

**Untersuchungen zur Genstruktur und Genexpression an  
Glutathion-S-Transferasen der Nematoden  
*Onchocerca volvulus* (Leukart 1893) und *Caenorhabditis elegans* (Maupas 1900)**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

-Dr. rer. nat.-

des Fachbereiches Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Stephanie Krause  
aus Buxtehude

Hamburg 2001

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. R. D. Walter

Weitere Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. K. Wiese

Tag der Disputation: 05. April 2002

Hamburg, den 20. März 2002



*Udo Wienand*

Professor Dr. U. Wienand  
Dekan

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Nematoden</b>	<b>1</b>
<b>1.2 <i>Onchocerca volvulus</i></b>	<b>2</b>
<b>1.3 Das Krankheitsbild der Onchozerkose</b>	<b>3</b>
<b>1.4 <i>Caenorhabditis elegans</i></b>	<b>4</b>
<b>1.5 <i>C. elegans</i> als Modellnematode</b>	<b>5</b>
<b>1.6 Fremdstoffmetabolismus</b>	<b>6</b>
<b>1.7 Fremdstoffmetabolismen bei Helminthen</b>	<b>7</b>
<b>1.8 Glutathion-S-Transferasen</b>	<b>8</b>
<b>1.9 Glutathion-S-Transferasen der Helminthen</b>	<b>10</b>
<b>1.10 Glutathion-S-Transferasen von <i>O. volvulus</i></b>	<b>11</b>
<b>1.11 Transkriptionelle Aktivierung und Regulation von Glutathion-S-Transferasen</b>	<b>12</b>
<b>1.12 Zielsetzung</b>	<b>16</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Chemikalien und Bioreagenzien</b>	<b>18</b>
2.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen:	19
<b>2.2 Vektoren und Zellen:</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Nematodenmaterial</b>	<b>21</b>
<b>2.4 Präparation von DNA</b>	<b>22</b>
2.4.1 Präparation genomischer DNA von <i>O. volvulus</i> und <i>C. elegans</i>	22
2.4.2 Mini-Präparation und Plasmid-DNA	22
2.4.3 Groß-Präparation von Plasmid-DNA	23
<b>2.5 Synthese von Oligonukleotiden</b>	<b>23</b>
<b>2.6 Polymerase-Kettenreaktion</b>	<b>23</b>
<b>2.7 Agarose-Gel-Elektrophorese von DNA</b>	<b>24</b>
<b>2.8 Elution und Aufreinigung der DNA aus Agarose-Gelen</b>	<b>24</b>
<b>2.9 Restriktionsverdau von DNA</b>	<b>25</b>
<b>2.10 Ligation von DNA-Fragmenten</b>	<b>25</b>
<b>2.11 Transformation</b>	<b>25</b>
2.11.1 Herstellung von kompetenten Bakterien	25
2.11.2 Durchführung der Transformation	26
<b>2.12 Radioaktive Markierung von DNA</b>	<b>26</b>
<b>2.13 Transfer von DNA</b>	<b>26</b>
<b>2.14 Hybridisierung von DNA mit radioaktiv markierter DNA</b>	<b>27</b>
<b>2.15 DNA-Sequenzierung</b>	<b>27</b>

<b>2.16</b>	<b>RNA-Techniken</b>	<b>28</b>
2.16.1	Gesamt-RNA-Isolierung aus <i>C. elegans</i>	28
2.16.2	Transfer von RNA	28
2.16.3	Hybridisierung von fixierter RNA mit radioaktiv markierter DNA	28
<b>2.17</b>	<b>Disk-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen</b>	<b>29</b>
<b>2.18</b>	<b><i>In vitro</i>-Stress-Experimente</b>	<b>29</b>
<b>2.19</b>	<b>Analyse der Promoterregion von <i>O. volvulus</i> und <i>C. elegans</i></b>	<b>29</b>
2.19.1	Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukte _ Fehler! Textmarke nicht definiert.	
2.19.2	Eukaryotische Zellkultur	31
2.19.3	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	31
2.19.4	Untersuchung zum Startpunkt der Transkription	32
2.19.5	Dual-Luciferase-Assay	32
2.19.6	GFP-Reporter-Gen-Konstrukte _____ Fehler! Textmarke nicht definiert.	
2.19.7	Random Mutagenese	34
2.19.8	Herstellung von Zellkernextrakt	36
2.19.9	Gel-Retentionsanalyse	37
<b>2.20</b>	<b>Herstellung von polyA-RNA zur Analyse per „Microarray“</b>	<b>37</b>
<b>2.21</b>	<b>Auswertung der Daten aus der „Microarray“-Analyse</b>	<b>38</b>
<b>3.</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Genstruktur der <i>OvGST1</i></b>	<b>39</b>
3.1.1	Southern-Blot-Analyse	42
3.1.2	Northern-Blot Analyse	43
<b>3.2</b>	<b>Analyse der Stromaufwärtsregion der <i>OvGST1</i> (1a und 1b) und <i>OvGST2</i></b>	<b>44</b>
3.2.1	Ermittlung der Transkriptionsstartpunkte	44
3.2.2	Identifizierung potentieller Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren	46
3.2.3	Untersuchungen zur Promotoraktivität	47
3.2.3.1	Charakterisierung des positiven <i>cis</i> -Elementes des <i>OvGST2</i> -Promotors	50
3.2.3.2	Einfluss verschiedener Chemikalien auf die Promotoraktivität	52
<b>3.3</b>	<b>Expression des <i>OvGST2::GFP</i>-Konstruktes in <i>C. elegans</i></b>	<b>52</b>
<b>3.4</b>	<b>„Microarray“- Untersuchungen oxidativ gestresster <i>C. elegans</i></b>	<b>56</b>
3.4.1	Analyse der durch Paraquat regulierten Glutathion-S-Transferasen	58
3.4.2	Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Glutathion-S-Transferasen	59
<b>3.5</b>	<b>Expression der GSH-S-Transferase <i>Ce-F56A4.H::GFP</i> in <i>C. elegans</i></b>	<b>61</b>
<b>4.</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Analyse der Genstruktur von <i>OvGST1a</i> und <i>OvGST1b</i></b>	<b>63</b>
<b>4.2</b>	<b>Analysen zum Promotoraufbau der <i>OvGST1a</i> und <i>OvGST1b</i></b>	<b>65</b>
<b>4.3</b>	<b>Die Funktionalität des <i>OvGST1a</i>- und <i>OvGST1b</i>-Promotors</b>	<b>66</b>
<b>4.4</b>	<b>Gewebespezifische Expression der <i>OvGST1a/1b</i></b>	<b>68</b>
<b>4.5</b>	<b>Analysen zu dem Promotoraufbau der <i>OvGST2</i></b>	<b>70</b>

<b>4.6</b>	<b>Untersuchungen zur Funktionalität des <i>OvGST2</i>-Promotors</b>	<b>71</b>
<b>4.7</b>	<b>Gewebespezifische Expression der <i>OvGST2</i></b>	<b>72</b>
<b>4.8</b>	<b>Expressionsanalyse von <i>Caenorhabditis elegans</i></b>	<b>73</b>
<b>4.9</b>	<b>Gewebsspezifische Expression der <i>Ce-F56A4.H</i></b>	<b>76</b>
<b>5.</b>	<b><i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i></b>	<b>79</b>
<b>6.</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b>	<b>81</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Nematoden

Zu den Nematelminthen gehören eine Vielzahl von Klassen, deren Vertreter sich sowohl in der äußeren Gestalt, als auch im inneren Bau beträchtlich voneinander unterscheiden. Die artenreichste Klasse mit mehr als 30 000 Spezies umfasst die Nematoden. Sie haben zahlreiche Lebensräume im Meer, Süßwasser sowie in feuchter Erde mit großer Individuendichte besiedelt. Ebenso findet man unter den Nematoden zahlreiche human-, tier- oder pflanzenpathogene Parasiten.

Aufgrund des Mangels an eindeutig homologen Kriterien und durch das Fehlen von informativen Fossilien lassen sich phylogenetische Linien innerhalb der Nematoden nur schwer verfolgen. Die Versuche einer Gruppierung der Familien und Arten sind daher sehr verschieden. Welche Nematoden als primitiv zu gelten haben, ist bislang noch sehr umstritten. Neue Untersuchungen verwenden zur Zuordnung in einen Stammbaum „small subunit DNA“-Sequenzen (Blaxter et al, 1998). Die Autoren teilen das Phylum Nematoda unabhängig von der Lebensweise in fünf Klassen und erweitern so die traditionelle Einteilung der Nematoden in terrestrische Secernentea und marine Adenophorea.

Die systematische Einordnung der in dieser Arbeit untersuchten Nematoden *Onchocerca volvulus* und *Caenorhabditis elegans* wird im folgenden aufgeführt:

	<i>Onchocerca volvulus</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<u>Phylum</u> :	Nematoda	Nematoda
<u>Klasse</u> :	Secernentea V	Secernentea V
<u>Ordnung</u> :	Spirurida	Rhabditida
<u>Überfamilie</u> :	Filarioidea	Rhabditoidea
<u>Familie</u> :	Onchocerciadae	Rhabditidae

## 1.2 *Onchocerca volvulus*

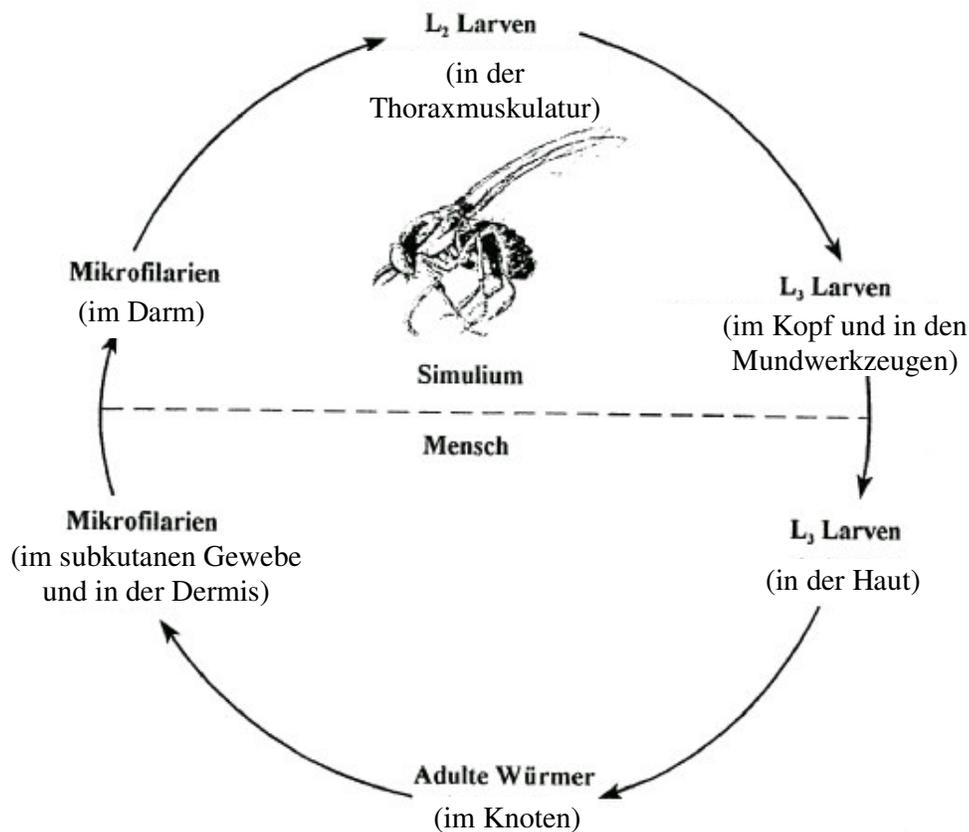
Laut WHO-Schätzungen sind weltweit etwa 18 Mio. Menschen mit *O. volvulus* infiziert (WHO, 2001). In Savannengebieten können ganze Ortschaften betroffen sein, in denen der Anteil erwerbstätiger Erwachsener durch Erblindung so stark reduziert ist, dass diese Siedlungen aufgrund fehlender wirtschaftlicher Existenzfähigkeit aufgegeben werden müssen. *Onchocerca volvulus* wurde erstmals 1893 von Leukart beschrieben. Das Männchen ist mit einer Größe von 3-5 cm und einem Durchmesser von 120-190 µm viel kleiner als das 25-50 cm lange Weibchen, das einen Durchmesser von 300-400 µm besitzt (Dönges 1988). Die adulten Weibchen finden sich zu mehreren in Bindegewebsknoten und im muskulären Bindegewebe zusammen und werden dort geschlechtsreif. Die Männchen dringen in diese Knoten ein, wo es zur Kopulation kommt. Täglich werden Tausende von Microfilarien (250-300 µm lang) ins subkutane Gewebe entlassen. Die Microfilarien können in der Dermis bis zu 2 Jahren überleben.

Die Übertragung der Onchozerkose erfolgt durch die Kriebelmücken (*Simulien sp.*). Bei einer Blutmahlzeit an einer infizierten Person nimmt die weibliche Mücke Microfilarien auf. Über die Darmwand und durch das Hämocoel gelangen die Microfilarien schließlich in die Thoraxmuskulatur, in der die Entwicklung zur infektiösen L3-Larve stattfindet. Die bei einem erneuten Stich in den Menschen gelangten L3 wandern nach der Häutung 12 bis 24 Monate als aktiv bewegliche L4 in Unterhautgewebe, Lymphsystem und Augen, bevor die Weibchen die Bildung eines Gewebsknotens induzieren.

Bisher gibt es kein sicheres Medikament, das die adulten *O. volvulus* abtötet. Die heutige Chemotherapie der Onchozerkose zielt auf die Bekämpfung der Microfilarien. Seit einigen Jahren wird für die Behandlung der Onchozerkose Ivermectin eingesetzt. Ivermectin zeigt geringe Nebenwirkungen (Van Leathem und Lopes 1996; Tagboto und Townson 1996; de Silva et al. 1997), da eine spezifische Inhibition von Chlorid-Kanälen der Invertebraten vorliegt (Kohler 2001).

Neuere Literatur berichtet von Endobakterien die in *O. volvulus* nachgewiesen werden konnten (Wu et al. 2000, Henkle-Dührsen et al. 1998). Nagetiere, welche mit den Filarien *Litosomoides sigmodontis* infiziert waren, wurden mit Tetracyclin behandelt. Hierbei konnte ein Einfluss auf die Entwicklung und die Fertilität des weiblichen Wurmes festgestellt werden (Hörauf 2000). Ob eine Behandlung der Onchozerkose durch Antibiotika erfolgsversprechend ist, bleibt fraglich.

Die Entwicklung makrofilarizider Medikamente, bzw. die eines Impfstoffes, ist dringend erforderlich.



### 1.11

### 1.12 Das Krankheitsbild der Onchozerkose

Die Präpatenzzeit beträgt 10 bis 30 Monate. Während einer Inkubationszeit von Monaten bis zu Jahren bleiben die heranwachsenden und adulten Filarien häufig im Bindegewebe von außen unentdeckt. Die Abkapselung der Mikrofilarien führt zu Bindegewebsknoten mit entzündlichen Granulomen und generalisierten Hauterscheinungen (Hautödem, Juckreiz, papulöses Exanthem, Lymphadenitis). Es kann sogar Erblindung der vorderen und hinteren Augenabschnitte (Sudan-Blindheit) führen. Die adulten Würmer leben in reizlosen Knoten des subkutanen Bindegewebes oder der Muskulatur, sog. Onchozerkome.

Die endemische Ausbreitung bezieht sich auf zwei große geographische Bereiche: Der tropische Regenwald und Savannengürtel von Afrika und Lateinamerika. In Afrika sind insgesamt 30 Länder, in Lateinamerika 6 Länder und zusätzlich auf der arabischen Halbinsel in Yemen sind davon betroffen (WHO 2001).

Abbildung 1. Lebenszyklus von *Onchocerca volvulus*

### 1.13 *Caenorhabditis elegans*

Der 1,5 mm große Fadenwurm *C. elegans* lebt in der Erde und ernährt sich von Bakterien. Die Weibchen legen etwa 240 Eier pro Tag. In den Eiern wird die Entwicklung der Embryonen bis zu schlüpfähigen Jungwürmern durchlaufen. Die Jungwürmer durchlaufen vier getrennte Larvalstadien und sind nach der vierten Häutung im Alter von nur 4 Tagen geschlechtsreif. Ihre Lebensdauer beträgt 2-3 Wochen. Unter ungünstigen Wachstumsbedingungen kann *C. elegans* auf eine für Nematoden nicht ungewöhnliche Entwicklungsvariante, die Dauerlarve, zurückgreifen. Diese kann nach der zweiten Häutung gebildet werden. Die Dauerlarve ist in der Lage, mit Hilfe ihrer extrem widerstandsfähigen Kutikula und ihres reduzierten Stoffwechsels monatelang inaktiv zu überleben (Schierenberg und Cassada 1986).

*C. elegans* sind Hermaphroditen (Zwitter). Sie besitzen Geschlechtschromosomen des XX-Typs, in ihrem Habitus und ihrer Anatomie sind sie weiblich, produzieren in ihren schlauchförmigen Gonaden aber dennoch zuerst Spermien und dann Eier. Neben dem Hermaphroditen treten durch Non-Disjunktion (fehlende Aufteilung) in der Meiose selten Männchen auf; diese besitzen nur ein Geschlechtschromosom (Schierenberg und Cassada 1986).

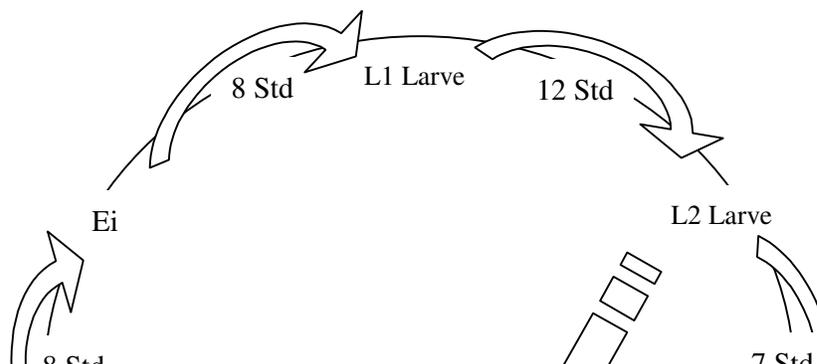


Abbildung 2. Lebenszyklus von *Caenorhabditis elegans*

#### **1.14 *C. elegans* als Modellnematode**

*C. elegans* bietet sich als eukaryotischer Modellorganismus durch seine Simplizität, die Transparenz seines Körpers und seine leichte Kultivierung im Labor für eine Vielzahl von biologischen Fragestellungen an. Er ist leicht in großen Mengen zu züchten und besitzt mit 3,5 Tagen eine kurze Generationszeit.

Das haploide Genom von *C. elegans* umfasst sechs Chromosomen mit  $8 \times 10^7$  Nukleotiden (Wood 1988). Das ist etwa 1/38 vom menschlichen Genom. Es wird geschätzt, dass an der Steuerung der Entwicklung von *C. elegans* etwa 1600 Gene beteiligt sind. Das gesamte Genom enthält ca. 5000 Gene. 1998 wurde das gesamte Genom von *C. elegans* als erster eukaryotischer Organismus vollständig sequenziert. Hierdurch sind genetische Analysen dieses Modelnematodes stark vereinfacht worden. Nach dem Genom wird nun das Proteom vollständig ermittelt.

In jahrelanger Arbeit konnte die gesamte Embryonal- und Larvalentwicklung vom Ei bis zum erwachsenen Tier auf zellulärer Ebene vollständig beschrieben werden (Marx 1984).

*C. elegans* ist sonst der erste Organismus, bei dem dies gelungen ist.

Als günstig erwies sich auch das fakultativ diözische (zweieltrige) Befruchtungssystem von *C. elegans*. Fremde Allele lassen sich durch Männchen einkreuzen und nach zwei Generationen kommt es zu homozygoten Nachkommen, ohne dass aufwendige Kreuzungen notwendig sind. Eine rezessive Mutation, die in einem Hermaphrodit heterozygot vorliegt, wird nach Selbstbefruchtung in der nächsten Generation bei  $\frac{1}{4}$  der Individuen homozygot vorhanden sein und daher phänotypisch zum Vorschein kommen. Neben diesen experimentellen Vorteilen rechtfertigt auch die enge Verwandtschaft zu parasitischen Nematoden die Nutzung von *C. elegans* als Modellnematoden für humanpathogene Nematoden (Riddle et al. 1997; Waterston et al. 1997; Blaxter und Bird 1997).

### **1.15      Fremdstoffmetabolismus**

Freilebende wie auch parasitische Organismen werden in ihrem Umfeld mit chemischen Verbindungen konfrontiert, die entweder keinen physiologischen Wert besitzen, nicht für normale metabolische Funktionen innerhalb des Organismus benötigt werden oder die sogar toxisch sein können. Das Eindringen dieser xenobiotischen Verbindungen, die zum Teil biologisch aktiv sind, stellt eine potentielle Gefahr dar und kann zu irreversiblen Schädigungen führen. Da diese Verbindungen zumeist lipophil sind, können sie leicht in die Zelle gelangen. Die hier ausgelösten chemischen Veränderungen von Biopolymeren verlaufen über radikalische Zwischenstufen, meist jedoch über eine Reaktion nukleophiler Gruppen des Biopolymers mit einer elektrophilen Gruppe des Fremdstoffes (Nuhn 1993). Auch soll nicht unerwähnt bleiben, dass Xenobiotika als Enzyminduktoren wirken und auf diesem Weg Interaktionen mit anderen Wirkstoffen auslösen können (Bock et al. 1990). Einige Xenobiotika können unverändert ausgeschieden werden, andere gehen spontane chemische Reaktionen ein, die meisten werden jedoch durch enzymatische Biotransformation umgebaut. Die am häufigsten verwendete Klassifizierung des Fremdstoffmetabolismus gründet auf der Vorstellung, dass die wichtigste Funktion darin besteht, schwer ausscheidbare unpolare, lipophile Stoffe zu leichter ausscheidbaren polaren, hydrophilen Stoffen zu metabolisieren (Jacoby 1983). Im Allgemeinen führt diese Biotransformation zu einer schnelleren Ausscheidung von Xenobiotika, wodurch die Akkumulation lipophiler Verbindungen verhindert wird. Daher ist xenobiotischer

Stoffwechsel meist synonym mit Entgiftung, wobei aber auch häufig die Biotransformation zur Biotoxifikation werden kann.

In der Phase I des Fremdstoffmetabolismus werden funktionelle, reaktive Gruppen in ein Molekül eingebracht; in der Mehrzahl der Organismen werden xenobiotische Verbindungen von einer Gruppe fremdstoffmetabolisierender Oxidationsenzyme entgiftet; bei denen es sich meist um Cytochrom P450-abhängige Enzyme handelt (Nebert und Gonzale 1987).

In der Phase II kommt es zur Konjugation einer polaren, funktionellen Gruppe der xenobiotischen Verbindung mit einem endogenen Co-Substrat. Endogenes Co-Substrat kann hier zum einen eine Aminosäure oder Glutathion (GSH), zum anderen Zucker-, Phosphat- oder Sulfatrest sein (Krishna und Klotz 1994).

Wichtige Phase-II-Entgiftungsenzyme sind die Glutathion-S-Transferasen (GST). Als Ergänzung zur klassischen Einteilung des Fremdstoffmetabolismus kann man den Export der biotransformierten Xenobiotika aus der Zelle als Teil der Phase III betrachten (Vore 1994). In dem glutathionabhängigen Stoffwechselweg werden die Konjugate mit Hilfe von Glutathion-Konjugate (GS-X)-Transportern ausgeschleust.

### **1.16 Fremdstoffmetabolismen bei Helminthen**

Naturgemäß sind fremdstoffmetabolisierende Enzyme in den einzelnen Organismen unterschiedlich ausgeprägt. Dies ist eine wichtige Ursache für die unterschiedliche Toxizität eines bestimmten Fremdstoffes in verschiedenen Organismen. Daher können Veränderungen von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen auch als eine Adaption an die parasitäre Lebensweise verstanden werden. Als gesichert gilt auch, dass es zur Expression von adaptiven Programmen wie dem Fremdstoffmetabolismus kommt, wenn der Parasit „chemischem Stress“ ausgesetzt ist, der durch Pharmaka oder durch Immuneffektorzellen des Wirtes hervorgerufen wird. Das Auftreten von Resistenzen auch bei Helminthen, gegen bisher gebräuchliche Medikamente (Ciolo et al. 1993; Brindley 1994; Roos et al. 1995; Pritchard 1994; Lacey und Gill 1994), verstärkt die Suche nach anderen Medikamenten, die selektiv die Funktion des Parasiten beeinträchtigen, ohne dabei die Wirtszellen in Mitleidenschaft zu ziehen. Die Suche konzentriert sich auf biochemische Vorgänge, die in qualitativer oder quantitativer Hinsicht charakteristisch für Parasiten sind.

Während die Phase I vom Fremdstoffmetabolismus des Wirtsorganismus zumeist von einer Gruppe von Oxidationsenzymen übernommen wird, wird postuliert, dass die Entgiftung bei Helminthen hingegen zumeist reduktiver, bzw. hydrolytischer Art ist. Auch scheint bei Helminthen ein Cytochrom-P450-abhängiger xenobiotischer Metabolismus zu fehlen (Precious und Barrett 1989a). Es darf aber nicht unerwähnt bleiben, dass die hier erwähnten Helminthen Darmbewohner sind, d.h. in einem sauerstoffarmen Milieu leben. Beschriebene Phase-I-Entgiftungsenzyme der Helminthen sind u.a. Sulfoxidasen; hier konnte gezeigt werden, dass sie die Anthelmintika Albendazol und Fenbendazol (Benzimidazolderivate) zu den entsprechenden Sulfoxiden metabolisieren (Douch und Buchanan 1979).

Während bei Helminthen der oxidative Abbau von Giftstoffen kaum untersucht ist, so sind bisher nur einige Glutathionperoxidase (GP) beschrieben, welche Hydroperoxide neutralisieren, ist der reduktive Phase-I-xenobiotische Metabolismus besser untersucht. So können Helminthen Xenobiotika reduzieren, die eine funktionelle Azo- bzw. Nitro-Gruppe besitzen (Munir und Barrett 1985). Weitere Enzyme, die am reduktiven Metabolismus der Phase I beteiligt sind, stellen die Familien der Aldehyd- und Ketonreduktasen dar. Einige Xenobiotika-hydrolysierende Enzyme konnten im Homogenat verschiedener Helminthen gemessen werden (Tracy und Vande Waa 1995).

Wichtige Phase-II-Entgiftungsenzyme höherer Eukaryonten konnten bei den untersuchten Parasiten nicht identifiziert werden (Tracy und Vande Waa 1995). Es wird postuliert, dass der wichtigste Weg der Helminthen Xenobiotika zu entgiften, die Bildung von GS-X durch die Glutathion-S-Transferase ist. Die Glutathion-S-Transferasen wurden mit Ausnahmen einiger parasitärer Protozoen, in allen darauf untersuchten Protozoen gefunden (Brophy und Pritchard 1994).

### **1.17 Glutathion-S-Transferasen**

Bei den Glutathion-S-Transferasen handelt es sich um eine multifunktionelle Enzymfamilie, die den nukleophilen Angriff des Schwefelatoms von GSH ( $\gamma$ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin) auf elektrophile Zentren endogener und xenobiotischer Verbindungen katalysieren (Mannervik 1985; Boyer 1989). Das elektrophile Zentrum der zumeist hydrophoben Verbindungen kann dabei ein Kohlenstoff-, Schwefel-, Stickstoff- oder Sauerstoffatom

sein. Die Isoenzyme der GST-Superfamilie setzen eine vielfältige Gruppe von Substraten um. Überschneidende Substratspezifitäten der einzelnen Isoenzyme sind weit verbreitet. Den Glutathion-S-Transferasen wird auch eine Rolle als passive Bindungsproteine für den intrazellulären Transport von einigen Steroid- und Thyroidhormonen, von endogenen Metaboliten und exogenen Verbindungen zugeschrieben. Auf diese Weise wird die Anreicherung dieser Verbindungen in der Zellmembran verhindert und so deren cytotoxische Effekte abgewendet (Listowski et al. 1993). Ein bedeutender Teil der Forschung konzentriert sich auf das Potential der Glutathion-S-Transferasen, kanzerogene Verbindungen zu entgiften. Im Rahmen der medikamentösen Tumorthherapie sind Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika beobachtet worden, die mit Glutathion-S-Transferasen in Zusammenhang gebracht werden. Hier konnte gezeigt werden, dass verschiedene resistente Zelllinien Glutathion-S-Transferasen überexprimieren (Liu et al. 2001, Tew et al. 1998). Die zugrunde liegenden Mechanismen beinhalten Genduplikation und transkriptionelle Aktivierung, Stabilisierung sowohl der mRNA als auch des Proteins.

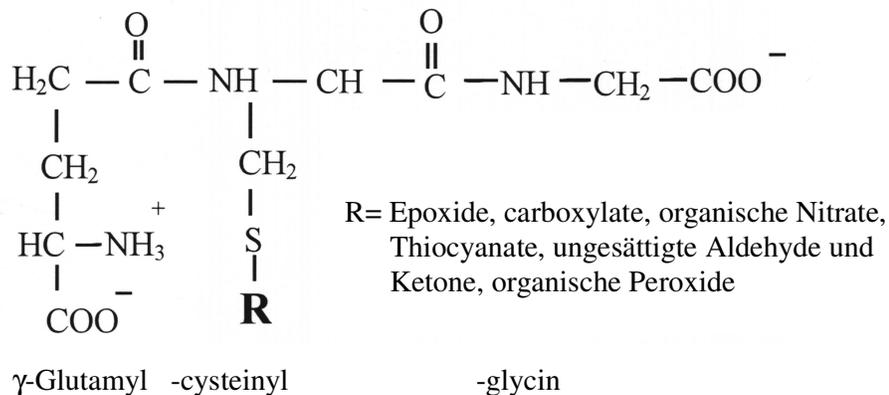


Abbildung 3 . Konjugation von Glutathion an elektrophilen Verbindungen

Der strukturelle Aufbau auf Protein- sowie Genebene wurde eingehend in den Organismen Maus, Ratte und Mensch analysiert. Es zeigte sich ein Aufbau der Enzyme in zwei Untereinheiten, die als Heterodimer oder Homodime das Enzym bilden.

Nach dem heutigen Wissensstand werden die zytosolischen Glutathion-S-Transferasen aufgrund ihrer Primärstruktur und Substratspezifität in sieben verschiedene Klassen unterteilt. Hierzu gehören die Alpha-, Mu-, Pi-, Sigma- und Theta-Klassen und die erst kürzlich beschriebenen Zeta- und Omega-Klassen (Eaton und Bammler 1999). Weiterhin lassen sich auch bei Pflanzen Phi- und die Tau-Klassen beschreiben (Edwards et al. 2000). Erwähnt werden sollte auch die Beta-Klasse einiger Bakterien (Vuilleumier et al. 1997), sowie die Delta-Klasse höherer Wirbellose (Zhou und Syvanen 1997). Des Weiteren lassen sich drei verschiedene mikrosomale Enzymformen beschrieben, welche unter dem Begriff „MAPEG“ („membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism“) zusammengefasst wurden. Hierzu gehören die Glutathion-S-Transferase1, LTC4-Synthase und eine mikrosomale Prostaglandin E-Synthase (Jakobsson et al. 1999).

Innerhalb der GST-Familien wurde die Genstruktur einzelner Enzyme miteinander verglichen. Isolierte GST-Gene der Klasse Alpha sind 11 bis 12 kb groß und besitzen 7 Exons (Rozen et al. 1992; Suzuki 1993; Telakowski-Hopkins 1985). Vertreter der Klasse Mu sind bis 5kb groß und haben 8 Exons (Reinhart et al. 1993; Pearson et al. 1993; Morton et al. 1990), wobei auch eine vom Hamster beschriebene Glutathion-S-Transferasen sogar 9 Exons besitzt (Fan et al. 1992). Klasse Pi-Gene sind etwa 3 kb groß und beinhalten 7 Exons (Okuda et al. 1987; Xu et al. 1994). Beschriebene Klasse Theta-Gene sind 4kb groß und besitzen 5 Exons (Ogura et al. 1994). Die Gene der Zeta-Klasse sind bis zu 11 kb groß und besitzen bis zu 9 Exons (Blackburn et al. 1998). Innerhalb der Pi-Klassen sind auch Pseudogene bekannt, die sich durch eine fehlende transkriptionelle Aktivität auszeichnen. Pseudogene haben keine Introns und scheinen als revers transkribierte mRNA, in Form von cDNA ins Genom integriert zu werden.

### **1.18 Glutathion-S-Transferasen der Helminthen**

Den Glutathion-S-Transferasen der Helminthen wird eine wichtige Rolle in der Immun- und der Chemotherapie zugesprochen (Smith et al. 1986; Balloul et al. 1987; Brophy und Barret 1990; Brophy und Pritchard, 1992). Die Glutathion-S-Transferasen erwiesen sich

besonders in Immunisierungsstudien gegen Schistosomiasis und Fascioliasis als außerordentlich protektive Antigene (Balloul et al. 1987; Sexton et al. 1990; Richter et al. 1993; Brophy und Pritchard 1994). Es wird angenommen, dass die Entgiftung durch die Glutathion-S-Transferasen einen der Hauptabwehrmechanismen der Helminthen gegen xenobiotischen Substanzen darstellt (Precius und Barrett, 1989b).

Obwohl die meisten Autoren eine Einordnung der Helminthen-GST durch spezifische Säugetier-GST-Familienmarker akzeptieren, wird dennoch die Berücksichtigung der Helminthen Glutathion-S-Transferasen in eine neue Zuordnung nötig sein (Vibonco-Perez und Landa-Piedra, 1998). Die Lokalisierung der Glutathion-S-Transferasen in Helminthen ist von Spezies zu Spezies unterschiedlich und weist auf mögliche Funktionen des jeweiligen Enzyms im Stoffwechsel der Helminthen hin (Douch und Buchanan 1979; Tayler et al. 1988; Trottei et al. 1990).

Die Lokalisation der Helminthen-Glutathion-S-Transferasen beschränkt sich nicht nur auf cytosolische und mikrosomale Formen, es sind auch sekretorische bzw. an der Zelloberfläche gebundene Glutathion-S-Transferasen bekannt. Bei den Trematoden *Fasciola hepatica* ist die extrazelluläre Glutathion-S-Transferase mit dem lamellären Bereich des intestinalen Epithelium assoziiert (Wijffels et al. 1992). In *Schistosoma mansoni* konnte ebenfalls eine sekretorische Glutathion-S-Transferase gefunden werden (Lui et al. 1996). In *O. volvulus* wurde die *OvGST1a/1b* an der Parasiten-Wirts-Oberfläche lokalisiert (Wildenburg et al. 1998).

### **1.19 Glutathion-S-Transferasen von *O. volvulus***

In *O. volvulus* konnten bisher vier Glutathion-S-Transferasen (*OvGST1a/1b*, *OvGST2*, *OvGST3*) identifiziert werden. Bei den *OvGST1a/1b* handelt es sich um sekretorische Enzyme, die mit Hilfe der Immunlokalisierung hauptsächlich im äußeren lamellären Bereich der Hypodermis detektiert wurden (Liebau et al. 1994; Wildenburg et al. 1998). Sie besitzen im Vergleich zu anderen Glutathion-S-Transferasen ein Signalpeptid, eine N-terminale Verlängerung und sind glykosyliert. Die *OvGST2* ist ein cytosolisches Enzym, welches in der Hypodermis von Adulten, in den Microfilarien der Haut und im infektiösen Stadium (L3) vorkommt (Liebau et al. 1996). Bei der *OvGST3* handelt es sich, wie bei der *OvGST1*, vermutlich um ein posttranslationell modifiziertes Enzym. Die *GST3* konnte

über die Methode der RT-PCR als stress-induzierbares Enzym identifiziert werden und lässt sich anhand der Aminosäuresequenz der Theta-Klasse zuordnen (Liebau et al. 2000).

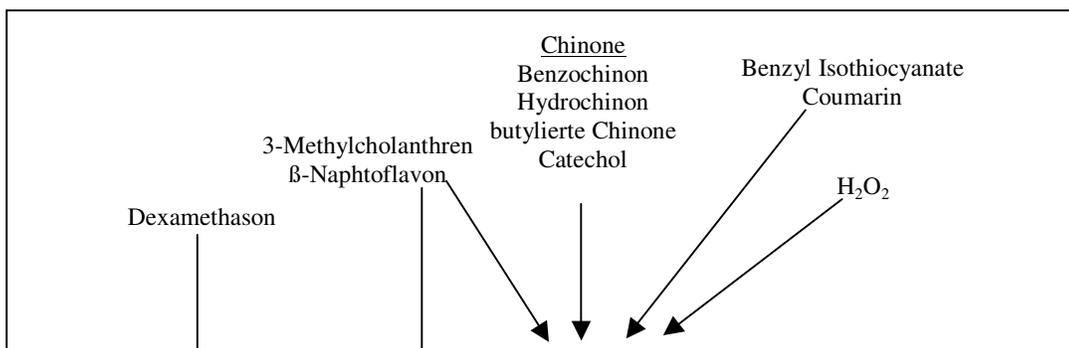
### 1.20 Transkriptionelle Aktivierung und Regulation von Glutathion-S-Transferasen

Die Regulation von Glutathion-S-Transferasen ist sehr komplex, da sowohl Gewebe- und Geschlechtsspezifität, aber auch Regulation durch physiologischen Stress sowie Induktion durch verschiedene Substanzen festgestellt werden konnte. Die molekularstrukturelle Vielfalt der Komponenten, die eine Erhöhung der Expression ermöglichen, deuten auf eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen, die zur Regulation notwendig sind.

Bei *Sphaerium corneum*, der Frischwassermuschel, wird die Expression von Glutathion-S-Transferasen nach Verschmutzung des Wassers durch organische Chlorverbindungen stark erhöht (Boryslawski et al. 1988). Bei Mais wird die Expression der GST-Isoenzyme nach Zugabe von Herbiziden, wie N,N-Diallyl-2,2-Dichloracetamide stark induziert (Holt et al. 1995; Jepson et al. 1994). Auch zeigen verschiedene Studien, die an Nagetieren durchgeführt wurden, dass weit über hundert verschiedene Chemikalien in der Lage sind, Glutathion-S-Transferasen zu induzieren (Hayes und Pulford 1995).

Es lässt sich eine Einteilung der Induktoren in vier verschiedene Gruppen vornehmen (John et al. 1995):

- Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
- Phenolische Antioxidantien, Michaelis-reaktive Akzeptoren, organische Isothiocyanate, ROS („reactive oxygen species“), einfache Arsenverbindungen
- Barbiturate
- Synthetische Glucocorticoide



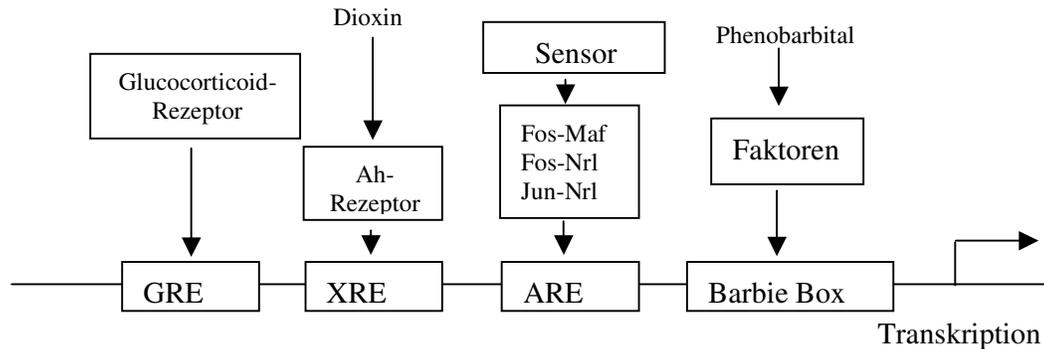


Abbildung 4. Interaktion zwischen Chemikalien und *cis*-Elementen der GST-Gene

### Regulation der Glutathion-S-Transferase durch Glucocorticoide

Die Regulation durch Hormone verläuft über Rezeptoren, die ihre Wirkung im Zellkern entfalten. Die nuklearen Rezeptoren können sowohl im Cytosol als auch im Kern lokalisiert sein. Die Hormone können aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften die Zellmembran passieren und so an den Rezeptor binden. Die Hormonbindung aktiviert so die transkriptionsregulierende Wirkung des Rezeptors. Es ist zu vermuten, dass die Induktion der rGSTA2 durch Dexamethason in Zusammenhang mit dem GRE-Element steht (Waxman 1992).

Die Expression der humanen GSTP1 kann durch Zugabe von Insulin erhöht werden. Dies wird in Zusammenhang mit einer 8 bp Sequenz (5'CCCGCTC-3') gebracht, die etwa +48 bis +55 bp vom Transkriptionsstartpunkt (innerhalb des Intron I) zu finden ist (Hatayama et al. 1991).

### Transkriptionelle Regulation durch Dioxin

Dioxin und andere verwandte halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe wirken stark induktiv auf eine Vielzahl von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus, wie Cytochrom p-450 und Glutathion-S-Transferase aber auch auf NADP(H)-Chinon-Reduktasen (Nebert und Gonzales 1986; Fujii-Keriyama et al. 1992; Poellinger et al. 1992; Whitlock 1993).

Die Induktion wird über den Ah-Rezeptor, „aryl hydrocarbon receptor“, vermittelt (Poland und Kuntson 1982; Nebert und Gonzales 1987). In Abwesenheit des Liganden Dioxin liegt der Ah-Rezeptor inaktiv vor und kann nicht an DNA-Elemente binden. Gelangt Dioxin über passive Diffusion in die Zelle, bildet sich ein Dioxin-Ah-Rezeptor-Komplex aus, der durch die Kernmembran tritt und dort an die DNA bindet (Landers und Bunce 1991; Poellinger et al. 1992; Whitelock 1993). Der Rezeptor bildet über eine Helix-Loop-Helix eine spezifische Bindung zu „xenobiotic response“-Elementen (Denison et al. 1988; Fujisawa-Sehara et al. 1988; Neuhold et al. 1989).

### **Regulation der Glutathion-S-Transferasen durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe**

Die GSTA2 der Ratte besitzt *cis*-Elemente die sich durch 3-Methylcholanthren induzieren lassen (Ding und Pickett 1985). Diese Elemente zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu XRE (xenobiotic response element), das bereits bei Cytochrom P450 (CYP450) beschrieben worden ist. Unter Zugabe von halogenen aromatischen Kohlenwasserstoffe erhöht sich die transkriptionelle Aktivität von CYP um das 30-fache (Fujisawa et al. 1986; Gonzalez et al. 1985; Neuhold et al. 1989).

Am XRE binden die AH-Rezeptoren. AH-Rezeptoren sind Liganden-gesteuerte Transkriptionsfaktoren mit einem Helix-Loop-Helix-Motiv. Diese Rezeptoren binden direkt an aromatischen Kohlenwasserstoffe und regulieren so die Transkription verschiedener Gene (Hayes und Pulford 1995, Paulson et al. 1990).

### **Transkriptionsfaktoren, die durch Anti- und Pro-Oxidantien und Michaelis-reaktive Akzeptoren die Induktion von Glutathion-S-Transferasen beeinflussen**

Es ist bekannt, dass die sog. AR-Elemente („antioxidant response element“) als DNA - Protein-Bindungsstellen in Glutathion-S-Transferasen vorkommen und eine Aktivierung unter Zugabe von planaren aromatischen Verbindungen, wie  $\beta$ -Naphthoflavon und 3-Methylcholanthren, bewirken (Rushmore 1990, Rushmore 1991).

Eine Aktivierung der AR-Elemente könnte durch die Bindung heteromerer bZIP-Proteinen hervorgerufen werden. So wäre eine Regulation dann über den Phosphorylierungs- oder den Redoxstatus möglich (Hayes und Pulford 1995).

### **Regulation der Glutathion-S-Transferasen durch Phenobarbital**

Viele Glutathion-S-Transferasen lassen sich durch Phenobarbital induzieren. Der genaue Mechanismus ist aber noch nicht bekannt. In Zusammenhang mit der Induktion sind „barbiturate-responsive“ Elemente gefunden worden. Dieses Element wurde bereits in den *Bacillus megaterium* Genen der Cyp<sub>BM-1</sub> und <sub>BM-3</sub> beschrieben (English et al. 1996).

Da die Aktivierung von Glutathion-S-Transferasen meist durch die Zugabe von Fremdstoffen stark erhöht werden kann, geht man von einer adaptiven Antwort auf chemischen Stress aus. Die Glutathion-S-Transferasen werden u.a. auch durch ihre eigenen Substrate und auch durch die Substrate des Cytochrom P450, die später zu GST-Substraten umgesetzt werden, induziert. Zudem wird vermutet, dass Glutathion-S-Transferasen auch die Induktion anderer Substrate steuern, deren Regulation Enzyme wie Chinon-Reduktase, Aflatoxin B1-Aldehydreduktase und  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase betreffen. Glutathion-S-Transferase und Substrate der Glutathion-S-Transferase scheinen auch die Fähigkeit zu besitzen, eine Reihe von Phase-II-Entgiftungsenzyme zu regulieren.

### **Regulation durch posttranskriptionelle Modifikation**

Zur vollständigen Darstellung der Mechanismen zur Regulation von Glutathion-S-Transferasen ist neben der Genregulation auch die Regulation der Enzymaktivität zu erwähnen. Glutathion-S-Transferasen können in vielfältiger Weise auf Enzymebene reguliert werden. Am häufigsten sind kovalente Modifikationen beschrieben worden. So konnte in vitro nachgewiesen werden, dass die Methylierung der humanen Glutathion-S-Transferase GSTm6 zu einer Erniedrigung der enzymatischen Aktivität führt (Johnson et al. 1992).

Eine Phosphorylierung der GSTA1 durch Protein-Kinase C konnte in vitro bewiesen werden. Es stellte sich nach der Phosphorylierung heraus, dass eine verringerte Affinität zu Bilirubin vorhanden ist (Taniguchi 1989). Vermutlich erhöht eine Phosphorylierung auch

die Affinität zu anderen Nonsubstrat-Liganden (Taniguchi 1989). Auch durch die Zugabe reaktiver Sauerstoffspezies konnte ein Effekt auf die Enzymaktivität gemessen werden. Allgemein kann gesagt werden, dass bei Glutathion-S-Transferasen der Alpha- und Pi-Klasse eine Hemmung eintritt, während die Mu-Klasse aktiviert wird. Für Pi-Klasse Glutathion-S-Transferasen ist ein Cystein-Rest für diese Inaktivierung verantwortlich (Hayes und Pulford 1995).

### **1.21 Zielsetzung**

Die Glutathion-Konjugation durch die Glutathion-S-Transferase (GST), sowie der anschließende Transport der gebildeten Konjugate, stellen einen der Hauptmechanismen der zellulären Entgiftung dar. Auch ist dies der bedeutenste Entgiftungsweg der Helminthen in Bezug auf Xenobiotika. Häufig ist das Auftreten von Medikamentenresistenzen mit einer vermehrten Bildung und Ausschleusung der Konjugate aus der Zelle verbunden. Daher ist eine fundierte Kenntnis der essentiellen Funktion der GST bei Helminthen von besonderem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation der Transkription der Glutathion-S-Transferasen von *O. volvulus* untersucht werden. In vorangegangenen Studien konnte bereits die Aminosäuresequenz der *OvGST1* und *OvGST2* ermittelt werden. Des Weiteren wurde die Genstruktur der *OvGST2* beschrieben.

Es sollte die genomische Struktur und der potentielle Promotorbereich der *OvGST1* untersucht werden. Zusätzlich hierzu sollte der schon bekannte Promotorbereich der *OvGST2* analysiert werden. Es sollten Promotor-Reporter-Konstrukte erstellt werden und in heterologen Systemen die Promotoraktivität, sowie Induzierbarkeit aber auch Stadien- und Gewebsspezifität untersucht werden. Die Analyse von *O. volvulus*-Promotoren wird dadurch erschwert, dass es hier keine geeigneten Laborwirte gibt und auch keine *O. volvulus* Zelllinien vorhanden sind. Aus diesem Grund wurden für die Untersuchungen der Modelorganismus *C. elegans*, aber auch eukaryotische Zelllinien anderer Organismen gewählt.

Ein zweiter Teil dieser Arbeit untersucht die Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies auf das Expressionsmuster von *C. elegans*. Die meisten Helminthen können durch enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien den größten Teil der entstandenen reaktive Sauerstoffspezies abbauen, die u.a. durch „oxidativen burst“ der Makrophagen und neutrophilen Granulocyten gebildet werden. Nicht erfolgreich abgewehrte reaktive Sauerstoffspezies führen zur Entstehung von Radikalen, die eine Lipidperoxidation der Zellmembran hervorrufen können. Die Sekundärprodukte dieser autokatalytischen Kettenreaktion können durch Glutathion-S-Transferasen neutralisiert werden.

Durch die Anwendung der „Mirco-Array“-Methode sollte eine Beschreibung Paraquat-induzierter Glutathion-S-Transferasen des Modellnematoden *C. elegans* vorgenommen werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Chemikalien und Bioreagenzien**

Die Chemikalien in p.A. Qualität wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merk (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die Bezugsquelle wird im Folgenden gesondert erwähnt, wenn daraus ein Einfluss auf die Versuchsdurchführung denkbar ist oder sich das Verständnis des Versuchsprotokoll dadurch vereinfacht.

#### DNA-Elektrophorese-Reagenzien

Agarose und DNA-Größenstandards (1kb- und 123 bp-Leiter) wurden von Life Technologies (Eggenstein) bezogen.

#### Eichproben für Polyacrylamid-Gele

Standards für die Molekulargewichtsbestimmung des SDS-PAGE lagen im Molekulargewichtsbereich 14 300– 200 000 (Life Technologies) bzw. Rainbow™ Molekulargewichts-standard 14 300– 200 000 von Amersham-Pharmacia Biotech (Braunschweig).

#### Elektrophorese-Reagenzien für Protein-Gele:

Acrylamid, Ammoniumpersulfat, Natriumdodecylsulfat (SDS), N, N, N', N' –Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Bromphenolblau-Natrium-Salz (Serva, Heidelberg), Dithioerythritol, Glycin und Tris-Puffer (Sigma-Aldrich, Deisenhofen).

#### Enzyme:

Restriktionsenzyme, DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment), T4-Polynukleotidkinase, Lysozym-Proteinase K, RNase und DNase (Boehringer Mannheim und Amersham-Pharmacia), Taq-Polymerase und Reverse-Transkriptase (Life Technologies, Karlsruhe).

Färbereagenzien:

Coomassie Blau (R250, G250) und Silbernitrat (Merk, Darmstadt).

„Kits“:

Sequenase Version 2.0 DNA „Sequencing Kit“ (Amersham Buchler, Braunschweig), „Random Primed DNA Labeling Kit“ (Boehringer Mannheim), „TA Cloning Kit“ (Invitrogen, Leek).

Medien und Platten:

Die Herstellung der Medien erfolgte nach Herstellerangaben. Feste Medien, zu Platten verarbeitet, enthielten zusätzlich 1,4 g Agar (Difco Laboratories, Ditroit, USA) je Liter.

Radioaktive Reagenzien:

Radioaktive Nukleotide (Amersham Buchler): [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP und [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP.

**3.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen:**

Agarose-Elektrophorese

5-fach TBE-Puffer:	450 mM Tris (Tris[Hydroxymethyl]aminomethane)/450 mM Borat/10 mM EDTA (pH 8,0)
5-fach TAE-Puffer:	200 mM Tris/1,5 M Natriumacetat/5 mM EDTA(pH 8,0)
6-fach Probenpuffer:	0,25% Bromphenolblau/0,25% Xylencyanol/40% Glycerol

Hybridisierungslösung

20-fach SSC:	3 M NaCl/0,3 M Natriumcitrat (pH 7,0)
100-fach Denhardt $\epsilon$ :	2% Ficoll/2% Polyvenylpyrrolidon/2% BSA in H <sub>2</sub> O
Heringssperma-DNA:	10 mg ml <sup>-1</sup> Heringsspermien-DNA in TE
SM-Puffer:	100 mM NaCl/10 mM MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O/0,01% Gelantine/ 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)

Medium und Agar

LB:	1,0% Trypticase-Pepton/0,5% Hefe-Extrakt/0,1% NaCl
-----	--

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5% Agar

### NGM

(„nematode growth medium“): besteht aus zwei Lösungen 0,3% NaCl/0,25% Pepton, diese werden von den Zusätzen getrennt autoklaviert

NGM Zusätze: 13 mM Cholesterin/1 mM CaCl<sub>2</sub>/0,5 mM MgCl<sub>2</sub>/0,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0,16 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### PBS

(phosphatgepufferte Kochsalzlösung):

10 mM NaCl/19 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH7,3)

### SDS-PAGE-Lösungen

Ammoniumpersulfat: 10% in H<sub>2</sub>O

30% Acrylamid-Lösung: 29,1% Acrylamid/0,9% Bisacrylamid

Sammelpuffer: 5,7g Tris-ad 100 ml H<sub>2</sub>O (auf pH 6,7 mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> einstellen)

1-fach SDS-Laufpuffer: 3g Tris/14,4 g Glycin/10 ml 10% SDS ad 1 l dH<sub>2</sub>O

2-fach SDS-Probenpuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 6,8)/12% Glycerin/4% SDS/  
2% 2-Mercaptoethanol/0,01% Serva Blue G

Trenngelbutter: 36,3 g Tris ad 100 ml (auf pH 8,9 mit HCl einstellen)

## 2.2 Vektoren und Zellen:

### Plasmidvektoren:

pCR<sup>TM</sup>II (Invitrogen, Niederlande CH Groningen), pPD95.77 (zur Verfügung gestellt von A. Fire, Carnegie Institution of Washington, Baltimore, MD), pGL-3 (Promega, Mannheim), pKL-TK Vektor (Promega).

### Bakterien:

DH5 $\alpha$ :  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*r<sub>K</sub>-*, *m<sub>K</sub>+*), *supE44*, *relA1*, *deoR*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, (Hanahan, 1985)

### Eukaryotische Zellen:

CHO-Zellen („chinese hamster ovary cells“; Wildtyp, DSMZ Nr: ACC126, ATCC (CRL - 9096)), 293-Zellen („human embryonic kidney -293 cells“; DSMZ Nr: ACC 305), HeLa-Zellen („human cervix carcinoma“ ATCC (CCL 2), DSMZ Nr.: ACC57).

## **2.3 Nematodenmaterial**

### *Onchocerca volvulus*

Aus Patienten in Liberia wurden Knoten mit *O. volvulus* operativ gewonnen. Die adulten *O. volvulus* wurden durch Behandlung der Knoten mit Collagenase (*Clostridium histolyticum*, Boehringer-Mannheim) vom Wirtsgewebe befreit (Schulz-Key et al. 1977). Die weiblichen Würmer wurden in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### *Caenorhabditis elegans*

Wildtyp (N2 var. Bristol) *C. elegans* wurde in 25 ml NGM in 9 cm-Petrischalen bei 22°C unter xenischen Bedingungen durch Zugabe von *Escherichia coli* OP 50 gezüchtet. Um die Ausbeute an Nematoden zu steigern, wurde *C. elegans* in 300 ml Massenkulturen unter Schütteln im Wasserbad gehalten. Zur Trennung der Bakterien von den Nematoden wurde die Methode des „Floating“ nach Sulston und Hodgkin (1988) durchgeführt. Um die Beweglichkeit der Nematoden herabzusetzen, wurden sie für 1h auf Eis gestellt und bei 1000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit den Nematoden in eiskalter 0,1 M NaCl-Lösung aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 20 ml 0,1 M NaCl-Lösung resuspendiert und 20 ml 60%ige Saccharoselösung hinzugegeben. Die Nematoden wurden resuspendiert und bei 1000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich die Nematoden in der oberen Schicht. Sie wurden mit einer Pasteurpipette in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit kalter 0,1 M NaCl-Lösung gewaschen, bevor sie für weitere Versuche verwendet wurden.

Für die Induktionsversuche wurden reine Larvenkulturen benötigt. Zu diesem Zweck wurde das Pellet von *C. elegans*-Massenkulturen in 20 ml kalter NaCl-Lösung suspendiert,

30 ml 60%ige Saccharoselösung hinzugegeben und mit 1200 g bei 4°C für 7 min zentrifugiert. In der obersten Schicht befanden sich neben etwa 10% Adulten ausschließlich Larvenstadien. Die Larvenstadien wurden durch eine Aufreinigung mit einem Sieb (55 µm Porengröße) von den Adulten getrennt. Die Reinheit der gewonnenen Larvenkulturen wurde mit Hilfe eines Binokulars überprüft.

## **2.4 Präparation von DNA**

### **3.2.1 Präparation genomischer DNA von *O. volvulus* und *C. elegans***

Die Nematoden wurden in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)/20 mM EDTA/2% SDS homogenisiert und anschließend mit Proteinase K (100 µg ml<sup>-1</sup>) für 2h bei 55°C behandelt. Nach Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung (1/4 des Endvolumens) wurde der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert und 15 min lang bei 2000 g zentrifugiert. Nachdem die RNA im Überstand mit RNase (100 µg ml<sup>-1</sup>) für 30 min bei 37°C abgebaut worden war, wurde eine Extraktion in einem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, Life Technologies) durchgeführt. Nach Ethanol-fällung und einem Waschschriff mit 70%igem Ethanol wurde die DNA in Wasser resuspendiert.

### **3.2.1 Mini-Präparation und Plasmid-DNA**

NEW WASH: 50% Ethanol/10 mM Tris-HCl

STET-Puffer: 50 mM Tris-HCl(pH 8,0)/8% Saccharose/50 mM EDTA/5% Triton X-100

Nach Zentrifugation (10<sup>4</sup> g, 2 min) eines 2-ml-Aliquots einer *E. coli*-über-Nacht-Kultur wurde das Bakterienpellet in 200 µl STET-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,0)/8% Saccharose/50 mM EDTA/5% Triton X-100) resuspendiert. Nach Zusatz von 100 µg Lysozym wurden die Proben für 10 min auf Eis gestellt, danach 15 min lang in kochendem Wasser erhitzt und anschließend für 20 min bei 10<sup>4</sup> g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Natriumjodidlösung (6M) gemischt.

Zur Bindung der DNA wurden 10 µl Glasmilch (Silicon Dioxid, Sigma-Aldrich) zugefügt und diese Suspension für 5 min bei Raumtemperatur (RT) geschüttelt. Nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml NEW WASH (50% Ethanol/10 mM Tris-HCl) wurde das Pellet 5 min lang bei 56°C getrocknet und dann in 80 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

Das Glasmilchpellet wurde bei 56°C für 5 min inkubiert und die DNA durch Zentrifugation abgetrennt.

### **3.2.1 Groß-Präparation von Plasmid-DNA**

Für diese Isolierung von Plasmid-DNA wurde das „Magic™ Maxiprep DNA Purification System“ (Promega) verwendet. Ausgehend von 100 bis 500 ml *E. coli*-über-Nacht-Kultur wurden maximal 500 µg Plasmid-DNA gewonnen.

### **2.5 Synthese von Oligonukleotiden**

Zur Synthese der Oligonukleotide wurde ein Gerät der Firma Applied Biosystem Inc. (USA, Foster City, CA) benutzt (Virologie, BNI). Die Synthese der 5'-Biotin markierten Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Biometra (Göttingen).

### **2.6 Polymerase-Kettenreaktion**

Für die Amplifikation von DNA-Längen < 1,5 kb wurde der PCR-Supermix (Life Technologies) verwendet.

PCR-Ansatz:

22 mM Tris-HCl (pH 8,4)/ 55 mM KCl/1,65 mM MgCl<sub>2</sub>/220 µM dNTP's/10 pmol pro Oligonukleotid/100 bis 200 ng DNA/22 U *Taq* DNA-Polymerase ml<sup>-1</sup>

Nachdem der Ansatz mit 100 µl Mineralöl überschichtet worden war, begann die Amplifikation der DNA mit einer einmaligen Denaturierung bei 95°C für 3 min. Im Anschluss wurden 25 bis 30 Zyklen durchgeführt, wobei jeder Zyklus aus einer



ml NEW WASH-Puffer gewaschen. Die DNA wurde mit dH<sub>2</sub>O bei 56°C von der Glasmilch eluiert (2.5.2).

## **2.9 Restriktionsverdau von DNA**

(nach Sambrook et al. 1989)

Je nach Angaben der Hersteller (Boehringer Mannheim, NEW ENGLAND Biolabs®<sub>Inc</sub> (Frankfurt am Main), MBI Fermentas, St. Leon-Rot) wurde die DNA mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen in den entsprechenden Restriktionspuffern für 1 bis 3 h verdaut. In der Regel enthielt ein Ansatz zwischen 1 und 10 µg DNA.

## **2.10 Ligation von DNA-Fragmenten**

(nach Sambrook et al. 1989)

In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurden 30 bis 50 ng Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuss an Fragment-DNA mit 1 µl 10-fachen Ligationspuffer (nach Herstellerangaben) und 1,5 U T4-DNA-Ligase bei 16°C für mindestens 12 h inkubiert.

Für eine Subklonierung in den pCR<sup>TM</sup>II-Vektor wurden 1 bis 2 µl eines unverdünnten PCR-Ansatzes nach Herstellerangaben (Invitrogen) direkt in den Vektor pCR<sup>TM</sup>II ligiert.

## **2.11 Transformation**

### **3.2.1 Herstellung von kompetenten Bakterien**

Eine Über-Nacht-Kultur von DH5α wurde 1:100 in 50 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis gestellt, anschließend bei 2000 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 15 ml eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 1 Stunde lang auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend erneut bei 2000 g bei 4°C für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in 2 ml eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>/20 % Glycerol vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden in 100-µl-Ansätze aliquotiert und bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

### **3.2.1 Durchführung der Transformation**

(nach Cohen et al. 1972)

Nach dem Auftauen wurden die kompetenten Zellen mit dem Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 1,5 min bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Nachdem die Zellen für einige Minuten auf Eis abgekühlt waren, wurden 500 µl LB-Medium hinzugefügt und die Zellen bei 37°C unter Schütteln für 30 min inkubiert. Hiernach wurden die Zellen auf ampicillinhaltige LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Fall von Transformationsvektoren, die die Möglichkeit einer Blau/Weiß-Selektion bieten, wurden zuvor auf den ampicillinhaltige LB-Platten 70µl 0.1 M Isopropyl-β-D-Galactosid/2% 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) ausgestrichen. Da sich weiße Kolonien durch den Besitz eines „Inserts“ auszeichnen, wurden sie für die Gewinnung von Plasmid-DNA in ein Selektionsmedium überimpft und über Nacht inkubiert.

### **2.12 Radioaktive Markierung von DNA**

Nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim) wurden 25 ng mit Hilfe des „Random Primed Labeling Kit“ für 30 min bei 37°C mit 50 µCi [α-<sup>32</sup>P]-dATP radioaktiv markiert. Die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide wurden mit Hilfe einer Sephadex G50-Säule abgetrennt.

### **2.13 Transfer von DNA**

(nach Sambrook et al. 1989)

Nachdem die DNA mit Restriktionsenzymen verdaut (10 µg pro Verdau) worden war, wurde sie in einem 0,8%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Fragmente im Agarose-Gel wurden für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, zweimal je 15 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl denaturiert und anschließend in Wasser getränkt und danach in 10 x SSC für 10 min vorbehandelt. Die DNA wurde über Nacht im Kapillarblotverfahren mit 10 x SSC als Laufmittel auf die Membran übertragen (Southern-Blot). Die Membran wurde am nächsten Tag mit 6 x SSC gewaschen und getrocknet. Bei

80°C für 2 h wurde die DNA auf der Membran fixiert.

## **2.14 Hybridisierung von DNA mit radioaktiv markierter DNA**

(nach Sambrook et al. 1989)

Die Nylonmembran bzw. Nitrozellulose-Filter mit der fixierten DNA wurden mindestens 1 h bei 60°C in Hybridisierungslösung (5 x SSC/0,5% SDS/5 x Denhardt`s/ 200 µg ml<sup>-1</sup> denaturierte Heringssperma-DNA) inkubiert. Zur Hybridisierung wurde die denaturierte, radioaktiv markierte Sonden-DNA (siehe 2.13) zugegeben und über Nacht bei 60°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Membran unter hoher Stringenz, wenn die Probe homolog war, wie folgt gewaschen:

- einmal 10 min lang, 2 x SSC/0,1% SDS bei RT,
- zweimal 30 min lang, 2 x SCC/0,1% SDS bei 60°C
- zweimal 30 min lang, 1 x SSC/0,1% SDS bei 60°C

Die Signale wurden nach Autoradiographie (Kodak BIOMAX, XOMAT-AR, Freiburg) nach einer Expositionsdauer von 3h bis 96 h bei -70°C detektiert.

## **2.15 DNA-Sequenzierung**

(nach Sanger et al. 1977)

Wie vom Hersteller Amersham Buchler empfohlen, wurden die Sequenzierungsreaktionen mit der „Sequenase Version 2.0“;  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP und mit Vektor oder Gen-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Die Doppelstrang-DNA wurde mit 0,2 m NaOH-Lösung für 10 min bei 37°C denaturiert. Anschließend wurde die DNA mit Ammoniumacetat (3 M, pH 5,2) und absolutem Ethanol präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in dH<sub>2</sub>O resuspendiert und für die Sequenzreaktion eingesetzt.

Außerdem wurde die Nukleotidsequenz der *C. elegans* cDNA-Klone mit dem „Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ nach Angaben des Herstellers (Perkin Elmer, Bad Wildbach) bestimmt. Die Sequenzierung wurde mit dem Gerät ABI 373 der Firma Applied Biosystems Inc. (USA, Forster City, CA) durchgeführt.

## **2.16 RNA-Techniken**

Alle verwendeten Glasbehältnisse und Metallgeräte wurden vor Gebrauch ausgebacken (240°C, über Nacht), wässrige Lösungen wurden mit 0,01% Diethylpyrocarbonat (DEPC) (v/v, über Nacht inkubiert, anschließend autoklaviert) behandeltem Wasser angesetzt.

### **3.2.1 Gesamt-RNA-Isolierung aus *C. elegans***

Die Nematoden und eukaryotischen Zellen (siehe 2.3) wurden in einer Mischung aus Phenol und Guanidium-Isothiocyanat (Trizol, Life Technologies) lysiert, um die Gesamt-RNA nach Herstellerangaben zu isolieren. Die Gesamt-RNA wurde mit Chloroform ( $\frac{1}{5}$  des RNA-Volumens) extrahiert und mit dem  $\frac{1}{2}$  Volumen an Isopropylalkohol präzipitiert.

### **3.2.1 Transfer von RNA**

(nach Sambrook et al. 1989)

Die Gesamt-RNA wurde in 1%igen Agarose-Formamidgelen aufgetrennt und danach in 10 x SSC über Nacht im Kapillarblotverfahren auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen (Northern-Blot).

### **3.2.1 Hybridisierung von fixierter RNA mit radioaktiv markierter DNA**

Hybridisierungslösung: 50% Formamid/1% SDS/5 x SSC/5% SDS bei 60°C

Signale wurden nach Autoradiographie nach Expositionsdauer zwischen 24 h und 1 Woche bei -70°C detektiert (Röntgenfilm: Kodak BIOMAX, Freiburg). Die Bandenintensität der Hybridisierungssignale wurde im PhosphorImager (Molekular Dynamics) mit dem Programm TINA (Version 2.09 f; Raytest) quantifiziert.

### **2.17 Disk-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen**

Zur Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Die Proben wurden 1:2 mit 2-fach Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und bei 10<sup>4</sup> g und RT für 3 min zentrifugiert. Es wurde eine Minigel-G41 Kammer von Biometra verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA (5%iges Sammelgel, 1,5 ml Sammelgelpuffer/2,3 ml dH<sub>2</sub>O/667 µl 30% Acrylamid/ 60 µl 10% SDS/25µl 10% Ammoniumpersulfat/5 µl TEMED) bzw. 30 mA (7,5%iges Trenngel, 1,5 ml Trenngelpuffer/3,0 ml dH<sub>2</sub>O/1,5 ml 30% Acrylamid/ 60 µl 10% SDS/25µl 10% Ammoniumpersulfat/5 µl TEMED) durchgeführt.

### **2.18 *In vitro*-Stress-Experimente**

Nachdem die *C. elegans*-Kulturen von Bakterien gereinigt worden waren, wurden sie zur Regenerierung für 1h in NGM bei 22°C kultiviert. Für die Stressversuche wurden die Nematoden (10<sup>5</sup> Nematoden auf 15 ml) in 9 cm-Petrischalen gegeben und dann mit Paraquat (10 mM, Life Technologies) inkubiert. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge an Nematoden in 15 ml NGM ohne Zusatz von Paraquat kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Nematoden bei 1300 g geerntet und das Kulturmedium entfernt. Das Nematodenpellet wurde zweimal mit eiskalter 0,1 M NaCl-Lösung gewaschen und schließlich in das vierfache Volumen an Trizol (Life Technologies) aufgenommen.

Das Nematodenmaterial wurde bis zur weiteren Bearbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Isolierung der Gesamt-RNA der gestressten Nematodenpopulationen erfolgte wie unter 2.17.1 beschrieben.

### **2.19 Analyse der Promoterregion von *O. volvulus* und *C. elegans***

Zur Untersuchung der als Promoter zu charakterisierenden Bereiche wurden die 5'-flankierenden Regionen der *OvGST1* (1a bzw. 1b) und der *OvGST2* von *O. volvulus* sowie die 5'-flankierenden Regionen der Glutathion S-Transferasen: F56A4.H, F37B1.8,

K01D12.14, R03D7.6 und Y48C3A.G von *C. elegans* analysiert. Um Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, wurden Sequenzvergleiche der 5' flankierenden Bereiche der GSH-S-Transferasen untereinander aber auch mit bekannten Faktorbindungsstellen unter Verwendung der Programme „MatInspector Version 2.2“; „PatSearch Version 1.1“ (beide Programme findet man unter <http://transfac.gbf.de>) und DNASIS (Hitachi) durchgeführt.

### 2.19.1 Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukte

Das Dual-Luciferase-Assay System (Promega) wurde verwendet, um den Promoterbereich der *OvGST1a/1b* bzw. der *OvGST2* zu charakterisieren. Hierfür wurden Gen-Konstrukte hergestellt, die Teile der 5'-flankierenden Regionen der GSH-S-Transferasen enthalten. Der entsprechende Genabschnitt wurde zunächst über PCR mit Pfu-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden so konzipiert, dass am 5'-Ende eine *Xho* I- bzw. *Mlu* I-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Hind* III-Schnittstelle gebildet werden konnte. Die folgenden Primer wurden für die Amplifizierung verwendet:

Zur Analyse der 5' flankierenden Region der *OvGST1a* und der *OvGST1b*:

*OvGST1a/1b*: von -608 bis -588 5'CCGCTCGAGTACAAGTAACTTCATAAAAAG3'  
*OvGST1a/1b*: von -382 bis -362 5'CCGCTCGAGCATCAATCCAAATCTATAAAG3'  
*OvGST1a/1b*: von -362 bis -340 5'CCGCTCGAGAGGAAATAGAATTTTTTACGAT3'  
*OvGST1a/1b*: von -340 bis -319 5'CCGCTCGAGCTAAAGATGACATTTATGTTC3'  
*OvGST1a/1b*: von +67 bis +46 5'CCCAAGCTTTGGGAACAGTAAATAACGAAC3'

Zur Analyse der 5' flankierenden Region der *OvGST2*

*OvGST2*: von -608 bis -588 5'ATCGACGCGTTGAGTTTCTTTCTTTCAGAATG3'  
*OvGST2*: von -563 bis -546 5'ATCGACGCGTGGCATTCTTCAAATTC3'  
*OvGST2*: von +18 bis +7 5'ATCCAAGCTTCCTGAAAATATTCTTGAAATAACTG3'

Weitere Deletionskonstrukte der *OvGST2* wurden über einen unvollständigen Exonukleaseverdau unter Verwendung des „EXOIII/S1 Deletion Kit“ der Firma MBI Fermentas hergestellt.

Die PCR-Produkte wurden zuerst in den pCR<sup>TM</sup>II-Vektor, wie unter 2.11 beschrieben, kloniert und dann mit *Mlu* I/*Hind* III bzw. *Xho* I/*Hind* III geschnitten. Die verdauten PCR-Fragmente wurden anschließend in den mit *Mlu* I/*Hind* III bzw. *Xho* I/*Hind* III geschnittenen pGL3-Enhancer Vektor (Promega) vor das „Firefly“-Luciferase-Gen subkloniert. Um die Orientierung zu überprüfen, wurden die Klone ansequenziert. Damit die Aktivität der GST-Promotoren normalisiert werden konnte, wurde eine Cotransfektion mit dem

pKL-TK Vektor (Promega) durchgeführt. Der pRL-TK Vektor enthält einen Thymidin-Kinase-Promotor, der vor dem Renilla-Luciferase-Gen liegt. Der pKL-TK sowie der pGL3-Vektor, ohne 5'-flankierenden Bereich der GSH-S-Transferase, wurden als negative Kontrolle verwendet werden.

### **2.19.2 Eukaryotische Zellkultur**

CHO-, 293-T- und HeLa-Zellen wurden in RPMI 1640 (Life Technologies) Medium unter Zusatz von 10% FCS (fetal calf serum), 100 U ml<sup>-1</sup> Penicillin, 100 µg ml<sup>-1</sup> Streptomycin und 4 mM Glutamat bei 37°C in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Da Zelltypen adhären sind, wurden die Zellen vor der Ernte zunächst mit PBS gewaschen, danach mit Trypsin/EDTA (0,005% Trypsin/0,002% EDTA) überschichtet und bei 37°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension gesammelt und durch zentrifugieren (5 min bei 1000 g, 4°C) mit PBS und RPMI 1640-Medium gewaschen. Die Zellzahl wurde mit dem Hematocytometer bestimmt.

### **2.19.3 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen**

24 Stunden vor der Transfektion wurden 5 x 10<sup>4</sup> Zellen in 400 µl pro Ansatz auf „24-Well-Culture Plates“ (Becton Dickenson, Cockeysville) ausplattiert. Die Zellen wurden mit RPMI 1640-Medium (ohne Serum) gewaschen und mit 100 µl RPMI 1640-Medium (ohne Serum) überschichtet. Anschließend wurde eine Mischung von 0,5 µg Test-Plasmid DNA, 0,1 µg pRL-TK Plasmid (Renilla Luciferase als interne Kontrolle) und 2,5 µg Transfectam (Dioctadecylamidoglycyl-Spermin; Promega) in 100 µl RPMI 1640-Medium (ohne Serum) zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden 400 µl RPMI 1640-Medium mit 10% FCS zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden für weitere 24 bis 48 Stunden inkubiert.

#### **2.19.4 Untersuchung zum Startpunkt der Transkription**

Bei der „primer extension“-Methode entsteht durch Einsatz des Enzyms Reverse Transkriptase eine komplementäre DNA. Unter Benutzung von radioaktiv markierten Primern, die an eine bekannte Sequenz innerhalb der mRNA binden, synthetisiert die Reverse Transkriptase entlang der RNA-Matrize einen neuen DNA-Strang. Die Reaktion wird durch das Ende der mRNA aber auch durch Sekundärstrukturen in der RNA gestoppt. Die Länge des entstandenen Produktes kann durch einen Vergleich mit einem DNA-Marker nach Auftrennung durch denaturierte Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie bestimmt werden.

Die Methode wurde wie von der Firma Promega beschrieben durchgeführt. Dafür wurden 10 pmol Primer mit T4-Polynukleotid Kinase und [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 10 min bei 37°C inkubiert. Die markierten Primer wurden von den nicht eingebauten Nukleotiden durch G25 Säulen getrennt. 1 pmol radioaktiv markierter Primer wurde zu 1 µg Gesamt-RNA gegeben und bei einer Temperatur von 58°C an die RNA angelagert. Nach Zugabe von Natriumpyrophosphat (4 mM) und Reversen Transkriptase erfolgte eine Inkubation bei 42°C für 30 min. Die entstandene cDNA konnte nach einer Hitzeinaktivierung (bei 90°C für 10 min) auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen werden.

#### **2.19.5 Dual-Luciferase-Assay**

Die eukaryotischen Zellen wurden 24 bis 48 h nach der Transfektion mit PBS gewaschen und mit 200 µl PLB („Passive Lysis Buffer“, Promega) bei Raumtemperatur für 15 min lysiert. Die Zelllysate wurden bei 10<sup>4</sup> g für 2 min zentrifugiert. Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurde ein Luminometer (Biolumat LB9500C, Berthold, Pforzheim) verwendet. 20 µl Überstand des Zelllysates, 50 µl dH<sub>2</sub>O und 50 µl „Dual-Luciferase-Assay Reagent II“ wurden in einer 12 x 47 mm Küvette (Berthold) gemischt, und nach 10 Sekunden konnte die Aktivität der „Firefly“-Luciferase bestimmt werden. Die Zugabe von 50 µl „Stop & Glo™ Reagent (Promega) inhibierte die „Firefly“-Luciferase (Promega), wobei gleichzeitig eine Stimulierung der Renilla-Luciferase einsetzte. Es konnte nun die Aktivität der Renilla-Luciferase in einer zweiten Messung ermittelt werden. Von jedem Zelllysate wurden Doppelbestimmungen vorgenommen. Die Hintergrundaktivität wurde

unmittelbar vor jeder Messung mit 50 µl „Dual-Luciferase-Assay Reagent II“ unter den entsprechenden Bedingungen bestimmt.

### 2.19.6 GFP-Reporter-Gen-Konstrukte

Zur Untersuchung der Transkriptionsregulation anhand von Zell- und Stadienspezifität wurden transgene Nematodenlinien von *C. elegans* ( pha-1 (e2132) ) hergestellt.

Die Kultivierung erfolgte bei 25°C auf NGM-Platten, die mit OP50-Bakterien beimpft wurden. Die Promotorenbereiche von *OvGST2* und den Glutathion-S-Transferasen F56A4.H, K01D12.14 und Y48C3A.G von *C. elegans* wurden in den Expressionsvektor pPD95.77 kloniert. Hierfür wurde zunächst der entsprechende Genabschnitt mittels PCR unter Zuhilfenahme der Pfu-Polymerase (Stratagene) amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden so konzipiert, dass am 5'-Ende eine *Sph* I bzw. *Pst* I und am 3'-Ende *Sma* I- bzw. *Bam* I-Schnittstelle gebildet werden konnte.

Für die Amplifizierung der 5'-flankierenden Region wurden unterschiedliche Primer verwendet:

a) Zur Analyse des gesamten Promotorbereichs:

*OvGST2*: von -682 bis -648 5'ATCCAAGCTTCCTGAAAATATCTTGAAATAACTG<sup>3'</sup>  
*OvGST2*: von +520 bis +552 5'ATCCAAGCTTCCTGAAAATATCTTGAAATAACTG<sup>3'</sup>

b) Zur Analyse der Promotoraktivität, Bildung von Deletionskonstrukten:

*OvGST2*: von -41 bis -16 5'CTGACATGCATGCATAAATTTTCTTGCTTTTGTGCATTTG<sup>3'</sup>  
*OvGST2*: von +6 bis +27 5'CAACATGCATGCCAATATTTTCAGTGAAGTAGTG<sup>3'</sup>

c) Zur Analyse der GSH S-Transferasen von *C. elegans*

*CeF56A4.H*: 1078 bp vor ATG  
 5' AAACCTGCAGCCATTTTCCGCGGTGAACTTGTA<sup>ACTAC</sup><sup>3'</sup>  
*CeF56A4.H*: 441 bp nach ATG  
 5' GTCGCGATCCACTTCCCGCCAAAATACTTCCTGTTGTGAAAATTGAA<sup>3'</sup>

Die PCR-Produkte wurden zuerst in den pCR<sup>TM</sup>II-Vektor, wie unter 2.11 beschrieben, kloniert und dann mit *Sph* I bzw. *Pst* I und *Bam* I bzw. *Sma* I geschnitten. Es folgte eine Subklonierung in den Expressionsvektor pPD95\_77, vor das „green fluorescent“- Protein (GFP). Die GFP-Fusionskonstrukte (100 µg ml<sup>-1</sup>) wurden über Microinjektion in die Gonaden der pha-1 Mutante eingebracht. Zur Komplementation des Gendefektes wurde das Wildtypgen von pha-1 (pBX) zusätzlich in die Gonaden der Nematoden eingebracht. Transgene Nematodenlinien konnten so bei 25°C selektiert werden. Zur Analyse des

Phänotypen wurden drei unabhängige Nematodenlinien untersucht. Die Analyse der Expression konnte durch die Normaski-Optik durchgeführt werden.

### 2.19.7 Random Mutagenese

Zur Variation einer Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle wurde die Methode der Random Mutagenese eingesetzt. Die Synthese der Oligonukleotide wurde aus fünf verschiedenen Ansätzen gespeist. Vier der Ansätze enthielten jeweils eines der vier Nukleotide GATC in einer Konzentration von 0,1 M (Diese bezeichne ich als Wildtypansätze). Diese steuerten die jeweils benötigten Nukleotide während ihres Einbaus im nichtvariablen Bereich des Oligos hinzu. Im fünften Ansatz wurde ein Nukleotidmix aus allen vier Nukleotiden GATC zu je einer Konzentration von 0,025 M bereitgestellt. Im variablen Bereich des Oligos wurde bei der Hinzusynthesierung eines jeden Nukleotids eine Mischung aus einem der Wildtypansätze und dem Nukleotidmix in einem Verhältnis von 0,85 zu 0,15 angesetzt. Die Wahrscheinlichkeit zum Einbau eines bestimmten Nukleotids bei Vorgabe dieses Nukleotids durch den Wildtypansatz beträgt:  $(0,85 \times 0,1 + 0,15 \times 0,0025) / (0,85 \times 0,1 + 0,15 \times 0,25) = 0,966$  (=96,6 %).

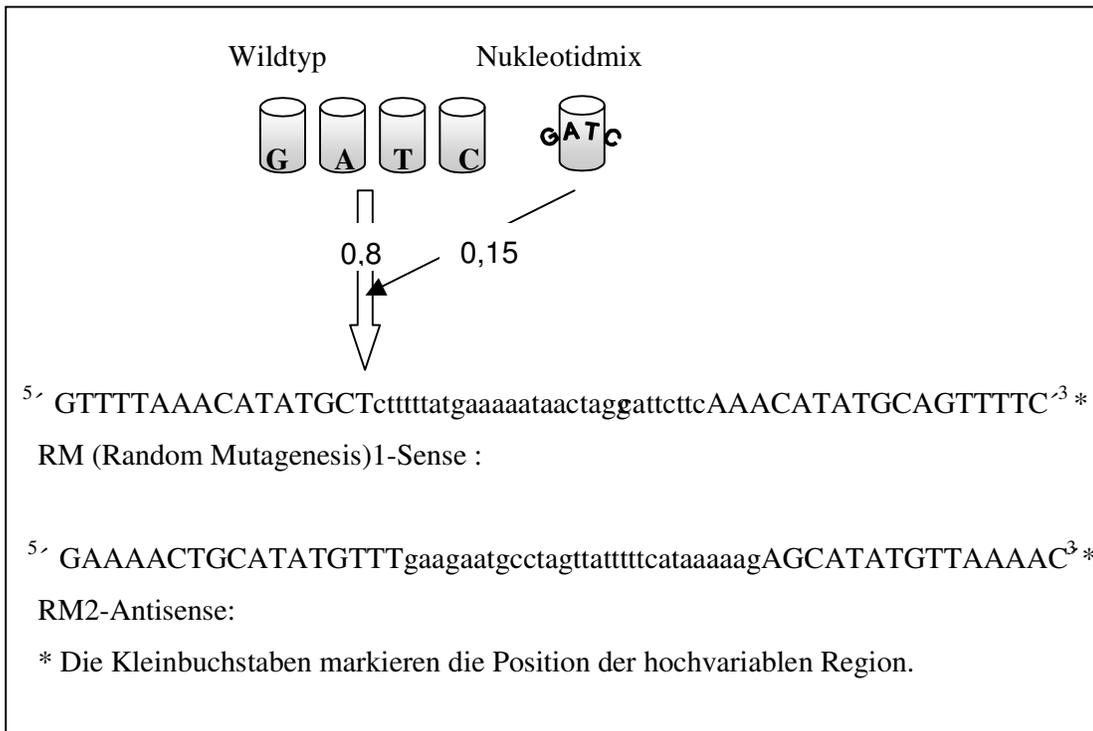


Abbildung 5. Herstellung von hochvariablen Oligonukleotiden

Für den ersten PCR-Ansatz (unter Verwendung von PCR-Supermix, siehe 2.7) wurde das Sense-Oligonukleotid, beginnend am 5'-Ende des Promotors (P1, siehe Abb.), gemeinsam mit dem RM2-Antisense eingesetzt. In einem Parallelansatz wurde das Antisense-Oligonukleotid des 3'-Endes des Promotorbereichs (P2) mit dem RM1-Sense verwendet. Die PCR-Produkte wurden über ein Agarose-Gel nachgewiesen und aus dem Gel eluiert. In einen drittem PCR-Ansatz wurden beide Produkte als Ausgangs-DNA ohne eine weitere Zugabe an Primer eingesetzt. Hierbei bildeten sich PCR-Produkte mit der vollen Länge des Promotorbereiches. Die PCR-Produkte wurden in den pCR<sup>TM</sup>II-Vektor (2.11) kloniert und die mutierte Region durch Sequenzierung analysiert. Zur Verwendung in Gel-Retentionsanalyse wurden die PCR-Produkte durch *Pvu* II und *Hinc* II aus dem PCR<sup>TM</sup>II-Vektor herausgetrennt und über ein Agarose-Gel aufgereinigt.

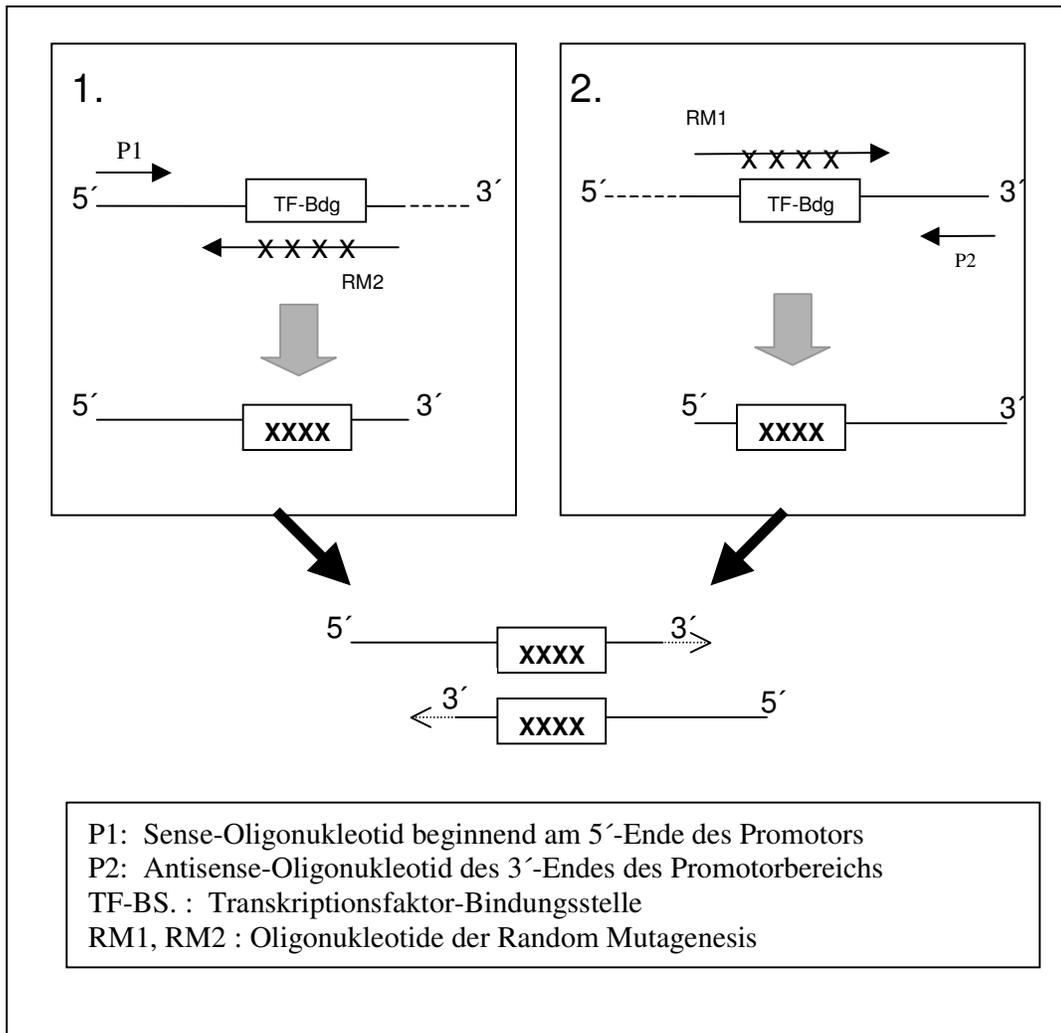


Abbildung 6. PCR-Strategie zur Herstellung einer hochvariablen Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle

### 2.19.8 Herstellung von Zellkernextrakt

Zellkernextrakte von *O. volvulus* und *C. elegans* wurden unter gleichen Bedingungen hergestellt. Ca. 1g an gefrorenem Nematodenmaterial (-178°C) wurden aufgetaut und bei 4°C in einem Glas/Glas Homogenisator unter Zugabe eines Aufschlusspuffers (150 mM Saccharose/30 mM KCl/7,5 mM NaCl/7,5 mM Hepes (pH 7,5)/ 0,25 mM EGTA/1 mM EDTA/0,3% nonident P-40) zerrieben. Das Homogenisat wurde auf 5 ml Aufschlusspuffer (versetzt mit 30% Saccharose) aufgeschichtet. Durch Zentrifugation bei 5000 g konnte das Homogenisat über einen Saccharosegradienten aufgereinigt werden.

Das Pellet wurde in Puffer B (10 mM Hepes (pH 7.9)/680 mM NaCl/1,5 mM MgCl<sub>2</sub>/0,5 mM EGTA/1 mM EDTA/25% Glycerol v/v) gelöst und die Suspension 30 min bei 4°C gerührt. Nach einer Ultrazentrifugation (30 min/4°C/10<sup>5</sup> g) wurde der Überstand mit 0,33g ml<sup>-1</sup> Ammoniumsulfat für 30 min bei 4°C gefällt. Durch eine weitere Zentrifugation von 85000 g für 20 min bei 4°C wurden die Proteine des Zellkernextraktes pelletiert und in Puffer C (20% Glycerol/60 mM KCl/0,125 mM EGTA/0,25 mM EDTA/0,5 mM DTT/14 mM β-Mercaptoethanol/1 mM PMSF) aufgenommen. Über Nacht erfolgte eine Dialyse gegen Puffer C. Der Zellkernextrakt wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Der hergestellte Zellkernextrakt sollte nun einer Gelretentionanalyse unterzogen werden. Die dabei interessierenden Transkriptionsfaktoren wurden affinitätschromatographisch im Zellkernextrakt angereichert. Hierfür wurden doppelsträngige, biotinylierte Oligonukleotide (1 nmol) nach Angaben des Herstellers (Promega, Streptavidin MagneSphere) an Streptavidin Säulen gekoppelt und der Zellkernextrakt (200 µg) aufgetragen. Zur Vermeidung unspezifischer DNA-Protein-Bindungen wurden 48 µg ml<sup>-1</sup> Oligo dI/dC zugesetzt. Die Säule wurde anschließend mit Puffer C und Puffer C plus 0.1 mM KCl gewaschen. Eine Elution erfolgte über steigende Konzentrationen an KCl (0,3, 0,4 und 0,5 M) in Puffer C. Zur anschließender Beseitigung der erhöhten Salzkonzentration wurde eine Dialyse gegen Puffer C durchgeführt.

### **2.19.9 Gel-Retentionsanalyse**

Die Gel-Retentionsanalysen wurden mit doppelsträngigen Oligonukleotiden, die eine Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle beinhalten, unter Verwendung des „gel shift assay“-Systems von Promega durchgeführt.

Gleiche Mengen (10 pmol) jedes Oligonukleotides wurden bei 80°C für 5 min in Annealing Puffer (40 mM Tris-HCl (pH 7.5)/20 mM MgCl<sub>2</sub>/50 mM NaCl) inkubiert. Die Lösung wurde langsam auf RT abgekühlt, damit sich die Einzelstränge zu Doppelsträngen zusammenlagern konnten. Die doppelsträngigen Oligonukleotide (5 pmol) wurden am 5'-Ende mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>]ATP und Polynukleotidkinase markiert und die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide wurden durch eine Sephadex G50-Säule (Pharmacia) entfernt.

Zur Bildung von Protein-DNA-Aggregaten wurde zunächst der Zellkernextrakt mit Bindungspuffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)/50 mM NaCl/1 mM EDTA/1 mM DTT/5 % Glycerin/10 mM MgCl<sub>2</sub>) 20 min lang bei RT inkubiert. Nach Zugabe von radioaktiv markierten Oligonukleotiden (1 pmol, doppelsträngig) folgte eine weitere Inkubation bei RT für 30 min. Die Negativ-Kontrolle enthielt zusätzlich die 10-fache Menge an nicht-radioaktiv markierten Oligonukleotiden. Alle Inkubationsansätze wurden über ein nicht-denaturierendes Acrylamidgel (4%; 80:1/ Acrylamid:Bisacrylamid) bei 150 V für 1 Stunde aufgetrennt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde eine Autoradiographie mit einer Dauer von 2 - 12 h vom Gel angefertigt.

### **2.20 Herstellung von polyA-RNA zur Analyse per „Microarray“**

Es wurde polyA-RNA aus drei unabhängigen Stressversuchen mit einer Stressdauer von 2h bzw. über Nacht durch Zugabe von 10 mM Paraquat hergestellt. Es konnten etwa 15 µg an polyA-RNA (über Oligotex mRNA Maxi Kit bezogen von Quiagen, Hilden) aus 800 µg Gesamt-RNA isoliert werden. Zur Analyse der Genexpression auf Chip-Ebene wurden die Proben in absolutem Ethanol auf Trockeneis verschickt (Stuart Kim, Department of Developmental Biology, Stanford University).

### **2.21 Auswertung der Daten aus der „Microarray“-Analyse**

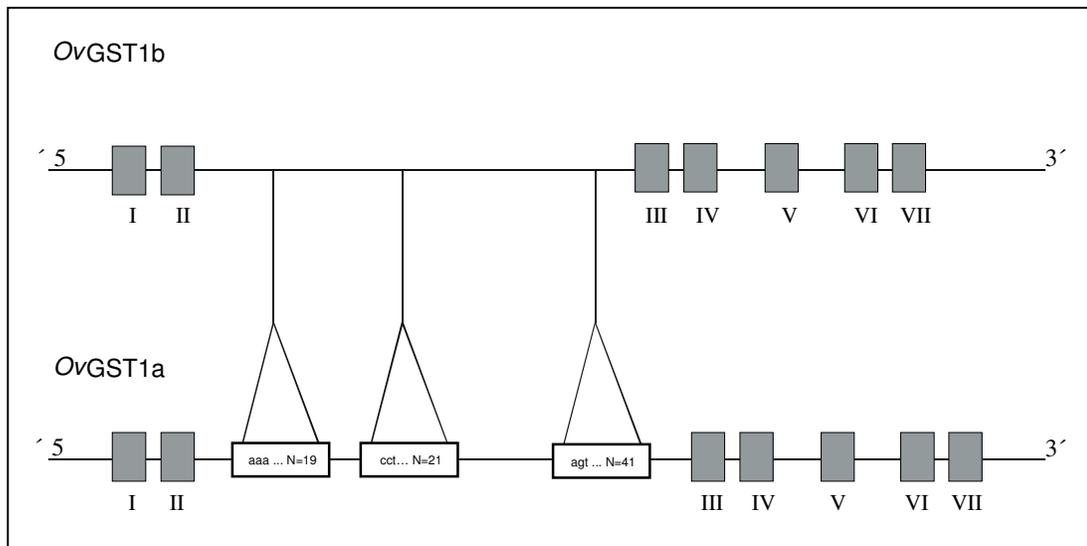
Damit die Expression einzelner Gene ermittelt werden konnte, wurde eine Normalisierung der Proben aus den Stressversuchen gegen die jeweiligen Kontrollen durchgeführt. Blieb die Expression einzelner Gene unterhalb des Faktors 2,5 oder konnten die Daten zur Expression nicht reproduziert werden, wurden diese von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die Expressionsdaten verschiedener Gene wurden schließlich zur Erstellung eines Expressionsprofil verwendet.

Die hoch- bzw. herabregulierten Glutathion-S-Transferasen wurden in weiterführenden Experimenten eingesetzt. Hierfür wurde zunächst die cDNA mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden hergestellt. Die Sequenz zur Erstellung der Oligonukleotide wurde aus der EMBL-Datenbank entnommen. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR<sup>TM</sup>II ligiert und anschließend eine Sequenzierung der Klone durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Genstruktur der *OvGST1*

Durch das Screening einer  $\lambda$ -Zap Bibliothek von *O. volvulus* mit einem 780 bp großen PCR-Fragment der *OvGST1* cDNA konnten 8 genomische Phagen-Klone isoliert werden. Die Sequenzanalyse der unterschiedlichen Klone ergab, dass verschiedene Isoformen der *OvGST1* vorhanden sind. In dieser Arbeit konnte die Genstruktur von zwei Isoformen der *OvGST1* beschrieben werden. Diese wurden daraufhin *OvGST1a* und *OvGST1b* benannt. Die Größe des isolierten Klones aus der  $\lambda$ -Zap Bibliothek betrug ca. 2,8 kb. Somit konnte die genomische Sequenz fast vollständig aus dieser Bibliothek isoliert werden. Für die *OvGST1b* hingegen konnte aus der  $\lambda$ -Zap Bibliothek nur ein Fragment von ca. 1,6 kb (einschließlich eines 5'-flankierenden Bereiches von 700 bp) isoliert werden. Beide fehlenden Bereiche der *OvGST1a* und *OvGST1b* konnten durch weiteres Screening einer EMBL3-Bibliothek von *O. volvulus* ermittelt werden.



**Abbildung 7. Genomische Struktur und Organisation der *OvGST1a* und *OvGST1b***  
Die kodierenden Bereiche wurden durch graue Boxen dargestellt; die zusätzlichen Insertionen im nicht-kodierenden Bereich der *OvGST1a* sind schwarz umrandet. Insgesamt konnten drei größere Insertionen in der *OvGST1b* gegenüber der *OvGST1a* beschrieben werden.

Die *OvGST1a* und *OvGST1b* haben, bezogen auf die Größe und Reihenfolge ihrer Exon-Intron Organisation, eine hohe Ähnlichkeit miteinander. Beide Gene haben eine Größe von ca. 3 kb und besitzen insgesamt sieben Exons. Die Intronbereiche haben eine Größe von ca. 100 bp mit Ausnahme des zweiten Introns, welches bei beiden über 1,6 kb groß ist. Ein auffälliger Unterschied auf Genomebene sind drei eingeschobene Sequenzabschnitte, sogenannte Insertionen, die die *OvGST1a* gegenüber der *OvGST1b* zusätzlich besitzt. Alle Insertionen befinden sich innerhalb des zweiten Introns (Abbildung 7). Des Weiteren befinden sich Punktmutationen verteilt über die gesamte Genlänge (Tabelle 1).

**Tabelle 1. Sequenz- und Nukleotidunterschiede der *OvGST1a* und *OvGST1b* innerhalb des 5'-flankierenden Bereichs**

<i>OvGST</i>	5'-Bereich	Sequenz	Struktureller Austausch
1a	-671	AT_AA	
1b		ATGAA	Guanin Insertion
1a	-662	TG_AA	
1b		TGTAA	Thymidin Insertion
1a	-555	AA_TT	
1b		AAATT	Adenosin Insertion
1a	-499	TTTAA	
1b		TTGTA	T → G Transversion
1a	-321	CC_GA	
1b		CCGGA	Guanin Insertion
1a	-246	TCGTT	
1b		TCCTT	G → C Transversion
1a	-233	TT_AA	
1b		TTCAA	Cytosin Insertion
1a	-191	ATATT	
1b		ATGTT	A → G Transition
1a	-155	TTCTC	
1b		TT_TC	Cytosin Deletion
1a	-148	TTT_A	
1b		TTTTA	Thymidin Insertion
1a	-145	AA_TT	
1b		AAATT	Adenin Insertion
1a	-111	CACTC	
1b		CAATC	C → A Transversion
1a	-69	TGTAG	
1b		TGCAC	T → C Transition
1a	-37	CATCT	
1b		CAACT	T → A Transversion

Durch diese Nukleotidaustausche ergibt sich in den nichtkodierenden Bereichen, mit Ausnahme des Introns II, eine Sequenzidentität von 99%. Durch die 3 Insertionen kommt es zu einer nur 92%igen Sequenzidentität. Die Sequenzidentität im potentiellen Promotorbereich beider Gene liegt bei 97%. Insgesamt elf Punktmutationen sind im kodierenden Bereich identifiziert worden, die sich größtenteils in Aminosäure-Austauschen widerspiegeln (Tabelle 2).

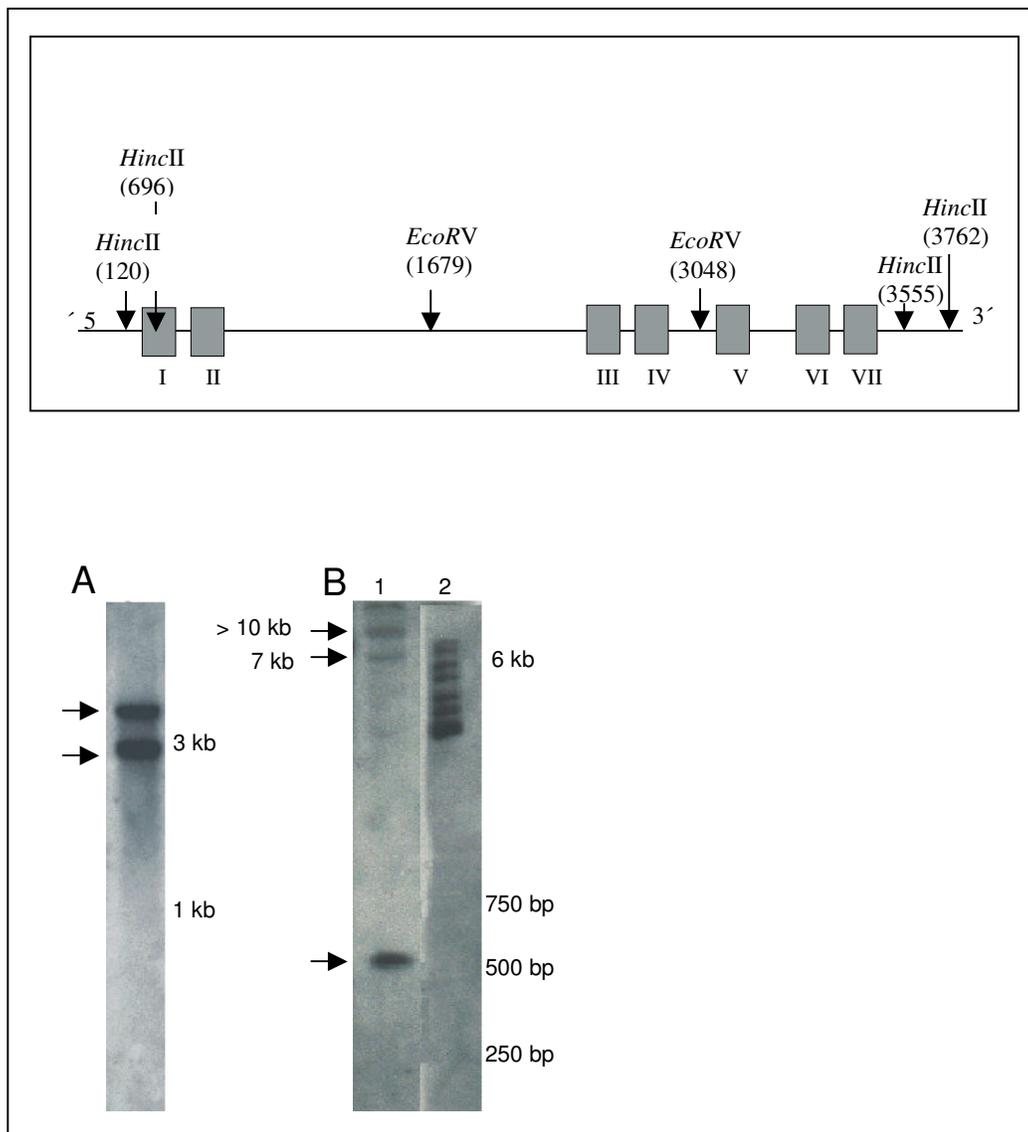
**Tabelle 2. Sequenz- und Nukleotidunterschiede der *OvGST1a* und *OvGST1b* innerhalb des kodierenden Bereiches**

Die Veränderung der Aminosäuresequenz aufgrund von Nukleotidaustauschen (fettgedruckte Buchstaben) wurde in der vierten Spalte aufgeführt.

<i>OvGST</i>	Exon	Sequenz	Struktureller Austausch	Aminosäure Austausch
1a	+250	<b>AGC</b>	G → A Transition	S → K
1b	am Kodon 28	<b>AAA</b>	C → A Transversion	neutral zu basisch
1a	+256	<b>GCT</b>	C → A Transversion	A → D
1b	am Kodon 30	<b>GAT</b>		neutral zu sauer
1a	+262	<b>CAT</b>	T → G Transversion	Q → Q
1b	am Kodon 32	<b>CAG</b>		stille Mutation
1a	+265	<b>GCG</b>	G → A Transition	A → T
1b	am Kodon 33	<b>ACG</b>		hydrophob zu hydrophil
1a	+300	<b>GGA</b>	G → A Transition	G → E
1b	am Kodon 44	<b>GAA</b>		neutral zu sauer
1a	1874	<b>AAG</b>	A → G Transition	K → R
1b	am Kodon 52	<b>AGG</b>		bleibt basisch
1a	+2245	<b>AGG</b>	G → T Transversion	R → M basisch zu
1b	am Kodon 94	<b>ATG</b>		neutral, schwefelhaltig
1a	+2267	<b>ATG</b>	G → A Transition	M → J
1b	am Kodon 101	<b>ATA</b>		Verlust der Schwefelgruppe
1a	+2386	<b>GAT</b>	A → C Transversion	D → A
1b	am Kodon 129	<b>GCT</b>		sauer zu neutral
1a	+2484	<b>GAC</b>	C → A Transversion	D → E
1b	am Kodon 153	<b>GAA</b>		bleibt sauer
1a	+2745	<b>GAT</b>	G → A Transition	D → N
1b	am Kodon 182	<b>AAT</b>		sauer zu basisch

### 3.1.1. Southern-Blot-Analyse

Zur weiteren Unterscheidung der *OvGST1a*- und *OvGST1b*-Gene wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde sowohl die gesamte Länge der cDNA (ca. 800 bp) als auch ein 608 bp-Fragment aus dem nichtkodierenden 5'-Bereich als Sonde eingesetzt. Anhand des erhaltenen Hybridisierungsmuster mit der Sonde des nichtkodierenden 5'-Bereiches konnte bestimmt werden, dass es sich um zwei verschiedenen Gene handelt.



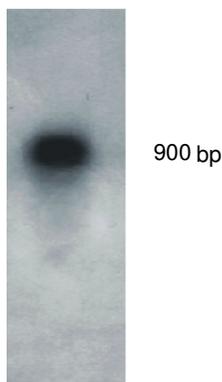
**Abbildung 8. Hybridisierung des radioaktiv markierten 5'-Bereiches an einem Southern-Blot von *O. volvulus***

Genomische *O. volvulus* DNA wurde mit den Enzymen *EcoRV* (A) und *HincII* (B, Spur 1) geschnitten. Die Positionen der hybridisierenden Banden sind mit Pfeilen markiert. Als Größenstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter verwendet.

Bei dem *EcoRV*-Verdau konnten zwei unterschiedliche Fragmentgrößen (2,7 kb und 4 kb) nachgewiesen werden (Abbildung 8). Da anhand der Sequenzdaten des 5'-flankierenden Bereiches beider Gene keine *EcoRV*-Schnittstelle nachgewiesen wurde, können diese beiden Fragmente nicht durch den Verdau eines einzelnen Gens entstanden sein. Dieses Ergebnis lässt sich jedoch durch das Vorkommen zweier unterschiedlicher Gene erklären. Dies konnte auch durch einen weiteren Verdau mit dem Enzym *HincII* bestätigt werden. Anhand der Sequenzanalyse konnten im 5'-nichtkodierenden Bereich nur zwei Schnittstellen festgestellt werden (Abbildung 8), die Southernblot-Analyse ergab jedoch ein anderes Bandenmuster. Es konnten drei Fragmente nachgewiesen werden (Abbildung 8), wobei sich das 500 bp-Fragment und ein weiteres Fragment, entweder von 7 kb oder einer Bande größer als 10 kb, durch den Verdau eines einzigen Gens erklären lassen. Da insgesamt jedoch drei Fragmente nachgewiesen wurden, lässt sich die Existenz der beiden größeren Banden nur durch das Vorhandensein zweier Genen erklären.

### 3.1.2 Northern-Blot Analyse

Die Gesamt-RNA von *O. volvulus* wurde auf einem Agarose/Formamidgel aufgetragen, anschließend auf eine Membran übertragen und eine Hybridisierung mit radioaktivmarkierter cDNA der *OvGST1* durchgeführt.



**Abbildung 9. Hybridisierung der Gesamt-RNA von *O. volvulus* mit einer cDNA-Sonde von *OvGST1***

30 µg Gesamt-RNA wurde in einem 1,5%igen Agarose/Formaldehydgel aufgetrennt und auf eine Gene-Screen-Plus Membran übertragen und anschließend mit der radioaktiv markierten *OvGST1*-cDNA hybridisiert.

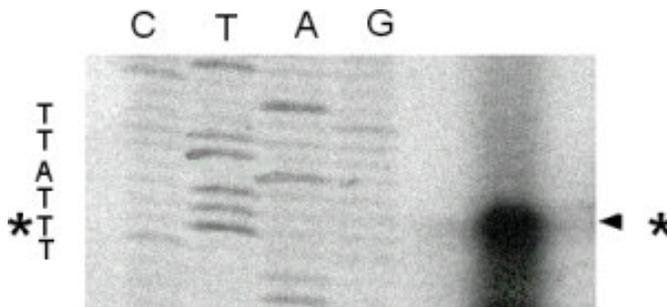
Die Autoradiographie zeigt eine Bande bei 900 bp (Abbildung 9).

### 3.2 Analyse der Stromaufwärtsregion der *OvGST1* (1a und 1b) und *OvGST2*

#### 3.2.1 Ermittlung der Transkriptionsstartpunkte

Damit der Promotorbereich der *OvGST1* Gene analysiert werden konnte, wurde zuvor der genaue Startpunkt der Transkription bestimmt. Hierfür wurden die 5'-flankierenden Bereiche aller drei Gene, *OvGST1a*, *OvGST1b* und *OvGST2* in den pGL3-Vektor kloniert und in 293-T Zellen eingebracht.

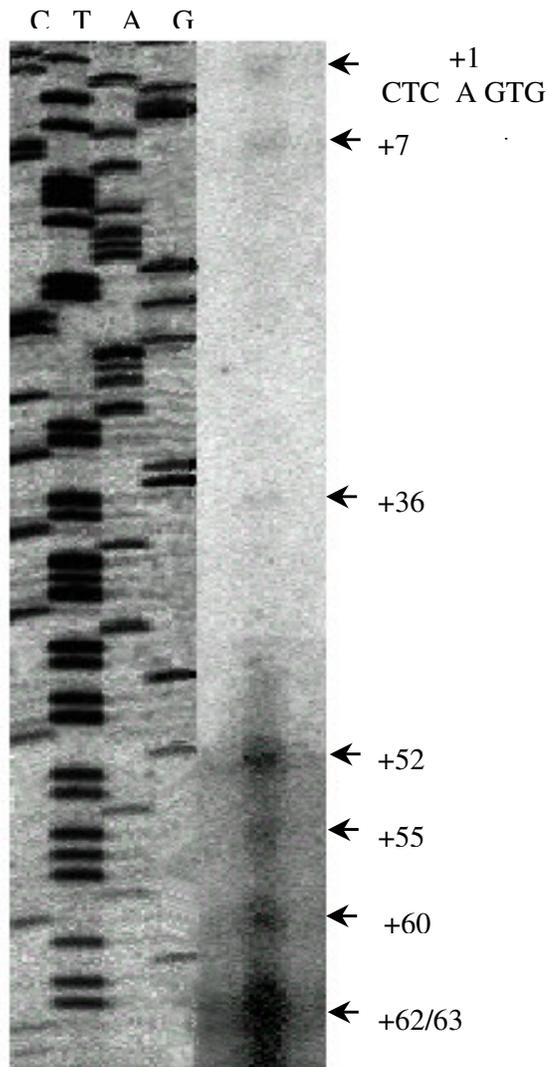
Die aus den transfizierten Zellen gewonnene Gesamt-RNA wurde anschließend für die „primer extension“ Analyse eingesetzt. Für die Amplifizierung der cDNA wurde ein Antisense-Primer verwendet, der innerhalb des Luciferase-Gens bindet.



**Abbildung 10. Ermittlung des Startpunktes der Transkription von *OvGST2***

Über die „primer extension“-Methode konnte für die *OvGST2* ein einzelner Transkriptionsstartpunkt ermittelt werden. Auf der linken Spur wurde die radioaktiv markierte cDNA aufgetragen deren Endpunkt (Pfeil) dem Startpunkt entspricht. Einem Thymidin (Stern) wurde der Startpunkt zugeordnet, welches 39 bp stromaufwärts vom Startkodon ATG liegt.

Die Autoradiographie der *OvGST2* (Abbildung 10) zeigt eine klare und eindeutige Bande 39 bp stromaufwärts vom Startmethionin. Diese Bande entspricht einem einzelnen Startpunkt. Im Gegensatz dazu wurden für die *OvGST1a* und *OvGST1b* eine Vielzahl von Banden (Abbildung 11) erhalten. Ein Nachweis mehrerer Transkriptionsstartpunkte der *OvGST1a/1b* konnte auch durch die „rapid amplification of cDNA ends (RACE)“-Methode nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 11. Startpunkte der Transkription von *OvGST1a* und *OvGST1b***  
Die mehrfachen Transkriptionsstartpunkte sind mit Pfeilen markiert und auf den ersten Startpunkt (+1) bezogen.

Hierbei korrespondierte das längste RACE-Produkt mit dem längsten mRNA-Fragment (+1). Ein weiterer Startpunkt liegt sechs Nukleotide stromaufwärts, gefolgt von einer Anhäufung weiterer Startpunkte, die sich innerhalb eines Clusters von +52 bis +63 befinden (Abbildung 11).

### 3.2.2 Identifizierung potentieller Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren

Zur Beschreibung der Regulation von *OvGST1a/1b* und *OvGST2* wurden zunächst die 5'-flankierenden Bereiche mit Hilfe des „Matinspector“-Programmes (<http://www.genomax.gsfc.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl>) nach Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren analysiert. Es wurden Sequenzmotive berücksichtigt, die eine 100%ige „Core“-Homologie und eine „Matrix“-Ähnlichkeit von über 90% besitzen. Bindungsstellen, denen in der Literatur eine Funktion bei der Regulation von Glutathion-S-Transferasen zugesprochen wurden, sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

**Tabelle 3. Mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in den 5'-flankierenden Regionen der *OvGST1a/1b* und *OvGST2***

Das Nukleotid +1 bezieht sich auf den Transkriptionsstartpunkt (Abbildung 10 und 11)  
 GATA: „GATA-binding protein“; C/EBP: „CAAT/enhancer binding protein“; CREB: „cAMP responsive element binding protein“; AP1: „activator protein 1“; BARBIE: „barbiturate inducible element“

Transkriptions-Faktor (Konsensussequenz)	Sequenz <i>OvGST1</i>	Position (Nukleotid) <i>OvGST1</i>	Sequenz <i>OvGST2</i>	Position (Nukleotid) <i>OvGST2</i>
GATA A/TGATAA/G	AGATAA TGATAG TGATAA	von -75 bis -80 von -466 bis -471 von -518 bis -523	AGATAA TGATAA	von -163 bis -168 von -259 bis -264
CEBP T/TGNNGA/CAAAC	TTCAGTAAT	von -302 bis -310	TTGTGAAAT TGATGCAAT	von -310 bis -318 von -541 bis -549
CREB NNTGACATA/C	GACATCA	von -378 bis -384	nicht vorhanden	
API T/ACTGAAAA	TTACTGAAAA	von -383 bis -393 (invers orientiert)	nicht vorhanden	
BARBIE ATNNA <u>AAAGC</u> NGR NGG	CTTTAAAGCTT TAAG	von -266 bis -280 (invers orientiert)	AAGAGAAAGC AACCAA	von -114 bis -129

Es konnten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie der BARBIE-Box oder API gefunden werden, denen in der Literatur eine mögliche Rolle in der Regulation von GSTs

zugesprochen wurde (Diccianni et al. 1992; Hayes und Oulford 1995; Xia et al. 1996; Lerche et al. 1997; Jaitovitch-Groisman et al. 2000). Weitere potentielle Bindungsstellen sind in ihrer Wirkungsweise mit der Regulation verschiedener Entgiftungsenzymen in Zusammenhang gebracht worden. Hinweise auf eine generelle Regulation in verschiedenen Geweben geben so z.B. das GATA-Motiv für gastrointestinale Induktion oder die Expression von Genen in bestimmten Larvalstadien durch das CCAAT/Enhancer-Binding Protein (Lekstrom-Himes und Xanthopoulos 1998; Borlak und Thum 2001).

### 3.2.3 Untersuchungen zur Promotoraktivität

Eine Analyse zur Funktion der 5'-flankierenden Regionen der *OvGST*-Gene wurde mit Hilfe des Luciferase-Reportergens durchgeführt. Dafür wurden DNA-Fragmente der *OvGST1a/1b* (671 bp) und der *OvGST2* (684 bp), die jeweils die Startpunkte der Transkription einschließen, verwendet. Die DNA-Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend in dem pGL3-Enhancer-Vektor direkt vor das „Firefly“-Luciferase-Reportergen kloniert. Nach Transfektion dieser Konstrukte in 293-T-Zellen wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. In den Transfektionsversuchen war die relative Expression der Luciferase durch den *OvGST1a*-Promotor ca. 30-fach, durch den *OvGST1b*-Promotor ca. 15-fach und durch den *OvGST2*-Promotor ca. 8-fach höher als die Hintergrundaktivität des pGL3-Enhancer-Vektors allein. Um *cis*-regulatorische Elemente bestimmen zu können, die die Expression der *OvGST* beeinflussen, wurden eine Reihe von Deletionen über PCR oder über unvollständige Exonukleaseverdau hergestellt (Abbildung 12). Diese Konstrukte wurden vor das Luciferasegen in den Vektor pGL3-Enhancer kloniert und für die Transfektion der 293-T-Zellen verwendet.

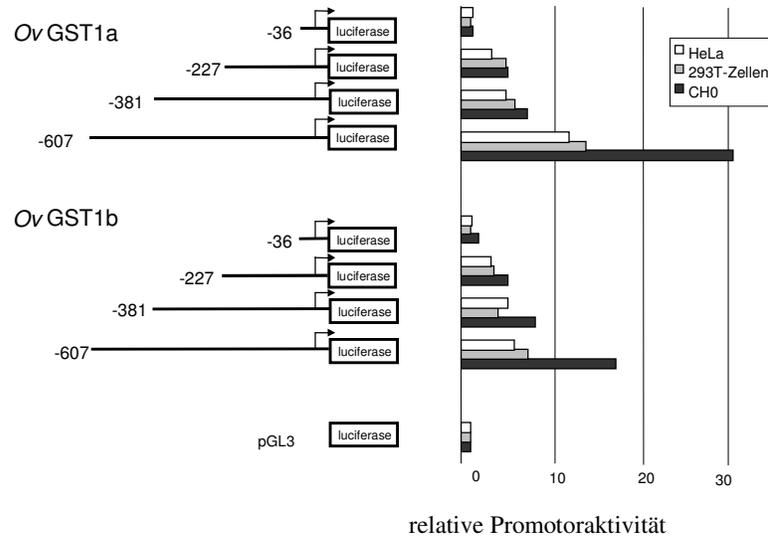
Bei Deletionen, die nur wenige Nukleotide hinter dem Transkriptionsstartpunkt enden, zeigte sich keine Luciferaseaktivität. Dies betraf die 36 bp-Fragmente der *OvGST1a* und *OvGST1b*. Erst bei größeren Fragmenten konnte eine Erhöhung der Aktivität gemessen werden. So konnten bei der Deletion -227 für die *OvGST1a* und *OvGST1b* eine 5-fach höhere Promotoraktivität gegenüber der Kontrolle (pGL3-Enhancer-Vektor) ermittelt werden. Bei zunehmender Fragmentlänge stieg die Luciferase-Aktivität weiterhin an, lag aber mit bis zu 8-fachen Werten noch unter der Aktivität, die mit dem größten Promotorfragment (671 bp) gemessen wurde (Abbildung 12).

Zur Überprüfung, ob eine für 293-T-Zellen spezifische Promotoraktivität vorlag, wurden auch Transfektionen in CHO- und HeLa-Zellen durchgeführt. Hierbei wurden übereinstimmende Aktivitäten der *OvGST1a/OvGST1b*-Deletionskonstrukte gemessen. Eine Ausnahme bildete eine um die Hälfte niedrigere Promotoraktivität, die in CHO und HeLa-Zellen transfiziert mit der maximalen Promotorlänge gemessen wurde (Abbildung 12.). Obwohl der direkte Sequenzvergleich der *OvGST1*-Promotoren eine sehr hohe Identität aufweist, besitzt der Promotorbereich der *OvGST1b* eine geringere Aktivität.

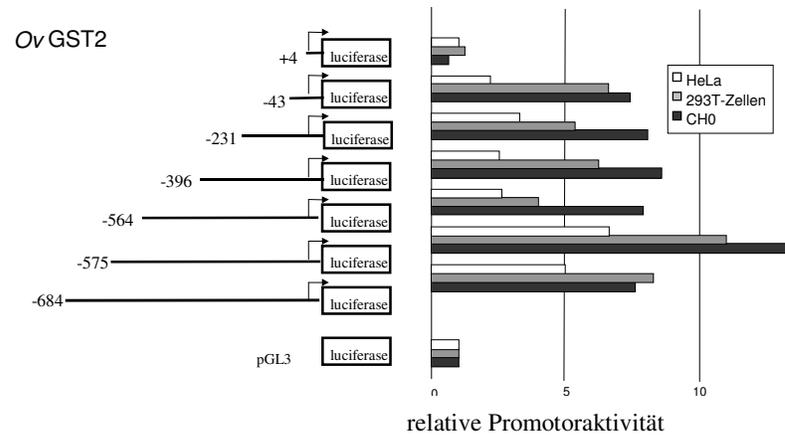
Es wurden auch Deletionskonstrukte des *OvGST2*-Promotors hergestellt. Die verkürzten Fragmente konnten durch einen Exonukleaseverdau des Konstruktes mit der größten Promotorlänge gewonnen werden. Eine 7-fache Aktivität gegenüber der Kontrolle konnte bereits 43 bp stromaufwärts vom Startpunkt gemessen werden. Dieser Wert zeigte sich bei den Transfektionen in CHO- und 293-T-Zellen, nicht aber für HeLa-Zellen. Für HeLa-Zellen wurde nur eine zweifache Steigerung der Aktivität gegenüber der Kontrolle gemessen.

Die höchste, bis zu 12-fache Aktivität des *OvGST2*-Promotors, wurde bei -575 gemessen. Hierbei handelt es sich nicht um die maximale Promotorlänge, die erst bei -684 endet. Diese hat einen 8-fachen Wert im Vergleich zur Kontrolle. Alle weiteren Deletionskonstrukte zeigten keine signifikante Steigerung der Promotoraktivität. Die durchgeführten Untersuchungen der Deletionsmutanten des *OvGST2*-Promotors weisen auf negative Promotorelemente im Bereich -575 bis -684 hin, während bei -564 bis -575 ein positives Promotorelement vorhanden sein könnte.

A



B



**Abbildung 12. Analyse der cis-Elemente im Promotorbereich von *OvGST1a/1b* (A) und *OvGST2* (B)**

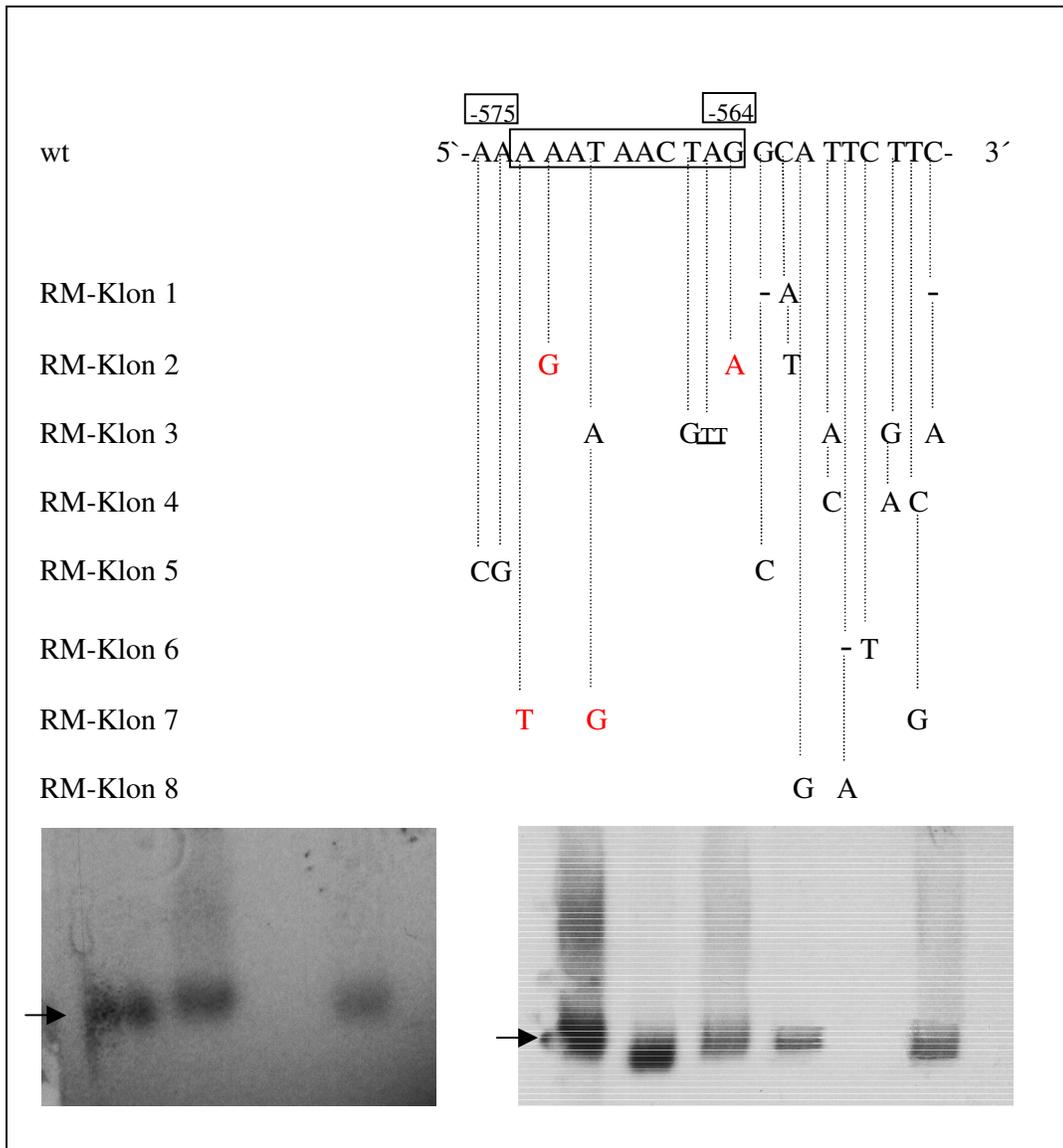
Schematische Darstellung der Promotorfragmente (links), die vor das Luciferasegen ligiert wurden. Der Transkriptionsstartpunkt ist mit +1 markiert. Rechts ist die gemessene Luciferaseaktivität (Mittelwert) wiedergegeben.

### **3.2.3.1 Charakterisierung des positiven *cis*-Elementes des *OvGST2*-Promotors**

Zur Charakterisierung des positiven *cis*-Elements, welches durch Deletionsmutanten -564 und -575 in 3.2.3 ermittelt wurde, wurde die Methode der „Random Mutagenesis“ eingesetzt.

Der Pool an degenerierten Oligonukleotiden (zuvor erwähnt als RM1-Sense und RM2-Antisense), wurde wie in Material und Methoden beschrieben, hergestellt. Anschließend konnte über Amplifizierung des Promotorbereichs der *OvGST2*, mittels degenerierten Oligonukleotiden, verschiedene Mutationen in das Element eingefügt werden. Die durch anschließende Sequenzierung ermittelten Nukleotidaustausche sind in der Abbildung 13 wiedergegeben.

Anhand von Gelretentionsanalysen wurde überprüft, welcher Nukleotidbereich innerhalb des *cis*-Elements für eine DNA-Protein-Bindung notwendig ist. Die Ergebnisse hierzu zeigen, dass eine Aufhebung der DNA-Protein-Bindung der RM-Klone 2 und 7 vorhanden ist. Dies betrifft jeweils zwei Punktmutationen von A→G(-572) und G→A(-564) bzw. von A→T(-573) und T→G(-560). Dagegen zeigte sich weiterhin eine Bindung der RM-Klone 1,3,4,5,6 und 8 (Abbildung 13). Aufgrund dieser Bindungsstudien sowie den Promotorstudien aus 3.2.3 kann der DNA-Bereich des *cis*-Elements auf zehn Nukleotide beschränkt werden.



**Abbildung 13. Gelretentions-Analysen der RM-Klone vom cis-Element (von -575 bis -564) der *OvGST2***

Schematische Darstellung der Nukleotidaustausche innerhalb des Oligonukleotids von 21 Basenpaaren (oben).

Unter der Verwendung der Oligonukleotide RM1 und RM2 (welche durch das Verfahren „Random Mutagenesis“ hergestellt wurden (siehe 2.20.7)) zusammen mit den Oligonukleotiden P1 und P2 wurde ein PCR-Fragment der gesamten Promotorlänge hergestellt (siehe 2.20.7). Die PCR-Fragmente wurden in den PCR<sup>TM</sup>II subkloniert und durch Sequenzierung analysiert. Für die Gelretentions-Analyse wurden ausgewählte RM-Klone mit *Pvu*I und *Hinc*II verdaut und über ein Agarose-Gel aufgereinigt. Erhaltene DNA-Fragmente von 270 bp Länge wurden mit  $\gamma$ P<sup>32</sup> markiert. Zur Bildung von Protein-DNA-Aggregaten wurde der Zellkernextrakt von *O. volvulus* verwendet.

wt = unveränderte Nukleotidsequenz, -575 und -564 = Deletionsmutanten aus 3.2.3

### 3.2.3.2 Einfluss verschiedener Chemikalien auf die Promotoraktivität

Der Einfluss von möglichen Induktoren auf die Promotoraktivität wurde im heterologen System untersucht. Die pGL3-Promotorkonstrukte von *OvGST1a*, *OvGST1b* und *OvGST2* wurden in 293-T-, CHO- und HeLa-Zellen eingebracht. Nach der Transfektion wurden die Zellen in RPMI-Medium (ohne Serum) aufgenommen. Über eine Konzentrationsreihe von 0,1-500  $\mu\text{M}$  für 3-Methylcholantren, Phenobarbital,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , trans-2-Octenal und 4-Hydroxy-trans-2-nonenal wurde die subletale Konzentration erstellt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde den Zellen 10% Serum hinzugefügt. Es ergaben sich für die Chemikalien folgende Endkonzentrationen:

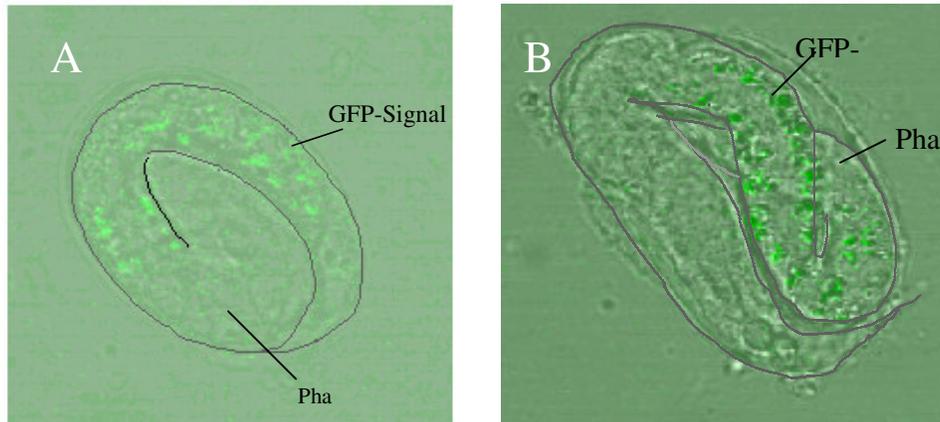
5  $\mu\text{M}$  3-Methylcholantren, 5  $\mu\text{M}$  Phenobarbital, 2  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und 16  $\mu\text{M}$  Trans-2-Octenal und 6  $\mu\text{M}$  4-Hydroxy-trans-2-nonenal.

Am nächsten Tag wurde die Luciferase-Aktivität der Promotor-Konstrukte gemessen. Für keine der verwendeten Chemikalien zeigte sich eine signifikante Änderung der Promotoraktivitäten der *OvGST1a*, *OvGST1b* und *OvGST2* (Daten nicht gezeigt).

### 3.3 Expression des *OvGST2::GFP*-Konstruktes in *C. elegans*

Die stadien- und gewebespezifische Expression der *OvGST2* sollte mit Hilfe des Modellnematoden *C. elegans* charakterisiert werden. Hierbei werden Fremd-DNA-Konstrukte in die Gonaden von jungen adulten Hermaphroditen mikroinjiziert. Die Fremd-DNA stabilisiert sich in extrachromosomaler Form und wird durch gewöhnliche Replikation vererbt.

Es wurde ein „green fluorescent protein“(GFP)-Fusionskonstrukt verwendet. Das *OvGST2::GFP*-Konstrukt wird in *pha-1* Mutanten (*pha-1*(Ce2132)) eingebracht. Diese Mutanten besitzen einen Gendefekt, der bewirkt, dass bei einer Temperatur über 15°C die Larven nicht mehr aus den Eiern schlüpfen können. Zur Komplementation des Gendefektes wurde das Wildtypgen von *pha-1* in die Nematoden koinjiziert. Die transgenen Nematodenlinien können nun aufgrund ihrer wiedergewonnenen Temperaturtoleranz bei 25°C selektiert werden. Zur Untersuchung des Expressionsmusters von *OvGST2* wurde die 5'-flankierende Region von 1,2 kb, einschließlich des ersten Introns vor das Reportergen GFP kloniert. Das GFP-Fusionsprotein wurde unter der Kontrolle des *OvGST2* Promotors in lebenden *C. elegans* exprimiert.



**Abbildung 14. Expression des *OvGST2::GFP*-Konstruktes in embryonalen Stadien von *C. elegans***

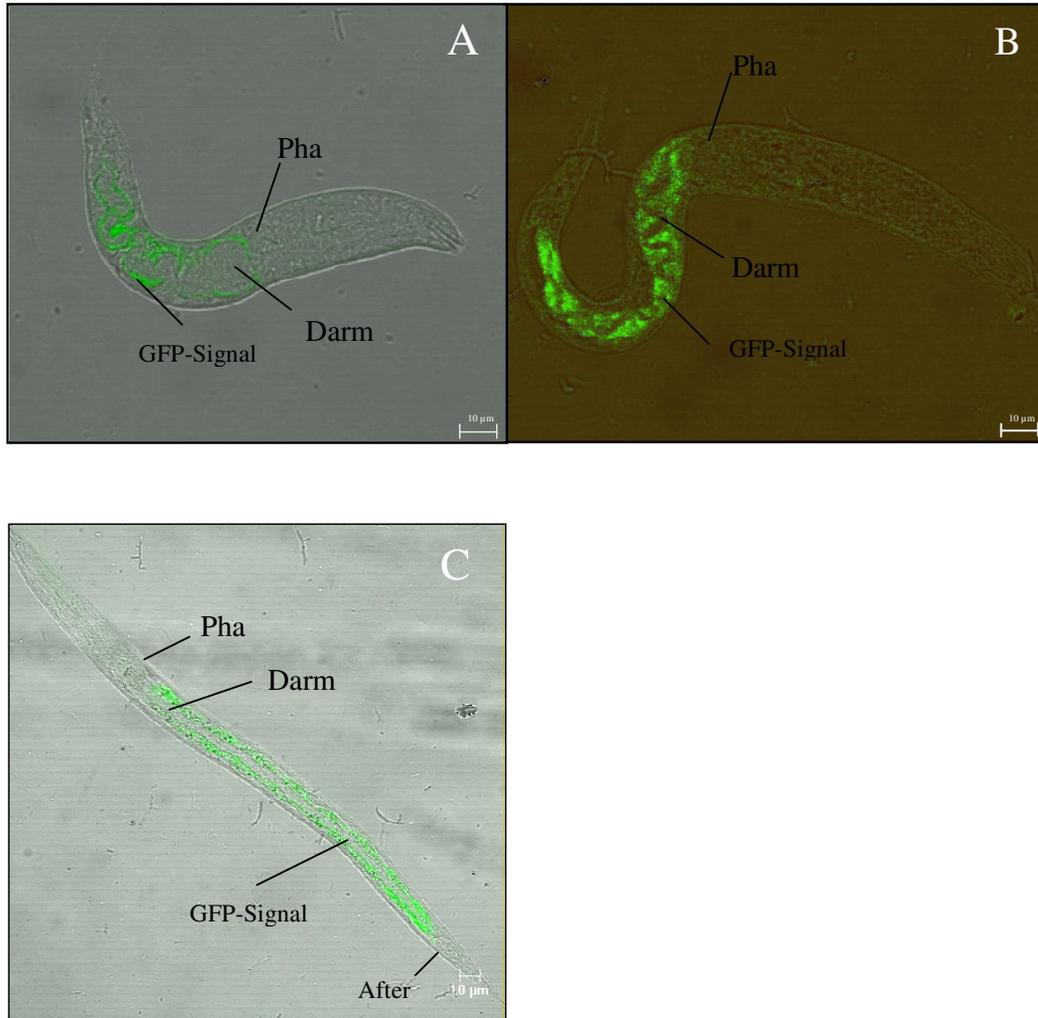
Projektionen des frühen Stadiums A und Stadiums B mit beginnendem Schlüpfvorgang aus dem Ei (Abbildung A). Die detektierten GFP-Signale befinden sich in einem Abschnitt vom Vorderdarms bis zum abdominalem Enddarm. In Abbildung B ist ein Signal im Bereich des Mitteldarms sichtbar. (Pha = Pharynx)

Die GFP-Expression ist schon im embryonierten Ei erkennbar; sie lässt sich bestimmten Zellen nur schlecht zuordnen, erlaubt aber eine Lokalisierung im Mitteldarmbereich (Abbildung 14).

In den Larvenstadien L1 bis L3 wurde ein starkes Signal im Bereich des endodermalen Mitteldarms über dessen volle Länge beobachtet (Abbildung 15.a und b). Der Mitteldarm beginnt hinter dem Pharynx und endet vor dem Enddarm, welcher kurz vor dem analen Sphinkter beginnt. Da kein Signal dem Lumen des Mitteldarms zuzuordnen ist, lässt sich die Expression des GFPs auf die den Darmkanal umgebenden Zellen beschränken.

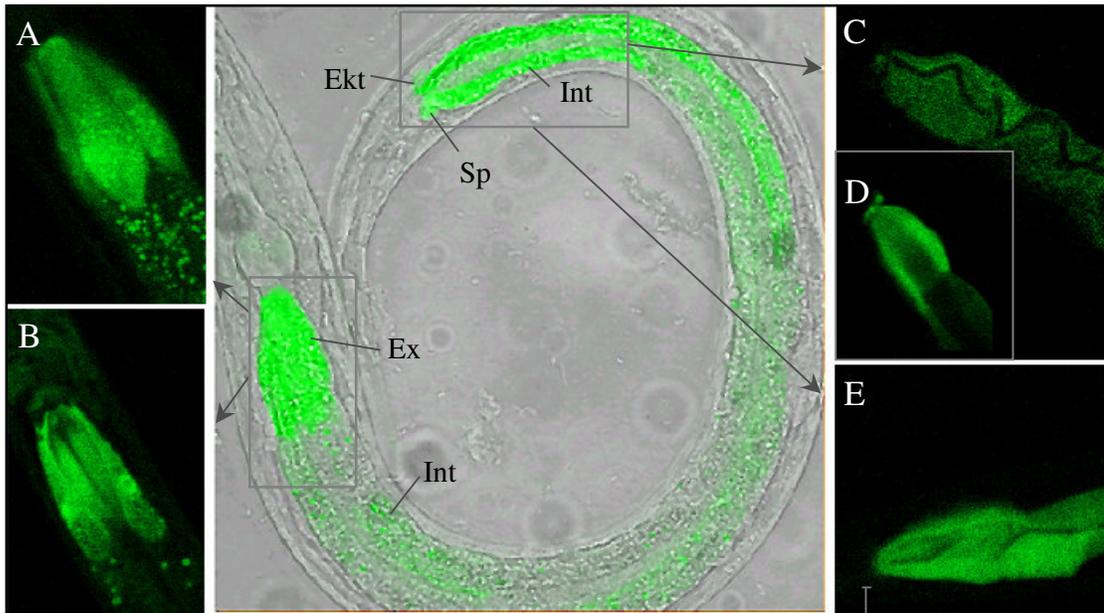
Im Hermaphroditen können Signale den intestinalen Zellen des vorderen Abschnitts, beginnend ab dem Pharynx, sowie intestinalen Zellen im hinteren Abschnitt des Mitteldarms zugeordnet werden (Abbildung 16). Eine nähere Betrachtung des vorderen Abschnitts ergibt, dass nur die intestinalen Zellen, nicht aber der Pharynx selbst markiert sind. Weiterhin ist deutlich eine Expression in den Exkretionsdrüsen sichtbar.

Im hinteren Darmbereich zeigen die intestinalen Zellen des Mitteldarms bis zur Sphinktermuskulatur GFP-Expression. Die GFP-Expression der intestinalen Zellen des Enddarms bezieht sich nur auf eine ektodermale Ausbuchtung des Darms, die aus einer Einschnürung der Sphinktermuskulatur hervorgeht.



**Abbildung 15. Expression des *OvGST2::GFP*-Konstruktes in verschiedenen Larvenstadien von *C. elegans***

In den Larvenstadien L1 (Abbildung A und B) sowie dem Stadium L3 (Abbildung C) ist ein starkes Signal im Bereich des endodermalen Mitteldarms über dessen volle Länge zu beobachten. Die Ausdehnung des Signals beginnt unterhalb des Pharynx (Pha) und endet kurz vor dem Enddarm.



**Abbildung 16. Expression des *OvGST2::GFP*-Konstruktes in adulten Hermaphroditen von *C. elegans***

In der mittleren Abbildung ist das GFP-Signal bezogen auf den ganzen Nematoden dargestellt. In adulten Hermaphroditen ist ein starkes Signal im vorderen und hinteren Abschnitt des Mitteldarms, sowie im Enddarm sichtbar. In den Abbildungen A und B kann ein GFP-Signal den Exkretionsdrüsen (Ex) zugeordnet werden. Die Abbildungen C und E zeigen die den Darmkanal umgebenden intestinalen Zellen (Int) in Aufsicht. Abbildung D zeigt den hinteren Abschnitt des Mitteldarms, sowie den vorderen Bereich des Enddarms sowie die ektodermale Ausstülpung (=Ekt) an. Punktförmige Signale, sichtbar in A und B, entstehen durch Eigenfluoreszenz von Darmbakterien. Sp = Sphinktermuskulatur

### 3.4 „Microarray“ - Untersuchungen oxidativ gestresster *C. elegans*

Es wurde das Expressionsmuster von insgesamt 90% der Gene von *C. elegans* untersucht. Ermittelt wurden Gene, die durch Zugabe von Paraquat eine veränderte *in vivo* Expression zeigten. Das Herbizid Paraquat ist ein Redoxzykler, der zum Erzeugen von oxidativem Stress eingesetzt wird. In einer NADPH-abhängigen Reaktion oxidiert die NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase Paraquat zum Radikal, das unter anaeroben Bedingungen stabil ist. Trifft das Radikal hingegen auf molekularen Sauerstoff, wird es wieder zu Paraquat reduziert. Dabei entstehen molekulare Sauerstoffradikale ( $O_2^{\cdot-}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (Fukushima et al., 1993, Yamada und Fukushima, 1993). Beide können schließlich eine oxidative Schädigung von Zellkomponenten hervorrufen.

Die Bestimmung der subletalen Konzentration von Paraquat für *C. elegans* wurde über eine Konzentrationsreihe beginnend ab 0,5 bis 100 mM Paraquat ermittelt. Hierzu wurden ca. 100 Nematoden in 2 ml Kulturmedium und der jeweiligen Paraquat-Konzentration für 24 h bei 25°C inkubiert. Zeigten die Nematoden nach Klopfen an dem Kulturgefäß keine Reaktion wie Schlängeln, wurden sie als tot betrachtet (Larsen, 1993). Für *C. elegans* wurde schließlich eine subletale Konzentration von 10 mM ermittelt.

Für die Analyse einer genomweiten Expression wurde das Expressionsniveau nichtbehandelter *C. elegans* mit dem Expressionsniveau Paraquat-gestresster Würmer verglichen. Die Untersuchung wurde mittels „Microarray“ in Zusammenarbeit mit P rof. Stuart Kim (Department of Developmental Biology, Stanford University) durchgeführt. Insgesamt konnte hierbei das Expressionsniveau von 11990 Genen untersucht werden. Diese Ergebnisse wurden anhand von zwei Testreihen (jeweils zwei Ansätze mit einer Expositionsdauer des Paraquat von 12 Stunden (PQ-12-h) und einem Ansatz mit einer Expositionsdauer von 2 Stunden (PQ-2-h)) der „Stanford Microarray Database“ entnommen und ausgewertet. Unterschiede im Expressionsniveau wurden als x-fache Veränderung angegeben und zur Auswertung nur Werte mit einer mehr als 2,5-fachen Veränderung berücksichtigt.

Tabelle 3. Anzahl der veränderten Gene von *C. elegans* unter Zugabe von Paraquat

$\Sigma$ Anzahl der Gene 11 990	Veränderte Expression $\geq 2,5$ -fach	heraufregulierte Gene	herunterregulierte Gene
PQ-2-h	2037	635	1402
PQ-12-h	1020	136	884

Im Ansatz des PQ-2-h-Versuches waren im Vergleich zur Kontrolle insgesamt 2037 Gene mehr als 2,5-fach verändert, davon wurden 635 herauf- und 1402 herunterreguliert. Bei einem 12-stündigen Stress zeigte sich eine Veränderung von insgesamt 1020 Genen, von denen 136 herauf- und 884 herunterreguliert waren.

Es wurden Gene analysiert, deren veränderte Genexpression in mindestens zwei separaten Ansätzen gemessen wurde. Da nur ein 2-Stunden-Ansatz erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurden nur Gene ermittelt, die auch zu dem späteren Zeitpunkt (12 Stunden) in ihrer Expression verändert wurden. Es ergab sich, dass Gene hochreguliert wurden, die im Zusammenhang mit Reparaturvorgängen geschädigter Zellkomponenten stehen. So wurde z. B. ein Transkriptionsfaktor mehr als das 4-fache heraufreguliert, der eine hohe Identität zu dem Transkriptionsfaktor II H (TFIIH)1 von *Homo Sapiens* aufzeigt. Diesem Faktor wird eine wesentliche Rolle bei „Nucleotide excision repair“ (NER) -Mechanismen (Feaver et al. 1999) zugeschrieben. Weiterhin wurde eine erhöhte Genexpression der poly-ADP-Ribose-Polymerase ermittelt. Dieses Enzym aktiviert im Zellkern vorkommende Proteasen, die eine Hauptfunktion in der Degradation von oxidativ geschädigten Histonen übernehmen (Ullrich et al. 1999). Ein Protein, das eine hohe Identität zu bekannten Aldehyd-Reduktasen aufzeigt, hat eine mehr als 5-fache Expression. Es ist anzunehmen, dass Produkte der Lipidperoxidation, wie 4-Hydroxynonenal und andere  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Aldehyde als Substrat dieser Aldehyd-Reduktase erkannt werden können (Burczynski et al., 2000).

Die Analyse der herunterregulierten Gene ergab, dass etwa 15% den „major sperm“-Proteinen zuzuordnen sind. Diese Proteine haben eine Funktion während der Spermatogenese. Bei 42% der herunterregulierten Gene ist bisher noch keine Funktion bekannt. Unter den restlichen Genen befinden sich Proteine wie Transposasen und Zinkfingerproteine, deren genaue Funktionsweise jedoch noch nicht ermittelt wurde.

Tabelle 4. Auflistung von Genen mit veränderter Expression unter Einfluss von Paraquat

<b>heraufreguliert</b>	<b>herunterreguliert</b>	<b>herunterreguliert</b>
G-Protein gekoppelter Rezeptor, SRD-Proteine, exprimiert in chemosensorischen Neuronen	schwache Identität zum Transkription-Elongations-Faktor B TCB1L von <i>H. sapiens</i>	schwache Identität zum humanen Trichohyalin (Hs. 82276), intermediäres Filament-assoziiertes Protein
Identität zur nidogen-2-mRNA von <i>Homo sapiens</i> (Hs. 82733)	„major sperm-specific protein (MSP)“	cytoplasmatisches Zink-Finger-Protein
Testes-spezifisches Protein	nuclearer Hormonrezeptor mit Zink-Finger-Motiv	Mangan-Superoxid-Dismutase
Domäne der poly[ADP-ribose]Polymerase	Thioredoxin	Serin/Threonin-Protein-Kinase
starke Identität zum TKFIIH von <i>H. sapiens</i> (Hs.895787BTF2)	Identität zur N-Acetylmuraminidase von <i>Entamoeba histolytica</i>	COL5A2, alpha-2 Collagen, Typ V
Mannose Rezeptor MRC1	Identität zu nuklearen Por-Proteine (NSP1) von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	G-Protein gekoppelter Rezeptor, Mitglied der ODR-10 „odorant response protein“
Hitze-Schock-Protein HSP70	Similarität zum humanen SSR2 „signal sequence receptor“	mitochondriales Carrier-(MCF)-Protein
starke Identität zum N-terminalen Ende der Aldehyd-Reduktase von <i>C. elegans</i>	schwache Identität mit Myo1p, schwere Kette des Myosin	COL9A1, alpha-1 Collagen, Typ IX
Glutathion-S-Transferase F37B1.8 K01D12.14 R03D7.6	Glutathion-S-Transferase F56A4.H Y48C3A.G	
Serin/Threonin-Protein Phosphatase	G-Protein gekoppelter Rezeptor, SRB-Proteine, in chemosensorischen Neuronen exprimiert	
RNA-bindendes-Protein H12I13.A	Fettsäuren-Desaturase, spezifisch für lange Ketten (16:0-18:0)	

### 3.4.1 Analyse der durch Paraquat regulierten Glutathion-S-Transferasen

Die Untersuchung der Regulation von GST durch Paraquat wurde mit Hilfe des Modellnematoden *C. elegans* durchgeführt. Es wurden Glutathion-S-Transferasen berücksichtigt, deren Genexpression sich mehr als 2,5-fache änderte. Es wurden 5

Glutathion-S-Transferasen ermittelt, die vermutlich durch Paraquat reguliert werden (Tabelle 5).

Tabelle 5 Einfluss von Paraquat auf die Expression verschiedener Glutathion-S-Transferasen von *C. elegans*

Glutathion-S-Transferasen	Steigerung (+) bzw. Hemmung (-) der Expression
K01D12.14	+9
F37B1.8	+3
R03D7.6	+3
F56A4.H	-7
Y48C3A.G	-7

Am stärksten wurde K01D12.14 um das 9-fache der mRNA-Menge erhöht. Um das 7fache wurden F56A4.H und Y48C3A.G herunterreguliert. Ein schwächerer Anstieg der mRNA-Menge zeigte sich bei F37B1.8 und R03D7.6, der etwa das 3-fache beträgt.

### 3.4.2 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Glutathion-S-Transferasen

Die cDNA der untersuchten Glutathion-S-Transferasen verfügen über einen Leserahmen von 400 bis 960 bp. Die F56A4.H ist 396 bp, K01D12.14 840 bp, y48C3A.G 966 bp, R03D7.6 624 bp und die F37B1.8 624 bp groß. Im Vergleich der Proteine R03D7.6 zu F37B1.8 wurde eine Identität von 45% sowie eine Ähnlichkeit von 62% ermittelt, während der Vergleich zwischen den Proteinen F37B1.7 zu F56A4.H nur eine Identität von 37% sowie eine Ähnlichkeit von 50% aufwies (Abbildung 17). Ein Vergleich der Proteine K01D12.14 zu Y48C3A.G ergab eine 31%ige Identität und eine 42%ige Ähnlichkeit zueinander. Eine grobe Zuordnung in die Proteinfamilien der GST lässt sich aufgrund der abgeleiteten Aminosäuresequenz und anhand der Bildung der „G-site“ (GSH-Bindungstasche (Abbildung 17)). Hierdurch lassen sich K01D12.14 und Y48C3a.G der mu-Klasse sowie F37B1.8 und R03D7.6 der alpha-Klasse zuordnen.

A.

Y48C3A.G	1	MPESTNFTEE	ITQWVESLPN	WGKAAVAGGVALAVY	IPYKFMATR	PKSPLN	ENWKP	DVVY	W
K01D12.14	1	MILEI	IAGI	IIILFIFNLLHTI	YKTF	LTPTVNAT	PKIHKR	--DYQK	DVVY
Y48C3A.G	61	LYQFPRARLL	PNLS	FCMKVET	WLRMSD	ITYE	IIPPCSL	STRSQE	GLPPFVELNGKEYYDS
K01D12.14	50	LYQFPRIDTV	PNLS	SFGLK	TETFLRAFK	IPEVI	VIET-GSL	RSRNG	GLPPFVELNGEHIFDS
Y48C3A.G	121	SFL	LRDIDQVIKHTS	DDHLSAEQK	TSRAFEAMSEK	SLA	TSAC	YRME	NVEKMLDQFDP
K01D12.14	109	DL	TEVRLRKHFQIPN	LSAEDESHATA	LCRLADNH	--LS	LI	IKYKAAE	DAWYSALLRGV
Y48C3A.G	181	KLFGIFGF	LFKLT	IGSRTYVSALLR	RTG	SD	TGFHSREDI	INIGSE	DLKATSKYLGNKHYF
K01D12.14	166	PGPNCLKT	LLKPL	IVRKL	FMKKVHER	ETGG	ALGNF	TEDEAEM	LCHKDLQAIQDSIKGKYL
Y48C3A.G	241	HG	HKPTKVDA	CIFSHLCQI	YAPY	TSEHRDL	IDG	ECKN	LAEYVERIK
K01D12.14	225	G--	DKITSAD	CTVFG	EVASAYYP	PNKFSRI	IDSHYPK	LHEYCD	RII
Y48C3A.G	301	FSTDTSNWKRRHVARNGNGKH							
K01D12.14									

B.

R03D7.6	1	MVSYKLT	YFN	GRGAGEV	SRQIF	FAYAG	QOYED	NRVTQ	EW	PALK	KETCA	AF	FG	GOLPF	LEV	DG
F37B1.8	1	MPSYK	TYFP	FRGLGEVR	LLFHL	ADCF	FKDER	FSFE	EW	GAVKS	--KSP	MG	OLP	IL	GV	DG
F56A4.H	1	MAV	QLY	YFTIR	GFGEY	IRLL	FLDN	GIK	FED	IRFDY	E	GNE	WQEF	FK	GML	GOLP
R03D7.6	61	KKLA	QSHAI	ARFLARE	EKL	NGKTA	WE	EAQ	VNSLAD	QYKDY	SS	EAR	PYFY	AV	MG	FG
F37B1.8	58	LEI	PSAA	ILRYLA	LK	GFAG	KTPED	RAW	VDA	VDR	KDF	FV	EF	KK	LV	VAK
F56A4.H	61	QEI	VQ	TGAIM	RHLG	---	RVH	GKEI	WR	-----	E	IR	I	F	S	--
R03D7.6	119	VET	LK	DIF	LPA	FEK	Y	GFL	VNF	LK	AS	G	S	G	F	L
F37B1.8	118	VAK	V	VSE	SV	PAMES	Y	F	K	L	N	G	L	L	E	R
F56A4.H	102	---	---	I	F	W	G	K	F	Q	F	R	K	T	F	S
R03D7.6	178	K	F	P	E	L	K	A	H	A	E	K	I	Q	A	I
F37B1.8	178	E	Q	K	L	T	A	L	L	E	K	V	Y	S	Q	E
F56A4.H		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Abbildung 17. Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Glutathion-S-Transferasen von *C. elegans*

In A. ist ein Vergleich von K01D12.14 zu Y48C3A.G wiedergegeben. In B. ist ein Vergleich der Proteine, F37B1.8 und F56A4.H dargestellt. Identische Aminosäuren sind in schwarz und homologe Aminosäuren in grau dargestellt. Einige Aminosäurereste, die eine GSH-Bindungstasche ausmachen sind eingezeichnet (bezogen auf die humane Glutathion-S-Transferasen, Salinas und Wong 1999).

Eine mögliche Unterteilung der Glutathion-S-Transferasen lässt sich durch einen Sequenzvergleich der Proteine vornehmen. Für diese Analyse mussten zunächst die in der EMBL-Datenbank enthaltenen Angaben über die Glutathion-S-Transferasen durch die

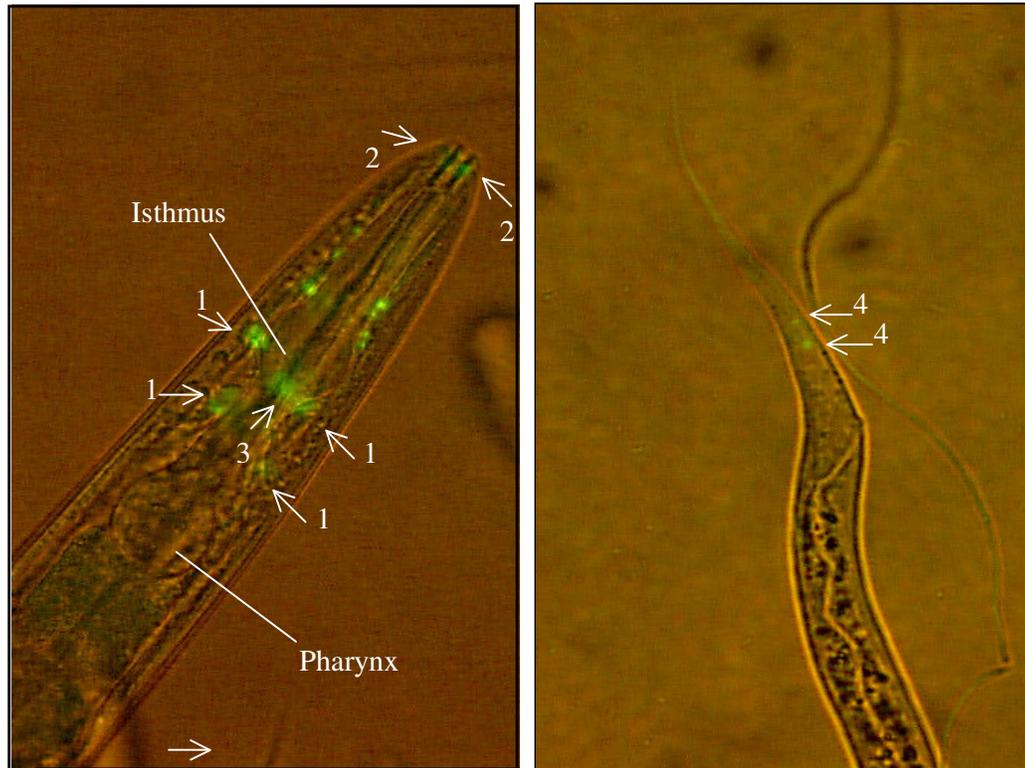
Isolierung und Sequenzierung der cDNA aus einer *C. elegans* cDNA-Bibliothek bestätigt werden. Hierfür dienten die genomischen Sequenzen jeder Glutathion-S-Transferase als Grundlage zur Erstellung von Oligonukleotiden. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie die Isolierung der kompletten cDNA ermöglichten.

Als Ergebnis zeigte sich, dass die Angaben aus der Datenbank mit den Sequenzen der Glutathion-S-Transferasen eine 100%ige Identität der Gene F37B1.8, R03D7.6 und Y48C3A.G aufwiesen. Ein Unterschied zu den Angaben in der Datenbank fand sich für das Gen K01D12.14. Ein zusätzlicher Sequenzabschnitt von 86 bp schließt sich dem fünften Exon an. Laut der Datenbank zählt dieser Sequenzabschnitt noch zum vierten Intron. Eine Isolierung des kodierenden Bereiches des Gens F56A4.H gelang bisher nicht.

Auch Intron/Exon-Grenzen sowie die Größe der Gene können für die Eingrenzung in eine der beschriebenen Klassen dienen. Die Genomstrukturen der Glutathion-S-Transferasen ließen jedoch keine eindeutige Zuordnung zu. K01D12.14 und Y48C3a.G haben eine Genomgröße von etwa 2 kb und besitzen 6 Exons. F37B1.8, F56A4.h und R03D7.6 haben eine Größe von etwa 2 bzw. 3kb und besitzen jeweils zwei Exons.

### **3.5 Expression der GSH-S-Transferase *Ce-F56A4.H::GFP* in *C. elegans***

Das Expressionsmuster von *Ce-F56A4.H::GFP* wurde durch ein GFP-Fusions-Konstrukt untersucht (vgl. 3.3.). In lebenden *C. elegans* konnte eine Expression von *Ce-F56A4.H::GFP* dokumentiert werden (Abbildung 18). Die GFP-Expression ist in den Somata von neun Neuronen (siehe Pfeile) sichtbar, die sowohl am Isthmus sowie am Schwanzende lokalisiert sind. Die Expression in den Somata ist nicht in jedem Wurm sichtbar (ca. 200 Würmer untersucht), und darüber hinaus existiert noch keine genauere Beschreibung der Neuronen. Den Neuronensomata, die zwischen Isthmus und Pharynx lokalisiert sind (Pfeil1), lassen sich möglicherweise sowohl den „quadrat outer labial neurons (OLQ)“, als auch den „cephalic neurons (CEP)“ und den „inner labia 1 neurons (IL1; IL2)“ zuordnen. Die am vorderen Mundbereich markierten Somata (Pfeil2) gehören eventuell zu den Neuronen der IL2 bzw. IL1 oder könnten den OLQ-Zellen zugeordnet werden. Signale, denen eine Position auf dem Isthmus zugesprochen werden können (Pfeil 3), sind wohl Neuronensomata der II1- bzw. II2- Familie oder zählen zur Familie der



**Abbildung 18.** Expression des F56A4.H::GFP-Konstruktes in *C. elegans*

Es können GFP-Signale einigen Neuronensomata zugeordnet werden, die sich im Bereich des Isthmus, sowie dem Schwanzende befinden.

**Abbildung A:** Neuronen am Isthmus lassen sich eventuell den „quadrat outer labial neurons (OLQ)“-Zellen, „cephalic neurons (CEP)“ und (bzw. oder) den „inner labial neurons (IL1; IL2)“ (Pfeil1) zuordnen. Am Mundbereich befinden sich Neuronensomata möglicherweise des Typs IL2 bzw. IL1 sowie möglicherweise OLQ-Zellen (Pfeil2). Auf dem Isthmus liegen Zellen, die zu der Familie IL1 bzw. IL2 zählen oder zur Familie der „lateral outer labial neurons (OLL)“ zugeordnet werden (Pfeil3).

**Abbildung B:** Die am Schwanzende befindlichen Neuronensomata können in die Familie der „phasmid neurons (PH)“, „neuron associated with ALM (ALNL)“ oder „ventral cord interneuron (PV)“ eingeordnet werden (Pfeil 4).

„lateral outer labial neurons (OLL)“. Die am Schwanzende befindlichen Neuronenkörper können meiner Ansicht nach in die Familie der „phasmid neurons (PH)“, „neuron associated with ALM (ALNL)“ oder „ventral cord interneuron (PV)“ eingeordnet werden (Pfeil 4).

## 2. Diskussion

Zur Ausbildung eines basalen Transkriptionsapparates ist nicht allein die Struktur der Initiationsregion von Bedeutung, sondern es werden auch regulatorische DNA-Sequenzen, die in unmittelbarer Nähe zum Transkriptionsstartpunkt liegen, benötigt. Als eine der am häufigst vorkommenden DNA-Sequenzen sei hier die TATA-Box erwähnt.

Eine Veränderung der Promotoraktivität verlangt zudem weitere regulatorisch wirkende DNA-Sequenzen, proximal oder distal gelegen, die als Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren dienen. Es gibt wenige Untersuchungen zur Organisation von Promotoren bei *O. volvulus*. Es wurden bisher die Strukturen von nur wenigen Genen, bei einer Gesamtzahl von schätzungsweise 4000 Genen, ermittelt (Unnasch und Williams 2000). Bei 4 Genen wurde die relative Promotoraktivität mittels Reportergenkonstrukten nachgewiesen und eine Analyse von potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen vorgenommen (Tawe et al. 2000; Da'Dara et al. 1996). Für Glutathion-S-Transferasen von *O. volvulus* wurde bisher keine Untersuchung zur Genregulation durchgeführt.

### 4.1 Analyse der Genstruktur von *OvGST1a* und *OvGST1b*

Im Rahmen dieser Studie konnte die vollständige Genstruktur der *OvGST1a* und *OvGST1b* ermittelt werden. Eine Analyse durch multiples Alignment gegen die Glutathion-S-Transferasen der Sigma-Klasse von *C. elegans* (*Ce-RIIG1*) sowie gegen die Prostaglandin D Synthase (PGDS) der Maus zeigte eine Übereinstimmung in der Lage der Introns (Abbildung 19).

Es besteht eine 40%-ige Aminosäureidentität der *OvGST1a* zu *Ce-R11G1*, während die Identität zu H-PGDS 35.8% beträgt. Die H-PGDS und die *Ce-R11G1* zeigen eine Übereinstimmung im Exon-Intron-Aufbau, wie sie für die Sigma-Klasse der GST-Familie beschrieben ist (Kanaoka et al. 1997). Anhand dieses Alignments lassen sich die *OvGST1a* und *OvGST1b* der Sigma-Klasse zuordnen.

Die Genstrukturen der *OvGST1a* und *OvGST1b* zeigen eine hohe Ähnlichkeit zueinander. In nichtkodierenden Bereichen kommt es zu einer 99%-igen Identität, während drei Sequenzinsertionen innerhalb des zweiten Introns sogar zu einer Erniedrigung der Identität auf 92% führen.

Ov-GST1a	1	MAIVNNSHIFIVLMTFITMNFVVEAASSNANQAITSENSIKPKGKLOPQMEKYTLTYFNG
Mm-H-PGDS	1	-----MPNYKLLYFNM
Ce-R11G1	1	-----MEYKLOYFNM
Ov-GST1a	61	RGRAEVIRLLFALANVSYEDNRTIRDEWKY LKPRTPFGHVPMLNVS CNV LGESHATELLL
Mm-H-PGDS	12	RGRAEIRYTFAYLDIKYEDHRIEQADWPKIKPTLPPGKIPVLEVEGLTIHQSLAIARYL
Ce-R11G1	11	MGRAEPARLTFAYAGVOYTDERVERKSAWPEIKATTPHGKLPVLYVDGAKLAQSRVIERYL
Ov-GST1a	121	GGRFGLLCTNDWEEAKIMAVVLNIDELFOKLIPTWHEKNTTKKAELFRNLSES DVMPFLG
Mm-H-PGDS	72	TKNTDLACKTALEROQADAVVDITDDFMS-LFPWAE-KDQDLKERMENELLTHQAPRLK
Ce-R11G1	71	GKVFGLA CETDWE TAKMDELVACVEDFLIEIQPWFKEQDNARKVVEIEKKLIESTIIPFIS
Ov-GST1a	181	RYEKFLKESTTGHIVGNKVSVDLTVENMLMTLLDDEVK---LEEYPOIASFVNKIGOMP
Mm-H-PGDS	130	DLDTYLGD--KEWFIGNYVTWADFWDICSTLLLVLPK-GLD IYPKLVSLRNKVOATPA
Ce-R11G1	131	AFENILVTNGTG YFVGDKISYADLAIEHIFWFMNSKILPGALRKVPEKIQEIEKITAIDS
Ov-GST1a	238	IKEWIKKRPKTYF
Mm-H-PGDS	187	ISAWILKRPQTKL
Ce-R11G1	191	IKSWINSRPKTEA

### Abbildung 19. Aminosäurevergleich der *Ov*-GST1a mit der Maus-H-PGDS sowie der GST R11G1 von *C. elegans*

Identische sowie ähnliche Aminosäurereste sind mit schwarzen bzw. grauen Boxen unterlegt. Positionen der Introns sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Im Vergleich zeigt sich eine N-terminale Verlängerung der *Ov*GST1a von 50 Aminosäuren. An Position 1-25 befindet sich ein Signalpeptid, das zur Reifung des Protein abgespalten wird. Daran schließt sich über weitere 25 Aminosäuren eine N-terminale Verlängerung an, die im Aminosäure-Vergleich nicht mit einbezogen wird. Der Vergleich der Proteinsequenzen beginnt ab der 50sten Aminosäure der *Ov*GST1a.

Zudem sind 11 Mutationen innerhalb der kodierenden Regionen vorhanden, die sich zumeist in Aminosäureaustausche widerspiegeln (siehe Ergebnisteil, Tabelle 1 und Tabelle 2). Die hohe Anzahl der Nukleotidaustausche, sowie die Anzahl von drei Sequenzinsertionen lassen vermuten, dass es sich um zwei verschiedene Gene handelt. Die hohe Übereinstimmung könnte auf eine Genduplikation zurückzuführen sein. Desöfteren sind Genduplikationen innerhalb der Genfamilien von Glutathion-S-Transferasen beschrieben worden (Coggan al. 1998; Telakowski-Hopkins et al. 1986; Tu et al. 1984). Auch sind hohe Identitäten der Aminosäuresequenzen verschiedener Glutathion-S-Transferase-Gene mehrfach in der Literatur erwähnt. So sind Sequenzidentitäten von 94-96% für die Untereinheiten der humanen Glutathion-S-Transferasen der Alpha Familie (Pickett et al. 1984) und bei der GST1A der Ratte beschrieben worden (Kalinyak et al. 1982; Daniel et al. 1983; Lai et al. 1984). Auch zeigte sich beim Vergleich der mikrosomalen Glutathion-S-Transferase des Menschen und der Ratte eine 95%-ige Übereinstimmung (De Jong et al. 1988a.) Vergleichend hierzu konnte bei der *Ov*GST1a zu der *Ov*GST1b eine Aminosäure-Identität von 96 % ermittelt werden.

Dass es sich bei *OvGST1a* und *OvGST1b* um verschiedene Ausprägungen eines Gens handelt, um sogenannte Allele, konnte zwar nicht ausgeschlossen werden, ist aber aufgrund der Sequenzunterschiede eher unwahrscheinlich. Für alle Glutathion-S-Transferasen sind Polymorphismen beschrieben worden, die einzelne oder wenige Aminosäureaustausche besitzen. So zeigen Allele der GSTP1 von *Homo sapiens* zwei Austausch (Stanulla et al. 2000) und Allele der GSTM1 von *Homo sapiens* einen einzelnen Austausch (Seidegard et al. 1988, De Jong et al 1988b). Hingegen sind bei *OvGST1a* zu *OvGST1b* insgesamt 10 Aminosäureaustausche ermittelt worden. Weiterhin liegen auch Daten über Polymorphismen nicht kodierender Bereiche vor. Allele der Mu-Klasse GSTM3 verfügen über einen einzelnen Nukleotidaustausch der zudem eine Veränderung der Funktionalität einer Transkriptionsfaktorbindungsstelle YY1 bewirkt (Inskip et al. 1995). Innerhalb der 5'-flankierenden Bereiche (671 bp) der *OvGST1a* und *OvGST1b* sind 14 Punktmutationen festgestellt worden.

Zur weiteren Unterscheidung der Gene *OvGST1a* und *OvGST1b* wurden Southernblot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde eine cDNA-Sonde mit der Länge von ca. 800 bp und ein Fragment des 5'-flankierenden Bereichs mit einer Länge von ca. 600 bp verwendet. Das Hybridisierungsmuster des radioaktivmarkierten 5'-Bereich (siehe Ergebnis Abbildung 8.) zeigt, dass es sich bei *OvGST1a* und *OvGST1b* um zwei verschiedene Gene handelt. Stark homologe Gene lassen sich von Allelen zusätzlich noch durch andere Methoden, z.B. der Ermittlung der Genloci, durch In-situ-Hybridisierung oder durch Genkopplungskarten unterscheiden.

### **3.2 Analysen zum Promotoraufbau der *OvGST1a* und *OvGST1b***

Eine sogenannte TATA-Box, wie sie für eine Reihe von eukaryotischen Promotoren beschrieben wurde, konnte stromaufwärts des Initiationsbereiches nicht gefunden werden. Die TATA-Box ist ein DNA-Element, welches für die korrekte Initiation der Transkription mitverantwortlich ist. Ein Fehlen dieses Elementes könnte zur Bildung von multiplen Startpunkten führen, wie sie für *OvGST1a* und *OvGST1b* im Bereich der Initiation, sowie 52-63 bp stromabwärts nachgewiesen werden konnten. Übereinstimmend wurden bei weiteren Genen, denen ebenfalls TATA-Box Elemente fehlen, multiple Transkriptionsstartpunkte nachgewiesen (Penrose et al. 1996; Marthinet et al. 2000; Cook

und Park 1999). Für *OvGST1a/1b* resultieren die verschiedenen Startpunkte in verschiedenen 5'-Enden der mRNA (Ergebnisteil 3.2.1).

Durch entsprechende Computersoftware konnte der 5'-flankierende Bereich der *OvGST1a/1b* auf putative Transkriptionsfaktorbindungsstellen hin untersucht werden. Hierbei wurden Sequenzmotive berücksichtigt, die eine 100%-ige „Core“-Homologie und eine nicht weniger als 90%-ige „Matrix“-Homologie zeigten. Hierbei wurden Promotorelemente berücksichtigt, denen bereits eine regulatorische Funktion auf Glutathion-S-Transferasen zugeschrieben wurde. Es konnten folgende potentielle Elemente identifiziert werden: „C/EBP-site“, „cAMP response element (CRE)“, „AP1-site“ und „GATA-binding protein“-Boxen. „CCAAT/enhancer-binding“-Proteine gehören zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die für die Zellteilung von Bedeutung sind, aber auch eine Reihe von gewebespezifischen Funktionen aufzeigen (Lekstrom-Himes und Xanthopoulos 1998). Für die GSTYa der Ratte konnte gezeigt werden, dass eine negative Regulation durch „CREB-binding“-Proteine, die an Elemente der „CCAAT/Enhancer-binding“-Proteine binden, erfolgt (Chen und Ramos 2000). In vielen Glutathion-S-Transferasen ist ein sogenanntes „barbiturate inducible element“ vorhanden über das die Regulation durch Phenobarbital erfolgt (Lerche et al. 1997). Weiterhin wurde über heterologe Nachweismethoden bei der Schistosomen Sm28GST eine Regulation durch AP1 gefunden. Diese transkriptionelle Aktivierung wird vermutlich über die Bindung von Jun/Fos-Dimeren reguliert (Albertson und Thomson 1976). Bisher sind noch keine GATA-Boxen bei Glutathion-S-Transferasen beschrieben worden. Eine Reihe von Untersuchungen zur Genregulation von Glutathion-Peroxidasen zeigen jedoch, dass hierdurch eine zellspezifische Expression, so z.B. in den Erythrozyten von GATA-Boxen gesteuert wird (O'Prey et al. 1994)

### **4.3 Die Funktionalität des *OvGST1a*- und *OvGST1b*-Promotors**

Aufgrund fehlender Zellkulturen von Nematoden, bleibt die Analyse der Funktionalität von Promotoren weiterhin schwierig. Die Verwendung von biolistischen Verfahren, wobei DNA bzw. RNA in Zellen durch Beschuss von Goldpartikel eingebracht wird, ist noch nicht ausgereift. Versuche hierzu wurden bisher an Parasiten wie *A. suum* und *S. mansoni* durchgeführt (Davis et al. 1999). In *O. volvulus* konnten die spezifischen Aktivitäten

verschiedener Promotoren durch die Nutzung heterologer Systeme erfolgreich bestimmt werden. Das heterologe System beruht auf der Transfektion eines Reportergen-Konstruktes; hierbei wird der parasitäre Promotor vor das Reportergen Luciferase kloniert und in Säugetierzellen hineingebracht. Transfektionen mit „Chinese-Hamster-Ovary“-Zellen (CHO) wurden bereits erfolgreich bei Aktivitätsbestimmungen der Promotoren von *O. volvulus* (Tawe et al 2000) verwendet. Ebenfalls wurde die Aktivität des Glutathion-S-Transferase-Promotors von *S. mansoni* in HeLa- und Jukat-Zellen untersucht (Serra et al., 1996). Eine hohe Übereinstimmung von NF-Y („nuclear factor Y“) und HSF („heat shock factor“) von *S. mansoni*, zu den entsprechenden humanen Faktoren unterstützt zudem die Anwendung dieser Modellsysteme (Serra et al. 1998).

Damit die Funktionalität der *O. volvulus*-Promotoren, *OvGST1a* und *OvGST1b*, getestet werden konnte, wurden die Nukleotidsequenzen der 5'-flankierenden Bereiche, einschließlich des Transkriptionsstartpunktes vor das „Firefly“-Luciferase-Gen kloniert, um hiermit 293-T-, CHO-, und HeLa-Zellen zu transfizieren. Die relative Expression der Luciferase in 293-T-Zellen war durch den *OvGST1a*-Promotor ca. 30-fach erhöht und durch den *OvGST1b*-Promotor ca. 15-fach höher als die Hintergrundaktivität. Um potentielle *cis*-regulatorische Elemente, die die Expression der Glutathion-S-Transferasen regulieren, zu lokalisieren, wurden Deletionskonstrukte des 5'-flankierenden Bereichs erstellt. Für die Promotoren der *OvGST1a* und *OvGST1b* zeigte sich bei einem Konstrukt, bestehend aus 36 bp, stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes, noch keine Promotoraktivität. Dies weist darauf hin, dass *cis*-Elemente, die zur Initiation der Transkription benötigt werden noch weiter stromaufwärts liegen. So konnte für die *OvGST1a* und *OvGST1b* festgestellt werden, dass die basale Promotoraktivität auf die ersten 200 bp beschränkt ist. Es bleibt zu überprüfen, ob die GATA-Box, welche sich -74 bis -81 bp vom Transkriptionsstartpunkt entfernt befindet (siehe Ergebnis, Tabelle 3), zur Initiation benötigt wird. Elemente, wie GATA-Boxen, aber auch andere für die basale Promotoraktivität notwendige *cis*-Elemente, können sich wenige 100 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes befinden. So konnte für eine Cystein-Protease von *Haemonchus contortus* gezeigt werden, dass ein sich 212 bp entfernt vom Startpunkt der Transkription befindliche GATA-Box für die Initiation essentiell ist (Britton et al. 1998). Weiter stromaufwärts liegt ein weiteres potentielles *cis*-Element, das „barbiturate inducible element“. Ob dieses Element einen Einfluss auf die Promotoraktivität ausübt, ist noch nicht geklärt. Induktionsversuche am heterologen System mit Phenobarbital (siehe Ergebnis 3.2.3.2) zeigten keine signifikante Veränderung der Promotoraktivität.

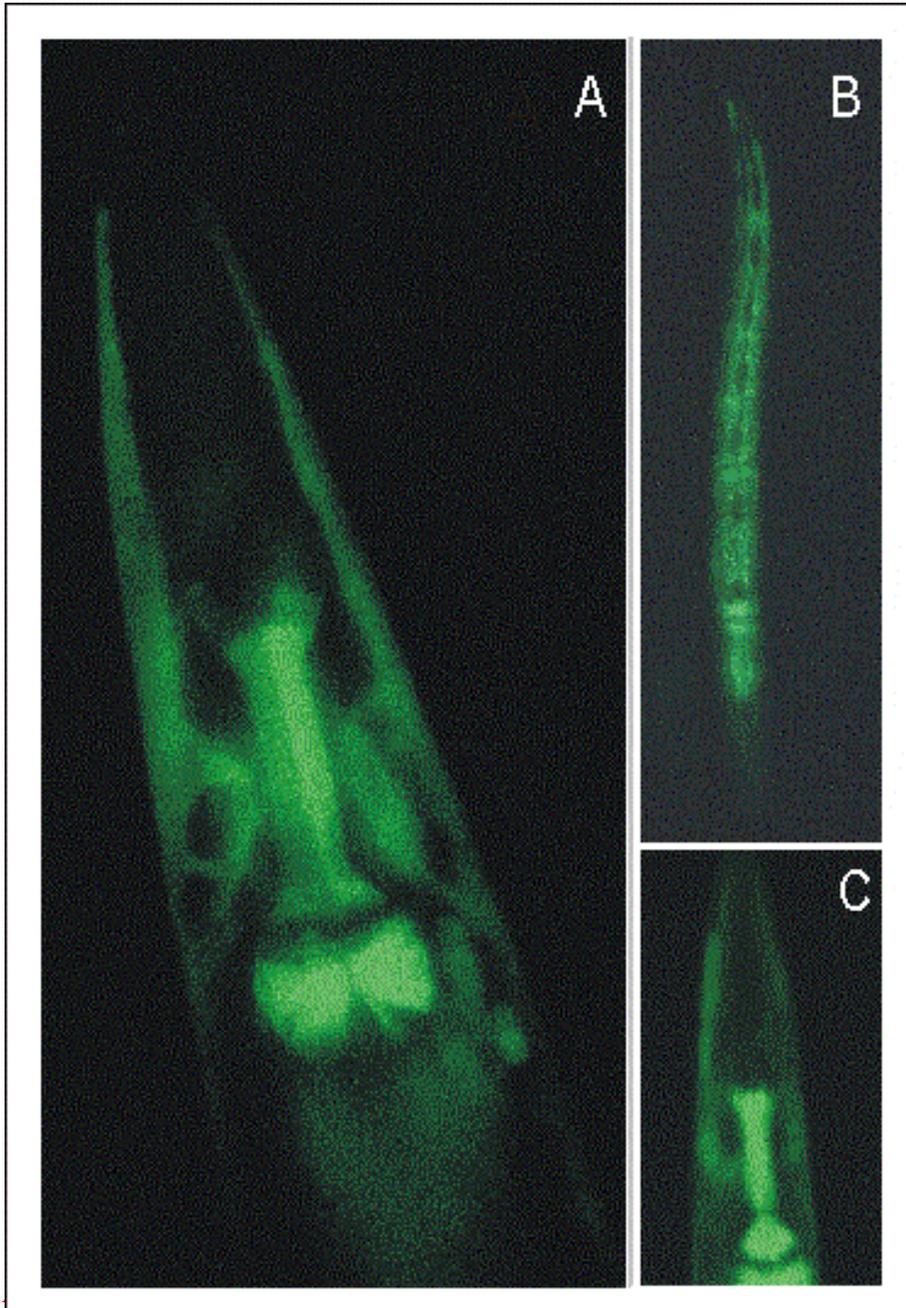
Eine steigende Zunahme der Promotoraktivität bei zunehmender Fragmentlänge des Promotors weist darauf hin, dass diese Sequenzen positive Promotorelemente enthalten. Interessanterweise konnte ein Unterschied der Promotoraktivität zwischen *OvGST1a* und *OvGST1b* festgestellt werden. Einzelne Punktmutationen, die innerhalb einer Bindungsstelle vorkommen, können zur Aufhebung der Bindung von Transkriptionsfaktoren führen.

#### **4.4 Gewebespezifische Expression der *OvGST1a/1b***

In vorherigen Studien wurde bereits eine Immunlokalisierung der *OvGST1a/1b* in *O. volvulus* durchgeführt (Wildenburg et al. 1998). Die Expression konnte in Microfilarien, in den infektiösen Larvalstadien (L3) und in adulten Filarien nachgewiesen werden. Die *OvGST1a/1b* konnte hauptsächlich im äußeren lamellären Bereich der Hypodermis lokalisiert werden. Zusätzlich konnte eine Lokalisierung in Ausbuchtungen der Cuticula, oberhalb der Hypodermis und auch in der Epicuticula nachgewiesen werden. Diese Beschreibung lässt den Schluss zu, dass es sich um sekretorische Proteine handelt, welche an der Parasiten/Wirtskontaktfläche vorkommen. Auch bei der Proteinstruktur sprechen ein Signalpeptid sowie vier bzw. 5 Glykosylierungsstellen innerhalb der Proteine für einen sekretorischen Charakter (Liebau et al. 1994a).

Anhand der Immunlokalisierung konnte die gewebe- und stadienspezifische Expression beschrieben werden. Anhand von GFP-Reporter-Konstrukten ist es möglich die Genexpression in dem Modelnematoden *C. elegans* unter Stressbedingungen, so z.B. durch Zugabe von Chemikalien, zu beobachten, aber auch die Veränderung der Promotorstruktur z. B. durch das Einfügen von Mutationen.

Anfängliche Studien zeigen, dass eine Expression des GFP-Promotorkonstruktes der *OvGST1a* in den hypodermalen Zellen, verstärkt in der *hyp-7* Zelle und etwas geringer in den „hypodermal seam“-Zellen zu beobachten ist. Eine Expression in den hypodermalen Zellen konnte nur ab dem postembryonalen Stadium beobachtet werden, während davor keine Expression detektiert wurde. Eine moderate GFP-Expression konnte zudem in allen Larvenstadien dem Isthmus und dem terminalen Bulbus zugeordnet werden. In Adulten war die GFP-Expression beschränkt auf die hypodermalen Zellen der Kopfgregion, den „arcade“-Zellen, sowie dem Isthmus und terminalen Bulbus des Pharynx (Abbildung 20.).



**Abbildung 20. Expression von *O. volvulus* GST1a::GFP-Reporterkonstrukt in transgenen *C. elegans***

Das stärkste Signal ist sichtbar im Isthmus und im terminalen Bulbus des Pharynx. Abbildung A. zeigt das Vorderende eines adulten Hermaphroditen, B. ein L3-Stadium und C den vorderen Bereich einer L3-Larve. In Abbildung B. ist ein moderates GFP-Signal dargestellt, welches in allen post-embryonalen Stadien der Hypodermis zu sehen ist.

Auffällig hierbei ist eine besonders starke GFP-Expression innerhalb der Drüsenzellen des terminalen Bulbus. Die Funktion dieser Drüsen ist nicht eindeutig geklärt, jedoch wird eine

Sekretion von Verdauungsenzymen vermutet. Diese findet statt, wenn der Isthmus und der terminale Bulbus des Pharynx geöffnet sind (Albertson 1976). Während eine Expression innerhalb der hypodermalen Zellen auch in *O. volvulus* beschrieben werden konnte, konnte bislang keine pharynxspezifische Expression beschrieben werden (persönliche Mitteilung von D. W. Büttner). Dieser augenscheinliche Unterschied lässt sich jedoch durch die verschiedenen Lebensgewohnheiten der Nematoden erklären. Bei *C. elegans* handelt es sich um einen freilebenden Organismus, der seine Nahrung über den Pharynx aufnimmt und Nahrungspartikel über die Darmwandung absorbiert. Bei *O. volvulus* hingegen besteht aufgrund der parasitären Lebensweise eine transcuticuläre Aufnahme der Nährstoffe über die gesamte Oberfläche. Eine Verteilung innerhalb des 40 cm langen Nematoden findet aufgrund fehlender Muskulatur des Darms nicht statt. Auch scheint der nur 0.6 mm lange Pharynx nicht für eine effektive Verteilung der Nährstoffe innerhalb des Nematoden verantwortlich zu sein. Es wird auch beobachtet, dass bei adulten weiblichen *Onchocerca* die Fähigkeit des Darms Nahrungspartikel aufzunehmen und innerhalb des Nematoden zu verteilen mit zunehmendem Alter verloren geht (Franz und Büttner 1983). Es ist daher zu vermuten, dass eine pharynx-spezifische Genexpression bei *C. elegans* ausgeprägt ist, sich aber bei *O. volvulus* nicht nachweisen lässt.

#### **4.5 Analysen zu dem Promotoraufbau der *OvGST2***

Anhand einer Computeranalyse konnte dem 5'-flankierenden Bereich der *OvGST2* eine Reihe von Bindungsstellen für Transkriptionfaktoren zugeordnet werden (<http://www.genomax.gsf.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl>). Unter Berücksichtigung von Faktoren, denen bereits eine regulatorische Funktion bei einigen Glutathion-S-Transferasen zugeschrieben wurde, können folgende Faktoren genannt werden: „GATA-binding“-Protein, „CAAT/Enhancer Binding“ Protein und „barbiturate inducible element“.

Diese Faktoren wurden ebenfalls in der Promotorregion von *OvGST1a/1b* gefunden und lassen vermuten, dass hier ähnliche Mechanismen zur Genregulation vorliegen. Die Untersuchung des Transkriptionsstartpunktes zeigte die Initiation an einem einzelnen Nukleotid. Der Startpunkt wurde einem Thymidin, welches 39 bp stromaufwärts vom Startkodon ATG liegt, zugeordnet. Die Funktion einer fehlenden TATA-Box kann

möglicherweise durch ein *cis*-Element übernommen werden, welches sich wenige Basenpaare stromabwärts vom Startpunkt entfernt befindet. Tatsächlich befinden sich hier zwei „GATA-binding“-Proteine, 163 und 259 bp entfernt. Die Anlagerung des „TATA binding“-Protein TFIID an GATA-Boxen wurde bereits bestätigt (Aird et al. 1994). Inwieweit das „GATA box element“ tatsächlich die Funktion einer fehlenden TATA-Box übernehmen kann, bleibt zu überprüfen.

#### 4.6 Untersuchungen zur Funktionalität des *OvGST2*-Promotors

Bei der *OvGST2* handelt es sich um ein cytosolisches Enzym für das eine „housekeeping“-Funktion postuliert wird. Aber es konnte dessen mögliche Funktion als enzymatisches Antioxidans bestätigt werden (Liebau et al. 1994b). Die *OvGST2* ist topologisch mit der Pi-Klasse der Glutathion-S-Transferasen verwandt. Auch die Analyse der *OvGST2* auf Genebene untermauert diese phylogenetische Verwandtschaft (Liebau et al. 1994).

Für die Promotoraktivität ergab sich eine bis zu 12fach erhöhte relative Luciferaseaktivität gegenüber dem Hintergrund. Dieser Wert bezieht sich nicht auf die Gesamtlänge des untersuchten Promotorbereiches (684 bp), sondern auf ein Deletionsfragment (575 bp), welches um 119 bp vom 5'-Ende her verkürzt wurde. Die gesteigerte Aktivität konnte jedoch durch die Deletion von weiteren 11 bp, Deletionsfragment (564 bp), aufgehoben werden. Hierdurch zeigte sich, dass sich ein positiv-wirkendes Element innerhalb dieser 11 bp (564 bis 575 bp) befindet. Es gilt zu überprüfen, ob das *cis*-Element sich über das restliche Promotorfragment hinaus erstreckt. Eine genaue Untersuchung des Elements konnte durch „random-mutagenesis“ und „gel-shift-assay“ vorgenommen werden. Anhand der bisherigen Ergebnisse kann das positiv-wirkende *cis*-Element auf insgesamt 10 Nukleotide eingegrenzt werden. Weiterhin zeigte sich, dass jeweils zwei Punktmutationen von A→G(-572) und G→A(-564) bzw. von A→T(-573) und T→G(-560) zum Verlust der Protein-DNA-Bindung und damit zum Verlust der Funktion des *cis*-Elements führen.

Ein Vergleich der Sequenz des *cis*-Elements mit Bindungsstellen bekannter Transkriptionsfaktoren, beruhend auf Daten des „Matinspector“-Programmes, zeigte keine Übereinstimmung. Es ist dennoch eine Charakterisierung der Bindungsstelle aufgrund der Nukleotidaustausche möglich. Der Verlust der DNA-Protein-Bindung aufgrund des Austausches von Adenin -578 und Thymin -560 durch Guanin deuten daraufhin, dass es

sich hier um eine A/T-reiche Sequenz handelt. A/T-reiche Sequenzen sind als Bindungsstellen für Oct1, MEF-2 (Lakich et al. 1998) aber auch für TF2D bekannt. Für eine klassische TATA-Box, an der TF2D bindet, liegt diese Bindungsstelle mit über 500 bp zu weit stromaufwärts vom Startpunkt der Transkription und kommt daher nicht in Frage. Für Oct1 sind POU-Bindungsdomänen beschrieben worden, die an A/T-reiche-Sequenzen binden (Lakich et al. 1998; Kalwinski et al. 1995). Inwieweit Proteine mit POU-Bindungsdomänen einen Einfluss auf die Genregulation der *OvGST2* ausüben, bleibt zu überprüfen. Einen weiteren Aspekt zur Genregulation bieten A/T-reiche Sequenzen durch lokale Konformationsänderungen der DNA. Für solche Sequenzen sind proteininduzierte Krümmungen der DNA bekannt. Durch eine Konformationsänderung der DNA können Bindungsstellen für weitere Transkriptionsfaktoren geschaffen, oder eine räumliche Nachbarschaft zu weiteren Faktoren gebildet werden.

### **3.7 Gewebespezifische Expression der *OvGST2***

Durch Immunlokalisierung konnte bereits ein Expressionsmuster der *OvGST2* in *O. volvulus* erstellt werden (Liebau et al. 1996). Hierbei zeigte sich eine besonders starke Immunoanfärbung innerhalb der synzytialen Hypodermis. Zur weiterführenden Untersuchung der transkriptionellen Regulation wurden Reporterkonstrukte des *OvGST2*-Promotors mit GFP erstellt und durch das Verfahren der Microinjektion in *C. elegans* eingebracht. Eine GFP-Expression konnte in allen Stadien von *C. elegans* nachgewiesen werden. Eine besonders ausgeprägte Expression zeigte sich innerhalb der H-förmigen Exkretionsdrüse und innerhalb der intestinalen Zellen des Mitteldarms. Obwohl Studien zur Anatomie der Exkretionsdrüse durchgeführt wurden, ist deren physiologische Bedeutung weitgehend ungeklärt. Bisher wird den Exkretionsdrüsen eine wesentliche Rolle bei der Osmoregulation zugeschrieben (Nelson et al. 1983, Nelson et al. 1984). Weitere Untersuchungen von A. Broeks (1995) zeigen, dass den exkretorischen Zellen auch eine Entgiftungsfunktion zukommt. So zeigte sich das die Resistenz gegen die Chemikalien Chloroquine und Kolchizin an den aktiven Transportern *pgp* (p-Glykoprotein) gebunden ist, der hauptsächlich in den Membranen der Exkretionsdrüse, aber auch den intestinalen Zellen vorkommt. Eine zweifach Mutante von *pgp-1* und *pgp-3*

resultiert nachweislich in einer Sensitivität gegenüber diesen Chemikalien (Broeks et al. 1995).

Weiterhin wird auch für die Glutathion-S-Transferase R03D7.6 von *C. elegans*, die gewebespezifisch in den exkretorischen Zellen exprimiert wird, eine Entgiftungsfunktion zugesprochen (persönliche Mitteilung von J. Daulby, School of Biology, University of Leeds). Bei einem Aminosäurevergleich der R03D7.6 gegen OvGST2 zeigt sich eine relativ hohe Homologie von 75%. Zudem konnte bei durchgeführten „Microarray“-Experimenten die Induktion von R03D7.6 durch Paraquat nachgewiesen werden. Vergleichbar durchgeführte Studien zur Induktion der OvGST2 durch Oxidantien zeigten jedoch keine Induktion (siehe 3.2.3.2.). Weiterhin zeigten auch in vitro Versuche mit adulten *O. volvulus*, die mit dem Xanthin/Xanthinoxidase-System und den Redoxzyklern Paraquat und Plumbagin gestresst wurden, keine signifikante Erhöhung oder Erniedrigung der mRNA-Menge (Liebau et al. 2000).

#### **4.8 Expressionsanalyse von *Caenorhabditis elegans***

Durch Zugabe von Paraquat, einem Redoxzykler, wurde das Expressionsmuster von insgesamt 90% der Gene von *C. elegans* untersucht. Für die Analyse wurde das Expressionsniveau nichtbehandelter Nematoden mit dem Expressionsniveau von Paraquat-gestressten Nematoden verglichen. In dieser Arbeit konnte das Expressionsniveau von 11990 Genen untersucht werden. Nach einer zweistündigen Exposition mit Paraquat zeigte sich eine mehr als 2,5-fache Veränderung an etwa 16% der Gene, hiervon waren 31% herauf und 69% herunterreguliert. Die Auswertung der 12-Stunden-Exposition zeigte eine Veränderung an etwa 8.5% der Gene, hiervon waren etwa 13% herauf und 87% herunterreguliert. Tendenziell zeigte sich, dass nach zwei Stunden sowie nach 12 Stunden der Anteil der herunterregulierten Gene mehr als doppelt so hoch ist, wie der Anteil der heraufregulierten Gene. Eine erste Analyse deutet darauf hin, dass bei den gestressten Larven eine Vielzahl von Genen ab/angeschaltet werden, die der Larve einen Übergang zum Dauerstadium ermöglichen. Studien zur Beschreibung der transkriptionellen Aktivität der Dauerlarve (Dalley und Golomb 1992) zeigen, dass die Transkriptionsrate der RNA-Polymerase II (RpoI) in Dauerlarven stark erniedrigt ist. Im Vergleich zu den Entwicklungsstadien wurde in „run-on“-Experimenten eine auf 40% erniedrigte Aktivität

der RpoI bei Dauerlarven festgestellt, die sich durch eine Erniedrigung des Metabolismus erklären lässt. Ferner zeigte sich, dass einige Entgiftungs- und Reparatursysteme in ihrer Expression hochreguliert werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten „Microarray“-Experimente zeigen, dass etwa 2-fach so viele Gene unter PQ-Stress herunterreguliert wurden, als herauf. Zudem konnte eine starke Reduktion der Histon- und Myosin-mRNA, 30-fache für Histon 1, 22-fache für H2A, 11,2-fache für H2D und 17-fache für Paramyosin, ermittelt werden. Für diese Proteine wurde auch eine drastische Reduktion in Dauerlarven festgestellt (Dalley und Golomb 1992). Die Beschreibung, dass *C. elegans* unter ungünstigen Lebensbedingungen in ein Dauerlarven-Stadium übergeht, lässt sich auch anhand des Expressionsmusters der Collagen-Gene verfolgen. Die Ergebnisse der „Microarray“-Analysen zeigten eine 3-fache Hochregulation des Collagen-2, welche nur spezifisch in Dauerlarven exprimiert wird (Kramer et al. 1985). Eine gleichzeitige Herunterregulation der Gene col-7 und col-19, die speziell im Übergang des Larvenstadiums zum adulten Stadium exprimiert werden, zeigen, dass eine verzögerte Entwicklung vorliegt, die sich durch den Übergang zur Dauerlarve erklären lässt (Liu et al. 1995). Auch eine Herunterregulation der „major sperm specific“-Proteine zeigt eine verzögerte Spermienbildung. Der Anteil an herunterregulierten „major sperm specific“-Proteine zu der gesamten Anzahl an herunterregulierten Genen beträgt laut den Daten aus dem „Microarray“ etwa 15 %.

Eine mehr als 2,5-fache Erhöhung des mRNA-Gehalts wesentlicher enzymatischer Antioxidantien, wie Superoxid Dismutase, Katalase, Cytochrom-C-Peroxidase und Glutathionperoxidasen wurde nicht festgestellt. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen an Superoxid-Dismutase, SOD1 und SOD2, bei *C. elegans*-Larven, die unter entsprechenden Bedingungen gestresst wurden und deren mRNA-Gehalt nur um den Faktor 2 anstieg (Tawe et al. 1998). Auch konnte für Katalasen von *C. elegans* bei entsprechenden Bedingungen eine nur 2-fache Steigerung des mRNA-Gehalts nach zwei Stunden beobachtet werden (Eckelt et al. 1998). Wurden die Larven hingegen 4 bis 20 Stunden in Gegenwart von Paraquat kultiviert, stieg der mRNA-Gehalt der CeCAT1 und CeCAT2-mRNA um den Faktor 3 bzw. 4. Dieser Anstieg konnte jedoch nicht anhand der „Microarray“-Versuchen bestätigt werden. Auch bei einer Exposition von über 12-Stunden betrug der mRNA-Gehalt gemessener Katalasen nicht mehr als das 2,5-fache der Kontrolle. Ergänzend sei erwähnt, dass selbst eine geringe Induktion an Katalasen bzw. Superoxiddismutasen zu einer erheblichen Steigerung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entgiftungspotential führt, da deren Potential addiert wird. Zudem ist noch zu bedenken, dass z.B. das Enzym

Katalase über eine lange Halbwertszeit verfügt und geringe Enzymmengen schnell hohe Peroxidase-Konzentrationen eliminieren können.

Die Induktion an Reparaturenzymen lässt sich dadurch erklären, dass bereits eine Schädigung von biologischen Strukturen erfolgt ist (Krinsky, 1992; Sies 1993; Michiels et al. 1994). Die Exposition von Paraquat führte u.a. zur erhöhten Expression an Genen, die an der Reparatur von DNA sowie an der Proteolyse beteiligt sind. So ist der Transkriptionsfaktor II H (TFII H), der nicht nur an der Transkription der RNA-Polymerase II beteiligt ist, sondern auch für „nucleotid excision repair“ benötigt wird (Feaver et al. 1999), um das 3- bis 6-fache erhöht. Laut der Angaben aus dem „Microarray“-Ansatz ist eine Erhöhung der poly-ADP-Ribose-Polymerase von 5- bis zu 7-fach nach zwei Stunden sowie bei einer Übernacht-Exposition messbar. Die poly-ADP-Ribose-Polymerase aktiviert im Kern vorkommende Proteasen, die eine Hauptfunktion in der Degradation von oxidativ geschädigten Histonen übernehmen (Ullrich et al 1999). Hierbei handelt es sich um die Ribosylierung des 20S-Proteosomen, welche zu einer erhöhten Enzymaktivität führt. Die mRNA des 20S-Proteosomen selbst wird hierbei nicht erhöht.

Weiterhin wurden auch Gene der Aldo-Keto-Reduktasen heraufreguliert. Neuere Literatur (Burczynski et al. 2000) beschreibt, dass im Promotorbereich der Aldo-Keto-Reduktasen „anti-oxidant response“ Elemente vorliegen, die via Signaltransduktion ausgehend von reaktiven Sauerstoffspezies angeschaltet werden. Als Substrate von Aldo-Keto-Reduktasen sind 4-Hydroxy-2-nonenal und andere  $\alpha$ - und  $\beta$ -ungesättigte Aldehyde bekannt, die während der Lipidperoxidation entstehen.

Durch die Expressionsanalyse konnte ein Eindruck über die *in vivo* durch Paraquat regulierten Gene gewonnen werden. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass der Anteil der durch Paraquat regulierten Gene in Wirklichkeit größer ist. Die erfolgte Expressionsanalyse ist nur in der Lage die Genexpression eines fixen Zeitpunktes unter gewählten Bedingungen zu erfassen. Es ist möglich, dass einige Gene unter gewählten Bedingungen nicht exprimiert werden. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass andere Kulturbedingungen ein anderes Bild bieten. Für einen umfassenden Eindruck des Einflusses von Paraquat auf die Transkriptionsregulation verschiedener Gene müssten weitere Expressionsanalysen unter verschiedenen Bedingungen, wie veränderter Konzentration von Paraquat, durchgeführt werden. Ein weiterer Kritikpunkt der Expressionsanalyse ist der, dass hierbei das mRNA-Niveau zum fixem Zeitpunkt

gemessen wird. Dabei wird außer Acht gelassen, dass die Stabilität der mRNA unter verschiedenen Bedingungen variiert und der Schluss vom RNA-Niveau auf die Transkriptionsrate deshalb nicht immer genau ist.

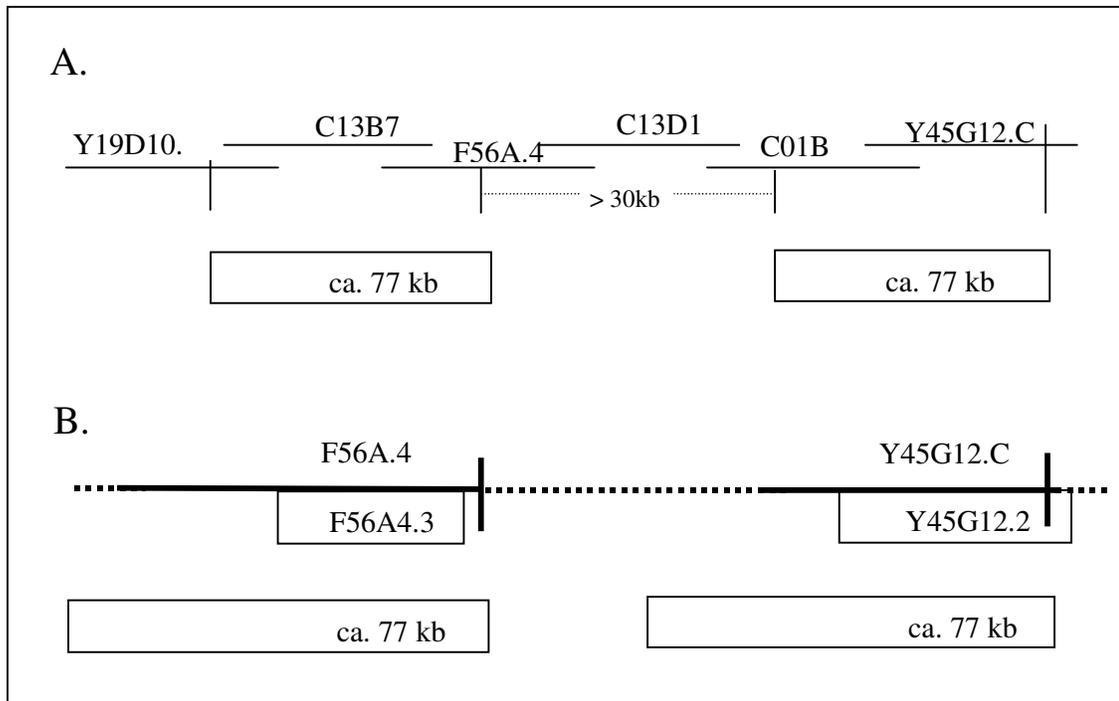
#### **4.9 Gewebsspezifische Expression der *Ce-F56A4.H***

Es wurden Reporterkonstrukte des *Ce-F56A4.H*-Gens erstellt. Die Analyse der transgenen Nematoden zeigte eine GFP-Expression innerhalb der Neuronen, speziell der Neuronensomata. Obwohl bereits seit 1975 durch die Elektronenmikroskopie eine komplette Strukturanalyse der im Vorderkörper befindlichen sensorischen Nerven durchgeführt werden konnte (Word et al. 1975), war es schwer die GFP-Expression einzelnen Neuronen zuzuordnen. *C. elegans* besitzt insgesamt 302 Neuronen (Wood 1988). Nun lässt sich die Expression von F56 allein anhand der Neuronensomata, ohne den Verlauf des Nervenstranges verfolgen zu können, dennoch mit guter Wahrscheinlichkeit auf folgende Typen an Neuronen beschränken: „quadrat outer labial“ neurons (OQL), „cephalic neurons“, „inner labial neurons“ (IL1, IL2) und „lateral outer labial neurons“ (OLL). Hierbei handelt es sich ausschließlich um sensorische Zellen, denen eine Funktion innerhalb der Chemo- und Thermotaxis zukommt (Word et al. 1975).

Mit Hilfe der vollständigen Genom-Datenbank wurde ein Identitätsvergleich gegen F56A4.3 durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine 100%-ige Übereinstimmung zum vorderen Genabschnitt dem Gen Y45G12C.2 besteht (Abbildung 21).

Die übereinstimmende Identität dieser Gene resultiert aus einer Genom-Duplikation. Der untersuchte Genabschnitt erstreckt sich über eine Länge von weit mehr als 200 kb. Darin sind zwei Genabschnitte von je 77 kb als Tandem-Duplikation angeordnet. Dazwischen befindet sich ein Einschub von > 30 kb, dessen Sequenz nur einfach vorliegt. Die genaue Sequenz dieses Einschubes ist noch nicht vollständig geklärt (Genome Sequencing Center, 1999). Das Gen F56A4.3 liegt am 3'-Ende des ersten 77 kb-Abschnittes und endet ca. 1000 bp vor dem Einschub. Für F56A4.3 wurde der kodierende Bereich mit 396 bp angegeben, eine Isolierung des kodierenden Bereiches gelang bisher noch nicht (siehe Ergebnis 3.4.2). Obwohl die Identität von F56A4.3 zu Y45G12.2 sich über den vollen genomischen Bereich von F56A4.3 erstreckt, wird für Y45G12.2 ein anderer Exon-Intron-Aufbau und ein daraus resultierender unterschiedlicher kodierender Bereich angegeben. Die Genomstruktur von Y45G12.2 weitet sich laut „Genome Sequencing Center“ über

den duplizierten Bereich hinaus aus, und das Gen erreicht eine Genlänge von ca 2.8 kb gegenüber von F56A4.3 von 444 bp. Es bleibt zu überprüfen, inwieweit sich für die mRNA von Y45G12.2 eine daraus resultierende Länge von 630 bp nachweisen lässt. Interessanterweise befindet sich stromaufwärts von F56A4.3 Gene der ORD-Familie (ORD-10). Neuere Studien hierzu zeigen, dass für den Signalweg, zur Übertragung des



**Abbildung 21. Cosmid-Anordnung**

A. Die Cosmide können anhand von überlappende Sequenzabschnitten in linearer Abfolge folgenderweise angeordnet werden: Y19D10.A, C13B7, F56A.4, C13D1, C01B4, Y45G12.C. Die Größe der Tandem-Duplication beträgt ca. 77 kb und wird durch einen Einschub von > 30bp unterbrochen.

B. Anordnung der Gene F56A4.3 und Y48G12C.2 bezogen auf dem Bereich der Gen-duplikation

chemo-sensorischen Reizes, ein sogenannter „odorant specific transmembran receptor“ (ORD-10) sowie ein „cyclic nucleotide gated channel“ (TAX -4/TAX-2) benötigt werden (Mori 1999). ORD-10 ist ein G-protein-gekoppelter Rezeptor, der in der Membran von olfaktorischen Neuronen vorliegt. Obwohl vermutet wird, dass bei *C. elegans* ein hoher Prozentsatz an Genen, ca. 25 % der Gesamt-RNA, in sogenannten polycistronischen Einheiten vorliegen (Blumenthal 1995; Blumenthal und Spieth 1996), ließe sich eine vermutlich gemeinsame zellspezifische Expression, der Gene F56A4.3 und ORD-10, nicht

durch die Regulation eines einzigen Promotors erklären. Die mehrfache Beschreibung von Genen, die polycistronisch reguliert werden, zeigt, dass eine Anordnung von Clustern vorliegt, in denen die Gene in einem geringen Abstand von 100- 300 bp in gleicher Orientierung vorliegen (Spieth et al. 1993). Zwar liegen innerhalb des Genomabschnitts, Cosmid C13B7 bis F56A4, die Gene F56A4.3 und ORD-10 in gleicher Orientierung vor, befinden sich aber weit mehr als 10 kb von einander entfernt. Für eine polycistronische Transkription müsste daher ein mRNA-Molekül eine bisher in der Literatur nicht beschriebene Länge von mehr als 10kb ausmachen. Es wäre daher wahrscheinlicher, dass diese Gene durch ähnliche Promotoren gesteuert werden und hierdurch eine Expression in den selben Zellen ermöglicht wird.

### 3. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit werden erstmals die transkriptionelle Regulation der Glutathion-S-Transferasen von *O. volvulus* bearbeitet.

Aus einer *O. volvulus*- $\lambda$ -Zap-Bibliothek wurden die fast vollständigen Klone zweier Isoformen der *OvGST1* isoliert. Zur Klärung der Genstruktur wurden fehlende 5'- und 3'-Bereiche der *OvGST1*-Klone, die im Folgenden als *OvGST1a* und *OvGST1b* benannt werden, durch weitere Screening einer EMBL3-Bibliothek von *O. volvulus* ermittelt. Beide Gene besitzen eine Größe von ca. 3kb und zeigen einen übereinstimmenden Genomaufbau mit sieben Exons. Die Introns sind um die 100 bp groß, außer das Intron II, welches bei beiden Genen über 1,6 kb groß ist. Die *OvGST1a* besitzt gegenüber der *OvGST1b* drei zusätzliche Insertionen im Intron II und mehrere Punktmutationen, die über die ganze Genomsequenz verteilt sind. Die Sequenzidentität der Gene liegt im Bereich von 97-99% mit Ausnahme im Intron II; hier ist eine Sequenzidentität von nur 92% vorhanden. Zur Ermittlung der Transkriptionsstartpunkte wurde die Methode des „Primerextension“ sowie das „rapid amplification of cDNA ends (RACE)“-Verfahren eingesetzt. Beide Verfahren zeigten übereinstimmend, dass für *OvGST1a* und *OvGST1b* mehrere Transkriptionsstartpunkte vorliegen. Dem gegenüber wurde für die *Ov-GST2* ein einzelner Startpunkt für die Transkription ermittelt.

Die Funktionalität der Promotoren wurde im „Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay“ ermittelt. Die Analyse zeigte, dass die Expression der Luciferase durch den *Ov-GST1a*-Promotor ca. 30-fach, durch den *Ov-GST1b*-Promotor ca. 15-fach und durch den *Ov-GST2*-Promotor ca. 8-fach höher als die Hintergrundaktivität ist. Es konnten *cis*-regulatorischen Elemente bestimmt werden, die die Expression der Glutathion-S-Transferasen von *O. volvulus* beeinflussen. Im „gel-Shift-Assay“ wurde gezeigt, dass bereits zwei Nukleotidaustausche A→G(-572) und G→A(-564) bzw. A→T(-573) und T→G(-560) eine DNA-Protein-Bindung aufheben können. Anhand beider Methoden, „Gel-shift-Assay“ sowie „Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay“, gelang es, den DNA-Bereich des *cis*-Elements auf neun Nukleotide einzuschränken.

Insbesondere interessierte die Frage, ob Chemikalien des Fremdstoffmetabolismus, sowie des oxidativen Stresses einen Einfluss auf die Promotoraktivität ausüben. Ein Einfluss der Chemikalien 3-Methylcholantren, Phenobarbital, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, trans-2-Octenal und 4-Hydroxy-trans-2-nonenal konnte mittels „Dual-Luciferase-Reportere-Gen-Assay“ nicht festgestellt

werden. Eine Induzierbarkeit durch diese Chemikalien bleibt durch andere Verfahren zu untersuchen.

Die stadien- und gewebespezifische Expression der *Ov*-GST2 wurde an Modellnematoden *C. elegans* mittels „green fluorescent protein (GFP)“-Fusionskonstrukte charakterisiert. Es ist bereits eine GFP-Expression im Embryon Ei erkennbar. Sie lässt sich ab dem Larvalstadium L1 den intestinalen Zellen zuordnen. Insbesondere im Hermaphroditen zeigte sich zudem eine GFP-Expression in den Exkretionsdrüsen.

Zur Untersuchung von Glutathion-S-Transferasen, welche sich gezielt durch Paraquat induzieren lassen, wurden *C. elegans*-Kulturen verwendet. Eine durch „Microarray“-vorgenommene genomweite Analyse zeigte, dass eine veränderte Expression mit Paraquat-gestressten Genen vorlag. Die Analyse der durch Paraquat regulierten Glutathion-S-Transferasen führte schließlich zur Untersuchungen an der Glutathion-S-Transferase *Ce*-F56A4.H. Für *Ce*F56A4.H konnte durch GFP-Fusionskonstrukte eine neuronenspezifische Expression festgestellt werden.

#### 4. Literaturverzeichnis

Albertson, D.G. und Thomson, J.N. (1976). The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 27, 299-325.

Aird, W.C., Parvin, J.D., Sharp, P.A. und Rosenberg, R.D. (1994). The interaction of GATA-binding proteins and basal transcription factors with GATA box-containing core promoters. A model of tissue-specific gene expression. J. Biol. Chem. 269, 883-889.

Balloul, J.M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., Cavallo, D., Lecocq, J.P. und Capron, A. (1987). Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. Nature 326, 149-153.

Blackburn, A.C., Woollatt, E., Sutherland, G.R. und Board, P.G. (1998). Characterization and chromosome location of the gene GSTZ1 encoding the human zeta class glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase. Cytogenet. Cellgenet. 83, 109-114.

Blaxter, M. und Bird, D. (1997). Parasitic nematodes. In: *C. elegans* II Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J. und Pries, J.R. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1-22.

Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraeta, A., Vanfletern, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.L., Vida, J.T. und Thomas, W.K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum nematoda. Nature 392, 71-75.

Blumenthal, T. (1995). Trans-splicing and polycistronic transcription in *Caenorhabditis elegans*. Trends. Genet. 11, 132-136.

Blumenthal, T. und Spieth, J. (1996). Gene structure and organization in *Caenorhabditis elegans*. Curr. Opin. Genet. Dev. 6, 692-698.

Bock, K.W., Lipp, H.P. und Bock-Henning, B.S. (1990). Induction and drug-metabolizing enzymes by xenobiotics. Xenobiotica. 20, 1101-1111.

Borlak, J. und Thum, T. (2001). Induction of nuclear transcription factors, cytochrome P450 monoxygenases, and glutathione S-transferase alpha gene expression in Aroclor 1254-treated rat hepatocyte cultures. Biochem. Pharmacol. 61, 145-153.

Boryslawski, M., Garrod, A.C., Person, J.T. und Woodhead, D.V. (1989). Elevation of glutathione S-transferase activity as a stress response to organo chlorine compounds, in the fresh water mussel, *Sphaerium corneum*. Marine Environ. Res. 84, 101-104.

Boyer, T.D. (1989). The glutathione S-transferase: An update. Hepatology 3, 486-496.

Brindley, P.J. (1994). Drug resistance to schistosoma and other anthelmintics of medical significance. Acta Trop. 56, 213-231.

- Britton, C., McKerrow, J.H. und Johnstone, I.L. (1998). Regulation of the *Caenorhabditis elegans* gut cysteine protease gene *cpr-1*: Requirement for GATA motifs. *J. Mol. Biol.* 283,15-27.
- Broeks, A., Janssen, H.W., Calafat, J. und Plasterk, R.H. (1995). A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins. *EMBO J.* 14, 1858-1866.
- Brophy, P.M., Crowley, P. und Barrett, J. (1990). Relative distribution of glutathione transferase, glyoxalase I and glyoxalase II in helminths. *Int. J. Parasitol.* 20, 259-261.
- Brophy, P.M. und Pritchard, D.I. (1994). Parasitic helminth glutathione S-transferases: An update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. *Exp. Parasitol.* 79, 89-96.
- Burczynski, M.E., Sridhar, G.R., Palackal, N.T. und Penning, T.M. (2000). The reactive oxygen species Michael acceptor-inducible human aldo-keto reductase AKR1C1 reduces the alpha, beta-unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal to 1,4-dihydroxy-2-nonenone. *J. Biol. Chem.* 276, 2890-2897.
- Chen, Y.H. und Ramos, K.S.A. (2000). CCAAT/enhancer-binding protein site within antioxidant/electrophile response element along with CREB-binding protein participate in the negative regulation of rat GST-Ya gene in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 275, 27366-27376.
- Cioli, D., Pica-Mattocchia, L. und Archer, S. (1993). Drug resistance to schistosomes. *Parasitol. Today* 9, 162-166.
- Coggan, M., Whitebread, L., Whittington, A. und Board, P. (1998). Structure and organization of the human theta class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. *Biochem. J.* 334, 617-623.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. und Hsu, L. (1972). Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2100-2114.
- Cook, G.A. und Park, E.A. (1999). Expression and regulation of carnitine palmitoyl-transferase-Ialpha and Ibeta genes. *Am. J. Med. Sci.* 318, 43-48.
- Da' Dara, A.A., HenkleDührsen, K. und Walter, R.D. (1996). A novel trans-spliced mRNA from *Onchocerca volvulus* encodes a functional S-adenosylmethione decarboxylase. *Biochem. J.* 320, 519-530.
- Dalley, B. und Golomb, M. (1992). Gene expression in the *Caenorhabditis elegans* dauer larva: Developmental regulation of Hsp90 and other genes. *Dev. Biol.* 151, 80-90.
- Daniel, V., Sarid, S., Bar-Nun, S. und Litwack, G. (1983). Rat ligand in mRNA molecular cloning and sequencing. *Arch. Biochem. Biophys.* 227, 266-271.

- Davis, R.E., Parra, A., LoVerde, P.T., Ribeiro, E., Glorioso, G. und Hodgson, S. (1999). Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8687-8692.
- DeJong, J.L., Morgenstern, R., Jornvall, H., De Pierre, J.W. und Tu, C.-P.D. (1988a). Gene expression of rat and human microsomal glutathione S-transferases, *J. Biol. Chem.* 263, 8430-8436.
- DeJong, J.L., Chang, C.M., Whang-Peng, J., Knutsen, T. und Tu, C.-P.D. (1988b). The human liver glutathione S-transferase gene superfamily: Expression and chromosome mapping of an Hb subunit cDNA. *Nucleic Acids Res.* 16, 8541-8554.
- Dension, M.S., Fisher, J.M. und Whitlock, J.P.Jr. (1988). Inducible, receptor-dependent protein-DNA interactions at a dioxin-responsive transcriptional enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2528-2532.
- De Silva, N., Guyatt, H. und Bundy, D. (1997). Anthelmintics. A comparative review of their clinical pharmacology. *Drugs* 53, 7869-7888.
- Diccianni, M.B., Imagawa, M. und Muramatsu, M. (1992). The dyad palindromic glutathione transferase P enhancer binds multiple factors including AP1. *Nucleic Acids Res.* 20, 5153-5158.
- Ding, V.D.-H. und Pickett, C.B. (1985). Transcription regulation of rat liver glutathione S-transferase genes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Arch. Biochem. Biophys.* 240, 553-559.
- Ding, G.J., Lu, A.Y. und Pickett, C.B. (1985). Rat liver glutathione S-transferases. Nucleotide sequence analysis of a Yb1 cDNA clone and prediction of the complete amino acid sequence of the Yb1 subunit. *J. Biol. Chem.* 260, 13268-13271.
- Döngens, J. (1988). *Parasitologie*. 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York.
- Douch, P.G.C. und Buchanan, L.L. (1979). Glutathione conjugation of some xenobiotics by *Ascaris suum* and *Moniezia expansa*. *Xenobiotica* 8, 171-176.
- Eaton, D.L. und Bammler, T.K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.* 49, 156-164.
- Eckelt, V.H.O., Liebau, E., Walter, R.D. und Henkle-Dührsen, K. (1998). Primary sequence and activity analysis of a catalase from *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 95, 203-214.
- Edwards, R., Dixon, D.P. und Walbot, V. (2000). Plant glutathione S-transferase enzymes with the multiple function in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 585, 193-198.
- English, N., Hughes, V. und Wolf, C.R. (1996). Induction of cytochrome P-450 BM-3 (CYP 102) by non-steroidal anti-inflammatory drugs in *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* 316, 279-283.

- Fan, W., Trifiletti, R., Cooper, T. und Norris, J.S. (1992). Cloning of a mu class glutathione S-transferase gene and identification of the glucocorticoid regulatory domains in its 5'-flanking sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6104-6108.
- Feaver, W.J., Huang, W. und Friedberg, E.C. (1999). The TFB4 subunit of yeast TFIIH is required for both nucleotide excision repair and RNA polymerase II transcription. *J. Biol. Chem.* 274, 29564-29567.
- Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Bardwell, L., Bardwell, A.J., Burtowski, S., Gulyas, K.D., Donahue, T.F., Friedberg, E.C. und Kornberg, R.D. (1993). Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair. *Cell* 75, 1379-1387.
- Feaver, W.J., Henry, N.L., Wang, Z., Wu, X., Svejstrup, J.Q., Bushnell, D.A, Friedberg, E.C. und Kornberg, R.D. (1997). Genes for Tfb2, Tfb3 and Tfb4 subunits of yeast transcription/repair factor IIIH. Homology to human cyclin-dependent kinase activating kinase and IIIH subunits. *J. Biol. Chem.* 272, 19319-19327.
- Franz, M. und Büttner, D.W. (1983). The fine structure of adult *Onchocerca volvulus*. The digestive tract and the reproductive system of the female worm. *Tropenmed. Parasit.* 34, 155-161.
- Fujii-Keriyama, Y., Imataka, H., Sogawa, K., Yasumoto, K.I. und Kiguchi, Y. (1992). Regulation of CypA1 expression. *FASEB J.* 6, 706-710.
- Fujisawa-Sehara, A., Sogawa, K., Nishi, C. und Fujii-Kuriyama, Y. (1986). Regulatory DNA elements localized remotely upstream from the drug-metabolizing cytochrome P450 gene. *Nucleic Acid Res.* 14, 1465-1477.
- Fujisawa-Sehara, A., Yamane, M. und Fujii-Kuriyama, Y. (1988). A DNA-binding factor specific for xenobiotic responsive elements of P-450c gene exists as a cryptic form in cytoplasm: It's possible translocation to nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5859-5863.
- Fukushima, T., Yamada, K., Isobe, A., Shiwaku, K. und Yamane, Y. (1993). Mechanism of cytotoxicity of paraquat. I. NADH oxidation and paraquat radical formation via complex. *J. Exp. Toxic. Pathol.* 45, 345-349.
- Gonzalez, F.J. und Nebert, D.W. (1985). Autoregulation plus upstream positive and negative control regions associated with transcriptional activation of the mouse P1-450 gene. *Nucleic Acid Res.* 13, 7269-7288.
- Hatayama, I., Yamada, Y., Tanaka, K., Ichihara, A. und Sato, K. (1991). Induction of glutathione S-transferase P-form in primary cultured rat hepatocytes by epidermal growth factor and insulin. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 807-814.
- Hayes, J.D. und Pulford, D.J. (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.

- Henkle-Dührsen, K., Eckelt, V.H.O., Wildenburg, G, Blaxter, M. und Walter, R.D. (1998). Gene structure, activity and localization of a catalase from intracellular bacteria in *Onchocerca volvulus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 9681, 69-81.
- Hörauf, A. (2000). Targeting of wolbachia endobacteria in *Litosomoides sigmodontis*: Comparison of tetracyclin with chloramphenicol, macrolides and ciprofloxacin. *Trop. Med. Int. Health* 5, 275-279.
- Holt, D.C., Lay, U., Clauke, E.D., Dinsmore, A., Jepson, I., Bright, S.W.J. und Greenland, A.J. (1995). Characterization of the safener-induced glutathione S-transferase isoform II from maize. *Planta* 395-402.
- Inskip A., Elexperu-Camiruaga, J., Buxton, N., Dias, P.S., MacIntosh, J., Campbell, D., Jones, P.W., Yengi, L., Talbot, J.A., Strange, R.C. und Fryer, A.A. (1995). Identification of poly-morphism at the glutathione S-transferase, GSTM3 locus: Evidence of linkage with GSTM1\*A. *Biochem. J.* 312, 713-716.
- Jacoby, W.B., Bend, J.R. und Cadwell, J. (eds.) (1983). *Metabolic basis of detoxification*, Academic Press 1-375.
- Jaitovitch-Groisman, I., Fotouhi-Ardakani, N., Schechter, R.L., Woo, A., Alaoui-Jamali, M.A. und Batist, G. (2000). Modulation of glutathione S-transferase alpha by hepatitis B virus and the chemopreventive drug oltipraz. *J. Biol. Chem.* 275, 33395-33403.
- Jakobsson, P.J., Thoren, S., Morgenstern, R. und Samuelsson, B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. USA* 96, 7220-7225.
- Jepson, I., Lay, V.J., Holt, D.C, Bright, S.W.J. und Greenland, A.J. (1994). Cloning and characterization of maize herbicide safener induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isoforms I, II and IV. *Plant Mol. Biol.* 26, 1855-1866.
- Kalinyak, J.E. und Tayler, J.M. (1982). Rat glutathione S-transferase. Cloning of double-stranded cDNA and induction of its mRNA. *J. Biol. Chem.* 275, 523-530.
- Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., Fujii, Y., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y. und Hayaishi, O. (1997). Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell* 90, 1085-1095.
- Kilwinski, J., Baak, M., Heiland, S. und Knippers, R. (1995). Transcription factor Oct1 binds to the AT-rich segment of the simian virus 40 replication origin. *J. Virol.* 69, 575-578.
- Kohler, P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int. J. Parasitol.* 3184, 336-345.
- Kramer, J.M., Cox, G.N. und Hirsh, D. (1985). Expression of the collagen genes col-1 and col-2 is developmentally regulated. *J. Biol. Chem.* 260, 1945-1951.

- Krinsky, N.I. (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200, 248-254.
- Krishna, D.R. und Klotz, U. (1994). Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin. Pharmacokinet.* 26, 144-160.
- Lacey, E. und Gill, J.H. (1994). Biochemistry of benzimidazole resistance. *Acata Trop.* 56, 245-262.
- Lai, H.-C. J., Li, N.-Q., Weiss, M.J., Reddy, C.C. und Tu, C.-P.D. (1984). The nucleotide sequence of a rat liver glutathione S-transferase subunit cDNA clone. *J. Biol. Chem.* 259, 5536.
- Lai, H.-C.J., Quian, B., Grove, G. und Tu, C.-P.D. (1988). Gene expression of rat glutathione S-transferases. Evidence for the gene conversion in the evolution of the Y<sub>b</sub> multigene family. *J. Biol. Chem.* 263, 11389-11395.
- Lakich, M.M., Diagana, T.T., North, D.L. und Wahlen, R.G. (1989). MEF-2 und Oct-1 bind to the homologous promoter sequence element and participate in the expression of a skeletal muscle-specific gene. *J. Biol. Chem.* 273, 15217-15226.
- Landers, J.P. und Bunce, N.J. (1991). The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity. *Biochem. J.* 276, 273-287.
- Lekstrom-Himes, J. und Xanthopoulos, K.G. (1998). Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of the transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273, 28545-28548.
- Larsen, P.L. (1993). Aging resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8905-8909.
- Lerche, C., Fautrel, A., Shaw, P.M., Glaise, D., Ballet, F., Guilouzo, A. und Corcos, L. (1997). Regulation of the major detoxification functions by phenobarbital and 3-methylcholanthrene in co-cultures of rat hepatocytes and liver epithelial cells. *Eur. J. Biochem.* 244, 98-106.
- Leuckart, F.R. (1893). *Filaria volvulus*. In Andrew Hope Davidson's hygiene diseases of warm climates, Young J. Peutland, London. Nachgedruckt in Kean, B.H., K.E. Classic investigations, vol. 2, Cornell University Press, Ithaca and London (1978).
- Liebau, E., Wildenburg, G., Walter, R.D. und Henkle-Dührsen, K. (1994a). A novel type of glutathione S-transferase in *Onchocerca volvulus*. *Infect. Immun.* 62, 4762-4767.
- Liebau, E., Wildenburg, G., Brophy, P.M., Walter, R.D. und Henkle-Dührsen, 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., Walter, R.D. und Henkle-Dührsen K. (1994b) *Onchocerca volvulus*: Isolation and sequence of a second glutathione S-transferase cDNA. *Exp. Parasitol.* 79, 68-71.

- Liebau, E., Walter, R.D. und Henkle-Dührsen, K. (1994c). Isolation, sequence and expression of an *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase cDNA. Mol. Biochem. Parasitol. 63, 305-309.
- Liebau, E., Eschbach, M.L., Tawe, W., Sommer, A., Fischer P., Walter, R.D. und Henkle-Dührsen, K. (2000). Identification of a stress-responsive glutathione S-transferase (Ov-GST3) by RT-PCR differential display. Mol. Biochem. Parasitol. 109, 101-110.
- Listowski, I. (1993). Glutathione S-transferases: Intracellular binding, detoxification and adaptive responses. In: Hepatic transport and bile secretion: Physiology and pathophysiology, ed. by N. Tavoloni and D. Berk pp. 397-405.
- Liu, Z., Kirch, S. und Ambros, V. (1995). The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene pathway controls stage-specific transcription of collagen genes. Development 121(8), 2471-2478.
- Liu, J., Chen, H., Miller, D.S., Saavedra, J.E., Keefer, L.K., Johnson, D.R., Klaassen, C.D. und Waalkes, M.P. (2001). Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. Mol. Pharmacol. 60, 301-309.
- Lui, J.L.J., Fontaine, A., Capron, J.M. und Grzych, A. (1996). Ultrastructural localization of Sm28GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. Parasitology 113, 377-391.
- Mannervik, B. (1985). The isoenzymes of glutathione transferase. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 5, 357-417.
- Marthinet, E., Divita, G., Bernaud, J., Rigal, D. und Bagetto, L.G. (2000). Modulation of the typical resistance by targeting the MED-1 region of human MDR1 promoter. Gene Ther. 7, 1224-1233.
- Marx, J.L. (1984). *Caenorhabditis elegans*: Getting to know you. Science 225, 40-42.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. und Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. 17, 235-248.
- Mori, I. (1999). Genetics of chemotaxis and thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Annu. Rev. Genet. 399-422.
- Morton, M.R., Bayney, R.M. und Pickett, C.B. (1990). Isolation and characterization of the rat glutathione S-transferase Yb<sub>1</sub> subunit gene. Arch. Biochem. Biophys. 277, 56-60.
- Munir, W.A. und Barrett, J. (1985). The metabolism of xenobiotic compounds by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea). Parasitology. 91, 145-156.
- Nebert, D.W. und Gonzales, F.J. (1987). P-450 genes: Structure, evolution and regulation. Annu. Rev. Biochem. 56, 945-993.

Nelson, F.K., Albert, P.S. und Riddle, D.L. (1983). Fine structure of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system. *J. Ultrastruct. Res.* 82, 156-171.

Nelson, F.K. und Riddle, D.L. (1984). Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery. *J. Exp. Zool.*, 231, 45-56.

Neuhold, L.A., Shirayoshi, Y., Ozato, K., Jones, J.E. und Neubert, D.W. (1989). Regulation of mouse CYPa1 gene expression by Dioxin: Requirement of two cis-acting elements during induction. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2378-2386.

Nuhn, P. (1993). The biochemical basis of toxic actions of drugs and other xenobiotics. *Pharm. Unserer Zeit* 22, 119-133.

O' Prey, J., Ramsay, S., Chambers, I. und Harrison, P.R. (1994). Transcriptional up-regulation of the mouse cytosolic glutathione peroxidase gene in erythroid cells is due to a tissue-specific 3' containing functionally important CACC/GT motifs and binding for GATA and Ets transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 14, 868.

Okuda, A., Sakai, M. und Muramatsu, M. (1987). The structure of the rat glutathione S-transferase P gene and related pseudogenes. *J. Biol. Chem.* 262, 3858-3863.

Ogura, K., Nishiyama, T., Hiratsuka, A. und Watabe, T. (1994). Isolation and characterization of the gene encoding rat class theta glutathione S-transferase subunit yrs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1250-1256.

Paulson, K.E., Darnell, J.E.Jr., Rushmore, T.H. und Pickett, C.B. (1990). Analysis of the upstream elements of the xenobiotic compound-inducible and positionally regulated glutathione S-transferase Ya gene. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1841-1852.

Pearson, W.R., Vorachek, W.R., Xu, S.-J., Berger, R., Hart, I., Vannis, D. und Patterson, D. (1993). Identification of class-mu glutathione S-transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1 p 13. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 220-233.

Penrose, J.F., Spector, J., Baldasaro, M., Xu, K., Boyce, J., Arm, J.P., Austen, K.F. und Lam, B.K. (1996). Molecular cloning of the gene for human leukotriene C4 synthase. Organization, nucleotide sequence, and chromosomal localization to 5q35. *J. Biol. Chem.* 271, 11356-11361.

Poellinger, L., Göttlicher, M. und Gustafsson, J.A. (1992). The dioxin and peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear receptors in search of endogenous ligands. *Trends Pharm. Sci.* 13, 241-245.

Poland, A. und Knutson, J.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22, 517-554.

Precious, W.Y. und Barrett, J. (1989a). The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths. *Biochim. Biophys. Acta* 992, 215-222.

Precious, W.Y. und Barrett, J. (1989b). Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitol. Today* 5, 156-161.

- Reinhart, J. und Pearson, W.R. (1993). The structure of two murine class-mu glutathione S-transferase genes coordinately induced by butylated hydroxyanisole. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 383-393.
- Pritchard R. (1994). Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 54, 259-268.
- Richter, D., Incani, R.N. und Harn, D.A. (1993). Isotype response to candidate vaccine antigens in protective sera obtained from mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* 61, 3003-3011.
- Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J. und Priess, J.R. (1997). Introduction to *C. elegans*. In: *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1-22.
- Rothkopf, G.S., Telakowski-Hopkins, C.A., Stotish, R.L. und Pickett, C.B. (1986). Multiplicity of glutathione S-transferase genes in the rat and association with a type 2 Alu repetitive element. *Biochemistry* 25, 993-1002.
- Roos, M.H. (1997). The role of drugs in the control of parasitic nematode infections: Must we do without? *Parasitology* 114 Suppl, 137-144.
- Rozen, F., Nguyen, T. und Pickett, C.B. (1992). Isolation and characterization of the human glutathione S-transferase ha1 subunit gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 589-593.
- Rushmore, T.H., King, R.G., Paulson, K.E. und Pickett, C.B. (1990). Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: Identification of a unique xenobiotic-response element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3826-3839.
- Rushmore, T.H., Morton, M.R. und Pickett, C.B. (1991). The antioxidant response element. *J. Biol. Chem.* 266, 11632-11639.
- Salinas, A.E. und Wong, M.G. (1999). Glutathione S-transferases - A Review. *Curr. Med. Chemistry* 6, 279-309.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: Laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nickelen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Schierenberg, E. und Cassada, R. (1986). Der Nematode *Caenorhabditis elegans* – Ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus. *Biologie in unserer Zeit* 1, 1-7.
- Sulston, J. und Hodgkin, J. (1988). In: *The nematode Caenorhabditis elegans*. Wood, W.B. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 587-606.
- Schulz-Key, H., Albiez, E.J. und Büttner D.W. (1977). Isolation of living adult *Onchocerca volvulus* from nodules. *Tropenmed. Parasitol.* 28, 428-430.

- Seidegard, J., Vorachek, W.R., Pero, R.W. und Person, W.R. (1988). Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. Proc. Natl. Acad. USA 85, 7293-7297.
- Serra, E., Zemzoumi, K., di Silvio, A., Mantovani, R., Lardans, V. und Dissous, C. (1998). Conservation and divergence of NF-Y transcriptional activation function. Nucleic Acids Res. 26, 3800-3805.
- Sexton, J.L., Milner, A.R., Panaccio, M., Waddington, J., Wiffels, G., Chandler, D., Thompson, C., Wilson L., Spithill, T.W. und Mitchell, G.F. (1990). Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. J. Immunol. 145, 3905-3910.
- Smith, D.B, Davern, K.M, Board, P.G, Tiu, W.U, Garcia, E.G. und Mitchell, G.F. (1986). Mr 26,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 1297J mice is a parasite glutathione S-transferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8703-8707.
- Spieth, J., Brooke, G., Kuersten, S., Lea, K. und Blumenthal, T. (1993) Operons in *C. elegans*: Polycistronic mRNA precursors are processed by trans-splicing of SL2 to downstream coding regions. Cell 73, 521-532.
- Stanulla, M., Schrappe, M., Müller-Brechlin, A., Zimmermann, M. und Welte, K. (2000). Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: A case-control study. Blood 95, 1222-1228.
- Suzuli, T., Johnston, P.N. und Broad, P.G. (1993). Structure and organization of the human alpha class glutathione S-transferase genes and related pseudogenes. Genomics 18, 680-686.
- Tagboto, S.K. und Townson, S. (1996). *Onchocerca volvulus* and *O. lienalis*: The microfilaricidal activity of moxidectin with that of ivermectin *in vitro* and *in vivo*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 90, 497-505.
- Taniguchi, H. und Pyrein, W. (1989). Glutathione S-transferase is an *in vitro* substrate of Ca<sup>++</sup>-phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C). Biochem. Biophys. Res. Commun. 162, 903-907.
- Tawe, W., Walter, R.D. und Henkle-Dührsen, K. (2000). *Onchocerca volvulus* superoxide dismutase genes: Identification of functional promoters for pre-mRNA transcripts which undergo trans-splicing. Exp. Parasitol. 94, 172-179.
- Taylor, J.B., Vidal, A., Torpier, G., Meyer, D.J., Roitsch, C., Balloul, J.M., Southan, C., Sondermeyer, P., Pemple, S., Lecoq, J.P., Capron, A. und Ketterer, B. (1988). The glutathione S-transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. EMBO J. 7, 465-472.
- Telakowski-Hopkins, C.A., Rothkopf, G.S. und Pickett, C.B. (1986). Structural analysis of rat liver glutathione S-transferase Ya gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9393-9397.

- Tew, K.D, O'Brien, M., Laing, N.M und Shen, H. (1998). Coordinate changes in expression of protective genes in drug-resistant cells. *Chem. Biol. Interact.* 24, 199-211.
- Tracy, J.W. und Vande Waa, E.A. (1995). Xenobiotic metabolism. In: *Biochemistry and molecular biology of parasites* (eds. Marr, J.J. and M. Müller) Academic Press, 161-175.
- Trottein, F., Kieny, M.P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R.J., Balloul, J.M., Schmitt, D., Lecocq, J.P. und Capron, A. (1990). Molecular cloning and tissue distribution of a 26-kilodalton *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41, 35-44.
- Tu, C.P.D., Lai, H.-C.J., Li, N.-Q., Weiss M. J. und Reddy C.C. (1984). The Yc and Yb subunit of rat liver glutathione S-transferases are the products of separate genes. *J. Biol. Chem.* 259, 9434-9439.
- Ullrich, O., Reinheckel, T., Sitte, N., Hass, R., Grune, T. und Davies, K.J. (1999). Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6223-6228.
- Unnasch, T.R. und Williams, S.A. (2000). The genomes of *Onchocerca volvulus*. *Int. J. Parasitol.* 30, 543-552.
- Van Leathem, Y. und Lopes, C. (1996). Treatment of onchocerciasis. *Drugs* 52, 861-869.
- Vibanco-Perez, N. und Landa-Piedra, A. (1998). Glutathione S-transferase in helminth parasites. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 40, 73-85.
- Vore, M. (1994). Phase III elimination: Another two-edge sword. *Environ. Health Perspect.* 102, 422-423.
- Vuilleumier, S., Sorribas, H. und Leisinger, T. (1997). Identification of a novel determinant of glutathione affinity in dichloromethane dehalogenases/glutathione S-transferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 238, 452-456.
- Waterson, R.H., Sulston J.E. und Coulson, A.R. (1997). The genome. In: *C. elegans II*. Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J. und Pries J.R. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1-22.
- Ward, S., Thomson, N., White, J.G. und Brenner, S. (1975) Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Comp. Neurol.* 160, 313-337.
- Waxman, D.J., Sundseth, S.S., Srivastava, P.K. und Lapenson, D.P. (1992). Gene-specific oligonucleotide probes for  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$  and microsomal rat glutathione S-transferase: Analysis of liver transferase expression and its modulation by hepatic enzyme inducers and platinum anticancer drugs. *Cancer Res.* 52, 5797-5802.
- Whitelock, J.P.Jr. (1993). Mechanistic aspects of dioxin action. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 754-763.

- Wijffels, G.L., Sexton, J.L., Salvatore, L., Pettitt, J.M., Humphris, D.C., Panaccio, M. und Spithill, T.W. (1992). Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathione S-transferases of *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* 74, 87-99.
- Wildenburg, G., Liebau, E. und Henkle-Dührsen, K. (1998). *Onchocerca volvulus*: Ultrastructure localisation of two glutathione S-transferases. *Exp. Parasitol.* 88, 34-42.
- Wood, W.B. (1988) Introduction to *C. elegans* biology. In: The nematode *Caenorhabditis elegans*. Wood, W.B. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1-16.
- Wu, Y., Egerton, G., Ball, A., Tanguay, R.M. und Bianco, A.E. (2000). Characterization of the heat-shock protein 60 chaperonin from *Onchocerca volvulus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 107, 155-168.
- Xia, C., Hu, J., Ketterer, B. und Taylor, J.B. (1996). The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem J.* 313, 155-161.
- Xu, X. und Stammbrook, P.J. (1994). Two murine GSTpi genes are arranged in tandem and are differentially expressed. *J. Biol. Chem.* 269, 30268-30273.
- Yamada, K. und Fukushima, T. (1993). Mechanism of cytotoxicity of paraquat II. Organ specificity of paraquat-stimulated lipid peroxidation in the inner membrane of mitochondria. *Exp. Toxic. Pathol.* 45, 375-380.
- Zhou, Z.H. und Syvanen, M. (1997). A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. *Mol. Gen. Genet.* 256, 187-194.

## Abkürzungen

Amp	Ampicillin
ARE	Antioxidant response element
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	„copy“ Desoxyribonukleinsäure
CHO	„Chinese-hamster-Ovary“-Zellen
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
dNTP	Dexoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GFP	green fluorescent protein
GRE	Glucocorticoid response element
GSH	Glutathion, $\gamma$ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin
GS-X-Transporter	Glutathion-Konjugate-Transporter
GST	Glutathion S-Transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HeLa-Zellen	„human cervic carcinoma“
kb	Kilobasen
L1-4	erstes, zweites, drittes und viertes Larvenstadium
LB	Luria-Bertani-Medium
MAPEG	„membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism“
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NGM	„nematode growth medium“
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PGDS	Prostaglandin D Synthase
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“
ROS	„reactive oxygen species“
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N', N', N'-tetramethylethylen-diamin
WHO	World Health Organisation
XRE	Xenobiotic response element
293-Zellen	„human embryonic kidney -293 cells“

# Curriculum Vitae

## **Persönliche Daten**

Name Stephanie Krause

Geburtsdatum 06.02.1972

Geburtsort Buxtehude

## **Schulbildung**

Juni 1988 Realschulabschluss in Norderstedt

Juni 1992 Allgemeine Hochschulreife in Hamburg

## **Studium**

September 1992 bis August 1994 Vordiplom Biologie an der Heinrich Heine Universität  
Düsseldorf

August 1994 bis Juni 1997 Diplom Biologie an der Universität Hannover mit der  
Diplomarbeit „Heterologe Expression und Charak-  
terisierung des Cathepsin D Protease-Inhibitors der  
Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)“ am Insitut für  
Allgemeine Botanik der Universität Hamburg

November 1997 bis April 2001 Promotionsstudium am Bernhard-Nocht-Institut für  
Tropenmedizin in Hamburg in der Abteilung Biochemie