

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

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

Aus einer *O. volvulus*- λ -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, H₂O₂, 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 Embryo Ei erkennbar. Sie lässt sich ab dem Larval-stadium 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.