eis. Nach Zugabe von 700 µl warmen LB-Medium (ohne Antibiotika) wurden die Zellen für 30 – 45 Min. bei 37 °C unter Schütteln (150-200 Upm) inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 12 000 x g für 2 Min. pelletiert, der Überstand zum Teil abgegossen und das Pellet resuspendiert, auf Agar-Platten mit entsprechenden Selektions-Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei einer „Blau-Weiß-Selektion“ (Topo TA-Kloning Kit) wurden zuvor 70 µl 0,1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und 60 µl 20 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-galactosid (X-Gal) in 2 % (v/v) Dimethylformamid ausplattiert. Bakterien, die Vektoren mit erfolgreicher Insertion der gewünschten DNA tragen, sind von weißer Farbe, während Bakterien ohne Insert im Vektor blau erscheinen.

3.2.4. Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Nach erfolgreicher Transformation eines Plasmid-Konstrukts in einem geeigneten Bakterienstamm (Tab. 3.1.4.) wurde für die Expression ein Klon in 10 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Kultur wurden 1:100 (v/v) verdünnt, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C inkubiert und die Expression des Proteins anschließend mit IPTG (Endkonzentration zwischen 0,1 und 1 mM) oder Anhydrotetracyclin 0,2 µg/ml induziert. Nach 4 Std. wurde die Bakterienkultur abzentrifugiert (30 Min., 3 500 Upm, 4 °C) und das Pellet für weitere Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

3.2.5. Rekombinante Expression unter Verwendung eines Fermenters

Zur Herstellung großer Proteinmengen fand die Expression in einem 2 Liter Fermenter statt. Dazu wurden 40 ml einer Übernacht-Kultur in 1,5 l Terrific Broth Medium (TB-Medium) mit entsprechendem Antibiotikum gegeben und unter Rühren bei 37 °C und Luftzufuhr bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen. Das Volumen wurde auf 2 l aufgefüllt und die Expression wie unter 3.2.4 durchgeführt.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Gewinnung und Aufbereitung von Onchozerkomen

Für die Gewinnung von *O. volvulus* wurden Onchozerkome verwendet, die in Liberia, Kamerun oder Benin von Patienten chirurgisch entfernt worden waren. Die Würmer wurden durch Verdauung des Knotengewebes in 0,5%iger Kollagenase und Freispülen isoliert (Schulz-Key *et. al.*, 1977). Nach vollständiger Trennung vom Wirtsgewebe wurden die Würmer bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Herausschneiden der Knoten für wissenschaftliche Zwecke wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Behörde Hamburg genehmigt.

3.3.2. Aufschluss von weiblichen *O. volvulus* für Protein-Isolierung

Rund zwanzig aufbereitete Weibchen und mehrere Männchen (siehe oben) wurden gepoolt und unter Zugabe von 1 x PBS/1 % (v/v) TritonX100, pH 7,4 und 0,1 mM PMSF in Isopropanol (1:5 v/v) auf Eis mit einem Glas-Glas-Homogenisator aufgeschlossen. Das Homogenat wurde für 1 Std. bei 100 000 x g bei 4 °C zentrifugiert und Überstand und Pellet getrennt voneinander bis zur weiteren Verarbeitung bei -70 °C gelagert.

3.3.3. Präparation von gesamt-RNA aus *O. volvulus*

Die RNA-Isolierung erfolgte unter Verwendung des TRIZOL-Reagenz. Das Phenol:Guanidiniumthiocyanatgemisch wurde nach Angaben des Herstellers in 10fachem Überschuss (w/v) zu den in flüssigem Stickstoff fixierten Wurmern gegeben und die Würmer mit einem Glas-Glas-Homogenisator homogenisiert. Nach einer 30minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 12 000 g wurde die RNA 2mal mit

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) und 1mal mit Chloroform (1:1) extrahiert. Die RNA wurde aus dem Überstand mit $\frac{1}{2}$ Volumen Isopropanol ausgefällt. Das RNA-Pellet wurde dann mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC-Wasser aufgenommen.

3.3.4. Reverse Transkriptase-Reaktion

Für die reverse Transkription der messenger-RNA (mRNA) in copy-DNA (cDNA) wurden zwei Systeme verwendet. Sollte die Erststrang cDNA-Synthese getrennt von der späteren Polymerase Kettenreaktion (PCR) ablaufen, wurde das M-MuLV-Reverse Transkriptase Kit für das Umschreiben der mRNA benutzt und wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt (New BioLabs). Es wurde 1 μ g Gesamt-RNA mit 0,5 μ M Oligo-(dT)Nukleotidprimer für 7 Min. bei 70 °C inkubiert, 0,6 mM dNTP's, der Enzympuffer und 20 U M-MuLV-Reverse Transkriptase hinzugegeben und für 60 Min. bei 42 °C inkubiert. Nach einem Inaktivierungsschritt für 10 Min. bei 70 °C wurde die cDNA bei 4 °C gelagert. Für PCR-Reaktionen wurde 1 μ l der cDNA als Matrize eingesetzt.

Sollte direkt nach der cDNA-Synthese eine PCR-Reaktion folgen, wurde der Enhanced Avian HS RT-PCR Kit verwendet und wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt (Sigma). Als Matrize wurde 20 ng Gesamt-RNA eingesetzt, für 50 Min. bei 42 °C inkubiert und die anschließende PCR-Reaktion mit spezifischen Oligonukleotiden wie unter 3.3.5 beschrieben mit 35 Zyklen durchlaufen.

3.3.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionen wurden in 50 - 100 μ l-Ansätzen durchgeführt. Dabei wurden 20 - 100 ng DNA, je 10 pmol Oligonukleotide (Oligo) Sense und Antisense, 200 μ M dNTP's, 2,5 - 5 U einer DNA-Polymerase sowie vom Hersteller an das jeweilige System adaptierte 1 x PCR-Puffer eingesetzt. Für die Synthese der PCR-Produkte wurde die *pfu*-Polymerase aufgrund ihrer korrekturlesenden 3' - 5'-Exonuklease-Aktivität eingesetzt oder die Polymerase „High Fidelity“ verwendet. Für analytische PCRs wurde die Taq-DNA-Polymerase oder der PCR-Supremix verwendet.

Die Denaturierung erfolgte stets für 1 Min. bei 94° C. Die Hybridisierungstemperatur änderte sich in Abhängigkeit von Länge und Spezifität der Oligonukleotide und richtete sich nach der Schmelztemperatur T_m , die anhand folgender Formel errechnet wurde:

$$T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$$

Die Dauer der Hybridisierung betrug meist 30-60 Sek. Die Elongation erfolgte bei 72 °C (68 °C bei der *pfu*-Polymerase) und die Dauer betrug 1 Min. pro Kilobasen (kb) zu amplifizierender DNA. Jeder Zyklus wurde 25 – 35mal wiederholt.

3.3.6. Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR zur Erstellung des *O₁GST1*-Konstrukts wurde unter Verwendung der *pfu*-Polymerase durchgeführt. Folgendes Primerpaar wurde eingesetzt:

O₁GST1+mutS: CTACAACCTCAAGCGGAAAAGTACACATTA und

O₁GST1+mutAS: TAATGTGTACTTTTCCGCTTGAGGTTGTAG.

Die PCR-Bedingungen betragen:

Denaturierung bei 95 °C	30 Sek.	
Denaturierung bei 95 °C	30 Sek.	
Annealing bei 55 °C	1 Min.] 17 Zyklen
Extinktion bei 68 °C	2 Min./kb	

3.3.7. Plasmid-DNA Präparation

Mini-Präparation

2 ml einer Übernachtskultur wurden bei 14 000 x g für 2 Min. bei RT pelletiert und in 200 µl STET-Puffer aufgenommen. Nach Zugaben von 100 µg Lysozym wurden die Zellen für 10 Min. auf Eis aufgeschlossen, die Reaktion durch 2minütiges Kochen im Wasserbad beendet und die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 14 000 x g und 4 °C für 15 Min. entfernt. Der Überstand wurde mit 500 µl 6 M NaJ und 5 µl Glasmilch versetzt, 10 Min. bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, abzentrifugiert und die an der Glasmilch gebundene DNA mit 500 µl Waschpuffer gereinigt. Die Glasmilch wurde bei 56 °C getrocknet, die DNA anschließend bei 56 °C getrocknet und in 80 µl dH₂O eluiert und bei -20 °C gelagert.

Midi/Maxi-Präparation

Für Großpräparationen von Plasmid-DNA wurden die Kit-Systeme von Qiagen verwendet und die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Lösungen für DNA-Präparation

New Wash

50 % Ethanol, 0,05 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

STET-Puffer

50 mM EDTA, 5 % (v/v) TritonX100, 8 % (v/v) Sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Glasmilch

12 % (w/v) Siliziumoxid, 0,12 % (v/v) HCl

3.3.8. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurden die Plasmidvektor-DNA, DNA-Fragmente und Plasmid-Konstrukte an jeweiligen enzymespezifischen Erkennungssequenzen geschnitten, was eine Ligation von DNA mit einem Vektor und eine Integrationskontrolle ermöglichte. Die enzymatische Spaltung wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Enzyme wurden in den vom Hersteller mitgelieferten Puffersystemen bei 37 °C eingesetzt. Für analytische Zwecke wurden 1 µg DNA und 2,5 - 5 U Enzym für 1 - 3 Std. inkubiert (20 µl Ansatz). Bei präparativen Verfahren wurden 10 - 50 µg DNA und 5 - 10 U Enzym für 3 - 16 Std. inkubiert (50 - 100 µl Ansatz) und für nachfolgende Arbeitsschritte über Qiagen-Säulen gereinigt.

3.3.9. DNA-Aufreinigung über DNA-Affinitätssäulen (Qiaquick PCR Purifikation Kit, Qiagen)

Zur Aufreinigung von homologen PCR-Produkten oder linearisierten DNA-Fragmenten wurde das Qiagen PCR Purifikation Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Mit dieser Methode wurden Enzyme, Salze, freie Nukleotide und kleine DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 100 bp von dem gewünschten DNA-Fragment getrennt.

3.3.10. Auftrennung von DNA über Agarosegel-Elektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese in einer horizontalen Flachgel-Apparatur. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen von 0,7 - 1,5 % (w/v) in TBE-Puffer für analytische und in TAE-Puffer für präparative Zwecke eingesetzt. Nach Aufkochen und Abkühlen des Agarosegels auf ca. 55 °C wurde Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) zugefügt. Nach dem Gießen und Auspolymerisieren des Gels wurden die DNA-Proben 1:5 mit DNA-Probenpuffer versetzt, aufgetragen und bei maximal 120 Volt aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden durch das zugefügte Ethidiumbromid mit einem UV-Transilluminator detektiert. Als Größenstandard wurde eine 1 Kb-DNA-Leiter verwendet.

Beschwerungspuffer für DNA

0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol, 40,00 % (w/v) Glycerin

3.3.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurde die zuvor mit Restriktionsendonukleasen verdaute, linearisierte und anschließend gereinigte Plasmid-DNA bzw. das zu klonierende DNA-Fragment zusammen in das T4-DNA-Ligase-System eingesetzt. In dem 10 µl Ansatz wurden 10 - 30 ng Plasmidvektor-DNA mit 3 bzw. 5 molarem Überschuss an Fragment-DNA nach Herstellerangaben (Promega) mit einer Einheit T4 DNA-Ligase bei 14 °C über Nacht im Wasserbad inkubiert und am folgenden Tag in einen *E. coli*-Stamm transformiert.

Bei Verwendung des TOPO TA Cloning Kits wurde das PCR-Produkt direkt in die TA-Ligation eingesetzt und nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) verfahren.

Einzelne Kolonien wurden vermehrt, deren DNA isoliert, die Insertion durch Restriktionsverdau überprüft und positive Klone auf korrekten Leserahmen hin sequenziert.

3.3.12. Dpn1-Verdau

Wenn als Matrize ein Vektor-Konstrukt in die PCR eingesetzt wurde, muss nach der Enzymreaktion ein Dpn1-Verdau vorgenommen werden. Die Restriktions-Endonuklease

Dpn1 zerstört das methylierte Ursprungsplasmid und verhindert so eine Transformation des Ursprungsplasmids anstelle des neuen Plasmids.

3.3.13. Methoden zur DNA-Sequenzierung

Eine DNA-Sequenzierung wurde u.a. für die Bestimmung der 5'- und 3'-Bereiche der *O1G*ST3-Varianten, für das Erhalten von cDNA-Sequenzen der *O1G*ST3-Varianten nach erfolgter TOPO-Klonierung, zur Überprüfung des richtigen Leserahmens eines Gen::Vektor-Konstrukts und zur Prüfung des gewünschten Basenaustausches nach einer Mutagenese-PCR eingesetzt. Zwei verschiedene Methoden kamen zum Einsatz:

a) „Manuelle Sequenzierung“

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 20 µl einer DNA-Minipräparation mit 2 µl 2 N NaOH für 10 Min. bei 37 °C unter Schütteln denaturiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 3 µl 3 M Natriumacetat pH 5,4 und 2 ½ Volumen 95%igem Ethanol in Flüssigstickstoff gefällt. Anschließend wurde die DNA für 20 Min. bei 14 000 x g und 4 °C pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei 56 °C getrocknet und in 7 µl dH₂O resuspendiert.

Die Sequenzierungsreaktion wurde nach Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Nach der enzymatischen Didesoxymethode wurde für die Sequenzreaktion der „Sequense Version 2.0 Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Als Isotop wurde Desoxyadenosin 5' α-[³⁵S]-triphosphat eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mit denaturierenden Polyacrylamidgelen (8 % Acrylamid (w/v), 7 M Urea) für 2 - 4 Std. in einer vertikalen Elektrophoresekammer bei 80 W. Das Gel wurde auf Whatman Papier überführt, getrocknet, ein Röntgenfilm aufgelegt und über Nacht bei RT exponiert. Die Entwicklung erfolgte durch den Curix-60-Entwickler.

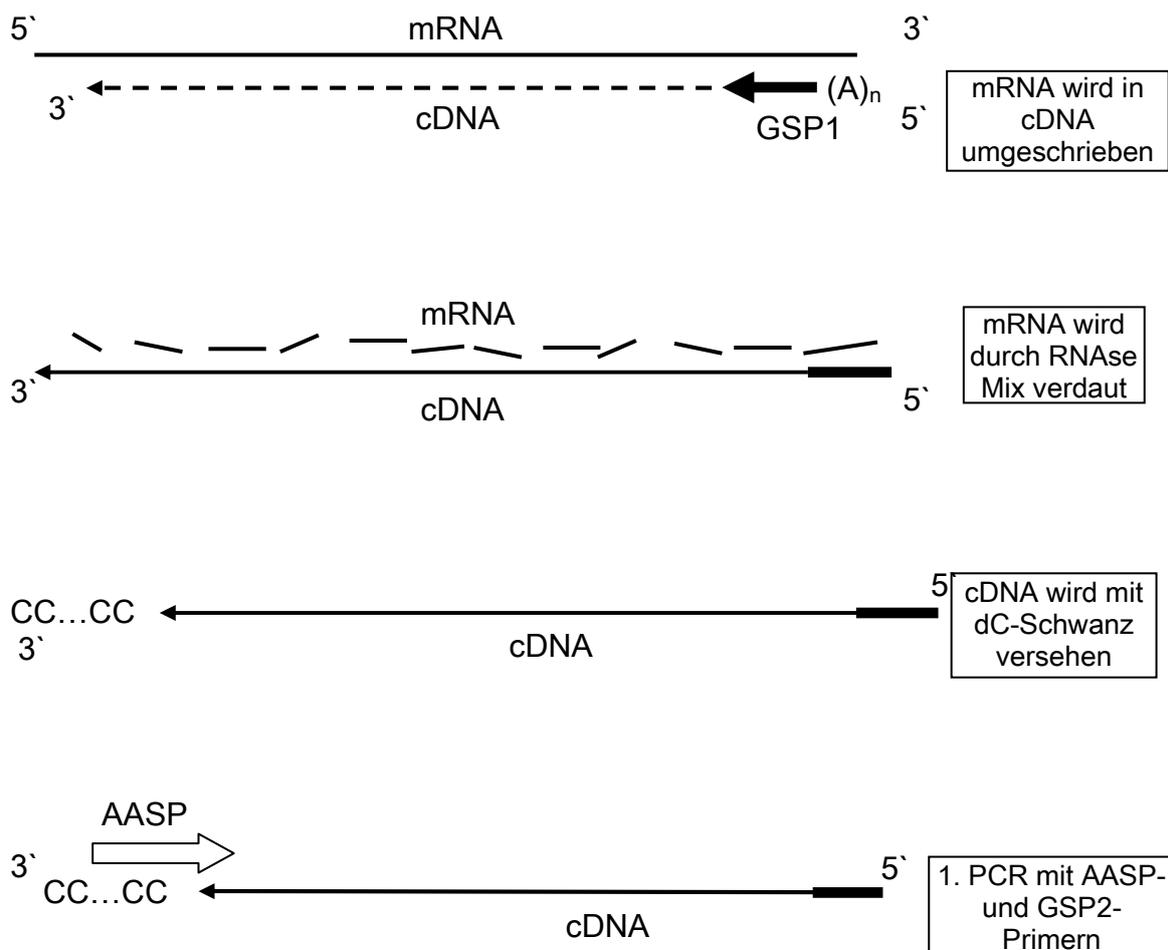
b) „Automatische Sequenzierung“

Die Sequenzierungsreaktion resultierte ebenfalls durch die Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977) Der Kettenabbruch erfolgte durch Einbau von fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden. Die Reaktion wurde mit Hilfe des „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kits“ nach Angaben des Herstellers (Applied Biosystems, ABI) durchgeführt. Die Sequenzreaktion verlief im Thermocycler über 25 Zyklen: 10 Sek. 96 °C, 5 Sek. 50 °C, 4 Min. 60 °C. Zur Reinigung wurde der Reaktionsansatz mit

80 µl HPLC-Wasser versetzt und einer Ethanol-Fällung (siehe „Manuelle Sequenzierung“) mit 3 µl Natrium Acetat, pH 4,6 unterzogen.

3.3.14. 5'- und 3'- „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE)

Zur genauen Charakterisierung der 5'- oder 3'-Enden des *OvGST3*-Transkriptes wurde die RACE-Methode verwendet. Sie wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Invitrogen). In die RACE-Reaktionen wurde jeweils 2,5 µg Gesamt-RNA von *O. volvulus* zunächst in eine Erststrang-cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) SUPERScript™ II umgeschrieben. Das Prinzip einer RACE ist in Abbildung 3.3.1 schematisch dargestellt:



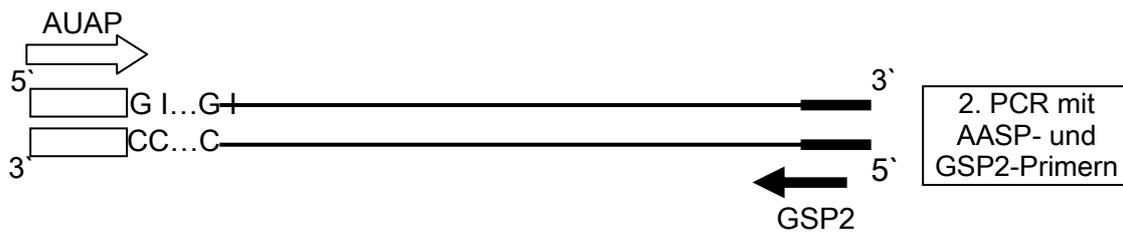


Abb. 3.3.1. Prinzip der 5'-RACE

Für die 5'-Amplifikation wurde ein genspezifischer Antisense-Primer (GSP1 = 5'RACE-AS-1: 5'-CTTGACATAAATTGATTTAGACTGAT-3') in die cDNA-Synthese eingesetzt. Durch Zugabe von RNase-H wurde die verbleibende RNA abgebaut und die Nukleotide, Enzyme und Oligonukleotide entfernt. Das Erststrang-cDNA-Produkt wurde am 3'-Ende mit Hilfe der Terminale-Deoxynucleotid-Transferase (TdT) mit einem homopolymeren Schwanz aus Desoxy-Cytosin (dC) versehen. Eine erste Amplifikation folgte durch Verwendung des dC-spezifischen „Abridged Anchor Sense-Primers“ (AASP) und dem genspezifischen antisense (GSP2 = 5'RACE-AS-2-Primer (5'-GATTTAGACTGATTGCTGTGCGC3'-). Die RACE-Produkte wurden in einer 2. PCR unter Verwendung des Sense-AUAP-Primers eingesetzt, um die Spezifität und Menge an Transkripten zu erhöhen.

Die 3'-RACE setzt man dann ein, wenn das 3'-Ende der mRNA unbekannt ist. In der reversen Transkription bindet ein polyA-Schwanz Adapter Primer am PolyA-Schwanz der mRNA und in der anschließenden PCR werden genspezifische 5'-Primer eingesetzt.

Die Produkte der 2. PCR wurden in den TOPO TA Cloning-Vektor ligiert (3.3.11.), in *E coli* One Shot-Zellen transformiert (3.2.3.), von positiven Klonen die Plasmid-DNA isoliert und mit EcoR I verdaut (3.3.13.). Die Klone mit Insertion wurden sequenziert (3.3.13.).

3.3.15. Amplifikation der unterschiedlich gespleißten mRNA der *OvGST3* cDNA mit Hilfe des Spliced Leads (SL1)

Die Amplifikation der unterschiedlich gespleißten mRNA-Varianten der *OvGST3*-cDNA ist in Abbildung 3.3.2. schematisch dargestellt. In allen PCR-Reaktionen wurde der gleiche 3'-Primer eingesetzt, der bereits bei der 3'RACE verwendet wurde. Die

Sequenz der 5'Primer variierte. Sie setzten sich aus der konstanten SL1-Sequenz und aus variierenden genspezifischen Sequenzen (sl-a-1 bis sl-e-1) zusammen (Tab. 3.3.1.). In die 2. PCR wurde dann ein 5'-Primer mit der weiterführenden genspezifischer Sequenz und der 3'-AUAP-Primer der 3'-RACE eingesetzt.

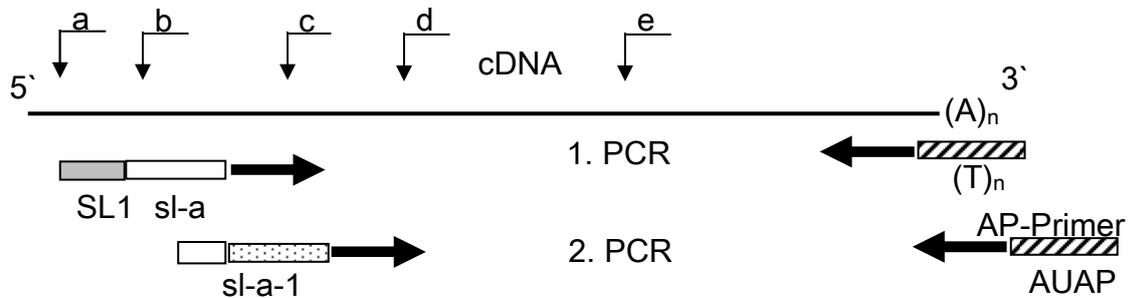


Abb. 3.3.2. Primer zur Amplifikation von trans-gespleißter mRNA von *O. volvulus*

Die PCR Produkt wurden sofort in den TOPO TA-Vektor kloniert und in Top 10-Zellen transformiert. Positive Klone wurden mit vektorspezifischen Sense- und Antisense-Primern sequenziert. Die unterschiedlichen transgespleißten TOPO-TA-Konstrukte dienten als Template für nachfolgende PCR-Reaktionen.

Tab. 3.3.1. Verwendete Olinonukleotide

Primer-Name	Sequenz
sl-a	5'-CAAGTTTGAGCTAACGTCATTG-3'
sla-1	5'-ACGTCATTGGTGACATCGCTATA-3'
sl-b	5'-CAAGTTTGAGGTCATCGTTCTG-3'
slb-1	5'-ATCGTTCTGTTCTTGACTTCTTC-3'
sl-c	5'-CAAGTTTGAGCATCCTGTGTTT-3'
slc-1	5'-CTGTGTTTCTCATTTCGCAGATAT-3'
sl-d	5'-CAAGTTTGAGGGAGTAAAAAGCAA-3'
sld-1	5'-GTAAAAAGCAAAGCAAGATTT-3'
sl-e	5'-CAAGTTTGAGATATGTGATGCA-3'
sle-1	5'-TGTGATGCAATACGGAAAGTAT-3'

Sl-a bis sl-e stellen Primer dar, die aus der SL1 Sequenz (grau unterlegt) und genspezifischer Sequenz aufgebaut sind. Sl-a-1 bis sl-e-1 zeigen die 2. PCR-Primer mit der entsprechenden weiterführenden Sequenz. Die übereinstimmenden Sequenzbereiche des 1. Primers und dem nested Primer sind unterstrichen. SL steht für Spliced Leader; a bis e für die 5 Initiationsstellen.

3.3.16. Signalpeptid-Nachweis

Durch Anwendung von *in vitro* Transkription und Translation sollte das Vorhandensein einer putativen Signalsequenz der *OvGST3* nachgewiesen werden. Hierzu wurde das Kit „PROTEINscript R II“ von Ambion verwendet.

Das System basiert zum einen auf der T7 Bacteriophagen Polymerase, die DNA in RNA transkribiert und zum anderen auf dem Kaninchen Retikulozyten Lysat (Pelham and Jackson, 1976), welches die essentiellen Komponenten für die darauf folgende Translation enthält. Durch Zugabe von mikrosomalen Membranen aus dem Hund (Promega) soll das Signalpeptid abgespalten oder prozessiert werden. Die Ausführung der *in vitro* Reaktionen wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für die Transkriptionsreaktion wurde 0,5 µg Plasmid-DNA des Konstruktes pJC40::SLC1_7 in einem 10 µl Ansatz für 90 Min. bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl dieses Ansatzes in die Translationsreaktion (25 µl total) eingesetzt, 1 µl „Canine Mircosomal Membranes“ zugefügt und für weitere 90 Min. bei 30 °C inkubiert.

3.3.17. Verdau mit dem Faktor Xa

Der „Faktor Xa“ schneidet nach der Erkennungssequenz Ile-Glu-Gly-Arg und wurde eingesetzt, um das Zielprotein vom Maltose-bindendes Protein (MBP) zu trennen. Der Faktor besteht aus zwei Untereinheiten, die im SDS-Gel ein Molekulargewicht von 20 und 30 kDa aufzeigen. Der Verdau wurde nach Angaben des Herstellers (New England BioLabs) durchgeführt und über Nacht bei 23 °C inkubiert.

3.3.18. Expression der *OvGST3*-Varianten unter Verwendung des pJC40-Vektor

Mittels PCR wurden die unterschiedlichen transgespleißter Varianten der *OvGST3* aus dem TOPO-Vektor mit den Sense-Primern:

SLEco1S 5'-GGAATTCCATATGTTTGGCTCATTATTGATATGCATC-3',

SLEco2S 5'-GGAATTCCATATGAACTGGTTTCTCGCGAAGAATCCT-3'

SLEco3S 5'-GGAATTCCATATGCTTACGATGGAGCTTACCGAG-3'

SLEcoS4 5'-CCGGAATTCATGTCAAGATTCCTCAACAAGGG-3'

SL_{EcoS5} 5'-CCGAATTCATGCAACAAGGGAATAAAAAGCAA-3'

und dem Antisense-Primer:

SL_{Bam1AS} 5'-GCGGGATCCTTAGGCATTGTAATATCCACTGCC-3'

amplifiziert und über EcoR - und BamH I-Schnittstellen in die spezifischen EcoR I/BamH I Restriktionsschnittstellen in den pJC40-Vektor ligiert. Um eine ideale Expression zu erzielen, wurde das Konstrukt in verschiedene *E. coli* Stämme transformiert. Die optimalen Expressionsbedingungen wurden durch variierende Temperaturen zwischen 14 °C und 37 °C und durch unterschiedliche IPTG-Konzentrationen zwischen 0,1 mM und 1 mM bestimmt. Der Vektor pJC40 translatiert einen „His-Tag“, bestehend aus 10 Histidinen, an den N-Terminus des gewünschten Proteins, was die Aufreinigung über eine Nickel-Säule ermöglicht (siehe 3.4.1.). Um das in „inclusion bodies“ eingeschlossene rekombinante Protein in Lösung zu bekommen, fand die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen durch Zugabe von 6 M Urea statt.

3.3.19. Expression der OvGST3-Varianten unter Verwendung des pMal-c2X-Vektors

Der pMal-c2X-Vektor kodiert für ein 42,6 kDa Maltose-bindendes Protein (MBP) und fusioniert dieses Protein an den C-Terminus des gewünschten Proteins. MBP wird zusammen mit dem gewünschten Protein exprimiert und liegt aufgrund seiner stark hydrophilen Eigenschaft frei im Zytoplasma vor. Die Protease (Faktor Xa) Schnittstelle ermöglicht das Trennen von MBP und dem Zielprotein.

Für die Klonierung der OvGST3-Varianten in den pMal Vektor wurden die TOPO-Klone (siehe 3.3.11.) als Matrize verwendet und mit Hilfe der verschiedenen Sense Primer (siehe 3.3.18.) und dem Antisense Primer:

AS-StrepBamH1 5'-GCGGGATCCAGATCATTTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAG
CGCTGGCATTGTAATATCCACTGCCGTATAC-3'

amplifiziert, der einen zusätzlichen StrepTactin-Schwanz kodiert (unterstrichener Sequenzbereich). Die Ligation fand über die primerspezifischen EcoR I- und BamH I-Schnittstellen und die gleichen vektorspezifischen Schnittstellen statt. Zur Überprüfung des richtigen Leserahmens wurde das Konstrukt mit vektorspezifischen Primern

sequenziert. (Sequ-S-pMal 5'-CTATTCTAAAAGTCGGACTATGTC-3' und Sequ-AS-pMal 5'-GGTCGTCAGACTGTTCGATGAAGCC-3'). Nach erfolgreicher Klonierung wurde das Konstrukt in BL 21 *E. coli*-Zellen exprimiert.

Die Aufreinigung fand über die Amylose/Agarose Matrix und nach dem Faktor Xa-Verdau über die StrepTactin-Säule (3.4.2.) oder direkt über die StrepTactin-Säule statt.

Weitere Expressionsvektoren wie pASK-IBA2 und pASK-IBA6 von IBA wurden zusätzlich verwendet, um ein lösliches, natives Protein zu erhalten. Kloniert wurde über die Schnittstellen EcoR I und BamH I. Das weitere Vorgehen fand nach Angaben des Herstellers statt (New BioLabs/Roche).

Eine Expression der *OvGST3* im eukaryontischen *Pichia*-System wurde ebenfalls durchgeführt, aber aufgrund unzureichender Ergebnisse in dieser Arbeit nicht aufgeführt.

3.3.20. Herstellung des Antikörper-Konstruktes AK-SLC1-7

Für die Herstellung eines polyklonalen *OvGST3*-Antikörpers durch die Immunisierung eines Huhns wurde ein Teilbereich des *ovgst3*-Gens rekombinant exprimiert. Als PCR-Template diente das *OvGST3*-Konstrukt SLC1-7::pJC40. Es wurde das Primer-Paar:

AK-C1-7 S: 5'-CCGGAATTCATGTCAAGATTTCTCAACAAGGG-3'

AK-C1-7 AS: 5'-CGCGGATCCGAGATTCTAGCATTTGTTTCAGCC-3'

mit den Restriktionsschnittstellen EcoR I und BamH I in der PCR-Reaktion eingesetzt und wie unter Abschnitt 3.3.8. und 3.3.11. beschrieben, in den Vektor pJC40 ligiert und in BLR DE3 *E. coli*-Zellen transformiert. Die Expression fand im Fermenter statt. Das Protein wurde mit 6 M Urea versetzt, über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt und über eine SDS-PAGE kontrolliert. Eine kleine Gelprobe der AK-SLC1-7 Proteinbande wurde ausgestanzt und die AS-Sequenz mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt.

3.4. Biochemische Methoden

Alle Schritte zur Aufreinigung rekombinanter Proteine fanden bei 4 °C statt. Das Bakterienpellet wurde im methodenspezifischen Puffer resuspendiert, durch Ultraschall aufgeschlossen, das Homogenat bei 100 000 x g für eine Stunde zentrifugiert und der Überstand mit der jeweiligen Matrix versetzt. Diese wurde zuvor mit dem entsprechenden Bindungspuffer äquilibriert.

Die Konzentration der Eluate wurden über die Bradford-Methode bestimmt und deren Reinheit über eine SDS-PAGE kontrolliert.

3.4.1. Reinigung rekombinanter Proteine über Ni²⁺-Chelatchromatographie

Rekombinante Proteine, die über pJC40-Konstrukte exprimiert wurden, besitzen einen N-terminalen (His)₆-tag mit dessen Hilfe das Protein über eine Ni²⁺-Chelatchromatographie aufgereinigt werden konnte. Die Chromatographie wurde nach Angaben des Herstellers (Qiagen) im „Batch“-Verfahren durchgeführt. Die Bindung an das Ni²⁺-Chelat erfolgte im spezifischen Bindungspuffer über Nacht und das gebundene Protein wurde am folgenden Tag 3 – 4mal mit Waschpuffer für 10 Min. unter Schwenken gereinigt. Die Elution erfolgte in einem möglichst geringen Volumen eines 250 bis 500 mM Imidazol-enthaltenden Puffers. Bei rekombinanten Proteinen, die sich in Einschlusskörpern („inclusion bodies“) befanden, wurden alle Puffer mit 6 M Urea versetzt, um das Protein in Lösung zu bekommen.

Bindungspuffer

20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol

Waschpuffer

20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol

Elutionspuffer

20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl, 250-500 mM Imidazol

3.4.2. Reinigung rekombinanter Proteine über StrepTactin

Zur Aufreinigung der Expression mit den pASK-IBA2- bzw. IBA6-Konstrukte wurde eine Affinitätschromatographiesäule mit immobilisierter Strep-Tactin-Säule verwendet und nach Angaben des Herstellers (IBA) durchgeführt. Die Bindung des rekombinanten

Proteins an die Strep-Tactin-Säule fand für 2 Std. im Puffer W statt. Die Säulen wurde 3 – 4mal mit 10 ml Puffer W für 10 Min. unter Schwenken gewaschen und anschließend 6mal mit 1 ml Puffer E eluiert, wobei jeder Milliliter 3 - 4mal über die Säule gegeben und aufgefangen wurde.

Die Säule wurde durch Waschen mit Puffer R regeneriert und konnte so erneut verwendet werden.

Puffer W

100 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

Puffer E

100 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin

Puffer R

100 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Hydroxyazophenyl Benzolsäure (HABA)

3.4.3. Reinigung rekombinanter Proteine über Amylose/Agarose Matrix

Eine Proteinexpression mit Hilfe des pMal-Vektors führt zur Bildung eines rekombinanten Proteins, welches mit einem Maltose-bindenden-Protein (MBP) fusioniert ist. Die Isolierung des MBP-Fusionsproteins wurde durch die Verwendung einer Amylose/Agarose-Matrix ermöglicht. Die Bindung der MBPs/*O*_vGST3-Variante an die Matrix fand über Nacht im Column-Puffer statt, der zugleich als Waschpuffer diente. Durch Zugabe von 10 mM Maltose zum Column-Puffer wurde das Fusionsprotein eluiert.

Column-Puffer

20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA

3.4.4. Reinigung rekombinanter Proteine über GSH-Sepharose bzw S-Hexylglutathion-Agarose

Die *rO*_vGST1 und *rO*_vGST2 lässt sich aufgrund ihrer Bindungseigenschaften von GSH über GSH-Sepharose bzw. S-Hexylglutathion-Agarose aufreinigen. Die Methode fand im „Batch“-Verfahren statt. Die Bindung an die GSH-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) bzw. S-Hexylglutathion-Agarose (Sigma) erfolgte über Nacht unter Schwenken im PBS-Puffer. Am folgenden Tag wurde 3 – 5mal mit PBS für 10 Min. unter

Schwenken gewaschen. Die Elution erfolgte mit 15 mM GSH/50 mM Tris-HCl pH 8,0 bzw. 15 mM S-Hexylglutathion/50 mM Tris-HCl pH 8,0. Dabei wurde mit möglichst geringem Volumen das Protein in 4 - 5 Fraktionen von der Matrix eluiert.

3.4.5. Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Rinderserumalbumin wurde im verwendeten Elutionspuffer als Eichsubstanz verwendet.

Bradford-Reagenz

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

3.4.6. Gelfiltration mittels „Fast pressure liquid chromatography“ (FPLC)

Eine Gelfiltration mittels FPLC wurde zur weiteren Aufreinigung und für das Wechseln der Pufferbedingungen der rO₁GST1 verwendet. Zunächst wurde die „High load“ Superdex 200 Säule mit 2 mM GSH/100 mM Na-Acetat-Trihydrat pH 7,5 äquilibriert. Dann wurde sie mit maximal 2 ml mit GSH-Säule gereinigter rO₁GST1 beladen und 2 ml Fraktionen bei einer Durchflussrate von 60 ml/Std. aufgefangen. Mittels Proteinbestimmung wurden die rO₁GST1-haltigen Fraktionen ermittelt und ihre Reinheit über SDS-Page und Coomassie Färbung kontrolliert.

3.4.7. SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen

Zum Nachweis und zur Molekulargewichtsbestimmung rekombinant hergestellter Proteine und deren Reinheitskontrolle wurde die SDS-PAGE gemäß Lämmli *et al.* (1970) durchgeführt. Dazu wurde ein 12,5%iges Trenngel hergestellt, das nach Polymerisation mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet wurde. Die Protein-Proben wurden vor dem Auftragen mit Auftragspuffer im Verhältnis 1:2 vermischt, für 10 Min. bei 95 °C denaturiert und bei 10 000 x g für 3 Min. zentrifugiert. Für die Trennung wurden Minigel-Kammern von Biometra verwendet. Der Elektrophoreselauf wurde bei 20 – 30 mA durchgeführt. Als Molekulargewichts-standard diente der „Precision Plus Protein Standard“.

SDS-PAGE Lösungen

2 x SDS-Probenpuffer

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

Sammelgelpuffer

5,7 g Tris-HCl, pH 6,7 ad 100 ml dH₂O

Trenngelpuffer

36,3 g (1,5 M) Tris-HCl, pH 8,9 ad 100 ml dH₂O

1 x SDS-Laufpuffer

3 g Tris-HCl, 14,4 g Glycin, 0,1 % (v/v) SDS ad 1000 ml dH₂O

Zusammensetzung des 12,5%igen Trenngels

1,5 ml Trenngel-Puffer; 1,5 ml dH₂O; 3,0 ml 30 % (v/v) Bis-Acrylamid; 40 μ l 10 % (w/v) SDS; 20 μ l 10 % (v/v) APS; 5 μ l TEMED

Zusammensetzung des 4%igen Trenngels

1,0 ml Sammelgel-Puffer; 1,3 ml dH₂O; 667 μ l 30 % (v/v) Bis-Acrylamid; 40 μ l 10 % (w/v) SDS; 20 μ l 10 % (v/v) APS; 5 μ l TEMED

3.4.8. Färbung der Proteingele mit Coomassie-Blau

Polyacrylamidgele wurden für 1 Std. in Coomassie-Blau R-250 gefärbt und anschließend mit einer Entfärberlösung behandelt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben.

Lösungen für Coomassie Färbung

Färbelösung

0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Bleu R-250, 20 % (v/v) Eisessig, 50 % (v/v) Ethanol, H₂O

Entfärber

20 (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, H₂O

3.4.9. Synthese des Ethacrynsäure-Glutathion-Konjugates

Das Ethacrynsäure-Glutathion-Konjugat ist ein Inhibitor einiger GSTs und wurde zur Ko-Kristallisation der rOvGST1 nach Bugge *et al.* (1990) synthetisiert. Dazu wurden in einem 50 ml Zentrifugengefäß 100 mg Ethacrynsäure in 2,5 ml absolutem Ethanol gelöst und 2,5 ml H₂O hinzugegeben. Ebenso wurden 100 mg GSH in 5 ml 50%igem (v/v) Ethanol gelöst und beide Lösungen vereinigt. Nach Zugabe von 10 Tropfen gesättigter NaHCO₃ wurde das Reaktionsgefäß mit Parafilm luftdicht verschlossen und für 48 Std. bei RT unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf 5 - 6 Reaktionsgefäße verteilt und in der SpeedVac getrocknet. Das Evaporat wurde in 2 ml gesättigter KHCO₃ gelöst und in ein Glasröhrchen überführt. Tropfenweise wurde 1%ige (w/v) H₃PO₄ hinzugegeben, bis ein Niederschlag entstand, der filtriert und getrocknet wurde. Die Masse und Reinheit des Ethacrynsäure-Glutathion Konjugates wurde über eine Massenspektroskopie bestimmt.

3.4.10. Synthese des S-p-Bromobenzylglutathions

S-p-Bromobenzylglutathion ist ebenfalls ein GST-Inhibitor und wurde zur Ko-Kristallisierung der rOvGST1 nach einer modifizierten Methode von Vince *et al.* (1971) synthetisiert. Es wurden 4 mM GSH und 4 mM S-p-Bromobenzylbromid in 10 ml 50%igem (v/v) Ethanol gelöst. Ohne den pH-Wert der Lösung höher als 9,23 steigen zu lassen wurde tropfenweise 5 M Natriumhydroxid hinzugegeben und unter Rühren der pH-Wert bei 9,2 über 3 Std. gehalten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 M Salzsäure auf einem pH-Wert von 2,11 gebracht. Das Produkt kristallisierte langsam aus und wurde über Nacht bei RT vollständig präzipitiert. Am folgenden Tag wurde das Produkt filtriert, mit Wasser und Ethanol gewaschen, in der SpeedVac getrocknet und mit Hilfe der Massenspektroskopie auf Masse und Reinheit überprüft.

3.4.11. MALDI-TOF-Massenspektrometrie

MALDI-TOF steht für Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie (matrix assisted laser desorption/ionization), der Zusatz TOF für "time-of flight mass". Eine kleine Probe des über SDS-PAGE aufgetrennten Proteins (rAK-SLC1_7) wurde über Nacht durch die Endoprotease Trypsin im Gel verdaut („gel-in-digest“) und die entstehenden Peptidfragmente wurden am folgenden Tag eluiert. Die

entstandenen spezifischen Peptidfragmente wurden bezüglich der molekularen Masse mit MALDI-TOF-MAs analysiert. Die erhaltenen Fragmentmassen (Massenfingerabdruck) wurden mit der bei einer theoretischen Spaltung erhaltenen Masse der rOvGST3 verglichen.

3.5. Immunologische Methoden

3.5.1. Western Blot und Immundetektion von Proteinen

Proteine wurden im 12,5%igen Trenngel aufgetrennt und nach Standardmethoden geblottet (Sambrook *et al.*, 1989). Nach erfolgreichem Blotten wurde die verwendete Nitrocellulose-Membran mit 3 % (w/v) BSA/PBS über Nacht bei 4 °C geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Am darauf folgenden Tag wurde der Blot 3mal für 10 Min. mit 0,3 % (v/v) Tween 20/PBS gewaschen und der gegen die OvGST3 spezifische polyklonale Antikörper wurde je nach Anwendung 1:100 bis 1:10 000 mit 0,03 % (v/v) Tween 20/PBS verdünnt und als erster Antikörper für 1 - 2 Stunden bei RT unter Schütteln gebunden. Nach erneutem dreimaligen Waschen (siehe oben) mit 0,3 % (v/v) Tween/PBS wurde der zweite Antikörper, ein Alkalische-Phosphatase- oder Peroxidase-gekoppelter Maus-anti-Huhn-Antikörper, 1:10 000 mit 0,03 % (v/v) Tween 20/PBS verdünnt und ebenfalls für 1 - 2 Stunden bei RT unter Schütteln gebunden. Nach dem Waschen wurde der Blot entwickelt.

Für den Alkalische-Phosphatase-Nachweis wurden 66 µl Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 33 µl Bromo-4-(chloro-3)-Indolyphosphat (BCIP) in 2 ml Substrat-Puffer vermischt und der Blot in der Lösung bis zur auftretenden Farbreaktion inkubiert. Anschließend wurde die Farbreaktion durch Zugabe von EDTA-Puffer gestoppt.

Der sensitivere Peroxidase-Nachweis wurde mit Hilfe des ECL-Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Amersham Phamacia Biotech).

Western Blotting Lösung

3 g Tris-HCl, 14,4 g Glycin, 20 % (v/v) Methanol ad 1000 ml dH₂O

Lösung für die Immunodetektion von ProteinenBCIP

50 mg/ml 5-Bromo-4-(chloro-3)-Indolylphosphat in Dimethylformamid

NBT

50 mg/ml Nitroblau-Tetrazoliumchlorid in 2 ml 70 % Dimethylformamid

Substrat-Puffer

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

Stopp-Puffer

20 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA, pH 2,9

3.5.2. Immunisierung eines Huhns

Für die Antikörperherstellung wurde zunächst ein dafür geeignetes Huhn ausgewählt. Um Kreuzreaktionen des Hühnereidotter mit *O. volvulus* auszuschließen, wurden drei verschiedene Dotter auf Reaktion mit *Onchocerca*-Extrakt hin untersucht. Das Huhn, dessen aufgereinigtes Eigelb eine nahezu negative Reaktion zeigte, wurde für die Immunisierung ausgewählt. Für die drei Immunisierungen wurden 600 µg der O_vGST3 (AK-SLC1-7, siehe 3.3.20) rekombinant hergestellt und über His-Tag aufgereinigt (siehe 3.3.20). Bei jeder Immunisierung wurden 200 µg des Proteins in einem Volumen von maximal 100 µl mit 100 µl Freund's Adjuvant (1. Immunisierung „complete“) gut vermischt und subkutan dem Huhn injiziert. Im Abstand von jeweils einer Woche wurde das Huhn zwei weitere Male mit 200 µg/100 µl Protein und 100 µl Freund's Adjuvant („incomplete“) immunisiert. Nach drei Wochen konnte der Antikörper aus dem Eidotter isoliert werden.

3.5.3. Antikörper-Aufreinigung aus Hühnereidotter

Für die Aufreinigung des Antikörpers aus dem Ei wurde das Eigelb vom Eiweiß getrennt und gut mit dH₂O gespült. Die Dotterhaut wurde mit einem Skalpell angeritzt und die Eidotter-Masse in einem 50 ml Plastikgefäß aufgefangen, die Masse mit einem Volumen K-Phosphatpuffer aufgenommen und gut vermischt. Die Dotter-Emulsion wurde in 30 ml Zentrifugenbecher mit einem Volumen K-Phosphatpuffer mit 7 % (w/v) PEG 6000 gemischt ([3,5 % (w/v) PEG]) und 30 Min. bei 4 °C auf einen Rollmischer inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 10 Min. bei 10 000 Upm und 4 °C

zentrifugiert und der Überstand durch Mull in einem frischen Zentrifugenbecher filtriert. Durch Zugabe von 10 % (w/v) PEG 6000 wurde die Lösung auf eine PEG-Endkonzentration von 12 % (w/v) eingestellt und gut vermischt, bis sich das gesamte PEG löste. Anschließend wurde die Lösung 10 Min. bei 10 000 Upm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml K-Phosphatpuffer durch auf- und abpipettieren gelöst und mit einem Volumen K-Phosphatpuffer mit 24 % (w/v) PEG 6000 vermischt ([12 % (w/v) PEG]). Es wurde erneut für 10 Min. bei 4 °C und 10 000 Upm zentrifugiert, Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml K-Phosphatpuffer aufgenommen und für 30 - 60 Min. bei 4 °C und 12 000 Upm zentrifugiert. Nun wurde der Antikörper enthaltende Überstand vorsichtig abgenommen und in ein frisches 15 ml Plastikgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,02 % (v/v) Natriumazid wurde der rOvGST3-Antikörper konserviert.

Stammlösung für 1 M K-Phosphat-Puffer pH 7,2

143,4 ml 1M K_2HPO_4 und 56,6 ml 1M KH_2PO_4 ergibt pH 7,2

3.5.4. Antikörper-Aufreinigung über „CNBr-activated Sepharose 4B“ (Amersham Biosciences)

Zunächst wurden 0,66 g der CNBr-aktivierten Sepharose 4B in einem 50 ml-Volumen einer 1 mM HCl-Lösung für 2 Std. bei 4 °C unter Drehen gequollen. Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 4 000 Upm wurde 2mal für 15 Min. mit 50 ml 1 mM HCl und anschließend 2mal mit 50 ml 1xPBS gewaschen. Die Sepharose wurde in ein 15 ml Plastikgefäß überführt und nach 5 Min. Zentrifugation (4 000 Upm) in 2 ml PBS aufgenommen. Die gegen PBS dialysierte Proteinlösung (9 mg/4 ml rOvGST3) wurde im Verhältnis 1:2 auf die Sepharose gegeben und über Nacht bei 4 °C unter Drehen gebunden. Am folgenden Tag wurde die OD_{280} des Überstandes gemessen. Bei erfolgreicher Bindung sollte >80 % des Proteins gebunden sein. Ein Teil des Überstandes wurde als absorbiertes Antikörper und Negativ-Kontrolle aufbewahrt und bei -70 °C gelagert.

Die restlichen aktiven Gruppen der Sepharose wurden mit Hilfe eines 0,1 M Tris-HCl-Puffers pH 8,0 für 2 Std. bei RT geblockt. Das gebundene Protein wurde 3mal mit 5 ml Acetat-Puffer pH 4,0 und 3mal 5 ml 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 8,0 jeweils abwechselnd gewaschen. Am Schluss des Waschvorganges wurde mit 10 ml PBS gewaschen. Vor der Antikörper-Bindung wurde die Sepharose mit 5 ml Glycin-Puffer (pH 2,5) und

anschließend mit 10 ml PBS equilibriert. Dann wurden die 9 mg des Anti-rOvGST3-Antikörpers über Nacht bei 4 °C gebunden und am folgenden Tag mit 2mal 10 ml PBS gewaschen. Die Sepharose wurde auf eine Säule gebracht und zunächst mit 2 ml Borat-Puffer, dann mit 2mal 10 ml PBS gewaschen. Der Antikörper wurde mit 10 ml Glycin-Puffer (pH 2,5) eluiert, wobei jeweils 1 ml Fraktionen 4mal über die Säule gegeben, aufgefangen und die Antikörper-Lösung durch Zugabe von 150 - 200 µl 1 M Tris-HCl pH 9 neutralisiert wurde. Von den 10 Fraktionen wurde jeweils die OD₂₈₀ bestimmt und diese gegebenenfalls gepoolt. Der so aufgereinigte rOvGST3-Antikörper wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -70 °C gelagert und die Säule mit dem gebundenen Protein mit PBS gewaschen, in 10 ml PBS/0,05 % (v/v) Natriumazid konserviert und so bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Acetat-Puffer

0,1 M Natrium Acetat, 0,5 M NaCl, Essigsäure auf pH 4,0

Glycin-Puffer

0,1 M Glycin in PBS, pH 2,5

Borat-Puffer

0,1 M Borat, 0,5 M NaCl, pH 8,0

3.5.5. Herkunft der immunhistologisch untersuchten Würmer

Für die Lokalisation der OvGST3 in *O. volvulus* wurden Paraffinblöcke mit Onchozerkomen aus früheren Studien der Abteilung für Helminthologie des Bernhard-Nocht-Institutes verwendet. Bei den Knoten handelt es sich um in 80 % Ethanol- oder in 4%igem gepuffertem Formaldehyd fixiertes Material. Die nach Karnovsky mit 1 oder 2 % Paraformaldehyd und 0,025 % Glutaraldehyd fixierten Knoten aus Ghana (Hoerauf *et al.*, 2003) wurden für die Immunelektronen-mikroskopie verwendet. Die Entnahme der Onchozerkome sowie die Behandlungen mit Doxycyclin und Ivermectin erfolgten nach Zustimmung der zuständigen Kommissionen in Hamburg und Ghana.

Es wurden mehr als 200 Weibchen untersucht, davon ca. 100 mit Embryogenese. Die unterschiedlich präparierten *Onchocerca*-Arten wurden mit dem hergestellten Anti-OvGST3-Antikörper immunhistologisch untersucht. Die untersuchten Onchozerkome stammten überwiegend aus Gebieten der afrikanischen Wald-Onchozerkose. Die Herkunft der untersuchten Onchozerkome ist in folgender Tabelle aufgelistet.

Tab. 3.5.1. Herkunft der immunhistologisch untersuchten Onchzerkome

Anzahl der Patienten	Land der Herkunft	Behandlung	Intervall zwischen Beginn der Behandlung und der Operation	Referenz
9 10 2 2 6	Liberia Ghana Burkina Faso Uganda Guatemala	nicht behandelt	entfällt	Büttner <i>et al.</i> , 1988 Hoerauf <i>et al.</i> , 2003 Büttner <i>et al.</i> , 1988 Fischer <i>et al.</i> , 1993 Büttner <i>et al.</i> , 1988
3 3 1 1 9	Ghana Uganda	Ivermectin: 0,15 mg/kg	2 Monate 25-44 h 19 Tage 24 h + 7 Monate 4-12 h + 1-2 Jahre	Hoerauf <i>et al.</i> , 2003 Fischer <i>et al.</i> , 1993 Ndyomgyenyi <i>et al.</i> , 2004
3 7 2 1	Ghana	Doxycyclin: 100 oder 200 mg/Tag Für 6-12 Wochen	2 Monate 5-7 Monate 11 Monate 25 Monate	Hoerauf <i>et al.</i> , 2003
4 1	Ghana	Doxycyclin und Ivermectin	11 Monate 17 Monate	Hoerauf <i>et al.</i> , 2003
4 4	Ghana	Suramin: 5 g in 36 Tagen	43 Tage 90 Tage	Awadzi <i>et al.</i> , 1995

Die Herkunft acht andere *Onchocerca*-Arten ist in der Tabelle 3.5.2. aufgeführt. Auch hier standen Paraffinblöcke Ethanol oder Formaldehyd-fixierter Würmern aus früheren Studien des Bernhard-Nocht-Institutes zur Verfügung. Es wurden Weibchen mit Embryogenese aus Knoten oder frei im Wirtsgewebe oder in Aorta oder Subkutis vorkommende Individuen untersucht.

Tab. 3.5.2. Herkunft der immunhistologisch untersuchten Würmer anderer *Onchocerca*-Arten

Spezies von <i>Onchocerca</i>	Wirtstier	Land der Herkunft	Anzahl der Proben	Spender, Referenz
<i>O. gibsoni</i>	Rind	Nordaustralien	4	Vankan und Copeman, 1988
<i>O. ochengi</i>	Rind	Kamerun	4	Wahl <i>et al.</i> , 1994
<i>O. dukei</i>	Rind	Kamerun	2	Wahl <i>et al.</i> , 1994
<i>O. armillata</i>	Rind, Aorta	Kamerun	1	Wahl <i>et al.</i> , 1994
<i>O. fasciata</i>	Kamel	Saudi-Arabien	3	Omar <i>et al.</i> , 1993
<i>O. tarsicola</i>	Rothirsch, Subkutis	Süddeutschland	3	Schulz-Key, 1975
<i>O. jakutensis</i>	Rothirsch	Norddeutschland	2	Plenge-Bönig <i>et al.</i> , 1995
<i>O. flexuosa</i>	Rothirsch	Norddeutschland	7	Plenge-Bönig <i>et al.</i> , 1995

Die fünf anderen Filarien-Arten stammen ebenfalls aus früheren Studien und ihre Herkunft ist in Tabelle 3.5.3. aufgelistet. Dabei handelt es sich überwiegend um Weibchen mit reichlich Embryonen. Um mögliche Kreuzreaktionen mit Arten außerhalb der Filaridae zu berücksichtigen, wurde mit *A. suum* ein Nematode und mit *S. mansoni* ein Trematode untersucht.

Tab. 3.5.3. Herkunft der immunhistologisch untersuchten anderen Helminthen-Arten

Spezies	Wirt	Anzahl der Proben	Herkunft, Referenz
<i>Filarien:</i> <i>Loa loa</i>	Mensch, Drill	5 Weibchen Mikrofilarien in Milz	Kamerun: Büttner <i>et al.</i> , 2003
<i>Dirofilaria immitis</i> <i>Dirofilaria repens</i>	Hund Mensch	1 Weibchen, (ohne Embryonen)	BNI, Helminthologie Diagn. Einsendungen
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Mensch (nach Doxycyclin)	1 Weibchen und 1 Männchen, Mikrofilarien in Blut	Ghana: Hoerauf <i>et al.</i> , 2003
<i>Brugia malayi</i> <i>Acanthocheilonema vitea</i> <i>Litomosoides sigmodontis</i>	Mastomys coucha Mastomys coucha Sigmodon hispidus Labormaus	10 Weibchen 2 Weibchen 5 Weibchen	BNI Helminthologie BNI Helminthologie BNI Helminthologie
<i>Andere Helminthen:</i> <i>Ascaris suum</i> <i>Schistosoma mansoni</i>	Schwein Labormaus	3 Weibchen 4 Weibchen, Eier und 4 Männchen	Schlachthof Hamburg BNI Helminthologie

3.5.6. Immundetektion der OvGST3 in Paraffinschnitten

Für die Lokalisation der OvGST3 in *O. volvulus* und in anderen Würmern wurden Paraffinschnitte verwendet. Als primärer Antikörper wurde das gereinigte Prä-Immunein und als spezifischer Antikörper gegen OvGST3 das gereinigte Ei des immunisierten Huhnes bzw. die chromatographisch aufgereinigten Fraktionen 2/3, 4/5 und vor allem 6/7 eingesetzt (siehe 3.5.4.).

Die Schnitte wurden in Rotihistol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanol-Reihe entwässert. Ethanol-Schnitte wurden zunächst in TBS gelagert, wohingegen Formaldehyd- und Karnovsky-Schnitte 30 Min. in 1 % (v/v) NH₄Cl inkubiert wurden. Diese wurden dann für 5 Min. in TBS gewaschen und für weitere 15 Min. in Glycin inkubiert. Die weiteren Schritte galten für alle Schnitte: Die Schnitte wurden zunächst für 5 Min. in 0,1 % (w/v) BSA/TBS gespült. Um unspezifische Bindungen zu unterbinden,

wurden sie mit sterilfiltriertem 10 % (w/v) BSA/TBS in einer feuchten Kammer für 30 Min. geblockt.

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurde die alkalische Phosphatase- anti-alkalische Phosphatase-Methode (APAAP) nach Angaben des Herstellers angewendet. Die primären Antikörper wurden in unterschiedlichen Verdünnungen (1:20 – 1:500) auf die Schnitte geträufelt und für 1 Std. in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Kontrolle wurde das Prä-Immune mit den Immunei gleichzeitig in derselben feuchten Kammer verwendet. Anschließend wurden nacheinander ein Kaninchenantikörper gegen Huhn (60 Min. 1:1000), ein monoklonaler Mausantikörper gegen Kaninchen (30 Min. 1:25), ein polyklonaler Kaninchen-antikörper gegen Maus (30 Min. 1:25) eingesetzt und schließlich der APAAP-Komplex angewendet (30 Min. 1:25). Der APAAP-Komplex enthält einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen alkalische Phosphatase. Für die Farbreaktion wurden die Schnitte mit Fast Red TR Salz behandelt und anschließend mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt.

3.5.7. Detektion der *OvGST3* durch Elektronenmikroskopie

Für die Lokalisation der *OvGST3* mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden Ultradünnschnitte von *O. volvulus* angefertigt. Die mit Karnovsky-Lösung fixierten Stücke von vier Weibchen aus den Onchozerkomen von drei Patienten wurden in LR-White-Acrylharz eingebettet. Die angefertigten Ultradünnschnitte wurden zunächst für 15 Min. bei RT in PBS gelegt und dann bei RT für 60 Min. mit PBS/10 % (w/v) BSA geblockt. Die Schnitte wurden anschließend mit einem Tropfen des Anti-*OvGST3*-Immunei der Fraktion 2/3 in einer Verdünnung von 1:200 und 6/7 in einer Verdünnung von 1:500 (in PBS/1 % w/v BSA) überschichtet, bei 37 °C für 60 Min. und in einer feuchten Kammer über Nacht (ca. 12 Std.) bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen (2mal mit PBS/1 % w/v BSA bei RT) wurden die Schnitte mit dem Kaninchen-Antikörper gegen Huhn versehen (in feuchter Kammer für 60 Min. bei RT, 1:500 in PBS/1 % w/v BSA). Dann 5mal bei RT mit PBS/1 % (w/v) BSA gewaschen, in einer Feuchten Kammer 30 Min. bei RT in einem Tropfen Protein A-Gold-Lösung (10 nm, 1:65 oder 1:50 v/v in PBS/1 % w/v BSA) inkubiert, 3mal mit PBS/1 % (w/v) BSA sowie 2mal mit dH₂O gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und mit Uranylacetat und Reynolds

Bleicitrat (1963) kontrastiert. Die Untersuchung erfolgte mit dem Philips CM 10 TEM bei 80 kV.

3.5.8. Nachweis von Antikörpern gegen OvGST3 im „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Mit Hilfe des „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) sollte geprüft werden, ob das Immunsystem von *O. volvulus*-infizierten Personen mit OvGST3 in Kontakt kommt und Antikörper gegen das Enzym gebildet werden. Hierzu wurden 117 Seren von Onchozerkose-Patienten untersucht, wobei 77 Patienten eine hyperreaktive (Sowda) und 40 eine generalisierte Form der Onchozerkose zeigten. Um mögliche Kreuzreaktionen mit Strukturen von Omega-GSTs in verwandten Filarien zu testen, wurden 40 weitere Seren untersucht. Dabei handelte es sich um Seren von Patienten, die mit den Filarien *W. bancrofti* (15 Seren) und *M. perstans* bzw. *M. streptocerca* (25 Seren) infiziert waren. Eine HIV-Infektion der untersuchten Patienten konnte ausgeschlossen werden (Tawill *et al.*, 1996). Die Herkunft der Seren ist in der Tabelle 3.5.4. aufgeführt.

Tab. 3.5.4. Herkunft der immunologisch untersuchten Humanseren

	Anzahl der Seren	Herkunft	Referenz
<i>Onchozerkose</i>	n = 117		
<i>Hyperreaktive</i>	n = 77	Liberia 1984-86	Albiez <i>et al.</i> , 1985
<i>Generalisierte</i>	n = 40	Liberia 1978 und 1982 Uganda 1991	Brattig <i>et al.</i> , 1986 Fischer <i>et al.</i> , 1993
<i>W. bancrofti</i>	n = 15	Essiama/Axim 2001	Hoerauf <i>et al.</i> , 2003
<i>M. perstans</i> <i>M. streptocerca</i>	n = 25		Fischer <i>et al.</i> , 1996 Fischer <i>et al.</i> , 1997

Mikrotiterplatten wurden mit der rekombinant hergestellten und aufgereinigten OvGST3 (AK-C1-7-Konstrukt, siehe Abschnitt 3.3.20.) sowie einem gut untersuchten Kontrollantigen von *O. volvulus*, Ov20 (Mpagi *et al.*, 2000a, b), beschichtet („coating“). Dazu wurden 100 µl der Proteinlösung mit einer Konzentration von 2 µg/ml Carbonatpuffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6) jeweils in die Vertiefungen pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Reagenzienleerwert („blank“) wurden Kavitäten ohne Proteinbeschichtung mitgeführt. Nicht gebundenes Protein wurde am folgenden Tag mit 0,1 % (v/v) Tween 20-haltiger PBS mit Hilfe eines Plattenwaschers

(MRW, Dynatech, Denkendorf) gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurde die Mikrotiterplatte für 1 Std. bei 37 °C mit 200 µl einer 5% (w/v) BSA/PBS-Lösung inkubiert („blocking“). Nach dreimaligem Waschen der Vertiefungen mit PBS/0,1 % (v/v) Tween 20 wurden die Humanseren in den Verdünnungen von 1:1000, 1:2000 und 1:4000 in 0,5 % (w/v) BSA/PBS für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Ein weiteres dreimaliges Waschen mit PBS/0,1 % (v/v) Tween 20 entfernte ungebundene humane Antikörper. Nach dem Waschen wurden als sekundäre Antikörper subklassenspezifische monoklonale Mausantikörper gegen Human-Immunglobuline zugesetzt. Zum Nachweis von IgG1-Antikörpern wurden gegen das Fc-Fragment von humanem IgG1 gerichtete Antikörper (HP6070, Verdünnung 1:1000 in 0,5 % w/v BSA/PBS) und zum Nachweis von IgG4 gegen das Fc-Fragment von IgG4 gerichtete Antikörper verwendet (HP6025, Verdünnung 1:1000). Die Inkubation fand für 90 Min. bei 37 °C statt. Nach erneutem Waschen wurde zur Detektion der Antikörper gegen *Ov*GST3 Peroxidase-gekoppelter Ziege-Antikörper gegen das F(ab')₂-Fragment von Maus IgG in einer Verdünnung von 1:5000 in 0,5 % (w/v) BSA/PBS für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut gewaschen und die gebundene Peroxidase nach 10 Min. Inkubation mit dem Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin sichtbar gemacht. Nach dem Stoppen der Enzymreaktion durch Zusatz von 100 µl einer 1 N H₂SO₄ erfolgte die Absorptionsmessung bei 450 nm im ELISA-Reader.

3.5.9. Statistische Analyse der ELISA-Ergebnisse

Zunächst wurden die Grenzwerte („cut-off“) für die IgG1- und IgG4-Bestimmung ermittelt. Hierfür wurden 10 Seren von gesunden Europäern (Normalseren) eingesetzt. Als „cut-off“-Wert wurde der arithmetische OD-Mittelwert plus 3 Standardabweichungen der 10 Normalseren bestimmt. Für jedes Patientenserum wurden die Endpunkttiter für die IgG1- und IgG4-Reaktionen mit *Ov*GST3 und *Ov*20 ermittelt. Der Endpunkttiter ergibt sich durch lineare Regression der gemessenen OD-Werte für die drei Serumverdünnungen (1:1000, 1:2000 und 1:4000) (Kemeney, 1992). Der Endpunkttiter repräsentiert die Serumverdünnung, bei der sich das eingesetzte Patientenserum nicht mehr von dem „cut-off“-Wert unterscheidet. Die Titer-Werte für die getesteten Seren wurden graphisch in Box-Plot-Diagrammen (10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 % und Ausreisser) dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen Gruppen der

Patientenseren wurden im „Mann-Whitney U test“ geprüft und Signifikanzen als $P < 0.05$, $P < 0.01$ oder $P < 0.001$ angegeben.

3.6. Kristallisation der rOvGST1 und rOvGST2

3.6.1. Expression der rOvGST1 und rOvGST2

Für die Kristallisierung mussten mindestens 30 - 40 mg reinstes rekombinantes Protein hergestellt werden. Zunächst wurden die Plasmid-Konstrukte für die jeweiligen Proteine hergestellt. Die cDNA-Sequenz der OvGST1 wurde in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden:

OvGST1-Expr-S 5'-GGAATTCCATATGGCATCTAGCAATGCTAATCATGCG-3' und
OvGST1-Expr-AS 5'-ACGCGGATCCCTAGAAATACGTTTTTGGTCTTTT-3'

amplifiziert, anschließend einem Dpn1-Verdau unterzogen (3.3.12) und über Qiagen-Säulen gereinigt (3.3.9). Das PCR-Produkt, wie auch der pJC20-Vektor wurden mit den Restriktionsendonukleasen Nde I und BamH I verdaut und anschließend ligiert. Da im prokaryotischem System fälschlicherweise ein 2. Translationsstartpunkt gelesen wurde, wurde mittels Mutagenese-PCR (mit: OvGST1+mutS 5'-CTACAACCTCAAGCGGA AAAGTACACATTA-3' und OvGST1+mutAS 5'-TAATGTGTACTTTTCCGCTTGAGG TTGTAG-3') das Methionin 25 (M25) im OvGST1::pJC20 Konstrukt in ein Alanin (A25) mutiert (3.3.6). Das mutierte Plasmid OvGST1(A25)::pJC20 wurde in den *E. coli* Stamm BL21 Star transformiert (3.2.3) und in einem 2 Liter Fermenter exprimiert (3.2.4).

Die cDNA der OvGST2 wurde ebenfalls amplifiziert (OvGST2expresS 5'-CCCAAGCTTAGTTATAAGCTGACATATTTTC-3' und OvGST2neuSmaAS 5'-ACGTA GGGCCCTCACTGTTTCCCATTTCCTCACTGG-3') und mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Sma I verdaut (unterstrichende Restriktionsstellen), wie auch der Vektor pJC20 und anschließend ligiert. Das Plasmid OvGST2::pJC20 wurde in den *E. coli*-Stamm BL21DE3 pLysS transformiert und in einem 2 Liter Fermenter exprimiert.

3.6.2. Aufreinigung und Konformationsbestimmung der Proteinlösungen

Die rekombinanten Proteine wurden affinitätschromatographisch über GSH-Sepharose bzw. S-Hexylglutathion-Agarose aufgereinigt (3.4.4). Ein SDS-Gel zeigte, dass die *O*1GST1 noch zusätzliche Proteine enthielt und eine weitere Reinigung mittels Gelfiltration erforderte (3.4.6). Die reinen GSTs wurden über Zentrifugation mit Hilfe von Zentrikonröhrchen (10 000 MW) auf eine Konzentration von 8 mg/ml eingeeengt. Für eine erfolgreiche Kristallisation ist es notwendig, dass die Proteine in homogener Konformation in Lösung vorliegen. Daher wurden die konzentrierten Proteinlösungen mit Hilfe der „dynamic light scattering“-Technik (Chayen *et al.*, 2004) auf deren Konformationszustand hin untersucht. Durch leichte pH-Wert-Änderungen und vorsichtiges Erwärmen sowie das Entfernen von Aggregaten durch Säulchen (0,1 µm Porendurchmesser) konnte eine homogene Proteinlösung erhalten werden.

3.6.3. Derivatisierung mit Schweratomen

Zur Lösung des Phasenproblems wurde bei der Kristallisation der *O*1GST1 die Methode des isomorphen Ersatzes mit Schweratomderivaten angewandt. Dazu wurden verschiedene Schweratom-Lösungen angesetzt und durch Ko-Kristallisation in die Struktur eingebaut. Folgende Stammlösungen mit einer Konzentration von 50 mM wurden angesetzt:

1. Thimerosal
2. Quecksilber (II) chlorid
3. Quecksilber (II) acetat
4. Kalium-Chloroplatinat
5. Gold (III) chlorid
6. Samariumacetat

Die Kristallisation der *O*1GST1 fand dann unter den oben genannten Standardbedingungen in Gegenwart von Schweratomen statt. Dabei betrug die Endkonzentration der Schweratomderivat-Lösung im Reservoir 5 mM.

3.6.4. Ko-Kristallisation mit Inhibitoren

Eine genauere Charakterisierung der Kristallstruktur der Substratbindungstasche der *O* ν GST1 ist durch Ko-Kristallisation mit einem Inhibitor bzw. Substrat möglich. Die früheste Möglichkeit, einen Inhibitor in die Kristallstruktur einzubringen ist während der Aufreinigung des rekombinanten Proteines. Dies wurde durch die Verwendung von S-Hexylglutathion während der affinitätschromatographischen Aufreinigung und Elution der *rO* ν GST2 erreicht. Die jeweiligen Proteinlösungen wurden wie zuvor in dem Kristallisationsansatz eingesetzt.

Eine Ko-Kristallisation der *rO* ν GST1 mit den Inhibitoren S-p-Bromobenzylglutathion und Ethacrynsäure-Glutathion wurde durch das sogenannte „Soaking“, also der Zugabe des Inhibitors zu nativen Kristallen (Cameron *et al.*, 2000) erreicht. Der Kristall wurde dafür mittels Nylonschleife gefischt und anschließend für 24 Stunden in der ursprünglichen Kristallisationslösung mit 10 mM des jeweiligen Inhibitors inkubiert. Bei der klassischen Ko-Kristallisation wurden 5 mM des Inhibitors in die Reservoirlösung hinzugegeben und wie zuvor inkubiert.

3.6.5. Kristallisation

Um eine große Zahl verschiedener Fällungsmittel, pH-Bereiche und Salzkonzentrationen mit minimalen Proteineinsatz zu testen, wurden anfänglich Kristallisationsbedingungen mittels des Kristallisations-Kits der Firma Hampton Research („Crystal Screen I“, Crystal Screen II“) ermittelt. Die Kristallisationsexperimente erfolgten nach der Dampf-Diffusion Methode im hängenden Tropfen und fanden bei 16 °C statt. Dabei wurden 500 μ l der jeweiligen Pufferlösung in eine Vertiefung einer Zellkulturplatte pipettiert. Aus dieser Reservoir-Lösung wurden 2 μ l auf ein Deckgläschen gebracht und mit 2 μ l Proteinlösung mit variierender Proteinkonzentration von 5 bis 10 mg/ml vermischt. Die Deckgläschen wurden zuvor für 2 Std. in 1%iger (v/v) Silikonisierungslösung unter Schwenken silikonisiert und anschließend getrocknet. Um ein geschlossenes System während des Äquilibrierungsvorganges zu garantieren, wurde der Rand der Vertiefung mit Silikonfett versehen, bevor das mit einem Tropfen versehene Deckgläschen umgedreht auf die Vertiefung der Zellkulturplatten gelegt wurde. Im hängenden Tropfen kommt es zu einer Konzentrationszunahme des Proteins (s. o.) und im Idealfall zu einer periodischen

Anordnung der Proteinmoleküle, was schließlich zu einer für das Protein charakteristischen Kristallstruktur führt. Die Zellkulturplatten wurden täglich unter einem Binokularmikroskop auf Kristallwachstum hin untersucht.

3.6.6. Vorbereitung der Kristalle zur Tieftemperatur-Messung

Einheitlich gewachsene Einkristalle wurden für die Röntgen-Analyse in der jeweiligen Reservoir-Lösung gesammelt und unter Vermeidung von Erschütterungen und Temperaturänderungen zum DESY/HASYLAB Hamburg überführt. Um Schäden an der Kristallstruktur durch intensive Röntgenstrahlung zu minimieren, fanden die Messungen unter extremen Tieftemperaturen (ca. $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$) statt, so dass eine genauere Datensammlung erfolgen konnte. Dafür wurden die Kristalle in Flüssigstickstoff schockgefroren. Um die Bildung von Eiskristallen in der den Kristall umgebenden Lösung zu verhindern, die schlimmstenfalls infolge der Anomalie des Wassers zur mechanischen Zerstörung des Kristalls führen kann, wurden Cryoprotektoren eingesetzt. Durch Zugabe von Glycerin oder PEG 400 in die verwendeten Kristallisationslösungen ([10 % v/v]) wurde eine Eiskristallbildung verhindert und die Kristalle cryotauglich gemacht (Rubinson *et al.*, 2000). Die zu vermessenen Kristalle wurden in der Nylonschleife in dem optimierten Tieftemperaturpuffer für 1 Min. äquilibriert, herausgehoben und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für das Vermessen wurde der in der Nylonschleife befindliche Kristall über die Fassung der Nylonschleife in eine vorgesehene Messvorrichtung (Goniometerkopf) eingespannt und durch einen Stickstoffstrom im gefrorenen Zustand gehalten.

3.6.7. Kristallographische Datensammlung

Die Kristalle wurden mit hochenergetischen Synchrotronstrahlen am Deutschen Elektronen Synchrotron EMBL/DESY Hamburg (*beamline* X13) vermessen. Für die Datensammlung wurde der Kristall auf dem Goniometerkopf exakt im Röntgenstrahl justiert. Die Messung erfolgte bei 110 K und unter Verwendung der Rotationsmethode (Arndt und Wonnacott, 1977). Die Diffraktionsdaten (Beugungsdaten) der Kristalle wurden bei DESY gesammelt (Consortium beamline X13 ausgestattet mit MAR Research CCD Detektor) und mit den Programmen *DENZO* und *SCALEPACK* (Minor *et al.*, 2000) prozessiert. Die gemessenen Kristallparameter wurden verfeinert und die

Raumgruppe sowie die Einheitszelle bestimmt. Die Röntgenstrukturanalyse wurde von Dr. Markus Perbandt durchgeführt (Höppner *et al.*, 2004, Perbandt *et al.*, 2005).

4. Ergebnisse

4.1. Herstellung von OvGST1-Inhibitoren

Die Strukturanalyse der OvGST1 erwies sich als äußerst schwierig. Die entstandenen Kristalle waren sehr empfindlich gegenüber Pufferänderungen, sodass kryotaugliche Kristalle stark an Diffraktionsqualität verloren, und dies erschwerte die Strukturanalyse. Das Phasenproblem sollte durch das Einsetzen von Inhibitoren mit Atomen großer Masse gelöst werden. Zwei GSH-Derivate wurden daraufhin hergestellt und mittels Massenspektroskopie qualitativ überprüft.

4.1.1. Synthese von Brombenzyl-Glutathion

Die Konjugation von Glutathion und 4-Brombenzyl-bromid wurde nach Vince *et al.* (2003) durchgeführt. Die Strukturformel des GSH-Derivates Brombenzyl-GSH ist in Abbildung 4.1.1. dargestellt.

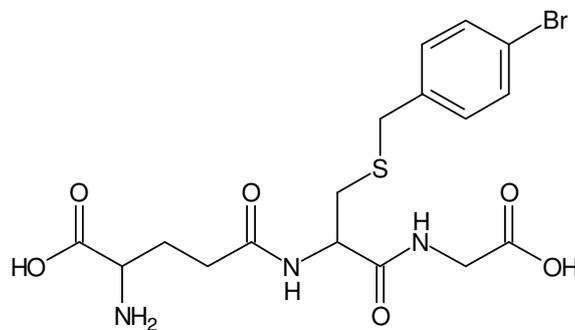


Abb. 4.1.1. Strukturformel des Brombenzyl-GSH

Das GSH-Derivat Brombenzyl-GSH hat ein errechnetes Molekulargewicht von 476,3494 mol und eine exakte Masse von 475,0413 mol.

Unter Abspaltung eines Brom-Moleküls und der Bildung eines Thioäthers wurden die beiden Stoffe kovalent verbunden. Die synthetisierte Substanz wurde mittels Massenspektroskopie analysiert.

In Abbildung 4.1.2. ist die Häufigkeit und Verteilung der gemessenen Massen des analysierten Moleküls dargestellt. Der Hauptpeak zeigt eine Molekülgröße von 476 mol was dem errechneten Molekulargewicht des Brombenzyl-Glutathion entspricht. Im

Spektrum sind weitere Nebenpeaks zu erkennen, die möglicherweise auf unterschiedliche Isotopenzusammensetzungen des Derivats zurückzuführen sind. Das Glutathion-Derivat liegt weitestgehend als einheitliche Form vor und wurde so in der Ko-Kristallisation eingesetzt.

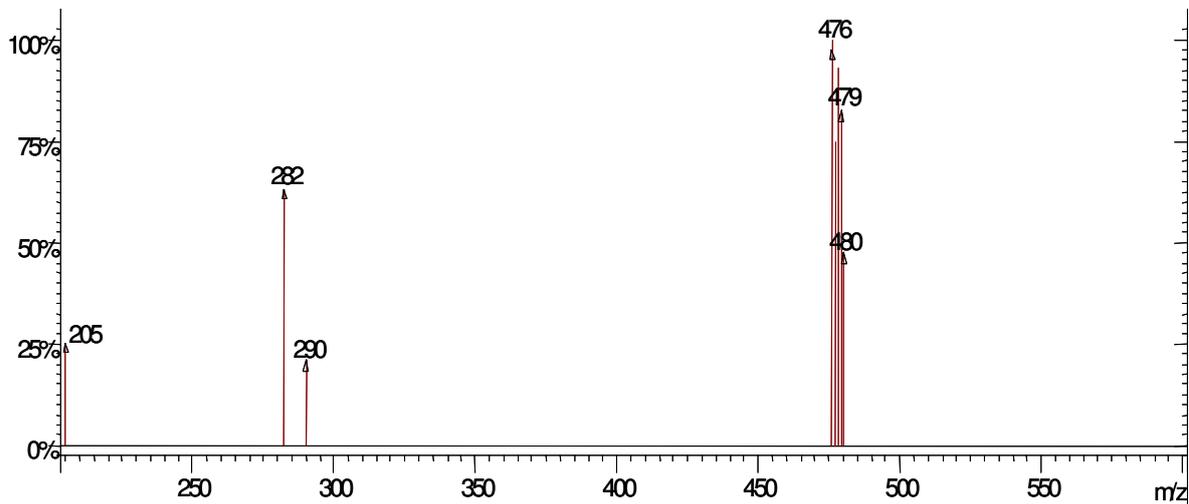


Abb. 4.1.2. Verteilung der relativen Massenhäufigkeit des Brombenzyl-Glutathions

4.1.2. Synthese eines Ethacrynsäure-Glutathion-Konjugat

Die Konjugation von GSH und Ethacrynsäure (2,3-Dichlor-4(2'-methylbutyryl)phenoxyessigsäure) wurde nach Bugge *et al.* (1990) durchgeführt und führte zum Ethacrynsäure-Glutathion-Konjugat, dessen Strukturformel in Abbildung 4.1.3. dargestellt ist.

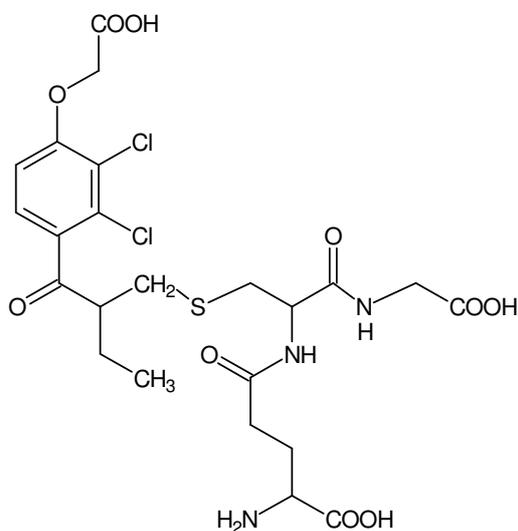


Abb.4.1.3. Strukturformel des Ethacrynsäure-GSH-Konjugats

Das Ethacrynsäure-Glutathion-Konjugat hat ein errechnetes Molekulargewicht von 610,4717 mol und eine exakte Masse von 609,0951 mol.

Nach Aufbrechen der Doppelbindung der Ethenyl-Gruppe der Ethacrynsäure kommt es zur Addition des Schwefelatoms des GSHs. Durch Bildung eines Thioäthers ist das Ethacrynsäure-Glutathion-Konjugat über die Schwefelbindung kovalent gebunden.

Die Massenspektroskopie zeigt (Abb. 4.1.4.) einen Hauptpeak bei einer Molekülgröße von 609,9 mol was dem errechneten Molekulargewicht des Ethacrynsäure-GSH-Konjugats entspricht.

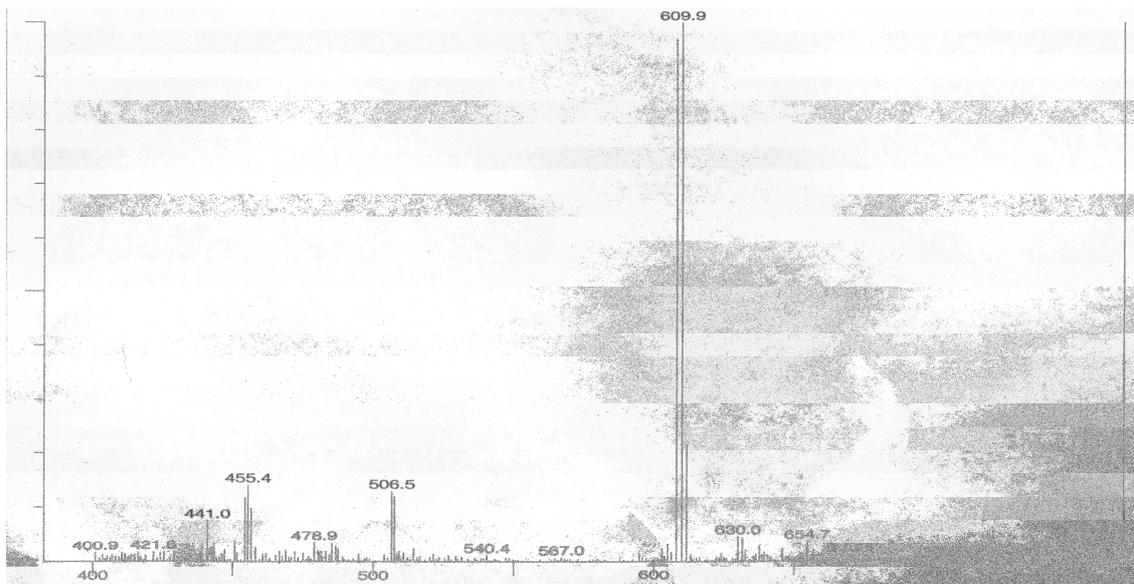


Abb. 4.1.4. Verteilung der relativen Massenhäufigkeit des Ethacrynsäure-Glutathion-Konjugats

4.2. Kristallstrukturanalyse der OvGST1 und OvGST2

Die dreidimensionalen Kristallstrukturen der OvGST1 und OvGST2 wurden angefertigt und mittels Röntgendiffraktion analysiert. Für die Herstellung von Kristallen wurden Milligramm-Mengen an Protein benötigt, die rekombinant in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und für den Prozess der Kristallisation eingesetzt wurden. Die Ergebnisse sind im Folgenden aufgeführt.

4.2.1. Expression und Aufreinigung der rekombinanten OvGST1

Die kodierende Region der OvGST1 wurde ohne Signalpeptidsequenz, wie unter 3.6.1. beschrieben, in den Expressionsvektor pJC20 kloniert und im *E. coli*-Stamm BL21 Star exprimiert. Anschließend wurde das rekombinante Enzym aufgereinigt. Die hohe

Affinität der GSTs zu GSH ermöglichte sowohl eine Aufreinigung durch GSH-Sepharose, als auch über S-Hexylglutathion-Agarose. Nach der anschließenden Gelfiltration wurde das saubere Eluat auf eine Proteinkonzentration von 6 bis 10 mg/ml eingestellt.

4.2.2. Expression und Aufreinigung der rekombinanten O_vGST2

Das Plasmidkonstrukt pJC20::O_vGST2 wurde wie unter 3.6.1. beschrieben hergestellt und im *E. coli*-Stamm BL21DE3 pLysS überexprimiert. Abschnitt 3.6.2. dokumentiert die anschließende Reinigung der O_vGST2. Neben dem physiologischen Substrat GSH wurde auch der Inhibitor S-Hexylglutathion während der Aufreinigung verwendet. Beide Komplexe, O_vGST2-GSH und O_vGST2-S-Hexylglutathion wurden unter denselben Bedingungen kristallisiert und ermöglichten eine genaue Charakterisierung der Glutathionbindungstasche (G-Stelle) und der hydrophoben Bindungstasche (H-Stelle) des Enzyms.

4.2.3. Untersuchung der Proteinlösung mittels dynamischer Lichtstreuung

Eine wichtige Voraussetzung für die Bildung von Proteinkristallen ist, dass das Protein in homogener Lösung vorliegt. Dies konnte mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuungstechnik („dynamic light scattering“, Chayen *et al.*, 2004) untersucht werden. Das Prinzip dieser Partikelgrößenmesstechnik beruht darauf, dass das durch die Partikel in einer Durchlichtanordnung gestreute, reflektierte und transformierte Licht in einem großen Winkelbereich (0 bis 150°) aufgefangen wird. In der Winkelabhängigkeit des gestreuten Lichtes liegt die Information, die in eine Partikelgrößenverteilung umgerechnet wird.

Die Untersuchung der rO_vGST1 zeigte, dass sich erst durch Zugabe von Natrium-Acetat die Aggregation der Proteinmoleküle unterbinden ließ. Nach Pufferwechsel durch Gelfiltration in 2 mM GSH bzw. S-Hexylglutathion/100 mM Natrium-Acetat-Trihydrat pH 8,0 lag die rO_vGST1 monodispers vor und konnte für die Kristallisation eingesetzt werden. Die Proteinlösungen beider Komplexe der O_vGST2 lagen monodispers vor und konnten direkt nach der Aufreinigung für die Kristallisation eingesetzt werden.

In der Abbildung 4.2.1. sind die Daten der dynamischen Lichtstreuung von 9 Messungen (Y-Achse) einer gleichen Proteinlösung der rO_vGST1 bildlich aufgeführt.

Auf der X-Achse ist der Radius der gemessenen Proteinmoleküle dargestellt. Farblich sind die gemessenen Moleküle gezeigt, die exakt den gleichen Radius besitzen. Dunkelrot bedeutet hiernach, dass über 97,1 % der gemessenen Proteinmoleküle einen Durchmesser von ca. 4 nm haben. Blau bedeutet, dass weniger als 1,7 % mit den gemessenen Molekülradien vorliegen. Die Proteinlösung besteht somit aus monodispersen Molekülen.

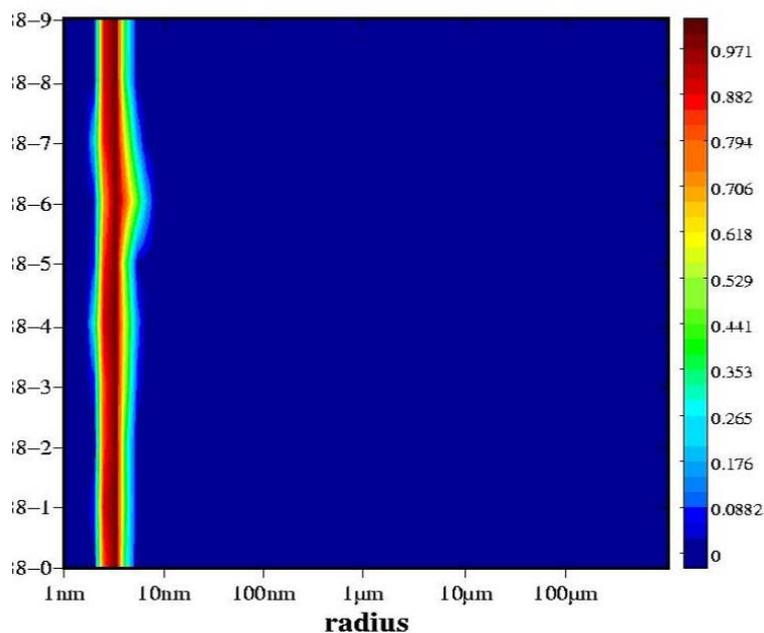


Abb. 4.2.1. Messergebnisse der dynamischen Lichtstreuung (Chayen *et al.*, 2004)

Auf der Y-Achse sind die 9 Messungen der *OvGST1*-Proteinlösung aufgeführt und auf der X-Achse der Radius der gemessenen Proteinmoleküle. Farblich dargestellt ist der prozentuale Anteil der gemessenen Proteine mit gleichem Radius.

4.2.4. Kristallisation der *rOvGST1*

Die Grundvoraussetzung für eine Kristallstrukturanalyse ist die Züchtung von Einkristallen, die eine Mindestgröße von 50 μm Kantenlänge besitzen. Um dies zu erreichen wurde mittels der „Hängenden-Tropfen-Methode“ (hanging drop) nach den idealen Kristallisationsbedingungen gesucht (Abschnitt 1.5.). Zunächst wurde eine Proteinkonzentration der *rOvGST1* von 5,7 mg/ml eingesetzt. Durch Verwendung der Kristallisations-Kits „Crystal Screen I“ und „Crystal Screen II“ konnte die Variabilität möglicher Kristallisationsbedingungen auf wenige Fällungsmittel, pH-Bereiche und Salzkonzentrationen eingeschränkt werden. Innerhalb einer Woche wuchsen Kristalle in folgenden Puffern:

Tab. 4.2.1. Kristallisationsbedingungen der rO₁GST1 mit 5,7 mg/ml Proteinkonzentration

Pufferbedingungen	Kristalle
0,2 M Natrium Acetat-trihydrat 0,1 M Tris HCl, pH 8,5 30 % w/v PEG 4000	relativ große viereckige Kristalle
0,1 M HEPES Na, pH 7,5 10 % v/v Isopropanol 30 % w/v PEG 4000	viele kleine viereckige Kristalle
0,1 M HEPES-Na, pH 7,5 10 % v/v Isopropanol 20 % w/v PEG 4000	viele kleine Kristalle
0,05 M mono-Kaliumdihydrogenphosphat 20 % w/v PEG 8000	sternchenförmige Kristalle

Kristallwachstum bei verschiedenen Pufferbedingungen bei einer Proteinkonzentration der rO₁GST1 von 5,7 mg/ml nach Verwendung der Kristallisations-Kits „Crystal Screen I“ und Crystal Screen II“ mit Kurzbeschreibung der Kristallform. PEG steht für Polyethylenglycol.

Zur weiteren Optimierung wurden die positiven Pufferbedingungen systematisch variiert. Durch eine Erhöhung der Proteinkonzentration oder eine Erhöhung der Fällungsmittelkonzentration wurde nach einem idealen Konzentrations-Zeit-Verlauf gesucht. Dabei wurde jeweils nur eine Komponente verändert. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden die Kristallisationsexperimente zweifach angesetzt. Die besten Ergebnisse erster Optimierungen ergaben die Pufferbedingungen von 0,1 M HEPES-Na pH 7,5, 10 % v/v Isopropanol und einer Polyethylenglycol (PEG) 4000-Konzentration von 20 bis 24 % w/v. Einen großen Einfluss auf die sich bildenden Kristalle hatte der Präzipitant PEG. Es wurden vier PEGs verschiedener Hersteller miteinander verglichen. Das PEG 4000 von Serva und das PEG 3350 von Sigma ergaben keine oder sehr uneinheitliche Kristalle. Sie wurden für weitere Optimierungen nicht mehr verwendet. Bei Anwesenheit von PEG 4000 von Fluka und Merk bildeten sich nach vier Tagen viele kleine Kristalle. Die PEGs dieser Hersteller wurden für alle weiteren Ansätze benutzt. Die Bildung vieler kleiner Kristalle deutet darauf hin, dass die Lösung zu lange im labilen Bereich gehalten wurde und so viele Kristallisationskeime entstehen konnten. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration auf 8,3 mg/ml führte zur Bildung von großen unstrukturierten Kristallen in Form von „Schieferplatten“, was auf ein zu schnelles Wachstum hindeutete. Eine noch höhere Proteinkonzentration führte zu einem Ausfallen des Proteins. Um einheitliche Kristalle zu erhalten, wurde versucht, durch Senkung der Inkubationstemperatur auf 4 °C das Wachstum zu verlangsamen. Dies führte jedoch wieder zur Bildung vieler kleiner Kristalle und hatte keinen positiven

Einfluss auf die Kristallbildung. Alle weiteren Optimierungen fanden daher bei Raumtemperatur (16 °C) statt.

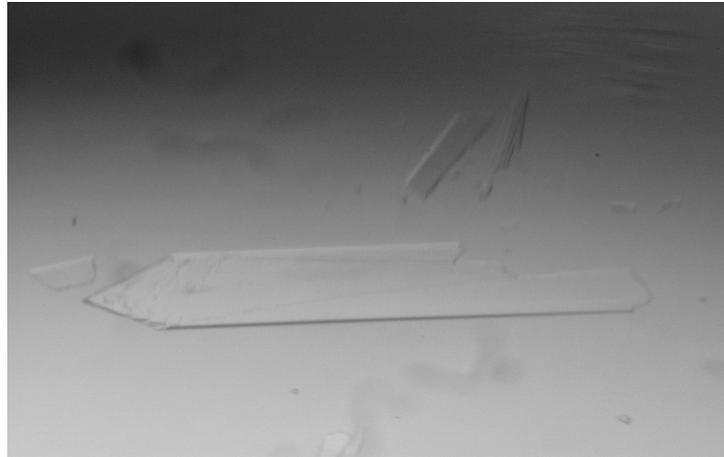


Abb. 4.2.2. Kristall der OvGST1

Ein nach vier Tagen gewachsener Kristall der rOvGST1. Die Proteinlösung wurde vor dem Prozess der Kristallisation im hängenden Tropfen in 2 mM GSH und 100 mM Natrium-Acetat-Trihydrat pH 8,0 mittels Gelfiltration umgepuffert und auf eine Konzentration von 8,3 mg/ml eingestellt. Diese Lösung wurde zusammen mit 0,1 M HEPES pH 7,5, 10 % v/v Isopropanol und 20 – 24 % w/v PEG 4000 von Fluka bzw. Merck in den Kristallisationsprozess eingesetzt. Die beiden Lösungen wurden in einem Tropfenverhältniss von 3 µl : 3 µl bei 16 °C für mehrere Tage inkubiert.

Ein Verlangsamen des Kristallwachstums durch Überschichten der Reservoir-Lösung mit einem Paraffin/Silikon-Ölgemisch im Verhältnis 1+1 führte zu einem starken Wasserentzug aus dem Tropfen und zu einem damit verbundenen Ausfällen des Proteins. Erst durch das Vergrößern des Tropfenvolumens der Proteinlösung sowie der Reservoir-Lösung auf 3 µl und dem Verkleinern des Gasraumes zwischen Tropfen und Reservoir wurde ein idealer Konzentrations-Zeit-Verlauf erreicht, der zur Bildung von Einkristallen führte. Die gewachsenen Kristalle wiesen alle weitestgehend eine flache rechteckige Form (Abb. 4.2.2.) auf mit Größen zwischen 100-200 x 50 x 10 µm. Alle einheitlich gewachsenen Einkristalle wurden zur Röntgenstruktur-Analyse bei DESY vermessen. Die Kristalle erwiesen sich auch hier äußerst empfindlich gegenüber Pufferwechsel, was ihre Handhabung bei der Vorbereitung und während der Messung erschwerte. Die Analyse und die Auswertungen der Daten wurden von Dr. Markus Perbandt (FB Chemie, Abteilung Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg) durchgeführt.

4.2.5. Strukturanalyse der *OvGST1*

Die Messdaten der nativen *OvGST1*-Kristalle ließen keine vollständige Strukturanalyse zu. Das Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse erschwerte das Entschlüsseln der Kristallstruktur. Durch isomorphen Ersatz sollten die fehlenden Phasen ermittelt werden. Diese Methode basiert auf der Messung mehrerer Kristalle, die sich durch Inkorporation von Schweratomen oder Inhibitoren unterscheiden. Die Differenz der nativen Struktur und der Schweratome bzw. Inhibitoren enthaltenden Struktur reicht aus, um das Phasenproblem zu lösen und die Struktur zu errechnen. Die Ko-Kristallisation der *OvGST1* mit den GSH-Derivaten Brombenzyl-GSH und dem Ethacrynsäure-GSH-Konjugat führte zu keinem Erfolg. Von den sechs verschiedenen Ansätzen der Ko-Kristallisation mit Schweratomen ergaben nur die Ansätze mit Gold (III)-Chlorid messbare Kristalle, die jedoch nicht bei der Lösung des Phasenproblems halfen.

Um das Phasenproblem zu umgehen, kann auch die Methode des molekularen Ersatzes (molecular replacement) Verwendung finden. In diesem Fall muss bereits eine ähnliche Kristallstruktur zur Verfügung stehen. Basierend auf den Atomkoordinaten dieser Kristallstruktur lassen sich die fehlenden Koordinaten berechnen. Hier kam als einzige Kristallstruktur die Prostaglandin D-Synthase der Ratte (PD: O35543, Kanaoka *et al.*, 1997) in Frage, die eine Sequenzidentität von 37 % zur *OvGST1* aufweist. Trotz der vergleichbar geringen Übereinstimmung konnte so die Struktur der *OvGST1* ermittelt werden. Das auf dem Sequenzvergleich beruhende Modell der computergestützten Analyse wurde von Dr. Markus Perbandt durchgeführt (siehe Diskussion).

4.2.6. Primär- und Sekundärstrukturanalyse der *OvGST1*

Die *OvGST1* wird der Sigma-Klasse zugeordnet. Ein Aminosäure-(AS)-Sequenzvergleich zeigt Ähnlichkeiten mit der Sigma-Klassen-GST vom Tintenfisch, aber auch große Übereinstimmungen mit der hämatopoetischen Prostaglandin D2-Synthase der Ratte (hPGDS, PD: O35543, Kanaoka *et al.*, 1997). Mittels Clustal W-Methode (<http://searchlaucher.bcm.tmc.edu/>) wurde ein multipler Sequenzvergleich durchgeführt (Thompson *et al.*, 1994). Abbildung 4.2.3. zeigt einen AS-Sequenzvergleich der *OvGST1* mit der hPGDS der Ratte sowie zweier GSTs der Sigma-Klassen von *C. elegans* (*CeGST11*, PD: Q21945 und *CeGST5*, PD Q095696,

(β 1 bis β 4) der hPGDS der Ratte. Die gepunkteten Linien markieren die β -Faltblattstrukturen, die durchgezogenen Linien die α -Helices. Die schwarzen Punkte markieren die AS der PDGS der Ratte, die mit GSH interagieren (Kanaoka *et al.*, 1997).

Ein signifikanter Unterschied der beiden Sekundärstrukturen kann in dem Bereich der Domäne 2 beobachtet werden, der die alpha-Helices 4, 5 bzw. 6 umfasst. Hier sind bei der *OvGST1* zwei α -Helices anstelle von einer (PDGS der Ratte) zu erkennen. Diese Domäne ist verantwortlich für die Ausbildung der hydrophoben Bindungstasche und damit für die Substratspezifität der GST.

Die endgültigen Ergebnisse zur dreidimensionalen Struktur sind bis zu dem jetzigen Zeitpunkt nicht abgeschlossen, werden aber in der Diskussion angesprochen.

4.2.7. Kristallisation der *rOvGST2*

Die Vorgehensweise der Kristallisation der *rOvGST2* entsprach der der *OvGST1*. Von der *rOvGST2* sollten jedoch zwei Kristallkomplexe mit GSH bzw. mit dem kompetitiven Inhibitor S-Hexylglutathion gebildet werden. Dies ermöglichte eine exaktere Charakterisierung der GSH-Bindungstasche. Zunächst wurde der *OvGST2*-Glutathion-Komplex mit einer Konzentration von 6 mg/ml, 7,9 mg/ml und 10 mg/ml eingesetzt. Nach Gebrauch der Kristallisations-Kits „Crystal Screen I“ und „Crystal Screen II“ entstanden innerhalb einer Woche bei 16 °C folgenden Kristalle (Tab. 4.2.2., Tab. 4.2.3., Tab. 4.2.4.):

Tab. 4.2.2. Kristallisationsbedingungen mit 6 mg/ml Proteinkonzentration

Pufferbedingungen	Kristalle
0,2 M Ammonium-Acetat 0,1 M Natrium-Acetat-trihydrat pH 4,6 30 % w/v PEG 4000	sternchenförmige Kristalle
0,2 M Natrium-Acetat-trihydrat 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 30 % w/v PEG 4000	lange, spitze Kristalle
0,2 M Natrium-Acetat-trihydrat 0,1 M Natrium-Cacodylat pH 6,5 30 % w/v PEG 8000	flache, lange Kristalle
0,1 M tris-Natrium-Citrat-dihydrat pH 5,6 20 % v/v Isopropanol 20 % w/v PEG 4000	viele, kleine Kristalle
0,1 M HEPES-Na pH 7,5 10 % v/v Isopropanol 20 % w/v PEG 4000	lange, spitze Kristalle
0,1 M HEPES-Na pH 7,5 20 % w/v PEG 10 000	flache, längliche Kristalle

Kristallwachstum unter verschiedenen Pufferbedingungen bei einer Proteinkonzentration der rO₁GST2 von 6 mg/ml nach Verwendung der Kristallisations-Kits „Crystal Screen I“ und „Crystal Screen II“ mit Kurzbeschreibung der Kristallform.

Tab. 4.2.3. Kristallisationsbedingungen mit 7,9 mg/ml Proteinkonzentration

Pufferbedingungen	Kristalle
0,2 M Natrium-Acetat-trihydrat 0,1 M Tris HCl pH 8,5 30 % w/v PEG 4000	viele verzweigte, lange, spitze Kristalle
0,2 M Natrium-Acetat-trihydrat 0,1 Natrium-Cacodylat pH 6,5 30 % w/v PEG 8000	flache, lange Kristalle
0,1 M HEPES Na pH 7,5 10 % v/v Isopropanol 30 % w/v PEG 4000	lange spitze „Bündel“-Kristalle
0,1 M HEPES Na pH 7,5 20 % w/v PEG 10 000	viele verzweigte, lange, flache Kristalle

Kristallwachstum unter verschiedenen Pufferbedingungen bei einer Proteinkonzentration der rO₁GST2 von 7,9 mg/ml unter Verwendung der Kristallisations-Kits „Crystal Screen I“ und „Crystal Screen II“ mit Kurzbeschreibung der Kristallform.

Tab. 4.2.4. Kristallisationsbedingungen mit 10 mg/ml Proteinkonzentration

Pufferbedingungen	Kristalle
0,2 M Ammonium-Acetat 0,1 M Tris Natrium-Citrat-dihydrat pH 5,6 30 % w/v PEG 4000	blumenförmige Kristalle
0,2 M Ammonium-Acetat 0,1 M Natrium-Acetat-trihydrat pH 4,6 30 % w/v PEG 4000	lange, stäbchenförmige Kristalle
0,05 M Mono-Kalium-dihydrogen Phosphat 20 % w/v PEG 8000	dünne, lange, spitzenförmige Kristalle
0,1 M MES ph 6,5 12 % w/v PEG 20 000	blumenförmige Kristalle
0,1 M HEPES-Na pH 7,5 20 % w/v PEG 10 000	blumenförmige Kristalle

Kristallwachstum unter verschiedenen Pufferbedingungen nach Verwendung des Kristallisations-Kits „Crystal Screen I“ und „Crystal Screen II“ bei einer Proteinkonzentration der rO₁GST2 von 10 mg/ml mit Kurzbeschreibung der Kristallform.

Die oben aufgeführten Ergebnisse dienten als Basis für weitere Optimierungsschritte. Die Bildung blumenförmiger Kristalle und viel-verzweigte „Bündel“ bei einer Proteinkonzentration von 7,9 und 10 mg/ml deuteten auf ein zu schnelles Kristallwachstum aufgrund zu hoher Proteinkonzentration hin. Daher wurden alle weiteren Ansätze mit 6 mg/ml rO₁GST2 durchgeführt.

Es zeigte sich, dass bei Anwesenheit des Präzipitats PEG 4000 bei einer Konzentration von 20 bzw. 30 % viele Kristalle wuchsen. Daher wurden diese Bedingungen als Basis

für weitere Optimierungen verwendet. Zunächst wurden die PEGs der Firmen Fluka, Merk, Serva und Sigma variiert. Konzentrationen von 16 bis 25 % (w/v) PEG 4000 bzw. 3350 (Sigma) wurden in 2 % Schritten mit konstanter Konzentration von 0,1 M HEPES Na pH 7,5 und 10 % (v/v) Isopropanol angesetzt. In den meisten Ansätzen entstanden viele kleine bis nadelförmige Kristalle, die ein sehr uneinheitliches Wachstum aufwiesen. Nur bei Anwesenheit von PEG 3350 von Sigma wuchsen einheitlich Kristalle mit konstanter Form. Dieses PEG wurde für die weitere Optimierung verwendet. Ideale Konzentrationen des PEG 3350 lagen zwischen 24 und 25 % (w/v). Dabei wurden zwei verschiedene Kristallmorphologien erzielt. Der Kristalltyp I wuchs in schmalen Platten mit einer Größe von 200 x 50 x 10 μm . Bei dem Typ II handelte es sich um Kristalle mit flacher, länglicher Gestalt und einer Größe von 400 x 20 x 20 μm .

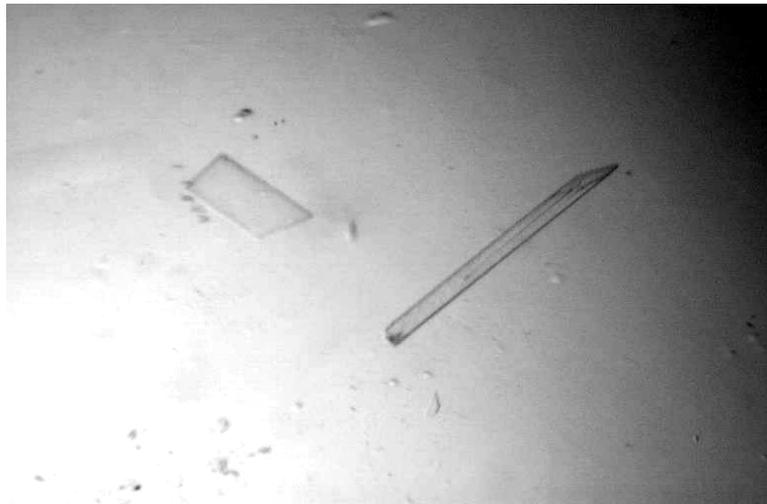


Abb. 4.2.4. Kristalle der *Oι*GST2 in zwei Formen

Die *rOι*GST2 wurde nach Aufreinigung über eine GSH-Sepharose in 15 mM GSH und 50 mM Tris HCl pH 8,0 eluiert. In den Prozess der Kristallisation wurde eine Proteinkonzentration von 6 mg/ml zusammen mit 0,1 M HEPES pH 7,5, 10 % v/v Isopropanol und 24-25 % w/v PEG 3350 von Sigma in einem Tropfenverhältnis von 2 μl : 2 μl eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 16°C inkubiert und nach 2 bis 3 Tagen wurden zwei Kristallformen verifiziert. Der quadratische Kristall der *rOι*GST2 zeigte die Raumgruppe $P2_12_12$ und der längliche Kristall die Raumgruppe $P2_1$.

Die Kristallisation des *Oι*GST2-S-Hexylglutathion-Komplexes fand unter identischen Bedingungen statt (siehe oben). Nach drei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur (16 °C) entstanden flache, längliche Kristalle, die optisch dem Kristall-Typ II des *Oι*GST2-GSH-Komplexes ähnelten.

4.2.8. Strukturanalyse des OvGST2-GSH-Komplexes

Die zwei gebildeten Kristallformen der OvGST2 zeigten unterschiedliche Beugungsgrade. Die Diffraktion des Kristalltyps I hatte eine Auflösung von 2,6 Å; die des Kristalltyps II eine von 1,5 Å. Die Analyse der Diffraktionsdaten zeigte, dass die zwei Kristalltypen unterschiedlichen Raumgruppen angehörten. Dies ist ein recht ungewöhnlicher Befund. Der Typ I gehört zur Raumgruppe $P2_12_12$ mit Einheitszellen-Parametern von: $a = 112.6$, $b = 84.3$, $c = 45.1$ Å. Der Typ II gehört zur Raumgruppe $P2_1$ mit einer Einheitszelle mit den Maßen: $a = 51.6$, $b = 82.3$, $c = 56.7$ Å, $\beta = 95.89^\circ$. In der Tabelle 4.2.5. ist die Statistik der gesamten Datensammlung der zwei verschiedenen Kristalltypen der OvGST2 dargestellt.

Tab. 4.2.5. Röntgendiffraktionsdaten des OvGST2-GSH-Komplexes

Parameter	Daten Typ I	Daten Typ II
Synchrotron-Strahlung	DESY/HASYLAB, Germany (Consortium Beamline X13)	DESY/HASYLAB, Germany (Consortium Beamline X13)
Detektor	MAR CCD, 165 mm	MAR CCD, 165 mm
Wellenlänge (Å)	0,8030	0,8046
Temperatur (K)	100	100
Raumgruppe	$P2_12_12$	$P2_1$
Parameter der Einheitszelle (Å, °)	$a = 112.6$, $b = 84.3$, $c = 45.1$	$a = 51.6$, $b = 82.3$, $c = 56.7$, $\beta = 95.89$
VM-Wert (Å ³ Da ⁻¹)	2.1, ein Dimer pro AU	2.4, ein Dimer pro AU
Auflösung (Å)	50 – 2.6 (2.65 – 2.6)	50 – 1.5 (1.53 – 1.5)
Gesamtzahl Reflexe	209776	603865
Einzelne Reflexe	13970	76005
R _{symm} (%)	8.4 (37.1)	12.8 (38.3)
Vollständigkeit (%)	99.6 (99.1)	98.2 (96.3)

Beide Kristalltypen ordnen sich in einer für GSTs typischen dimeren Struktur an, zeigen aber eine asymmetrische Einheit. Die hochauflösende Struktur des Kristallstyps II diente der genauen Strukturanalyse, die ebenfalls von Dr. Markus Perbandt durchgeführt wurde.

4.2.9. Strukturanalyse des OvGST2-S-Hexylglutathion-Komplexes

Die Analyse der dreidimensionalen Struktur des Kristalls des OvGST2-Komplexes mit Integration des kompetitiven Inhibitors S-Hexylglutathion fand bei einer Auflösung von 1,8 Å statt und ordnete den Komplex in die Raumgruppe $P2_1$ ein. Die Parameter der

Raumgruppe sind: $a = 51,9$; $b = 82,0$; $c = 107,11$ Å. Die Statistik der gesammelten Daten ist in der Tabelle 4.2.6. dargestellt.

Tab. 4.2.6. Röntgendiffraktionsdaten des O ν GST2-S-Hexylglutathion-Komplexes

Parameter	Daten
Synchrotron-Strahlung	DESY/HASYLAB, Germany (Consortium Beamline X13)
Detektor	MAR CCD, 165 mm
Wellenlänge (Å)	0,8046
Temperatur (K)	100
Raumgruppe	$P21$
Parameter der Einheitszelle (Å, °)	$a = 51.9, b = 82.0, c = 107.11, \beta = 91.2$
VM-Wert (Å ³ Da ⁻¹)	2.36
Auflösung (Å)	20 – 1.8
Gesamtzahl Reflexe	603865
Einzelne Reflexe	76005
R _{symm} (%)	12.8 (38.3)
Vollständigkeit (%)	98.2 (96.3)

Obgleich die Kristalle mit integriertem GSH und S-Hexylglutathion dieselben Raumgruppen bilden, zeigen sie unterschiedliche Einheiten. Sie bilden zwar beide eine für alle zytosolischen GSTs typische dimere Form, der O ν GST2-GSH-Komplex bildet jedoch eine asymmetrische Einheit aus einem Dimer, wohingegen der O ν GST2-S-Hexylglutathion-Komplex eine asymmetrische Einheit aus zwei Dimeren zeigt. Ansonsten konnte kein signifikanter Unterschied in der Tertiärstruktur beider Komplexe festgestellt werden. Anscheinend haben die beiden Liganden keinen Einfluss auf die Kristallbildung, da sie nicht bei der Anordnung der Kristallstruktur involviert sind. Die Ergebnisse der Kristallstruktur der O ν GST2 sind in den Veröffentlichungen von Höppner *et al.* 2004 und Perbandt *et al.* 2005 detailliert dargestellt.

4.2.10. Primär- und Sekundärstrukturanalyse der O ν GST2

Mit der AS-Sequenz der O ν GST2 wurde mittels der Clustal W-Methode (<http://searchlaucher.bcm.tmc.edu/>) ein multipler Vergleich durchgeführt (Thompson *et al.*, 1994). Eine hohe Übereinstimmung der O ν GST2-Sequenz konnte mit Sequenzen anderer GSTs der Pi-Klasse gezeigt werden. In der Abbildung 4.2.5. ist ein AS-Sequenzvergleich der O ν GST2 (PD: P46427, Salinas *et al.*, 1994) mit Sequenzen der Pi-Klassen GSTP1 von *C. elegans* (PD: P10299, Weston *et al.*, 1989) und der humanen Plazenta GSTP1 Pi-Klassen (PD: P09211, Kano *et al.*, 1997) aufgeführt. Die Sequenz

von *C. elegans* ist zu 60 % identisch mit der Sequenz von *O. volvulus*. Die Sequenzidentität der humanen GSTP1 zur *OvGST2* beträgt 42 %. Die schwarz unterlegten Aminosäuren stellen die konservierten Bereiche der GSTs dar, wohingegen die grauen die homologen AS-Austausche zeigen. Die markierten Bereiche der Sekundärstruktur basieren auf der Röntgenstrukturanalyse der *OvGST2*. Sie zeigen ebenfalls die für alle GSTs typische $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ -Struktur.

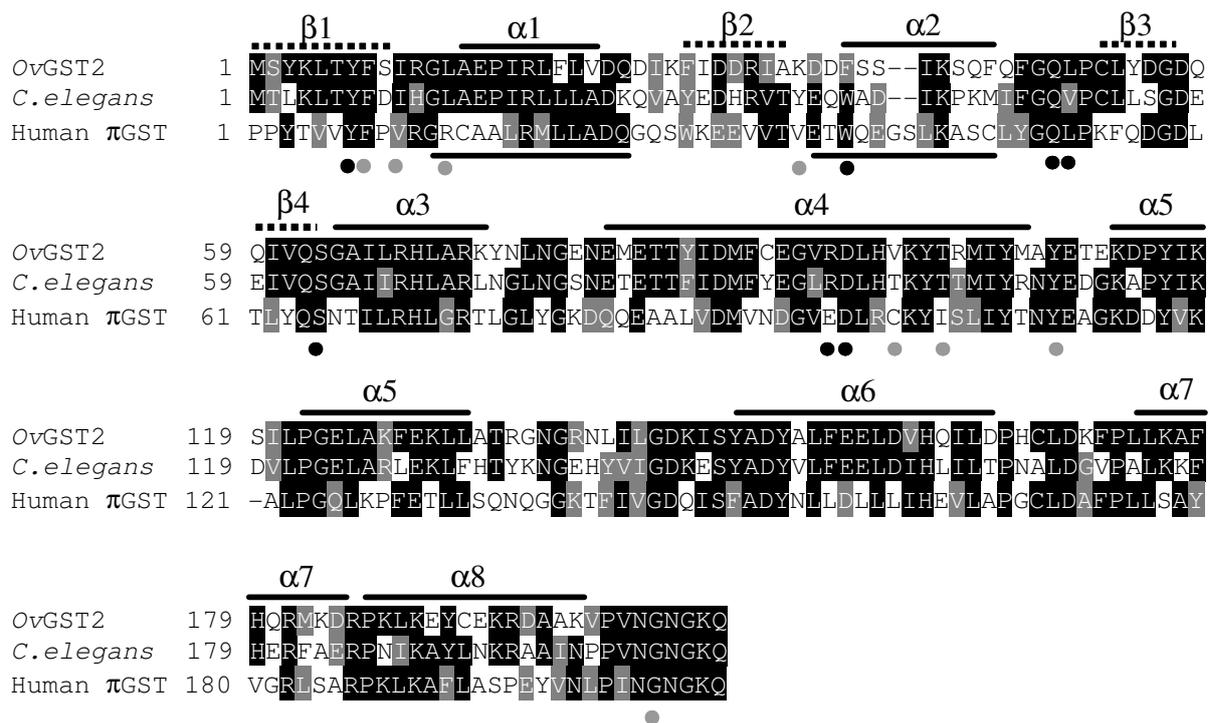


Abb. 4.2.5. Sequenzvergleich der *OvGST2* mit homologen GSTs

Die AS-Sequenz der *OvGST2* (PD: P46427) wurde verglichen mit den AS-Sequenzen der Pi-Klassen GST von *C. elegans* (GSTP1, PD: P10299) und der Pi-Klassen GST der humanen Plazenta GST (GSTP1, PD: P09211). Der Vergleich wurde mit dem Clustal W-Algorithmus durchgeführt. Die übereinstimmenden, konservierten Bereiche sind schwarz, die homologen AS-Austausche zwischen den Proteinen sind grau unterlegt. Die Sekundärstruktur zeigt die α -Helices ($\alpha 1$ bis $\alpha 8$) und β -Faltblattstruktur ($\beta 1$ bis $\beta 4$) der *OvGST2*. Die gepunkteten Linien markieren die β -Faltblattstrukturen, die durchgezogenen Linien die α -Helices. Die abweichenden Sekundärstrukturen der humanen GST zur *OvGST2* sind unterhalb der Sequenz gezeigt. Die schwarzen Punkte markieren die Aminosäuren der *OvGST2*, die zu S-Hexylglutathion Wasserstoffbrücken ausbilden. Die grauen Punkte markieren die Aminosäuren die hydrophobe Interaktionen zu S-Hexylglutathion zeigen.

Der größte Unterschied zwischen der humanen Pi-Klassen GST und der *OvGST2* konnte in den Regionen 29-42, 124-146 und 192-201 beobachtet werden. Die Region 29-42 umfasst die Betafaltblattstruktur $\beta 2$ und die Alpha-helix $\alpha 2$. Hier kommt es bei der humanen GST zu einer Insertion von zwei Aminosäuren (40 und 41). Der Austausch der Aminosäuren, die für die Ausbildung der Substratbindungstasche verantwortlich

sind, insbesondere an der Position Leu13/Arg13, führen bei der *OvGST2* im Vergleich zur humanen Sigma-Klassen GST zu einer weiter geöffneten hydrophoben Bindungstasche (H-Stelle).

4.3. Charakterisierung der *OvGST3*

Die *OvGST3* wurde ursprünglich durch „Differential Display“ RT-PCR entdeckt, bei der nach differenziell exprimierten Genen in *O. volvulus* unter Einfluss von oxidativem Stress gesucht wurde. Die Stressantwort, unter anderem hervorgerufen durch Xanthin-Xanthinoxidase, zeigte nach semi-quantitativer RT-PCR-ELISA eine bis zu 125fache Induktion (Liebau *et al.*, 2000). Dies deutete auf eine wichtige Funktion bei der Verteidigung gegen toxische Oxidantien hin, die unter anderem während der Immunantwort des Wirts auf den Parasiten einwirken. Die vollständige cDNA-Sequenz wurde nach der Analyse einer Phagenbank von *O. volvulus* erhalten. Es wurden drei verschiedene Transkripte der Größe 265, 224, 171 bp isoliert, alles Produkte von alternativen Spleißprozessen (Sommer *et al.*, 2001).

4.3.1. Primär- und Sekundärstrukturanalyse der *OvGST3*

Ein Vergleich der AS-Sequenz der *OvGST3* zu anderen GST-Sequenzen (BLASTN: www.searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/nucleic_acid-search.html) zeigt, dass die *OvGST3* der Omega-Klasse angehört. Ein Sequenzvergleich des offenen Leserahmens der *OvGST3* mit dem der humanen Omega-GST (GSTO1-1, PD: AL139341; Yu *et al.*, 2004) und der homologen Omega-GST von *C. elegans* (C29E-4.7, PD: L23651; Wilson *et al.*, 1994) ergibt, dass der übereinstimmende Bereich erst ab der AS-Position 32 beginnt (Abb. 4.3.1.). Die Analyse dieses N-terminalen Bereiches (AS 1-50) mit dem Programm SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/Services/SignalP-2.0/>) führte zur Identifizierung eines potenziellen Signalpeptids. Die ermittelte Spaltstelle liegt zwischen den Aminosäuren A20 und I21. Ein potenzielles Signalpeptid weist auf eine extrazelluläre Lokalisation der *OvGST3* hin. Dieses konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Das Alignment der *OvGST3* mit den AS-Sequenzen der Omega-GST des Menschen und von *C. elegans* in Abbildung 4.3.1. zeigt die konservierten Aminosäuren und die

homologen AS-Austausche. Mit Ausnahme der ersten 30 Aminosäuren besteht eine hohe Ähnlichkeit im N-terminalen Bereich (Domäne I) der Proteine. Die *Ov*GST3 hat eine 31%ige Identität zur *C. elegans*-Sequenz und eine 29%ige zur humanen Sequenz. Die Sequenzen C29E-4.7 und GSTO1-1 untereinander haben eine Identität von 32 %.

In Abbildung 4.3.1. sind die Bereiche der Sekundärstruktur der humanen Omega-GST basierend auf einer Röntgenstrukturanalyse (Board *et al.*, 2000) und die theoretisch berechnete Sekundärstruktur der *Ov*GST3 aufgeführt (Sommer, 2000). Beide Strukturen zeigen vier β -Faltblattstrukturen und zehn α -helikale Bereiche. In der Domäne I beider Proteine ist das für alle GSTs charakteristische $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ -Motiv konserviert. Die N-terminalen Bereiche (Domäne II) bestehen ausschließlich aus α -Helices, ein charakteristisches Merkmal der GSTs.

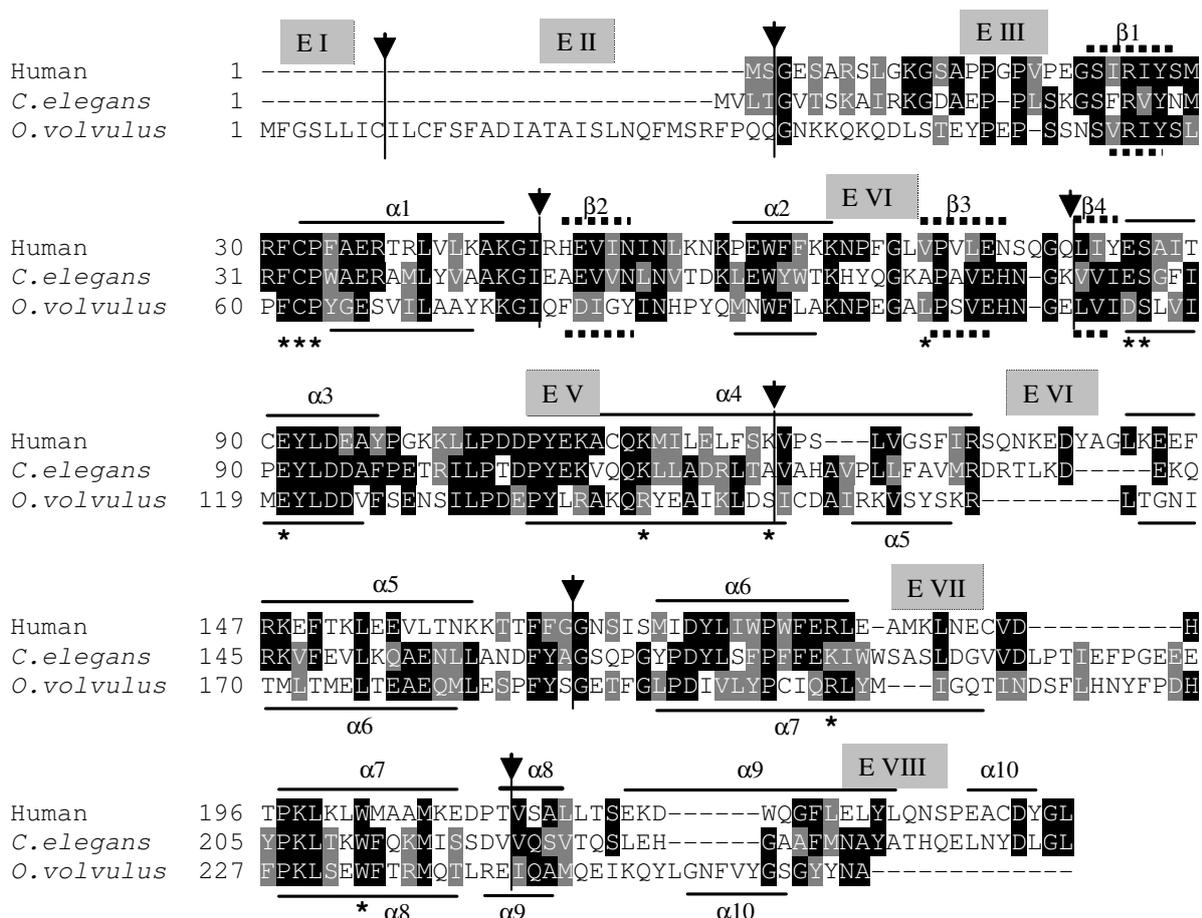


Abb. 4.3.1. Vergleich der AS-Sequenz der *Ov*GST3 mit homologen GSTs

Der Vergleich der *Ov*GST3 mit den AS-Sequenzen der Omega-GST des Menschen (PD: AL139341) und *C. elegans* (PD: L23651) zeigt die konservierten Aminosäuren (schwarz unterlegt) und die homologen AS-Austausche (grau unterlegt). Oberhalb der Sequenz ist die Sekundärstruktur der humanen Omega-GST basierend auf einer Röntgenstrukturanalyse dargestellt, unterhalb die der theoretisch berechneten Sekundärstruktur der *Ov*GST3. Die für die GSH-Bindung essentiellen

Aminosäuren sind im Alignment durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet. Die Pfeile markieren die Exon-Intron Grenzen der *O. volvulus*-Sequenz, die Exons sind durch graue Kästen mit E I bis E VIII gekennzeichnet.

Die Bereiche der Sekundärstrukturen unterscheiden sich in der Domäne I nur geringfügig und variieren nur in ihren Größen. In der Domäne II hingegen wird die vierte α -Helix bei *O. volvulus* voraussichtlich in zwei unterteilt, wohingegen es bei der humanen Omega-GST am C-terminalen Ende zu der weiteren Ausbildung einer Helix-Struktur kommt.

Die für die GSH-Bindung essentiellen Aminosäuren sind im Alignment durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet. Eine zentrale Rolle spielt das Cystein der ersten α -Helix an Position-23 (C62 in der *OvGST3*) in Verbindung mit den benachbarten Phenylalanin (F31) und Prolin (P33). Dieses N-terminale Cystein hat im hoch konservierten „FCP“-Motiv des Thioredoxins und Glutaredoxin eine essentielle Bedeutung für deren S-Thioltransferaseaktivität. Dieses „FCP“-Motiv ist auch in dem Sequenzvergleich der Omega-GSTs zu finden und erklärt die S-Thioltransferaseaktivität der GSTO1-1 des Menschen bzw. der Omega-GST von *C. elegans*.

Die Röntgenstrukturanalyse der humanen GSTO1-1 zeigt, dass zwei Aminosäuren die Beschaffenheit der Substratbindungstasche entscheidend beeinflussen: zum einen das Tryptophan an Position 222 und zum anderen das Arginin an Position 183, welches auch an äquivalenter Position (R206) in der *OvGST3* konserviert ist. Sie führen zu einer wenig hydrophoben Tasche. Andere Komponenten führen bei der GSTO1-1 zu einer großen, zur Oberfläche hin offenen Substratbindungstasche. Dies lässt vermuten, dass Substrate der *OvGST3* ungewöhnlich groß sein können.

Die *OvGST3* wurde zunächst auf cDNA-Ebene weiter untersucht. Die verschiedenen Transkripte der *OvGST3* wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert, um die *OvGST3* unter anderem funktionell näher charakterisieren zu können.

4.3.2. Analyse der cDNA der *OvGST3*

Der Genbereich der *OvGST3* beträgt 1038 bp und beinhaltet 8 Exons und 7 Introns. In der Abbildung 4.3.2. ist die Nukleotidsequenz mit den Intron/Exon-Bereichen aufgeführt. Die Introns sind in kursiven Kleinbuchstaben geschrieben und unterhalb der farbige unterlegten Exonbereiche ist die abgeleitete AS-Sequenz dargestellt.

Die Befunde von Sommer (2000) dreier durch alternative Spleißprozesse entstandener Transkripte konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass im alternativen Spleißprozess nicht nur das Exon V (hellgrau) sondern auch das Exon IV (grün) beteiligt ist (siehe Abb. 4.3.2.). Ein Fehlen des Exons V führt zum Verlust der Helix 4 und für die GSH-Bindung essentiellen Aminosäuren. Die GSH-Bindung wäre wesentlich schwächer oder würde ganz fehlen und die Funktionsweise damit geändert. Ein Fehlen des Exons IV führt zum Verlust der Faltblattstruktur β 2 und β 3 sowie der Helix 2. Werden beide Exons gespleißt entsteht ein Transkript, das außer dem „FCP“-Motiv des Thioredoxins bzw. Glutaredoxins keine weiteren AS-Reste besitzt, die bei der GSH-Bindung beteiligt sind. Die Substratbindungstasche würde jedoch unbeeinflusst bleiben.

Anders verhält es sich bei dem nachgewiesenen cDNA-Fragment, bei dem es aufgrund des transkribierten Introns V (dunkelgrau) zu einer frühzeitigen Unterbrechung aufgrund der Ausbildung eines Stopcodons (rot markiert) an Position 517-519 des offenen Leserahmens kommt. Die GSH-Bindungsstelle wird vollständig transkribiert, die Substratbindungstasche jedoch nicht. Diese Spleißvariante konnte bei über fünf der isolierten cDNA-Fragmente nachgewiesen werden und führt zu einem nur 171 bp langen Transkript.

All diese Spleißvarianten konnten ohne Signalpepidsequenz in *E. coli* exprimiert werden, wurden jedoch alle von dem prokaryotischen System in „inclusion bodies“ eingeschlossen und konnten nicht in nativer Form hergestellt werden.

5'-Ende

gccatgcatcacattctgagcattccaatgccagtggtcacatttttatgacattctctttt
 tcaatttcttgaaaaattgcaataccttttacaataaatagcatgaaacttaatgaaataaa
 acgattcacaaaagcttctattatggtttgagttgcttctttcttcaaatgattggtgcct
 ttattaaaaaaaaaaaaaagaacccaaaactatcattttgagagaaagcctttatagaccatta
 tagcaaggagcattttattataaattttaaaaaataaataatttttatggtgtaaatattt
 tttcttgtaacgtcattggtgacatcgctatacaaggatcgttctggttcttgacttctt
 cctgcaatcgaattgctactgcgcaactatttgcacctggttagctgataaatattactgtac
 gaca**ATG TTT GGC TCA TTA TTG ATA TGgt**aggtgatataaaaaatgtgtacattg
 M F G S L L I C

tggaacttgaattagattcgaataaatggtaaatatttcgattccaaaatcttcgatggttg
 ttgcagcttttcttaaggaaggaatattaatgatagactaaaagacatgaaggattgtggg
 aacgattcatcaattttatatttttctatcaaattttgattccatgatgttcacaaaatttt
 cgttaacactaatgagactatcttctatctgaaaaatacaatatacagaatgcaagaaacat
 agaataatattcttctgtagaaagaatgctggagaagccttttagatcttggttcttgacaatt
 tttatctttgttattctcatagaaaacaatttac**agC ATC CTG TGT TTC TCA TTC GC**
 I L C F S F A

A GAT ATA GCG ACA GCA ATC AGT CTA AAT CAA TTT ATG TCA AGA TTT
 D I A T A I S L N Q F M S R F

CCT CAA CAA Ggttggattqtattacaacacagaatatttttctagttcgtagacatcta
 P Q Q

aagtgggtgattttgttgcaaatattctataggatattatagaatcatatgtgtaatgtagtc
 ctaaagtataatattgttgccttggttttatcattgatattacctatcggttgcaattcagga
 agatccatctatcagccatagataacagtactatcttcatggcagtagacacttaacattttgc
 ataattgcatgaaaaaatatcaatggaggattttac**agGG AAT AAA AAG CAA AAG CA**
 G N K K Q K Q

A GAT TTG AGT ACA GAG TAT CCA GAA CCT TCA TCG AAC TCT GTC CGG
 D L S T E Y P E P S S N S V R

ATT TAT TCG CTG CCA TTT TGT CCG TAT GGT GAA AGT GTC ATC CTT GC
 I Y S L P F C P Y G E S V I L A

T GCG TAT AAA AAA GGC ATT CAgttagtcttttgaaatttaagcacgtgaaatgaa
 A Y K K G I Q

A Y K K G I H

ttatcaatattttgttaaatatttagttacaattcattgtcaacattgtcatttgcttca
ga TTT GAC ATT GGA TAT ATT AAT CAC CCA TAT CAA ATG AAC TGG TTT
 F D I G Y I N H P Y Q M N W F

CTC GCG AAG AAT CCT GAA GGG GCT CTA CCA GCT GTA GAA CAT AAT GG
 L A K N P E G A L P A V E H N G

A GAGgttcattgtataatcggatattttatatcaaaaagctgaaatcattttcacatgaggttt
 E

catgaaaaaagacaatgttaacttattttctaataatataatattgtacttttggaatca
 agccaaaacacgttgtgattagaattgagtaaatgggaattataaataatcggaggacacaag
 tcaatttttacgaaagacaaaaatataaaattac**agCTT GTG ATT GAC TCC CTA GTA**
 L V I D S L V

ATT ATG GAA TAT CTG GAT GAT GTG TTC TCG GAA AAC AGC ATT TTG CC
 I M E Y L D D V F S E N S I L P

C GAT GAA CCA TAT CTG AGA GCA AAG CAA CGA TAT GAG GCA ATT AAA
 D E P Y L R A K Q R Y E A I K

CTA GAT TCG gtg cgt cga tta gtt ttt aaa act tca tct atc cga ad
 L D S V R R L V F K T S S I R T

t ttt gat aat acc ttt cta tta tagATA TGT GAT GCA ATA CGG AAA
 F D N T F L L I C D A I R K

GTA TCA TAT TCA AAA AAG CTA ACT GGC AAT ATC ACC ATG CTT ACG AT
 V S Y S K K L T G N I T M L T M

G GAG CTT ACC GAG GCT GAA CAA ATG CTA GAA TCT CCT TTT TAT TCA
 E L T E A E Q M L E S P F Y S

Ggtttgacccttttttatttccggttctttattgctcacatttctgcaaaactgtccttctctt
 ttaggtcttcttctatttttatttacaacttcggtcccttatttctgatttaaattttatttt
 ataaatat**agGC GAA ACA TTC GGC TTG CCA GAT ATT GTC TTG TAT CCG T**
 G E T F G L P D I V L Y P

GT ATT CAA CGA TTA TAT ATG ATC GGA CAA ACC ATT AAC GAC AGT TTC
 C I Q R L Y M I G Q T I N D S F

CTT CAC AAT TAT TTC CCA GAT CAC TTT CCA AAA CTT TCA GAA TGG TT
 L H N Y F P D H F P K L S E W F

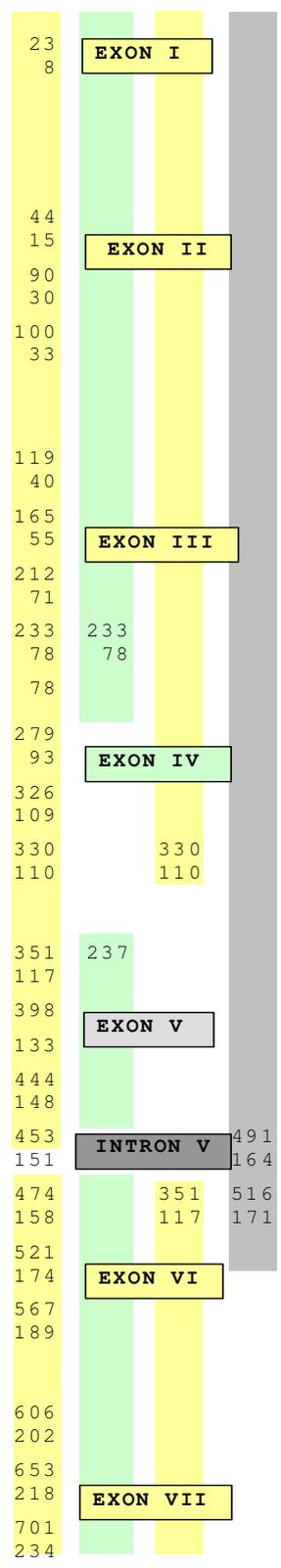




Abb. 4.3.2. Gensequenz der *OvGST3*

Die Nukleotidsäuresequenz des Gens der *OvGST3* mit resultierender AS-Sequenz. Die Exon-Bereiche sind gelb unterlegt und auf der rechten Seite in Kästchen mit Exon I bis VIII nummeriert, kursiv sind die Intron-Bereiche. Der alternative Spleißbereich ist mit grün (Exon IV), hell- (Exon V) und dunkelgrau (Intron V) unterlegt. Rot markiert sind die Stopcodons. Die links aufgeführten Farbbalken zeigen die durch alternatives Spleißen entstehenden Transkripte. Die Nukleotide bzw. Aminosäuren sind vom 5' Ende aus durchnummeriert.

In dieser Arbeit wurden weitaus mehr Transkripte der *OvGST3*, als die in der Einleitung beschriebenen Varianten, nachgewiesen. Der 5'- und 3'-Bereich der cDNA wurde mit der RACE-Methode bestimmt. Durch die Sequenzierung der 5'-RACE-Produkte konnte die Spliced Leader Sequenz SL1 (SL1: GGTTTAATTACCCAAGTTTGAG) am 5'-Ende einiger cDNA Sequenzen der *OvGST3* nachgewiesen werden. Es konnten fünf Stellen verifiziert werden, A, B, C, D und E, die alle genau an einer Intron/Exon-Grenze lagen. Eine Ausnahme stellt die Trans-Spleißstelle A dar, die dem 5'-Ende des Gens am nächsten liegt. Sie zeigt keine charakteristische AG-3'-Spleißstelle.

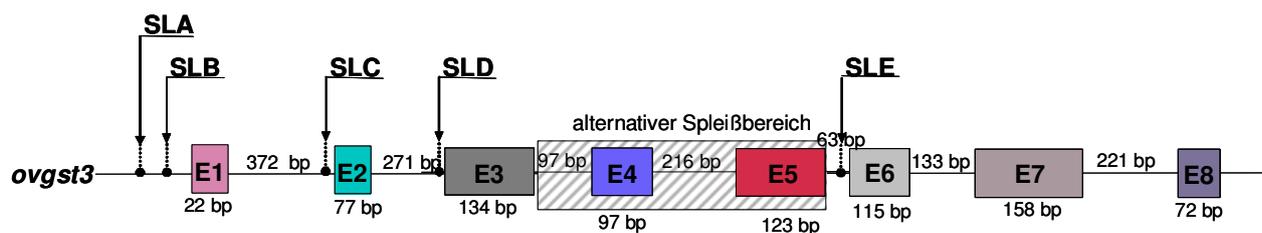


Abb. 4.3.3. Darstellung der Genstruktur der *OvGST3*

Farbige Kästchen stehen für die Exons (E) 1 bis 8, darunter die jeweilige Größe in Basenpaaren (bp). Die Verbindungslinien dazwischen zeigen die Introns mit Größenangabe in bp. Grau-gestreift unterlegt ist der Bereich des alternativen Spleißens. Die Pfeile SL A bis E zeigen die Initiationsstellen der Spliced leader (SL)-Sequenz an.

Der 3'-Bereich war weitestgehend einheitlich, nur ein sequenzierter Klon zeigte einen verlängerten 3'-Bereich. In Abbildung 4.3.3. ist die Genstruktur der *OvGST3* schematisch aufgeführt und die Spleißpositionen sind markiert.

Das Sequenzieren verschiedener Klone zeigte auf, dass neben den drei schon bekannten alternativen Spleißvarianten eine weitere zu finden war. Das Exon IV wurde in drei Fällen der sequenzierten Varianten nicht gelesen und führte ebenfalls zu einem frühzeitigen Translationsabbruch aufgrund eines entstandenen Stopcodons.

Nach Sequenzierung von über 40 Klonen wurden 14 Spleißvarianten gefunden. Die Initiationsstartpunkte des Trans-Spleißens führten zu fünf verschiedenen Varianten, die nochmals in ihrem alternativen Spleißbereich variierten. Das unterschiedliche Lesen der Exons IV und V, sowie die Anwesenheit oder Abwesenheit des Introns V ergaben schließlich die verschiedenen Spleißvarianten. Diese sind in Abbildung 4.3.4. schematisch dargestellt. Mit aufgeführt sind Bereiche, die voraussichtlich für ein potenzielles Signalpeptid kodieren, sowie für die Glutathion-Bindungstasche und die hydrophobe Substrat-Bindungstasche. Diese Annahme ist auf Sequenzvergleiche mit homologen Omega-GSTs verschiedener Organismen mit bekannter Proteinstruktur zurückzuführen.

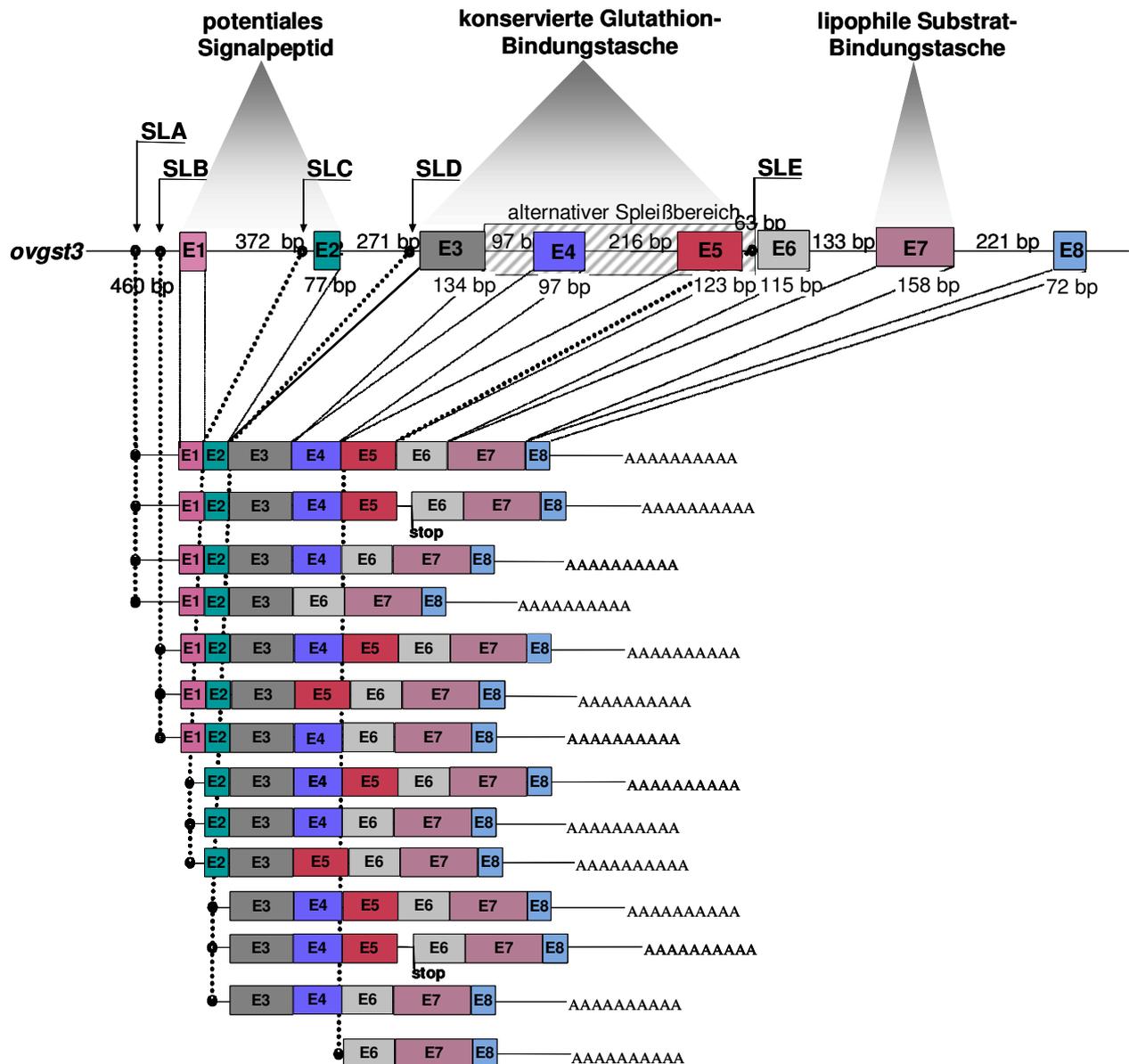


Abb. 4.3.4. Schematische Darstellung der Spleißvarianten

In der Abb. ist das Gen der *OVGST3* schematisch mit Exon- (Kästchen) und Intron-Bereichen (Linie) dargestellt; die Basenpaar (bp)-Anzahl der Exons (E) 1 bis 8 ist unten, die der Introns ist oben aufgezeigt. Der alternative Spleiß-Bereich ist grau unterlegt; die Pfeile markieren die Initiationsstellen der „Spliced Leader“ (SL)–Sequenzen A bis E. Die Linien führen zum Trans- bzw. Cis-Spleiß-Produkt, die zu den darunter dargestellte 13 weiteren Spleißvarianten führen.

Von den 14 vollständig durchsequenzierten Varianten wurde jeweils der offene Leserahmen (ORF) mit Hilfe des Computerprogrammes „Generunner“ (Version 3.05; 1994 Hasting Software) theoretisch erstellt. Die Initiationsstellen SLA und SLB führen zum ersten Startcondons (ATG) im Exon I und damit zur Translation der vollständigen Signalpeptidsequenz. Die Initiationsstelle SLC liegt zwischen der Intron I– und Exon II–Grenze. In diesem Fall liegt das gelesene M27 und der entstehende ORF führt zu einem unvollständigen Lesen des Exons II, ohne die potenzielle Signalpeptidsequenz.

Die Initiationsstelle SLD liegt zwischen dem Intron II und dem Exon III. Der Translationsstartpunkt liegt jedoch erst im Exon IV an Position M90. Der ORF liest nur für einen Teil der GSH-Bindungstasche. Der fünfte Initiationspunkt SLE liegt hinter dem Exon V und das gebildete Protein besitzt keine GSH-Bindungstasche. Die Translation beginnt mit dem M171 und führt zu einem unvollständigen Lesen des Exons VI mit nur einer Teilinformation der hydrophoben Bindungstasche.

4.3.3. Rekombinante Expression der *OvGST3*-Varianten

Die *OvGST3* sollte aus drei Gründen exprimiert werden:

1. Für die funktionelle Charakterisierung des Enzyms,
2. für die Kristallisation und Strukturanalyse und
3. für die Antikörperherstellung und anschließende Lokalisation der *OvGST3*.

Für die funktionelle und strukturelle Charakterisierung war es notwendig, ein natives Protein herzustellen. Dazu wurden zunächst nur zwei der 14 Spleißvarianten gewählt. Sie sollten nicht für die Signalpeptid-Sequenz kodieren, aber einmal die vollständige Glutathionbindungstasche (mit Exon IV und V) und einmal die unvollständige (ohne Exon V) kodieren. Diese Varianten hatten den Initiationsstartpunkt SLC und wurden daher als SLC1_7 (vollständig) und SLC2_2 (unvollständig) bezeichnet. Sie kodieren für ein 28,9 kDa (SLC1_7) und ein 22,8 kDa (SLC2_2) großes Protein und wurden zu Beginn der Expressionsversuche als pJC40-Konstrukt in verschiedenen *E. coli*-Zellen transformiert. Eine gute Expression wurde nur in BLRDE 3 Zellen erreicht (Abb. 4.3.5.).

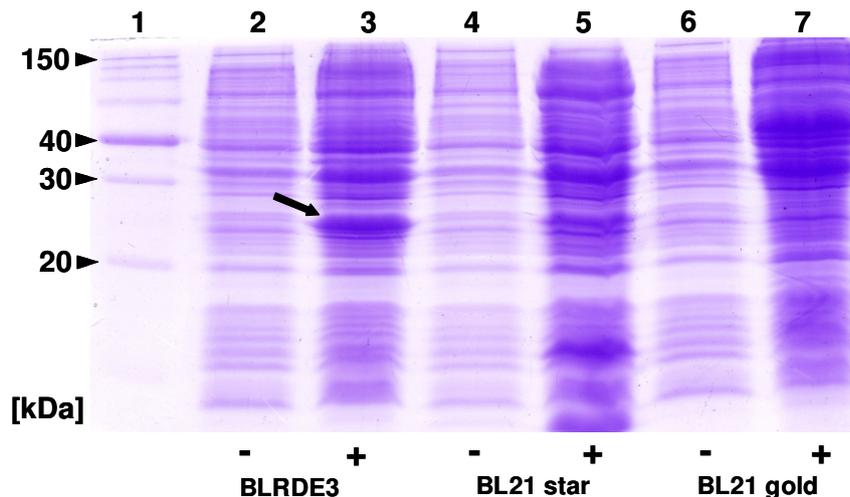


Abb. 4.3.5. Expressionsversuche des pJC40::SLC2_2-Konstrukts in *E. coli*

Proteinbandenmuster eines Coomassie-gefärbten SDS-Gels nach Expression des pJC40::SLC2_2-Konstrukts in verschiedenen *E. coli*-Zellen; nicht induzierte (-) und mit IPTG induzierte (+) Zellen. Spur 1: Proteinmarker, 2/3: Bandenmuster der BLRDE3-Zellen; 4/5: BL21 Star-Zellen; 6/7: BL21 gold-Zellen. Der Pfeil markiert in der Abbildung die Position der rekombinanten *OνGST3* SLC2-2 + His-Tag (22,8 + 3,4 kDa) im SDS-Gel.

Die *rOνGST3* beider Varianten konnte jedoch nicht als lösliches Protein hergestellt werden. Unabhängig von variierenden Konzentrationen des Induktors IPTG bzw. Expressionstemperaturen konnte das Protein nur in Einschlusskörpern („inclusion bodies“) nachgewiesen werden. Auch nach Verwendung von Reduktanten wie DTT und TritonX100 konnte das Protein nicht in Lösung gebracht werden. Erst unter denaturierenden Bedingungen (6 M Urea) konnten die Einschlusskörper aufgeschlossen und die *rOνGST3* aufgereinigt werden. Eine Rückfaltung des Proteins in die native und damit aktive Form durch langsames Verdünnen der Urea-Konzentration war leider nicht möglich.

Desweiteren wurde versucht, ein verkürztes Transkript der *OνGST3* in löslicher Form zu erhalten. Möglicherweise war die hydrophobe Substratbindungstasche verantwortlich für die Unlöslichkeit des Proteins. Basierend auf der SLC1_7-Variante wurde ein pJC40-Konstrukt hergestellt, welches später für die Antikörperherstellung verwendet wurde. Auch dieses Konstrukt (AK-SLC1_7) führte zu keinem nativen Protein. Wie in Abbildung 4.3.6. zu erkennen ist, befindet sich das Protein in der Pelletfraktion.

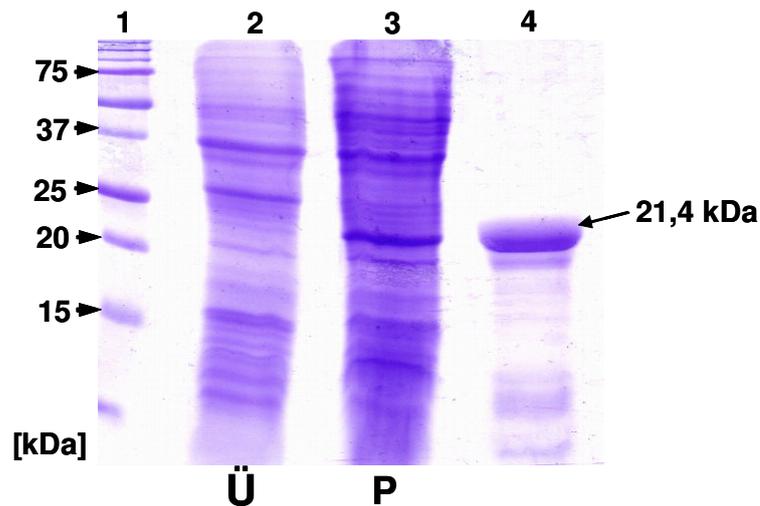


Abb. 4.3.6. Expression des Antikörperkonstrukts AK-SLC1_7

Proteinbandenmuster eines Coomassie-gefärbten SDS-Gels nach Expression des pJC40::AK-SLC1_7-Konstrukts in BLRDE3. 1: Proteinmarker; 2: 100 000 g Überstand; 3: Pelletfraktion; 4: AK-SLC1_7 nach Chromatographie-Aufreinigung. Der Pfeil markiert die Position bei 21,4 kDa der *rOvGST3* im Gel. Konstrukt + His-Tag (18 + 3,4 kDa).

Auch die Verwendung anderer Plasmide wie z.B. pASK-IBA2, -IBA6 von IBA führten zu keinem löslichen Protein. Ebenso erfolglos war der sehr zeitaufwendige Versuch, die *OvGST3* im eukaryontischen *Pichia*-System zu exprimieren.

Erfolgreich war hingegen die Expression der SLC1_7-Variante in BL21-Zellen im pMal CRI (c2x)-Vektor. Ein 42,6 kDa Maltose-bindendes Protein (MBP) wurde an den C-Terminus des gewünschten Proteins fusioniert. Aufgrund der stark hydrophilen Eigenschaft des MBPs lag dieses als Fusionsprotein mit der *OvGST3*-Variante frei im Zytosol vor. Der am C-Terminus des Zielproteins angehängte StrepTactin-Schwanz ermöglichte eine chromatographische Aufreinigung über StrepTactin. Ein anschließender Verdau mit dem Faktor Xa trennte die beiden Proteine, führte jedoch sofort zu einem Aggregieren und einem damit verbundenen Ausfällen der *OvGST3*. Durch Zugaben von lipidähnlichen Glykopyranosiden (GPyS) sollte ein Aggregieren der möglicherweise membranständigen *OvGST3* verhindert und so das Protein in Lösung gehalten werden. Dies hatte jedoch keinen positiven Effekt. Erst nach Zugabe von 1 % des Reduktionsmittels DTT zum Faktor Xa-Verdau konnte eine größere Menge an nativem Protein für einige Zeit (ca. 8 Std.) in Lösung gehalten werden, wobei die Protease-Aktivität jedoch stark behindert wurde (siehe Abb. 4.3.7.).

Trotz der löslichen Form des Proteins konnte keine Aktivität der *Ov*GST3 in unterschiedlichen enzymatischen Analysen nachgewiesen werden. Weder das unaufgereinigte Proteingemisch nach dem Protease-Verdau, noch die verdaute und anschließend aufgereinigte *rOv*GST3 wiesen GST-Aktivität auf. Aufgrund des fehlenden Nachweises einer Aktivität konnte die Funktion und die mögliche Aufgabe der *Ov*GST3 in *O. volvulus* nicht ermittelt werden. Ebenfalls war eine Kristallisation aufgrund der zu geringen Proteinmenge und fehlender Aktivität nicht möglich.

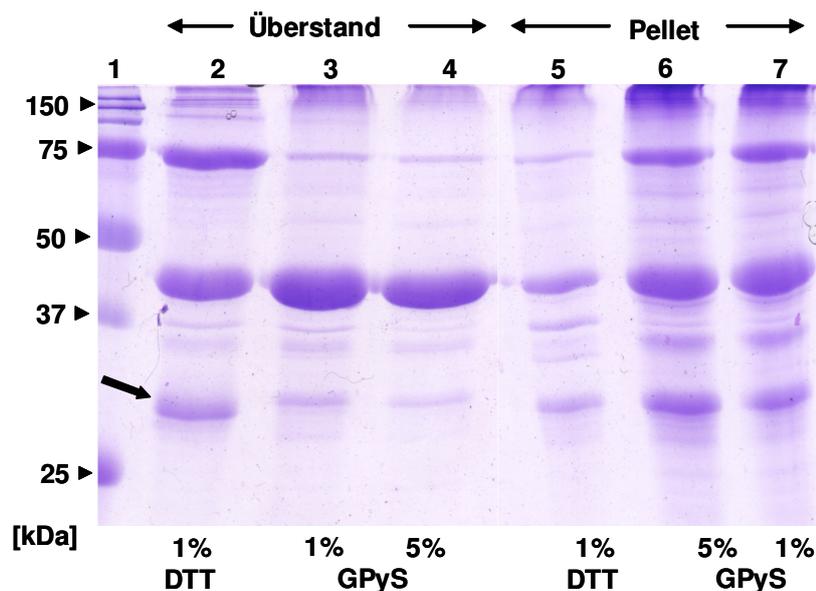


Abb. 4.3.7. pMal::SLC1_7 Expression nach Faktor Xa Verdau

Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der pMal::SLC1_7 Expression nach chromatographischer Aufreinigung über StrepTactin und anschließendem Faktor Xa-Verdau. In Spur 2 bis 4 ist nach 10 Min. Zentrifugation bei 1000 x g der jeweilige Überstand des Verdaus aufgetragen; in Spur 5 bis 7 sind nach Abnahme des Überstandes die jeweilige Pelletfraktion aufgetragen. Die oberste Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa zeigt das Fusionsprotein MBP/SLC1_7, die mittlere dicke Bande zeigt das MBP (42,7 kDa) und der Pfeil markiert die Position der rekombinanten *Ov*GST3 (28,9 kDa + 1,2 kDa Strep-Tag). 1: Proteinmarker; 2: löslicher Überstand mit 1 % w/v DTT; 3: löslicher Überstand mit 1 % Glykopyranisid (GPyS); 4: mit 5 % GPyS; 5: Pellet mit 1 % DTT; 6: Pellet mit 5 % GPyS; 7: Pellet mit 1 % GPyS.

4.4. Herstellung von Antikörpern gegen die *Ov*GST3

Für die Lokalisation der *Ov*GST3 in Paraffinschnitten von *O. volvulus* wurde zur Antikörperbildung ein Huhn mit dem AK-SLC1_7-Protein immunisiert. Der vom Huhn gebildete Antikörper wurde aus dem Hühnereidotter isoliert, aufgereinigt und für die Immundetektion eingesetzt. Zunächst wurde die Spezifität des Antikörpers überprüft. Für die Immunlokalisation der *Ov*GST3 wurden Paraffinschnitte von männlichen,

weiblichen Würmern und von Mikrofilarien eingesetzt. Zudem wurden Schnitte von weiteren *Onchocerca*- und verwandte Filarien-Arten sowie von Helminthen untersucht.

4.4.1. Das Antikörper-Konstrukt AK-SLC1_7

Für die Antikörperbildung gegen die *Ov*GST3 wurde das Antikörper-Konstrukt AK-SLC1-7 rekombinant im *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert. Das Vektor-Konstrukt AK-SLC1-7::pJC40 kodiert für ein ca. 18 kDa großes Protein, bestehend aus 159 Aminosäuren. Es beinhaltet die vollständige GSH-Bindungsstasche, jedoch nicht die mutmaßliche Signalpeptidsequenz und die 80 Aminosäuren am C-Terminus. Dieser mediane Bereich zeigte sich nach Analyse mit Hilfe des Programmes „bioinformatics“ (<http://bioinformatics.org>) als besonders protektiver Antigenbereich.

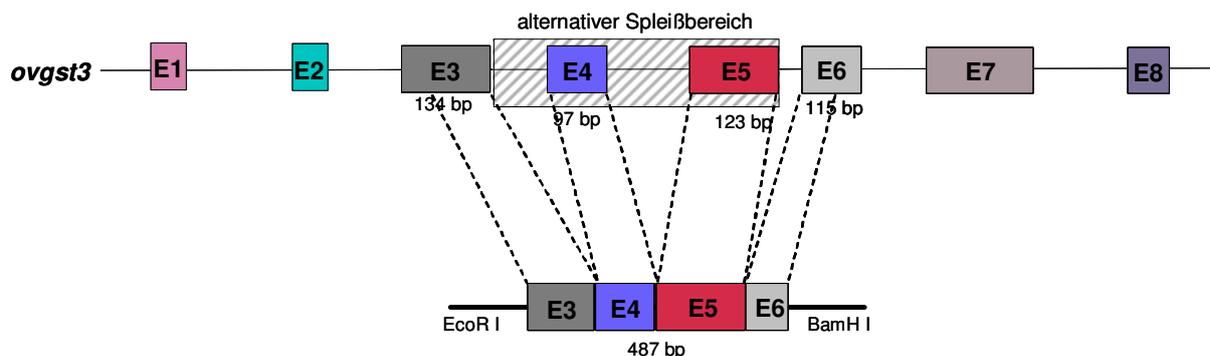


Abb. 4.4.1. Darstellung des Antikörper-Konstrukts AK-SLC1-7

Das 487 Basenpaare (bp) lange Konstrukt codiert für 159 Aminosäuren und bildet ein ca. 18 kDa großes Protein. Über EcoR I- und BamH I-Schnittstellen wurde das AK-Konstrukt in den Vektor pJC40 ligiert.

Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde das 21,4 kDa große Protein (18 kDa Konstrukt + 3,4 kDa His-Tag) verifiziert. Hierzu wurden kleine Proben der Proteinbanden des SDS-Gels nach Coomassie-Färbung entnommen. In Abbildung 4.4.1. ist das SDS-Gel mit den nummerierten Probenentnahmestellen abgebildet. Der Vergleich der analytischen und theoretischen Fragmentmassen stimmte überein und bestätigte, dass es sich bei allen Proben um das *Ov*GST3-Peptid handelte.

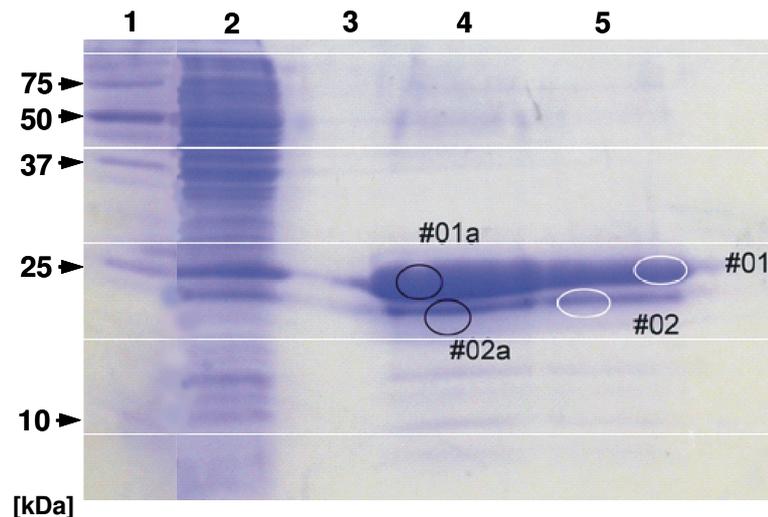


Abb. 4.4.1. SDS-PAGE des rekombinanten Antikörper-Konstrukts AK-SLC1-7

Darstellung eines 12%igen SDS-Gels, beladen mit: Spur 1: Protein-Größenstandard; Spur 2: *E. coli*-Extrakt nach Induktion; Spur 3: leer; Spur 4: 2. Fraktion der His-tag-Aufreinigung; Spur 5: 3. Fraktion der His-tag-Aufreinigung. Die Kreise markieren die vier nummerierten Probenentnahmestellen.

4.4.2. Antikörperspezifität

Vorraussetzung für die Lokalisation der *Ov*GST3 ist das Ausschließen von Kreuzreaktionen des Prä-Immuneidotter mit Extrakten von *O. volvulus*. Hierzu wurden von drei zur Verfügung stehenden Hühnern die jeweiligen Ei-Suspensionen durch Western Blot-Analyse auf mögliche Kreuzreaktionen hin untersucht. *O. volvulus*-Extrakt wurde mit Hilfe eines Western Blot-Verfahrens auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und für die Immundetektion eingesetzt. In Abbildung 4.4.2. sind die Western-Blot-Streifen nach der Peroxidase-Reaktion dargestellt. Der Prä-Immuneidotter in Spur 3 zeigte kaum eine Reaktion mit dem *O. volvulus*-Extrakt. Dieses Huhn wurde zur Antikörperbildung ausgewählt.

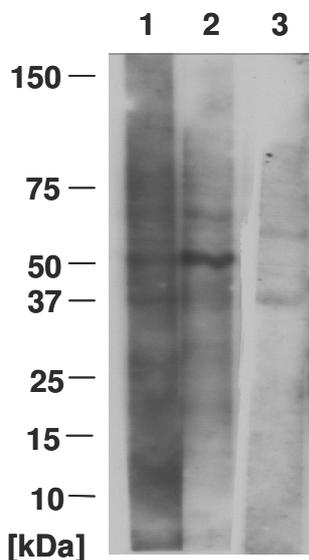


Abb. 4.4.2. Kreuzreaktionen der Prä-Immuneidotter gegen *O. volvulus*-Extrakt

Nach Auftrennung des *O. volvulus*-Extrakts über ein 12,5%iges SDS-Gel und anschließender Western Blot-Analyse wurden 0,5 cm breite Blot-Streifen in die Immunreaktionen eingesetzt. In Spur 1 bis 3 sind die Peroxidase-Reaktionen der drei Prä-Immuneidotter (1:100 verdünnt) der verschiedenen Hühner dargestellt.

Die Spezifität des *Ov*GST3-Antikörpers wurde mittels Western Blot-Analyse kontrolliert. Der unaufgereinigte *E. coli*-Extrakt wurde über ein SDS-Gel aufgetrennt, mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die Spezifität des Antikörpers überprüft. Das Ergebnis der Peroxidase-Reaktion ist in Abbildung 4.4.3. dargestellt.

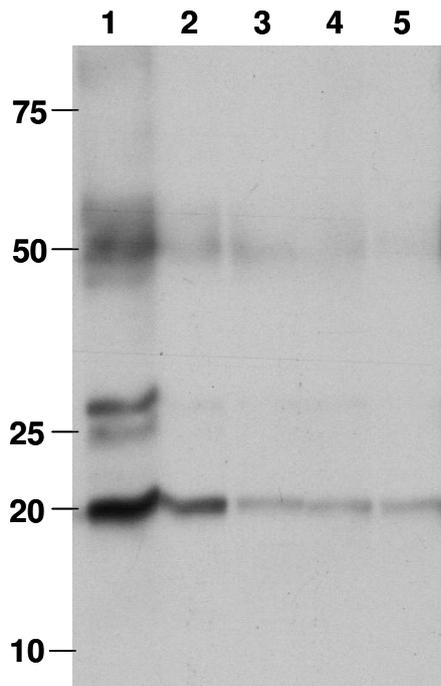


Abb. 4.4.3. Nachweis des rAK-SLC1-7 im *E. coli*-Extrakt

Der unaufgereinigte *E. coli*-Extrakt mit dem rAK-SLC1_7 Protein (*Ov*GST3) wurde mittels Western Blot analysiert. In Spur 1 ist der native Antikörper und in Spur 2 bis 5 sind die affinitätschromatographisch aufgereinigten Antikörper-Fractionen 1/2 (Spur 2), 2/3 (Spur 3), 4/5 (Spur 4) und 6/7 (Spur 5) eingesetzt.

Die Analyse der Antikörper-Spezifität zeigte, dass der isolierte Antikörper erst nach affinitätschromatographischer Aufreinigung eine spezifische Detektion des rekombinanten Proteinkonstrukts zeigte. So wurde die Fraktion 6/7 (Spur 5) mit hoher Spezifität primär für die Immundetektion der nativen *Ov*GST3 in Paraffinschnitten von *O. volvulus* eingesetzt.

Für den Nachweis von *Ov*GST3-Varianten im Gesamtextrakt von *O. volvulus* wurde die aufgereinigte Fraktion 6/7 in die Immundetektion eingesetzt. Es ließen sich jedoch keine *Ov*GST3-Varianten bei Untersuchungen verschiedener *O. volvulus*-Extrakte im Western-Blot-Verfahren nachweisen. Unter Umständen ist die äußerst geringe Expression dieser Omega-GST für den fehlenden Nachweis verantwortlich. So konnte die homologe Omega-GST P29 von *C. elegans* im Gesamtextrakt des Modellorganismus ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Burmeister, unveröffentlicht).

Die drei rekombinant hergestellten alternativen Spleißvarianten konnten alle mit dem Antikörper detektiert werden, mit Ausnahme des trans-gespleißten SLE-Konstruktes. Dieser Spleißvariante fehlt auch die gesamte GSH-Bindungstasche, gegen die der Antikörper gerichtet war.

4.5. Lokalisation der OvGST3 in *O. volvulus* mittels Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Immundetektion wurde angewandt, um die native OvGST3 in *O. volvulus* zu lokalisieren. Untersucht wurden Schnitte von männlichen Würmern, von geschlechtsreifen Weibchen mit den jeweiligen embryonalen Entwicklungsstadien im Uterus und von Mikrofilarien in Wirtsgeweben. Unterschiedlich präparierte Materialien, bzw. Würmer aus verschiedenen Regionen Afrikas wurden ausgewählt, sowie andere *Onchocerca*-Arten und verwandte Filarien, um mögliche Kreuzreaktionen aufzuzeigen. In die Immundetektion wurden der Prä-Immuneidotter, der native OvGST3-Antikörper (OvGST3-AK) und die affinitätsgereinigten Antikörper-Fraktionen 4/5 und 6/7 in unterschiedlichen Verdünnungen sowie der Überstand des absorbierten Antikörpers der Fraktion 6/7 eingesetzt.

4.5.1. Spezifität des Anti-OvGST3 Antikörpers in Schnitten von *O. volvulus*

Zunächst wurde das Prä-Immuneidotter untersucht, um mögliche huhnspezifische Antigen-Antikörperreaktionen ausschließen zu können. Verdünnungen von 1:100 und 1:250 zeigten keinerlei Immunreaktion in allen untersuchten Schnitten von männlichen wie auch weiblichen *O. volvulus*-Würmern (Abb. 4.5.1.) oder anderen *Onchocerca*- bzw. Filarienarten. Der Prä-Immuneidotter war frei von Filarienantikörpern.

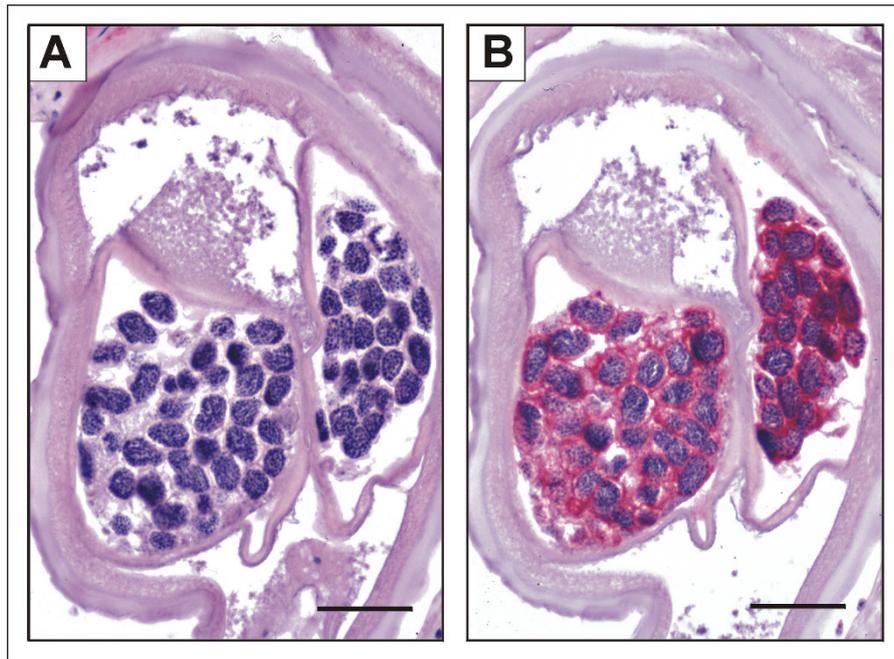


Abb. 4.5.1. Immundetektion des Prä-Immuneidotter in Schnitten von *O. volvulus*

Ausschluß von möglichen Kreuzreaktionen im Prä-Immunei. A zeigt die Immundetektion (APAAP) der isolierten Antikörper (1:100) aus dem Prä-Immuneidotter und in B die Detektion (rot) des *OvGST3*-spezifischen Antikörpers (AK) *OvGST3*-AK (1:250), nach Immunisierung des Huhns. Maßstab: 200 µm.

Der affinitätsgereinigte *OvGST3*-Antikörper der Fraktionen 4/5 zeigte in Weibchen von *O. volvulus* eine sehr starke Markierung der Eihülle. Vereinzelt konnte eine Färbung der Hypodermis, des Uterusepithels und anderer Organe festgestellt werden, die zum Teil eine Hintergrundfärbung darstellte. Diese Färbung wurde bei stärkerer Verdünnung des Antikörpers sehr viel schwächer (bis 1:5000), die Markierung der Eihülle verlor jedoch kaum an Intensität. Diese Befunde konnten auch mit der eingesetzten Fraktion 6/7 festgestellt werden und wurde überwiegend für die Immundetektion eingesetzt.

Nach der Analyse zahlreicher Schnitte konnte eindeutig festgestellt werden, dass es bei allen untersuchten Schnitten zu einer starken und spezifischen Reaktion in der Eihülle kommt. Die Antigen-Antikörperreaktionen der Eihülle wurden in den verschiedenen Embryonalstadien im Uterus, insbesondere im späten Morula-Stadium nachgewiesen. Diese Reaktion erfolgte unabhängig von der Fixierung der Schnitte in Ethanol, Formaldehyd, Glutaraldehyd oder in Paraformaldehyd mit wenig Glutaraldehyd nach Karnovsky fixiertem Material. Nach Absorption der Antikörper der Fraktion 6/7 mit der rekombinanten *OvGST3* wurde nur noch eine stark reduzierte Markierung der Eihüllen in den Schnitten beobachtet. Das bestätigte die Spezifität der Antikörperfraktion 6/7.

4.5.2. Detektion der nativen OvGST3 in Entwicklungsstadien von unbehandelten *O. volvulus*

Die Analyse der unterschiedlichen Entwicklungsstadien von der Oozyte bis zu gestreckten Mikrofilarien ergab, dass erst beim Erreichen des frühen Morulastadiums eine Markierung der Eihülle stattfindet. Die Darstellung der Embryonalentwicklung in Abb. 4.5.2. zeigt, dass die Oozyten, die Zygoten, die ersten Teilungsstadien und die sehr jungen Morulae ohne Eihüllen keine Reaktion mit den Antikörpern gegen OvGST3 eingehen (A + B). Erst bei jungen Morulae kommt es zu einer schwachen Reaktion der sich bildenden Eihülle (C). Bei älteren Morulae ist die jetzt gut ausgebildete, eng an den Zellen anliegende Eihülle stark markiert (D). Über eine positive Markierung der äußersten Zellen der Morulae konnte keine Aussage getroffen werden. Die zentralen Morulazellen sind jedoch stets farblos. Die später leicht abgelösten Eihüllen der Brezel-Stadien (geknäuelte Mikrofilarien, E) und die verlassenen Eihüllen der gestreckten Mikrofilarien (F) sind weiterhin markiert. Hier ist gut zu erkennen, dass alle intakten späteren Embryonalzellen nicht markiert waren (E). Die abgestreiften Eihüllen sind weiterhin stark markiert (F). Die Antigen-Antikörperreaktion beschränkte sich eindeutig auf die Eihüllen. Das wurde durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt (Abschnitt 4.6.).

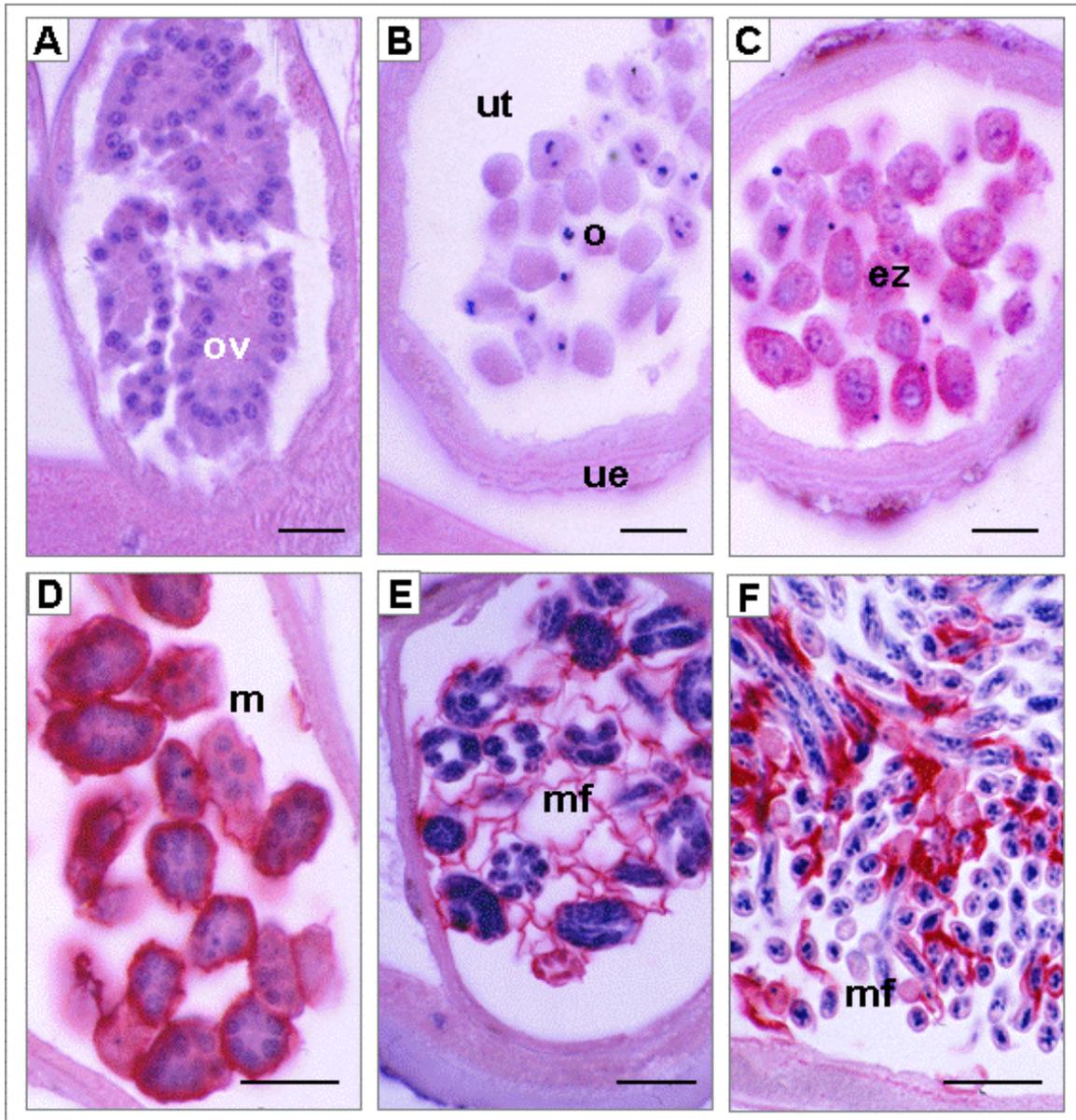


Abb. 4.5.2. Immundetektion der *OvGST3* in Stadien der Embryogenese von *O. volvulus*

Schnitte von unbehandelten geschlechtsreifen *O. volvulus* Weibchen wurden für die Anti-*OvGST3*-Immundetektion (APAAP) eingesetzt. Die *OvGST3*-Antikörper der Fraktion 6/7 wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. A: Ungefärbte Ovarien (ov). B: Nicht markierte Oozyten (o), frühe Stadien der Zellteilung im Uterus (ut) umgeben vom Uterusepithel (ue). C: Embryonalzellen (ez) im frühen Morula-Stadium mit leichter Markierung der sich bildenden Eihülle (rot markiert). D: Morulae (m) mit stark positiver Eihülle (rot). E: Geknäuelte Mikrofilarien (mf) mit gelockerter Eihülle in rot. F: Gestreckte Mikrofilarien mit abgestreifter Eihülle (rot). Maßstab: 50 μ m.

4.5.3. Detektion der nativen OvGST3 in Schnitten von chemotherapeutisch behandelten *O. volvulus*

Filarien von Ivermectin-, Suramin- oder Doxycyclin-behandelten Patienten wurden aus zwei Gründen untersucht. Erstens sollte festgestellt werden, ob die Behandlung und eine damit verbundene Stress-Situation die Würmer anders markiert. Zweitens sollte geprüft werden, ob eine Abhängigkeit der Markierung mit der Anwesenheit der obligaten Endobakterien der Gattung *Wolbachia* in Hypodermis, Oozyten und Embryonen festzustellen ist. Diese Annahme ergab sich aus dem weiter unten beschriebenen Befund. Hier zeigte die Wolbachien-freie *Onchocerca*-Spezies, *O. flexuosa*, keine Reaktion der Eihülle mit dem Antikörper gegen OvGST3 (siehe Abschnitt 4.5.4.).

Bei den untersuchten Schnitten Ivermectin-behandelter Würmer konnte kein Unterschied zu unbehandelten Wümmern festgestellt werden. Das mikrofilarizide Medikament beeinflusst in Weibchen von *O. volvulus* die Embryogenese. Morulae werden kaum beeinträchtigt. Erst ältere geknäuelte Mikrofilarien sind betroffen, die im Laufe der Behandlung degenerieren und nicht mehr geboren werden. Dieser Effekt hält über ein halbes Jahr an, dann beginnen die Weibchen wieder Mikrofilarien zu produzieren. Daher wurden Würmer untersucht, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung gewonnen wurden (Abschnitt 3.5.5.). Der Zeitpunkt der Entnahme der Würmer nach der Ivermectin-Behandlung hatte jedoch keinen Einfluss auf die starke Markierung der Eihülle.

Die Wirkung von Suramin tritt langsam ein. Während der ersten Monate sterben einige Männchen, die Embryogenese aller Stadien wird beeinflusst und zuletzt sterben die Weibchen. Bei noch intakten Embryonen konnte eine genauso stark markierte Eihülle festgestellt werden wie bei Embryonen un behandelter Würmer. Degenerierte Embryonen zeigten eine abnehmende Markierung der Eihülle. Tote Würmer zeigten keine Markierung. Sonst waren keine Hinweise auf eine zusätzliche Markierung durch Suramin verursachte Stresssituationen zu finden.

Würmer, die einer Doxycyclin-Behandlung ausgesetzt waren, konnten durch eine hohe Anzahl an degradierten Embryonen charakterisiert werden. Diese waren zum Teil stark markiert. Dabei war nicht zu unterscheiden, ob die Antigen-Antikörperreaktion sich auf die Eihülle beschränkte oder ob auch Zellen der Embryonen eine Reaktion zeigten. Es konnte in wenigen Schnitten beobachtet werden, dass es vereinzelt bei stark geschädigten Embryonen nicht zu einer Markierung der Eihülle kam. Die durch

Doxycyclin gehemmte Entwicklung der Embryonen führt vermutlich zu einer unvollständigen Entwicklung der Eihülle.

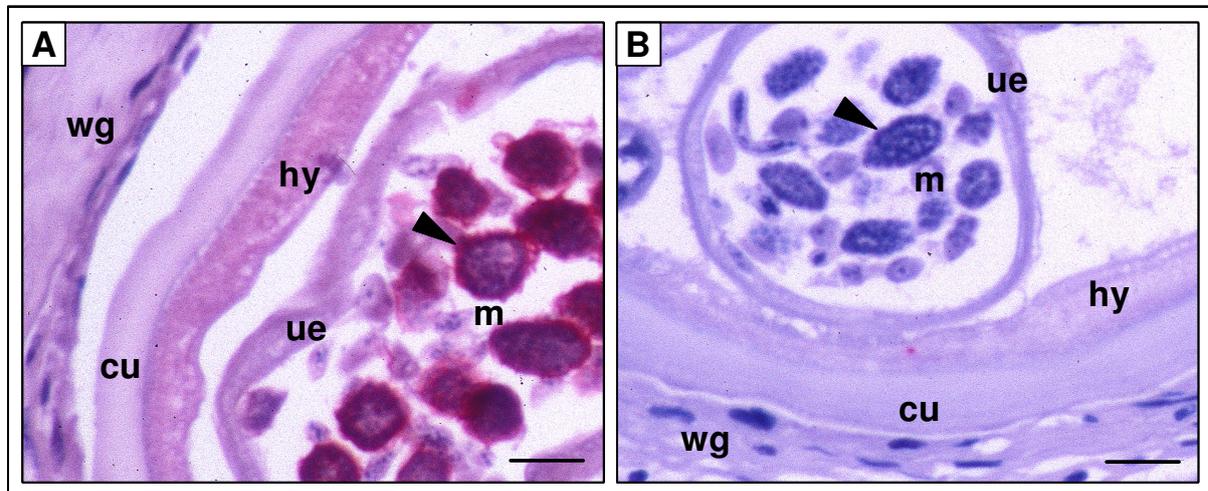


Abb. 4.5.3. Querschnitte von *O. volvulus* nach Behandlung mit Doxycyclin

Demonstration der Abwesenheit von Wolbachien in Doxycyclin-behandelten *O. volvulus*. In Bild A ist die Immundetektion (APAAP) der *OVGST3* (rot) mit Hilfe der Antikörper-Fraktion 6/7 (1:250) in *O. volvulus* nach Doxycyclin-Behandlung dargestellt. Das Wirtsgewebe (wg), die Kutikula (cu) und das Uterusepithel (ue) sind negativ, schwach positiv ist die Hypodermis und stark positiv (Pfeil) sind die Eihüllen der Morulae (m). In Bild B ist die Immundetektion der Wolbachien mit Hilfe des Wolbachien-spezifischen *DiWSP*-Antikörpers dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der *OVGST3*-positive Wurm nach Behandlung mit Doxycyclin frei von Wolbachien ist. Der Pfeil deutet auf die nicht markierte Eihülle. Maßstab: 15 μ m.

Eine Abhängigkeit der Eihüllenmarkierung von der Anwesenheit von Wolbachien wurde durch den Befund der Doxycyclin-behandelten Würmer ausgeschlossen. Die Schnitte in Abbildung 4.5.3. dokumentieren, dass mit Doxycyclin behandelte *O. volvulus*-Weibchen weiterhin eine starke Markierung der Eihülle zeigen. Die Abbildung 4.5.3. B lässt erkennen, dass die verwendeten Schnitte gänzlich frei von Wolbachien sind. Die fehlende Detektion des Wolbachien-spezifischen Antikörpers „*Dirofilaria immitis* *Wolbachia* Surface Protein“ (*DiWSP*) beweist die vollständige Entfernung der Wolbachien nach der Medikamentenbehandlung. Demzufolge handelt es sich bei der Antigen-Antikörperreaktion der Hypodermis und der Eihülle bei *O. volvulus* um eine Filarien-spezifische Reaktion und nicht um eine Antikörperreaktion mit bakteriellen Substanzen.

Ebenso sprechen die Befunde der EM-Untersuchung gegen eine *Wolbachia*-abhängige Detektion, da die untersuchten Embryonen im EM keine Markierung der Bakterien zeigen (Abschnitt 4.6.). Zum anderen kann eine Reaktion des Uterusepithels in der

Endobakterien-freien *O. flexuosa*-Art festgestellt werden. Auch dies zeigt, dass es sich bei Markierung der Hypodermis oder Eihülle nicht um eine Interaktion mit bakteriellen Substanzen handelt, sondern um eine Filarien-spezifische Reaktion.

4.5.4. Formen und Strukturen von *O. volvulus* ohne Antikörperreaktionen

Die in den unbehandelten Schnitten nicht markierten Organe waren: die Epikutikula und Kutikula, das Ovar, die Basallaminae der Organe und die fibrilläre Muskulatur. Die untersuchten Männchen von *O. volvulus* waren gänzlich negativ (Abb. 4.5.4.). Die Spermatozoen in Schnitten des Uterus waren ebenfalls nicht markiert.

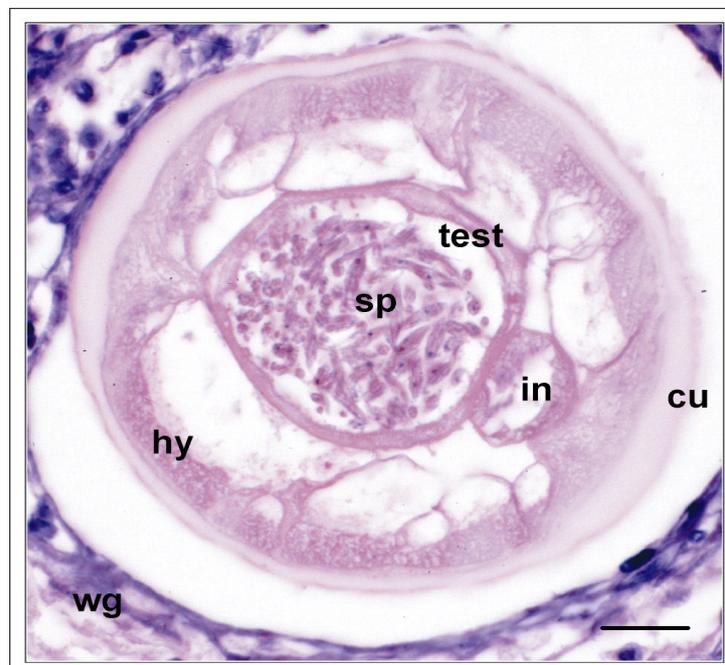


Abb. 4.5.4. Männlicher *O. volvulus* im Querschnitt

Immundetektion (APAAP) der *OvGST3* im männlichen *O. volvulus*. Die *OvGST3*-Antikörper Fraktion 6/7 wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die gesamten Organe, wie die Kutikula (cu), die Hypodermis (hy), das Intestinum (in), der Testis (test) und die Spermien (sp) sind nicht markiert. Ebenfalls negativ ist das Wirtsgewebe (wg). Maßstab: 20 µm.

Nicht detektiert wurden Mikrofilarien in Geweben unbehandelter Knotenträger (Abb. 4.5.5.) sowie degenerierende Mikrofilarien im Knotengewebe von Patienten nach Ivermectin-Behandlung.

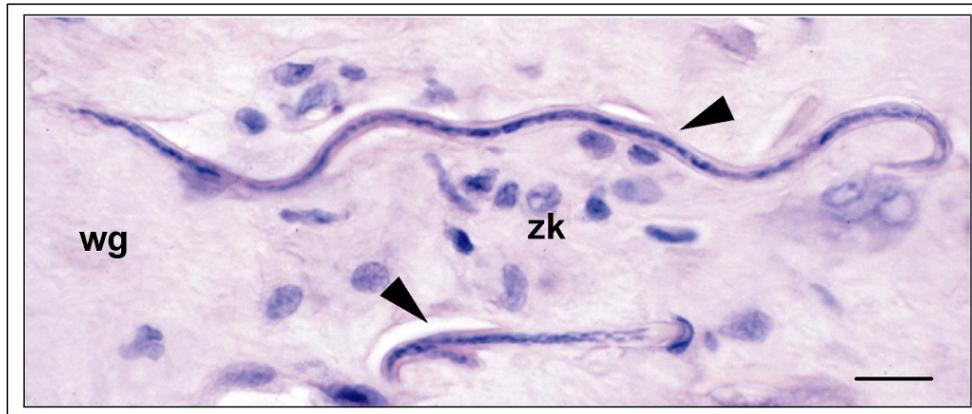


Abb. 4.5.5. Mikrofilarien im Wirtsgewebe

Immundetektion (APAAP) der *OvGST3* nach Verwendung der *OvGST3*-spezifischen Antikörper der Fraktion 6/7 in einer Verdünnung von 1:100. Die Mikrofilarien (Pfeil) im humanen Wirtsgewebe (wg) zeigen keine Antigen-Antikörperreaktion. Blau markiert sind die Zellkerne (zk) des Wirtsgewebes und der Mikrofilarien. Maßstab: 20 μ m.

4.5.5. Variierende Antikörperreaktionen in Schnitten von *O. volvulus*

In einzelnen Schnitten konnten Interaktionen des Antikörpers mit der Hypodermis und dem Uterusepithel festgestellt werden, jedoch mit erheblicher Variabilität. Fraglich waren die stark variierenden Reaktionen mit dem nicht-fibrillären Anteil der Muskulatur, dem Darmepithel und der Pseudocoelomflüssigkeit. Die hohe Konstanz der Reaktion, die die Eihülle zeigte, wurde nicht gefunden.

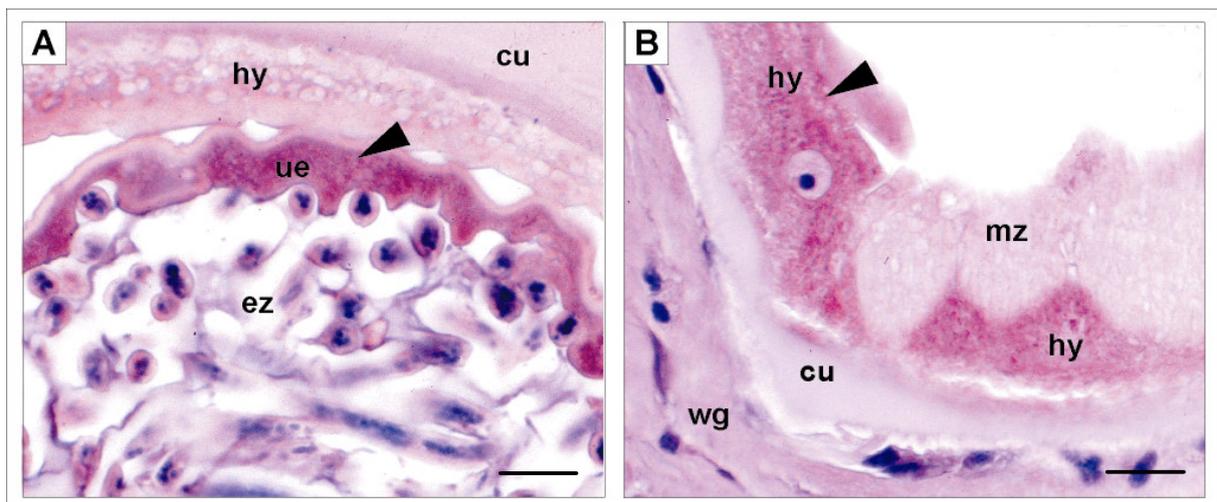


Abb. 4.5.6. Markierung der Hypodermis und des Uterusepithels

Immundetektion (rot) der *OvGST3* in Uterus-Querschnitten von *O. volvulus*. Für die APAAP-Reaktion wurden als Primärantikörper die *OvGST3*-Antikörper der Fraktion 6/7 in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. In A kommt es zu einer Markierung des Uterusepithels (ue, Pfeil), wohingegen die Embryonalzellen (ez), die Hypodermis (hy) und Kutikula (cu) unmarkiert sind. Abbildung B zeigt eine Markierung der Hypodermis (Pfeil) unter denselben Reaktionsbedingungen im selben

Weibchen. In diesem Schnitt ebenfalls nicht markiert ist die Muskulatur (mz) und das Wirtsgewebe (wg). Maßstab in A und B: 15 µm.

Gelegentlich zeigte auf einem Schnitt ein Weibchen markierte und nicht markierte Organe. Die Abbildung 4.5.6. zeigt einmal eine Markierung des Uterusepithels, nicht aber der Hypodermis. Andere Schnitte desselben Weibchens zeigten jedoch eine Markierung der Hypodermis. Unter Umständen könnten variierende zelluläre Expressionszustände jeweiliger Gewebe für diese Markierung verantwortlich sein.

4.5.6. Immundetektion mit dem OvGST3-AK in Schnitten anderer Onchocerca-Arten

Eine Immundetektion mit dem OvGST3-AK in Schnitten anderer *Onchocerca*-Arten wurde durchgeführt, um mögliche Kreuzreaktionen des Anti-OvGST3-Antikörpers zu untersuchen. Es zeigte sich, dass der eingesetzte Antikörper mit Strukturen der untersuchten *Onchocerca*-Arten reagiert und es mit Ausnahme von *O. flexuosa* ebenfalls zu einer Detektion der Eihülle kommt. Da *O. flexuosa* neben *A. viteae* die einzigen untersuchten Filarien-Arten sind, die keine symbiotischen Wolbachien besitzen, wurde vermutet, dass die Interaktion mit der Eihülle durch die Anwesenheit von Wolbachien entsteht. Eine direkte Abhängigkeit der beiden Befunde konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die Eihülle von *O. volvulus* auch nach Entfernung der Wolbachien durch Behandlung mit Doxycyclin weiterhin stark positiv reagierte (siehe Abschnitt 4.5.3.).

In Abbildung 4.5.7. sind Querschnitte von *O. flexuosa* gezeigt. Die mit OvGST3-AK der Fraktion 6/7 behandelten Schnitte reagierten nicht mit der Eihülle dieser *Onchocerca*-Art. Es kam jedoch vereinzelt zu einer Markierung von Hypodermis und Uteruswand (in Abb. 4.5.7. nicht zu erkennen).

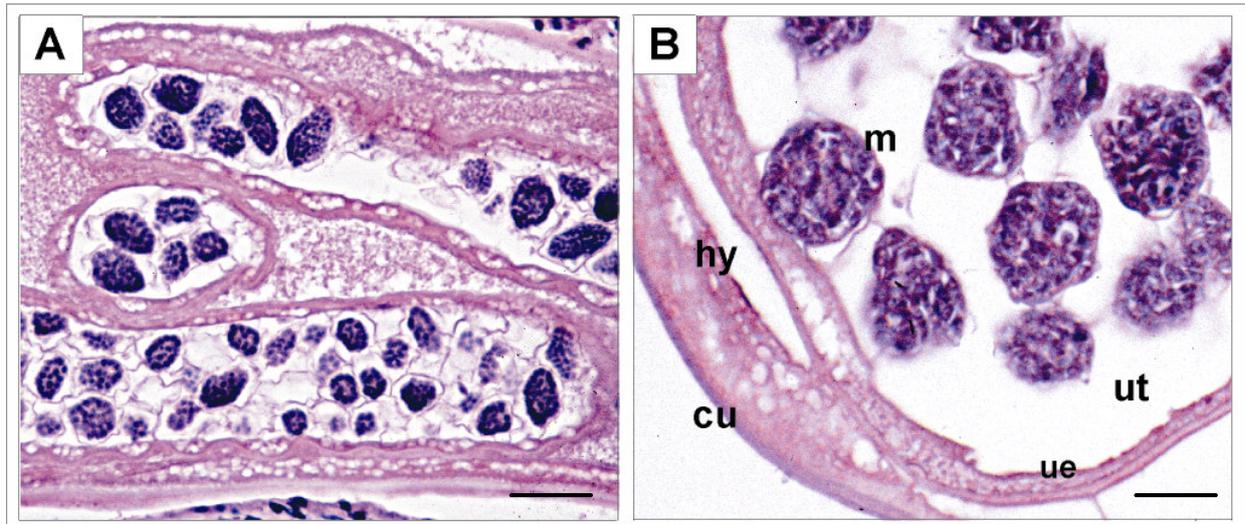


Abb. 4.5.7. Querschnitte eines Weibchens von *O. flexuosa* mit Embryonen

Immundetektion (APAAP) der O ν GST3 in *O. flexuosa* mit der O ν GST3-Antikörperfraktion 6/7 in einer Verdünnung von 1:100. In A ist eine Übersicht eines Uterus-Querschnittes mit Morula-Stadien dargestellt; in B ein Ausschnitt eines Uterus (ut); ungefärbt sind die Eihüllen der Morulae (m), das Uterusepithel (ue), die Hypodermis (hy) und die Kutikula (cu). Maßstab in A: 200 μ m, in B: 15 μ m.

In Abbildung 4.5.8. sind drei weitere mit *O. volvulus* verwandte Arten dargestellt, jeweils mit Prä-Immunein und Antikörper der Fraktion 6/7 behandelt. *O. dukei* zeigt nur eine Detektion der Eihülle, die eine vergleichbare Stärke wie von *O. volvulus* aufweist (B). Bei *O. ochengi* konnte eine Markierung der Eihülle und der Uteruswand festgestellt werden (D). In Bild F ist eine starke Markierung der Hypodermis bei *O. fasciata* zu sehen. Ebenso wurde in Schnitten von *O. fasciata* eine Detektion der Eihülle sowie der Uteruswand festgestellt, die ebenso stark wie bei *O. volvulus* war.

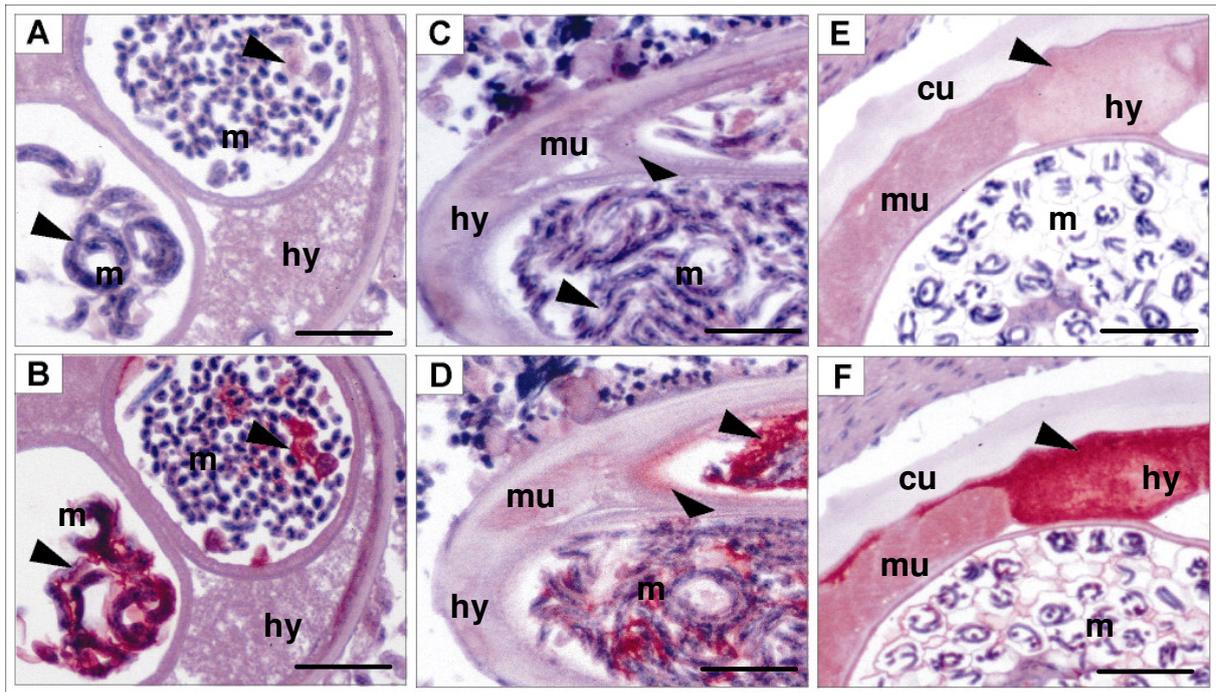


Abb. 4.5.8. Immundetektion der *OvGST3* in *O. dukei*, *O. ochengi* und *O. fasciata*

Die obere Reihe (A, C, E) zeigt die Negativ-Kontrollen: die Immundetektion (APAAP) mit eingesetztem Prä-Immunein in einer Verdünnung von 1:100. Die untere Reihe (B, D, F) zeigt die Detektion (rot) der *OvGST3* mit dem *OvGST3*-Antikörper der Fraktion 6/7 in einer Verdünnung von 1:100. A und B zeigen Uterus-Querschnitte von *O. dukei*. Abbildung B zeigt die Antikörperreaktion mit der Eihülle (Pfeile). Keine Färbung der Mikrofilarien (m) und der Hypodermis (hy). Abbildung C und D zeigen Uterus-Querschnitte von *O. ochengi* mit einer Antikörperreaktion des Uterusepithels und der Eihülle (Pfeile). Nicht markiert sind die Muskulatur (mu), die Hypodermis und die Mikrofilarien. In Abbildung E und F sind die Querschnitte von *O. fasciata* dargestellt mit einer starken Antikörperreaktion der Hypodermis (Pfeil). Nicht markiert sind die Kutikula (cu), die Muskulatur und die Morulae. Maßstab in Abbildung A bis D: 20 μm , in E und F: 16 μm .

Bei den Arten *O. jakutensis* und *O. gibsoni* konnte keine eindeutige Aussage über die Markierung der Hypodermis gemacht werden, da die Färbung je nach Schnitt stark variierte und nicht ausreichend geeignete Schnitte zur Verfügung standen. Die Eihüllen waren jedoch bei beiden Arten stark positiv. In der Tabelle 4.5.1. ist *O. volvulus* mit den verwandten Wurmartarten und den jeweiligen Markierungen aufgeführt.

Tab. 4.5.1. Markierung der Organe der mit *O. volvulus* verwandten *Onchocerca*-Arten

Wurmart	Markierung		
	Eihülle	Hypodermis	Uterusepithel
<i>O. volvulus</i>	positiv	positiv	positiv
<i>O. ochengi</i>	positiv	negativ	positiv*
<i>O. gibsoni</i>	positiv	positiv*	negativ
<i>O. dukei</i>	positiv	negativ	negativ

<i>O. fasciata</i>	positiv	positiv	positiv
<i>O. jakutensis</i>	schwach positiv	positiv*	negativ
<i>O. flexuosa</i>	negativ	positiv	positiv

Die Tabelle zeigt eine Auflistung von *Onchocerca*-Arten mit positiver oder negativer *Ov*GST3-Antikörperreaktion von Eihülle, Hypodermis und Uterusepithel. Das Sternchen (*) kennzeichnet Markierungen, die nur gelegentlich positiv waren.

Diese Befunde zeigen, dass es zu Kreuzreaktionen des Anti-*Ov*GST3-Antikörpers mit Organen und Strukturen anderer *Onchocerca*-Arten kommt.

4.5.7. Lokalisation der Omega-GSTs in mit *Onchocerca*-verwandten Filarien und anderen Helminthen

Der affinitätsgereinigte *Ov*GST3-Antikörper der Fraktion 6/7 wurde noch bei weiteren Helminthen eingesetzt, um mögliche Kreuzreaktionen nachzuweisen. Mit Ausnahme von *B. malayi* konnte keine Markierung der Eihülle bei verwandten Filarien und anderen Helminthen detektiert werden. Es kam bei *B. malayi* teilweise zu einer eindeutigen Markierung der Eihülle, der Hypodermis und des Uterusepithels, die bei keiner anderen Filarien-Art in vergleichbarer Stärke zu erkennen war (Abb. 4.5.9.).

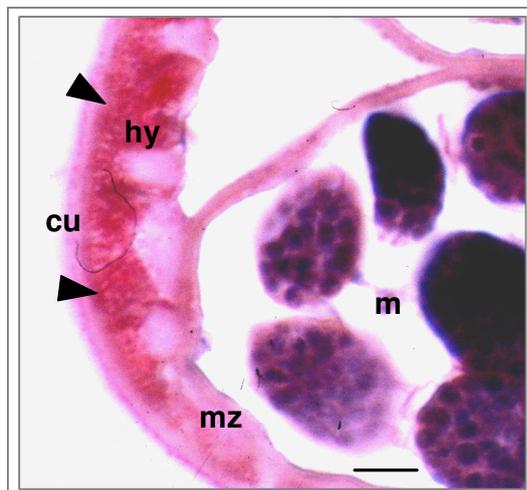


Abb. 4.5.9. Immundetektion der *Ov*GST3 in *Brugia malayi*

Immundetektion (APAAP) der *Ov*GST3 mit dem *Ov*GST3-Antikörper der Fraktion 6/7 in einer Verdünnung von 1:100 in Schnitten von *B. malayi*. Die Detektion der *Ov*GST3 in der Hypodermis (hy) ist deutlich durch eine Rotfärbung zu erkennen. Nicht markiert wurde die Kutikula (cu), die Muskelzellen sowie die Zellen der Morula-Stadien (m). In diesem Schnitt sind die Eihüllen von *B. malayi* im Gegensatz zu anderen Schnitten nicht markiert. Maßstab: 15 μ m

Die zwei untersuchten Weibchen von *D. repens* wiesen zwar keine Embryonen auf, zeigten jedoch vereinzelt eine eindeutige Markierung der Hypodermis und des Uterusepithels. Für den Nematoden *A. suum* und die Filarien-Arten *W. bancrofti* und *L. loa* konnte keine Markierung der Eihülle, der Hypodermis oder des Uterusepithels festgestellt werden. Die gescheideten Mikrofilarien von *L. loa* in der Milz eines

Menschen und eines Affen und im Blut eines Menschen waren ebenfalls negativ. Ebenso zeigten alle weiteren mit *Onchocerca* verwandten Filarien keine Detektion des Uterusepithels. Eine Markierung der Hypodermis konnte zum Teil bei *A. viteae*, *D. immitis*, *D. repens* und *L. sigmodontis* nachgewiesen werden, wobei die Markierung je nach Wurm variierte. Die Eier des Trematoden *S. mansoni* mit Mirazidien waren ebenfalls negativ. Die Befunde sind in der Tabelle 4.5.2. aufgelistet.

Tab. 4.5.2. Markierung der Organe von verwandten Filarien-Arten bzw. anderen Helminthen

Wurmarten	Markierung		
	Eihülle	Hypodermis	Uterusepithel
<i>Brugia malayi</i>	positiv*	positiv*	positiv*
<i>Acanthocheilonema viteae</i>	negativ	positiv*	negativ
<i>Dirofilaria immitis</i>	negativ	positiv*	negativ
<i>D. repens</i>	keine Embryonen	positiv*	positiv*
<i>Litomosoides sigmodontis</i>	negativ	positiv*	negativ
<i>Loa loa</i>	negativ	negativ	negativ
<i>Wuchereria bancrofti</i>	negativ	negativ	negativ
<i>Asaris suum</i>	negativ	negativ	negativ
<i>Schistosoma mansoni</i>	negativ	Gewebe negativ	negativ

Die Tabelle zeigt eine Auflistung von verwandten Filarien-Arten, von *A. suum* und *S. mansoni*. Das Sternchen (*) kennzeichnet Markierungen, die nur gelegentlich positiv waren.

4.6. Lokalisation der O_vGST3 in *O. volvulus* mittels Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopischen (EM) Untersuchungen wurden Ultra-Dünnschnitte von *O. volvulus* angefertigt. Die Lokalisation der nativen O_vGST3 mit der Immunogoldmethode beschränkte sich auf Stücke von zwei unbehandelten Weibchen von *O. volvulus* mit Embryonen und von zwei behandelten Weibchen, in denen keine Embryonen zu finden waren. Diese Weibchen stammten von einem Patienten, der 11 Monate zuvor sechs Wochen lang mit 100 mg Doxycyclin täglich behandelt worden war und der 72 Stunden vor der Nodulektomie 0,15 mg/kg KG Ivermectin erhalten hatte. Zunächst wurden die affinitätsgereinigten O_vGST3-Antikörper der Fraktion 2/3 in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Anschließend wurden die O_vGST-AK der Fraktion 6/7 in einer Verdünnung von 1:500 angewendet, um die Hintergrundmarkierung zu verringern.

4.6.1. Immungolddetektion der OvGST3 in der Eihülle von *O. volvulus*

Die Verwendung der Antikörper-Fractionen 2/3 und 6/7 für die Immungoldreaktion ergaben eine eindeutige Detektion der Eihülle. Die deutliche Markierung der Eihülle durch Goldpartikel konnte bei beiden Weibchen gezeigt werden, wobei die Fraktion 6/7 zu einer wesentlich geringeren Hintergrundmarkierung führte (0., 0., 0.).

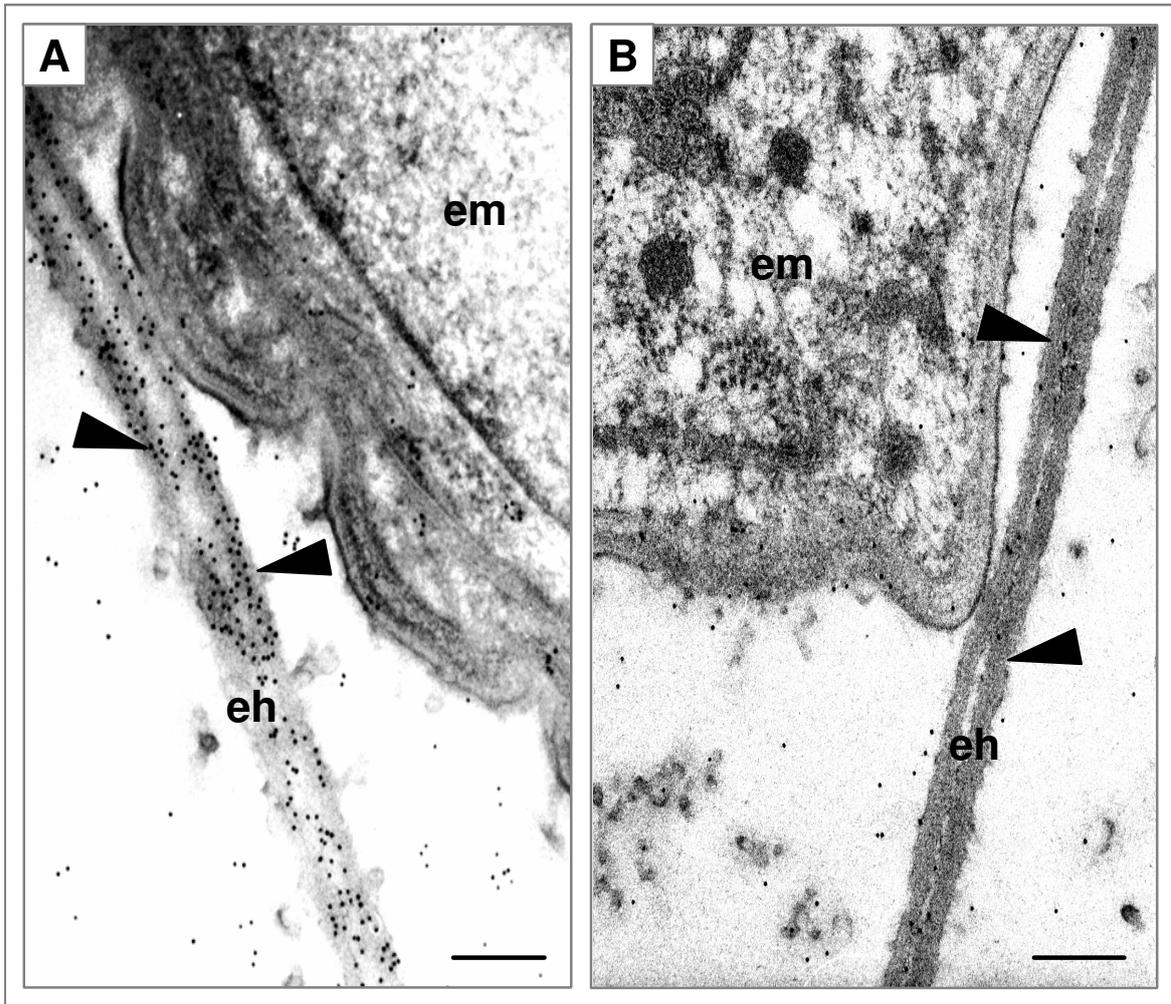


Abb. 4.6.1. Immungolddetektion der OvGST3 in *O. volvulus*

Immungolddetektion mittels Elektronenmikroskopie von OvGST3; A mit Anti-OvGST3 Antikörper der Fraktion 6/7 (1:500); B mit dem aufgereinigten Prä-Immuneidotter (1:500). In A sind zwei dicht nebeneinander liegende Eihüllen (eh) deutlich markiert (Pfeile). Nicht markiert ist der Embryo (em) mit der gewellten Kutikula einer geknäuelten Mikrofilarie. Vereinzelt sind Goldpartikel als Hintergrunddetektion zu erkennen. In B ist keine Reaktion des Prä-Immuneidotters mit den Eihüllen desselben Weibchens oder mit Strukturen des Embryos zu detektieren. Maßstab: ca. 50 nm

Die Kontrollschnitte mit dem Prä-Immunei zeigten keinerlei Immungoldreaktion mit Strukturen von *O. volvulus* (Abb. 4.6.1.). Im Gegensatz zu der stark markierten Eihülle zeigten die Zellen der Morula-Stadien und der geknäuelten Mikrofilarien keinerlei

Reaktion mit dem Gold. Die Antigen-Antikörperreaktion beschränkte sich hier, anders als bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen, nur auf die Eihülle.

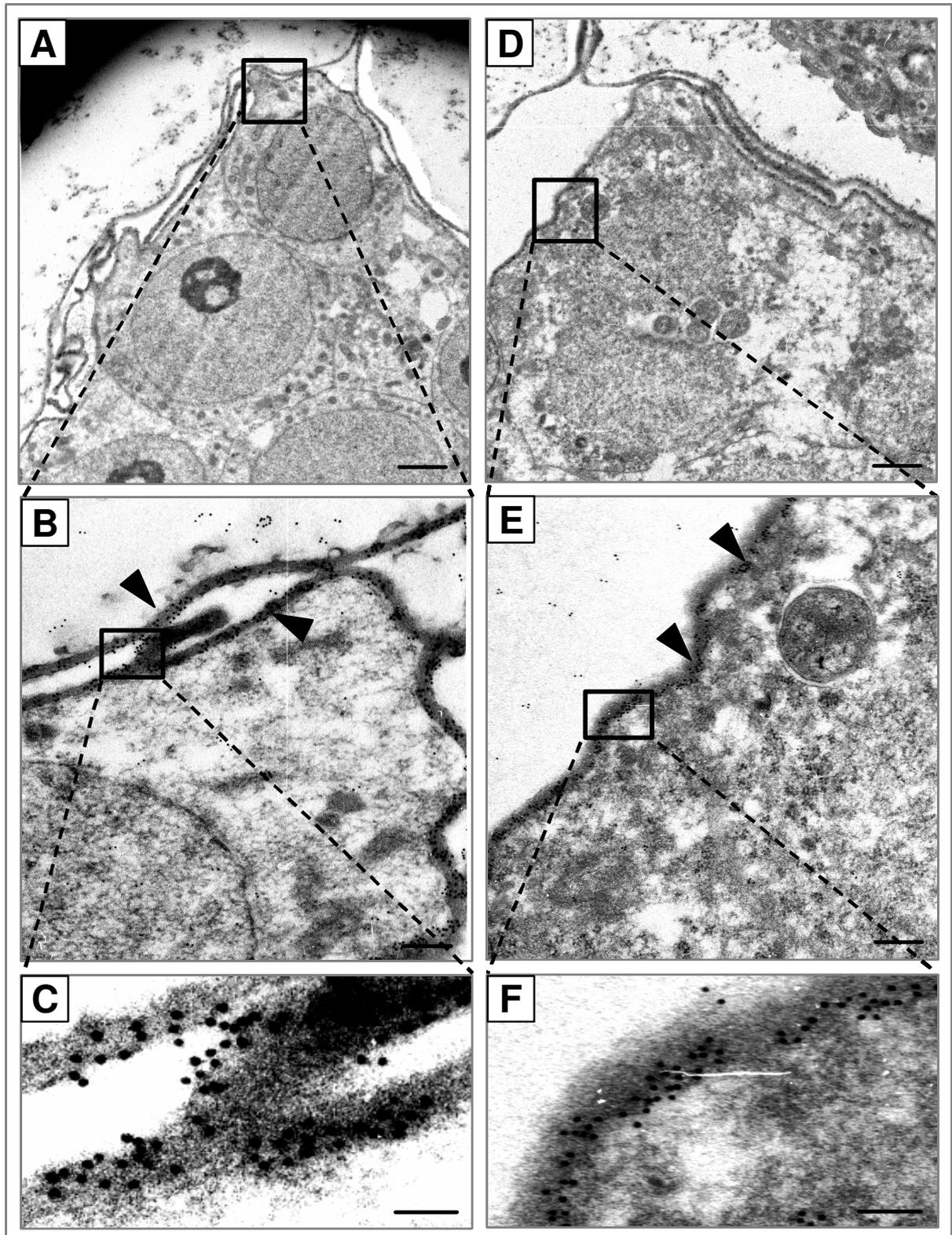


Abb. 4.6.2. Immungolddetektion intakter und degradierter Morulae in *O. volvulus*

Immungolddetektion der OVGST3 in Schnitten von intakten (A und B) und degradierten (C und D) Morulae (1:500). A zeigt die Übersicht einer Morula mit Zellen und Zellkern umgeben von einer

Eihülle. B zeigt eine Detailaufnahme der intakten Morula mit der durch Goldpartikel markierten Eihülle (Pfeile). In C eine weitere Ausschnittsvergrößerung mit klar erkennbarer Markierung der Eihülle abgebildet. D bis F dokumentieren die Detektion der Goldpartikel, die sich bei dieser degradierten Morula ausschließlich auf die Eihülle beschränken (Pfeile). D zeigt eine Übersicht der degradierten Morula mit aufgelösten Zellen und nicht mehr erkennbaren Kernen. E zeigt eine Detailaufnahme und F eine weitere Ausschnittsvergrößerung. Maßstab: A + D: ca. 800 nm; B + E: ca. 50 nm; C + F: ca. 5 nm

Die Untersuchung intakter und degradiertes Morulae zeigten eine deutliche Detektion, die sich ausschließlich auf die Eihülle der Embryonen beschränkte (Abb. 4.6.2.). Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie bezogen sich die Befunde jedoch nur auf eine beschränkte Anzahl von Morula-Stadien.

4.6.2. Immungolddetektion vom Hitzeschockprotein HSP60 in *O. volvulus*

Um unspezifische Reaktionen während der Präparation und Kontrastierung der Ultradünnschnitte auszuschließen, wurden konsekutive Schnitte derselben Weibchen mit dem Antikörper gegen das durch Stress induzierbare Hitzeschockprotein HSP60 markiert. Dieser Antikörper reagiert in unbehandelten *O. volvulus* vor allem mit den Wolbachien und nur wenig mit Mitochondrien. In den Strukturen der unbehandelten *O. volvulus* Weibchen wurde keine Detektion des HSP60-Antikörpers festgestellt, weder in der Eihülle noch in Strukturen des Embryos. Dass die Markierung mit dem Antikörper gegen HSP60 funktionierte, zeigten stark positiv reagierende Wolbachien in Hypodermis und Embryonen (nicht dargestellt).

Dieser Befund unterstreicht die Spezifität der Immungolddetektion mit dem Anti-*Ov*GST3-Antikörper. Sie bestätigen die lichtmikroskopischen Befunde an den vielen Würmern. Eine Bindung des *Ov*GST3-Antikörpers an die Eihülle in ungestressten Würmern deutet auf eine konstitutive Expression der *Ov*GST3 hin.

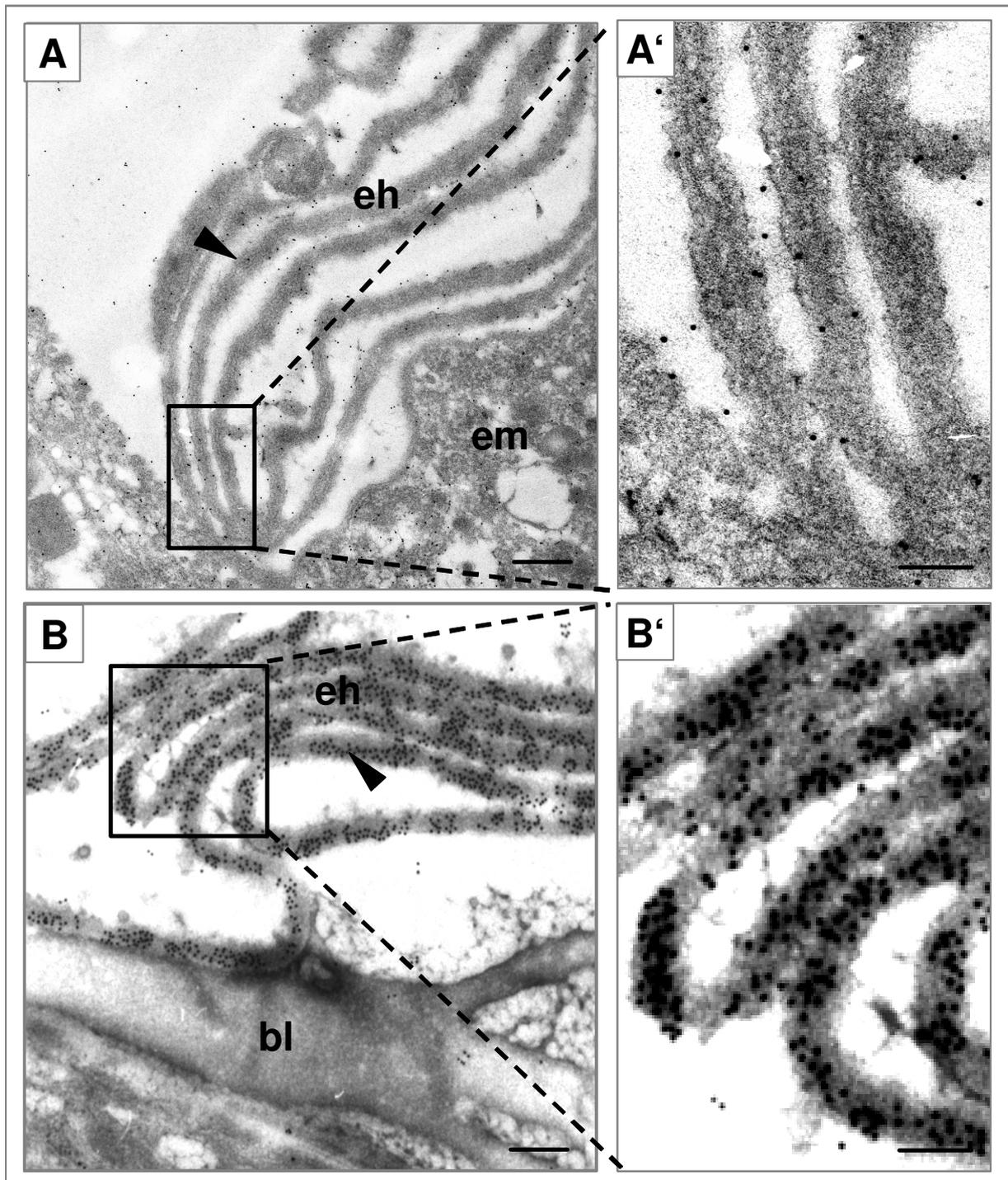


Abb. 4.6.3. Immungolddetektion eines unbehandelten *O. volvulus*

A: Keine HSP60-Reaktion (1:500) mit den abgestreiften Eihüllen: Deutlich zu erkennen bei der Ausschnittsvergrößerung (A'). B: Eindeutige Goldpartikelmarkierung der abgestreiften Eihüllen (Pfeile) durch Anti-*Ov*GST3 Antikörper der Fraktion 6/7 (1:500). Ebenso klar erkennbar in der Ausschnittsvergrößerung (B'). Maßstab: A + B: ca. 450 nm; A' + B': ca. 5 nm

4.6.3. Immungolddetektion der Uterus- und Körperwand von *O. volvulus*

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von *O. volvulus* zeigten keine Markierung der *Ov*GST3 in der Uteruswand. Wie in Abbildung 4.6.4. dokumentiert, reagiert das Uterusepithel, die Basallamina sowie die Muskelzellen des Uterus im Gegensatz zu der an dem Epithel anliegenden Eihülle einer geknäuelten Mikrofilarie nicht mit dem Antikörper gegen *Ov*GST3. Auch die Organe der Körperwand, wie Muskulatur, Hypodermis, Kutikula und Epikutikula der vier untersuchten Weibchen zeigten keine Reaktion (Abb. 4.6.5.).

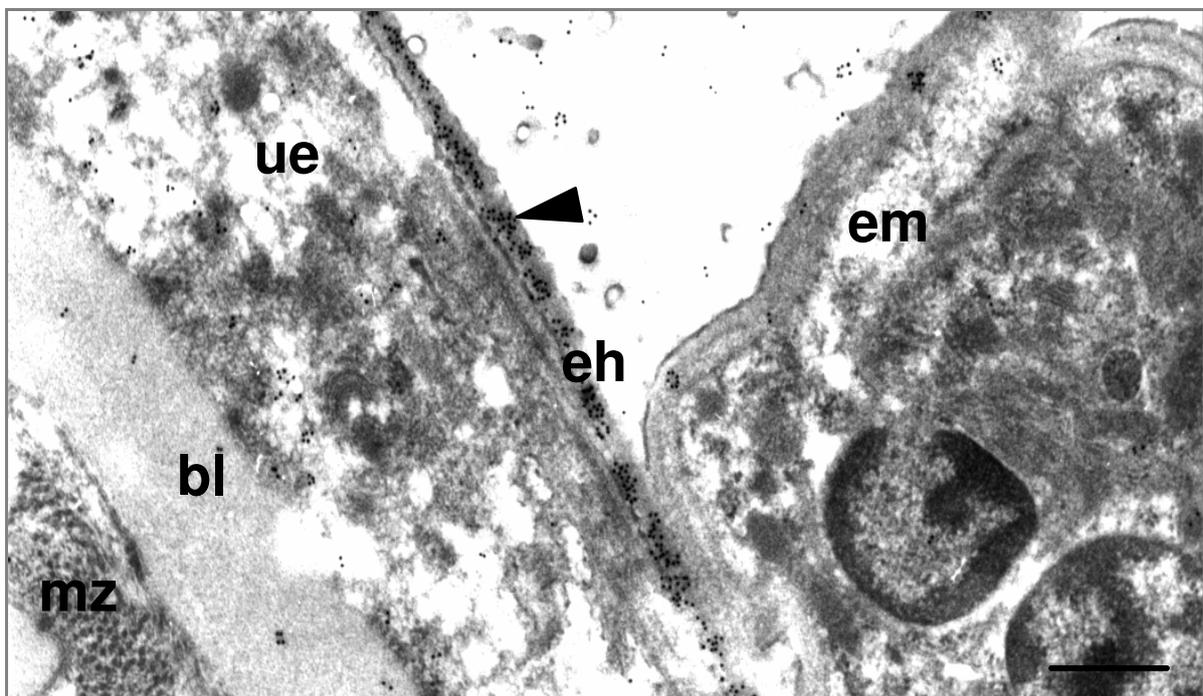


Abb. 4.6.4. Querschnitt von *O. volvulus* mit Uteruswand, Eihülle und Embryo

Immungolddetektion der *Ov*GST3 mittels Anti-*Ov*GST3-Antikörpern der Fraktion 6/7 (1:500). Die Uteruswand, bestehend aus Muskelzellen (mz), Basallamina (bl) und Uterusepithel (ue) zeigt keine Detektion des *Ov*GST3-Antikörpers. Deutlich markiert hingegen ist die Eihülle (eh) des Embryos (em). Maßstab: ca. 30 nm

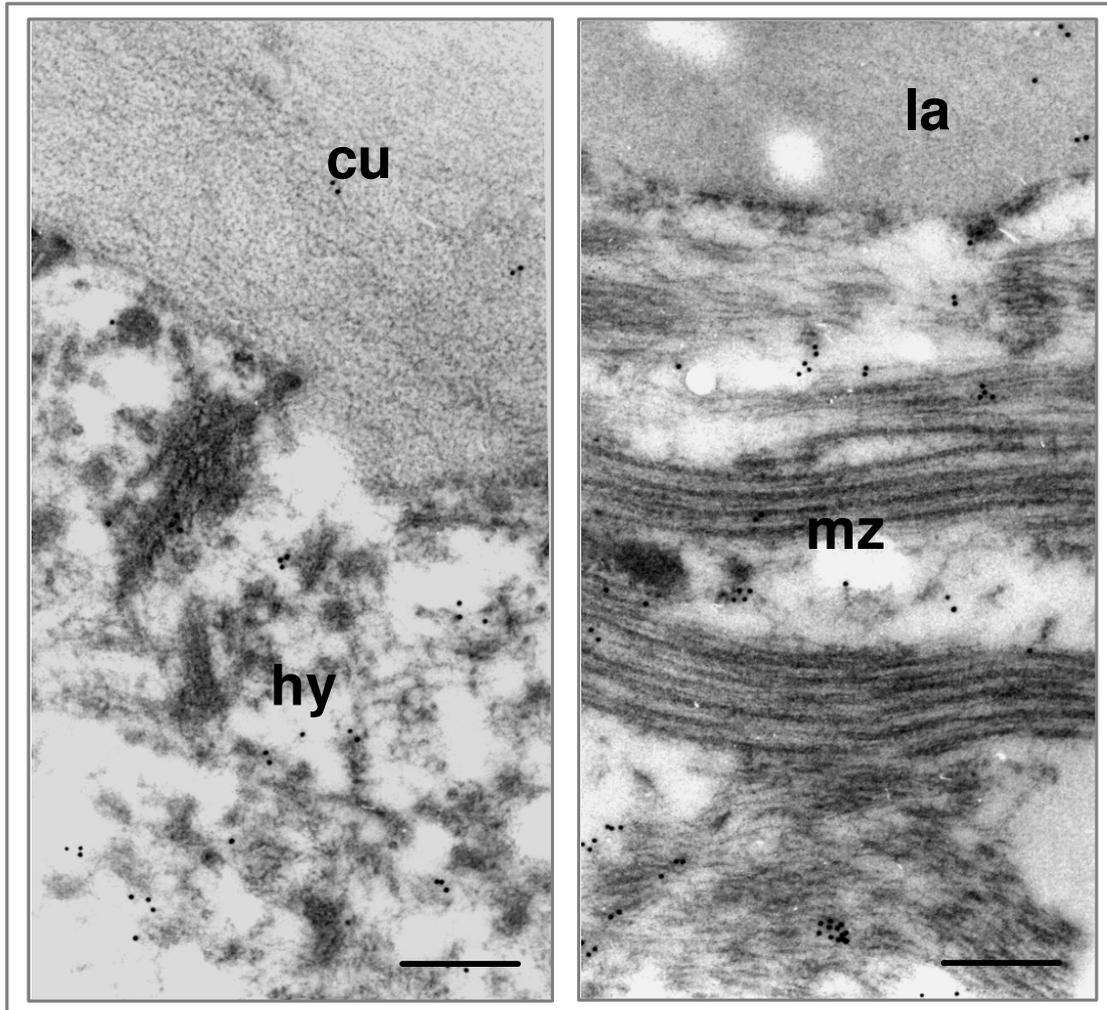


Abb. .4.6.5. Immungolddetektion der Körperwand von *O. volvulus*

Immungolddetektion der *O1GST3* mittels *O1GST3*-Antikörper der Fraktion 6/7 (1:500). In den Geweben der Körperwand von *O. volvulus* konnte keine Markierung festgestellt werden. Die rechte Abbildung zeigt die Kutikula (cu) mit der nach innen liegenden Hypodermis (hy). Links ist die äußere Lamina (la) und die Körpermuskulatur (mz) dargestellt. Maßstab: ca. 10 nm

Zusammenfassend ergibt sich, dass die immunelektronenmikroskopische Untersuchung die lichtmikroskopische Beobachtung der spezifischen Markierung von *O1GST3* in der Eihülle bestätigt. Das Fehlen einer Markierung von Hypodermis und Uterusepithel kann in Übereinstimmung mit der beobachteten Variation der lichtmikroskopischen Befunde an der geringen Anzahl von Proben bei der EM liegen.

4.7. Nachweis von *Ov*GST3-Antikörpern in Humanseren mittels ELISA

Um zu prüfen, ob die *Ov*GST3 möglicherweise mit dem Immunsystem des Menschen in Kontakt kommen und auf diese Weise eine Immunantwort wie z.B. eine Antikörperbildung auslöst, sollte die Antikörperaktivität der *Ov*GST3 bestimmt werden. Möglicherweise stellt diese GST ein Zentralkomplex dar, welches für die Entwicklung von Impfstoffen gegen Wurminfektionen oder für serologische Diagnosen von Wurmerkrankungen geeignet scheint. Es sollte festgestellt werden, ob Antikörper gegen *Ov*GST3 gebildet werden. Dazu wurden IgG1- und IgG4-Antikörper gegen *Ov*GST3 in Seren von Onchozerkose-Patienten im ELISA („Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“) untersucht. Die Spezifität der Antikörperantwort wurde anhand von Seren einer Gruppe von Patienten geprüft, die mit anderen Filarien, intestinalen Nematoden oder Trematoden infiziert waren. Dabei konnte auf einen *Ov*GST3-kreuzreagierenden Antikörper getestet werden.

4.7.1. Antikörperantwort von Onchozerkose-Patienten gegen *Ov*GST3

Um zu untersuchen, ob die *Ov*GST3 eine Antikörperbildung in Onchozerkose-Patienten induziert, wurden 117 Seren von *Onchocerca*-infizierten Personen auf *Ov*GST3-reaktive Immunglobuline untersucht; 77 Seren stammten von Patienten mit einer generalisierten und 40 mit einer chronisch-hyperreaktiven (Sowda-) Form. Zum Vergleich wurden Parallelansätze mit dem immundominanten *O. volvulus*-spezifischen Antigen *Ov*20 (Mpagi *et al.*, 2000) durchgeführt, gegen das alle Onchozerkose-Patienten IgG4-Antikörper bilden. Als Negativ-Kontrolle wurden Seren von 20 Filarien-freien europäischen Personen (Normalseren) verwendet. Mit Hilfe der Normalseren wurde der „cut-off“-Wert festgelegt. Im ELISA wurden 5 µg/ml des in *E. coli* rekombinant hergestellten Antikörper-Konstrukts AK-SLC1_7 eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.7.1. dargestellt.

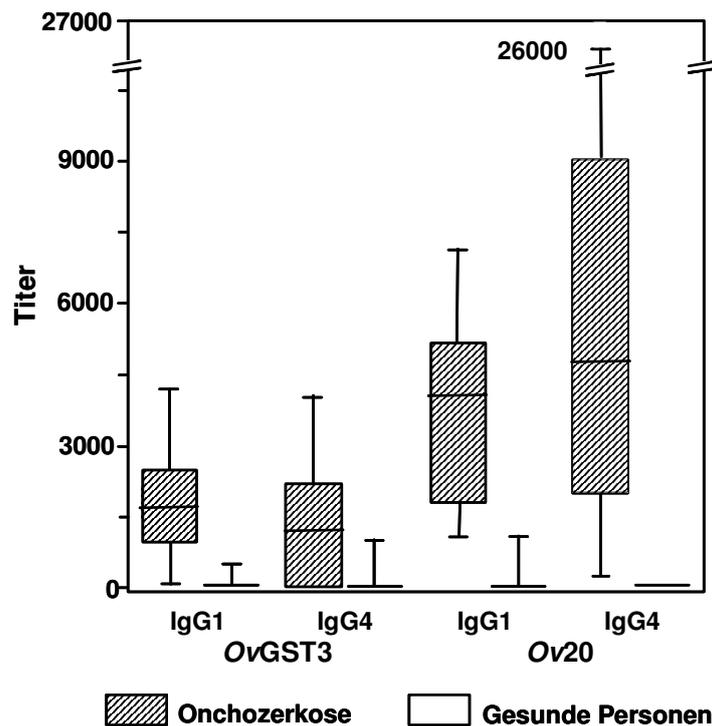


Abb. 4.7.1. IgG1 und IgG4 Reaktionen von Seren *O. volvulus*-infizierter Patienten mit *OvGST3* und *Ov20* im ELISA

Untersucht wurden 117 Seren von Onchocerkose-Patienten und von 20 nicht infizierten europäischen Kontroll-Seren. Die Box-Plots zeigen 50 % der Messwerte der IgG-Antworten der jeweiligen Patientenserum (Titer = OD₄₅₀-Wert) in den Rechtecken, mittig ist der Median eingezeichnet, die auslaufenden Balken zeigen die 10 % und 90 % Perzentilen, die Punkte markieren die Messwerte außerhalb der Perzentile.

Die Box-Plots zeigen bei Ansätzen mit infizierten Seren im Vergleich zu den Kontrollseren einen signifikanten Anstieg ($P < 0,001$) der Immunglobulin-Reaktionen. Die Mediane der ermittelten Titer lag für die Kontrollseren zwischen 50 und 90, wohingegen die Werte der *Onchocerca*-Patienten zwischen 1250 und 4800 lagen. Die *OvGST3* löst in den 117 Patientenserum im Vergleich zu den 20 Kontrollseren sowohl eine signifikant höhere Reaktion mit IgG1, als auch mit IgG4 aus. Die gemessenen IgG1-Werte mit einem Median von 1700 weisen auf einen Trend zu einer IgG1-Antwort im Vergleich zu den IgG-Werten (Median bei 1250). In denselben Seren war eine wesentlich stärker ausgeprägte Immunantwort gegen das immundominante *O. volvulus*-spezifische *Ov20*-Antigen nachweisbar ($P > 0,001$) (Mpagi *et al.*, 2000 a, b). Dabei fiel die IgG4-Antikörperantwort als Trend stärker aus (Median bei 4800) als die IgG1-Antwort (Median bei 4100). Die eindeutige *O. volvulus*-spezifische IgG-Antwort auf *Ov20* bestätigte die Infektion durch *O. volvulus*. Die Befunde zeigen, dass *OvGST3* in Kontakt

mit dem Immunsystem des Wirtes kommt und als Antigen die Bildung von *Ov*GST3-spezifischen Antikörpern auslöst.

4.7.2. Antikörperantwort gegen *Ov*GST3 von Patienten mit hyperreaktiver (Sowda-) und generalisierter Form der Onchozerkose

Um festzustellen, ob Patienten mit der hyperreaktiven Sowda-Form eine stärker ausgeprägte Anti-*Ov*GST3-Antikörperantwort zeigen als Patienten mit generalisierter Form, wurden die Immunantworten der Patientenserum miteinander verglichen. Die 77 Seren von Patienten mit einer generalisierten Form wurden den 40 Seren von Patienten mit einer chronisch hyperreaktiven (Sowda-) Form gegenübergestellt.

Die Abbildung 4.7.2. zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den IgG-Antworten der hyperreaktiven und denen der generalisierten Form festzustellen sind. Die Mediane der Titer der IgG1-Antikörper waren in beiden Fällen sehr ähnlich (1700 bzw. 1775), wobei die Streuung der 77 Seren von Patienten mit einer hyperreaktiven Form (Sowda) geringer war. Die durch *Ov*GST3 ausgelöste IgG4-Antwort zeigte Titerwerte mit einem Median um 1200, wobei die Werte der Sowda-Seren wiederum eine geringere Streuung zeigten.

Im Unterschied zur *Ov*GST3 löst das immundominante *Ov*20-Antigen eine signifikant stärkere IgG1-Antwort in Sowda-Seren (Titer des Median: 5000) im Vergleich zur generalisierten Form aus (Median: 2200). Der Titer der IgG4-Reaktion des *Ov*20-Antigens deutet auf keinen signifikanten Unterschied der beiden Formen hin. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine IgG4-Antwort zwar typisch für Wurmerkrankungen ist, aber auch charakteristisch für die Anwesenheit einer größeren Anzahl von Mikrofilarien im Körper. Dieser Befund bestätigt früher erhobene Ergebnisse (Mpagi *et al.*, 2000 a, b).

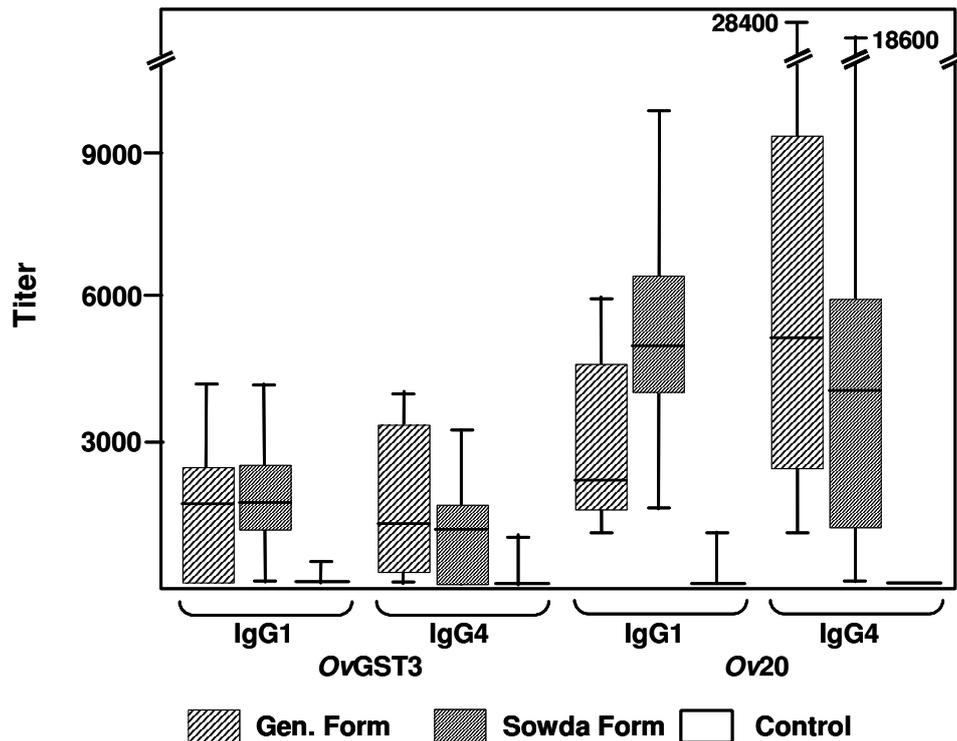


Abb. 4.7.2. IgG1- und IgG4-Antwort *O. volvulus*-infizierter Patienten mit hyperreaktiver (Sowda)- und generalisierter Form

IgG-Antworten auf die *OvGST3* von 77 Sowda und 40 generalisierten Seren, sowie 20 Kontrollseren. Detektiert wurden *OvGST3*- und *Ov20*-spezifische IgG1 und IgG4 Immunglobuline. Die Box-Plots zeigen 50 % der Messwerte der IgG-Antworten der jeweiligen Patientenserum (Titer = OD₄₅₀-Wert) mit 10 % und 90 % Perzentilen, die Punkte markieren die Messwerte außerhalb der Perzentile.

Demnach zeigen Patienten mit einer chronischen Sowda-Form der Onchozerkose keine stärker ausgeprägte Anti-*OvGST3*-Antikörperantwort im Vergleich zu Patienten mit einer generalisierten Form. Das immundominante *Ov20* hingegen löst bei beiden Formen eine verstärkte IgG-Immunität aus. Bei Patienten mit einer hyperreaktiven Form führt *Ov20* zu einer sehr starken IgG1-Antwort und einer weniger ausgeprägten IgG4-Antwort. Patienten mit einer generalisierten Form der Onchozerkose zeigen eine signifikant niedrigere IgG1-Immunität und eine tendenziell höhere IgG4-Antwort im Vergleich zu den Sowda-Seren.

4.7.3. Antikörperantwort gegen *OvGST3* von Onchozerkose-Patienten mit hoher und mit niedriger Mikofilarien-Dichte

Um zu klären, ob die Antikörperreaktion gegen die *OvGST3* von der Mikofilarien-Dichte (Mf-Dichte) abhängt, wurden die 117 Seren der Patienten, sowohl mit generalisierter als

auch mit hyperreaktiver Form, in zwei Gruppen mit hoher (von >96 Mf/mg Haut) und niedriger Mikrofilariendichte (von <10 Mf/mg Haut) untergliedert (Abb. 4.7.3.). Die IgG4-Immunantwort der 43 Seren mit hoher Mikrofilariendichte war signifikant höher als die der 74 Seren mit niedriger Mf-Dichte. Die Stärke der Reaktion des IgG1-Immunglobulins mit dem Antigen *Ov*GST3 war hingegen unabhängig von der Mikrofilariendichte und zeigte keinen signifikanten Unterschied ($P = 0,078$).

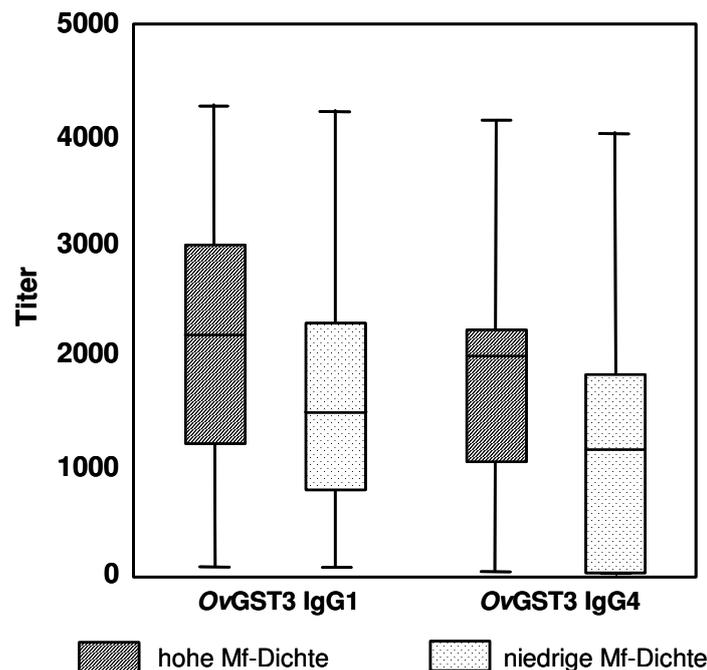


Abb. 4.7.3. IgG1 und IgG4-Antworten auf *Ov*GST3 in Seren von Onchozerkose-Patienten mit niedriger und hoher Mikrofilariendichte.

Untersucht wurden 117 Seren von Onchozerkose-Patienten bestehend aus 43 Seren mit hoher (> 96 Mf/mg Haut) und 74 mit niedriger Filariendichte (< 10 Mf/mg Haut). Auf die Darstellung der Kontrollseren wurde verzichtet. Die Box-Plots zeigen 50 % der Messwerte der IgG-Antworten der jeweiligen Patientenserum (Titer = OD₄₅₀-Wert) in den Rechtecken. Mittig ist der Median eingezeichnet. Die auslaufenden Balken zeigen die 10 % und 90 % Perzentile.

4.7.4. ELISA gegen *Ov*GST3 mit *O. volvulus* verwandter Filarien- und Trematoden infizierter Patientenserum

Die lichtmikroskopischen Befunde der *Ov*GST3 sprachen dafür, dass der Anti-*Ov*GST3-Antikörper möglicherweise mit Strukturen anderer Filarien reagiert. Es war daher von Interesse zu prüfen, ob Seren von Patienten, die mit einer anderen Filarien-Art infiziert waren, kreuzreagieren. Dazu wurden neben den 117 Seren von Patienten mit Onchozerkose und den 20 europäischen Kontrollseren, 103 Seren von nicht mit Onchozerkose infizierten Patienten untersucht. Von diesen waren 56 Patienten an

anderen Filarieninfektionen erkrankt, wie *M. perstans* (n=25), *W. bancrofti* (n=15) und *B. malayi* (n=8). Weiter waren 18 Seren mit dem intestinalen Nematoden *A. suum* infiziert.

Die Abbildung 4.7.4. zeigt, dass die untersuchten Seren im Unterschied zu den Kontrollseren zum Teil mit der *Ov*GST3 reagierten. Es konnten Kreuzreaktionen mit Seren von Patienten mit *M. perstans*-, *W. bancrofti*- und *B. malayi*-Infektionen festgestellt werden. Zu keiner Kreuzreaktion kam es bei Seren von Patienten, die mit *A. suum* infiziert waren.

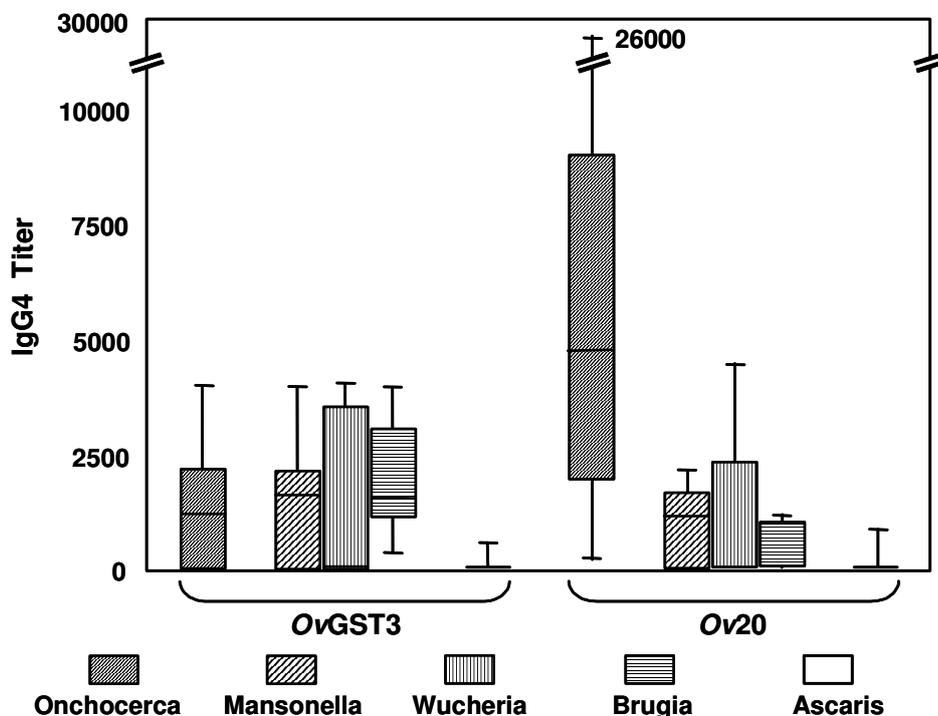


Abb. 4.7.4. ELISA mit Seren von mit *O. volvulus*, verwandten Filarien- oder intestinalen Nematoden-infizierten Patienten

IgG-Antworten auf die *Ov*GST3 in 117 Seren von Onchocerca-infizierten Patienten, davon 25 Seren mit *M. perstans*, 15 Seren mit *W. bancrofti*, 8 mit *B. malayi*, 18 mit *A. suum*. Detektiert wurden *Ov*GST3- und *Ov*20-spezifische-IgG1 und IgG4. Die Rechtecke der Box-Plots markieren den Bereich, indem sich 50 % der Messwerte der IgG-Antworten der jeweiligen Patientenserum (Titer = OD₄₅₀-Wert) befinden. Mittig ist der Median eingezeichnet und die auslaufenden Balken zeigen die 10 % und 90 % Perzentile.

Diese Ergebnisse decken sich zum Teil mit den Befunden der Immunhistologie. So wird die *Ov*GST3 nicht nur in Seren von *B. malayi*-infizierten Patienten erkannt, sondern auch der experimentelle Anti-*Ov*GST3-Antikörper aus dem Huhn reagierte mit Strukturen von *B. malayi*. Dies lässt auf das Vorkommen einer *Ov*GST3-homologen Struktur in dieser

nah-verwandten Filarien-Art schließen. Konträr dazu verhalten sich die Befunde von *A. suum*. Hier reagierten weder die Humanseren mit der *OvGST3*, noch gibt es positive immunhistologische Reaktionen der *OvGST3*-spezifischen Antikörper mit Strukturen des intestinalen Nematoden. Es konnten keine Kreuzreaktionen der *OvGST3*-Antikörper mit Geweben von *W. bancrofti* festgestellt werden. Die serologischen Befunde zeigen jedoch eine, wenn auch nur sehr vereinzelte, Reaktion der Seren von mit *W. bancrofti*-infizierter Patienten mit *OvGST3*. Zu *M. perstans* können keine histologischen Befunde zum Vergleich herangezogen werden.

Die serologischen Befunde zeigen, dass die Omega-Klasse von *O. volvulus* immunogene Aktivität besitzt, im Vergleich zum immundominanten *Ov20* jedoch mit geringer Spezifität und schwacher Sensitivität.

5. Diskussion

Onchocerca volvulus ist der Erreger der Flußblindheit. Fehlende makrofilariocide Medikamente bzw. Vakzine verhindern einen lang anhaltenden Schutz vor Infektionen mit dem Parasiten. Das Auftreten erster Resistenzen gegenüber dem einzig wirksamen mikrofilariziden Medikament Ivermectin macht es dringend notwendig, neue Ziele im Stoffwechsel des Parasiten für die Entwicklung von Chemotherapeutika zu finden (Ardelli und Pritchard, 2004).

GSTs gelten als immun- und chemotherapeutischer Angriffspunkt gegen Helminthen (Brophy and Pritchard, 1994; Salinas *et al.*, 1994; Riveau *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000). In allen auf GSTs hin untersuchten Arten konnten Vertreter dieser Enzymfamilie nachgewiesen werden, andere Phase II-Entgiftungsenzyme jedoch nicht (Brophy und Pritchard, 1994, Selkirk *et al.*, 1998). Ebenso können Phase I-Entgiftungsmechanismen, wie das Cytochrom P450-abhängigen Entgiftungssystem, welches in Säugern eine zentrale Rolle einnimmt, bei den Helminthen nicht nachgewiesen werden oder haben eine untergeordnete Funktion. GSTs nehmen also eine zentrale Stellung im xenobiotischen Metabolismus dieser Parasiten ein (Barrett, 1998; Precious und Barrett J, 1989).

Bedingt durch die parasitäre Lebensweise müssen sich Helminthen nicht nur mit den Sekundärmetaboliten der Wirtsnahrung und gegen sie eingesetzte Medikamente, sondern auch mit den Abwehrreaktionen des Wirtes auseinandersetzen (Brophy und Pritchard, 1992b). GSTs sind maßgeblich daran beteiligt, den Parasiten vor Wirtseffektormolekülen zu schützen und ermöglichen durch Modulation der Immunabwehr ein Persistieren im Wirt. Eine Neutralisation der GST-katalysierten parasitären Abwehrmechanismen durch Immun- und/oder Chemotherapeutika soll zu einem biochemischen Ungleichgewicht zugunsten des Wirtes führen und so eine Eliminierung des Parasiten bewirken (Brophy und Pritchard, 1994).

In *O. volvulus* sind bisher drei GSTs beschrieben und eine weitere nachgewiesen worden (Liebau *et al.*, 1994a, 1994b, 1994c, 1996, 1998, 2000). Dabei lässt sich feststellen, dass in parasitisch lebenden Organismen im Vergleich zu frei lebenden verhältnismäßig wenige GSTs nachgewiesen wurden. Bei dem frei lebenden Modellnematoden *C. elegans* sind bis dato 41 GSTs bekannt (van Rossum *et al.*, 2001) und Hayes *et al.* (2005) führt 24 der bis jetzt beschriebenen GSTs des Menschen auf.

Abgeschlossene Genomprojekte wie z.B. das von *B. malayi* deuten darauf hin, dass ungleich weniger GSTs in Parasiten vorkommen, die im Einzelnen eine umfangreichere und vielfältigere Funktion ausüben, als die vielen z.B. bei Säugetieren.

Aufgrund der zentralen Rolle der GSTs in parasitisch lebenden Organismen sind in dieser Arbeit die drei bekannten GSTs von *O. volvulus* strukturell sowie funktionell untersucht worden. Unterschiede zu den bekannten GSTs des Menschen sollten aufgezeigt werden, um so die Grundlage für die Entwicklung spezifischer Anthelminthika zu schaffen. Zudem sollte die noch zum Teil unbekannte immunogene Bedeutung der GSTs im humanen Immunsystem festgestellt werden.

5.1. Die Kristallstrukturanalyse der OvGST1

Die OvGST1 von *O. volvulus* ist in zahlreichen Studien untersucht worden (Wildenburg *et al.*, 1998; Liebau *et al.*, 1994; Krause *et al.*, 2001; Sommer *et al.*, 2001; Sommer *et al.*, 2003). Sie wird der Sigma-Klasse zugeordnet und ist strukturell eng verwandt mit den S-Kristallinen des Tintenfischs. Bislang einzigartig für GSTs ist, dass die OvGST1 ein Glykoprotein ist, welches ein Signalpeptid und eine 25 Aminosäure umfassende N-terminale Verlängerung besitzt (Sommer *et al.*, 2003). Aufgrund ihrer extrazellulären Lokalisation und ihrer Funktion als Glutathion-abhängige Prostaglandin D-Synthase (PGDS) stellt sie einen idealen Angriffspunkt für makrofilariocide Medikamente und die Vakzineentwicklung dar. Es wird postuliert, dass sie als Prostaglandin-Synthase in der Lage ist, Prostaglandine zu bilden und so möglicherweise mitverantwortlich für die Modulation der Immunantwort des Wirtes ist (Sommer *et al.*, 2003). Die genaue Charakterisierung der Struktur und der Beschaffenheit der Substratbindungstasche stellt eine essentielle Voraussetzung für die Entwicklung von Medikamenten dar.

Trotz erfolgreicher Kristallbildung konnte nur eine unvollständige Kristallstruktur der OvGST1 ermittelt werden. Ebenso erlaubte das Einsetzen von Schweratomen in den Prozess der Kristallisation kein vollständiges Entschlüsseln der Struktur.

Die bisherigen Befunde der von M. Perbandt (Universität Hamburg) durchgeführten Röntgenstrukturanalyse zeigt eine GST-typische dimere Struktur. Im Vergleich zur Prostaglandin D-Synthase der Ratte (PD: O35543, Kanaoka *et al.*, 1997) ist in Abbildung 5.1.1. zu erkennen, dass die Substratbindungstasche der OvGST1

wesentlich breiter, offener und für Liganden wesentlich leichter zugänglich ist, als die eher schmale Tasche der PGDS der Ratte. Dies ermögele ein Binden von größeren, aromatischen Verbindungen, was aufgrund der gefundenen Prostaglandin D2 Isomeraseaktivität wahrscheinlich ist. Die offensichtlichen strukturellen Unterschiede zwischen der *OvGST1* und der homologen GST von Säugetieren erlauben, wie auch bei der *OvGST2*, eine gezielte Entwicklung von spezifischen Wirkstoffen.

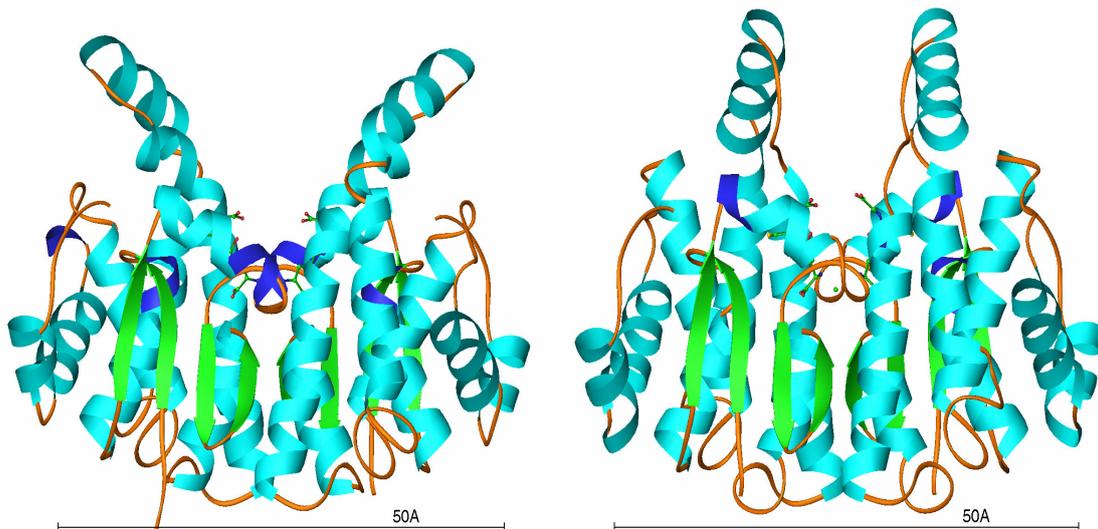


Abb. 5.1.1 Kristallstruktur der *OvGST1* und der Prostaglandin D-Synthase der Ratte

In weiterführenden Profilstudien könnten Substrat- und Inhibitorspezifitäten der Parasiten-GST und der homologen GST des Wirtsorganismus verglichen und die Unterschiede aufgezeigt werden. Ein Inhibieren der als Prostaglandin-Synthase wirkenden *OvGST1* könnte das Überleben des Parasiten im Wirt erschweren, indem die immunologischen Abwehrmechanismen des Wirts uneingeschränkt wirken könnten und so zu einer Eliminierung des Parasiten führen.

5.2. Die Kristallstrukturanalyse der *OvGST2*

Die *OvGST2* von *O. volvulus* ist erstmals von Salinas *et al.* 1994 beschrieben und von Liebau *et al.* (1996) charakterisiert worden. Sie wird strukturell der Pi-Klasse zugeordnet und funktionell wird ihr in *O. volvulus* eine „housekeeping“-Funktion zugesprochen. Sie ist zytosolisch und kommt in allen Geweben und Entwicklungsstadien von *O. volvulus* vor. Der hohe Anteil dieser GST von 0,1 % des gesamten Proteingehaltes eines adulten

Wurmes spricht für eine essentiell wichtige Funktion dieser GST im Parasiten (Liebau *et al.*, 1996). Es wird angenommen, dass sie Schutz vor toxischen Lipid-Peroxidationsprodukten bietet. Pi-Klassen GSTs spielen allgemein eine wichtige Rolle bei der Detoxifikation von zytotoxischen Substanzen. Insbesondere werden Pi-Klassen-GSTs für die Resistenzbildung gegen Tumor-Medikamente verantwortlich gemacht (Wang and Tew, 1985; Armstrong *et al.*, 1992; Townsend und Tew, 2003; Burg *et al.*, 2006).

Studien von Brophy *et al.* (2000) zeigen, dass die Selektivität der Pi-Klassen GST vom Parasiten gegenüber der vom Menschen um ein 25faches erhöht werden konnten, indem β -carbonyl-substituierte Glutathionkonjugate mit langen Ketten und sperrige Alkyl-Gruppen verwendet wurden.

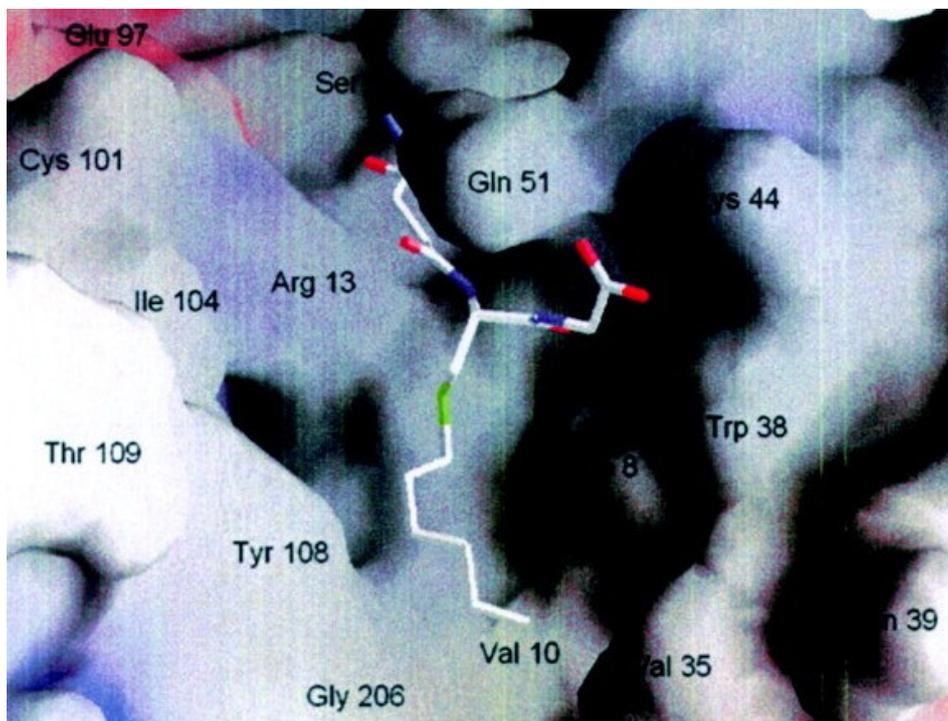


Abb. 5.1.2. Substratbindungstasche der humanen Pi-Klassen GST

Darstellung der Oberfläche des aktiven Zentrums der humanen Pi-Klassen-GST mit gebundenem S-Hexylglutathion.

Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse. In den Abbildungen 5.1.2. und 5.1.3. sind im Vergleich die Oberflächenstrukturen der Substratbindungstasche der humanen Pi-Klassen-GST sowie der *O1*GST2 dargestellt. Wie die Abbildungen zeigen, hat der Austausch von Arginin13 im humanen Enzym gegen Leucin13 im Parasiten einen entscheidenden Einfluss auf die Beschaffenheit der hydrophoben Bindungstasche. Dieser AS-Austausch führt zu einem größeren,

tunnelartigen Zwischenraum von ungefähr 40 \AA^3 und erlaubt ein Eindringen und Binden von größeren Ko-Substraten. Ebenso führt der Austausch des Isoleucin104 gegen ein Threonin102 zu einer zusätzlichen Erweiterung der Bindungstasche von 20 \AA^3 .

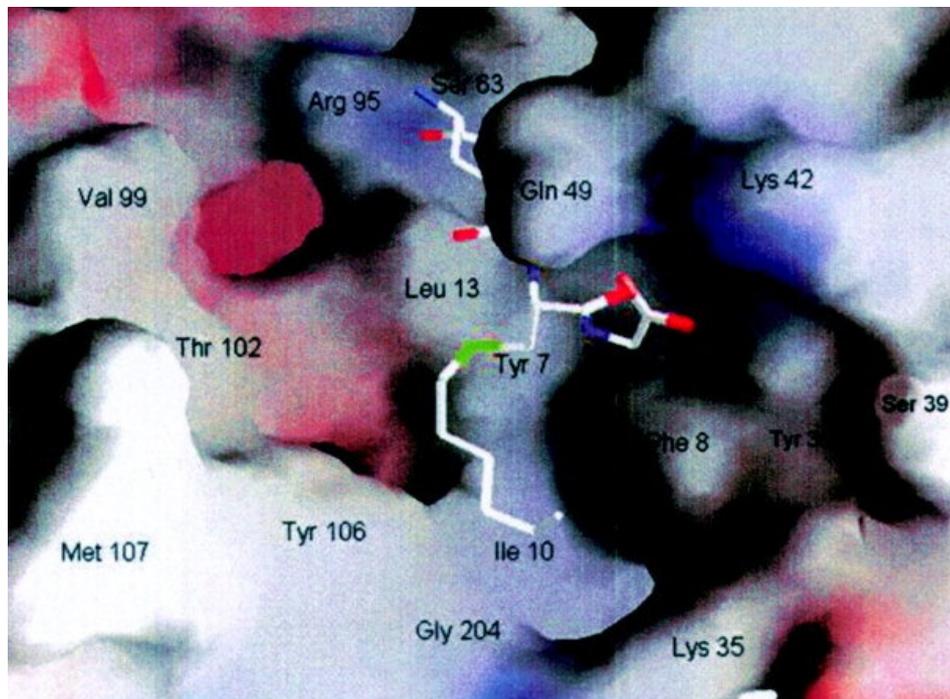


Abb. 5.1.3. Substratbindungstasche der *O1vGST2*

Darstellung des entsprechenden aktiven Zentrums der *O1vGST2* mit gebundenem S-Hexylglutathion. Auf der linken Seite ist in rosa die tunnelartige hydrophobe Bindungstasche markiert.

Da nur drei AS-Reste der Substratbindungstasche bei der *O1vGST2* im Vergleich zur humanen GST konserviert sind, können diese strukturellen Unterschiede für die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren genutzt werden.

Die Kenntnisse der dreidimensionalen Struktur von Proteinen haben in der Vergangenheit die Entwicklung einer Vielzahl von Wirkstoffen ermöglicht (Kleinert *et al.*, 1992, Renin-Inhibitor; Webber *et al.*, 1993, Thymidylat-Synthase-Inhibitor; Borkakoti *et al.*, 1994 Kollagenase-Inhibitor; Vara Prasad *et al.*, 1999, HIV Protease-Inhibitor). So basiert die Entwicklung des Influenza-Medikamentes Tamiflu auf Röntgenstrukturanalysen der Serin-Protease (Hilpert *et al.*, 1994; Veale *et al.*, 1995 a, b). Die erstellte dreidimensionale Struktur der *O1vGST2* ermöglicht für die Bekämpfung der Onchozerkose eine Entwicklung und Entdeckung von wirksamen antifilariziden Medikamenten. Aufgrund der ubiquitären Expression dieser GST in allen Geweben und Stadien von *O. volvulus* ist anzunehmen, dass ein Inhibieren zu einer molekularen

Inbalance zugunsten des humanen Wirtes führen könnte und damit langfristig zu einer Eliminierung der Filarien-Infektion.

5.3. Die *Ov*GST3 und ihr Vergleich zu anderen Omega-GST

Untersuchungen von Abwehrmechanismen und Entgiftungssystemen haben gezeigt, dass involvierte Enzyme sich durch eine verstärkte Expression auszeichnen. Induktion zellulärer Entgiftungsenzyme wird eine Resistenz-vermittelnde Wirkung gegenüber oxidativen Stress zugesprochen. Dabei gilt den Enzymen ein besonderes Interesse, die bei der Verteidigung gegen toxischen Oxidantien Einfluss nehmen, die während der Immunantwort des Wirts auf den Parasiten wirken. So wird der *Ov*GST3 von *O. volvulus* aufgrund der stark induzierten Expression unter oxidativen Stressbedingungen eine besondere Rolle bei der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies zugesprochen (Liebau *et al.*, 2000).

Die *Ov*GST3 wird in die erstmals im Jahr 2000 von Board *et al.* beschriebene Klasse der Omega-GSTs geordnet. Diese Klasse zeichnet sich durch diverse Merkmale aus, die sich von den übrigen GSTs grundlegend unterscheiden. Charakteristisch für diese Klasse ist die zu anderen GSTs vergleichsweise niedrige 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzol (CDNB)-Aktivität. Desweiteren zeichnen sich Omega-GSTs durch eine GST-untypische Glutathion-abhängige Thiol-Transferase-Aktivität aus, sowie durch die Fähigkeit die Glutathion-abhängige Reduktion von Dehydroascorbat zu katalysieren (Board *et al.*, 2000). Dies sind charakteristische Eigenschaften, die für Thioredoxine und Glutaredoxine gelten und auf ein Cystein in der N-terminalen Domäne zurückzuführen sind (Washburn und Wells, 1999). Dieses Cystein ist essentiell für die katalytische Aktivität von Thioltransferasen und findet sich bei allen Omega-GSTs an äquivalenter Position wieder. Das Cystein erzeugt hier ein nukleophiles Zentrum und bewirkt, dass die Omega-GSTs aufgrund einer kovalenten Bindung zum GSH als gemischtes Disulfid vorliegt. Zusammen mit den flankierenden Aminosäuren Phenylalanin (F31/F61) und Prolin (P33/P63), die stabilisierend auf die Thiol-Formation wirken, formt sich das konservierte und ausschließlich bei den Omega-GSTs vorkommende „FCP“-Motiv (Kortemme und Creighton, 1995).

Den anderen zytosolischen GSTs fehlt dieses zentrale Cystein. Bei ihnen wirken Tyrosin- bzw. Serinreste stabilisierend auf das GSH, die essentiell für deren katalytische Aktivität sind. Mutationen des Cystein im aktiven Zentrum führen zu einer Inaktivierung (Shan und Armstrong, 1994). Dies lässt auf eine andere Funktionsweise der Omega-Klassen-GSTs schließen.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal der Omega-GSTs zeigt sich durch eine GST-untypische, offene V-förmige Konformation der GSH-Bindungstaschen (Board *et al.*, 2000). Die verantwortlichen Aminosäuren sind auch bei der *OvGST3* vorhanden und haben Einfluss auf die Wechselwirkung der Untereinheiten des katalytisch aktiven Dimers und führen zu einer größeren und leichter zugänglichen GSH-Bindungsstelle (Sheehan *et al.*, 2001). Diese Unterschiede deuten auf ein Omega-GST-spezifisches GSH-Bindungsverhalten hin und können die fehlende Bindungskapazität der *OvGST3* an die GSH-Sepharose erklären, die auch für die humane GSTO 1-1 von Board *et al.* (2000) und für die Omega-GST von *C. elegans* beschrieben ist (Burmeister, unveröffentlicht).

Zusätzlich fehlen den Omega-GSTs weitere Wechselwirkungen mit GSH und der N-terminalen GSH-bindenden Domäne, die bei anderen GST-Klassen von sauren AS-Resten der Helix 4 der zweiten Domäne ausgebildet werden (Board *et al.*, 2000). Bei Omega-GSTs sind korrespondierende Reste durch basische Aminosäuren (*OvGST3/GSTO 1-1*: R134/L122) ausgetauscht. Auch innerhalb der Omega-Klasse können in diesem Bereich signifikante Unterschiede gefunden werden. Die Deletion von drei Aminosäuren bei der humanen GSTO 1-1 und die Untergliederung der „Helix 4“ in zwei α -Helices (Helix 4 und 5) bei der Omega-GST von *O. volvulus* sprechen für ein anderes Bindungsverhalten zum GSH und lassen unter Umständen auf unterschiedliche Funktionsweisen beider Enzyme schließen.

Die Substratbindungstasche der GSTs zeichnet sich durch ihren überwiegend hydrophilen Charakter aus. Bei der GSTO1-1 ist unter anderem die Aminosäure Arginin an Position 183 dafür verantwortlich. Sie ist bei der *OvGST3* an äquivalenter Position (R-206) konserviert. Der sich dadurch bildende große Zwischenraum der beiden Untereinheiten der dimeren Struktur und die relativ polare Natur der Substrattasche der Omega-GSTs lassen vermuten, dass Substrate oder Bindungspartner wesentlich größer sind. Die Bindungstasche wäre breit genug, um auch mit anderen Proteinen als

Bindungspartner interagieren zu können und so unter Mitwirkung von GSH regulatorisch auf Protein-Protein-Interaktionen zu wirken (Board *et al.*, 2000).

All diese Abweichungen der GSH-Bindungstasche sowie die andere Beschaffenheit der hydrophilen Substratbindungstasche zu den übrigen zytosolischen GSTs bestätigen, dass die Omega-GSTs nicht die für GSTs kennzeichnende GSH-Konjugationsreaktion katalysieren, sondern für andere Thiolierungsreaktionen verantwortlich sind. Die strukturellen Homologien zu Thioltransferasen lassen vermuten, dass auch die *O*VGST3 mit dem ebenfalls nachzuweisenden „FCP“-Motiv als Thioltransferase aktiv ist. Dies wird durch den Befund der zur *O*VGST3 homologen Omega-GST von *C. elegans* (C29E4.7) bestätigt, die Thioltransferase-Aktivität und Dehydroascorbat-Reduktase-Aktivität aufweist. (Burmeister, unveröffentlicht).

Ein weiterer Unterschied der Omega-GSTs zu den anderen GST-Klassen liegt in einer N-terminalen Verlängerung von 19 bis 20 Aminosäuren (Board *et al.*, 2000; Sommer, 2000; Sheehan *et al.*, 2001). Die Analyse dieses N-terminalen Bereiches weist auf ein potenzielles Signalpeptid und auf eine extrazelluläre Lokalisation der *O*VGST3 hin. Ein direkter Beweis für das Vorliegen einer Signalpeptidsequenz konnte bislang nicht erbracht werden. Für andere Omega-GSTs wurden bisher keine Signalpeptidsequenzen beschrieben.

Als exkretorisch-sekretorisches Protein mit Glutathion-abhängiger Thioltransferase-Aktivität käme der *O*VGST3 eine neue Bedeutung zu. Durch oxidativen Stress kommt es unter anderem zu S-Thiolierung diverser Proteine und Membrankomponenten. Diese Reaktion führt zur Bildung gemischter Disulfide, die Substrate der *O*VGST3 darstellen können. Cysteinreste von Proteinen bilden unter oxidativen Stressbedingungen mit unterschiedlichen niedermolekularen Thiolen, wie GSH und Cystein, Schwefelbindungen aus, was oft zu einem Funktionsverlust essentiellerer Proteine führt (Ravichandran *et al.*, 1994; Jahngen-Hodge *et al.*, 1997). Die Funktion der S-Glutathionylierung inaktiviert nicht nur Enzyme, sondern wirkt auch regulatorisch auf Enzymaktivitäten, bietet Schutz vor irreversiblen oxidativen Schädigungen, stellt einen generellen Thiol/Disulfid-Redoxpuffer dar, ist für die Stabilisierung extrazelluläre Proteine verantwortlich und kontrolliert die Signaltransduktion durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Ziegler, 1995; Deneke, 2000). Als eine Glutathion-abhängige S-Thioltransferase könnte die *O*VGST3 eine Schutzfunktion ausüben oder regulatorisch auf Proteine wirken, die sich auf der Parasiten-Oberfläche befinden.

5.4. Spleißprozesse und deren Bedeutung für die *OvGST3*

In dieser Arbeit konnten 14 verschiedene Spleißvarianten der *OvGST3* nachgewiesen werden, die sowohl auf trans- als auch auf alternative Spleißprozesse zurückzuführen sind. Auf Proteinebene konnten jedoch im Western-Blot von *O. volvulus*-Extrakten diese Spleißvarianten nicht nachgewiesen werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass es sich bei den aufgeschlossenen Würmern um ungestresste Individuen handelte. Unter normalen physiologischen Bedingungen liegt die Transkriptmenge der *OvGST3* weit unterhalb der der *OvGST1* und *OvGST2* (Liebau *et al.*, 2000) und befindet sich damit möglicherweise unter der Nachweisgrenze der angewandten Western Blot-Methode. Erst durch Xanthin/Xanthin-Oxidase verursachter Stress führt zu einem extrem starken Anstieg (ca. 125-fach) der mRNA Menge (Liebau *et al.*, 2000). Das hat unter Umständen zur Folge, dass Stressbedingungen zu einer messbaren Transkriptmenge führen oder aber erst durch diese Stressbedingungen die unterschiedlichen Spleißprodukte gebildet werden. Diese Vermutungen lassen sich erst durch Untersuchung von Xanthin/Xanthin-Oxidase gestressten *O. volvulus*-Würmern klären.

Alternatives Spleißen

Eine Besonderheit der *OvGST3* ist der Nachweis eines alternativen Spleißbereiches. Die Beschreibung von Sommer *et al.* (2000) und Kampkötter *et al.* (2004) von drei durch alternative Spleißprozesse entstandenen Transkripten konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (siehe Abschnitt 4.3.2). Diese Befunde deuten auf eine mögliche funktionelle Diversität der *OvGST3* und einer damit verbundenen variierenden physiologischen Funktion dieser GST in *O. volvulus*.

Die weiterführenden Untersuchungen von *OvGST3*-Transkripten auf cDNA-Ebene stellen einen erweiterten Spleißbereich fest, der nicht nur Exon V, sondern auch Exon IV umfasst. Das Thioredoxin- bzw. Glutaredoxin-spezifische „FCP“-Motiv der GSH-Bindung bleibt vom alternativen Spleißprozess unbeeinflusst, die für die Stabilisierung der GSH-Bindung essentiellen AS-Reste gehen jedoch verloren (siehe Abb. 4.3.1.). Der Spleißprozess verursacht zudem eine strukturelle Änderung der hydrophoben Bindungstasche und beeinflusst die Positionierung der für die Dimerisierung verantwortlichen Aminosäuren. Dies könnte bedeuten, dass sich aufgrund alternativen

Spleißens die GSH-bindenden Eigenschaften der *OvGST3* ändern, die Substratspezifität eine andere ist und die Bildung einer dimären Struktur nicht mehr gegeben ist.

Im Gegensatz dazu führt eine sogenannte Intron-Retention (Ladd and Cooper, 2002) des Introns V zu einer frühzeitigen Unterbrechung des offenen Leserahmens und zur Bildung einer GST, bei der die gesamte C-terminale Domäne und damit die Substratbindungstasche fehlt. Die Ausbildung einer dimeren Struktur wäre aufgrund fehlender Bindungspartner nicht mehr möglich und das Enzym würde als Monomer vorliegen. Dieses 19 kDa-große Protein besäße nur die GSH-Bindungstasche. Es entspräche genau dem Bereich, der für die meist um 12 kDa große Thioltransferasen typische tertiäre $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ -Struktur kodiert und das konservierte „FCP“-Motiv besitzt (Katti *et al.*, 1995). Ein verkürztes Enzym mit ausschließlicher Thioltransferase-Aktivität wäre für die Intron-Retention-gespleißte *OvGST3* denkbar.

Alternative Spleißprozesse sind für eine Vielzahl von Proteinen in Nematoden beschrieben worden (Shiwaku und Donelson, 1995; Blumenthal, 1998; Denton *et al.*, 2004). Eine vergleichbar große Vielfalt von Spleißvarianten einer GST, die für *OvGST3* gezeigt werden konnte, wurde bisher nicht gefunden. Alternatives Spleißen von GSTs ist bis jetzt nur bei *Anopheles*-Arten und bei Menschen beschrieben worden.

A. gambiae besitzt eine Sigma-Klassen-GST, die in zwei alternativen Spleißformen translatiert wird. Von einer weiteren GST von *A. gambiae* sowie einer Delta-Klasse GST von *A. dirus* werden jeweils vier alternativ gespleißte GST-Varianten gebildet (Ding *et al.*, 2003; Udomsinprasert *et al.*, 2004). Die vier Isoformen der Delta-Klasse von *A. dirus* zeigen geringfügige Veränderungen des aktiven Zentrums und führen aber zu gravierenden Unterschieden in der Enzymaktivität. Nur zwei von 44 AS-Resten sind für diese Unterschiede verantwortlich (Wongsantichon und Ketterman, 2005). Udomsinprasert *et al.* (2004) beschreiben, dass diese Isoformen der Delta-GST von *A. dirus* eine regulatorische Funktion auf die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) der Signaltransduktionskaskade hat. Die unterschiedlichen GST-Spleißvarianten zeigen zum einen verschiedene katalytische Funktionen, zum anderen regulieren sie auf unterschiedliche Weise den JKN-Signaltransduktions-Weg und wirken so regulatorisch auf Transkription, Gen-Expression, Zelldifferenzierung und Apoptose.

Der Prozess des alternativen Spleißens ist in höheren Eukaryoten weit verbreitet und führt zu einer Erhöhung der funktionellen Diversität von Proteinen. Im Menschen werden zwischen 30 und 60 % der humanen Gene alternativ gespleißt (Lee *et al.*, 2003) und führen so zur hohen funktionellen Komplexität des menschlichen Genoms. Das Vorkommen einer hohen Spleißvariation kann am Beispiel eines Zelloberflächenproteins von *Drosophila melanogaster* gezeigt werden. Dieses Protein ist in neuronale Konnektive involviert und wird von 38 unterschiedlichen mRNA-Isoformen gebildet, deren Ursprung auf einem einzelnen Gen liegen. (Neves *et al.*, 2004; Wojtowicz *et al.*, 2004).

Die Bildung unterschiedlicher Isoformen eines Enzyms ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Zum einen kann sie zelltypabhängig sein, dabei können exprimierte SR-Proteine (SR: „splice regulatory“) an spezifische Sequenzbereiche binden und dort den Zusammenbau von Spleißosomen fördern. Oder aber zellspezifische Proteine können Spleißstellen besetzen und die Ausbildung von Spleißosomen verhindern (Reed, 2000). Alternatives Spleißen kann auch über die Geschlechtsbestimmung wie bei *Drosophila* und *C. elegans* entscheiden (McKeown, 1992; Tian und Maniatis, 1993). Auch können Änderungen exogener Parameter, wie Temperatur, oxidativer Stress u.a. diesen Prozess beeinflussen (Ladd und Cooper, 2002). So nimmt ein Gen durch die sich bildenden Isoformen eine Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen im jeweiligen Organismus ein. Dieses könnte auch für die *OvGST3* gelten.

Bindungsstellen für unterschiedliche Spleißfaktoren, die im Intronbereich vorkommen (Buckanovich und Darnell, 1997; Brudno *et al.*, 2001; Ladd und Copper, 2002) konnten jedoch in der Gensequenz der *OvGST3* nicht nachgewiesen werden. Grund dafür mag das fehlende Wissen und Verstehen über die überaus komplexen Spleißprozesse sein, die je nach Organismus, Zellzusammenschluss, Zelltyp und Differenzierungsstatus reguliert und verändert werden. Sich ändernde Umweltbedingungen wirken zusätzlich auf den Expressionszustand der Zelle (Ladd und Cooper, 2002).

Trans-Spleißen

Zu dem alternativen Spleißen konnte in dieser Arbeit eine Spleißsequenz (SL) nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um die SL1-Sequenz bestehend aus 24 Nucleotiden, die sich an das 5'-Ende der prä-mRNA lagert. Für die *OvGST3* konnten

fünf solcher Initiationsstellen nachgewiesen werden, die unter anderem die Translation des potenziellen Signalpeptids bestimmen. Bei diesem Vorgang des intermolekularen Spleißens (Trans-Spleißens) wird die Intronsequenz der prä-mRNA nicht über eine Lasso-Struktur wie beim intramolekularen Standard-Spleißvorgang entfernt und das 5'-Exon mit dem 3'-Exon verbunden, sondern das Mini-Exon (SL) wird über eine Y-förmige Struktur mit dem 3'-Exon verbunden und die Intronsequenz von den stromaufwärts befindlichen Exonstrukturen abgetrennt. Die entstehende mRNA wird so durch die Integration der SL-Sequenz an speziellen SL-Initiationsstellen am 5'-Ende gekürzt.

Dieses Trans-Spleißen ist erstmals 1984 von Milhausen *et al.* für Typanosomen beschrieben worden, später auch für Nematoden (Krause und Hirsh, 1987, Takacs *et al.*, 1988; Zeng *et al.*, 1990), Trematoden (Rajkovic *et al.*, 1990) und Euglena (Tessier *et al.*, 1991). Nach Ferguson und Rothman (1999) werden 70% der translatierten mRNA des Nematoden *C. elegans* trans-gespleißt.

5.5. Immunhistologische Befunde und deren Interpretation

Die Lokalisation der O_vGST3 in der Eihülle war ein überraschendes Ergebnis, da dieser GST aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen eine Schutzfunktion vor extrazellulären vom Immunsystem ausgelösten oxidativem Stress zugesprochen wurde (Liebau *et al.*, 2000).

Dass es sich bei der Detektion um eine O_vGST3-spezifische Reaktion handelt, verdeutlichten mehrere Befunde. So bestätigte die MALDI TOF-Analyse, dass es sich bei dem für die Huhn-Immunsierung eingesetzten Protein um die rekombinant exprimierte O_vGST3 handelte (siehe Abschnitt 4.4.). Die Spezifität des hergestellten Antikörpers wurde durch die Reaktion des Prä-Immuneidotters mit *O. volvulus*-Schnitten deutlich. Zudem war die starke Markierung der Eihülle sowohl mit dem isolierten, als auch mit dem affinitätschromatographisch aufgereinigten Antikörper bis zu einer Verdünnung von 1:5000 nachzuweisen.

Ebenso konnten Kreuzreaktionen mit für *E. coli* spezifischen Proteinen ausgeschlossen werden, die aufgrund unvollständiger Entfernung von *E. coli*-Proteinen während der Aufreinigung aus dem *E. coli*-Zell-Pellet mit in die Immunsierung hätten eingebracht

werden können. Die affinitätschromatographisch aufgereinigten Antikörperfraktionen zeigten keine Reaktionen mit Proteinen des für die Expression verwendeten *E. coli*-Stamms. Der fehlende Nachweis der *Ov*GST3 in Schnitten von *O. flexuosa* führte zur Vermutung einer Wolbachien-abhängigen Reaktion mit dem Anti-*Ov*GST3-Antikörper. Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden. Der fehlende Nachweis der *Ov*GST3 in der Hülle bei *O. flexuosa*, die keine Symbiose mit Endobakterien aufzeigen (Brattig *et al.*, 2001), findet jedoch keine Klärung.

Eine Bestätigung für eine Lokalisation der *Ov*GST3 in der Eihülle von *O. volvulus* gibt der Befund von Li *et al.* (2004). Hier zeigten Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen („yeast two-hybrid“-Screening) in *C. elegans*, dass das Eihüllenprotein y47D7A.13 (Kamath *et al.*, 2003) mit der Omega GST K10F12.4 von *C. elegans* interagiert. Die Funktion dieser zur *Ov*GST3 nur zu 21 % identischen GST ist bisher jedoch unbekannt.

Detektion der *Ov*GST3 in der Eihülle

Die Lokalisation der *Ov*GST3 beschränkte sich weitestgehend auf die Eihülle der sich entwickelnden Embryonen. Dieser Befund konnte in licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen festgestellt werden. Die Markierung war unabhängig von der Art der Behandlung der Würmer und wurde sowohl in unbehandelten, als auch in mit Doxycyclin, Ivermectin oder Suramin behandelten Wurmern lichtmikroskopisch nachgewiesen. Demnach war die Markierung der Eihülle unabhängig vom durch Xenobiotika ausgelösten Stresszustand des Wurms. Ebenso deutete der fehlende Nachweis des Hitzeschockproteins Hsp60 auf eine Stress-unabhängige Detektion der Eihülle hin (Abb. 4.6.3.). Bei männlichen Filarien sowie bei den im humanen Wirtsgewebe befindlichen Mikrofilarien konnte keine Detektion der *Ov*GST3 festgestellt werden.

Der Stress-unabhängige Befund deutet auf eine konstitutive Expression der *Ov*GST3 in der Eihülle hin. *Ov*GST3-ähnliche Strukturen in Eihüllen von anderen *Onchocerca*-Arten, mit Ausnahme von *O. flexuosa*, reagierten ebenfalls mit dem entwickelten Antikörper und führten zu einer Detektion. Das Vorkommen von Omega-GSTs in anderen *Onchocerca*-Arten ist bisher nicht beschrieben worden, aber wahrscheinlich. Sowohl in der zu *O. volvulus* nahe verwandten Art *B. malayi* (Gundlach und Liebau,

persönliche Mitteilung) und *S. masoni* (Girardini *et al.*, 2002), als auch in dem freilebenden Nematoden *C. elegans* konnten GSTs dieser Klasse nachgewiesen werden (Board *et al.*, 2000). Es kann vermutet werden, dass Omega-GSTs anderer *Onchocerca*-Arten ähnliche Epitope darstellen, die von dem eingesetzten Antikörper erkannt werden und so zur Detektion von diesen Strukturen führten.

Mögliche enzymatische Funktion der OvGST3 in der Eihülle

Eine enzymatische Schutzfunktion vor oxidativem Stress wäre denkbar, würde sich jedoch auf den Schutz des Embryos vor möglichen oxigenen Bedingungen im Uteruslumen beschränken.

Da jedoch die Eihülle der nahe verwandten, gescheideten Filarienart, *B. malayi* ebenfalls eine Reaktion mit dem Anti-OvGST3-Antikörper eingeht, könnte angenommen werden, dass die Funktion ursprünglich für gescheidete Mikrofilarien von Bedeutung war. Die GST hätte in diesem Fall die Funktion, die Mikrofilarien vor immunogenen Angriffen des Wirtsorganismus zu schützen. Für die ungescheideten Mikrofilarien der *Onchocerca*-Arten wäre diese Aufgabe einer GST nicht mehr gegeben, aber als Relikt erhalten geblieben, mit einer möglicherweise geänderten Funktion.

Die fehlende Markierung der Eihülle von anderen, nicht zu den *Onchocerca* gehörenden Filarien, lässt auf eine Abwesenheit einer Omega-GST-ähnlichen Struktur schließen oder das Epitop wird vom OvGST3-spezifischen Antikörper nicht erkannt. Gleiches gilt für *A. suum* und *S. manoni*. Die Lokalisation der Mikrofilarien im Wirt, ob im Blut oder in der Haut, kann nicht mit der Markierung der Eihülle in Zusammenhang gebracht werden. Die Eihülle von *B. malayi* reagiert mit dem Anti-OvGST3-Antikörper, deren Mikrofilarien gescheidet im Blut vorkommen, wohingegen die Eihülle von *L. sigmodontis* (ebenfalls mit einer gescheideten im Blut vorkommenden Mikrofilarie) nicht markiert ist.

Im Hinblick auf die Thioltransferase-Aktivität der Omega-GSTs könnte der OvGST3 eine regenerierende Funktion von S-thiolierten Proteinen zugeordnet werden. So konnten Qiao *et al.* (2001) zeigen, dass die rekombinant exprimierte humane Linsen-Thioltransferase (RHLT) *in vitro* Dethiolase-Aktivität besitzen. Die durch Cystein-Thiolierung inaktivierte GST und Glutathionperoxidase (GPx) wurde effizient durch die Aktivität der RHLT wieder regeneriert. Ebenso war diese Thioltransferase in der Lage, die Aktivität einer durch Oxidation inaktivierten Glycerinaldehyd-3-Phosphatase-

Dehydrogenase (G-3PD) in H₂O₂-ausgesetzten Linsen-Epithelzellen zu regenerieren. Es wird vermutet, dass es unter oxidativen Stressbedingungen zu Schädigungen in der G-3PD-Struktur kommt, indem sich Protein-Thiole bilden, die aus gemischten Disulfiden bestehen. Die Thioltransferase RHLT trennt bei Anwesenheit von GSH die Protein-Thiole und reaktiviert die durch oxidativen Stress geschädigte Dehydrogenase (Qiao *et al.*, 2001). Ähnliches wird für weitere Thioltransferasen beschrieben, die Protein-Protein-Disulfide reduzieren und so Proteine vor oxidativen Schäden schützen (Holmgren, 2000).

Eine Schwefelbrücken-trennende Funktion könnte auch der *OvGST3* zukommen. Oxidative Bedingungen könnten den Prozess der Eihüllenbildung negativ beeinflussen. Eine GSH-abhängige Thiol/Disulfid-bildende Funktion der *OvGST3* würde zum einen unter oxidativen Bedingungen die Aufrechterhaltung der Aktivität Cystein-haltiger Enzyme gewährleisten, die am Aufbau der Eihülle beteiligt sind. Zum anderen wäre es denkbar, dass die *OvGST3* mit einer Thioltransferase-Aktivität bei der kontrollierten Ausbildung von Disulfidbrücken während der Eihüllenbildung beteiligt ist; eine Vermutung, die auf dem Befund von Bardehle *et al.* (1992) beruht. Sie postulieren, dass Disulfidbrücken die Hauptrolle bei Quervernetzungen der Scheiden-Komponenten von Mikrofilarien bei *B. malayi* spielen. Bardehle *et al.* (1992) beschreiben, dass 2 % des Scheiden-Trockengewichtes aus Cystein/Cystin bestehen, was ebenfalls für einen hohen Anteil von Disulfidbrücken in der Scheide spricht. Nach Zaman (1987) sind gescheidete Mikrofilarien von *B. malayi* ähnlich aufgebaut, wie die Eihülle des Parasiten. *Onchocerca*-Arten besitzen jedoch ungescheidete Mikrofilarien und lassen aufgrund der fehlenden Scheide auch keine Detektion der *OvGST3* bei Mikrofilarien erkennen. Die Detektion der Eihülle von *B. malayi* und der Nachweis einer zur *OvGST3* homologen Genstruktur von *B. malayi* lassen vermuten, dass auch diese Filarienart eine Omega-GST mit ähnlichen Epitop-Eigenschaften besitzt, die den immunhistologischen Nachweis der *OvGST3* bei *B. malayi* erklären.

Mögliche strukturelle Funktion der *OvGST3* in der Eihülle

Eine andere denkbare Funktion der *OvGST3* mit Lokalisation in der Eihülle wäre die einer strukturellen Aufgabe. Das bekannteste Beispiel für solch eine Strukturfunktion stellt das S-Kristallin dar. Dieses Protein bildet den Hauptanteil der transparenten,

refraktiven Linse der Cephalopoden und zeigt über 40 % Identität zu Sigma-Klassen GSTs sowie GST-Aktivität (Ji *et al.*, 1995; Tomarev und Piatigorsky, 1996). Ebenso deutet die schon erwähnte Sequenzübereinstimmung eines Chlorid-Kanals des Zellkerns, NCC27 (CLIC1), zur humanen GSTO 1-1 auf die Möglichkeit, dass GSTs die Eigenschaft besitzen könnten, Ionenkanäle zu bilden und so eine strukturelle Funktion zu übernehmen (Dulhunty *et al.*, 2001).

Da über den genauen strukturellen Aufbau der Eihülle von *O. volvulus* bisher wenig bekannt ist, kann eine mögliche Strukturfunktion dieser GST in der Hülle nur schwer erklärt werden. Für Nematoden wird allgemein eine aus drei primären Schichten aufgebaute Eihülle beschrieben, die von dem jungen Embryo gebildet wird (MacKinnon, 1987). Die erste sich bildende Schicht stellt die Vitellin-Schicht dar. Sie formt später die äußere Struktur der Eihülle. Innerhalb dieser bildet sich eine Chitin-Schicht, wobei das Chitin bei Filarien im Laufe der weiteren Entwicklung wieder entfernt wird (Fuhrman und Piessens, 1985; Brydon *et al.*, 1987). Die innere Lipid-Schicht, die elektronendichte Basalschicht, enthält Lipide und Proteine.

Um eine gewisse Permeabilität für Nährstoffe und vor allem Sauerstoff zu gewährleisten, besitzt die Eihülle diverse Strukturen, die einen Stoffaustausch ermöglichen (Wharton, 1980; 1983). Hierbei könnte die *OvGST3* eine strukturelle Funktion einnehmen. Die *OvGST3* würde von Embryonalzellen gebildet und abgegeben werden. Die Markierung der Eihülle zu einem sehr frühen Zeitpunkt des Entwicklungszyklus spricht für eine Lokalisation der *OvGST3* in der Vitellin-Schicht. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen deuten jedoch eher auf eine zur Basalmembran orientierte Lokalisation hin. Die Detektion der Goldpartikel scheint sich auf die innere Schicht, die Lipid-Schicht, zu beschränken. Eine genaue Aussage lässt sich auf der Basis dieser EM-Untersuchungen aufgrund der sehr dünnen Eihülle jedoch nicht treffen.

Detektion der *OvGST3* in Hypodermis und Uterusepithel

Eine Detektion in der Hypodermis und dem Uterusepithel durch den eingesetzten Anti-*OvGST3*-Antikörper kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Diese Befunde können unterschiedliche Ursachen haben.

Einen großen Einfluss hatte die Stärke der Verdünnung des eingesetzten Antikörpers. Die variierenden Konzentrationen des eingesetzten Antikörpers führten vermutlich zu einer veränderten Sensitivität und unter Umständen auch Spezifität.

Die regelmäßige Detektion der Eihülle in allen untersuchten Schnitten, unabhängig von der Fixierungsmethode des untersuchten Materials, sprechen gegen eine methodisch verursachte Variation der Ergebnisse. Eher könnten unterschiedliche Stoffwechselbedingungen verantwortlich sein, die in den jeweils untersuchten Würmern zum Zeitpunkt der Fixierung herrschten. Möglicherweise handelte es sich bei der Markierung von Hypodermis und Uterusepithel um die unterschiedlichen Spleißvarianten, deren Expression durch spezifische Faktoren induziert werden. Es konnte jedoch keine Abhängigkeit der Markierung der jeweiligen Organe von der Behandlung der Würmer (unbehandelt, mit Doxycyclin, Ivermectin, Suramin behandelt), vom Alter der jeweils untersuchten Würmer oder von anderen Faktoren, wie z.B. Herkunft der Individuen, festgestellt werden.

Um Aufschluß über die Lokalisation der *OvGST3* in weiteren Geweben zu erlangen, könnten in weiterführenden Untersuchungen weitere spezifische *OvGST3*-Antikörper gebildet werden, die eine Unterscheidung der einzelnen Spleißvarianten ermöglichen.

Interpretation der immunhistologischen Befunde der *OvGST3* unter Berücksichtigung der Spleißvarianten

Unter Berücksichtigung der nachgewiesenen Spleißvarianten könnte, wie schon diskutiert, der *OvGST3* eine vielfältige Funktion zukommen. Da die untersuchten Würmer nicht dem durch Xanthin/Xanthin-Oxidase ausgelösten oxidativen Stress ausgesetzt waren, kommt es möglicherweise zu keiner Bildung der unterschiedlichen Spleißvarianten. Nachzuweisen sind nur konstitutiv exprimierte Varianten, wie die für die Eihülle spezifische Isoform der *OvGST3*.

Bei der stark variierenden Markierung der Organe in weiblichen Würmern könnten, wie schon erwähnt, verschiedene Faktoren der Grund dafür sein. So nehmen möglicherweise unterschiedliche Stressfaktoren Einfluss auf zelltypspezifische SR-Proteine, die wiederum die Expression der unterschiedlichen Spleißvarianten beeinflussen und steuern (Reed, 2000; Ladd und Cooper, 2002).

Die Erfolg versprechende Ko-Expression der *Ov*GST3 mit dem Fusionsprotein MBP sollte im Rahmen weiterer Forschungen untersucht werden, um eine Aktivität der *Ov*GST3 nachzuweisen. Dies würde Aufschluss geben, in wieweit sich die Aktivität der einzelnen Spleißvarianten unterscheidet und welche Funktionen der *Ov*GST3 in *O. volvulus* zukommen.

5.6. Die immunogenen Eigenschaften der r*Ov*GST3

Für die Entwicklung von Impfstoffen gegen Wurminfektionen ist es bedeutsam biologisch wichtige Moleküle zu identifizieren, die eine Schlüsselfunktion in der Immunantwort des Menschen gegen Wurmparasiten haben. Ebenso ist für eine sensitive Diagnose der Onchozerkose, die durch die „skin snip“- und Mazzotti-Methode nicht gegeben ist, die Identifizierung eines artspezifischen Antigens für die Serologie weiterhin erforderlich. Verschiedene spezifische bzw. sensitive immundiagnostische Antigene sind bereits beschrieben worden. Aber weder das sehr spezifische *Ov*16-Antigen noch *Ov*33 (Aspartaseprotease-Inhibitor) oder *Ov*20 (Retinol-bindende Protease) sowie andere Antigene zeigen eine 100%ige Sensitivität und Spezifität (Lobos *et al.*, 1990, Bradley *et al.*, 1991; Erdmann *et al.*, 1995; Jenkins *et al.*, 1996; Mpagi *et al.*, 2000 a, b). Daher wird zum einen für eine bessere Diagnose der Onchozerkose weiterhin nach einem optimalen Antigen gesucht. Zum anderen wäre die Entdeckung eines hoch immunogenen Moleküls für die Vakzineentwicklung von großer Bedeutung.

***Ov*GST3 mit Antigenaktivität**

Vorraussetzung für immunogene Eigenschaften eines Moleküls ist der Kontakt mit dem immunkompetenten Gewebe des Wirtes. Um zu überprüfen, ob dies für die *Ov*GST3 gilt, wurde es als Antigen in ELISA-Untersuchungen mit humanen Seren eingesetzt. Dabei wurden die für die Nematoden-Infektion charakteristisch erhöhten Isoformen IgG1 und IgG4 untersucht (Brattig *et al.*, 1994).

Die Befunde zeigten eindeutig, dass die *Ov*GST3 als Antigen von *Onchocerca*-erkrankten Patienten erkannt wird. Im Vergleich zu den Kontrollseren konnten sowohl signifikant stärkere Reaktionen von IgG1- als auch mit IgG4-Immunglobuline detektiert

werden, wobei sich die Titerwerte beider Antikörper kaum unterschieden (siehe Abschnitt 4.7.1.). Entweder gelangt diese GST als Eihüllenprotein wie die Mikrofilarien aus dem Uterus in die Umgebung und kommt dadurch mit dem humanen Immunsystem in Kontakt. Oder die Immunreaktion beruht auf Varianten der *OvGST3*, die unter Umständen in anderen Geweben exprimiert werden. Die Seren von gesunden Europäern zeigten keine Reaktion mit der in der ELISA-Untersuchung eingesetzten *OvGST3*.

Die Möglichkeit, dass die *OvGST3* als Eihüllenprotein eine Immunantwort auslösen könnte, zeigen frühere Arbeiten (Diesfeld und Kristen, 1978; Tume *et al.*, 1995). Damit besitzen Eihüllenproteine von *O. volvulus* Antigenaktivität und werden somit aus dem Uteruslumen in die Umgebung entlassen. Die Ergebnisse dokumentieren, dass sowohl Eier als auch leere Eihüllen antigene Eigenschaften besitzen. Frisch geschlüpfte ungescheidete Mikrofilarien hingegen zeigen keine Antigenaktivität mit Seren von Onchozerkose-Patienten. Ebenso löst das Eihüllenprotein *Oveg1* eine Immunantwort in *Onchocerca*-infizierten Personen aus (Tume *et al.*, 1995). Damit übereinstimmend ist davon auszugehen, dass auch die *OvGST3* beim Austritt der Mikrofilarien zusammen mit der Eihülle und der Uterusflüssigkeit in die Umgebung des Wurmes gelangt, als Antigen fungiert und die Bildung von *OvGST3*-spezifischen Antikörpern auslöst.

Immunreaktion gegen *OvGST3* im Vergleich zu *Ov20* in Seren von *O. volvulus*-infizierten Patienten

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *OvGST3* in den untersuchten Seren von *O. volvulus*-infizierten Patienten im Vergleich zu dem immundominanten *Ov20*-Protein eine schwächere Immunreaktion auslöst. Dieser Befund zeigt eine geringere Antigenität der *OvGST3* und eine geringere Spezifität. Ebenso kann für die *OvGST3* kein signifikanter Unterschied zwischen Seren von Onchozerka-Patienten mit generalisierter und Sowda-Form festgestellt werden. Die IgG1-Werte der Sowda-Seren sind nur für *Ov20* signifikant höher als die der generalisierten Form. Ein zu erwartender Befund, da Sowda-Patienten allgemein auf die Filarien-Infektionen mit einer verstärkten pro-inflammatorischen Immunantwort und hohen IgG1-3/IgE-Bildung reagieren. Dies ist assoziiert mit einer starken Reduktion der Mikrofilariendichte auf <10 Mf/mg Haut und geringeren oder fehlendem Nachweis von Onchozerkomen (Hoerauf *et*

al., 2005). Sowda-Patienten zeigen jedoch aufgrund der starken Immunreaktion eine extrem ausgeprägte Dermatitis.

Bei chronischer generalisierter Form der Onchozerkose werden verstärkt parasitenspezifische IgG1- und IgG4-Antikörper produziert (Weil *et al.*, 1990; Bradley *et al.*, 1993; Chandrashekar *et al.*, 1996). Insbesondere die IgG4 Subklasse stellt einen dominanten Antifilarien-Antikörper dar (Ottesen *et al.*, 1985). Dafa'alla *et al.* (1992) stellen eine positive Korrelation von IgG4-Titer und der Mikrofilariendichte fest. So zeigten die Ergebnisse unabhängig von der Krankheitsform eine Abhängigkeit der Antikörperreaktivität gegen *Ov*GST3 von der Mikrofilariendichte. Bei einer hohen Mikrofilariendichte von >96 Mf/mg Haut konnte sowohl eine verstärkte IgG1 als auch ein signifikant höherer IgG4-Titer festgestellt werden. Damit übereinstimmend ist die Vorstellung, dass die *Ov*GST3 zusammen mit der Eihülle während der Freilassung der Mikrofilarien aus dem Uterus ebenfalls in die Umgebung gelangt.

Spezifität der immunogenen r*Ov*GST3

In Übereinstimmung mit einigen immunhistologischen Beobachtungen weisen die serologischen Untersuchungen auf Kreuzreaktivität der Antikörper gegen verschiedene Filarien hin. So reagieren IgG4-Antikörper in Seren von mit *B. malayi*-, *M. perstans*- bzw. *W. bancrofti*-infizierten Personen mit der *Ov*GST3. Da GSTs klassenspezifisch in vielen Bereichen ihrer Struktur hoch konserviert sind, werden vermutlich *Ov*GST3-homologe Domänen beider untersuchter Filarien von IgG4-Subklassen erkannt. Immunologische Kreuzreaktionen zwischen GST-Klassen sind hingegen selten (Hayes *et al.*, 2005). So konnte bei *B. malayi* gezeigt werden, dass das Anti-*Ov*GST3 Antiserum vom Kaninchen mit *Ov*GST1- und *Ov*GST2-ähnlichen GSTs von *B. malayi* kreuzreagierte (Rao *et al.*, 1985). Ähnliches wird auch von Sommer (*et al.*, 2001) beschrieben. Dies bedeutet, dass *B. malayi* und verwandte Filarien auch Omega-Klassen homologe GSTs bilden könnten, mit ähnlichen Epitop-Eigenschaften.

Für Filarien-Infektionen stellt IgG4 den sensitivsten und spezifischsten Antikörper-Isotypen dar (Lucius *et al.*, 1992) und wird bevorzugt bei Filarienerkrankungen für diagnostische Zwecke eingesetzt (Muck *et al.*, 2003). Die Befunde des für *O. volvulus* spezifisch geltenden *Ov*20 sowie andere Befunde zeigen, dass die Spezifität der IgG4-Reaktion begrenzt ist und es zu geringfügigen Reaktionen mit anderen

Filarienantigenen kommt (Weil *et al.*, 1990). Die *Ov*GST3 ist jedoch kein *Onchocerca*-spezifisches Antigen, da es bei IgG4 zu Kreuzreaktionen mit Seren von Patienten kommt, die mit den Filarienarten *B. malayi*, *M. perstans* oder *W. bancrofti* infiziert waren. Eine zusätzliche Infektion der Filarien-infizierten Patienten mit *O. volvulus* konnte ausgeschlossen werden.

Bei den Reaktionen der 15 Seren von mit *W. bancrofti*-infizierten Patienten ist zu berücksichtigen, dass der Median des IgG4-Titers Null ist und nur einzelne Seren mit der *Ov*GST3 kreuzreagierten. Dabei handelt es sich vermutlich um falsch-positive Reaktionen, da es bei den immunhistologischen Untersuchungen von *W. bancrofti* zu keiner Detektion *Ov*GST3-ähnlicher Strukturen kam. Eine höhere Anzahl an Seren würde vermutlich zu einem eindeutigeren Befund führen.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die *Ov*GST3 zwar als Antigen von Onchoserose-Patienten erkannt wird, die Reaktion jedoch im Vergleich zu *Ov*20 wenig sensitiv ist. Zudem eignet sich die *Ov*GST3 wenig als *O. volvulus*-spezifisches Antigen zu diagnostischen Zwecken, da Filarien-Arten nicht unterschieden werden.

6. Zusammenfassung

Weltweit sind über 18 Millionen Menschen mit dem Erreger der Flussblindheit *Onchocerca volvulus* infiziert. Die Krankheit durch Vektorkontrolle und Massenbehandlung mit dem mikrofilariziden Medikament Ivermectin zu eliminieren, waren bis jetzt erfolglos. Daher ist die Erforschung neuer Angriffspunkte für die Entwicklung effektiver makrofilarizider Medikamente dringend erforderlich, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Resistenzbildung gegen Ivermectin.

Das Überleben von *O. volvulus* im Menschen wird durch Abwehrstrategien des Parasiten ermöglicht, in deren Zentrum die Glutathion S-Transferasen (GSTs) stehen. Diese für den Parasiten essentielle Enzymfamilie detoxifiziert endogene und xenobiotische Substanzen, so auch Chemotherapeutika. Ein gegen GSTs wirkendes Medikament würde das Überleben im Wirt erschweren oder gar unmöglich machen. Aufgrund geringer Kenntnisse über Strukturen und Funktionen der GSTs von *O. volvulus* war deren Charakterisierung Ziel dieser Arbeit.

In *O. volvulus* sind bis lang drei GSTs bekannt: die *Ov*GST1 mit ihren Isoformen a und b, die *Ov*GST2 und die *Ov*GST3. Um spezifische Inhibitoren gegen die *Ov*GST1 und *Ov*GST2 zu entwickeln, wurden Proteinkristalle beider Enzyme angefertigt und deren Struktur bestimmt. Hierbei sollten Strukturunterschiede zwischen der parasitären GST und dem homologen Wirtsenzym aufgezeigt werden. Zudem sollte der bisher unbekannt Funktion der *Ov*GST3 nachgegangen werden.

Die *Ov*GST1 wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und das enzymatisch aktive Protein für Kristallisationsversuche eingesetzt. Nach einer Optimierungsphase wurden mit der hängenden Tropfen-Methode Kristalle erzeugt. Die idealen Kristallisationsbedingungen fanden sich bei 16 °C mit 3 µl 8,3 mg/ml Proteinlösung und 3 µl Kristallisationslösung bestehend aus 0,1 M HEPES Na pH 7,5, 10 % v/v Isopropanol und 20 – 24 % w/v PEG 4000. *Ov*GST1-Kristalle entstanden innerhalb einer Woche. Aufgrund geringer Diffraktion der entstandenen Kristalle konnte bislang nur eine unvollständige Struktur ermittelt werden. Es ließ sich jedoch eine breite und offene Substratbindungstasche feststellen, die in Übereinstimmung mit der gefundenen Prostaglandin D2 Isomeraseaktivität steht.

Die zytosolische *Ov*GST2 wurde ebenfalls rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Das enzymatisch aktive Protein wurde in die Kristallisation eingesetzt und es entstanden innerhalb von 2-3 Tagen Kristalle. Ideale Bedingungen fanden sich bei 16 °C und 2 µl einer 6 mg/ml Proteinlösung und 2 µl einer Kristallisationslösung, bestehend aus 0,1 M HEPES pH 7,5, 10 % v/v Isopropanol und 24-25 % w/v PEG 3350. Die Struktur der *Ov*GST2 wurde sowohl mit dem natürlichen Substrat GSH, als auch mit dem kompetitiven Inhibitor S-Hexylglutathion ermittelt (in Kooperation mit Dr. Perbandt, Universität Hamburg/DESY). Die Strukturanalyse ergab, dass ein Aminosäure-Austausch im aktiven Zentrum zu signifikanten Strukturänderungen zwischen der humanen Pi-Klassen GST (Arg13) und der *Ov*GST2 (Leu13) des Parasiten führten. Es konnte eine wesentlich breitere Substratbindungsstelle der *Ov*GST2 festgestellt werden, die zu einer anderen Substratspezifität führt und damit eine Basis für Inhibitorentwicklung bietet.

Der *Ov*GST3 wird eine Schutzfunktion vor reaktiven Sauerstoffspezies zugesprochen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der *Ov*GST3 auf cDNA-Ebene konnten die Expression dreier alternativer Spleißprodukte bestätigen. Desweiteren konnten fünf Initiationspunkte für Trans-Spleißprozesse ermittelt werden. Dies führt durch trans- und alternatives Spleißen zu einem Nachweis von 14 verschiedenen Transkripten der *Ov*GST3, wobei das potenzielle Signalpeptid mit in diese Spleißprozesse involviert war. Dieser Befund bestärkt die Vermutung, dass die *Ov*GST3 eine sehr breite Substratspezifität zeigt und unter Umständen unterschiedliche Funktionen ausübt.

Die rekombinante Expression der verschiedenen Spleißvarianten der *Ov*GST3 in *E. coli* gelang erst nach Verwendung eines Maltose-bindenden Fusionsproteins in löslicher Form. Nach Abtrennung des Fusionsproteins kam es zum Ausfallen der *Ov*GST3, das durch Zugabe von Reduktionsmitteln geringfügig verhindert werden konnte. Eine Enzymaktivität konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden.

Eine Transkriptvariante mit einem hoch immunogenen Sequenzbereich wurde für die Antikörperproduktion eingesetzt. Mit Hilfe des gebildeten Antikörpers konnte die *Ov*GST3 in Schnitten von *O. volvulus* lokalisiert werden. Sie fand sich fast ausschließlich in der Eihülle. Andere *Onchocerca*-Arten und andere Filarien reagierten teilweise mit dem *Ov*GST3-spezifischen Antikörper.

Für die Identifizierung potenzieller Vakzinekandidaten ist eine genaue Immunantwort von Patienten von großer Bedeutung. Daher wurde die IgG1- und IgG4-Immunantwort generalisierter (n= 40) und hyperreaktiver (n= 77) Onchozerka-Patienten auf die r*O*_vGST3 untersucht. Über 90 % der Patientenseren erkannten die *O*_vGST3 als Antigen. Im Vergleich zu den Kontrollseren konnte ein signifikanter Anstieg von IgG4 beobachtet werden. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der Immunglobulin-Reaktionen zwischen IgG1- und IgG4-Antworten festgestellt werden. Eine Abhängigkeit der Immunantworten von der Mikrofilariendichte (<10 Mf/mg Haut bzw. >96 Mf/mg Haut) war jedoch signifikant.

7. Literatur

- Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, Ronai Z. (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* 18: 1321-34.
- Allen JE, Maizels RM. (1996) Immunology of human helminth infection. *Int Arch Allergy Immunol.* 109: 3-10. Review.
- Anderson RM. (1994) Mathematical studies of parasitic infection and immunity. *Science.* 264: 1884-86. Review.
- Arca P, Hardisson C, Suarez JE. (1990) Purification of a glutathione S-transferase that mediates fosfomycin resistance in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 34: 844-48.
- Ardelli BF, Prichard RK. (2004) Identification of variant ABC-transporter genes among *Onchocerca volvulus* collected from ivermectin-treated and untreated patients in Ghana, West Africa. *Ann Trop Med Parasitol.* 98: 371-84.
- Armstrong RN. (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol.* 10: 2-18. Review.
- Asakura T, Imai A, Ohkubo-Uraoka N, Kuroda M, Iidaka Y, Uchida K, Shibasaki T, Ohkawa K. (2005) Relationship between expression of drug-resistance factors and drug sensitivity in normal human renal proximal tubular epithelial cells in comparison with renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 14: 601-07.
- Astor MB, Anderson ME, Meister A. (1988) Relationship between intracellular GSH levels and hypoxic cell radiosensitivity. *Pharmacol Ther.* 39: 115-21.
- Awadzi K, Hero M, Opoku NO, Addy ET, Buttner DW, Ginger CD. (1995) The chemotherapy of onchocerciasis XVIII. Aspects of treatment with suramin. *Trop Med Parasitol.* 46: 19-26.
- Balendiran GK, Dabur R, Fraser D. (2004) The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct.* 22: 343-52. Review.
- Balloul JM, Sondermeyer P, Dreyer D, Capron M, Grzych JM, Pierce RJ, Carvallo D, Lecocq JP, Capron A. (1987) Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature.* 326: 149-53.
- Bardehle G, Jepp-Libutzki A, Linder D, Moehnle K, Schott HH, Zahner H, Zahringer U, Stirm S. (1992) Chemical composition of *Litomosoides carinii* microfilarial sheaths. *Acta Trop.* 50: 237-47.
- Barrett J. (1998) Cytochrome P450 in parasitic protozoa and helminths. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 121: 181-83. Review
- Becker K, Gui M, Traxler A, Kirsten C, Schirmer RH. (1994) Redox processes in malaria and other parasitic diseases. Determination of intracellular glutathione. *Histochemistry.* 102: 389-95.
- Betz M, Fox BS. (1991) Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol.* 146: 108-13.
- Beuckmann CT, Fujimori K, Urade Y, Hayaishi O. (2000) Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain. *Neurochem Res.* 25: 733-38.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond).* 91: 179-94. Review.
- Blumenthal T. (1998) Gene clusters and polycistronic transcription in eukaryotes. *Bioessays.* 20: 480-87. Review.

- Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermini LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J. (2000) Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem.* 275: 24798-806.
- Borkakoti N, Winkler FK, Williams DH, D'Arcy A, Broadhurst MJ, Brown PA, Johnson WH, Murray EJ. (1994) Structure of the catalytic domain of human fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Nat Struct Biol.* 1:106-10.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- Bradley JE, Helm R, Lahaise M, Maizels RM. (1991) cDNA clones of *Onchocerca volvulus* low molecular weight antigens provide immunologically specific diagnostic probes. *Mol Biochem Parasitol.* 46: 219-27.
- Bradley JE, Gillespie AJ, Trenholme KR, Karam M. (1993) The effects of vector control on the antibody response to antigens of *Onchocerca volvulus*. *Parasitology.* 106: 363-70.
- Brattig NW, Tischendorf FW, Reifegerste S, Albiez EJ, Berger J. (1986) Differences in the distribution of HLA antigens in localized and generalized form of onchocerciasis. *Trop Med Parasitol.* 37: 271-75.
- Brattig NW, Krawietz I, Abakar AZ, Ertmann KD, Kruppa TF, Massougboji A. (1994) Strong IgG isotypic antibody response in sowdah type onchocerciasis. *J Infect Dis.* 170: 955-61.
- Brattig NW, Büttner DW, Hoerauf A. (2001) Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia endobacteria*. *Microbes Infect.* 3: 439-46.
- Brattig NW, Bazzocchi C, Kirschning CJ, Reiling N, Büttner DW, Cecilian F, Geisinger F, Hochrein H, Ernst M, Wagner H, Bandi C, Hoerauf A. (2004) The major surface protein of *Wolbachia endosymbionts* in filarial nematodes elicits immune responses through TLR2 and TLR4. *J Immunol.* 17: 437-45.
- Bresell A, Weinander R, Lundqvist G, Raza H, Shimoji M, Sun TH, Balk L, Wiklund R, Eriksson J, Jansson C, Persson B, Jakobsson PJ, Morgenstern R. (2005) Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *FEBS J.* 272: 1688-703.
- Brophy PM, Pritchard DI. (1992) Immunity to helminths: Ready to tip the biochemical balance? *Parasitol Today.* 8: 419-22.
- Brophy PM, Pritchard DI. (1992) Metabolism of lipid peroxidation products by the gastrointestinal nematodes *Necator americanus*, *Ancylostoma ceylanicum* and *Heligmosomoides polygyrus*. *Int J Parasitol.* 22: 1009-12.
- Brophy PM, Pritchard DI. (1994) Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. *Exp Parasitol.* 79: 89-96. Review
- Brophy PM, Campbell AM, van Eldik AJ, Teesdale-Spittle PH, Liebau E, Wang MF. (2000) Beta-carbonyl substituted glutathione conjugates as inhibitors of *O. volvulus* GST2. *Bioorg Med Chem Lett.* 10: 979-81.
- Brudon M, Gelfand MS, Spengler S, Zorn M, Dubchak I, Conboy JG. (2001) Computational analysis of candidate intron regulatory elements for tissue-specific alternative pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* 29: 2338-48.
- Brydon LJ, Gooday GW, Chappell LH, King TP. (1987) Chitin in egg shells of *Onchocerca gibsoni* and *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol.* 25: 267-72.
- Buckanovich RJ, Darnell RB. (1997) The neuronal RNA binding protein Nova-1 recognizes specific RNA targets *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell Biol.* 17: 3194-201.

- Bugge JF, Stokke ES, Vikse A, Kiil F. (1990) Stimulation of renin release by PGE₂ and PGI₂ infusion in the dog: enhancing effect of ureteral occlusion or administration of ethacrynic acid. *Acta Physiol Scand.* 138: 193-201.
- Burg D, Riepsaame J, Pont C, Mulder G, van de Water B. (2006) Peptide-bond modified glutathione conjugate analogs modulate GSTpi function in GSH-conjugation, drug sensitivity and JNK signaling. *Biochem Pharmacol.* 71: 268-77.
- Büttner DW, Racz P. (1983) Macro- and microfilariae in nodules from onchocerciasis patients in the Yemen Arab Republic. *Tropenmed Parasitol.* 34: 113-21
- Büttner DW, Albiez EJ, von Essen J, Erichsen J. (1988) Histological examination of adult *Onchocerca volvulus* and comparison with the collagenase technique. *Trop Med Parasitol. Suppl* 4: 390-417.
- Büttner DW, Wanji S, Bazzocchi C, Bain O, Fischer P. (2003) Obligatory symbiotic Wolbachia endobacteria are absent from *Loa loa*. *Filaria J.* 2: 10.
- Cameron TS, Deeth RJ, Dionne I, Du H, Jenkins HD, Krossing I, Passmore J, Roobottom HK. (2000) Bonding, structure, and energetics of gaseous E8(2+) and of solid E8(AsF₆)₂ (E = S, Se). *Inorg Chem.* 39: 5614-31.
- C. elegans* Sequencing Consortium. (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science.* 282: 2012-18. Review.
- Chandrashekar R, Ogunrinade AF, Weil GJ. (1996) Use of recombinant *Onchocerca volvulus* antigens for diagnosis and surveillance of human onchocerciasis. *Trop Med Int Health.* 1: 575-80.
- Chayen N, Dieckmann M, Dierks K, Fromme P. (2004) Size and shape determination of proteins in solution by a noninvasive depolarized dynamic light scattering instrument. *Ann N Y Acad Sci.* 1027: 20-27.
- Clos J, Brandau S. (1994) pJC20 and pJC40--two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 5: 133-37.
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69: 2110-114.
- Cotgreave IA. (2003) Analytical developments in the assay of intra- and extracellular GSH homeostasis: specific protein S-glutathionylation, cellular GSH and mixed disulphide compartmentalisation and interstitial GSH redox balance. *Biofactors.* 17: 269-77. Review.
- Deneke SM. (2000) Thiol-based antioxidants. *Curr Top Cell Regul.* 36: 151-80. Review.
- Denton J, Nehrke K, Rutledge E, Morrison R, Strange K. (2004) Alternative splicing of N- and C-termini of a *C. elegans* CIC channel alters gating and sensitivity to external Cl⁻ and H⁺. *J Physiol.* 555: 97-114.
- Diesfeld HJ, Kirsten C. (1975) [Demonstration of antigenicity in adult dipetalonema vitae by the indirect immunofluorescence test using serum from filariasis patients (author's transl)] *Tropenmed Parasitol.* 26: 499-502.
- Ding Y, Ortellì F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H. (2003) The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics.* 4: 35.
- Dirr H, Reinemer P, Huber R. (1994) X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Eur J Biochem.* 220: 645-61. Review.
- Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G, Board P. (2001) The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J Biol Chem.* 276: 3319-23.

- Edwards R, Dixon DP. (2005) Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401: 169-86.
- Erdmann G, Saloga J, Mohamadzadeh M, Becker D, Knop J, Enk AH. (1995) Heat-stable antigen is expressed by murine keratinocytes and delivers costimulatory signals in T-cell activation. *Exp Dermatol.* 4: 291-96.
- Fahey RC, Sundquist AR. (1991) Evolution of glutathione metabolism. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 64:1-53. Review.
- Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A. (1985) Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science.* 227: 1485-87.
- Ferguson KC, Rothman JH. (1999) Alterations in the conserved SL1 trans-spliced leader of *Caenorhabditis elegans* demonstrate flexibility in length and sequence requirements in vivo. *Mol Cell Biol.* 19: 1892-900.
- Finkelman FD, Urban JF Jr, Beckmann MP, Schooley KA, Holmes JM, Katona IM. (1991) Regulation of murine in vivo IgG and IgE responses by a monoclonal anti-IL-4 receptor antibody. *Int Immunol.* 3: 599-607.
- Fischer P, Kipp W, Bamuhiga J, Binta-Kahwa J, Kiefer A, Büttner DW. (1993) Parasitological and clinical characterization of *Simulium neavei*-transmitted onchocerciasis in western Uganda. *Trop Med Parasitol.* 44: 311-21.
- Fischer P, Kilian AH, Bamuhiiga J, Kipp W, Büttner DW. (1996) Prevalence of *Mansonella perstans* in western Uganda and its detection using the QBC-fluorescence method. *Appl Parasitol.* 37: 32-37.
- Fischer P, Bamuhiiga J, Büttner DW. (1997) Occurrence and diagnosis of *Mansonella streptocerca* in Uganda. *Acta Trop.* 63: 43-55.
- Fuhrman JA, Piessens WF. (1985) Chitin synthesis and sheath morphogenesis in *Brugia malayi* microfilariae. *Mol Biochem Parasitol.* 17: 93-104.
- Gallin MY, Jacobi AB, Büttner DW, Schonberger O, Marti T, Erttmann KD. (1995) Human autoantibody to defensin: disease association with hyperreactive onchocerciasis (sowda). *J Exp Med.* 182: 41-47.
- Gao W, Luquetti AO, Pereira MA. (2003) Immunological tolerance and its breakdown in Chagas' heart disease: role of parasitokines. *Front Biosci.* 8: 218-27.
- 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: 5512-21.
- Gottesman MM, Pastan I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 62: 385-427. Review.
- Guse AH, da Silva CP, Berg I, Skapenko AL, Weber K, Heyer P, Hohenegger M, Ashamu GA, Schulze-Koops H, Potter BV, Mayr GW. (1999) Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature.* 398: 70-73.
- Hall LR, Pearlman E. (1999) Pathogenesis of onchocercal keratitis (River blindness). *Clin Microbiol Rev.* 12: 445-53. Review.
- Hartmann S, Lucius R. (2003) Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *Int J Parasitol.* 33: 1291-302. Review.
- Hayes JD, Pulford DJ. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 30: 445-600. Review.
- Hayes JD, McLellan LI. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* 31: 273-300. Review.

- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45: 51-88. Review.
- Heijn M, Oude Elferink RP, Jansen PL. (1992) ATP-dependent multispecific organic anion transport system in rat erythrocyte membrane vesicles. *Am J Physiol.* 262: 104-10.
- Hilpert K, Ackermann J, Banner DW, Gast A, Gubernator K, Hadvary P, Labler L, Muller K, Schmid G, Tschopp TB, et al. (1994) Design and synthesis of potent and highly selective thrombin inhibitors. *J Med Chem.* 37: 3889-901.
- Hoerauf A, Brattig N. (2002) Resistance and susceptibility in human onchocerciasis--beyond Th1 vs. Th2. *Trends Parasitol.* 18: 25-31. Review.
- Hoerauf A, Mand S, Fischer K, Kruppa T, Marfo-Debrekeye Y, Debrah AY, Pfarr KM, Adjei O, Büttner DW. (2003) Doxycycline as a novel strategy against bancroftian filariasis--depletion of *Wolbachia* endosymbionts from *Wuchereria bancrofti* and stop of microfilaria production. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 192: 211-16.
- Hoerauf A, Satoguina J, Saefel M, Specht S. (2005) Immunomodulation by filarial nematodes. *Parasite Immunol.* 27: 417-29. Review.
- Holmgren A. (2000) Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biofactors.* 11: 63-64.
- Hong SJ, Kang SY, Chung YB, Chung MH, Oh YJ, Kang I, Bahk YY, Kong Y, Cho SY. (2000) *Paragonimus westermani*. a cytosolic glutathione S-transferase of a sigma-class in adult stage. *Exp Parasitol.* 94: 180-89.
- Höppner J, Perbandt M, Betzel Ch, Walter RD, Liebau E. (2004) Crystallization of the major cytosolic glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60: 1496-97.
- Ishikawa T. (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci.* 17: 463-8. Review.
- Jahngen-Hodge J, Obin MS, Gong X, Shang F, Nowell TR Jr, Gong J, Abasi H, Blumberg J, Taylor A. (1997) Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress. *J Biol Chem.* 272: 28218-26.
- Jakobsson PJ, 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: 689-92.
- Jenkins RE, Taylor MJ, Gilvary N, Bianco AE. (1996) Characterization of a secreted antigen of *Onchocerca volvulus* with host-protective potential. *Parasite Immunol.* 18: 29-42.
- Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain PO, Han JD, Chesneau A, Hao T, Goldberg DS, Li N, Martinez M, Rual JF, Lamesch P, Xu L, Tewari M, Wong SL, Zhang LV, Berriz GF, Jacotot L, Vaglio P, Reboul J, Hirozane-Kishikawa T, Li Q, Gabel HW, Elewa A, Baumgartner B, Rose DJ, Yu H, Bosak S, Sequerra R, Fraser A, Mango SE, Saxton WM, Strome S, Van Den Heuvel S, Piano F, Vandenhoute J, Sardet C, Gerstein M, Doucette-Stamm L, Gunsalus KC, Harper JW, Cusick ME, Roth FP, Hill DE, Vidal M. (2004) A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science.* 303: 540-43.
- Ji Y, Akerboom TP, Sies H. (1996) Microsomal formation of S-nitrosoglutathione from organic nitrites: possible role of membrane-bound glutathione transferase. *Biochem J.* 313: 377-80.
- Ji X, von Rosenvinge EC, Johnson WW, Tomarev SI, Piatigorsky J, Armstrong RN, Gilliland GL. (1995) Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry.* 34: 5317-28.

- Johansson AS, Mannervik B. (2001) Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *J Biol Chem.* 276: 33061-65.
- Kanaoka Y, Ago H, Inagaki E, Nanayama T, Miyano M, Kikuno R, Fujii Y, Eguchi N, Toh H, Urade Y, Hayaishi O. (1997) Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell.* 90: 1085-95.
- Kano T, Sakai M, Muramatsu M. (1987) Structure and expression of a human class pi glutathione S-transferase messenger RNA. *Cancer Res.* 47: 5626-30.
- Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M, Welchman DP, Zipperlen P, Ahringer J. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature.* 421: 220-21.
- Kampkotter A, Volkman TE, de Castro SH, Leiers B, Klotz LO, Johnson TE, Link CD, Henkle-Duhrsen K. (2003) Functional analysis of the glutathione S-transferase 3 from *Onchocerca volvulus* (*Ov*-GST-3): a parasite GST confers increased resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol.* 325: 25-37.
- Katti SK, Robbins AH, Yang Y, Wells WW. (1995) Crystal structure of thioltransferase at 2.2 Å resolution. *Protein Sci.* 4: 1998-2005.
- Kemeny DM. (1992) Titration of antibodies. *J Immunol Methods.* 150: 57-76. Review.
- Kleinert HD, Rosenberg SH, Baker WR, Stein HH, Klinghofer V, Barlow J, Spina K, Polakowski J, Kovar P, Cohen J, et al. (1992) Discovery of a peptide-based renin inhibitor with oral bioavailability and efficacy. *Science.* 257: 1940-43.
- Kortemme T, Creighton TE. (1995) Ionisation of cysteine residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to unusual 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: 753-61.
- Krause S, Sommer A, Fischer P, Brophy PM, Walter RD, Liebau E. (2001) Gene structure of the extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* and its overexpression and promoter analysis in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biochem Parasitol.* 117: 145-54.
- Krauth-Siegel RL, Jockers-Scherubl MC, Becker K, Schirmer RH. (1989) NADPH-dependent disulphide reductases. *Biochem Soc Trans.* 17: 315-17.
- Kwan-Lim GE, Forsyth KP, Maizels RM. (1990) Filarial-specific IgG4 response correlates with active *Wuchereria bancrofti* infection. *J Immunol.* 145: 4298-305.
- Ladd AN, Cooper TA. (2002) Finding signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era. *Genome Biol.* 23; 3-11 Review.
- Lee C, Atanelov L, Modrek B, Xing Y. (2003) ASAP: the Alternative Splicing Annotation Project. *Nucleic Acids Res.* 31: 101-05.
- Lederer B, Boger P. (2005) A ligand function of glutathione S-transferase. *Z Naturforsch [C].* 60: 166-71.
- Liebau E, Wildenburg G, Walter RD, Henkle-Duhrsen K. (1994) A novel type of glutathione S-transferase in *Onchocerca volvulus*. *Infect Immun.* 62: 4762-67.
- Liebau E, Walter RD, Henkle-Duhrsen K. (1994) *Onchocerca volvulus*: isolation and sequence of a second glutathione S-transferase cDNA. *Exp Parasitol.* 79: 68-71.
- Liebau E, Walter RD, Henkle-Duhrsen K. (1994) Isolation, sequence and expression of an *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase cDNA. *Mol Biochem Parasitol.* 63: 305-09.

- Liebau E, Schonberger OL, Walter RD, Henkle-Duhrsen KJ. (1994) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. Mol Biochem Parasitol. 63: 167-70.
- Liebau E, Wildenburg G, Brophy PM, Walter RD, Henkle-Duhrsen K. (1996) Biochemical analysis, gene structure and localization of the 24 kDa glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus*. Mol Biochem Parasitol. 80: 27-39.
- Liebau E, Muller V, Lucius R, Walter RD, Henkle-Duhrsen K. (1996) Molecular cloning, expression and characterization of a recombinant glutathione S-transferase from *Echinococcus multilocularis*. Mol Biochem Parasitol. 77: 49-56.
- Liebau E, Spillner E, Henkle-Duhrsen K. (1997) pOVEX vector: prokaryotic expression and purification of onchocerciasis vaccine candidate antigens as fusion proteins with the 24 kD *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase. Trop Med Int Health. 2: 691-94.
- Liebau E, Eckelt VH, Wildenburg G, Teesdale-Spittle P, Brophy PM, Walter RD, Henkle-Duhrsen K. (1997) Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. Biochem J. 324: 659-66.
- Liebau E, Eschbach ML, Tawe W, Sommer A, Fischer P, Walter RD, Henkle-Duhrsen K. (2000) Identification of a stress-responsive *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase (*Ov*-GST-3) by RT-PCR differential display. Mol Biochem Parasitol. 109: 101-10.
- Lobos E, Altmann M, Mengod G, Weiss N, Rudin W, Karam M. (1990) Identification of an *Onchocerca volvulus* cDNA encoding a low-molecular-weight antigen uniquely recognized by onchocerciasis patient sera. Mol Biochem Parasitol. 39: 135-45.
- Lucius R, Kern A, Seeber F, Pogonka T, Willenbacher J, Taylor HR, Pinder M, Ghalib HW, Schulz-Key H, Soboslay P. (1992) Specific and sensitive IgG4 immunodiagnosis of onchocerciasis with a recombinant 33 kD *Onchocerca volvulus* protein (*Ov*33). Trop Med Parasitol. 43: 139-45.
- Lumjuan N, McCarroll L, Prapanthadara LA, Hemingway J, Ranson H. (2005) Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol. 35: 861-71.
- Maizels R, Langhorne J, Glaichenhaus N. (1998) Pathogenic and protective responses in parasitic infections. Res Immunol. 149: 875-77.
- Maizels RM. (2005) Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. Curr Opin Immunol. 17: 656-61. Review.
- MacKinnon BM. (1987) An ultrastructural and histochemical study of oogenesis in the trichostrongylid nematode *Heligmosomoides polygyrus*. J Parasitol. 73: 390-99.
- Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B, Listowsky I, Morgenstern R, Muramatsu M, Pearson WR, et al. (1992) Nomenclature for human glutathione transferases. Biochem J. 282: 305-06.
- McKeown M, Madigan SJ. (1992) Sex determination and differentiation in invertebrates: *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*. Curr Opin Cell Biol. 4: 948-54. Review.
- McLellan LI, Wolf CR. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. Drug Resist Updat. 2: 153-64.
- McNair AT, Dissous C, Duvaux-Miret O, Capron A. (1993) Cloning and characterisation of the gene encoding the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. Gene. 124: 245-49.
- McMahon JE, Sowa SI, Maude GH, Hudson CM, Kirkwood BR. (1988) Epidemiological studies of onchocerciasis in savanna villages of Sierra Leone. Trop Med Parasitol. 39: 60-8.
- McTigue MA, Williams DR, Tainer JA. (1995) Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. J Mol Biol. 246: 21-27.
- Meister A, Anderson ME. (1983) Glutathione. Annu Rev Biochem. 52: 711-60. Review.

- Michelson AM. (1982) Oxygen radicals. Agents Actions Suppl. 11: 179-201. Review.
- Milhausen M, Nelson RG, Sather S, Selkirk M, Agabian N. (1984) Identification of a small RNA containing the trypanosome spliced leader: a donor of shared 5' sequences of trypanosomatid mRNAs? Cell. 38: 721-29.
- Minor W, Tomchick D, Otwinowski Z. (2000) Strategies for macromolecular synchrotron crystallography. Structure. 8: 105-10. Review.
- Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T, Spithill TW. (1996) Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. Vaccine. 14: 1603-12.
- Mpagi JL, Buttner DW, Tischendorf FW, Erttmann KD, Brattig NW. (2000) Use of the recombinant *Onchocerca volvulus* protein Ov20/OvS1 for the immunodiagnostic differentiation between onchocerciasis and mansonelliasis and for the characterization of hyperreactive onchocerciasis (sowda). Trop Med Int Health. 5: 891-97.
- Mpagi JL, Buttner DW, Tischendorf FW, Erttmann KD, Brattig NW. (2000) Humoral responses to a secretory *Onchocerca volvulus* protein: differences in the pattern of antibody isotypes to recombinant Ov20/OvS1 in generalized and hyperreactive onchocerciasis. Parasite Immunol. 22: 455-60.
- Muck AE, Pires ML, Lammie PJ. (2003) Influence of infection with non-filarial helminths on the specificity of serological assays for antifilarial immunoglobulin G4. Trans R Soc Trop Med Hyg. 97: 88-90.
- Murphy WJ, Watkins KP, Agabian N. (1986) Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for trans splicing. Cell. 47: 517-25.
- Ndyomugenyi R, Tukesiga E, Buttner DW, Garms R. (2004) The impact of ivermectin treatment alone and when in parallel with *Simulium neavei* elimination on onchocerciasis in Uganda. Trop Med Int Health. 9: 882-86.
- Neves G, Zucker J, Daly M, Chess A. (2004) Stochastic yet biased expression of multiple Dscam splice variants by individual cells. Nat Genet. 36: 240-46.
- Nilsen TW. (1992) Trans-splicing in protozoa and helminths. Infect Agents Dis. 1: 212-18. Review.
- Nuhn P. (1993) [The biochemical basis of toxic actions of drugs and other xenobiotics] Pharm Unserer Zeit. 22: 119-33. Review. German.
- Omar MS, Raouf AM, al-Amari OM. (1993) Histochemical distribution of esterases in adult *Onchocerca fasciata* (Filarioidea: Onchocercidae). Trop Med Parasitol. 44: 295-98.
- Pastrana DV, Raghavan N, FitzGerald P, Eisinger SW, Metz C, Bucala R, Schleimer RP, Bickel C, Scott AL. (1998) Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor. Infect Immun. 66: 5955-63.
- Perbandt M, Hoppner J, Betzel C, Walter RD, Liebau E. (2005) Structure of the major cytosolic glutathione S-transferase from the parasitic nematode *Onchocerca volvulus*. J Biol Chem. 280:12630-36.
- Plenge-Bonig A, Kromer M, Buttner DW. (1995) Light and electron microscopy studies on *Onchocerca jakutensis* and *O. flexuosa* of red deer show different host-parasite interactions. Parasitol Res. 81:66-73.
- Precious WY, Barrett J. (1989) Xenobiotic metabolism in helminths. Parasitol Today. 5: 156-60.
- Qiao F, Xing K, Liu A, Ehlers N, Raghavachari N, Lou MF. (2001) Human lens thioltransferase: cloning, purification, and function. Invest Ophthalmol Vis Sci. 42: 743-51.
- Ottesen EA, Skvaril F, Tripathy SP, Poindexter RW, Hussain R. (1985) Prominence of IgG4 in the IgG antibody response to human filariasis. J Immunol. 134: 2707-12.

- Rajkovic A, Davis RE, Simonsen JN, Rottman FM. (1990) A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. Proc Natl Acad Sci USA. 87: 8879-83.
- Ranson H, Prapanthadara L, Hemingway J. (1997) Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT-resistant strain of *Anopheles gambiae*. Biochem J. 324: 97-102.
- Rao UR, Salinas G, Mehta K, Klei TR. (2000) Identification and localization of glutathione S-transferase as a potential target enzyme in *Brugia* species. Parasitol Res. 86: 908-15.
- Ravichandran V, Seres T, Moriguchi T, Thomas JA, Johnston RB Jr. (1994) S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by the phagocytosis-associated respiratory burst in blood monocytes. J Biol Chem. 269: 25010-15.
- Reed R. (2000) Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. Curr Opin Cell Biol. 12: 340-45. Review.
- Richter D, Incani RN, Harn DA. (1993) Isotype responses to candidate vaccine antigens in protective sera obtained from mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. Infect Immun. 61: 3003-11.
- Rigsby RE, Fillgrove KL, Beihoffer LA, Armstrong RN. (2005) Fosfomycin resistance proteins: a nexus of glutathione transferases and epoxide hydrolases in a metalloenzyme superfamily. Methods Enzymol. 401: 367-79.
- Riveau G, Poulain-Godefroy OP, Dupre L, Remoue F, Mielcarek N, Locht C, Capron A. (1998) Glutathione S-transferases of 28kDa as major vaccine candidates against schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 93 Suppl 1: 87-94. Review.
- Rodriguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderon R, Gomez-Garcia L, Saavedra R, Bojalil R, Terrazas LI. (2002) Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. Infect Immun. 70: 3656-64.
- Rubinson KA, Ladner JE, Tordova M, Gilliland GL. (2000) Cryosalts: suppression of ice formation in macromolecular crystallography. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 56: 996-1001.
- Salinas G, Braun G, Taylor DW. (1994) Molecular characterisation and localisation of an *Onchocerca volvulus* pi-class glutathione S-transferase. Mol Biochem Parasitol. 66: 1-9.
- Salinas AE, Wong MG. (1999) Glutathione S-transferases--a review. Curr Med Chem. 6: 279-309. Review.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 74: 5463-67.
- Sarma GN, Savvides SN, Becker K, Schirmer M, Schirmer RH, Karplus PA. (2003) Glutathione reductase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: crystal structure and inhibitor development. J Mol Biol. 328: 893-907.
- Scheidt KA, Roush WR, McKerrow JH, Selzer PM, Hansell E, Rosenthal PJ. (1998) Structure-based design, synthesis and evaluation of conformationally constrained cysteine protease inhibitors. Bioorg Med Chem. 6: 2477-94.
- Schirmer RH, Schollhammer T, Eisenbrand G, Krauth-Siegel RL. (1987) Oxidative stress as a defense mechanism against parasitic infections. Free Radic Res Commun. 3: 3-12.
- Schormann N, Pal B, Senkovich O, Carson M, Howard A, Smith C, Delucas L, Chattopadhyay D. (2005) Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* pteridine reductase 2 in complex with a substrate and an inhibitor. J Struct Biol. 152: 64-75.
- Schulz-Key H. (1975) [Investigations on the filariidae of the cervidae in Southern Germany. 1. Development of the nodule, finding of the sexes and production of the microfilariae in *Onchocerca flexuosa* (Wedl, 1856), in the red deer (*Cervus elaphus*) (author's transl)] Tropenmed Parasitol. 26: 60-9.

- Schulz-Key H, Albiez EJ, Büttner DW. (1977) Isolation of living adult *Onchocerca volvulus* from nodules. Tropenmed Parasitol. 28: 428-30.
- Scott JC, McManus DP. (2000) Molecular cloning and enzymatic expression of the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma japonicum*: evidence for sequence variation but lack of consistent vaccine efficacy in the murine host. Parasitol Int. 49: 289-300.
- Selkirk ME, Smith VP, Thomas GR, Gounaris K. (1998) Resistance of filarial nematode parasites to oxidative stress. Int J Parasitol. 28: 1315-32. Review.
- Shan S, Armstrong RN. (1994) Rational reconstruction of the active site of a class mu glutathione S-transferase. J Biol Chem. 269: 32373-9.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. (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. Review
- Shiwaku K, Donelson JE. (1995) Cis-splicing and polyadenylation of actin RNA can precede 5' trans-splicing in nematodes. Biochem Biophys Res Commun. 211: 49-53.
- Skipsey M, Andrews CJ, Townson JK, Jepson I, Edwards R. (1997) Substrate and thiol specificity of a stress-inducible glutathione transferase from soybean. FEBS Lett. 409: 370-74
- Sommer A. (2000) Gutathion-abhängige Entgiftungssysteme der Nematoden *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893) und *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900). Dissertation. Universität Hamburg.
- Sommer A, Nimtz M, Conradt HS, Brattig N, Boettcher K, Fischer P, Walter RD, Liebau E. (2001) Structural analysis and antibody response to the extracellular glutathione S-transferases from *Onchocerca volvulus*. Infect Immun. 69: 7718-28.
- Sommer A, Rickert R, Fischer P, Steinhart H, Walter RD, Liebau E. (2003) A dominant role for extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* is the production of prostaglandin D2. Infect Immun. 71: 3603-06.
- Takacs AM, Denker JA, Perrine KG, Maroney PA, Nilsen TW. (1988) A 22-nucleotide spliced leader sequence in the human parasitic nematode *Brugia malayi* is identical to the trans-spliced leader exon in *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci USA. 85: 7932-6.
- Tawill SA, Gallin M, Erttmann KD, Kipp W, Bamuhiiga J, Büttner DW. (1996) Impaired antibody responses and loss of reactivity to *Onchocerca volvulus* antigens by HIV-seropositive onchocerciasis patients. Trans R Soc Trop Med Hyg. 90: 85-89.
- Tessier LH, Keller M, Chan RL, Fournier R, Weil JH, Imbault P. (1991) Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by trans-splicing in *Euglena*. EMBO J. 10: 2621-25.
- Tew KD, Ronai Z. (1999) GST function in drug and stress response. Drug Resist Updat. 2: 143-47.
- Thomas JA, Chai YC, Jung CH. (1994) Protein S-thiolation and dethiolation. Methods Enzymol. 233: 385-95.
- Tian M, Maniatis T. (1993) A splicing enhancer complex controls alternative splicing of doublesex pre-mRNA. Cell. 74: 105-14.
- Tomarev SI, Piatigorsky J. (1996) Lens crystallins of invertebrates diversity and recruitment from detoxification enzymes and novel proteins. Eur J Biochem. 235: 449-65. Review.
- Townsend DM, Tew KD. (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. Oncogene. 22: 7369-75. Review.
- Trottein F, Kieny MP, Verwaerde C, Torpier G, Pierce RJ, Balloul JM, Schmitt D, Lecocq JP, Capron A. (1990) Molecular cloning and tissue distribution of a 26-kilodalton *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. Mol Biochem Parasitol. 41: 35-44.

- Tume C, Sun E, Titanji V, Bathurst I, Barr P, Hough M, Weiss N, Chakravarti B, Wahi M, Lackey A, et al. (1995) *Onchocerca volvulus*: identification and characterization of an immunogenic eggshell protein (*Oveg1*). *Exp Parasitol.* 81: 445-52.
- Porter R. R., Lachmann P.J. und Reid K. B. M. (1986) *Biochemistry and Genetics of Complement*, Cambridge University Press
- Uchida K. (2000) Induction of glutathione S-transferase by prostaglandins. *Mech Ageing Dev.* 116: 135-40. Review.
- Udomsinprasert R, Bogoyevitch MA, Ketterman AJ. (2004) Reciprocal regulation of glutathione S-transferase spliceforms and the *Drosophila* c-Jun N-terminal kinase pathway components. *Biochem J.* 383: 483-90.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 160: 1-40.
- Valko M, Morris H, Cronin MT. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 12: 1161-208. Review.
- van Rossum AJ, Brophy PM, Tait A, Barrett J, Jefferies JR. (2001) Proteomic identification of glutathione S-transferases from the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics.* 1: 1463-68.
- Vande Waa EA. (1991) Chemotherapy of filariases. *Parasitol Today.* 7: 194-99.
- Vankan DM, Copeman DB. (1988) Reproduction in female *Onchocerca gibsoni*. *Trop Med Parasitol.* 39: 469-71.
- Vara Prasad JV, Boyer FE, Domagala JM, Ellsworth EL, Gajda C, Hagen SE, Markoski LJ, Tait BD, Lunney EA, Tummino PJ, Ferguson D, Holler T, Hupe D, Nouhan C, Gracheck SJ, VanderRoest S, Saunders J, Iyer K, Sinz M, Brodfuehrer J. (1999) Nonpeptidic HIV protease inhibitors: 6-alkyl-5,6-dihydropyran-2-ones possessing achiral 3-(4-amino/carboxamide-2-t-butyl,5-methylphenyl thio) moiety: antiviral activities and pharmacokinetic properties. *Bioorg Med Chem Lett.* 9: 1481-86.
- Veale CA, Bernstein PR, Bryant C, Ceccarelli C, Damewood JR Jr, Earley R, Feeney SW, Gomes B, Kosmider BJ, Steelman GB, et al. (1995) Nonpeptidic inhibitors of human leukocyte elastase. 5. Design, synthesis, and X-ray crystallography of a series of orally active 5-aminopyrimidin-6-one-containing trifluoromethyl ketones. *J Med Chem.* 38: 98-108.
- Veale CA, Damewood JR Jr, Steelman GB, Bryant C, Gomes B, Williams J. Non-peptidic inhibitors of human leukocyte elastase. (1995) 4. Design, synthesis, and *in vitro* and *in vivo* activity of a series of beta-carbolinone-containing trifluoromethyl ketones. *J Med Chem.* 38: 86-97.
- Vince R, Daluge S, Wadd WB. (1971) Studies on the inhibition of glyoxalase I by S-substituted glutathiones. *J Med Chem.* 14: 402-04.
- Vuilleumier S. (1997) Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? *J Bacteriol.* 179: 1431-41. Review.
- Wahl G, Achu-Kwi MD, Mbah D, Dawa O, Renz A. (1994) Bovine onchocercosis in north Cameroon. *Vet Parasitol.* 52: 297-311.
- 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.
- Washburn MP, Wells WW. (1999) The catalytic mechanism of the glutathione-dependent dehydroascorbate reductase activity of thioltransferase (glutaredoxin). *Biochemistry.* 38: 268-74.
- Webber SE, Bleckman TM, Attard J, Deal JG, Kathardekar V, Welsh KM, Webber S, Janson CA, Matthews DA, Smith WW, et al. (1993) Design of thymidylate synthase inhibitors

- using protein crystal structures: the synthesis and biological evaluation of a novel class of 5-substituted quinazolinones. *J Med Chem.* 36: 733-46.
- Weil GJ, Ogunrinade AF, Chandrashekar R, Kale OO. (1990) IgG4 subclass antibody serology for onchocerciasis. *J Infect Dis.* 161: 549-54.
- Weston K, Yochem J, and Greenwald I, (1989) A *Caenorhabditis elegans* cDNA that encodes a product resembling the rat glutathione S-transferase P subunit. *Nucleic Acids Res.* 17: 2138.
- Wharton D. (1980) Nematode egg-shells. *Parasitology.* 81: 447-63. Review.
- Wharton DA. (1983) The production and functional morphology of helminth egg-shells. *Parasitology.* 86: 85-97. Review.
- Wildenburg G, Liebau E, Henkle-Duhrsen K. (1998) *Onchocerca volvulus*: ultrastructural localization of two glutathione S-transferases. *Exp Parasitol.* 88: 34-42.
- Wilson R. (2001) The sequence of *C. elegans* cosmid C29E4. Unpublished
- Wilson R, Ainscough R, Anderson K, Baynes C, Berks M, Bonfield J, Burton J, Connell M, Copey T, Cooper J, et al. (1994) 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature.* 368: 32-38.
- Willson M, Sanejouand YH, Perie J, Hannaert V, Opperdoes F. (2002) Sequencing, modeling, and selective inhibition of *Trypanosoma brucei* hexokinase. *Chem Biol.* 9: 839-47.
- Winayanuwattikun P, Ketterman AJ. (2004) Catalytic and structural contributions for glutathione-binding residues in a Delta class glutathione S-transferase. *Biochem J.* 382: 751-57.
- Wojtowicz WM, Flanagan JJ, Millard SS, Zipursky SL, Clemens JC. (2004) Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell.* 118: 619-33.
- Wongsantichon J, Ketterman AJ. (2005) Alternative splicing of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 401: 100-16.
- Wright MD, Harrison RA, Melder AM, Newport GR, Mitchell GF. (1991) Another 26-kilodalton glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 49: 177-79.
- Wu Z, Liu S, Zhang S, Tong H, Gao Z, Liu Y, Lin D, Liu Z, Wu G, Yi H, Song G, Xu Y. (2004) Persistence of the protective immunity to *Schistosoma japonicum* in Chinese yellow cattle induced by recombinant 26 kDa glutathione-S-transferase (reSjc26GST). *Vet Parasitol.* 123: 167-77.
- Yu L, Kalla K, Guthrie E, Vidrine A, Klimecki WT. (2003) Genetic variation in genes associated with arsenic metabolism: glutathione S-transferase omega 1-1 and purine nucleoside phosphorylase polymorphisms in European and indigenous Americans. *Environ Health Perspect.* 111: 1421-27.
- Yang W, Jackson DC, Zeng Q, McManus DP. (2000) Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. *Vaccine.* 19: 103-13.
- Zhang DX, Zou AP, Li PL. (2001) Ceramide reduces endothelium-dependent vasodilation by increasing superoxide production in small bovine coronary arteries. *Circ Res.* 88: 824-31.
- Zaman V. (1987) Ultrastructure of *Brugia malayi* egg shell and its comparison with microfilarial sheath. *Parasitol Res.* 73: 281-83.
- Zeng WL, Alarcon CM, Donelson JE. (1990) Many transcribed regions of the *Onchocerca volvulus* genome contain the spliced leader sequence of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol.* 10: 2765-73.
- Ziegler SE, Morella KK, Anderson D, Kumaki N, Leonard WJ, Cosman D, Baumann H. (1995) Reconstitution of a functional interleukin (IL)-7 receptor demonstrates that the IL-2 receptor gamma chain is required for IL-7 signal transduction. *Eur J Immunol.* 25: 399-404.

Danksagung

Ein spezieller Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Eva Liebau für die Bereitstellung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung, die wertvollen Ratschläge und Anregungen sowie ihre Unterstützung und Motivation.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. D. Walter für die freundliche Unterstützung, seine Geduld und Beharrlichkeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Büttner möchte ich für die Einführung in die Welt der Histologie von *O. volvulus*, seine Unterstützung und Begeisterung sowie seine stete Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. Wiese danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachters meiner Dissertation.

Herrn Dr. Markus Perbandt gilt ein besonderer Dank, der mir die Tricks und Tips erfolgreicher Kristallisation gezeigt hat. Ebenso möchte ich Herrn Dr. Norbert Brattig und Herrn Dr. Kai Lüersen für deren Unterstützung danken sowie Frau Schmetz und Frau Ingeborg Albrecht.

Marie-Luise Eschbach möchte ich für Ihre unglaubliche Geduld und außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und für die schönen Mittags- und Kaffeepausen danken sowie Dr. Zita Krnajski für die vielen Ratschläge und Ihr Vertrauen. Martin Mayer danke ich für seine Hilfe und Treuseligkeit und Swantje Gundlach für Ihre positive Art, die mir insbesondere am Schluss meiner Dissertation sehr geholfen hat. Allen weiteren Kollegen möchte ich für die wirklich schöne Zeit am Bernard-Nocht-Institut danken.

Stefan Wriggers möchte ich für sein Verständnis und liebevolle Unterstützung danken und Katrin Magelsen für Ihre Anteilnahme und Zuverlässigkeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und denen ich noch so viel mehr zu verdanken habe.