

Glutathion-abhängige Entgiftungssysteme der
Nematoden *Onchocerca volvulus* (Leukart, 1893) und
Caenorhabditis elegans (Maupas, 1900)

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

-Dr. rer. nat. -

des Fachbereichs Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Alexandra Sommer

aus Helmarshausen

Hamburg 2002

1. Einleitung	5
1.1 Nematoda	5
1.1.1. <i>Onchocerca volvulus</i>	5
1.1.2. <i>Caenorhabditis elegans</i>	7
1.2 Oxidativer Stress	10
1.2.1 Zelluläre Antioxidantien, Biotransformation und Entgiftung	11
1.2.2 Abwehrstrategien und xenobiotische Mechanismen in Helminthen.....	12
1.3 Glutathion und Glutathion-Stoffwechsel	13
1.3.1 Glutathion-abhängige Entgiftungsenzyme	13
1.3.2 Glutathion S-Transferasen	14
1.1.3 Das Glyoxylase-System	16
1.4 Zielsetzung	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Bioreagenzien und Chemikalien.....	22
2.2 Puffer und Nährmedien	23
2.3 Plasmidvektoren, Bakterienstämme, <i>C. elegans</i> Stämme	26
2.4 Biochemische Methoden	27
2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford	27
2.4.2 Präparation von 100 000 xg Überständen der Nematoden für die Proteinaufreinigung ...	27
2.4.3 Proteinaufreinigung im "Batch"-Verfahren.....	27
2.4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.4.5 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Blau.....	28
2.4.6 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	28
2.4.7 Western Blot Analyse	29
2.4.8 Immunodetektion der transferierten Proteine	29
2.4.9 Deglykosylierung der nativen <i>Ov</i> -GST1a und -1b und der <i>rOv</i> -GST1a aus <i>C. elegans</i> ...	29
2.4.10 Expression der <i>Ov</i> -GloI	30
2.4.11 Enzymkinetik der <i>rOv</i> -GloI.....	30
2.4.12 Gelfiltration.....	31
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	31
2.5.1 Plasmid-DNA Präparation	31
2.5.2 Restriktionsverdau	32
2.5.3 Ligation	32
2.5.4 Plasmidtransformation in <i>E. coli</i> -Zellen	32
2.5.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	32
2.5.6 Screening der <i>O. volvulus</i> λ -ZapII cDNA-Bank zur Isolierung von	
<i>Ov</i> -GST3 und <i>Ov</i> -GloI-Klonen.....	33
2.5.7 „In vivo Excision“ vom Phagen λ -ZapII zum Plasmidvektor	33
2.5.8 Präparation von _{gesamt} RNA von Nematoden	34
2.5.9 Radioaktive Markierung von DNA mit α -[³² P]-dATP.....	34
2.5.10 Northern Blot Analyse.....	34

2.5.11	Hybridisierung von Northern Blots mit radioaktiv-markierter DNA	34
2.5.12	Reverse Transkriptase-Reaktion	35
2.5.13	Virtuelle Northern Blot Analyse.....	35
2.5.14	Markierung von cDNA mit Digoxigenin.....	36
2.5.15	Nachweis Digoxigenin-markierter DNA auf Southern Blots	36
2.5.16	Alkalische Denaturierung von Plasmid-DNA für die Sequenzreaktion mit α -[³⁵ S]-dATP ..	37
2.5.17	Sequenzreaktion nach Sanger <i>et al.</i>	37
2.6	<i>C. elegans</i> Methoden	37
2.6.1	<i>C. elegans</i> Kulturführung	37
2.6.2	Einfrieren von <i>C. elegans</i>	38
2.6.3	<i>C. elegans</i> Aufreinigung über einen Sucrosegradienten.....	38
2.6.4	<i>C. elegans</i> Induktionsversuche	38
2.6.5	Ektopische Überexpression der <i>Ov</i> -GST1a in <i>C. elegans</i>	38
2.6.6	<i>C. elegans</i> Mikroinjektion	39
2.7	Massenspektrometrische Analysen.....	39
2.7.1	Präparation der nativen <i>Ov</i> -GST1a und -1b für die	39
	massenspektrometrische Analyse (MS).....	39
2.7.2	HPLC und "Electrospray Ionization" (ESI)-MS	39
2.7.3	"Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight" (MALDI-TOF) MS	40
2.7.4	ESI-MS/MS	40
2.7.5	Bestimmung der PGH ₂ -D ₂ Isomeraseaktivität der r <i>Ov</i> -GST1a	40
2.7.6	Prostaglandin-Extraktion und Vorbereitung für die HPLC-MS Analyse	41
2.8	Immunbiologische Methoden.....	41
2.8.1	Synthese der 17-mer Peptide der N-terminalen Verlängerung der <i>Ov</i> -GST1a	41
2.8.2	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)	42
3.	Ergebnisse	43
3.1	Analyse der <i>Ov</i>-GloI	43
3.1.1	Isolierung der cDNA der <i>Ov</i> -GloI und Northern Blot Analyse	43
3.1.2	Sekundärstrukturanalyse der <i>Ov</i> -GloI und Vergleich der abgeleiteten	44
	Aminosäuresequenz mit Glyoxylasen anderer Organismen	44
3.1.3	Rekombinante Expression der <i>Ov</i> -GloI und	47
	Bestimmung des Molekulargewichts des enzymatisch aktiven Enzyms	47
3.1.4	Bestimmung der kinetischen Konstanten und	48
	Erstellung eines Inhibitorprofils für die <i>Ov</i> -GloI	48
3.2	Untersuchungen zur <i>Ov</i>-GST1a und -1b	50
3.2.1	Analyse der N-Glykanstruktur der <i>Ov</i> -GST1a und -1b	50
3.2.1.1	Aufreinigung der nativen <i>Ov</i> -GST1a und -1b und Bestimmung des Mengen-.....	50
	verhältnisses von <i>Ov</i> -GST1a: <i>Ov</i> -GST1b in <i>O. volvulus</i>	50
3.2.1.2	Vergleich der Aminosäuresequenzen der <i>Ov</i> -GST1a und <i>Ov</i> -GST1b	52
	und Sekundärstrukturanalyse.....	52

3.2.1.3	Tryptischer Verdau der nativen <i>Ov</i> -GST1a und -1b und Zuordnung der Fragmente durch HPLC-MS Analyse	54
3.2.1.4	Analyse der N-Glykanstrukturen der <i>Ov</i> -GST durch ESI-MS und MALDI-TOF Analyse ..	56
3.2.1.5	Analyse der Verknüpfung der Mannosereste durch ESI „daughter ion“ Spektren anhand des Glykopeptids 1 der <i>Ov</i> -GST1a	58
3.2.2	Untersuchung der Antikörperantwort auf die <i>Ov</i> -GST1a und -1b anhand von Seren <i>Onchocerciasis</i> -infizierter Patienten durch ELISA	59
3.2.2.1	Vergleich der Antikörperantwort der glykosylierten und der deglykosylierten <i>Ov</i> -GST1a und -1b im ELISA	59
3.2.2.2	Analyse der Antikörperantwort auf die <i>rOv</i> -GST1a mit N-terminaler bzw. ohne N-terminale Verlängerung	61
3.2.2.3	Untersuchung der Antikörperantwort auf die N-terminale Verlängerung der <i>Ov</i> -GST1a mit <i>Onchocerciasis</i> -Patientenserum im Vergleich zu Seren von Patienten mit anderen Helmintheninfektionen	63
3.2.3	Bestimmung des physiologischen Substrats der <i>Ov</i> -GST1a und -1b	63
3.2.3.1	Analyse der Prostaglandinbildung der <i>rOv</i> -GST1a mit Prostaglandin H ₂ als Substrat ...	63
3.2.3.2	Prostaglandin D ₂ -Bildung durch die <i>rOv</i> -GST1a im gekoppelten Enzymtest mit Cyclooxygenase I	65
3.2.4.1	Expression des <i>Ov</i> -GST1a-Promotor::GFP-Reportergenkonstrukts in <i>C. elegans</i>	67
3.2.4.2	Glykosylierung der <i>Ov</i> -GST1a bei Überexpression in <i>C. elegans</i>	69
3.2.4.3	Aufreinigung der posttranslational modifizierten <i>Ov</i> -GST1a aus <i>C. elegans</i> durch Ni ²⁺ -Chelatchromatografie	70
3.3	<i>Onchocerca volvulus</i>-GST3.....	72
3.3.1	Identifizierung von 3 verschiedenen Transkripten der <i>Ov</i> -GST3	72
3.3.1.1	Isolierung der cDNA-Sequenzen der <i>Ov</i> -GST3a, -3b, -3c	72
3.3.1.2	Vergleich der isolierten cDNA-Sequenzen der <i>Ov</i> -GST3.....	72
3.3.1.3	Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der 3 mRNA-Transkripte..... der <i>Ov</i> -GST3	75
3.3.2	PCR-basierte Analyse der Genstruktur der <i>Ov</i> -GST3.....	77
3.3.2.1	Isolierung des <i>Ov</i> -GST3 Gens	77
3.3.3	Promotoranalyse der <i>Ov</i> -GST3-homologen <i>C. elegans</i> GST F13A7.10	78
3.3.3.1	Analyse der Promotorregionen des <i>Ov</i> -GST3 Homologs F13A7.10 aus <i>C. elegans</i>	78
3.3.3.2	Untersuchung des Expressionsmusters von F13A7.10 in transgenen <i>C. elegans</i>	80
3.3.4	Untersuchung der transkriptionellen Regulation der <i>Ov</i> -GST3-homologen GST aus <i>C. elegans</i>	84
3.3.4.1	Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der <i>C. elegans</i> GST K10F12.4, C29E4.7 und F13A7.10 mit der <i>Ov</i> -GST3b	84
3.3.4.2	Regulation der Transkription von K10F12.4, C29E4.7 und F13A7.10 unter oxidativen Stressbedingungen: „Virtuelle Northern Blot“ Analysen	86
4.	Diskussion.....	90
4.1	Diskussion der <i>Ov</i>-Glo1 Ergebnisse.....	90

4.1.1	Das Glyoxylase-System von <i>O. volvulus</i>	90
4.1.2	Sequenzanalyse der <i>Ov-GloI</i>	90
4.1.3	Analyse der katalytischen Eigenschaften der <i>Ov-GloI</i>	94
4.2	Diskussion der Untersuchungen der <i>Ov-GST1a</i> und <i>-1b</i>	95
4.2.1	Proteinaufreinigung, Diskussion des Mengenverhältnisses von	
	<i>Ov-GST1a</i> und <i>Ov-GST1b</i> in <i>O. volvulus</i> , Vergleich der Aminosäuresequenzen	
	und der Sekundärstruktur	95
4.2.2	Diskussion der N-Glykanstrukturen der <i>Ov-GST1a</i> und <i>-1b</i>	99
4.2.3	ELISA-Analyse zur Antigenizität der <i>Ov-GST1a</i> und <i>-1b</i>	100
4.2.4	Diskussion der Prostaglandin D ₂ -Isomeraseaktivität der <i>Ov-GST1a</i>	101
4.2.5	Analyse des Expressionsmusters der <i>Ov-GST1a</i> in <i>C. elegans</i>	104
4.2.6	Diskussion der ektopischen Expression der <i>Ov-GST1a</i> in <i>C. elegans</i>	105
4.3	Diskussion der Ergebnisse der <i>Ov-GST3</i> und der homologen GST	
	F13A4.10, C29E4.7, K10F12.4 aus <i>C. elegans</i>.....	106
4.3.1	Diskussion der 3 Transkripte der <i>Ov-GST3</i> und	
	eine Analyse ihrer Primär- und Sekundärstruktur	106
4.3.2	Diskussion der Genstruktur der <i>Ov-GST3</i>	
	im Vergleich zu den genomischen Strukturen der homologen GST in <i>C. elegans</i>	111
4.3.3	Promotoranalyse und Charakterisierung des Expressionsmusters	
	des F13A7.10-Promotor::GFP-Reportergenkonstrukts in transgenen <i>C. elegans</i>	114
4.3.4	Analyse der Aminosäuresequenzen und Regulation der Transkription von	
	K10F12.4, F13A7.10 und C29E4.7 unter Einfluss xenobiotischer Verbindungen	115
5.	Zusammenfassung.....	118
6.	Abürzungsverzeichnis	123
7.	Literaturverzeichnis	126

1. Einleitung

1.1 Nematoda

Das Phylum Nematoda gehört mit etwa 30 000 vertretenen Arten zu den vielfältigsten Gruppen des Tierreichs. Trotz ihrer einfachen Organisation besiedeln sie vielfältige Lebensräume wie feuchte Böden, Sediment, Benthos und Phyton in Salz- und Süßwasser. Im Laufe der Evolution sind einige Arten zu einer parasitischen Lebensweise übergegangen und haben als Schädlinge von Pflanzen und Tieren, sowie als Parasiten des Menschen aus ökonomischer und medizinischer Sicht an Bedeutung gewonnen. Nach dem Schlüpfen umfasst der Lebenszyklus der Nematoden vier Juvenilstadien bis zur Entwicklung des adulten geschlechtsreifen Wurms.

Die parasitischen Nematoden unterscheiden sich deutlich in den für sie typischen Lebensweisen, machen aber eine vergleichbare, oft mit einem Wirtswechsel verbundene, Entwicklung durch. Das dritte Juvenilstadium aller parasitischer Nematoden (L3) ist die Invasionslarve, welche zur Infektion des Endwirts führt. Zu den humanpathogenen, ausnahmslos obligat parasitisch lebenden Nematoden, sind vor allem die Ascariden und die Filarien zu zählen. Nach Angaben der World Health Organization (2001) sind mehr als 100 Millionen Menschen der tropischen und subtropischen Gebiete Afrikas, Asiens aber auch Latein- und Mittelamerikas mit Erregern verschiedener Formen der Filariasis infiziert. Neben subkutan persistierenden Filarien wie *Loa loa*, *Onchocerca volvulus* und *Dipetalonema streptocerca* sind vor allem die lymphatischen Filarien (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*) für die Ausprägung der unterschiedlichen Krankheitsbilder der Filariasis verantwortlich.

1.1.1. *Onchocerca volvulus*

Die systematische Einordnung der Nematoda als eigener Stamm oder als Klasse eines Phylums (Aschelminthes oder Nematelminthes) mit verschiedenen anderen, morphologisch verwandten Gruppen wie den Gastrotricha und Rotifera wird bis heute unter Taxonomen kontrovers diskutiert. Nach Hartwich lässt sich die Gruppe der Filarien zu denen die Gattung *Onchocerca* gehört, wie folgt einordnen¹:

Phylum	Nematoda
Klasse	Secernentea
Ordnung	Spiruvida
Überfamilie	Filarioidea
Familie	Onchocercidae

Die Gattung *Onchocerca* gehört zur Überfamilie der obligat parasitisch lebenden Filarien. Die verschiedenen *Onchocerca*-Arten werden von Kriebelmücken (Familie: Simuliidae) und Gnitzen (Familie: Ceratopogonidae) auf den Endwirt übertragen. Nur die Art *O. volvulus* parasitiert im Menschen und ist als Erreger der Flussblindheit oder Onchocercose bekannt. *Onchocerca*-Infektionen kommen fast ausschließlich in Afrika vor. Als 1875 die als Mikrofilarien bezeichneten Juvenilstadien von *O. volvulus* in der Haut entdeckt wurden, hat man sie zwar mit dem Krankheitsbild der Flussblindheit in Verbindung gebracht, die adulten Würmer wurden jedoch erst 1893 von Leuckart entdeckt. Die *O. volvulus* Weibchen haben einen Durchmesser von etwa 0,4 mm und werden bis zu 80 cm lang. Die Männchen hingegen sind nur 3 – 5 cm lang. Die Onchocercome befinden sich im subkutanen Gewebe der Haut, enthalten zumeist 1 – 3 Weibchen sowie 1 oder 2 männliche Würmer und erreichen damit z. T. einen Durchmesser von 6 cm. In drei oder vier zyklischen Fortpflanzungsperioden pro Jahr entlassen die viviparen Weibchen jeweils 200 000 bis 400 000 Mikrofilarien, die in der Haut umherwandern. Die Lebensdauer der adulten Würmer wird auf 10 bis 15 Jahre geschätzt, die Mikrofilarien leben etwa 2 Jahre, wenn sie nicht von einer Kriebelmücke aufgenommen werden. Nach Aufnahme der Mikrofilarien während einer Blutmahlzeit der Kriebelmücke wandern diese im Überträger durch die Darmwand in die Thoraxmuskulatur ein und entwickeln sich dort über das 2. Juvenilstadium (L2) zum dritten Juvenilstadium (L3). Die Invasionslarve wandert in den Kopf der Mücke ein und wird so bei der nächsten Blutmahlzeit auf den Menschen übertragen. Die Weiterentwicklung im Menschen über das 4. Juvenilstadium bis zum adulten geschlechtsreifen Wurm dauert etwa 1 Jahr (Abb. 1.1.1.A). Die in der Folge freigesetzten Mikrofilarien werden für die meisten der Krankheitsbilder der Onchocerciasis verantwortlich gemacht.

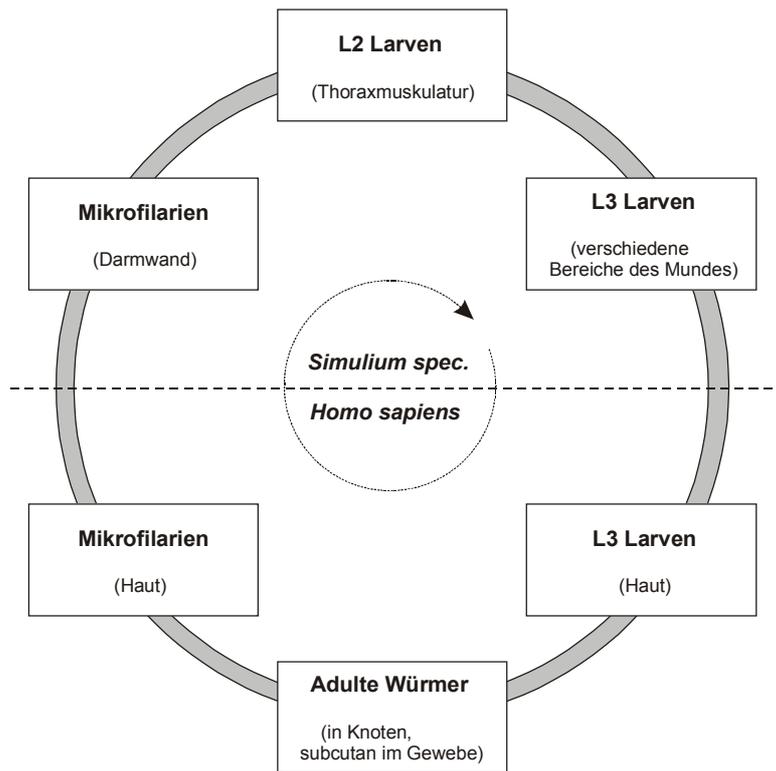


Abb. 1.1.1.A *Onchocerca volvulus* Lebenszyklus

Neben der namensgebenden Erblindung durch Einwanderung von Mikrofilarien in die Augen, sind vor allem dermatologische Erkrankungen, verbunden mit Sekundärinfektionen, die Folge. Zur Eindämmung der Onchocerciasis sind aufgrund fehlender makrofilarizider Medikamente bisher 2 Strategien verfolgt worden: die Bekämpfung des Vektors und die Massenbehandlung mit dem Mikrofilarizid Ivermectin. Dadurch konnte eine Eindämmung der Transmission erreicht und die Zahl der Erblindungen deutlich reduziert werden. Um einen langfristigen Schutz und eine damit verbundene Eliminierung der Onchocerciasis zu erreichen, ist die Entwicklung makrofilarizider Medikamente, bzw. eines Vakzines, dringend erforderlich.

1.1.2. *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans ist als freilebender Nematode, dessen Nahrung ausschließlich aus Bakterien besteht, im Boden weit verbreitet². Nach Blaxter (1998) lässt sich *C. elegans* wie folgt systematisch einordnen³:

Phylum	Nematoda
Klasse	Secernentea
Ordnung	Rhabditida
Überfamilie	Rhabditoidea
Familie	Rhabditidae

C. elegans ist ein morphologisch und genetisch sehr einfach organisierter Organismus, der eine Reproduktionszeit von 3 Tagen (Abb. 1.1.2.B) und eine Lebenserwartung von etwa 3 Wochen hat. Die Würmer sind diploide, selbstbefruchtende Hermaphroditen von etwa 1 mm Länge. Während des reproduktiven Lebensabschnitts legt jeder Hermaphrodit etwa 350 Eier, aus denen bei optimalen Lebensbedingungen innerhalb von 12h die 0,2 mm großen Jungtiere des ersten Stadiums schlüpfen. Die Entwicklung erfolgt über vier Juvenilstadien bis zum adulten Wurm. Unter ungünstigen Lebensbedingungen kann der Entwicklungszyklus im 2. Juvenilstadium unterbrochen werden und es entstehen Dauerlarven, die durch ihre extrem verdickte Cuticula und reduzierten Stoffwechsel in der Lage sind, bis zu mehreren Monaten zu überleben. Unter optimalen Lebensbedingungen (25°C, optimale Ernährungsbedingungen) entwickeln sich diese Dauerstadien innerhalb von 12h zu Würmern des 4. Stadiums. Durch spontane Verteilungsfehler während der Meiose kommt es in seltenen Fällen (500:1) zur Entwicklung von Männchen, welche nur ein Geschlechtschromosom tragen.

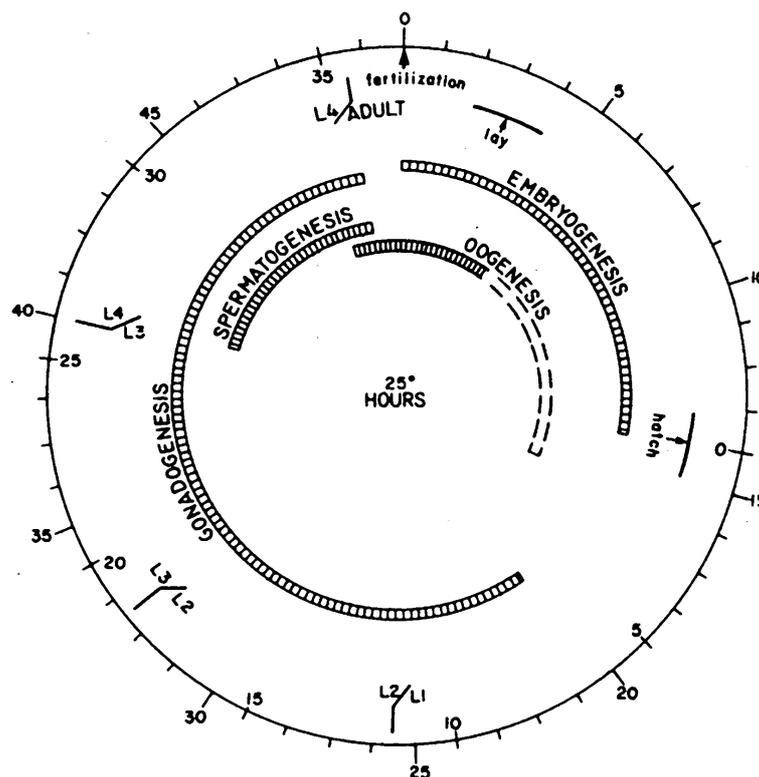


Abb. 1.1.2.B *Caenorhabditis elegans* Lebenszyklus (nach Wood, 1988)

Wie bei allen kleinen Nematoden liegt auch bei *C. elegans* Eutelie vor: die adulten Hermaphroditen bestehen aus 959 somatischen Zellen, die Männchen sind aus 1031 Zellen aufgebaut; das Nervensystem besteht aus insgesamt 302 Zellen. Das haploide Genom von *C. elegans* umfasst etwa $8 \cdot 10^7$ Basenpaare und liegt auf 6 Chromosomen⁴. Durch das

C. elegans-Genomprojekt wurde das Gesamtgenom, bestehend aus etwa 32 000 Genen mit über 80% Einzelkopiesequenzen, entschlüsselt (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/Genomic_Sequence.html).

Die Transparenz von *C. elegans*, aber auch die kurze Reproduktions- und Lebensphase, die leichte Kultivierung im Labor, die einfache Erzeugung stabiler Transfektanten und genetischer „Knock-outs“ sowie das relativ kleine, inzwischen vollständig sequenzierte Genom, haben *C. elegans* zu einem Modellorganismus für die Untersuchung vielfältiger biologischer Fragestellungen werden lassen (Abb. 1.1.2.C). Durch den hohen Grad der Übereinstimmung in Anatomie und Entwicklung und der nahen Verwandtschaft, gilt *C. elegans* inzwischen auch als gutes Modell für die Untersuchung parasitischer Nematoden^{5,6}.

Mikroinjektion von DNA-Konstrukten und Markerplasmiden in die Ovarien von *C. elegans*

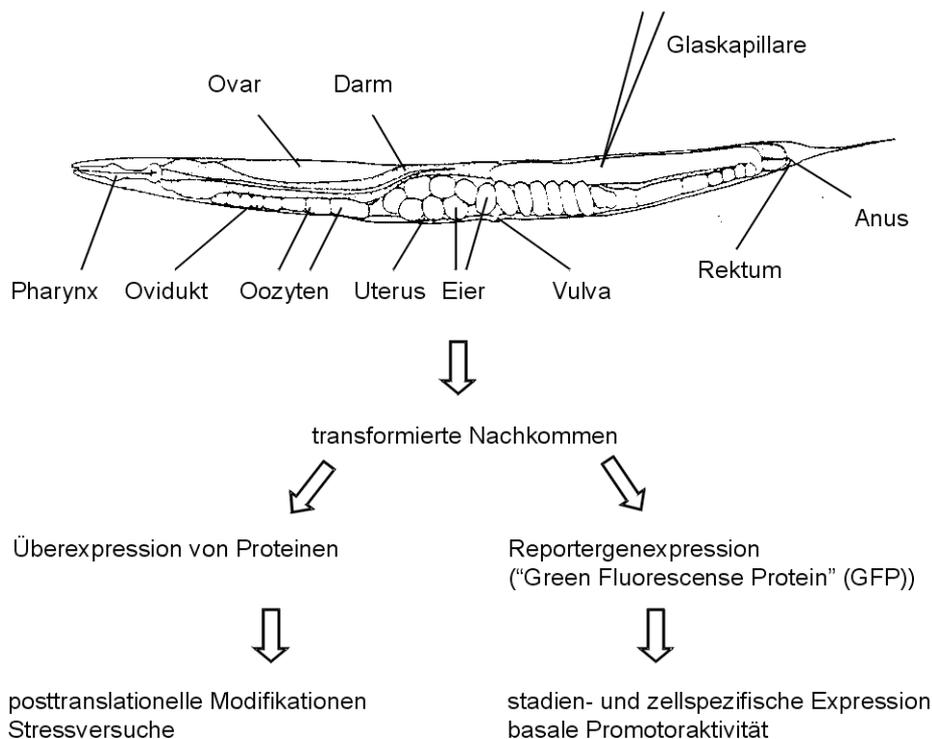


Abb. 1.1.2.C Mikroinjektion von *C. elegans*

Durch die Mikroinjektion in die Gonaden der Hermaphroditen ist es möglich, Transfektanten zu erzeugen, anhand derer z. B. die Regulation von Genen untersucht werden kann; sie können aber auch für die Überexpression von Proteinen genutzt werden.

1.2 Oxidativer Stress

Unter oxidativem Stress versteht man die Auslenkung des Gleichgewichts von Pro- und Antioxidantien in der Zelle zugunsten der Prooxidantien, wodurch verschiedene reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, die in der Folge zu Zellschädigungen bis hin zur Apoptose der Zelle führen können⁷.

Toxische Sauerstoffspezies entstehen endogen in allen aerob lebenden Organismen im Energiestoffwechsel. Hier werden bei der partiellen Reduktion molekularen Sauerstoffs über reaktive Zwischenprodukte zu Wasser (Abb. 1.2.A) reaktive Sauerstoffverbindungen freigesetzt⁸.

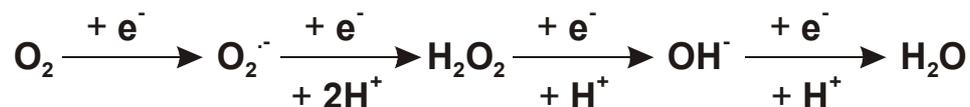


Abb. 1.2.A Partielle Reduktion molekularen Sauerstoffs zu Wasser (H₂O)

Zu den entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies zählen beispielsweise Superoxidanionen (O₂^{·-}), Singulett-Sauerstoff (¹O₂), freie Hydroxylradikale (OH[·]), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und verschiedene Peroxyradikale (LO₂[·]). Die Sauerstoffradikale gehen zur Auffüllung ihres äusseren Orbitals mit Elektronen unspezifische Reaktionen ein und übertragen so ihren Radikalcharakter auf andere Verbindungen. Dadurch wird eine Kettenreaktion, wie z. B. die Lipidperoxidation, initiiert bzw. fortgeführt.

Neben der mitochondrialen und mikrosomalen Elektronentransportkette sind als weitere endogene Quellen dieser reaktiven Verbindungen zu nennen:

- i inflammatorische Prozesse, bei denen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen durch aktivierte Immuneffektorzellen freigesetzt werden („oxidative burst“)
- ii die Arachidonsäurekaskade, welche durch die Phospholipase A₂ aktiviert wird
- iii die Autooxidation von Katecholaminen und Ascorbat
- iiii Oxidationsprozesse, bei welchen es durch diatomaren Sauerstoff zur Bildung von Ferrihäm- (Fe³⁺) aus Ferrohäm- (Fe²⁺) Gruppen kommt

Als exogene Quellen der Radikalbildung sind v. a. ionisierende Strahlung, Zigarettenrauch, redoxzyklische Xenobiotika wie Paraquat und Plumbagin oder auch Zytostatika wie Doxorubicin zu nennen⁹.

Die im Zuge der Radikalreaktionen entstehenden zellulären Schäden sind mannigfaltig. Die oxidative Schädigung von Nucleinsäuren führt meist zu DNA-Strangbrüchen und kann in der Mutation ganzer Chromosomen resultieren. Durch oxidative Modifikation von Aminosäuren kommt es oft zu einer Veränderung der Proteinkonformation, die zu einem Verlust der katalytischen Aktivität von Enzymen oder auch der Zerstörung transmembraner Ionenkanäle und Metabolitentransporter führen kann. Die Peroxidation von Membranphospholipiden führt

zu einer veränderten Permeabilität von Membranen, sowie zur Entstehung weiterer, toxischer Sekundärprodukte wie dem Aldehyd 4-Hydroxy-2-nonenal^{10,11}. Mit oxidativem Stress werden inzwischen viele pathophysiologische Phänomene, wie neurodegenerative Erkrankungen, Arteriosklerose und auch der Alterungsprozess verbunden^{12,13,14,15}.

1.2.1 Zelluläre Antioxidantien, Biotransformation und Entgiftung

In Verbindung mit der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies haben aerob lebende Organismen im Laufe der Evolution sehr effektive Abwehrsysteme entwickelt um die zellulären Komponenten vor der Schädigung durch diese Verbindungen zu bewahren. Nach Sies¹⁵ lässt sich die Abwehrstrategie in drei aufeinanderfolgende Abschnitte unterteilen: die Prävention, die Neutralisierung und Reparatur geschädigter zellulärer Strukturen. Als „Präventivmassnahmen“ kann man das Verpacken der DNA in Chromatinstrukturen, die Ausbildung spezieller Quartärstrukturen von Enzymen, welche bei der Katalyse reaktive Sauerstoffspezies bilden, und die Bildung von Pigmenten und Metallchelatoren bezeichnen. Um entstandene Prooxidantien abzufangen, stehen der Zelle enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien wie z. B. α -Tocopherol, Ascorbat und reduziertes Glutathion zur Verfügung. Zu den wichtigsten enzymatischen Systemen zur Neutralisierung von Oxidantien zählen die Katalasen, Superoxid-Dismutasen, Thioredoxin-Peroxidasen und die Glutathion-abhängigen Peroxidasen. Entgehen die reaktiven Sauerstoffspezies dieser Abwehr, kommt es zur Bildung toxischer Sekundärprodukte. Hier stehen dann weitere Entgiftungsenzyme wie die Glutathion S-Transferasen (GST), Aldehyd-Reduktasen, Cytochrom P-450, Epoxidhydrolasen und Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen zur Verfügung. Ist bereits eine oxidative Schädigung erfolgt, werden Reparaturenzyme zur Lipolyse, Proteolyse und DNA-Reparatur aktiviert.

Neben der chemischen Veränderung von Biopolymeren aufgrund von Radikalmechanismen, werden Veränderungen oft auch durch die Reaktion elektrophiler Gruppen eines Fremdstoffs mit nukleophilen Gruppen eines Biopolymers hervorgerufen. Die zumeist lipophilen xenobiotischen Verbindungen können ungehindert die Zellmembran passieren. Auch wenn sie z. T. unverändert wieder ausgeschieden werden können, gehen andere spontane chemische Reaktionen ein und stellen damit eine Gefahr für die Zelle dar. Die meisten Xenobiotika jedoch werden durch enzymkatalysierte Biotransformation umgebaut¹⁶.

Jakoby *et al.* definieren als essentielle Funktion des xenobiotischen Stoffwechsels die Metabolisierung schwer ausscheidbarer, lipophiler Stoffe in leichter ausscheidbare, hydrophilere Stoffe¹⁷. Neben einer Entgiftung der lipophilen Verbindungen kann es dabei aber auch zu einer Biotoxifikation kommen. Der xenobiotische Stoffwechsel lässt sich in zwei funktionell aufeinanderfolgende Phasen unterteilen, wobei in der 1. Phase eine Umwandlung der xenobiotischen Verbindungen erfolgt, so dass diese in der 2. Phase an endogene Co-

Substrate konjugiert werden können. Die Umwandlung und Einführung funktioneller Gruppen in die xenobiotischen Verbindungen erfolgt durch eine Reihe zumeist Cytochrom P450-abhängiger Oxidationsenzyme^{18,19}, die Konjugationsreaktionen der Phase II hingegen werden von Enzymen mit ausserordentlich breiter Substratspezifität übernommen.

1.2.2 Abwehrstrategien und xenobiotische Mechanismen in Helminthen

Aufgrund ihrer parasitären Lebensweise müssen sich die Helminthen mit Sekundärmetaboliten der Nahrung des Wirts, mit gegen sie eingesetzten Medikamenten und v. a. mit der Immunabwehr des Wirts auseinandersetzen. Infolgedessen haben sie im Laufe der Evolution diverse Abwehrstrategien entwickelt, die neben der Veränderung ihrer Morphologie z. B. durch Ausbildung einer dicken Cuticula oder der Aufnahme von Wirtsantigenen (molekulares Mimikry), v. a. zu einer Beeinflussung des Immunsystems des Wirtes durch die Komplementinaktivierung²⁰, Immunsuppression²¹ und Inhibierung der T-Zellproliferation²² geführt haben. Das Ziel ist dabei in erster Linie nicht die Blockade der Immunantwort, sondern der Erwerb immunologischer Toleranz²². Zusätzlich verfügen die Parasiten über ein an ihre Lebensweise adaptiertes enzymatisches Verteidigungssystem. Während bei dem Wirtsorganismus die 1. Phase der Entgiftung über oxidative Systeme erfolgt, fehlt bei den bisher daraufhin untersuchten Helminthen ein Cytochrom P450-abhängiger Metabolismus²³, so dass hier eine Entgiftung basierend auf zumeist reduktiven bzw. hydrolytischen Mechanismen postuliert wird²⁴. Als Phase I Entgiftungsenzym konnte bei vielen parasitischen Nematoden die Superoxid-Dismutase nachgewiesen und charakterisiert werden^{25,26,27}; weiterhin wurden bei *Dirofilaria immitis* und *Brugia pahangi* Selen-unabhängige Glutathion-Peroxidasen charakterisiert^{28,29} und auch die Entgiftung von H₂O₂ durch Katalasen ist bei parasitischen Nematoden beschrieben worden³⁰. Ausser den GST, die zur Phase II des xenobiotischen Metabolismus gehören, sind andere wesentliche Enzyme dieser Phase der Entgiftung bei Helminthen nicht nachzuweisen gewesen. Die Entgiftung scheint hier von anderen, bisher nicht bekannten Systemen übernommen zu werden oder von bekannten Entgiftungsenzymen mit breiterer Substratspezifität kompensiert zu werden³¹. Da in allen bisher daraufhin untersuchten Helminthen Glutathion S-Transferasen (GST) nachgewiesen werden konnten³², kann von einer zentralen Stellung dieser Enzyme im xenobiotischen Metabolismus der Parasiten ausgegangen werden. Die Bildung von Glutathionkonjugaten durch die GST stellt also einen essentiellen Stoffwechselweg zur Entgiftung xenobiotischer Verbindungen in Helminthen dar.

1.3 Glutathion und Glutathion-Stoffwechsel

Das Tripeptid Glutathion (L-Glutamyl-L-Cysteinylglycin), liegt intrazellulär in relativ hohen Konzentrationen von 0,1 mM – 10 mM vor³³. Auch in fakultativ anaeroben und aeroben Bakterien wie *Escherichia coli*, nicht aber in anaeroben Mikroorganismen, stellt Glutathion (GSH) das wichtigste intrazelluläre Thiol dar^{34,35,36}. Bei höheren Organisationsformen werden die Aufgaben des GSH z. T. durch GSH-Analoga, wie Homoglutathion bei *Phaseolus aureus* und Trypanothion bei Trypanosomen und Leishmanien, übernommen^{37,38}. Mit Ausnahme dieser speziellen Fälle, lässt die weite Verbreitung von GSH in aerob lebenden Organismen darauf schließen, dass das Tripeptid sich in der Evolution während des Übergangs von der anaeroben zur Sauerstoff-enthaltenden Atmosphäre entwickelt hat. Das biochemische Verhalten des GSH steht in engem Zusammenhang mit der Entgiftung reaktiver Verbindungen des Sauerstoffmetabolismus^{39,40}. Der Hauptfunktionsträger des GSH ist die Sulfhydrylgruppe des Cysteinrests. Diese Thiolgruppe kann als Elektronendonator dienen und ist damit sowohl als Nukleophil, Reduktant und auch Radikalfänger wirksam. Nukleophile Additions- und Substitutionsreaktionen führen zu GSH-Konjugaten, welche durch den sukzessiven Abbau des Peptids in Exkretionsprodukte wie Merkaptursäure, Thioglucuronide u. a. Verbindungen umgewandelt werden. Reaktionen in denen GSH als Reduktant wirkt, führen meist zur Bildung von Glutathiondisulfid (GSSG). Die Reaktion mit freien Radikalen führt nach Elektronenabgabe zur Bildung eines Thiylradikals.

Die Synthese von Glutathion erfolgt in zwei hintereinander geschalteten Reaktionen durch das Schrittmacherenzym γ -Glutamyl-Cysteinsynthetase und die GSH-Synthetase³³. Um das Verhältnis von GSH zu GSSG im Cytosol, welches abhängig vom Organismus bzw. Gewebe, zwischen 30:1 bis 100:1 liegt, aufrecht zu erhalten⁴¹, wird GSH ständig neu synthetisiert. Neben der Synthese von GSH erfolgt auch eine Reduktion des Disulfids durch die NADPH-abhängige Glutathion-Reduktase⁴². Damit trägt die Glutathion-Reduktase dazu bei, das unter aeroben Bedingungen intrazellulär reduzierende Milieu der Zellen aufrecht zu erhalten.

1.3.1 Glutathion-abhängige Entgiftungsenzyme

Neben seiner Funktion bei der Aufrechterhaltung des Thiol-Redoxstatus der Zelle, kommt dem GSH eine zentrale Rolle als Teil des antioxidativen Systems zu. Antioxidantien wie α -Tocopherol und Ascorbat werden durch GSH in reduziertem und damit aktiven Zustand gehalten⁴³. Die Thioltransferase und auch die Protein-Disulfid-Isomerase sind auf GSH angewiesen, um Enzyme wie die Pyruvatkinase und die Phosphofruktokinase im aktiven Zustand zu halten.

In der Reaktion mit dem Selenoprotein Glutathion-Peroxidase wirkt GSH als Cofaktor. Durch die Katalyse der GSH-Peroxidase können praktisch alle organischen Peroxide und H_2O_2 entgiftet werden^{44,45}. Die Entgiftung toxischer 2-Oxoaldehyde die durch zelluläre oxidative Prozesse gebildet werden, wird von der Glyoxylase I (GloI) übernommen, welche GSH als Cofaktor benutzen⁴⁶. Als Cofaktor wird GSH auch in den Reaktionen der Maleylacetoacetat-Isomerase im Tyrosinstoffwechsel⁴⁷, in Reaktionen der Formaldehyd-Dehydrogenase⁴⁸ und der Prostaglandin-Endoperoxid-Isomerase benötigt⁴⁹. In der Entgiftung endogener und xenobiotischer Verbindungen durch Enzyme der GST-Superfamilie wird GSH aufgrund seiner nukleophilen Eigenschaften als Cosubstrat genutzt. Die hierbei entstehenden Glutathionkonjugate werden sukzessive abgebaut oder über spezifische Transporter aus der Zelle geschleust.

1.3.2 Glutathion S-Transferasen

Die Glutathion S-Transferasen stellen eine große Familie von Isoenzymen dar, die innerhalb des Fremdstoffmetabolismus als Entgiftungsenzyme GSH-abhängige Konjugationsreaktionen vermitteln. Die GST zeichnen sich, wie andere Superfamilien auch, durch eine sehr breite, überlappende Substratspezifität der zugehörigen Isoenzyme aus, d. h. sie weisen eine große Toleranz gegenüber den Strukturen und den elektrophilen Gruppen der zu konjugierenden Verbindungen auf^{50,51,52}. GST katalysieren die Konjugation endogener und xenobiotischer, meist lipophiler Verbindungen mit elektrophilem Zentrum an GSH, wodurch Konjugate mit hydrophilerem und dadurch weniger toxischem Charakter entstehen⁵³. Weiterhin sind sie auch als passive Bindungsproteine von Häm, Bilirubin, Gallensäuren, Steroiden und anderen nichtpolaren Molekülen beschrieben worden, wobei die Bindung des Liganden zu einer Inhibierung der enzymatischen Aktivität führen kann⁵⁴. Diese passive Bindung kann dem intrazellulären Transport und der Speicherung von Stoffen dienen, verhindert aber auch eine Akkumulation dieser Stoffe in der Zellmembran und wirkt damit dem zytotoxischen Effekt der Substanzen entgegen⁵⁵.

Die Nomenklatur der GST beruht auf einer standardisierten Einteilung der Säugetier-Enzyme, welche 1999 aber auch auf andere Organismen erweitert wurde⁵⁶. Die Zuordnung der cytosolischen GST erfolgt auf Basis ihrer Sekundärstruktur und des Substratprofils und wurde neben den bekannten Klassen der Alpha-, Pi-, Theta-, Mu- und Sigma-Klasse, kürzlich um die Zeta- und Omega-Klasse erweitert⁵². Bei Pflanzen sind zusätzlich Phi- und Tau-Klassen definiert worden. Bakterien besitzen auch eine Beta-Klasse und bei höheren wirbellosen Tieren ist eine Delta-Klasse beschrieben worden^{57,58}. Innerhalb der einzelnen Klassen sind Struktur motive vieler verschiedener Proteine für die GST-Struktur rekrutiert worden. Eine Ausnahme stellt allerdings die Klassen-übergreifend konservierte GSH-Bindungsstelle, dar.

Die GST der Sigmaklasse weisen z. B. eine starke strukturelle Ähnlichkeit zu den S-Crystallinen der Linsen von Tintenfischaugen auf⁵⁹. Eine weitere GST dieser Klasse ist, aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit zu hämatopoetischen Prostaglandin D Synthetasen (PGDS), als PGH₂ – PGD₂ - Isomerase identifiziert worden⁶⁰. Innerhalb der Theta-Klasse ist eine nur 13 kDa große GST mit hoher Sequenzidentität zu MIF („Macrophage Migration Inhibitor Factor“) beschrieben worden,⁶¹ und innerhalb der erst kürzlich beschriebenen Omegaklasse befindet sich eine GST mit Ähnlichkeit zu einem Chlorid-Kanal (NCC27), die auch auf Ryanodin-Rezeptoren modulatorisch wirken soll⁶².

In daraufhin untersuchten Parasiten konnten, mit Ausnahme einiger parasitischer Protozoen, eine Vielzahl verschiedener GST-Isoenzyme nachgewiesen werden³². Andere zur Phase II gehörende Entgiftungsenzyme höherer Eukaryonten konnten in Helminthen jedoch nicht nachgewiesen werden, so dass die GST im Zentrum der Abwehrmechanismen der Helminthen stehen³¹. Für viele GST von Helminthen sind bereits die cDNA- und genomischen Sequenzen veröffentlicht worden: *O. volvulus*^{63,64,65} und *O. ochengi*, *Echinococcus multilocularis*⁶⁶, *Paragonimus westermani*⁶⁷, *Schistosoma japonicum* und *Schistosoma mansoni*^{68,69}, *Ascaridia galli*⁷⁰, *Ascaris suum*⁷¹, *Ancylostoma duodenale*, *Heligmosoides polygyrus*⁷² und *Fasciola hepatica*⁷³ sind nur einige Beispiele. Weiterhin sind durch die Arbeit des „Filarial Genome Network“ neue cDNA-Sequenzen mit Identität zu verschiedenen GST-Klassen publiziert worden.

Aufgrund ihrer zentralen Rolle im xenobiotischen Stoffwechsel der Helminthen gelten die GST bei Toxikologen als mögliche chemotherapeutische Angriffspunkte, während sie für Immunologen potentielle Vakzineandidaten darstellen. Immunisierungsstudien mit rekombinant in *E. coli* exprimierten GST aus *F. hepatica* und *S. mansoni* haben gezeigt, dass diese außerordentlich protektive Antigene darstellen. Die Modulation von Wirtseffektormolekülen wie Leukotrienen, als Produkte des Lipoxygenaseweges, und Prostaglandinen, als Produkte des Cyclooxygenaseweges, durch die GST macht es den Helminthen möglich, die Immunantwort des Wirtes zu modulieren. Die Metabolisierung dieser Substrate könnte ein Mechanismus sein, mit dem die Helminthen die Aggregation von Thrombozyten auf ihrer Oberfläche verhindern bzw. mit den vaskulären Endothelzellen interagieren. Die Analyse der exkretorisch-sekretorischen Produkte von *S. mansoni* in der Haut hat beispielsweise ergeben, dass PGD₂ die Wanderung der aktivierten Langerhanschen Zellen zu den Lymphknoten verhindert und damit die gerichtete Immunantwort des Wirtes verzögert⁷⁴. Auch ein Einfluss auf die Wirkung von Medikamenten, deren Metabolisierung zu toxischen Sauerstoffverbindungen führt, konnte auf die Aktivität von GST zurückgeführt werden. Die Inaktivierung der aktiven Form des Anthelminthikums Metrifonate, das Dichlorvos, ist auf die Bildung des entsprechenden GS-X-Konjugats zurückzuführen⁷⁵. Die passive Bindungskapazität der GST und die damit verbundene

Entgiftung durch Entzug der chemischen Verbindung aus dem Zellstoffwechsel ist ein weiterer Mechanismus, welcher bei anderen Anthelminthika zu deren Inaktivierung führt⁷⁶.

1.1.3 Das Glyoxylase-System

Die Entdeckung des Glyoxylase (Glo)-Systems als Teil der GSH-abhängigen Enzymologie geht auf die Arbeiten von Dakin & Dudley (1913) zurück. Das ubiquitäre Vorkommen des Glo-Systems im Cytosol fast aller pro- und eukaryotischen Organismen deutet auf eine essentielle Funktion dieses Enzymsystems im Stoffwechsel hin⁷⁷. Das Glo-System kommt in fast allen Zellen eines Organismus vor und ist mit Beginn der Embryogenese bis hin zum Zelltod nachzuweisen. Die Bedeutung des Glo-Systems im Zellstoffwechsel steht in engem Zusammenhang mit dem primären Substrat Methylglyoxal und dessen physiologischer Wirkungsweise⁷⁸. Aus diesem Grund kommt dem Glo-System eine wichtige Rolle bei der Entgiftung des toxischen Methylglyoxals zu. Auch eine Funktion in der Kontrolle des glykolytischen Bypass des Embden-Meyerhof-Weges und bei der Kontrolle der Zellproliferation gelten als gesichert. Das Glo-System besteht aus zwei Enzymen, der Lactoylglutathion-Lyase (Glyoxylase I, EC 4.4.1.5) und der Hydroxyacylglutathion-Hydroxylase (Glyoxylase II, EC 3.1.2.6), dem Schrittmacherenzym. Als Isomerase katalysiert die Glyoxylase I (GloI) die Bildung von S-2-Hydroxyacylglutathion aus dem Hemimercaptal-Addukt von GSH und einer großen Anzahl verschiedener 2-Oxoaldehyde. Im Anschluss daran wird das 2-Hydroxyacylglutathion durch die als Thiolesterase wirkende Glyoxylase II (GloII) hydrolysiert (Abb.1.3.3.A).

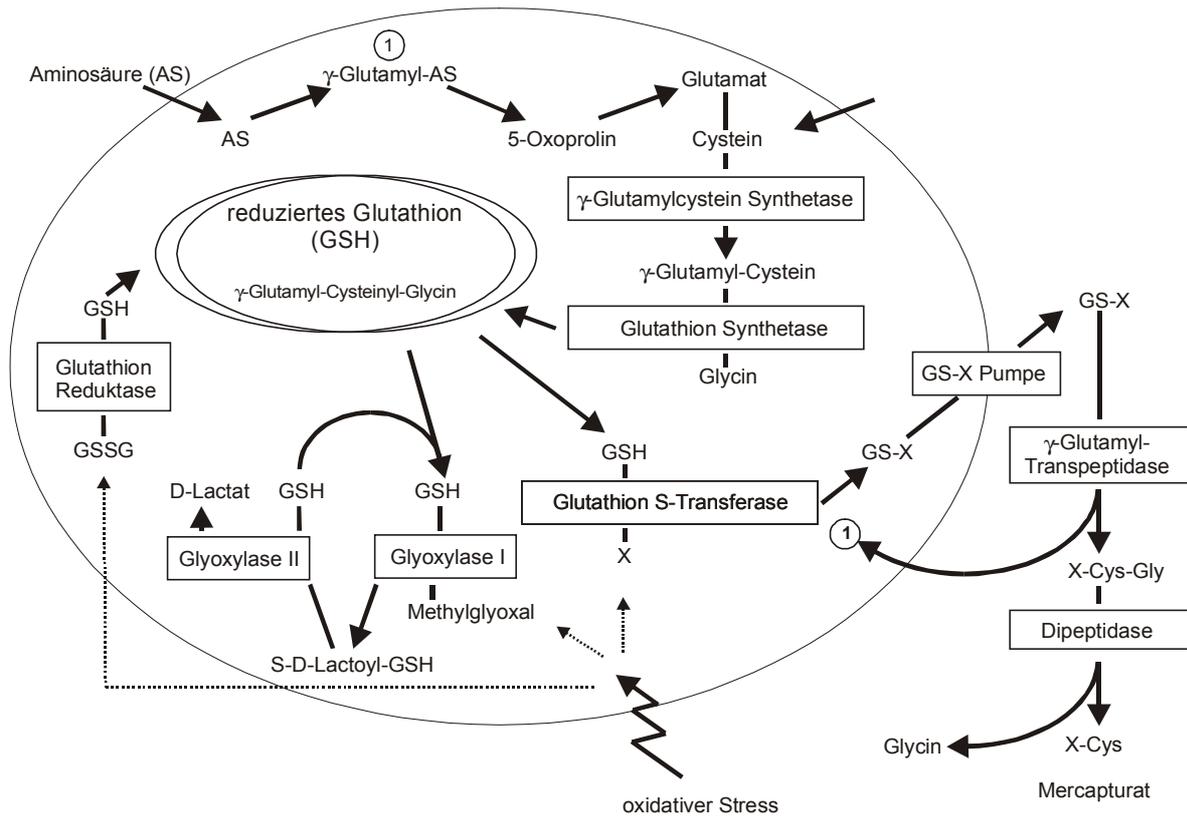


Abb.1.3.3.A Schematische Darstellung der GSH-abhängigen Stoffwechselwege der Zelle

Im Zentrum der verschiedenen Stoffwechselwege steht das GSH. Weiterhin dargestellt sind die de novo-Synthese von GSH, die Entsorgung der GS-X-Konjugate, die Reduktion von GSSG durch die GSH-Reduktase sowie, als Bestandteile dieser Arbeit, die GloI und die GST. AS: Aminosäure; ①: γ -Glutamyl-AS; getrichelte Linien/Pfeile: Einwirkung von oxidativem Stress.

Die Bildung von Methylglyoxal ist die Folge des Vorkommens von Triose-1,2-enediol 3-Phosphat bei physiologischem pH-Wert in den Zellen durch den Embden-Meyerhof-Weg. Weitere Quellen von Methylglyoxal im Metabolismus von Säugetieren sind z. B. die Oxidation von Acetol im Acetonmetabolismus^{79,80} und die Bildung von Aminoaceton im Threoninkatabolismus durch die Aminoxidase^{81,82} (Abb.1.3.3.B).

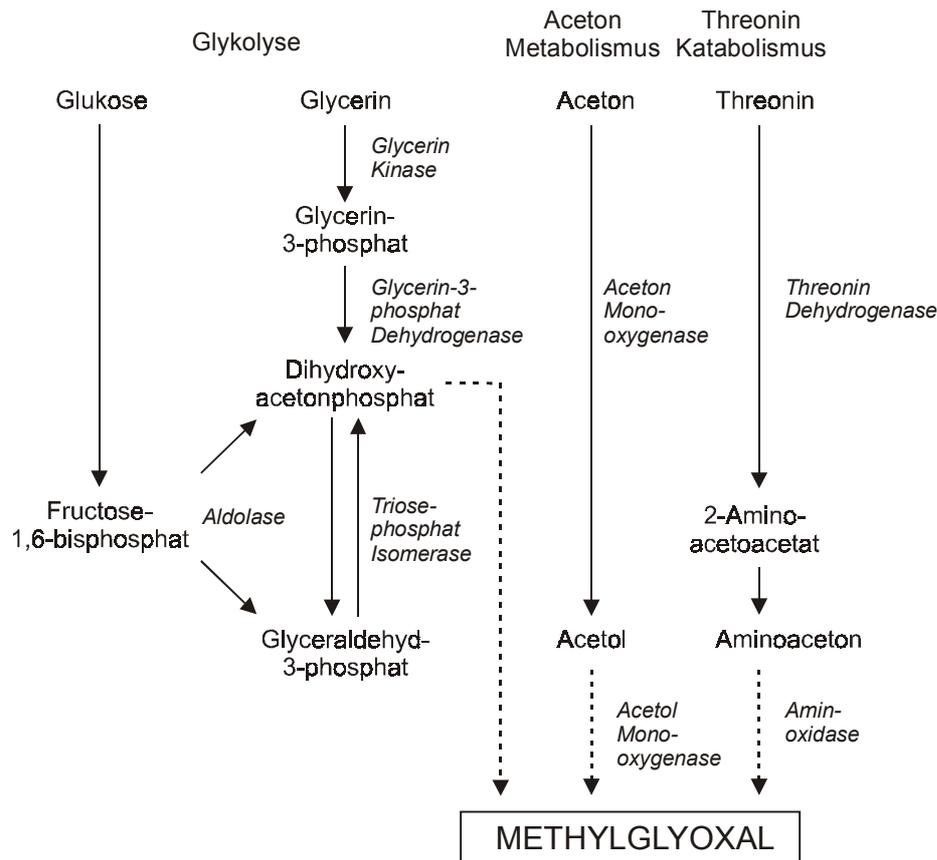


Abb.1.3.3.B Quellen der Entstehung von Methylglyoxal im Organismus

Durch diese Stoffwechselwege liegen Methylglyoxal und auch Glyoxal als Metabolite in den Zellen in Konzentrationen von 0,1 – 2 μM vor⁸³. Eine Erhöhung der Konzentration in millimolare Bereiche hat verschiedene zytotoxische Effekte zur Folge, wie die Hemmung glykolytischer Enzyme⁸⁴ und die Inhibierung der Mikrotubulzusammenlagerung⁸⁵. Methylglyoxal ist auch verantwortlich für die Bildung von „Advanced Glycation Endproducts“ (AGE), welche zu schweren Zellschädigungen und Hyperglykämie führen⁸⁶. Weitere zytotoxische Effekte des Methylglyoxals und verwandter 2-Oxoaldehyde beruhen auf der Modifikation von Arginin- und Cysteinresten in Proteinen, wodurch es zu einer vorzeitigen Degradation dieser Proteine kommt. Methylglyoxal führt durch Bindung an DNA- und RNA-Stränge, besonders an deren Guanosinreste, zu einem Anstieg der Mutageneserate und darauffolgender Apoptose⁸⁷. Resultierende DNA/DNA- und DNA/Protein- Verknüpfungen und Schwesterchromatidaustausche konnten direkt auf eine Erhöhung der Methylglyoxalkonzentration zurückgeführt werden. Durch Zugabe von 1 mM Methylglyoxal zu *E. coli* Zellen wurde die zytostatische Wirkung von α -Oxoaldehyden, als Folge der Inhibierung der Proteinsynthese, nachgewiesen^{86,46}. Versuche, die Toxizität und zytostatische Wirkung von α -Oxoaldehyden für therapeutische Zwecke, v. a. in der Onkologie, zu nutzen sind aufgrund der schnellen Umsetzung der Verbindungen zu α -Hydroxysäuren, bisher erfolglos verlaufen. Weiterführende Untersuchungen konzentrieren

sich auf die Entwicklung von Inhibitoren der Enzyme des Glo-Systems um die schnelle Metabolisierung dieser Verbindungen zu verhindern. Die Hemmung der GloI-Aktivität in resistenten Leukämiezellen hat diese z. B. für eine chemotherapeutische Behandlung wieder zugänglich gemacht⁸⁸.

Von besonderem Interesse ist das Glo-System auch in Hinblick auf die Entgiftung reaktiver Sekundärprodukte der Lipidperoxidation. Die in der Zellmembran entstehenden α -hydroxylierten Carbonylverbindungen können durch Autooxidation und β -Eliminierung zu Substraten der GloI werden. Damit kommt dem Glo-System auch eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress zu^{46,104}.

Bisher ist das Glo-System nur bei wenigen Parasiten biochemisch charakterisiert worden. Bei Untersuchungen von *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrocyten wurde eine 30-fach erhöhte Bildung von D-Lactat aus Methylglyoxal im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen nachgewiesen. Dieser Anstieg der D-Lactat Bildung konnte auf eine Erhöhung der GloI und II-Aktivität zurückgeführt werden. Die Relevanz des Glo-Systems für das Überleben der Parasiten wurde durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren der GloI deutlich. S-*p*-Bromobenzylglutathion z. B. inhibiert das Wachstum von *P. falciparum in vitro* und führt nach etwa 6h zum Absterben der Parasiten^{89,90}. Das Glo-System verschiedener Helminthen wurde bisher nur mittels Aktivitätsbestimmungen in Homogenaten und Rohextrakten untersucht. Dabei zeigte sich eine hohe Variabilität im Vorkommen der Enzyme des Systems. Während in den daraufhin untersuchten Nematoden sowohl GloI- als auch GloII-Aktivität gemessen werden konnte, wiesen Trematoden und Cestoden lediglich GloII, nicht aber GloI-Aktivität auf⁷⁶. Sehr hohe spezifische Aktivitäten für verschiedene Substrate wurden bei der Charakterisierung des Glo-Systems von *Onchocerca gutturosa* nachgewiesen¹²⁹.

1.4 Zielsetzung

Aufgrund fehlender makrofilarizider Medikamente stellt die Kontrolle und Bekämpfung von Filarieninfektionen in den tropischen Gebieten der Erde bis heute ein gesundheitliches Problem dar. Für die Bekämpfung und Kontrolle der als Flussblindheit bekannten Onchocerciasis werden deshalb parallel zwei Strategien verfolgt: durch das Vektor-Kontrollprogramm der OCP erfolgt eine Bekämpfung der Kriebelmücken (*Simulium spec.*) als Überträger der Onchocerciasis. Zum anderen wird versucht, die Behandlung der Bevölkerung mit dem mikrofilariziden Medikament Ivermectin zu gewährleisten. Das Ziel, mit diesen Methoden eine Ausrottung der Onchocerciasis zu erreichen, ist an der Infrastruktur, der flächendeckenden Behandlung der Bevölkerung in den endemischen Gebieten und auch an der Notwendigkeit einer regelmäßigen Verabreichung von Ivermectin, bisher gescheitert. Viele grundlegenden Studien der Überlebensstrategien parasitischer Nematoden im Wirt haben dazu beigetragen, das Verteidigungssystem des Parasiten, gerichtet gegen die Immunabwehr des Wirtes, näher zu charakterisieren. Dabei sind grundlegende Unterschiede im xenobiotischen Metabolismus zwischen Wirt und Parasit aufgedeckt worden, die nun für die Entwicklung von makrofilariziden Medikamenten oder Vakzinen genutzt werden können. Ein potentiell Ziel stellt das Glutathion-abhängige Entgiftungssystem von *Onchocerca volvulus* dar, welches aufgrund seiner zentralen Rolle im Stoffwechsel und seinen vielfältigen Funktionen als geeigneter Angriffspunkt erscheint. An zentraler Stelle der Glutathion-abhängigen Entgiftung in Helminthen stehen die Glutathion S-Transferasen, welche bereits als potentielle Vakzinekandidaten für die Bekämpfung der Bilharziose identifiziert wurden. Ein weiteres System der Glutathion-abhängigen Enzymologie stellt das Glyoxylase-System dar, welches bei der Entgiftung toxischer α -Oxoaldehyde eine Rolle spielt.

Um den Stellenwert des Glyoxylase-Systems auf die Entgiftung dieser zytotoxischen Verbindungen bei *O. volvulus* einschätzen zu können, sollte die Glyoxylase I aus *O. volvulus* isoliert, rekombinant exprimiert und biochemisch charakterisiert werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der *O. volvulus* Glutathion S-Transferase 1a und -1b (Ov-GST1a und -1b) beruhen auf der Identifizierung dieser Enzyme als exkretorisch-sekretorische Proteine und der für GST ungewöhnlichen N-Glykosylierung und N-terminalen Verlängerung. Daher sollte die N-Glykanstruktur der Ov-GST1a und -1b charakterisiert und der Einfluss der N-Glykane auf die Erkennung der GST als Antigen in Seren von Patienten mit Onchocerciasis durch ELISA analysiert werden. Weiterhin sollte die Antikörperantwort gegen die N-terminale Verlängerung der Ov-GST1a und -1b in Seren von Patienten mit Onchocerciasis untersucht werden. Als Teil einer biochemischen Analyse sollte das physiologische Substrat dieser GST identifiziert werden. Für eine vergleichende Analyse sollte das Expressionsmuster der rOv-GST1a in dem

Modellnematoden *Caenorhabditis elegans* untersucht werden. Durch ektopische Expression der rOv-GST1a in *C. elegans* sollte die Kapazität dieses Nematoden als Modell für die Expression posttranslational modifizierter Proteine des Parasiten untersucht werden.

Durch „Differential Display“ RT-PCR wurde der 3'-Bereich einer *O. volvulus* GST identifiziert, die durch oxidativen Stress hochreguliert wird. Im Folgenden sollte die cDNA der Ov-GST3 isoliert und eine erste Analyse der Genstruktur vorgenommen werden. Innerhalb der Arbeit sollte mit der Untersuchung der transkriptionellen Regulation homologer GST von *C. elegans* unter Einfluss von xenobiotischen Verbindungen begonnen werden. Weiterhin sollte das Expressionsmuster einer homologen GST in *C. elegans* charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Bioreagenzien und Chemikalien

Alexis Biochemicals:	COX-1, PGD ₂ , PGH ₂ , Arachidonsäure
Amersham Buchler (Braunschweig):	α -[³⁵ S]-, α -[³² P]-dATP
Amersham Pharmacia Biotech:	Glutathion Sepharose, Sequenase Kit, Western Blot Molekulargewichtsstandard Rainbow™
Biomol (Hamburg):	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glycerin; Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG), Tris-Puffer
Boehringer (Mannheim):	Ampicillin, dNTP, Lysozym
Eurogentech:	Agarose
GibcoBRL (Eggenstein):	Low Melting Agarose, SDS-PAGE Molekulargewichtsstandard
GibcoBR (Life Technologies, Invitrogen):	PCR-Supermix, Taq-Polymerase, Topo TA Cloning-Kit, Acrylamid/ Bisacrylamid
Macheray-Nagel:	Nucleobond AX Midi Kit
MBI Fermentas:	1kb DNA Leiter GeneRuler™
Merck (Darmstadt):	Ammoniumpersulfat (APS), Isopropanol, Magnesiumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdodecylsulfat (SDS), N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin, (TEMED)
New England Biolgies:	Restriktionsenzyme, Elongase, T4-DNA Ligase
Packard:	ATP-Lite Kit
Pekin Elmer:	Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
Promega:	Pfu-Polymerase, T4-DNA Polymerase
Pierce	Feinchemikalien für das ELISA
Quiagen:	EndoFree™ Plasmid Maxi Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, Ni-NTA-Agarose-Matrix

Roche:	Proteinase K, Collagenase, RNase, DNase, Reverse Transkriptase, DNA Restriktionsenzyme
Serva (Heidelberg):	Dialyseschläuche, SDS
Sigma (Deisenhoven):	Bovine-Serum-Albumin (BSA), Coomassie Brilliant Blue, Diylpyrocarbonat (DEPC), Dithiothreitol (DTT), Ethidiumbromid, Kodak Biomax MR, Methylglyoxal, Mineralöl; red. GSH, S-Hexylgluthathion-Sepharose, Siliciumoxid (Glasmilch), Nystatin, Feinchemikalien für Enzymtests
Stratagene (La Jolla):	Pfu Polymerase; DNA Extraction Kit, IPTG, X-GAL
USB (Cleveland, USA):	Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing-Kit

2.2 Puffer und Nährmedien

Aufgeführt sind alle mehrfach konzentrierten Puffer und Medien, sowie die im Labor allgemein zur Verfügung stehenden Lösungen. Die für spezielle Versuche benötigten Puffer und Biochemikalien sind im methodischen Teil bei der Versuchsdurchführung angegeben.

Puffer und Medien für Arbeiten mit *C. elegans*:

Freezing Solution:	5,85 g NaCl, 6,8 g KH_2PO_4 , 300 g Glycerol, 5,6 ml 1 M NaOH, ad 1 l dH_2O Nach dem Autoklavieren: 3 ml 0,1 M MgSO_4
M9-Puffer:	3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, 1 ml 0,1 M MgSO_4 , ad 1 l H_2O , autoklaviert
“Nematode growth medium” (NGM) und NGM-Agar:	3 g NaCl, 17 g Agar, 2,5 g Sojabohnen - Pepton, ad 975 ml H_2O . Nach dem Autoklavieren: 1 ml Cholesterol (5 mg/ml in Ethanol), 1 ml 1 M CaCl_2 , 1 ml 1 M MgSO_4 , 25 ml 1 M KH_2PO_4 , pH 6

Lösungen für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen, (*Escherichia coli*):

Lösung A:	100 mM CaCl ₂
Lösung B :	80 mM CaCl ₂ , 15% Glycerin

Allgemeine Lösungen für molekularbiologische Arbeiten:

Beschwerungspuffer für DNA/RNA-Agarosegelelektrophorese:	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 40% (w/v) Glycerol
New Wash:	50% Ethanol, 10 mM Tris, pH 7,5, 0,05 mM EDTA, pH 8,0, 50 mM NaCl
STET-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 5% (v/v), Triton-X-100, 8% (v/v) Sucrose
5 x TAE-Puffer:	200 mM Tris-Base, 1,5 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, pH 8,0
5 x TBE-Puffer:	450 mM Tris-Base, 450 mM Borat, 10 mM EDTA, pH 8,0

Hybridisierungslösungen für α -[³²P]-dATP markierte DNA/RNA:

Heringsspermien-DNA:	10 mg/ml Heringssperma in TE-Puffer
100x Denhardt's:	2% Ficoll, 2% Polyvinylpyrrolidon, 2% BSA
20x SSC:	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
BD1:	0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl
BD2:	1 M Tris/HCl, pH 7,4, 1,5M NaCl

Hybridisierungslösungen für Dig-11-dUTP markierte DNA:

5 x Maleinsäurepuffer:	0,5 M Maleinsäure, 0,75 M NaCl, pH7,5 (NaOH)
10 x Blockierungspuffer:	10 % (w/v) Blockierungsreagenz in 1 x Maleinsäurepuffer
Hybridisierungslösung:	5 x SSC, 1 % (v/v) Blockierungspuffer, 0,1 % (v/v) N-Lauroylsarkosine, 0,02 % SDS
Waschpuffer:	0,3 % (w/v) Tween 20 in 1 x Maleinsäurepuffer

2. Material und Methoden

5 x Detektionspuffer: 0,5 M Tris-Base, 0,5 M NaCl, pH 9,5

Allgemeine Lösungen für biochemische Arbeiten:

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

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

SDS-PAGE Lösungen:

2 x SDS-Probenpuffer:

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

(Bis-) Acrylamid Stocklösung:

29,1 g Acrylamid, 0,9 g Bisacrylamid in 100 ml

Sammelgelpuffer:

5,7 g Tris/HCL in 100 ml, pH 6,7

Trenngelpuffer:

36,3 g Tris/HCL in 100 ml, pH 8,9

APS:

10% (w/v) in dH₂O

1 x SDS- Laufpuffer:

3 g Tris/HCL, 14,4 g Glycin, 10 ml SDS (10%) ad 1 l dH₂O

Lösungen für die Coomassie Färbung:

Fixierer:

20% Trichloressigsäure

Färbelösung:

A: 0.2% „Coomassie Brilliant Blue“G-250 in 96% Ethanol

B: 20% Eisessig

A und B zu gleichen Teilen mischen

Entfärber:

20% Ethanol (v/v), 10% (v/v) Eisessig in 1 l dH₂O

Lösungen für die Silberfärbung:

Lösung 1:

30% Ethanol, 10% Essigsäure

Lösung 2:

20% Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,5%

Lösung 3:	Glutaraldehyd, 0,2% Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1% AgNO ₃ , 0,02% Formaldehyd
Lösung 4:	2,5% Na ₂ CO ₃ , 0,01% Formaldehyd
Lösung 5:	0,05 M EDTA

Western Blot Lösungen:

Anodenlösung 1:	0,3 M Tris/HCl, 20% Methanol, pH 10,4
Anodenlösung 2:	25 mM Tris/HCl, 20% Methanol, pH 10,4
Kathodenlösung:	40 mM 6-Aminohexansäure, 20% Methanol, pH 7,6

Lösungen für die Immunodetektion von Proteinen:

BCIP :	100 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat in 100% Dimethylformamid
NBT:	100 mg Nitroblautetrazoliumchlorid in 2 ml 70% Dimethylformamid
Substratpuffer:	0,1 M Tris-Base, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , pH 9,5
Stoppuffer:	20 mM Tris/HCl, 1 mM Na-EDTA, pH 2,9

Lösung für die Proteinbestimmung

Bradford-Reagenz	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% Ethanol (w/v), 8,5% H ₃ PO ₄ (w/v)
------------------	--

2.3 Plasmidvektoren, Bakterienstämme, *C. elegans* Stämme

Clos, J. ⁹¹	pJC40
Invitrogen	pJC20, TOPO pCR TM II
Fire, A. ⁹²	pPD49.83, pPD95.77, pPD118.25
(Carnegie Institution of Washington, Baltimore, MD)	
Schnabel, H. ⁹⁸	<i>C. elegans</i> Wildtyp, N2 var. Bristol
(Universität Braunschweig)	<i>C. elegans</i> Mutanten, <i>phal</i>

Stratagene: BL21, BLR-DE3P/lys, Dh5 α , HB101, HT115, PLKF', OP50

2.4 Biochemische Methoden

Alle mehrfach konzentrierten Puffer und Medien, sowie die im Labor allgemein zur Verfügung stehenden Lösungen sind unter 2.2: „Puffer und Nährmedien“ angegeben. Verwendete Abkürzungen für Inkubationszeiten: 1 Hochkomma (') steht für Minute, 2 Hochkommata (") für Sekunde.

2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der Mikromethode von Bradford⁹³ mit Rinderserumalbumin als Referenzprotein durchgeführt.

2.4.2 Präparation von 100 000 xg Überständen der Nematoden für die Proteinaufreinigung

Die Würmer wurden unter Zugabe von PBS/1% Triton X-100, 0,1 mM PMSF (1:5, v/v) homogenisiert. Durch Zentrifugation (Centricon T1065, TFT 55.38 Rotor, Kontron) für 1h bei 100 000 xg wurde der Überstand gewonnen und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.4.3 Proteinaufreinigung im "Batch"-Verfahren

Die Bakterienpellets wurden nach der Expression in dem entsprechenden Bindungspuffer der verwendeten Affinitätsmatrix resuspendiert, beschallt und der Überstand durch Ultrazentrifugation von Zellrückständen befreit.

a) "His-Bind Resin" - Agarose (Qiagen) :

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

Waschpuffer: 20 mM Imidazol/ " / "

Elutionspuffer: 250 mM Imidazol/ " / "

b) GSH-Sepharose (Pharmacia):

Bindungspuffer: PBS, pH 7,4

Waschpuffer: PBS, pH 7,4

Elutionspuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0/20 mM GSH

c) S-Hexyl-GSH-Sepharose (Amersham):

Bindungspuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,8

Waschpuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,8/0,1 M Dithiothreitol

Elutionspuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,8/0,1 M Dithiothreitol/10 mM S-Hexyl-GSH

Zur Proteinbindung wurden die Bakterienüberstände auf die mit Bindungspuffer äquilibrierten Affinitätsmatrices geladen und über Nacht unter Drehen bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde anschliessend 3 x mit dem entsprechenden Waschpuffer gereinigt (30', Drehen, 4°C) und mit 500 µl Elutionspuffer für 30' bei 4°C konzentriert eluiert. Alle Zentrifugationsschritte der Matrices erfolgten bei 500 rpm, 4°C. Alle Proteine wurden über Nacht gegen die für die folgenden Versuche benötigten Puffer dialysiert.

2.4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese wurde unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli⁹⁴ durchgeführt. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen SDS-Probenpuffer versetzt, für 5' gekocht und 15' bei 14 000 xg zentrifugiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde erfolgte in Minigel G42 Kammern (Biometra) bei 20 mA (5% Sammelgel) und 40 mA (12,5% bzw. 15% Trenngel). Als Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGE wurde bei Coomassie Färbung ein Marker mit einem Molekulargewichtsbereich von 10 000 bis 220 000 Da (Gibco BRL) verwendet. Bei anschließendem Western Blot der Proteine wurde ein vorgefärbter Marker („Prestained SDS-PAGE Standard, RainbowTM“) mit einem Molekulargewichtsbereich von 7 000 bis 203 000 Da verwendet.

2.4.5 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Blau

Die Gele wurden 30' fixiert, für 1 - 2h gefärbt und bis zum Erhalt eines transparenten Hintergrundes entfärbt.

2.4.6 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Färbung der Polyacrylamidgele erfolgte nach der Vorschrift von Heukeshoven und Dernick⁹⁵. Die Gele wurde für 15' in Lösung 1 fixiert, weitere 15' in Lösung 2 inkubiert und nach 3 x Waschen in dH₂O in Lösung 3 für 15' getränkt. In Lösung 4 wurden die Gele bis zur Färbung der Proteinbanden entwickelt und die Entwicklung dann durch Zugabe von Lösung 5 gestoppt.

2.4.7 Western Blot Analyse

Die Proteine aus den SDS-PAGE wurden durch das Semi-Dry-Blotverfahren in einer horizontalen Blotkammer (LKB Bromma 2117 Multiphor II, Firma Pharmacia) auf eine Nitrocellulosemembran (PROTRAN BA-85, Schleicher & Schuell) transferiert. Vor dem Blotten wurde das Gel in Kathodenpuffer für 30' äquilibriert.

Blotaufbau (Anode - Kathode):

3 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenlösung 1

6 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenlösung 2

1 Lage Nitrocellulose, getränkt in Anodenlösung 2

Polyacrylamidgel

9 Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenlösung

Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 1h.

2.4.8 Immunodetektion der transferierten Proteine

Verwendete Antikörper:

Anti-Ov-GST1a/1b: 1:250 (v/v) in PBS/1% BSA

Anti-Rabbit IgG F(ab')₂ Fragment, aus Eseln, alkalische Phosphatase-konjugiert (Immuno Research Laboratories, Inc.), 1:5 000 (v/v) in PBS/1% BSA

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Blot 1h bei RT mit PBS/1% BSA blockiert und über Nacht bei 4°C mit dem 1. Antikörper inkubiert. Danach wurde 3 x mit PBS/0.05% TWEEN 20 gewaschen und der Blot in der Lösung mit dem 2. Antikörper für 1h bei RT geschwenkt. Daraufhin wurde der Blot erneut 3 x mit PBS/TWEEN 20 und abschließend 1 x mit H₂O für je 5' gewaschen. Für die Detektion der Ov-GST1 wurde die Färbelösung mit 0,033% (v/v) NBT und 0,33% (v/v) BCIP versetzt und der Blot bis zur gewünschten Intensität der Proteinbanden darin inkubiert. Die Farbentwicklung wurde durch Inkubation des Blots in Stoppuffer beendet und der Blot anschließend auf Whatmanpapier getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt.

2.4.9 Deglykosylierung der nativen Ov-GST1a und -1b und der rOv-GST1a aus *C. elegans*

Glykosidasen:

1. Rekominante Peptid-N-Glykosidase F *Flavobacterium meningosepticum* (Roche)
2. Rekombinante Endoglykosidase H *Streptomyces plicatus* (Roche)
3. α -Mannosidase *Canavalin ensiformis* (Oxford GlycoSystems)
4. Endo- β -Galactosidase *Bacteroides fragilis* (Roche)

1. 1 – 2 µg Protein wurden mit 0.5% SDS 10' auf 95°C erhitzt und über Nacht bei 37°C in Peptid-N-Glykosidase F-Puffer (200 mM Na₂HPO₄, 25 mM Na-EDTA, 1% CHAPS, pH 7,3) mit 1 Einheit Peptid-N-Glykosidase F (0,2 U/µl) in einem Endvolumen von 100 µl inkubiert.
2. 1 µg Protein wurde mit 0,06% SDS 5' bei 95°C denaturiert und über Nacht bei 37°C in 0,1 M Natriumacetatpuffer, pH 5,5/0,5mM PMSF mit 0,003 Einheiten Endoglycosidase H (1 mU/µl) in einem Volumen von 50 µl inkubiert.
3. 1 µg Protein wurde mit 0,5 Einheiten α-Mannosidase (0,1 U/µl) in 0,1M Na-Acetatpuffer, pH 5,0/2 mM Zn²⁺ in einem Volumen von 50 µl über Nacht bei 37°C inkubiert.
4. 1 µg Protein wurde mit 0,0025 Einheiten Endo-β-Galactosidase (1 mU/µl) in 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.8 in einem Endvolumen von 80 µl über Nacht bei 37°C verdaut.

Für die SDS-PAGE und Western Blot Analyse wurden die Ansätze unter Vakuumzentrifugation auf ein Volumen von 25 µl eingeengt

Die Deglykosylierung der nativen Ov-GST1a und -1b für die ELISA Analyse erfolgte unter nicht denaturierenden Bedingungen (2' 80°C, -SDS).

2.4.10 Expression der Ov-GloI

Zur Expression wurde das Plasmid pJC40::Ov-GloI in den *E. coli* Bakterienstamm BL21(DE3) transformiert und ein Klon über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator in 10 ml LB-Medium/1 mM ZnSO₄/10% (v/v) Glycerol/50 µg/ml Ampicillin angezogen. Nach Verdünnung der Kultur (1:100 (v/v)) im selben Medium wurde die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ 0,6 bei 37°C inkubiert und die Expression der anschliessend mit 1 mM IPTG induziert. Nach 3h wurde die Bakterienkultur pelletiert (30', 3 500 rpm, 4°C), die Zellen in 10 mM Tris/HCl, pH 7,8 resuspendiert und zum Aufbrechen der Bakterienzellwand 8 x für 30" auf Eis sonifiziert (30 Watt). Nach Ultrazentrifugation bei 100 000 xg (TFT 55.33 Rotor, Centrikon T-1065, Kontron) wurde der Überstand affinitätschromatographisch aufgereinigt.

2.4.11 Enzymkinetik der rOv-GloI

Die kinetischen Konstanten, spezifische Aktivität und das Inhibitorprofil konnten spektrophotometrisch bestimmt werden.

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten der rOv-GloI für Methylglyoxal wurde durch die Zunahme der Absorption bei 240 nm ($\epsilon = 2,86 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) bestimmt, für Phenylglyoxal als Substrat erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 263 nm ($\epsilon = 5,69 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Zur Bestimmung der Konzentration der nichtenzymatisch gebildeten Hemimerkaptale (aus GSH und Methylglyoxal/Phenylglyoxal) wurden die Gleichgewichtskonstanten von 3 mM für

Methylglyoxal bzw. 0,6 mM für die Phenylglyoxalreaktion verwendet. Durch 5' Präinkubation von 2 mM Methylglyoxal/Phenylglyoxal mit 2 mM GSH in 0,05 M NaPhosphat-Puffer, pH 6,6, wurde eine vollständige Hemimerkaptalbildung gewährleistet, bevor die Messung durch Zugabe der entsprechenden Konzentration an rOv-GloI gestartet wurde. Die kinetischen Konstanten wurden aus Werten im proportionalen Bereich von Enzymaktivität (Substratumsatz) und Enzymkonzentration ermittelt. K_m - und V_{max} -Werte wurden durch doppelt-reziproke Plots nach Lineweaver-Burk bestimmt.

Die IC_{50} -Werte für die rOv-GloI wurden unter Konstanthaltung der GSH- und Methylglyoxalkonzentration (Adduktkonzentration: 20 μ M) bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (bis 100 μ M) bei $\lambda = 240$ nm gemessen.

2.4.12 Gelfiltration

Für die FPLC-Analyse der rOv-GloI wurde eine „High Load“ Superdex 75 Säule (16 x 16 cm) verwendet. Nach Äquilibrierung mit 50 mM Tris/HCl, pH 8,0/150 mM NaCl wurden 500 μ g rOv-GloI auf die Säule geladen und bei einer Durchflussrate von 60 ml/h in 2 ml Fraktionen aufgefangen. Die Bestimmung der rOv-GloI-haltigen Fraktionen erfolgte durch die Analyse der enzymatischen Aktivität mit Methylglyoxal als Substrat. Für die Bestimmung des Molekulargewichts des nativen Proteins wurde die Säule mit folgenden Proteinstandards kalibriert: Ferritin (440 000), Katalase (232 000), Aldolase (158 000), Rinderserumalbumin (66 000), Ovalbumin (45 000) und Cytochrom C (12 500).

2.5 Molekularbiologische Methoden

Alle mehrfach konzentrierten Puffer und Medien, sowie die im Labor allgemein zur Verfügung stehenden Lösungen sind unter 2.2: „Puffer und Nährmedien“ angegeben. Verwendete Abkürzungen für Inkubationszeiten: 1 Hochkomma (') steht für Minute, 2 Hochkommata (") für Sekunde.

2.5.1 Plasmid-DNA Präparation

a) Mini-Präparation:

Die Bakterienzellen der Übernachtskultur werden bei 14 000 xg für 2' abzentrifugiert und in 200 μ l STET-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 10 μ l Lysozym aus Hühnereiweiß (10 mg/ml) wurde der Ansatz für 10' auf Eis gestellt, dann 2' im Wasserbad gekocht und die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 14 000 xg/4°C für 15' entfernt. Der Überstand wird mit 500 μ l 6 M NaJ und 5 μ l Glasmilch versetzt, 5' bei RT inkubiert, abzentrifugiert und die DNA/Glasmilch 3 x mit je 400 μ l Waschpuffer gereinigt. Die Probe wird bei 56°C getrocknet und die DNA schließlich durch Zugabe von 80 μ l dH₂O eluiert.

b) Midi-/Maxi-Präparation:

Für Plasmid-Grosspräparationen wurden die Kit-Systeme „Nucleobond Plasmid Midi-Kit“ und „Endofree Plasmid Maxi-Kit“ des Herstellers Qiagen verwendet. Die Präparation erfolgte genau nach Angabe des Herstellers.

2.5.2 Restriktionsverdau

Pro Reaktionsansatz wurden 1 - 10 µg DNA mit den Restriktionsenzymen und Pufferkomponenten entsprechend der Herstellerangaben (Roche) für 1-3h verdaut. Die Restriktionsansätze wurden im Folgenden mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angabe des Herstellers gereinigt.

2.5.3 Ligation

Für die Ligation wurden 10 – 30 ng linearisierter Plasmidvektor-DNA mit 3 bzw. 5 molarem Überschuss an Fragment-DNA nach Herstellerangaben (Promega) mit 1,5 Einheiten T4 DNA-Ligase bei 14°C über Nacht im Wasserbad inkubiert und am folgenden Tag in *E. coli* (Dh5α) transformiert.

2.5.4 Plasmidtransformation in *E. coli*-Zellen

Die Transformation erfolgte nach der Methode von Cohen *et al.*⁹⁶. 100 µl kompetente *E. coli*-Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA für 30' auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschock für 90" bei 42°C wurden 700 µl vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und die Zellen für 30' in den 37°C-Schüttelinkubator gestellt. Anschließend wurden die Zellen bei 6 000 xg 2' pelletiert, in 400 µl frischem LB-Medium resuspendiert und auf LB-AMP-Platten ausgestrichen. Das Wachstum der Kolonien erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

2.5.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurden mit je 2 Einheiten Taq-Polymerase (Roche), Elongase (Gibco BRL) oder *pfu*-Polymerase (Pharmacia) und den entsprechenden Puffersystemen nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die DNA-Konzentration betrug max. 100 ng/100 µl PCR-Ansatz. Die PCR-Konditionen wurden entsprechend der verwendeten Oligonukleotidprimer, der Länge des zu amplifizierenden Fragments und verwendeten Polymerasen variiert.

Angegeben sind die Bedingungen für die Mutagenese PCR zur Erstellung von pPD 49.83 C-term. His und Ov-GST1aM25A unter Verwendung von *pfu*-Polymerase. Nach der PCR wurde das DNA Templat für 1h bei 37°C mit DpnI verdaut und 7 µl des PCR-Ansatzes in Dh5α transformiert.

95°C 30''
95°C 30'' ┐
55°C 1' 14 x
68°C 2'/kb └
4°C ∞

2.5.6 Screening der *O. volvulus* λ-ZapII cDNA-Bank zur Isolierung von Ov-GST3 und Ov-GIol-Klonen

100 ml LB-Medium wurden mit 0,2% Maltose, 10 mM MgSO₄ mit einer Übernachtskultur des *E. coli* Stammes PKLF' angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14 000 xg für 5' wurden die Bakterien in 25 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert und für die Infektion mit den vorher getiterten Phagen der *O. volvulus* λ-ZapII cDNA-Bank für 20' bei 37°C infiziert. Die Ansätze wurden mit 9 ml NZY-Weichagar vermischt, auf NZY-Agarplatten ausplattiert (~ 10 000 Phagenklone/Platte) und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Von jeder Platte wurden 2 Abzüge mit Nitrocellulose-Filtern (Schleicher & Schuell) gemacht. Die Filter wurden in BD1 denaturiert, in BD2 neutralisiert und mit 2 x SSC gewaschen. Die DNA wurde durch Erhitzen der Filter auf 80°C für 30' fixiert und konnte anschliessend für die Hybridisierung verwendet werden. Positive Phagenklone wurden nach dem ersten Screening-Zyklus ausgestochen, in SM-Puffer eluiert und für die 2. Runde erneut ausplattiert. Die in dieser Runde erhaltenen Phagenklone wurden vereinzelt und zur Freisetzung in SM-Puffer überführt.

2.5.7 „In vivo Excision“ vom Phagen λ-ZapII zum Plasmidvektor

Die „In vivo Excision“ der positiven Phagenklone erfolgte nach Vorschrift des Herstellers (Stratagene) entsprechend der Anleitung des „Uni-Zap™ Cloning Kit“. Für die Umwandlung in Plasmidvektoren (pBluescript-SK⁺) wurden *E. coli* Zellen des Stammes XL-1 Blue und die Helfer Phagen R408 verwendet.

2.5.8 Präparation von _{gesamt}RNA von Nematoden

a) Präparation mit TRIZOL™ (Gibco, BRL)

Das Phenol:Guanidiniumthiocyanatgemisch wurde nach Angaben des Herstellers in 10-fachen Überschuss (w/v) zu dem Nematodenpellet gegeben und bis zum Aufschluss der Würmer homogenisiert. Nach einer Zentrifugation bei 12 000 g, 4°C für 15', wurde die RNA 2x mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und 1x mit Chloroform (1:1) extrahiert und bei -70°C mit Ethanol gefällt.

b) Aufschluss der Würmer mit dem Ribolyzer

Zur Gewinnung der RNA aus den Juvenilstadien wurden diese nach Beendigung der Induktionsversuche mit TRIZOL versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen in Gefäße mit feinem Quarzsand überführt. Der Aufschluss erfolgte bei 4°C im Ribolyzer bei Stufe 6, für 3 x 25". Nach einer kurzen Zentrifugation wurde wie unter a) beschrieben fortgefahren.

2.5.9 Radioaktive Markierung von DNA mit α -[³²P]-dATP

Für die Markierung der DNA wurden nach Angaben des Herstellers (Roche) 25 ng DNA mit Hilfe des „Random Primed Labeling Kit“ für 30' bei 37°C mit 50 μ Ci α -[³²P]-dATP inkubiert. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide wurden im Folgenden auf einer Sephadex G50-Säule abgetrennt.

2.5.10 Northern Blot Analyse

Pro Spur wurden 30 μ g RNA in einem 1% Agarose/2,2 M Formamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte über Nacht mit 10 x SSC als Transferpuffer im Kapillarverfahren. Die RNA wurde durch Erhitzen des Blots für 1h bei 80°C fixiert und konnte danach für die Hybridisierung eingesetzt werden.

2.5.11 Hybridisierung von Northern Blots mit radioaktiv-markierter DNA

Die Prähybridisierung des Blots erfolgte für mindestens 1h bei 42°C im Rollofen unter Verwendung einer Hybridisierungslösung aus 50% Formamid/1% SDS/5x SSC/5x Denhardt's/200 μ g/ml denaturierter Heringsspermien-DNA. Nach Zugabe der denaturierten radioaktiv-markierten DNA-Sonde wurde der Blot über Nacht bei 42°C hybridisiert. Unspezifisch gebundene DNA wurde am folgenden Tag durch 2 x Waschen mit 2 x SSC/1%

SDS für 10' bei 50°C und 1 x Waschen mit 1 x SSC/ 1% SDS entfernt. Der Blot wurde bei -70°C für 24h bis zu 1 Woche exponiert (Kodak BioMax).

2.5.12 Reverse Transkriptase-Reaktion

Die Erststrang cDNA-Synthese erfolgte in einem Volumen von 20 µl mit frisch präparierter *gesamt*RNA der Nematoden unter Verwendung eines Oligo-(dT)Nuklotidprimers. Für die Synthese wurden 200 ng RNA mit 25 mM Tris/HCl, pH 8,3/38 mM KCl/1,5 mM MgCl₂/5 mM Dithiothreitol/20 µM dNTP-Mix und 0,2 µM "one-base-anchored" Oligo-(dT) Primer eingesetzt. Nach einer kurzen Denaturierung bei 65°C und der Anlagerung des Primers bei 37°C für 10', wurde die Synthese durch Zugabe von 100 Einheiten "Moloney Murine Leukemia Virus" (M-MLV) Reverse Transkriptase gestartet. Nach 45' bei 42°C wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 75°C für 5' gestoppt und die cDNA bei -20°C gelagert.

2.5.13 Virtuelle Northern Blot Analyse

Verwendete Oligonukleotidprimer:

Oligo-dT/Sal IA, 5' biotinyll. 5'-CTGCGCCAGAATTGGCAGGTCGAC (T)₂₅G/A/C-3'

Oligo-dT/Sal IB 5'-CTGCGCCAGAATTGGCAGGTCGAC-3'

CapFinder B1 5'-GAGAGAACGCGTGACGAGAGACTGACAGGGGGGGGA/T/C-3'

CapFinder B2 5'-GAGAGAACGCGTGACGAGAGACTGACAG-3'

Erststrang cDNA-Synthese und Kopplung an die Avidin-gekoppelten magnetischen „Beads“:

mRNA-BP: 20 mM Tris/HCl, pH 7,8, 2 mM EDTA, 1 M LiCl

mRNA-WP: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,15 M LiCl

cDNA-WP: 50 mM Tris/HCl, pH 8,3, 75 mM KCl

Für die Erststrang cDNA-Synthese wurde die jeweils verwendete Menge *gesamt*RNA für 5' bei 65°C denaturiert. Die Erststrang cDNA-Synthese erfolgte mit Oligo-dT/Sal IA und 1 – 2 µg *gesamt*RNA für 45' bei 42°C und 15' bei 37°C (10 µM Dithiothreitol, 1 mM dNTPs, 2pmol/µl Oligo-dT/Sal IA, 2 pmol/µl CapFinder B1, 100 Einheiten RNAsin, 200 Einheiten M-MLV Reverse Transkriptase, 2 µg Rinderserumalbumin, 2 mM MnCl₂ in 50 mM Tris/HCl, pH 8,3). Die Beads (5 µl/Probe) werden nach 2 x Waschen in mRNA-WP aliquotiert und mit 50 µl mRNA-BP versetzt. Die Kopplung erfolgt bei 37°C für 1h unter Schütteln. Nach 2 x Waschen in mRNA-WP wird die gekoppelte cDNA in 50 µl cDNA-WP aufgenommen und kann durch Lagerung bei 4°C bis zu einer Woche verwendet werden. Für die Vermehrung der cDNA wurden 1 - 5 µl der gekoppelten cDNA eingesetzt.

Die cDNA-Vermehrung erfolgte unter Verwendung von Oligo-dT/Sal IB und CapFinder B2 (1 Einheit Taq Polymerase, 200 µM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 20 pmol/Oligonukleotid) unter den angegebenen standardisierten PCR-Bedingungen, wobei die Anzahl der PCR-Zyklen abhängig von den untersuchten Proben variiert wurde.

95°C	1'	┘
50°C	30"	1 x
72°C	7'	┘
95°C	25"	┘
50°C	30"	8 x
72°C	7'	┘
95°C	25"	┘
50°C	30"	8 x
72°C	8'	┘
95°C	25"	┘
50°C	30"	8 x
72°C	9'	┘

Etwa 5 µl der PCR-Ansätze wurde über Agarose Gelelektrophorese (1%; w/v) aufgetrennt und durch das Kapillarblotverfahren auf Nitrocellulose transferiert. Der Nachweis der cDNA erfolgte durch Digoxigenin-markierte cDNA Proben.

2.5.14 Markierung von cDNA mit Digoxigenin

Für die PCR-Reaktion wurde die Taq-Polymerase und das Puffersystem der Fa. Invitrogen verwendet. Für die Markierung der DNA wurde Dig-11-dUTP (Fa. Roche) eingesetzt.

Die PCR (0,03 µM dTTP, 0,05 µM dGTP, 0,05 µM dCTP, 0,05 µM dATP, 0,016 µM Dig-11-dUTP, 1,5 mM MgCl₂, je 10 pmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer, 1,5 Einheiten Taq-Polymerase in 1 x Gibco BRL-Puffer; Endvolumen: 50 µl) erfolgte unter Standardbedingungen bei einer Elongationstemperatur von 72°C und wurde zeitlich entsprechend der Länge des zu markierenden cDNA Fragments variiert. Die erfolgreiche Markierung der DNA wurde durch Agarose Gelelektrophorese detektiert.

2.5.15 Nachweis Digoxigenin-markierter DNA auf Southern Blots

Die Prähybridisierung des Southern Blots erfolgte mit der Hybridisierungslösung für 2h bei 65°C. Die Digoxigenin-markierte cDNA Sonde wurde für 5' bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zur Hybridisierung in die Hybridisierungslösung gegeben. Der Blot wurde über Nacht bei 65°C im Rollofen hybridisiert und nach Abnahme der Hybridisierungslösung 2 x 5' in 2 x SSC/0,1%SDS (RT) und 2 x 15' in 0,1 x SSC/ 0,1% SDS gewaschen.

Für den Chemilumineszenznachweis wurde der Blot für 5' in Waschpuffer äquilibriert, für 30' mit 100 ml Blockierungslösung bei RT inkubiert und im Folgenden für 1h bei RT mit Anti-

Dig/Alkalische Phosphatase-markiertem Antikörper (1:10 000, v/v) in 1% Blockierungspuffer geschwenkt. Der Blot wurde 2 x 15' mit 100 ml Waschpuffer gewaschen und für 5' in 50 ml Detektionspuffer äquilibriert. Der Nachweis erfolgte mit CSPD („disodium 3-(4-methoxy Spiro (1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}] decan)-4-yl) phenyl phosphate“) als Substrat (1:100, v/v) in Detektionspuffer für 5' im Dunkeln. Der Blot wurde in einer Kassette für 30' bei 37°C inkubiert, mit einem Kodak BioMax™ Film für weitere 30' bei RT exponiert und konnte dann entwickelt werden.

2.5.16 Alkalische Denaturierung von Plasmid-DNA für die Sequenzreaktion mit α -[³⁵S]-dATP

10-15 μ l einer DNA-Minipräparation wurden mit 1 μ l 2 N NaOH für 10' bei 37°C denaturiert und durch Zugabe von 3 μ l 3 M Natriumacetat neutralisiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zusatz des 2,5 x Volumens 96% Ethanol und 30' Inkubation bei -20°C. Nach 20' Zentrifugation (14 000 xg/4°C) wurde die DNA noch einmal mit 70% Ethanol gewaschen und bei 56°C getrocknet.

2.5.17 Sequenzreaktion nach Sanger *et al.*⁹⁷

Für die Sequenzreaktion nach der enzymatischen Didesoxymethode wurden die Reagenzien des „Sequenase Version 2.0 Kits“ (USB, Cleveland, USA) verwendet. Als Isotop wurde Desoxyadenosin 5' α -[³⁵S]-triphosphat eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mit denaturierenden Polyacrylamidgelen.

2.6 C. elegans Methoden

Alle mehrfach konzentrierten Puffer und Medien, sowie die im Labor allgemein zur Verfügung stehenden Lösungen sind unter 2.2: „Puffer und Nährmedien“ angegeben. Verwendete Abkürzungen für Inkubationszeiten: 1 Hochkomma (') steht für Minute, 2 Hochkommata (") für Sekunde.

2.6.1 C. elegans Kulturführung

C. elegans Wildtyp Kulturen wurden auf NGM-Agar mit *E. coli* OP50 bei 25°C gehalten. Die Kultivierung der *phal* Mutanten erfolgte bei 15°C. *C. elegans* Massenkulturen für die RNA-Gewinnung und Proteinexpression wurden in 500 ml Kolben mit 80 ml NGM-Flüssigmedium für 5 Tage gezüchtet. In einigen Fällen wurde das Fungizid Nystatin (1:100, v/v) zugesetzt.

2.6.2 Einfrieren von *C. elegans*

Zum Einfrieren der Würmer wurden Hungerkulturen verwendet. Die NGM-Platte wurde mit M9-Puffer abgespült und im gleichen Verhältnis mit „Freezing Solution“ gemischt. Die Ansätze wurden in einer Styroporbox langsam abgekühlt und nach einem Tag in flüssigen Stickstoff überführt. Bei Bedarf wurden die Proben bei RT aufgetaut und auf NGM-Agar-Platten gegeben.

2.6.3 *C. elegans* Aufreinigung über einen Sucrosegradienten

Die Flüssigkulturen der Würmer wurden zum Absinken der *C. elegans* für 1h auf Eis gestellt, ein Teil des Überstandes abgenommen und die Kultur für 10' bei 4°C, 1500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 50 ml 0.1 M NaCl resuspendiert und wieder für 10' bei 4°C, 1500 rpm zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension des Pellets wurde der Sucrosegradient aus 30 ml 60% Sucrose, 20 ml 0,1 M NaCl aufgebaut, gemischt und bei 4°C und 1200 rpm für 5' zentrifugiert. Die in einem Ring konzentrierten Würmer wurden abgenommen und 2 x mit 50 ml 0,1 M NaCl gewaschen.

2.6.4 *C. elegans* Induktionsversuche

Für die Induktionsversuche wurden gereinigte *C. elegans* Juvenilstadien verwendet. Die Trennung der adulten Tiere von den Juvenilstadien erfolgte mit einem Sieb (40 µm). Die adulten Würmer wurden für die Neuanzucht der Massenkulturen verwendet, die Juvenilstadien wurden zur Erholung für 1h in M9-Puffer geschwenkt. Für die Stressversuche wurden verschiedene Konzentrationen von Dexamethason (0,25, 2 mM) und tert-Butylhydroperoxid (tBOOH; 0,5, 1, 1,5 mM), sowie 50 mM Paraquat eingesetzt. Die Würmer wurden für 1h und 3h (Dexamethason, tBOOH) bzw. 2, 4, 8 und 16h (Paraquat) in M9-Puffer mit der entsprechenden Verbindung inkubiert und zum festgesetzten Zeitpunkt kurz zentrifugiert, mit TRIZOL™ versetzt und bei -196°C gelagert.

2.6.5 Ektopische Überexpression der *Ov-GST1a* in *C. elegans*

Für die Expression der *Ov-GST1a* in *C. elegans* wurden 3 verschiedene DNA-Konstrukte erstellt: die DNA der *Ov-GST1a* ohne Signalpeptid und mit Signalpeptid wurden in den Vektor pPD 49.83 kloniert. Zur Aufreinigung über Ni²⁺-Chelatchromatografie wurde die *Ov-GST1a* mit Signalpeptidsequenz in den Vektor pPD 49.83 mit Expressionskassette für einen C-terminalen His-Schwanz kloniert. Durch Mikroinjektion wurden transgene *C. elegans* Linien erhalten, die nach Hitzeschock die Fremdproteine exprimieren. Für die Expression der Proteine wurden die Würmer für 2h einem Hitzeschock bei 31°C ausgesetzt. Nach einer

weiteren Inkubation für 1h bei 25°C wurden die Würmer abzentrifugiert, homogenisiert und für die SDS-PAGE/Western Blot Analyse eingesetzt bzw. über den His-Schwanz mittels Ni²⁺-Chelatchromatografie aufgereinigt.

2.6.6 *C. elegans* Mikroinjektion

Für die ektopische Überexpression wurde die entsprechende cDNA in pPD 49.83, pPD 49.83 mit C-terminalem His-Schwanz, pPD 118.25 kloniert. Für die GFP-Reportergenexpression wurde pPD 95.77 verwendet. Der 5'-Bereich bis zum Beginn des 2. Exons wurde so kloniert, dass der offene Leserahmen des GFP erhalten blieb.

Die Mikroinjektion der DNA-Konstrukte erfolgte in die Gonaden junger *C. elegans phal* Mutanten (genetischer Knock-out des *phal*-Gens, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert, der die normale Entwicklung des Pharynx steuert). Bei 15°C sind die Mutanten zur Ausbildung eines funktionsfähigen Pharynx in der Lage^{98,99}. Nach Coinjektion des GFP-Konstrukts mit dem Markerplasmid pBX (mit dominantem *phal*-Gen) werden die Würmer bei 25°C kultiviert. Die Folgegeneration ist Träger von Markerplasmid und DNA-Konstrukt.

2.7 Massenspektrometrische Analysen

Alle mehrfach konzentrierten Puffer und Medien, sowie die im Labor allgemein zur Verfügung stehenden Lösungen sind unter 2.2: „Puffer und Nährmedien“ angegeben. Verwendete Abkürzungen für Inkubationszeiten: 1 Hochkomma (') steht für Minute, 2 Hochkommata (") für Sekunde.

2.7.1 Präparation der nativen Ov-GST1a und -1b für die massenspektrometrische Analyse (MS)

Nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung wurde die Ov-GST1a und -1b gegen 10 mM Tris/HCl, pH 8,1/0,1 mM Dithiothreitol/0,02% (w/v) NaN₃ dialysiert. Die Proteine wurden über Nacht bei 37°C mit Trypsin im Verhältnis 30:1 (w/v) in 100 mM Tris/HCl, pH 8,1/0,1 mM Dithiothreitol/0,02% (w/v) NaN₃ verdaut. Nach einer 2. Dialyse gegen 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7,4, wurden die Proteine lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

2.7.2 HPLC und "Electrospray Ionization" (ESI)-MS

100 pmol der tryptisch-verdauten Proteine wurden mit einem Applied Biosystems 172 A Microbore "High-Pressure Liquid Chromatography" (HPLC) System mit einer Aquapore OD-300 C18-Säule (1 x 100 mm) bei einer Durchflussrate von 40 µl/min und einem linearen

Gradienten von 4% - 56% Acetonitril in 0,1% Formolsäure und 4 mM Ammoniumacetat aufgetrennt. Die Elution der Peptide wurde im UV-Bereich bei $\lambda = 214$ nm und durch MS (TSQ 700 Triple-Quadrupole Instrument mit Finnigan ES Ionenquelle) detektiert. In einem präparativen HPLC-Lauf wurden die Glykopeptide manuell aufgefangen und durch Edman-Abbau sequenziert (Applied Biosystems; Modell 475A).

2.7.3 "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight" (MALDI-TOF) MS

Für die MALDI-TOF Analyse wurden die (Glyko-)Peptidfraktionen mit einer Matrix aus 19 mg α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure in 400 μ l Acetonitril und 600 μ l 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure in dH_2O gemessen. Die Probenlösung wurde 1:1 (v/v) mit der Matrix versetzt und die Konzentration der Probenlösung auf 1 – 10 pmol/ μ l eingestellt. Für die Bestimmung der molekularen Massen im MALDI-TOF MS wurde ein Bruker REFLEX time-of-flight Gerät benutzt.

2.7.4 ESI-MS/MS

Für die ESI-MS/MS Analyse wurden die (Glyko-)Peptidproben in Gold-beschichtete Nanospray-Kapillaren (Protana, Odense, Dänemark) gefüllt und orthogonal vor dem Quadrupole "time of flight" Spektrometer (Micromass, Manchester, UK) mit Nanospray Ionenquelle plaziert und eine Spannung von 1000 V angelegt. Bei Kollisions-induzierten Dissoziationsexperimenten wurden die „parent ions“ selektiv vom Quadrupole Spektrometer in die Kollisionsquelle geleitet. Als Kollisionsgas wurde Argon verwendet, die kinetische Energie wurde auf einen Wert von -35 eV eingestellt. Die "daughter ions" wurden dann durch ein orthogonal angeordnetes "Time of Flight" MS-Spektrometer analysiert.

2.7.5 Bestimmung der PGH₂-D₂ Isomeraseaktivität der rOv-GST1a

Lsg. 1: 0,3M NaCl, 5 mM Tryptophan, 0,5 μ M Hämin in 20 mM Na-Phosphat, pH 7,4

Lsg. 2: 5 mM EDTA, 5 mM GSH, pH 6,0 (NaOH)

Lsg. 3: 2 M Zitronensäure

Lsg. 4: 1 mg/ml Triphenylphosphin in Chloroform

a) Cox-1 Test: 30 μ M Arachidonat, 30 Einheiten Cyclooxygenase I (Cox-1)

Lsg. 2 mit der entsprechenden Enzymkonzentration (0,5 μ g – 12 μ g rOv-GST1a) ad 25 μ l. 20 μ l Lsg. 1 mit 30 μ M Arachidonat versetzen, die Ansätze mischen und den Test durch Zugabe von 30 Einheiten Cox-1 starten (3', 37°C, unter Schütteln). Das Stoppen der Enzymreaktion erfolgt durch Abkühlung (Eiswasser) unter Zugabe von Lsg. 3 und 4 im

Verhältnis 1,5:1000 (v/v). Die für die Extraktion der Prostaglandine (PG) verwendete Lsg. 4 muss eisgekühlt sein.

b) PGH₂ Test: 40 µM PGH₂

Testbedingungen und Vorgehensweise entsprechen der für den Cox-1 Test beschriebenen Methode, Lsg. 1 wird ohne Hämin und Tryptophan im Test eingesetzt. Der Test wird hier durch direkte Zugabe des Substrats gestartet und muss dementsprechend auf eine Inkubationszeit von 1,5' – 2' bei 37°C reduziert werden.

2.7.6 Prostaglandin-Extraktion und Vorbereitung für die HPLC-MS Analyse

Die Extraktion der Prostaglandine (PG) aus den Proben erfolgt nach dem Stoppen der Enzymreaktion durch 3 x Zentrifugation mit Lsg. 4 bei 14 000 xg, 4°C für 5'. Zwischen den Zentrifugationsschritten wird von jeder Probe ein festgelegtes, konstant zu haltendes Volumen (hier: 150 µl) des Überstandes abgenommen und bei -70°C gelagert. Nach Zugabe von 150 µl Lsg. 4 werden die Proben kurz gevortext und wieder zentrifugiert. Für die HPLC MS Analyse wird das Chloroform unter Stickstoff abgedampft und die PG mit dem Eluenten (Ameisensäure: dH₂O: Trifluoressigsäure) im Verhältnis 31:69:0,02 (v/v/v) versetzt. Die Messungen und Identifizierung der PG wurden von Hrn. Rainer Rickert, Fachbereich Lebensmittelchemie, der Universität Hamburg durchgeführt. Die Auswertung der enzymabhängigen PG-Bildung erfolgte durch die Quantifizierung der Flächenintegrale der PG-Peaks als % detektierbare PG/MS Analyse. Die Reproduzierbarkeit dieser Enzymtests ist abhängig von der genauen Einhaltung der Reaktionszeit bis zum Stoppen, der Kühlung aller Komponenten sowie übereinstimmenden Extraktionsmengen der PG. Eine Quantifizierung der PG ist mit diesem Verfahren dennoch nicht möglich.

2.8 Immunbiologische Methoden

Alle mehrfach konzentrierten Puffer und Medien, sowie die im Labor allgemein zur Verfügung stehenden Lösungen sind unter 2.2: „Puffer und Nährmedien“ angegeben. Verwendete Abkürzungen für Inkubationszeiten: 1 Hochkomma (') steht für Minute, 2 Hochkommata (") für Sekunde.

2.8.1 Synthese der 17-mer Peptide der N-terminalen Verlängerung der Ov-GST1a

Die folgenden, überlappenden Peptide wurden, gekoppelt an Poly-L-Lysin, durch die Fa. IPF PharmaCeuticals GmbH synthetisiert und im ELISA verwendet:
(ASSNANQAITSENSIKP)8K7A, (AITSSENSIKPKGKLPQ)8L7A

2.8.2 „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Die Antikörperantwort auf die N-Glykane, die N-terminale Verlängerung und die N-terminalen Peptide wurde durch einen "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA) ermittelt. Die optimale Konzentration für die Beschichtung der ELISA-Platten mit den Antigenen, und die optimalen Serumverdünnungen wurden durch Titration mit einem Serenpool *O. volvulus*-infizierter Patienten ermittelt. Die nativen Proteine wurden nach Dialyse gegen 0,1 M Natriumcarbonatpuffer, pH 9,6, in einer Konzentration von 1 µg/ml kovalent an die aktivierten CovaLink NH Platten (Nunc) gekoppelt. Die rekombinanten Proteine wurden in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt. Nach Inkubation über Nacht bei RT wurden die Platten 3 x mit dH₂O gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5% (w/v) Magermilchpulver/PBS, pH 7,5 blockiert. Alle Seren wurden in einer Verdünnung von 1:400 (v/v) eingesetzt. Gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humane Immunglobuline G (IgG) und mit Tetramethylbenzidin als Substrat detektiert. Zwischen jedem Inkubationsschritt wurden 5 Waschschrte mit PBS/0,05% TWEEN 20 (v/v) durchgeführt. Die Substratreaktion wurde mit 0,5 M H₂SO₄ gestoppt und die optische Dichte bei $\lambda = 450$ nm bestimmt. Die Seren Mikrofilarien-positiver Patienten (38 Proben) stammten aus Guinea und Benin, ebenso die afrikanischen Kontrollseren Onchocerca-negativer Personen. Für den Test der Kreuzreaktivität der N-terminalen Verlängerung wurden Onchocerca-negative Seren von Patienten mit anderen Helmintheninfektionen (3 Seren von Patienten mit *Schistosoma mansoni* bzw. *Loa loa* Infektion, 4 Serenpools je 3 Seren *Trichinella spiralis*-infizierter Patienten, 5 Pools je 3 Seren *Ascaris lumbricoides*-infizierter Personen, 5 Pools je 2 Seren *Brugia malayi*- bzw. *Wuchereria bancrofti*-infizierter Personen) verwendet. Die Spezifität der Bindung wurde durch Kopplung ubiquitärer, cytosolischer Proteine an die Platte überprüft. Als Positivkontrolle wurde auf jeder Platte ein Serum eines Patienten mit generalisierter Onchocerciasis und bekannter, hoher Antikörperkonzentration getestet. Nur Werte mit Variationen < 10% pro Platte und verschiedener Platten untereinander wurden in die statistische Auswertung einbezogen. Unterschiede zwischen den Daten der 2 Gruppen (+/- N-terminale Verlängerung, +/- N-Glykane) wurden mit dem Mann-Whitney U-Test und gepaartem bzw. ungepaartem Wilcoxon-Test analysiert. Ein P-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der *Ov*-Glol

3.1.1 Isolierung der cDNA der *Ov*-Glol und Northern Blot Analyse

Für die Isolierung der *O. volvulus* Glyoxylase I (*Ov*-Glol) wurde eine λ Uni-Zap XR cDNA-Bank genutzt, welche für die Untersuchung überexprimierter Gene nach Behandlung mit dem Mikrofilarizid Ivermectin erstellt worden war. Die cDNA-Bank wurde mit dem *E. coli* Stamm XL1-Blue als Wirtsbakterien für die Phagen ausplattiert und rekombinante Klone isoliert und sequenziert. Der Sequenzvergleich eines PCR-Produkts bei einer BLAST Datenbanksuche führte zur Identifizierung der *Ov*-Glol aufgrund konservierter Bereiche der abgeleiteten Aminosäure (AS-) Sequenz. Die vollständige cDNA von 579 bp konnte aus dieser Bank isoliert werden und bildet einen offenen Leserahmen von 193 Aminosäuren (Abb 3.1.1.B).

Durch Hybridisierung eines Northern Blots mit der vollständigen cDNA der *Ov*-Glol als Sonde konnte gezeigt werden, dass die *Ov*-Glol, in Übereinstimmung mit der Grösse der isolierten cDNA, als einzelnes Transkript von ~ 600 bp vorliegt (Abb. 3.1.1.A).

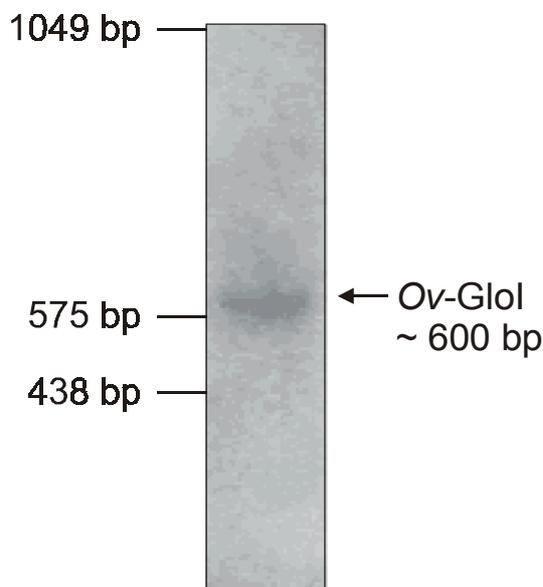


Abb. 3.1.1.A Northern Blot Analyse der *Ov*-Glol

Ein Northern Blot mit *O. volvulus* _{gesamt}RNA (25 μ g/Spur) wurde mit der vollständigen α -[32 P]-dATP-markierten cDNA der *Ov*-Glol hybridisiert. Die detektierte Bande entspricht mit 600 bp etwa der Grösse der cDNA.

3.1 Ergebnisse *Onchocerca volvulus* Glyoxylase I

5' -	M	G	S	T	Q	C	E	S	G	G	S	S	N	I	A	G	P	17 AS
	ATG	GGC	TCG	ACT	CAG	TGC	GAA	TCA	GGA	GGA	AGC	AGC	AAC	ATT	GCC	GGA	CCG	51 bp
	I	P	A	D	E	I	F	Q	Q	T	M	L	R	I	K	T	L	34
	ATC	CCA	GCT	GAC	GAA	ATC	AAA	ACA	TTG	GTA	AAA	GAA	CCA	CCG	CCA	GAA	ACG	102
	V	K	E	P	P	P	E	T	N	D	F	Y	K	D	P	R	K	51
	AAT	GAT	TTT	TAT	TTC	CAG	CAA	ACA	ATG	TTG	CGT	ATT	AAA	GAT	CCT	CGG	AAA	153
	T	L	P	F	Y	C	N	V	L	G	M	R	L	L	K	Q	M	68
	ACG	TTG	CCA	TTT	TAT	TGT	AAT	GTT	TTG	GGG	ATG	AGA	TTA	TTG	AAA	CAA	ATG	204
	D	Y	P	D	G	K	F	S	L	Y	F	V	G	Y	K	P	A	85
	GAC	TAC	CCA	GAT	GGG	AAA	TTC	TCT	TTA	TAT	TTT	GTG	GGT	TAT	AAG	CCA	GCA	255
	S	E	I	P	N	D	P	I	E	Q	K	R	Y	A	L	S	T	102
	TCA	GAA	ATC	CCT	AAT	GAT	CCT	ATA	GAA	CAG	AAA	CGC	TAT	GCG	CTG	TCA	ACA	306
	L	A	T	I	E	L	T	H	N	W	G	T	E	N	D	P	N	119
	TTG	GCA	ACG	ATC	GAA	TTA	ACT	CAT	AAT	TGG	GGT	ACC	GAG	AAC	GAT	CCG	AAT	357
	F	N	Y	H	N	G	N	K	E	P	R	G	F	G	H	I	G	136
	TTC	AAT	TAT	CAT	AAT	GGA	AAT	AAA	GAA	CCG	CGC	GGT	TTC	GGT	CAC	ATC	GGT	408
	I	A	V	K	D	V	Y	A	A	C	K	R	F	E	E	L	G	153
	ATA	GCG	GTA	AAG	GAT	GTA	TAT	GCG	GCA	TGT	AAA	CGT	TTT	GAA	GAA	TTG	GGC	459
	V	Q	F	V	K	K	P	D	D	G	R	M	K	G	L	A	F	170
	GTT	CAG	TTC	GTG	AAG	AAG	CCC	GAC	GAT	GGT	CGC	ATG	AAA	GGA	TTA	GCA	TTC	510
	I	Q	D	P	D	G	Y	W	I	E	I	F	N	P	H	T	D	187
	ATT	CAG	GAT	CCA	GAT	GGT	TAT	TGG	ATC	GAA	ATA	TTT	AAT	CCC	CAT	ACT	GAT	561
	N	Y	L	L	N	V	#											193
	AAT	TAT	CTT	TTG	AAT	GTG	TAA	-	3'									582

Abb. 3.1.1.B cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz der Ov-GloI

Der offene Leserahmen der Ov-GloI umfasst 579 Basenpaare (bp) und codiert für ein Protein von 193 Aminosäuren (AS).

3.1.2 Sekundärstrukturanalyse der Ov-GloI und Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Glyoxylasen anderer Organismen

Der offene Leserahmen der Ov-GloI kodiert für ein Protein mit einer berechneten molekularen Masse von 21 930 Da und einem theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 5,59. Durch BLAST Datenbanksuche mit der abgeleiteten AS-Sequenz der Ov-GloI wurden Homologien [% Ähnlichkeit] zu GloI von *Drosophila melanogaster* (Genbank-Nr. AAF59267) [72%], *Homo sapiens* (S63603) [71%], *Lycopersicon esculentum* (Q42891) [64%] und *Pseudomonas putida* (P16635) [58%] festgestellt (Abb. 3.1.2.A). Die hohe Identität der AS-Sequenz der Ov-GloI in bekannten, für die katalytische Aktivität der GloI essentiellen Bereichen bestätigt, dass es sich bei der Ov-GloI um eine GloI handelt.

3.1 Ergebnisse *Onchocerca volvulus* Glyoxylase I

<i>Ov-GloI</i>	1	MGSTQCESGGSSNIAGPIPADEIKT	LVKEFFFEETNDFYFCOTMLRIKDFRKTLLFFYCNVL
AAF59267	1	-----MGDVTGLSNAQADELCQKPESS	TKDFLFCOTMYRIKDFRKSLLFFYTGVV
S63603	1	-----MAEPQPPSGGLTDEAALS	CCSDADPSTKDFLLCOTMLRVKDFKSLDFYTRVL
Q42891	1	-----MASESKDSPSNNPGLHAT	EDFATKGYFLCOTMERIKDFKVSLEFYSKVL
P16635	1	-----MSLNDLNTLFGVTAQAD	FATAQCFVFNFTMLRVKDIKSLDFYTRVL
<i>Ov-GloI</i>	61	GMRLIKQMDYFDGKFSLYFVGYKPA	SEIFNDHIEQRRYALSTLATIELTHNWGTENDFNF
AAF59267	50	GMILLVKLDFPEAKFSLYFLGYEN	ATDVFKDFKQRRSWALS
S63603	54	GMILLQKCDFFIMKFSLYFLAYED	KNDIFKEKLEKIAWALS
Q42891	50	GMSLLRKLDPEEMKFSLYFMGYED	TASAFSDFVERTAWTFSCKSTLELTHNWGTESDFNF
P16635	47	GFKLVDRDFVEAKFSLYFLALVDP	ATIPALDDARHCWMSIPGVLELTHNWGTERDADF
<i>Ov-GloI</i>	121	N-YHNGNKEPRGFGHIGI	AVKDVYAACKRFEELGVCFVKKPDDGRMKGLAFICDPDGYWI
AAF59267	110	N-YHGNIDPRGFGHIGIMV	PDVYAACKRFEELGVDFVKKPDDGRMKGLAFIKDPDGYWI
S63603	114	S-YHNGNSDPRGFGHIGI	AVPDVYSACKRFEELGVCFVKKPDDGRMKGLAFICDPDGYWI
Q42891	110	TGYHNGNSEPRGFGHIGV	TVLDVYKACERFESLGVEFVKKFLDGMKGLAFIKDPDGYWI
P16635	107	A-YHGNIDPRGFGHICV	SVPDVVAACERFEALQVFCRRLSDGRMNEHLAFIKDPDGYWV
<i>Ov-GloI</i>	180	EIFNPHTDNYLLNV--	
AAF59267	169	EIFNAHSV-----	
S63603	173	EITLNENKMATLM----	
Q42891	170	EIEDTKIIKDAAGSAS	
P16635	166	EVIQETPL-----	

Abb. 3.1.2.A Alignment der Ov-GloI mit verschiedenen homologen Proteinen

Vergleich der Sequenzen der Ov-GloI mit GloI von der *Drosophila melanogaster* (AAF59267), dem Menschen (S63603), der Kartoffel (Q42891) und der *Pseudomonas putida* GloI (P16635). Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, konservierte AS-Austausche sind grau dargestellt, sofern sie in mindestens 3 der 5 Sequenzen vorkommen.

Die Sekundärstrukturanalyse (Programm. JNet; <http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/>) zeigt eine für katalytisch-aktive GloI typische Anordnung von 4 langen α -Helices und 8 β -Faltblattstrukturen, welche für die Ausbildung der $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ und $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ Topologie der Homodimerstruktur der GloI verantwortlich ist (Abb. 3.1.2.B). Die monomere Struktur der Ov-GloI ist durch einen langen, flexiblen N-terminalen Bereich gekennzeichnet und besteht im Folgenden aus zwei Domänen (Domäne 1: Aminosäuren 39 – 118, Domäne 2: 124 – 181), welche durch 17 Aminosäuren verbunden sind (Abb. 3.1.2.C). In beiden Domänen ist das $\beta\alpha\beta\beta$ Motif strukturbildend.

Aufgrund der bekannten Kristallstruktur der humanen GloI und der hohen Sequenzidentität von > 60% mit der Ov-GloI war eine Zuordnung der für die katalytische Aktivität essentiellen Aminosäuren möglich (Abb. 3.1.2.B). Neben den für die GSH-Bindung notwendigen Aminosäuren R45, N111 und R130, sind auch die für die Bindung zweier Zn^{2+} -Ionen verantwortlichen Aminosäuren Q40, E107 (Beteiligung an der Bindung durch Untereinheit A) und H134, E180 (Untereinheit B) an äquivalenten Positionen in der Ov-GloI vorhanden. Die zwei hydrophoben Substratbindungstaschen liegen in der Dimerisierungsebene des Enzyms und werden durch Aminosäuren beider Untereinheiten gebildet. Der Vergleich AS-Reste von Ov-GloI und dem humanen Enzym (*Hs-GloI*) an diesen Positionen (*Ov-GloI/Hs-GloI*) zeigt, dass neben den identischen Resten (F75/F68, L77/L70, F79/F72, L100/L93, M165/M158, L168/L161, F170/F163) einige konservierte AS-Austausche (M68/C61, Y70/F63, G73/M66,

F182/L175, L191/M184) vorkommen, die zu Unterschieden in der Grösse der Bindungstaschen beider Enzyme führen. Von Bedeutung für die Substratspezifität der Ov-GloI ist sicher der Austausch von K96/I89 und D187/M180, wodurch die Bindungstaschen des Dimers einen hydrophilen, geladenen Charakter erhalten, während diese bei der GloI des Menschen ausschließlich von hydrophoben ungeladenen Aminosäuren gebildet werden.

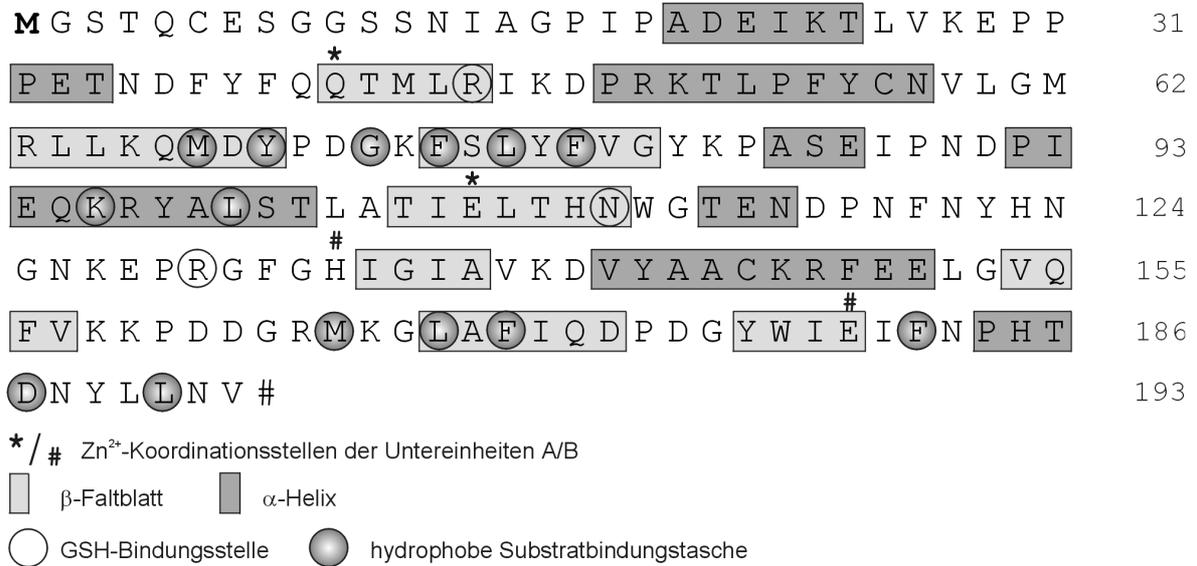


Abb. 3.1.2.B Sekundärstrukturanalyse der Ov-GloI

Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der Ov-GloI und aller für die katalytische Aktivität relevanten Aminosäuren (Kreis: für die GSH-Bindung verantwortliche Aminosäuren; dunkelgrau unterlegter Kreis: Aminosäuren der hydrophoben Substratbindungstaschen). In der enzymatisch-aktiven, dimerisierten Form beteiligen sich beide Domänen des jeweiligen Monomers an der Ausbildung der zwei Substratbindungstaschen und Zn²⁺-Bindungsstellen. Die erste Domäne eines Monomers umfasst die Aminosäuren bis ~ Position 120, die folgenden Aminosäuren werden der Domäne 2 zugeordnet. Substratbindungstasche 1 wird von Domäne 1 der Untereinheit A (UEH A) und Domäne 2 der UEH B gebildet, entsprechend setzt sich Substratbindungstasche 2 aus Domäne 2 der UEH A und Domäne 1 der UEH B zusammen. Die für die Zn²⁺-Bindung verantwortlichen Aminosäuren der jeweiligen UEH sind mit */# markiert, β-Faltblatt- und α-Helixbereiche sind hell-/dunkelgrau eingefasst.

3.1 Ergebnisse *Onchocerca volvulus* Glyoxylase I

Domäne1	1	MGSTQCESGGSSNIAGPIPADEIKTLVKEPPPETNDFYEQQTMIRIKDPRKTLPFYCNVL
Domäne2	124	-----NGNKEPRGFHIGLAVKDVYAACKRF-EEL
Domäne1	61	GMRLLKQMDYPDGKFSLYFVGYKPAEIPNDPIEQKRYALSTLATETHTNNGTENDPNF
Domäne2	153	GVQFVKKPDDGRMKGLAFIQD-PDG-----YWLKLF-NPHLDNYLLN
Domäne1	121	NYH
Domäne2	193	V--

Abb. 3.1.2.C Alignment der zwei Domänen einer Untereinheit der Ov-GloI basierend auf der strukturellen Ähnlichkeit

Die beiden Domänen eines Monomers sind einander sehr ähnlich (16 identische AS, 8 konserviert ausgetauschte AS) und in ihrer Funktion bei der katalytischen Reaktion der Ov-GloI äquivalent. Verbunden sind die Domänen durch eine Region von 17 Aminosäuren. Die Bildung jedes aktiven Zentrums einer UEH, erfolgt durch die Zusammenlagerung je einer Domäne eines Monomers zum katalytisch-aktiven Dimer mit zwei aktiven Zentren.

3.1.3 Rekombinante Expression der Ov-GloI und Bestimmung des Molekulargewichts des enzymatisch aktiven Enzyms

Für die Expression der Ov-GloI wurde die cDNA beginnend mit dem Startcodon in das Expressionsplasmid pJC40 kloniert. Die Expression in dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) führte zur Bildung eines Proteins von ~ 25 000 Da (Abb. 3.1.3.A, Spur C). Dies stimmt mit der kalkulierten molekularen Masse von ~ 25 000 Da inklusive der N-terminalen His-Verlängerung, sehr gut überein. Die Ov-GloI wurde mittels S-Hexyl-Glutathion-Sepharose affinitätschromatografisch aufgereinigt (Abb. 3.1.3.A, Spur D) und nach Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 in den Enzymtests eingesetzt. Aus 1 l Bakterienkultur konnten ~ 6 mg Protein aufgereinigt werden. Die Aufreinigung und Lagerung bei -20°C beeinflussten die Enzymaktivität nicht.

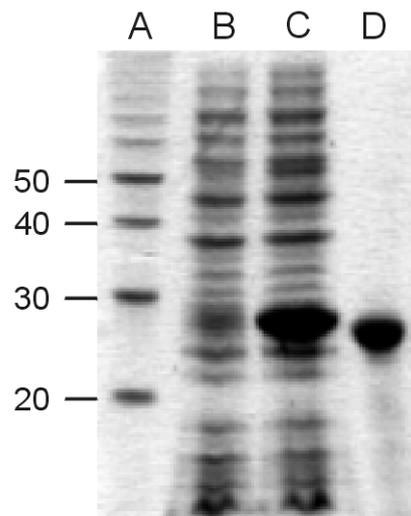


Abb. 3.1.3.A Rekominante Expression und Aufreinigung der rOv-GloI

Coomassie-Färbung eines SDS/PAGE [15% (w/v) Gel]. Spur A, Proteinmarker (Angaben der molekularen Massen in kDa auf der linken Seite); Spur B, *E. coli* BL21 (DE3) Lysat mit pJC40::Ov-GloI, ohne Induktion der Expression durch IPTG; Spur C, *E. coli* BL21 (DE3) Lysat mit pJC40::Ov-GloI nach Induktion mit IPTG; Spur D, affinitätschromatografisch aufgereinigte rOv-GloI.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der enzymatisch-aktiven rOv-GloI wurde eine FPLC-Gelfiltration durchgeführt. Die molekulare Masse der aktiven rOv-GloI wurde mit 45 000 Da ermittelt und entspricht damit der eines Dimers.

3.1.4 Bestimmung der kinetischen Konstanten und Erstellung eines Inhibitorprofils für die Ov-GloI

Um die katalytischen Eigenschaften der rOv-GloI zu bestimmen, wurden die kinetischen Konstanten für das physiologische Substrat Methylglyoxal und für das, aufgrund des addierten Phenolrestes, deutlich hydrophoberen Substrats Phenylglyoxal unter Standardbedingungen spektrophotometrisch bestimmt (Tab. 3.1.4.A).

Die rOv-GloI besitzt mit $284 \pm 32 \mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg Protein eine hohe spezifische Aktivität für das physiologische Substrat Methylglyoxal. Die spezifische Aktivität für Phenylglyoxal beträgt $105 \mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg Protein. Die K_m -Werte von $340 \mu\text{M}$ für Methylglyoxal und $311 \mu\text{M}$ für Phenylglyoxal sind als äquivalent anzusehen, d. h. keines der beiden Substrate wird bevorzugt umgesetzt. Die Wechselzahl pro katalytischem Zentrum der rOv-GloI beträgt $11\,900 \text{ min}^{-1}$ für Methylglyoxal, bzw. $4\,900 \text{ min}^{-1}$ für Phenylglyoxal und liegt damit im unteren, für GloI erwarteten Bereich. Die k_{cat}/K_m -Werte von $3,52 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für Methylglyoxal und

$1,57 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für Phenylglyoxal zeigen aber deutlich die hohe katalytische Effizienz dieses Enzyms.

Substrate	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	$10^7 \times k_{\text{cat}}/K_m$ ($\text{M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)
Methylglyoxal	340 ± 53	11 900	3,52
Phenylglyoxal	311 ± 10	4 900	1,57

Tab. 3.1.4.A Kinetische Konstanten der rekombinanten Ov-GloI

Die freie GSH-Konzentration betrug bei allen Messungen 0,1 mM. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei Einzelbestimmungen.

Der inhibierende Einfluss verschiedener hydrophober Verbindungen auf die Glo-Aktivität wurde unter Standardbedingungen mit Methylglyoxal als Substrat spektrophotometrisch bestimmt und die Inhibierung in Form von IC_{50} -Werten angegeben (Tab. 3.1.4.B). Durch das Hydroxynaphtochinonderivat Lapachol und das Polyhydroxyflavon Fisetin, welche als wirksame Glo-Inhibitoren bekannt sind, ließ sich die Aktivität der rOv-GloI bis zu einer Konzentration von 100 μM nicht inhibieren. Eine Präinkubation des Enzyms mit S-Nitrosoglutathion, welches durch die Bildung eines gemischten Disulfids mit einem konservierten Cysteinrest zu einer Konformationsänderung und darauffolgender Inhibierung des Enzyms führen soll, beeinflusste die nicht Aktivität der rOv-GloI bis zu einer Inkubation mit 100 μM . Als bekannte Inhibitoren der GloI aus dem Menschen (*Hs-GloI*) und der GloI aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden weiterhin Purpurogallin (IC_{50} -Wert: 15 μM), Dichlorophen (48 μM), Quercetin (74 μM), S-Hexyl-Glutathion (113 μM) und das Medikament Oxibendazol (107 μM) getestet. Mit der Ausnahme von Purpurogallin haben sich damit alle bekannten Glo-Inhibitoren als schwache rOv-GloI-Inhibitoren erwiesen und bestätigen damit den Unterschied der hydrophoben Substratbindungstaschen im Vergleich zu GloI anderer Organismen.

Inhibitoren	IC ₅₀ -Werte (µM)
Lapachol	keine Inhibierung bis 100
Fisetin	“
S-Nitrosoglutathion	“
Purpurogallin	15
Dichlorophen	48
Quercetin	74
Oxibendazol	107
S-Hexyl-Glutathion	113

Tab. 3.1.4.B Einfluss bekannter Glyoxylase I-Inhibitoren auf die Enzymaktivität der rOv-GloI

Die Inhibitoren wurden unter Standardbedingungen mit Methylglyoxal als Substrat gemessen. Die angegebenen IC₅₀-Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

3.2 Untersuchungen zur Ov-GST1a und -1b

3.2.1 Analyse der N-Glykanstruktur der Ov-GST1a und -1b

3.2.1.1 Aufreinigung der nativen Ov-GST1a und -1b und Bestimmung des Mengenverhältnisses von Ov-GST1a:Ov-GST1b in *O. volvulus*

Die Ov-GST1a und -1b gehören zu den GSH-bindenden GST von *O. volvulus*. Die Aufreinigung der GST erfolgte aus dem Homogenat von 30 weiblichen Würmern. Nach Zentrifugation bei 100 000 xg wurde der Überstand affinitätschromatografisch über GSH-Sepharose gereinigt. Aus einem Weibchen konnten mit diesem Verfahren etwa 0,5 µg gereinigte Ov-GST1 gewonnen werden. Die molekulare Masse der nativen GSH-bindenden Ov-GST beträgt etwa 24 kDa (Ov-GST2), 31 und 34 kDa (Ov-GST1a und -1b). Für weitere Analysen wurden ausschließlich die Eluate verwendet, in denen Ov-GST1, aber keine Ov-GST2 vorlag (Abb. 3.2.1.1.A, Spur A). Aufgrund der AS-Sequenz der Ov-GST1a und -1b beträgt die erwartete molekulare Masse beider Proteine ~ 26 000 Da. In Spur B (Abb. 3.2.1.1.A) ist zum Vergleich die in *E. coli* rekombinant exprimierte, enzymatisch aktive rOv-GST1a aufgetragen. Da die AS-Sequenzen beider Proteine 4 (Ov-GST1a) bzw. 5 (Ov-GST1b) potentielle N-Glykosylierungsstellen aufweisen, war von einer posttranslationalen Modifikation beider Proteine auszugehen (Abb. 3.2.1.2.A). Dies konnte durch vollständige Deglykosylierung mit N-Glykanase F (Abb. 3.2.1.1.A, Spur C) und Endoglykosidase H (Abb. 3.2.1.1.A, Spur D) bestätigt werden. Die breitere Spur der Ov-GST1a (Abb. 3.2.1.1.A,

Spur A) ist damit durch die Mikroheterogenität der Kohlenhydrate zu erklären. Die Ov-GST1b ist im Vergleich zur Ov-GST1a nur als sehr schwache Bande im SDS-PAGE zu erkennen.

Um das Vorkommen der 2 verschiedenen Isoformen der Ov-GST1 zu bestätigen, wurde eine HPLC-Massenspektrometrie (-MS) Analyse durchgeführt. Die nativen Ov-GST wurden mit Trypsin verdaut und durch HPLC-MS auf die Abundanz zweier theoretischer Spaltprodukte hin untersucht, welche sich nur in einer Position in ihrer Sequenz unterscheiden (₉₉FGLLD_{TND}[A]WEEAK₁₁₁; ₁₁₂I_{MAAVLNID}[E]ELFQK₁₂₅; Aminosäuren der Ov-GST1b in Klammern). Durch „Electrospray Ionization“ (ESI-) MS/MS Peptidsequenzierung der gesammelten Fraktionen eines präparativen HPLC-Laufs konnten die erwarteten, für Ov-GST1a bzw. -1b spezifischen Fragmente eindeutig identifiziert werden. Das Verhältnis von Ov-GST1a zu Ov-GST1b bei dieser Bestimmung betrug 7 : 1 (Abb. 3.2.1.1.B).

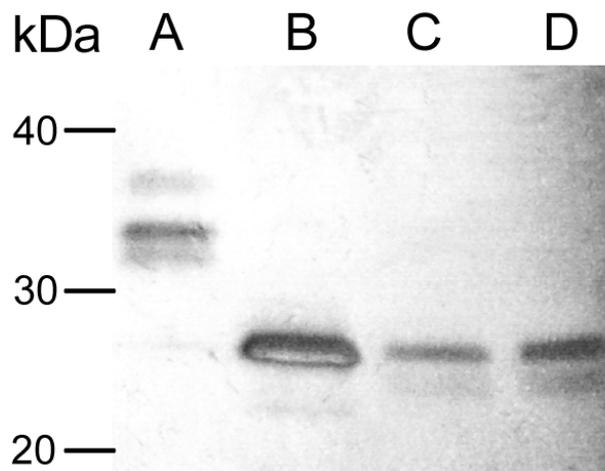


Abb. 3.2.1.1.A Affinitätschromatographische Aufreinigung und Deglykosylierung der nativen Ov-GST1a und -1b

Auftrennung der über GSH-Sepharose gereinigten Ov-GST1a und -1b in einem 12,5% (w/v) SDS-PAGE. Die nativen Proteine (Spur A) weisen eine molekulare Masse von ~ 31 kDa (Ov-GST1a) bzw. ~ 33 kDa (Ov-GST1b) auf. Die Breite der Banden (v. a. der Ov-GST1a) ist auf die Mikroheterogenität der Kohlenhydrate zurückzuführen. In Spur B ist die in *E. coli* exprimierte rOv-GST1a aufgetragen, Spur C zeigt die deglykosylierten Proteine nach N-Glykanase F Behandlung, Spur D zeigt die Ov-GST1a und -1b nach Deglykosylierung mit Endoglykosidase H.

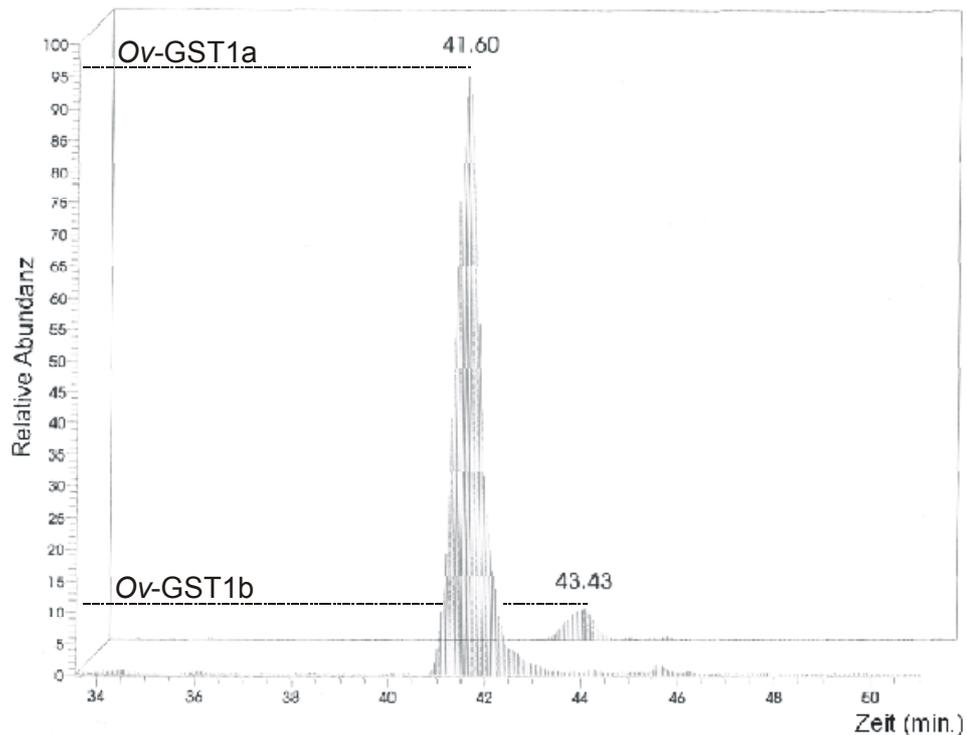


Abb. 3.2.1.1.B Darstellung der Mengenverhältnisse von *Ov*-GST1a:*Ov*-GST1b in *O. volvulus* durch HPLC-MS Analyse

Durch Trypsin-Verdau der nativen *Ov*-GST1a und -1b entstehen trotz der hohen Identität der AS-Sequenzen spezifische Spaltprodukte. Durch die Analyse der Peptidfragmente mit HPLC-MS konnte die Abundanz der *Ov*-GST1a und -1b, hier dargestellt für die spezifischen Spaltprodukte ${}_{99}\text{FGLLG TND[A]WEEAK}_{111}$ (*Ov*-GST1b in Klammern), in *O. volvulus* mit 7:1 (*Ov*-GST1a:-1b) bestimmt werden.

3.2.1.2 Vergleich der Aminosäuresequenzen der *Ov*-GST1a und *Ov*-GST1b und Sekundärstrukturanalyse

Der offene Leserahmen der *Ov*-GST1a und -1b kodiert für 2 Vorläuferproteine von 250 Aminosäuren mit einem identischen Signalpeptid von 25 Aminosäuren (Abb. 3.2.1.2.A). Aufgrund des Peptidrückgrats ergibt sich für die reifen Proteine nach Abspaltung des Signalpeptids ein Molekulargewicht von 25 688,5 bzw. 25 829,7 (*Ov*-GST1a; *Ov*-GST1b). Geringe Unterschiede in der cDNA-Sequenz der beiden Isoformen führen zu insgesamt 10 AS-Austauschen. Beide Proteine besitzen eine ungewöhnliche N-terminale Verlängerung von 24 Aminosäuren, welche keine Homologie zu anderen bekannten GST aufweist. Genau in diesem Bereich liegen 4 der 10 AS-Austausche, wodurch es in der *Ov*-GST1b zur Ausbildung einer 5. potentiellen N-Glykosylierungsstelle kommt (Abb. 3.2.1.2.A; dunkelgrau unterlegt). Weiterhin verleihen die Austausche von nicht-polaren, hydrophilen Resten der *Ov*-GST1a, gegen geladene Aminosäuren in äquivalenter Position der *Ov*-GST1b in diesem Bereich, der Verlängerung der *Ov*-GST1b einen eher hydrophilen Charakter. Die N-

Gykosylierungsstellen der Ov-GST1a und -1b liegen, abgesehen von der zusätzlichen potentiellen N-Glykosylierungsstelle der Ov-GST1b an Position N6 in der N-terminalen Verlängerung, an identischen AS-Positionen: N50, N79, N134 und N144 (s. Abb. 3.2.1.2.A). Ein Alignment der Ov-GST1a und -1b mit GST aus verschiedenen Klassen zeigt, dass die Ov-GST1a und -1b eine große Homologie zu den Enzymen der Sigma-Klasse aufweisen (s. Kap. 3.2.3.1, Abb. 3.2.3.1.A), besonders zu den GST vom Tintenfisch und zu der hämatopoetischen Prostaglandin D Synthetase (hPGDS) der Ratte. Die Sekundärstrukturanalyse der Ov-GST1a und -1b, basierend auf der bekannten Kristallstruktur der GST vom Tintenfisch (PDB-Code: 1GSQ), zeigte, dass die Ov-GST1a und -1b die typische GST-Domänenstruktur aufweisen. Die Domäne 1 der Ov-GST1 wird aus 4 kurzen β -Faltblattstrukturen gebildet (Abb. 3.2.1.2.A, hellgrau), die im enzymatisch aktiven Homodimer für die GSH-Bindung verantwortlich sind. Als typisch für die GST der Sigma-Klasse, kann die Domäne 2 angesehen werden, welche aus 8 (anstelle von 7 typischen) α -Helices gebildet wird (Abb. 3.2.1.2.A, dunkelgrau unterlegt). Diese Domäne ist für die Ausbildung der hydrophoben Bindungstasche und damit für die Substratspezifität der GST verantwortlich. Aufgrund der Sekundärstrukturvorhersage kann davon ausgegangen werden, dass die N-Glykane das gesamte Peptidrückgrat der Ov-GST1 bedecken und abschirmen.

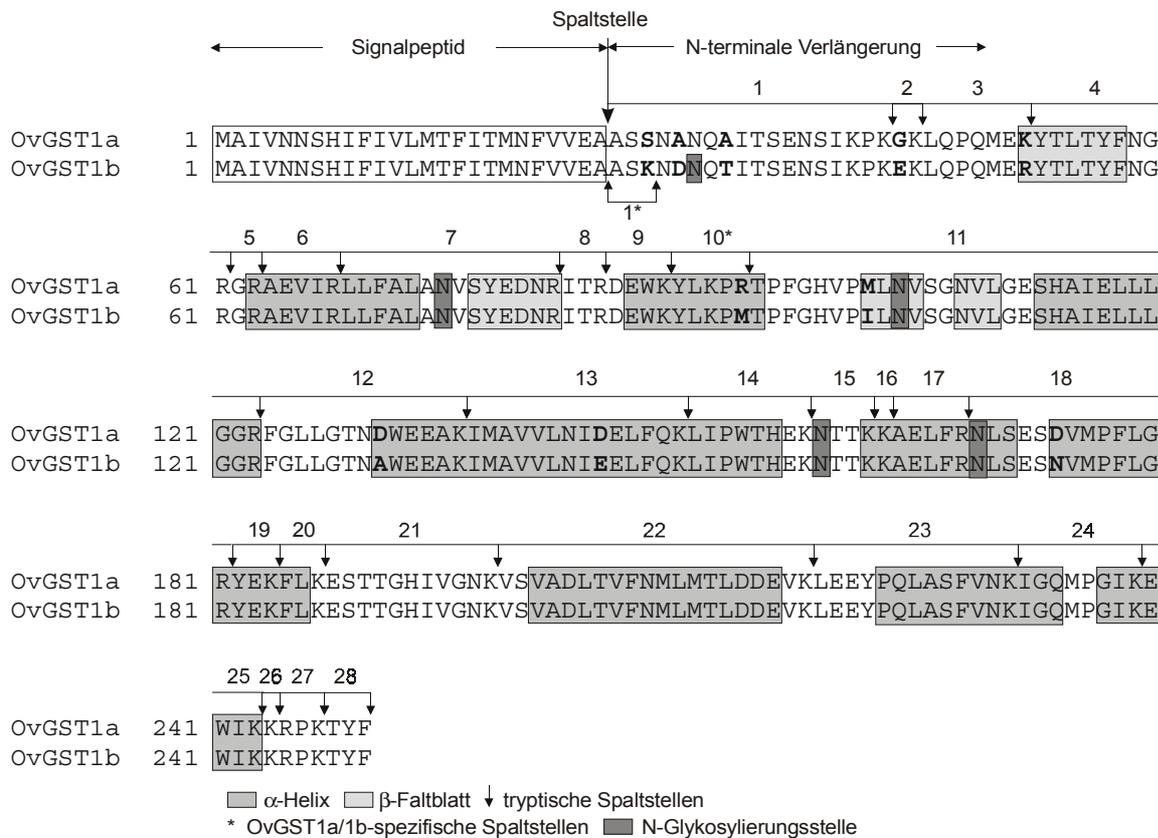


Abb. 3.2.1.2.A Alignment der AS-Sequenzen der Ov-GST1a und -1b

In dem Alignment ist das Signalpeptid (25 AS), die Spaltstelle und die N-terminale Verlängerung (24 AS) beschriftet. Die Nummerierung der AS gilt für das reife Protein und beginnt dementsprechend mit „1“ nach der Spaltstelle des Signalpeptids. Die Nummerierung

über den Sequenzen entspricht den tryptischen Fragmenten (Tab. 3.2.1.3.A). Unterschiede in der AS-Sequenz zwischen *Ov*-GST1a und -1b sind fett gedruckt.

3.2.1.3 Tryptischer Verdau der nativen *Ov*-GST1a und -1b und Zuordnung der Fragmente durch HPLC-MS Analyse

Wie in Abb. 3.2.1.1.A (vergl. Spur A mit C/D) dargestellt, sind die nativen *Ov*-GST stark glykosyliert. Die N-Glykane machen etwa 13% bzw. 20% des Molekulargewichts der *Ov*-GST1a und 1b aus. Um die Strukturen der N-Glykane massenspektrometrisch auflösen zu können, wurden die gereinigten Proteine mit Trypsin verdaut. Aufgrund der AS-Sequenz der *Ov*-GST1a und -1b ergeben sich bei einem vollständigen Verdau 27 Peptidfragmente pro Protein. Dabei führt eine, für die *Ov*-GST1a spezifische Spaltstelle zu den Fragmenten 10a/10b und eine für die *Ov*-GST1b spezifische Spaltstelle zu den Fragmenten 1a/1b (s. Abb. 3.2.1.1.A). Weitere Unterschiede zwischen den beiden Proteinen beruhen auf AS-Austauschen, die aber keine Veränderung des Spaltungsmusters zur Folge haben. Die resultierenden Peptidfragmente wurden in einem präparativen Microbore HPLC-Lauf voneinander getrennt, aufgefangen und im Folgenden durch MS sowie AS-Sequenzierung identifiziert. Im UV-Spektrum ($\lambda = 214 \text{ nm}$; Abb. 3.2.1.3.A) sind die den Peptidfragmenten zugeordneten Peaks dargestellt. Weitere Peaks sind auf Nicht-Peptid Kontaminationen, sowie Peptidfragmente des Trypsins zurückzuführen. Die in Tab. 3.2.1.3.A angeführte vollständige Auflistung aller erwarteten Peptidfragmente zeigt, dass fast alle nicht-glykosylierten Peptide identifiziert und zugeordnet werden konnten; Peptide $< 400 \text{ Da}$ sind durch ESI-MS nicht zu detektieren.

Die 4 Glykopeptide der *Ov*-GST1a (Fragmente 7, 10b, 13/14 und 17) konnten aufgrund des charakteristischen Musters der Molekularionen der gebundenen N-Glykane im MS eindeutig identifiziert werden. Durch die geringen Sequenzunterschiede zwischen *Ov*-GST1a und -1b (Glykopeptid 1, AS 44 - 57 (GP1₄₄₋₅₇) der *Ov*-GST1a entspricht GP2 der *Ov*-GST1b; GP3₁₂₆₋₁₃₇ der *Ov*-GST1a entspricht GP4 der *Ov*-GST1b) können durch den tryptischen Verdau nur 3 für die *Ov*-GST1b spezifische glykosylierte Peptide gebildet werden, von denen GP2₆₅₋₉₈ und GP5₁₄₄₋₁₅₆ identifiziert wurden. GP1₄₋₁₈ der *Ov*-GST1b konnte hingegen nicht detektiert werden.

3.2 Ergebnisse *Onchocerca volvulus* GST1a und -1b

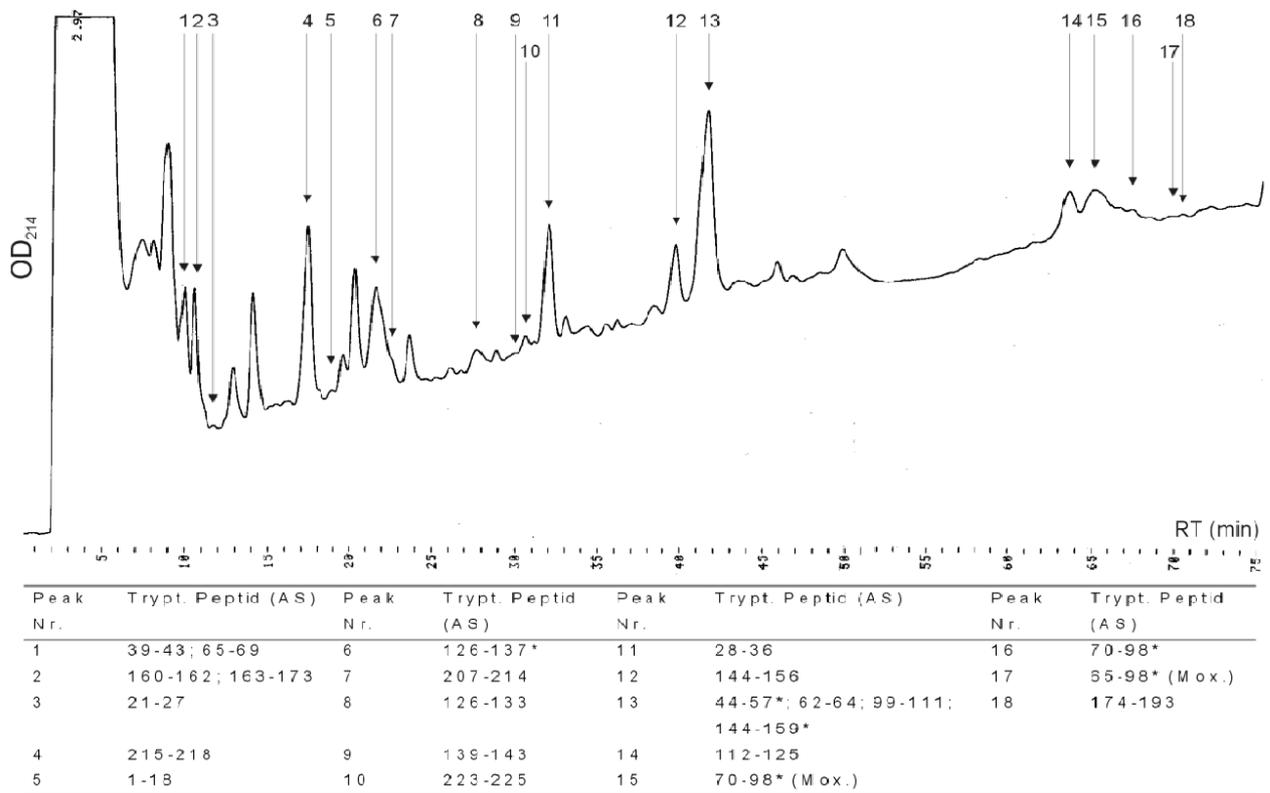


Abb. 3.2.1.3.A UV-Spektrum der präparativen HPLC-MS Analyse der tryptischen Peptide von *Ov-GST1a* und -1b

Die nativen *Ov-GST1a* und -1b wurden nach Trypsinverdau über eine Microbore HPLC getrennt und Aliquots der einzelnen Peakfraktionen für die AS-Sequenzierung verwendet. Die Fraktionen wurden weiterhin durch ESI-MS Analyse auf Glykopeptide hin untersucht. Die identifizierten Glykopeptide enthaltenden Fraktionen sind mit * markiert. Mox.: oxidierter Methioninrest, RT: Retentionszeit.

Molekulargewicht der tryptischen Fragmente der *Ov-GST1a* und -1b, analysiert durch HPLC-MS^a
(Erläuterungen s. nächste Seite)

Trypt. Peptid ^b	HPLC Peak Nr.	AS Pos. im nativen Protein	<i>Ov-GST1a</i>			<i>Ov-GST1b</i>		
			Berechnete Peptid-Masse (Da)	Gemessenes Peptid-Signal ([M + nH] ⁿ⁺¹)	Zugeordnete Peptid-Masse (Da)	Berechnete Peptid-Masse (Da)	Gemessenes Peptid-Signal ([M + nH] ⁿ⁺¹)	Zugeordnete Peptid-Masse (Da)
1	5	1-18	1858,9	930,5 ²⁺	1859			
1°		1-3				304,18	n. d. ^e	
1b		4-18 ^c				2903,84	n. d.	
2		19-20	203,1	n. d.		275,15	n. d.	
3	3	21-27	872,4	873,2	872,2	900,45	n. d.	
4	11	28-36	1133,6	567,9 ²⁺	1133,8	ld.		
5		37-38	231,1	n. d.		ld.		
6	1	39-43	586,3	587,3	586,3	ld.		
7	13	44-57 ^c	2840,3	1421,2 ²⁺	2840,4	ld.		
8		58-60	388,24	n. d.		ld.		
9	13 ^f	61-64	576,3	577,4	576,4	ld.		
10	17 (Mox. ^f)	65-98 ^c				4844,4	1615,7 ³⁺	4844,1
10a	1	65-69	675,4	676,2	675,2			
10b	15 (Mox.), 16	70-98 ^c	4230	1411 ³⁺	4230			
11	13	99-111	1478,7	740,3 ²⁺	1478,6	1434,7	718,3 ²⁺	1424,6

3.2 Ergebnisse *Onchocerca volvulus* GST1a und -1b

Trypt. Peptid ^b	HPLC Peak Nr.	AS Pos. im nativen Protein	Ov-GST1a			Ov-GST1b		
			Berechnete Peptid-Masse (Da)	Gemessenes Peptid-Signal ($[M + nH]^{n+1}$)	Zugeordnete Peptid-Masse (Da)	Berechnete Peptid-Masse (Da)	Gemessenes Peptid-Signal ($[M + nH]^{n+1}$)	Zugeordnete Peptid-Masse (Da)
12	14	112-125	1631,9	817 ²⁺	1632	1645,9	823,9 ²⁺	1645,8
13	8	126-133	1022,56	1023,6	1022,6	ld.		
13 ⁺ 14 ^d	6	126-137 ^c	2683,2	1342,7 ²⁺	2683,4	ld.		
15		138	146,1	n. d.		ld.		
16	9	139-143	634,3	635,2	634,2	ld.		
17	12	144-156 ^c	2680	1341,2 ²⁺	2680,4	2679,1	1340,7 ²⁺	2679,4
18		157-159	438,2	n. d.		ld.		
17 ⁺ 18 ^d	13	144-159 ^c	3100,3	1551,2 ²⁺	3100,4	3099,4	n. d.	
19	2	160-162	406,3	407,2	406,2	ld.		
20	2	163-173	1141,6	571,9 ²⁺	1141,8	ld.		
21	18	174-193	2239,1	1120,6 ²⁺	2139,2	ld.		
22	12	194-206	1536,8	769,3 ²⁺	1536,6	ld.		
23	7	207-214	842,5	843,3	842,3	ld.		
24	4	215-218	574,3	575,3	574,3	ld.		
25		219	146,11	n. d.		ld.		
26		220-222	399,26	n. d.		ld.		
27	10	223-225	429,2	430,1	429,1	ld.		

Tab. 3.2.1.3.A Zuordnung der tryptischen Peptide der Ov-GST1a und -1b und Identifizierung der Glykopeptide durch HPLC-MS und ESI-MS

^a Angabe der monoisotopischen theoretischen Massen und der durch ESI-MS detektierten Massen der mehrfach geladenen Fragmentionen ($[M + nH]^{n+1}$)

^b Die Nummerierung der tryptischen Peptide entspricht der im Alignment der Ov-GST1a und -1b verwendeten Nummerierung. Ov-GST1a bzw. -1b-spezifische Spaltstellen sind mit "a" und "b" markiert.

^c Glykopeptide. Die angegebenen Massen entsprechen der Peptidmasse plus der Masse der Hauptglykoform, Man₅GlcNAc₂.

^d Unvollständiger tryptischer Verdau.

^e n. d.: Nicht detektiert. Massen <400 Da wurden von dem Massenspektrometer nicht aufgezeichnet.

^f Mox.: Oxidierter Methioninrest.

ld.: Die Peptide der Ov-GST1a und -1b sind identisch

3.2.1.4 Analyse der N-Glykanstrukturen der Ov-GST durch ESI-MS und MALDI-TOF Analyse

Bei der Analyse der Glykopeptide der Ov-GST1a/1b durch ESI-MS (s. Tab. 3.2.1.3.A) und MALDI-TOF („Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight“) wurden an den N-Glykosylierungsstellen typische Molekularionen mit Masseninkrementen von 162 Da detektiert. Der Zuwachs von je 162 Da an den N-Glykosylierungsstellen deutet auf die Bindung von Hexosen an diesen Stellen hin. Durch Vorversuche, in denen die Wirkung verschiedener spezifischer Glykosidasen auf das N-Glykanmuster der Ov-GST1 getestet wurde, konnte bereits festgestellt werden, dass die Ov-GST1a und -1b Mannosereste tragen. In Abb. 3.2.1.4 ist, stellvertretend für die isolierten Glykopeptide (GP) der Ov-GST1a und -1b,

das MALDI-TOF Spektrum der Peptide der N-Glykosylierungsstelle 1 (N50) und 4 (N144) dargestellt. GP1₄₄₋₅₇ und GP4₁₄₄₋₁₅₉ wurden zusammen mit anderen Peptiden in der HPLC-Fraktion 13 eluiert (s. Abb. 3.2.1.3.A). An der Glykosylierungsstelle 1 der *Ov*-GST1a und -1b sind N-Glykanstrukturen mit 2 bis 5 Mannoseresten (Man) über 2 N-Acetylglucosaminreste (GlcNAc) mit dem Peptidrückgrat verbunden (allg. Struktur: Man₂₋₅GlcNAc₂). Die Chitobiose-Grundstruktur der N-Glykane der Säugetiere umfasst neben den 2 GlcNAc-Resten mindestens 5 daran gebundene Mannosereste. Bei der *Ov*-GST1a und -1b hingegen ist z. T. sogar diese Grundstruktur noch verkürzt; die Hauptglykanstruktur an Glykosylierungsstelle 1 (N50), aber auch an Glykosylierungsstelle 2 (N79) und 3 (N134) trägt 5 Mannosereste (Man₅GlcNAc₂; Abb. 3.2.1.4.A, linke Seite). Im Gegensatz dazu sind die an der Glykosylierungsstelle 4 (N144) gebundenen Kohlenhydratstrukturen wesentlich länger und tragen mit bis zu 9 Mannoseresten die maximal mögliche oligomannosidische N-Glykanstruktur (Man₅₋₉GlcNAc₂). In Abb. 3.2.1.4.A, rechte Seite, ist die Glykostruktur des unvollständig verdauten GP4₁₄₄₋₁₅₉ dargestellt. Die Man₉GlcNAc₂-Struktur ist hier aufgrund ihres geringen Vorkommens in der Abbildung nicht zu erkennen.

Die ESI-MS Analysen der N-glykosylierten Peptide bestätigen die durch MALDI-TOF erhaltenen Ergebnisse des oligomannosidischen Glykosylierungsmusters der *Ov*-GST1a und konnten für die Bestimmung der Verhältnisse der einzelnen Kohlenhydratstrukturen an den 4 Glykosylierungsstellen genutzt werden:

GP1₄₄₋₅₇ Man₅/Man₄/Man₃/Man₂ = 1:0,32:0,1:0,01;

GP2₇₀₋₉₈ Man₅/Man₄/Man₃ = 1:0,51:0,07;

GP3₁₃₄₋₁₃₇ Man₅/Man₄/Man₃ = 1:0,13:0,07;

GP4₁₄₄₋₁₅₆ Man₅/Man₆/Man₇/Man₈/Man₄/Man₃/Man₉ = 1:0,48:0,15:0,1:0,05:0,04:0,01.

Die Verhältnisse der einzelnen Glykostrukturen zueinander verdeutlichen, dass Man₅GlcNAc₂ die dominante N-Glykanstruktur aller Glykosylierungsstellen der *Ov*-GST1a darstellt. Weiterhin sind mit dem Vorkommen von Man₂-, Man₃- und Man₄GlcNAc₂, mehr als 30% der N-Glykane der *Ov*-GST1a kleiner als die kleinsten für Säugetiere beschriebenen N-Glykanstrukturen. Während an den N-Glykosylierungsstellen 1 (N50), 2 (N79), und 3 (N134) oligomannosidische N-Glykane mit bis zu 5 Mannoseresten vorliegen, ist die 4. N-Glykosylierungsstelle durch wesentlich längere Kohlenhydratketten mit 5 bis 9 Mannoseresten gekennzeichnet. Die für die *Ov*-GST1b bestimmten N-Glykanstrukturen unterscheiden sich, soweit detektierbar, nicht von denen der *Ov*-GST1a. Das grössere Molekulargewicht der *Ov*-GST1b (s. Abb. 3.2.1.1.A, Spur A) im Vergleich zur *Ov*-GST1a ist demzufolge wahrscheinlich auf die N-Glykosylierung der zusätzlichen, in der N-terminalen Verlängerung liegenden, potentiellen Glykosylierungsstelle zurückzuführen.

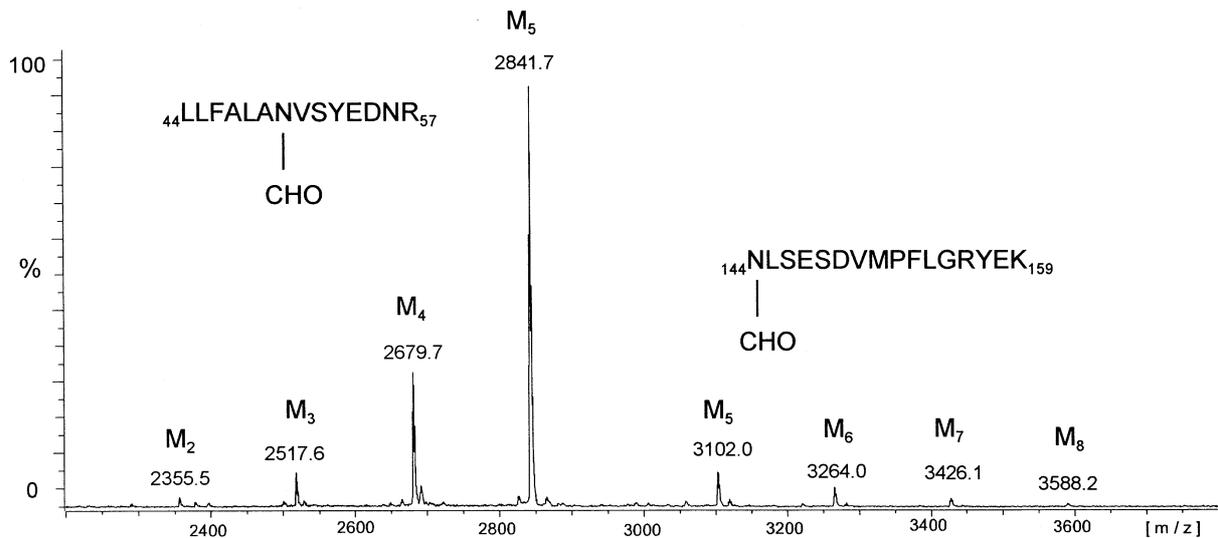


Abb. 3.2.1.4.A MALDI-TOF Spektrum der HPLC-Fraktion 13 der *Ov*-GST1a und -1b nach tryptischem Verdau

Die N-Glykosylierungsstelle 1 (N50, linke Seite der Abb.) trägt eine verkürzte N-Glykanstruktur mit 2 bis 5 Mannoseresten (M_2 bis M_5). Die N-Glykosylierungsstelle 4 (N144, rechte Seite der Abb.) trägt hingegen eine oligomannosidische Struktur mit 5 bis 9 Mannoseresten (M_9 kann in dieser Abb. nicht aufgelöst werden). Die Hauptglykanstruktur bei m/z 2841,7 wurde für die Untersuchung des Verknüpfungsmusters der N-Glykane im ESI-MS/MS analysiert (s. Abb. 3.2.1.5.A); m/z : Masse/Ladung.

3.2.1.5 Analyse der Verknüpfung der Mannosereste durch ESI „daughter ion“ Spektren anhand des Glykopeptids 1 der *Ov*-GST1a

Für die Analyse der Verknüpfung der einzelnen Mannosereste wurden die Hauptglykanstrukturen der einzelnen Glykosylierungsstellen durch ESI-MS/MS dargestellt. Die „daughter ion“-Spektren zeigen die Abundanz der Fragmentationen die bei der Spaltung der Mannosebindungen entstehen, und lassen dadurch Rückschlüsse auf das Verknüpfungsmuster der einzelnen Hexosen untereinander zu. Stellvertretend für die $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Strukturen aller Glykopeptide ist in Abb. 3.2.1.5.A das doppelt geladene ESI-„daughter ion“ Spektrum des GP_{144-57} abgebildet. In dem Fragmentierungsschema sind die identifizierten Fragmentationen der Mannosereste angeführt. Aufgrund der Abundanz teilweise noch verbundener Hexosereste konnte das abgebildete Verknüpfungsmuster erstellt werden. Die durch MALDI-TOF, ESI-MS und ESI-MS/MS ermittelte häufigste Oligomannoseform der *Ov*-GST1a und -1b entspricht damit in ihrem Verknüpfungsmuster den typischen Oligomannosen der Säugetiere. Eine Aussage über die Art der glykosidischen Bindungen (α , β) ist allerdings mit diesen Methoden nicht möglich.

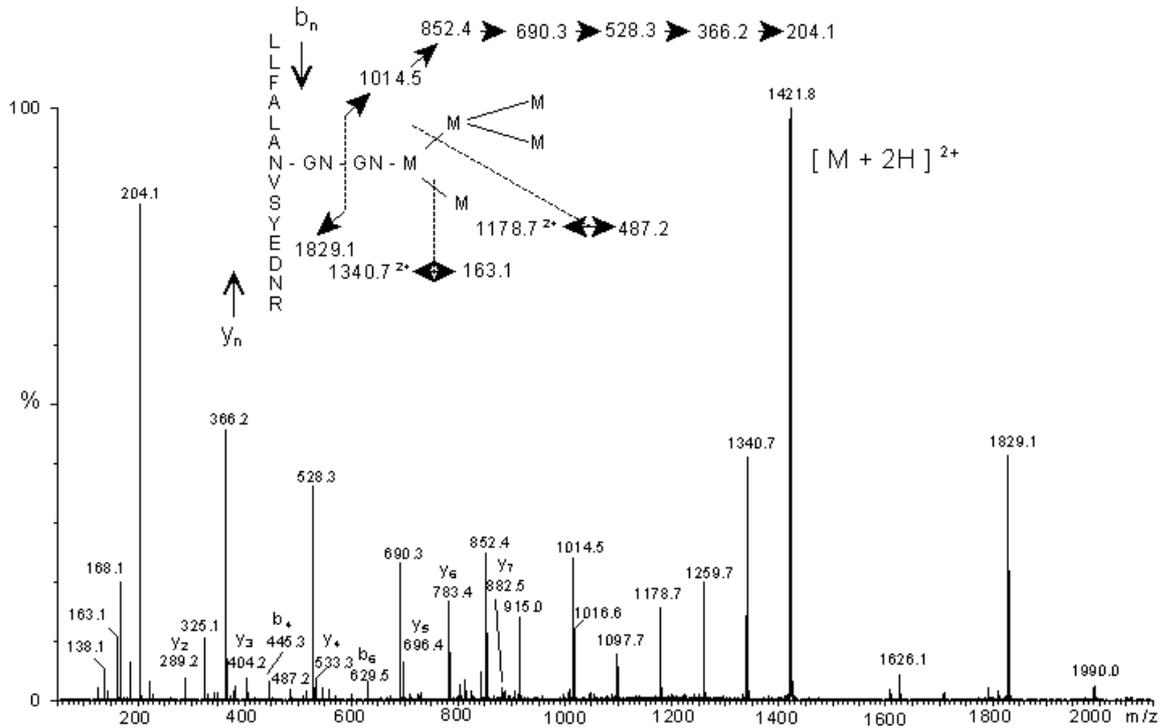


Abb. 3.2.1.5.A ESI „daughter ion“ Spektrum des zweifach geladenen GP1 mit 5 Man-Resten

Die detektierten Haupt-Fragmentationen entstehen durch die Abspaltung von 1 bis 5 Mannoseresten und 2 GlcNAc-Resten. Die Abundanz der identifizierten Fragmentationen wurde zur Identifizierung der Verknüpfung der N-Glykane genutzt (schematisch dargestellt). Peptid spezifische Fragmente sind in der Abb. durch y_n (vom carboxyterminalen Ende ausgehend) und b_n (aminoterminalen Ende) dargestellt.

3.2.2 Untersuchung der Antikörperantwort auf die *Ov*-GST1a und -1b anhand von Seren *Onchocerciasis*-infizierter Patienten durch ELISA

3.2.2.1 Vergleich der Antikörperantwort der glykosylierten und der deglykosylierten *Ov*-GST1a und -1b im ELISA

Aufgrund der Lokalisierung der *Ov*-GST1a und -1b an der Parasit-Wirt-Grenze¹³⁸ und den im Vergleich zu den Kohlenhydratstrukturen des Wirts stark verkürzten N-Glykanen, sollte der Einfluss der Kohlenhydratketten auf die Erkennung der *Ov*-GST1 als Antigen durch ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) analysiert werden.

Dazu wurde die Immunglobulin (Ig) G_{gesamt} Antikörperantwort von 29 Seren von Patienten mit generalisierter *Onchocerciasis* auf die glykosylierte und mit N-Glykanase F deglykosylierte *Ov*-GST1a und -1b bestimmt. Abgesehen von dem Zusatz von N-Glykanase F für die Deglykosylierung wurden die Proben identisch behandelt, so dass ein Einfluss der Vorbehandlung auf die späteren ELISA-Messungen ausgeschlossen werden konnte. Da es durch die N-Glykanase F-Behandlung zu einer Veränderung der Ladung der *Ov*-GST1 an

den Glykosylierungsstellen kommt (Veränderung von N zu D), wurde die *Ov*-GST1 zum Vergleich mit Endoglykosidase H deglykosyliert. Die IgG Antikörperantwort der Endoglykosidase H- und N-Glykanase F-behandelten *Ov*-GST1 wiesen im ELISA keine signifikanten Unterschiede auf. Als Negativkontrolle wurde die Antikörperantwort von 5 europäischen und 4 afrikanischen Seren nicht-infizierter Personen untersucht. Die OD_{450} -Werte repräsentieren die IgG Antikörperantwort auf die glykosylierte bzw. deglykosylierte *Ov*-GST1a und -1b. Der OD_{450} -„cut-off“ von 0,18 könnte auf konservierte GST Epitope zurückzuführen sein. Die statistische Analyse der Antikörperantworten durch den gepaarten Wilcoxon-Test zeigte, dass die glykosylierte Form der *Ov*-GST1a und -1b zu signifikant höheren Antikörperantworten ($P < 0,05$) führte (Median $OD_{450} = 0,66$ [10% und 90% Perzentile, 0,32 und 0,79]) als die deglykosylierte *Ov*-GST1 (Median $OD_{450} = 0,36$ [10% und 90% Perzentile, 0,19 und 0,58]) (Abb. 3.2.2.1.A). Von den 29 getesteten Seren reagierten nur 2 Seren nicht mit den Proteinen, 2 weitere wiesen ausschließlich Antikörper gegen die glykosylierte Form der *Ov*-GST1a und -1b auf. Die native, im Wurm vorliegende, Struktur weist also aufgrund ihrer Glykosylierung Epitope auf, die vom Immunsystem des Wirtes als stärkere Antigene erkannt werden, als die deglykosylierte Form. Die für die rekombinante, in *E. coli* exprimierte *Ov*-GST1a gemessenen OD_{450} -Werte waren ebenfalls deutlich geringer als die für das native Protein bestimmten Werte und bestätigen damit, dass die Glykosylierung für die signifikant erhöhte Antikörperantwort verantwortlich ist.

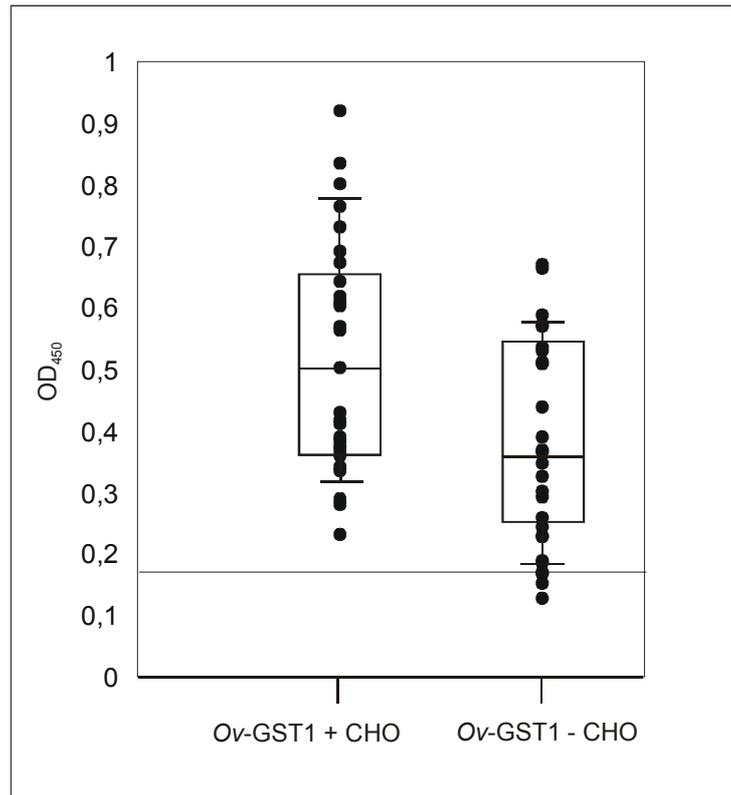


Abb. 3.2.2.1.A ELISA der IgG Antwort *O. volvulus*-infizierter Patienten auf die native glykosylierte und mit N-Glykanase F deglykosylierte *Ov*-GST1a und -1b

Es wurden 29 Seren *O. volvulus*-infizierter Patienten untersucht ($n = 3$). Die Antikörperantwort auf die glykosylierte Form der *Ov*-GST1a und -1b (*Ov*-GST1 + CHO) war signifikant höher ($P < 0,05$) als auf die deglykosylierten Formen der GST (*Ov*-GST1 - CHO). Die IgG Antworten der Patientenserum (OD_{450} -Werte) sind in Form einzelner Punkte dargestellt. Der Bereich, in dem sich 50% der IgG Antikörperantworten (in OD_{450} -Werten) auf die *Ov*-GST1a und -1b mit und ohne N-Glykosylierung befinden, ist durch die Rechtecke markiert; die Balken markieren die 10% und 90% Perzentilen. Der „cut-off“ ist durch eine waagerechte Linie gekennzeichnet.

3.2.2.2 Analyse der Antikörperantwort auf die r*Ov*-GST1a mit N-terminaler bzw. ohne N-terminale Verlängerung

Die *Ov*-GST1a und -1b besitzen im N-terminalen Bereich eine Verlängerung aus 24 Aminosäuren (s. 3.2.1.2.A). Die Expression der *Ov*-GST1a in *E. coli* führt oftmals zur Expression zweier Proteine, da neben dem 1. Startmethionin auch das Methionin an Position 25 als Translationsstartpunkt genutzt wird und damit zur Bildung einer verkürzten, aber enzymatisch voll aktiven r*Ov*-GST1a führt (Abb. 3.2.2.2.A, Spur C). Die Epitopenalyse mit dem Programm ANTIGENIC (<http://www.uk.embnet.org/Software/EMBOSS/>) nach der Methode von Kolaskar und Tongaonkar¹⁰⁰ führte zur Identifizierung von 8 potentiellen antigenen Bereichen in der *Ov*-GST1a und -1b (A39 – S52, F72 – N79, S81 – S88, A90 –

L102, I112 – W129, E147 – F160, G167 – M184, L194 – K206), von denen einer in der N-terminalen Verlängerung lokalisiert ist (K18 – Q24). Basierend auf dieser Vorhersage wurde die Antigenizität der N-terminalen Verlängerung im ELISA untersucht. Um die Konformation der Ov-GST1a zu erhalten, wurde nicht nur der N-terminale Bereich, sondern das gesamte enzymatisch aktive Protein im ELISA eingesetzt. Dafür wurde mittels Mutagenese-PCR der 2. Translationsstartpunkt entfernt (Punktmutation von M25 in A25), so dass eine Expression der rOv-GST1a mit N-terminaler Verlängerung sichergestellt war (Abb. 3.2.2.2.A, Spur D). Als Vergleich wurde die rOv-GST1a ohne N-terminale Verlängerung in *E. coli* zur Expression gebracht (Abb. 3.2.2.2.A, Spur B) und die Antikörperantwort im ELISA detektiert. Insgesamt wurden 38 Seren von Patienten mit der generalisierten Form der Onchocerciasis auf ihre IgG Antikörperantworten, ausgedrückt in OD₄₅₀-Werten, hin getestet. Während von den 38 getesteten Patientenseren nur 4 nicht mit dem Protein plus N-terminaler Verlängerung reagierten, wurde die rOv-GST1a ohne Verlängerung von 9 Patienten nicht als Antigen erkannt. Damit erkannten 34 von 38 (89,5%) Patienten die rOv-GST1a als Antigen, von diesen wiederum zeigten 22 (58%) eine erhöhte IgG_{gesamt} Antikörperantwort gegenüber dem Protein mit N-terminaler Verlängerung. Die für die rOv-GST1a mit N-terminaler Verlängerung gemessenen Antikörperantworten (Median OD₄₅₀ = 0,28 [10% und 90% Perzentile 0,16 und 0,58]) waren signifikant höher (P = 0,046) als die für das verkürzte Protein erhaltenen IgG Antworten (Median OD₄₅₀ = 0,22 [10% und 90% Perzentile 0,17 und 0,35]).

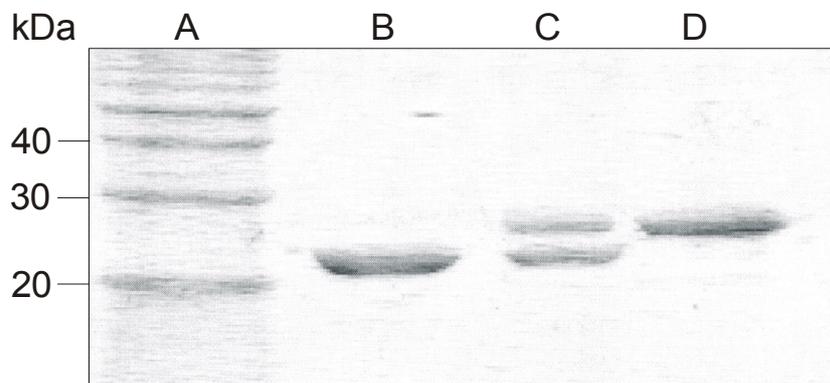


Abb. 3.2.2.2.A Rekombinante Expression und Aufreinigung der Ov-GST1a mit N-terminaler bzw. ohne N-terminale Verlängerung

Coomassie-Färbung eines 12,5% (w/v) SDS-PAGE. Spur A: Proteinmarker, Angaben der molekularen Massen in kDa auf der linken Seite; Spur B: gereinigte rOv-GST1a ohne N-terminale Verlängerung; Spur C: Expression der rOv-GST1a mit N-terminaler und ohne N-terminale Verlängerung in *E. coli* durch die Erkennung von M25 als 2. Translationsstartpunkt; Spur D: gereinigte rOv-GST1a (M25A) mit N-terminaler Verlängerung.

3.2.2.3 Untersuchung der Antikörperantwort auf die N-terminale Verlängerung der Ov-GST1a mit Onchocerciasis-Patientenseren im Vergleich zu Seren von Patienten mit anderen Helmintheninfektionen

Die GST von Helminthen weisen bestimmte für sie typische, konservierte Bereiche auf, die bei serologischen Untersuchungen von Patienten mit anderen Helmintheninfektionen Kreuzreaktionen hervorrufen können und damit auch für eine Vakzinierung nur schlecht geeignet sind. Die Ov-GST1a und -1b hingegen ist durch eine für GST einzigartige N-terminale Verlängerung gekennzeichnet. Im Folgenden sollten mögliche Kreuzreaktionen der N-terminalen Verlängerung der rOv-GST1a und -1b mit Seren von Patienten mit verschiedenen anderen Helmintheninfektionen analysiert werden. Um Antikörperreaktionen auf konservierte GST-Bereiche auszuschließen, wurde der N-terminale Bereich in 2 überlappenden Peptiden synthetisiert und die Kreuzreaktion mit Seren von Patienten mit *L. loa*-, *B. malayi*-, *W. bancrofti*-, *A. lumbricoides*-, *T. spiralis*- und *S. mansoni*-Infektionen untersucht. Alle getesteten Seren zeigten geringe IgG Antworten mit OD₄₅₀-Werten ≤ 0,15. Keines der Seren von Patienten mit Filarieninfektionen (*L. loa*, *B. malayi*) zeigte OD₄₅₀-Werte > 0,1. Zwei der 5 Serenpools von Patienten mit *W. bancrofti* Infektionen zeigten OD₄₅₀-Werte von > 0,1. Von 20 untersuchten Seren von Patienten mit Onchocerciasis reagierten 12 mit Antikörperantworten mit OD₄₅₀-Werten > 0,1 auf die N-terminalen Peptide, 8 hingegen zeigten nur eine geringe IgG Antwort (Median OD₄₅₀ = 0,2 [10% und 90% Perzentile 0,052 und 0,86]; „cut-off“ OD₄₅₀ = 0,04).

3.2.3 Bestimmung des physiologischen Substrats der Ov-GST1a und -1b

3.2.3.1 Analyse der Prostaglandinbildung der rOv-GST1a mit Prostaglandin H₂ als Substrat

Basierend auf der AS-Sequenz und der Sekundärstruktur, wie auch aufgrund des ermittelten Substrat- und Inhibitorprofils (Sommer *et al.*, unveröffentlicht) kann die Ov-GST1a und -1b der Sigma-Klasse zugeordnet werden. Das Alignment der Ov-GST1a und -1b mit der Sigma-Klassen-GST vom Tintenfisch (PDB-Code 1GSQ) und von *C. elegans* (Acc. Nr. NP_508625) weist eine sehr große Ähnlichkeit von 45% (1GSQ) bzw. sogar 54% (*Ce*-GSTSigma) der Aminosäuren zur Ov-GST1a und -1b auf (Abb. 3.2.3.1.A). Neben der Homologie zu den GST der Sigma-Klasse, zeigt sich im Alignment mit der hämatopoetischen Prostaglandin D₂-Synthase (hPGDS) der Ratte und des Menschen, dass die Ov-GST1a und -1b diesen ebenfalls sehr homolog ist (AS-Identität: 33%; homologe Aminosäuren insgesamt ~ 47% im Vergleich zu beiden hPGDS; Abb. 3.2.3.1.A). Aufgrund dieser Ähnlichkeit und dem Vorkommen bekannter, für die enzymatische Aktivität essentieller Aminosäuren an

äquivalenten Positionen (Y8, R14, W105, K114, K198), wurde die GSH-abhängige Prostaglandin (PG) H₂-D₂ Isomeraseaktivität der rOv-GST1a getestet. Bei Verwendung von 40 µM PGH₂ als Substrat, konnte mit HPLC-MS eine konzentrationsabhängige Bildung von PGD₂ durch die rOv-GST1a gemessen werden (Abb. 3.2.3.1.B). In wässriger Lösung und bei Raumtemperatur ist PGH₂ sehr instabil, so dass es zur Bildung nicht enzymatischer Zerfallsprodukte kommt und im HPLC-MS PGD₂, PGE₂ und PGF_{2α} nachgewiesen werden können (s. Abb. 3.2.3.1.B, ohne Enzymzugabe). Durch Zugabe von rOv-GST1a hingegen kommt es zu einer verstärkten Bildung von PGD₂, verbunden mit einer Abnahme der nachzuweisenden PGF_{2α}- und PGE₂-Konzentration im Test (Abb. 3.2.3.1.B). Die Abnahme der nicht enzymatisch gebildeten Zerfallsprodukte bei Erhöhung der rOv-GST1a Konzentration im Test ist auf den damit verbundenen, gesteigerten Verbrauch von PGH₂ für die enzymatische Bildung von PGD₂ durch die rOv-GST1a zurückzuführen. Bei einer Konzentration von etwa 9 µg rOv-GST1a im Test, wird PGH₂ (40 µM) zum limitierenden Faktor der Enzymreaktion. Eine quantitative Analyse ist aufgrund der Instabilität von PGH₂ nicht möglich.

Die rOv-GST1a weist somit eine Isomeraseaktivität auf die zur spezifischen Bildung von PGD₂ führt. Der Einsatz von PGD₂ als potentiell Substrat der rOv-GST1a führte nicht zur Bildung weiterer möglicher Folgeprodukte (wie z. B. Δ¹²-PGJ₂, 9α,11β-PGF₂) und wird damit nicht als Substrat verwendet.

humPGDS	1	MPNYKLT	YFNMRGRAE	IIRYIFAYLD	QYEDHRIE	QADWPE	EIKSTL	LPFGKI	PILEVDGLT																																							
ratPGDS	1	MPNYKLLY	FNMRGRAE	IIRYIFAYLD	KYEDHRIE	QADWPKIK	PTLP	PEGKI	PVLEVEGLT																																							
Ce-GSTsigma	1	MEYKLT	YFNMMGRAE	PARLIFAYAG	VOYTD	ERVEKSAW	EIKAT	TPH	KGKLPVLYVDGAK																																							
Ov-GST1a	1	MEKYTL	TYFNGR	GRAEVIRLL	FALANVSY	EDNRIT	TRDEW	KYLK	PRT	PFGHVPMLN	VSGNV																																					
1GSQ	1	MEKYTL	LHYFPL	MGRAEL	CRFVLA	AHGE	EFTD	RVVEM	ADWENL	KAT	MYSNAMPVLD	IDGTK																																				
humPGDS	61	LHQS	LAIARYLTK	NTDLAG	NTEME	QCHVD	AVDTL	DDF	MSCF	-PWA	EKKQD	--VKEQMFN																																				
ratPGDS	61	LHQS	LAIARYLTK	NTDLAG	KTELE	QCOVDA	VVDTL	DDF	MSLF	-PWA	EENQD	--LKERTFN																																				
Ce-GSTsigma	60	LAQSR	VIERYL	GKVF	FLAGET	DWETAK	MDEL	VAC	VED	ELIE	IQ	PWFKE-QDN	AKKVEIEFK																																			
Ov-GST1a	61	LGESH	AIEELL	GGRF	GLLG	TNDW	EAKIMA	VVLN	IDE	LFQ	KLI	PWTHEK	-NTTKAE	ELFR																																		
1GSQ	61	MSQSM	CIARHL	AREF	GLDG	KTSLE	KYR	VDE	ITET	LQDI	FNDV	VVKIK	FA-PEA	-AK-EAVQ																																		
humPGDS	118	ELL	TYNAPHL	MQDLD	TYL---	GGR	-EW	LIGN	SVTW	ADF	-YWE	ICST	TLL	VFK	PDL	LDNH	P																															
ratPGDS	118	DLL	TRQAPHL	LKDL	LDTYL---	GDK	-EW	FIGN	YVTW	ADF	-YWD	ICST	TLL	LV	LK	PDL	LGI	YP																														
Ce-GSTsigma	119	KL	ESTI	IPF	ISAFEN	ILVT	NG--	TGY	FV	GDK	ISY	ADL	AI	FHI	F	WM	NSKI	LP	GAL	RKY	P																											
Ov-GST1a	120	NLS	ES	DVMP	FLGR	YEK	ELKE	ST--	TGH	VGN	KV	SV	ADL	T	V	EN	MLM	TLD	DE	V	K---	LEE	YP																									
1GSQ	118	QNY	EK	SKR	LAP	FL	LE	GL	L	V	SN	G	G	D	G	E	F	V	G	N	S	M	T	L	A	D	L	H	C	Y	V	A	L	E	V	P	L	K	H	T	P	-E	L	L	K	D	C	P
humPGDS	173	RLV	TLR	KKV	QAIP	AVAN	WIK	RRP	QTKL																																							
ratPGDS	173	RLV	SL	LN	KV	QAIP	AI	SA	WIL	KRP	QTKL																																					
Ce-GSTsigma	177	KL	Q	E	F	I	E	K	I	T	A	I	D	S	I	K	S	W	I	N	S	R	P	K	T	E	A																					
Ov-GST1a	175	QL	A	S	F	V	N	K	I	G	Q	M	P	G	I	K	E	W	I	K	R	P	K	T	Y	F																						
1GSQ	177	KI	V	A	L	E	K	R	V	A	E	C	P	K	I	A	A	Y	L	K	R	P	V	R	D	F																						

Abb. 3.2.3.1.A Alignment der Aminosäuresequenz der Ov-GST1a mit der hPGDS aus der Ratte und dem Menschen, sowie mit den GST der Sigma-Klasse aus dem Tintenfisch und *C. elegans*

Alignment der Ov-GST1a mit den AS-Sequenzen der hPGDS aus der Ratte und dem Menschen, sowie den zur Sigma-Klasse gehörenden GST des Tintenfischs (PDB: 1GSQ) und der *C. elegans* GST R11G1. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, konserviert

ausgetauschte Aminosäuren sind hellgrau dargestellt. Zur Optimierung des Alignments wurde die 24 Aminosäuren der N-terminalen Verlängerung der Ov-GST1a nicht mit in das Alignment einbezogen.

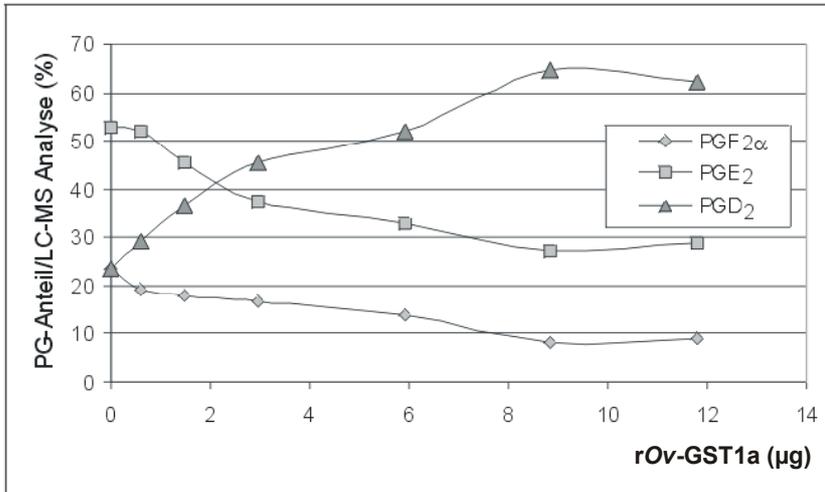


Abb. 3.2.3.1.B Darstellung der konzentrationsabhängigen Prostaglandin H₂-D₂ Isomeraseaktivität der rOv-GST1a mit Prostaglandin H₂ als Substrat

Die Enzymaktivität der rOv-GST1a wurde mit einer konstanten Prostaglandin (PG) H₂-Konzentration von 40 µM bei verschiedenen rOv-GST1a Konzentrationen getestet und die entstehenden Produkte durch HPLC-MS analysiert. Mit dieser Methode kann PGD₂, PGF_{2α} und PGE₂ nachgewiesen werden. Jeder Messwert repräsentiert 2 unabhängige Messungen der rOv-GST1a Isomeraseaktivität. Angegeben sind die pro MS-Analyse gebildeten Prostaglandine als prozentuale Anteile.

3.2.3.2 Prostaglandin D₂-Bildung durch die rOv-GST1a im gekoppelten Enzymtest mit Cyclooxygenase I

Die Prostaglandin (PG)-Synthese erfolgt *in vivo* durch die Oxygenierung von Arachidonsäure zu PGG₂. Die Reaktion wird durch eine der zwei Isoformen der Cyclooxygenase katalysiert und durch deren Hydroperoxidaseaktivität zu PGH₂ reduziert. Um die PGH₂-D₂ Isomeraseaktivität der rOv-GST1a zu bestätigen und die Bildung nicht enzymatischer Zerfallsprodukte von PGH₂ zu reduzieren, wurde die Isomeraseaktivität in einer gekoppelten Enzymreaktion gemessen, in der PGH₂ sowohl gebildet als auch metabolisiert wird. Unter möglichst physiologischen Testbedingungen wurde durch die Cyclooxygenase I aus Arachidonat PGH₂ für die Isomerasereaktion der rOv-GST1a bereitgestellt und die entstehenden Produkte durch HPLC-MS identifiziert. Wie in Abb. 3.2.3.2.A zu erkennen, wird mit Erhöhung der rOv-GST1a Konzentration im Test vermehrt PGD₂ gebildet. Durch die hohe Aktivität der Cyclooxygenase I wird sehr viel PGH₂ bereitgestellt, so dass trotz der Metabolisierung durch die rOv-GST1a noch PGF_{2α} und PGE₂ entstehen können

(Abb. 3.2.3.2.A). Die spezifische Bildung von PGD₂ im gekoppelten Enzymtest (Abb. 3.2.3.2.B) ist durchaus vergleichbar mit der PGD₂-Bildung im direkten Test mit PGH₂ als Substrat und bestätigt die PGH₂-D₂ Isomeraseaktivität der rOv-GST1a.

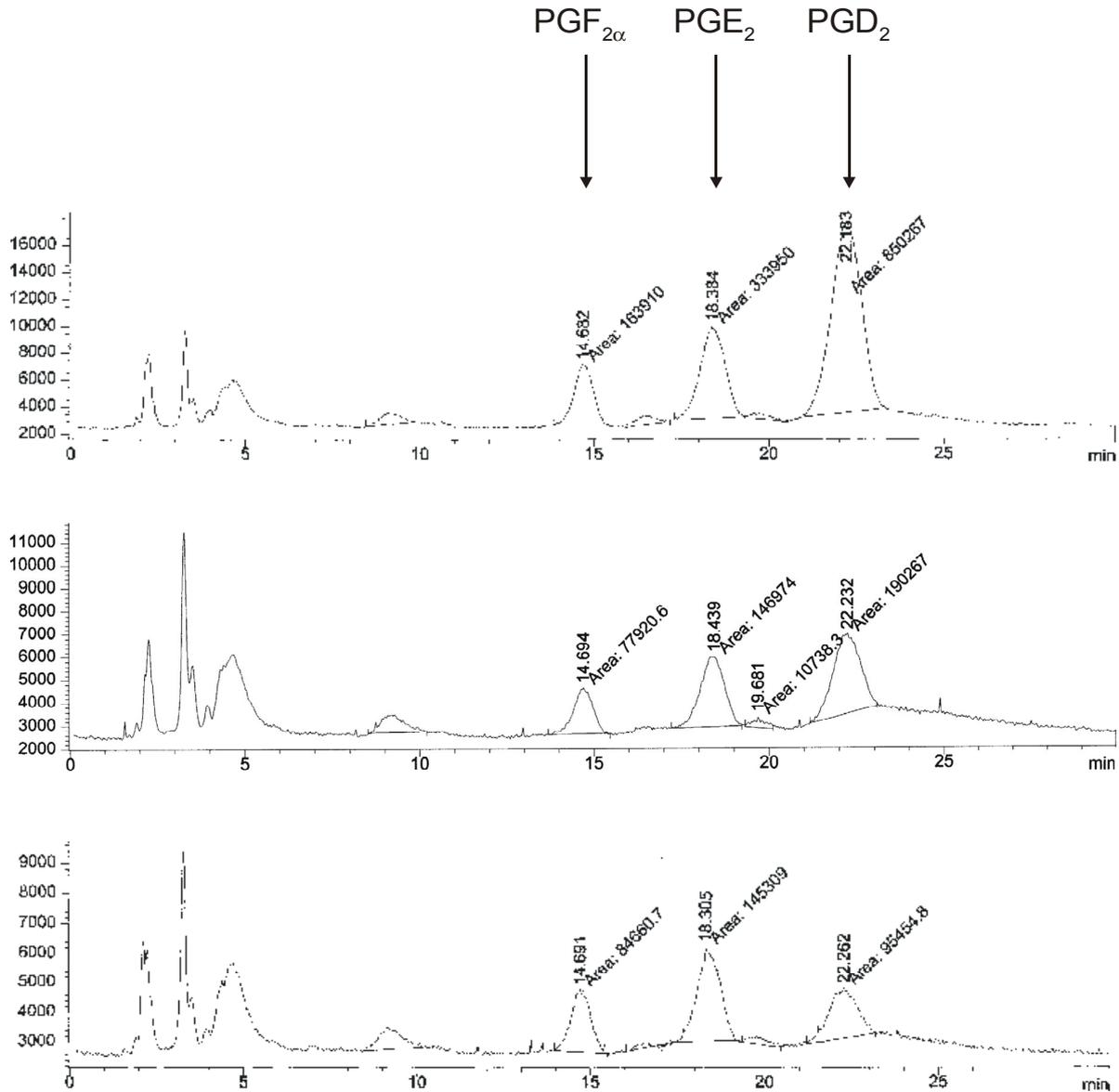


Abb. 3.2.3.2.A Exemplarische Darstellung des Retentionsmusters der durch HPLC-MS Analyse identifizierten Prostaglandine

Detektion der verschiedenen Prostaglandine nach Auftrennung über „Reversed Phase“ HPLC und MS Analyse im UV-Bereich (OD₂₁₄). Die abgebildeten UV-Spektren stellen einzelne Messungen der enzymatisch, durch die rOv-GST1a gebildeten, und nicht-enzymatisch gebildeten Prostaglandine dar. Für diese exemplarische Darstellung wurden Spektren gewählt, die zu einer Versuchsreihe gehören: das untere Spektrum zeigt die zu detektierenden Prostaglandine ohne rOv-GST1a im Enzymtest, das mittlere Spektrum zeigt die enzymatisch und nicht enzymatisch, bei Einsatz von 2,4 µg rOv-GST1a im Test gebildeten Prostaglandine, das obere Spektrum wurde bei Einsatz von 11,8 µg rOv-GST1a im Test erhalten.

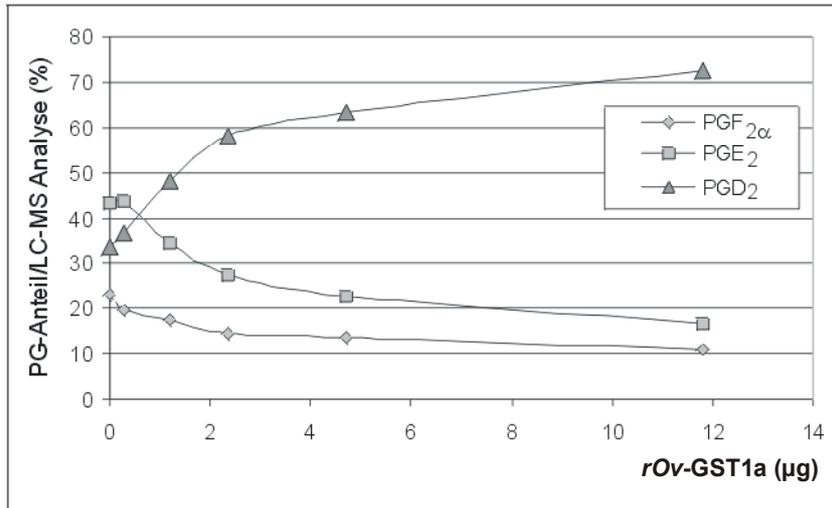


Abb. 3.2.3.2.B Konzentrationsabhängige Bildung von PGD₂ durch die rOv-GST1a im gekoppelten Enzymtest mit Cyclooxygenase I

Die Isomeraseaktivität der rOv-GST1a wurde unter Verwendung von 30 µM Arachidonsäure und 0,2 Einheiten Cyclooxygenase I bei verschiedenen rOv-GST1a Konzentrationen gemessen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert von 2 unabhängigen Messungen dar. Angegeben sind die pro MS-Analyse gebildeten Prostaglandine als prozentuale Anteile.

3.2.4.1 Expression des *Ov-GST1a*-Promotor::GFP-Reportergenkonstrukts in *C. elegans*

Für die Untersuchung funktioneller Aspekte der Genregulation von *O. volvulus* muss auf ein heterologes System wie *C. elegans* zurückgegriffen werden. Um das Expressionsmuster der *Ov-GST1a* in *C. elegans* zu analysieren, wurde der 5'-Bereich (-608 bp bis zum Beginn des 3. Exons) als Fragment von 2,57 kb in Fusion mit dem „Green Fluorescence Protein“ (GFP) kloniert. Das Promotor::GFP-Reportergenkonstrukt wurde, zusammen mit dem Markerplasmid pBX, in die Gonaden von *C. elegans pha-I* Mutanten injiziert. Die erfolgreiche GFP-Expression in den transgenen Organismen zeigt, dass der freilebende Nematode die regulativen Elemente des Parasitenpromotors erkennt – d.h. bestimmte, konservierte DNA-Elemente führen zu einer zumindest ähnlichen, basalen Transkription. Während die Embryonen der Transfektanten noch keine GFP-Expression zeigten, wurde in den postembryonalen Juvenilstadien und auch den adulten Tieren eine deutliche GFP-Expression im Hypodermisbereich festgestellt (Abb. 3.2.4.1.A/B/C). Die Juvenilstadien zeigten eine ausgeprägte GFP-Expression der gesamten Hypodermis, besonders aber der hyp 7 Zelle (Abb. 3.2.4.1.B). Eine eher moderate GFP-Färbung konnte im Isthmus und im terminalen Bulbus des Pharynx festgestellt werden (Abb. 3.2.4.1.C). In den adulten Würmern war die Expression auf die Hypodermis im Bereich des Pharynx beschränkt und neben

einem verstärkten GFP-Signal im Isthmus und den Drüsenzellen des terminalen Bulbus, zeigte sich eine GFP-Expression in den Arkadenzellen (Abb. 3.2.4.1.A).

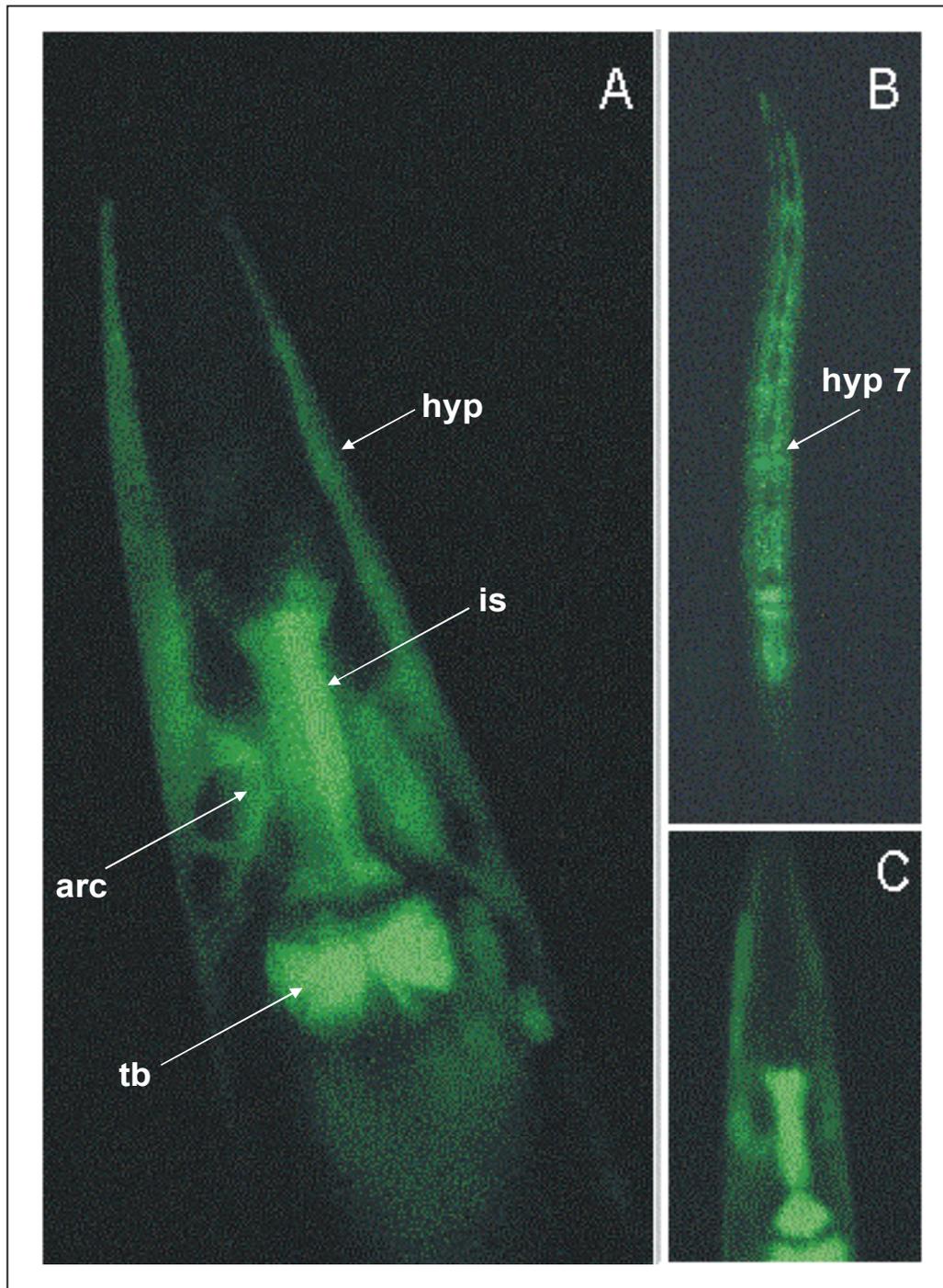


Abb. 3.2.4.1.A Expression des *Ov*-GST1a::GFP-Reportergenkonstrukts in *C.elegans*

Die Expression der *Ov*-GST1a wurde durch Transfektion eines GFP-Reportergenkonstrukts mit dem 5'-Bereich der *Ov*-GST1a in *C. elegans* analysiert. A: adulter Wurm; B: L2 Stadium; C: L3 Stadium. In den postembryonalen Stadien konnte eine deutliche Fluoreszenz in der hyp 7 Zelle beobachtet werden (B). Die stärkste Färbung konnte im Isthmus, dem

posterioren terminalen Bulbus (tb) und in den Arkadenzellen (arc), sowie in der Hypodermis nachgewiesen werden (A).

3.2.4.2 Glykosylierung der *Ov*-GST1a bei Überexpression in *C. elegans*

Da die native *Ov*-GST1a und -1b nur in geringen Mengen zu isolieren sind und die Beschaffung der Würmer einen großen Kostenfaktor darstellt, sollte die *Ov*-GST1a für weitere Untersuchungen in *C. elegans* überexprimiert werden. Für die ektopische Überexpression der *Ov*-GST1a mit und ohne Signalpeptid, wurde die entsprechende cDNA unter die Kontrolle eines Hitzeschock-Promotors (hsp 16-41) gestellt. Die Expression der *Ov*-GST1a in *C. elegans* erfolgte bei 31°C und führte zur Bildung des posttranslational modifizierten N-glykosylierten Proteins (Abb. 3.2.4.2.A, Spur A). Durch die Deglykosylierung mit N-Glykanase F, im Vergleich zu dem in *E. coli* rekombinant exprimierten Protein, zeigte sich, dass die *Ov*-GST1a das erwartete Molekulargewicht aufwies und dementsprechend in *C. elegans* korrekt prozessiert wurde (vergl. Spur B und C; Abb. 3.2.4.2.A). Dies wird auch durch die Expression der *Ov*-GST1a ohne Signalpeptid im Western Blot bestätigt (Abb. 3.2.4.2.B, Spur A). Die Spezifität des Signals konnte durch den Vergleich mit *C. elegans* Wildtyp Homogenat im Western Blot bestätigt werden (Abb. 3.2.4.2.B, Spur B). Die N-Glykosylierung der in *C. elegans* überexprimierten *Ov*-GST1a weist, soweit aufgrund des Deglykosylierungsmusters mit Endoglykosidase H, α -Mannosidase, und α -Fucosidase analysierbar (Daten nicht gezeigt), keine Unterschiede zu dem nativen, in *O. volvulus* vorliegenden Enzym auf (vergl. Abb. 3.2.1.1.A). Da durch Endoglykosidase H und α -Mannosidase, nicht aber durch α -Fucosidase und Endo- β -Galaktosidase eine Deglykosylierung nachgewiesen werden konnte, ist eine oligomannosidische N-Glykanstruktur der in *C. elegans* exprimierten *Ov*-GST1a sehr wahrscheinlich.

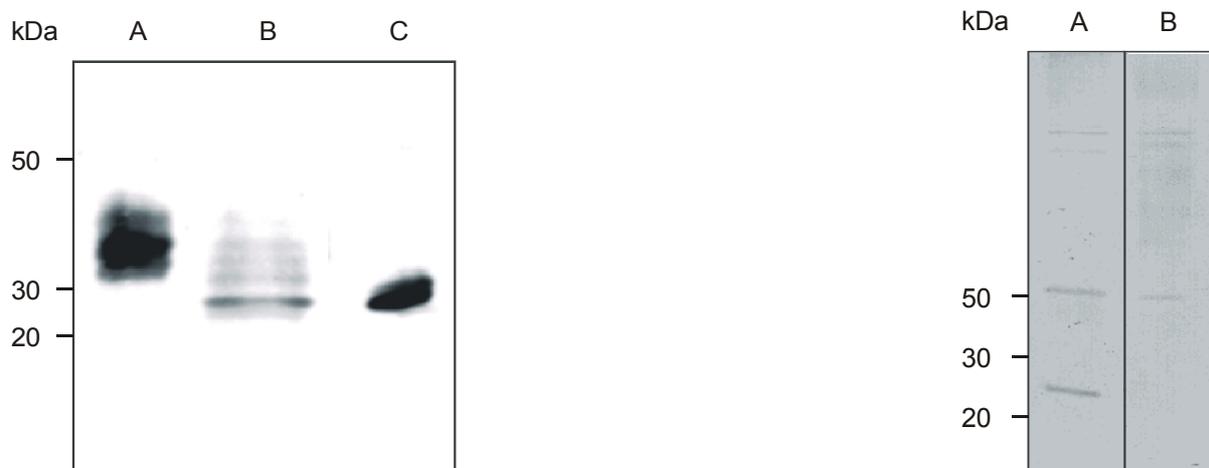


Abb. 3.2.4.2.A/B Überexpression der *Ov*-GST1a in transgenen *C. elegans*

Die gesamte Sequenz der *Ov*-GST1a mit (linke Abb.) und ohne Sequenz für das Signalpeptid (rechte Abb.) wurde in den Vektor pPD 49.83 mit dem hsp 16-49

Hitzeschockpromotor kloniert. Die Detektion der in *C. elegans* exprimierten rOv-GST1a erfolgte durch Western Blot Analyse. Die Expression der rOv-GST1a ohne Signalpeptid (Abb. rechts, Spur A) führte zu einer Bande bei 27 kDa, die dem Peptidrückgrat der GST entspricht. Abb. rechts, Spur B: *C. elegans* Wildtyp. Die Expression der rOv-GST1a mit Signalpeptid führte zur N-Glykosylierung der Ov-GST1a (Abb. links, Spur A). Die molekulare Masse von ~ 31 kDa entspricht in etwa der des nativen Proteins aus *O. volvulus*. Abb. links, Spur B: Deglykosylierung mit N-Glykanase F; Spur C: rekombinant in *E. coli* exprimierte rOv-GST1a.

3.2.4.3 Aufreinigung der posttranslational modifizierten Ov-GST1a aus *C. elegans* durch Ni²⁺-Chelatchromatografie

Die für die Überexpression von Genen in *C. elegans* bisher erhältlichen Vektoren sind mit den erforderlichen, induzierbaren Promotorbereichen und mit mRNA stabilisierenden synthetischen Introns ausgestattet, so dass eine stabile Proteinexpression in *C. elegans* gewährleistet ist. Für eine Aufreinigung der exprimierten Proteine können diese allerdings nicht genutzt werden, da keine Expressionskassetten für die Bildung der entsprechenden, affinitätschromatographisch zu nutzenden Aminosäuren existieren.

In 3.2.4.2 konnte die Expression der posttranslational modifizierten rOv-GST1a in *C. elegans* durch Western Blot nachgewiesen werden. Da *C. elegans* basierend auf der Analyse der verfügbaren EST-Datenbanken selbst über mehr als 40 Sequenzen mit Homologien zu GST verfügt, ist eine affinitätschromatografische Aufreinigung über GSH- oder S-Hexyl GSH-Sepharose ausgeschlossen. Da die ektopische Expression der rOv-GST1a unter Kontrolle des Hitzeschockpromotors hsp16-41 erfolgreich war, wurde der Vektor pPD 49.83 durch Insertion eines His-Schwanzes in die 2. „Multiple Cloning Site“ (MCS) unter Erhalt aller verfügbaren Restriktionsschnittstellen modifiziert. Direkt nach der Sac I-Restriktionsschnittstelle, Position: 578 bp, wurde durch PCR eine Sequenz von 10 CAT-Nukleotiden und eines TGA-Stopcodons inseriert. Innerhalb der 2. MCS können damit alle Restriktionsschnittstellen ab Nhe I (541 bp) genutzt werden, die Nco I-Schnittstelle (557 bp) kann als alternativer Translationsstartpunkt dienen (Abb. 3.2.4.3.A).

3.2 Ergebnisse *Onchocerca volvulus* GST1a und -1b

Schematische Darstellung des Plasmid pPD49.83 mit C-terminalem His-Schwanz für die Überexpression und Aufreinigung von potentiellen Vakzinekandidaten in *C.elegans*

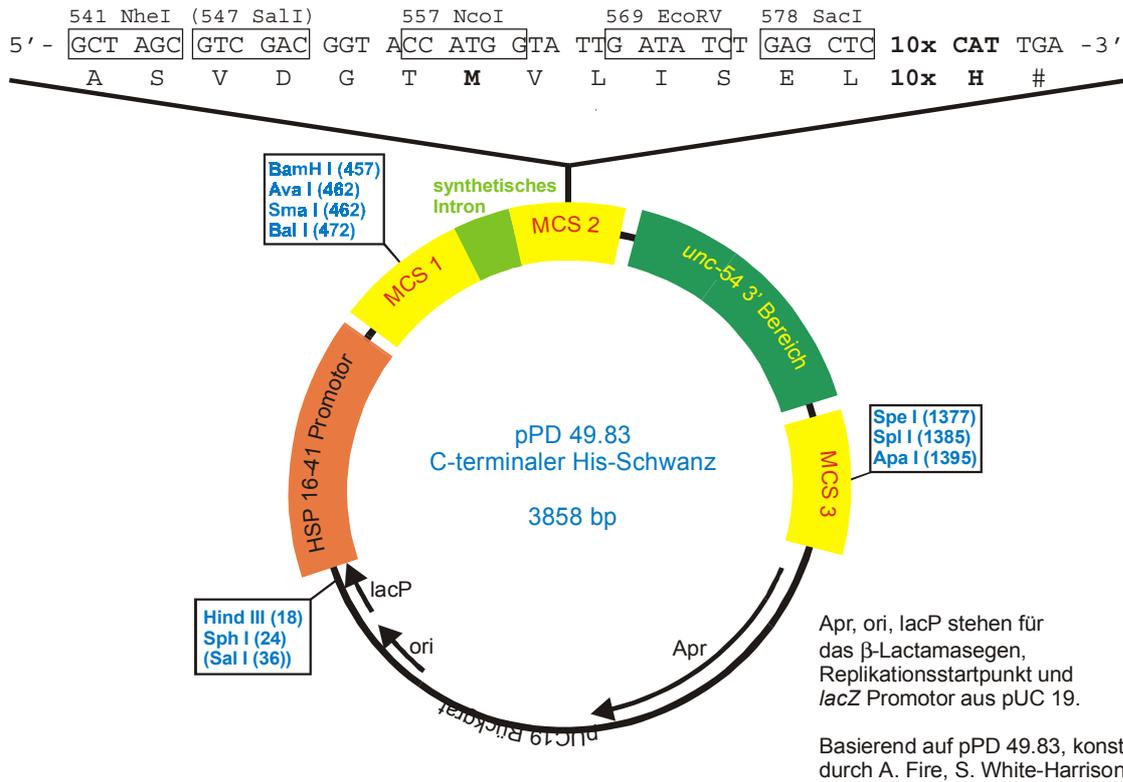


Abb. 3.2.4.3.A Abbildung des modifizierten Plasmidvektors pPD 49.83 für die Aufreinigung von ektopisch exprimierten Proteinen in *C. elegans* über Ni^{2+} -Chelatchromatographie

In den Vektor pPD 49.83 mit hsp 16-41 Promotor (A. Fire, Carnegie Institution of Washington, Baltimore, MD) wurde eine Nukleotidsequenz von 10 CAT-Codons inklusive einer TGA-Stopsequenz am 3'-Ende der MCS II eingebaut. Damit wurden die bereits integrierten Klonierungskassetten erhalten und eine affinitätschromatographische Aufreinigung exprimierter Proteine durch Ni^{2+} -Sephrose möglich.

Dieser Vektor wurde für die Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung der Ov-GST1a über Ni^{2+} -Sephrose genutzt. Durch Verwendung der Restriktionsschnittstellen BamHI (457 bp) und EcoRV (569 bp) konnte die rOv-GST1a mitsamt der Signalsequenz kloniert und mit dem, für die Aufreinigung erforderlichen C-terminalen His-Schwanz, exprimiert werden (Abb. 3.2.4.3.B). Die C-terminale Verlängerung der Ov-GST1a scheint keinen Einfluss auf die N-Glykosylierung des Enzyms zu haben (vergl. Abb. 3.2.4.2.A; Spur A).

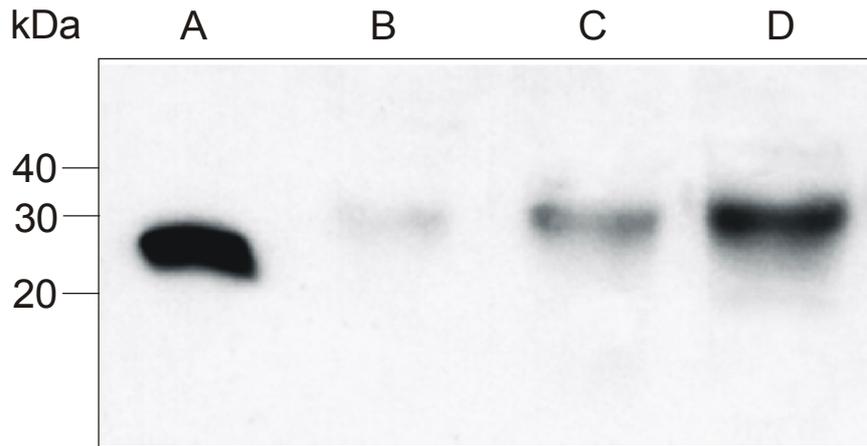


Abb. 3.2.4.3.B Western Blot Analyse der in *C. elegans* überexprimierten rOv-GST1a mit C-terminalem His-Schwanz

Nach Expression der rOv-GST1a plus C-terminalem His-Schwanz in *C. elegans* (Hitzeschock: 2h, 31°C) wurden die Würmer homogenisiert und die rOv-GST1a über Ni²⁺-Sephrose gereinigt. Nach Auftrennung über ein 12,5% (w/v) SDS-PAGE und Western Blot Analyse konnte die rOv-GST1a spezifisch bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (0,5 µg, 1 µg, 3 µg Protein) nachgewiesen werden (Spur B-D). Spur A: rekombinant in *E. coli* exprimierte rOv-GST1a mit N-terminaler Verlängerung.

3.3 *Onchocerca volvulus*-GST3

3.3.1 Identifizierung von 3 verschiedenen Transkripten der Ov-GST3

3.3.1.1 Isolierung der cDNA-Sequenzen der Ov-GST3a, -3b, -3c

Der 3'-Bereich der Ov-GST3 mRNA wurde im Zuge einer „Differential Display“ (DD) RT-PCR Analyse identifiziert, bei der insgesamt 118, durch oxidativen Stress hochregulierte Transkripte kloniert und sequenziert wurden⁶⁵. Die Behandlung der Würmer mit Xanthin/Xanthin-Oxidase führte, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollwürmern, zum Anstieg der Transkriptmenge eines 280 bp großen Fragments der Ov-GST3, welches isoliert und charakterisiert werden konnte. Neben dem 3'- nichttranslatierten Bereich kodierte das Fragment für einen offenen Leserahmen von 45 Aminosäuren. Für die Isolierung der gesamten cDNA der Ov-GST3 wurde eine λ ZAPII cDNA-Bank aus adulten *O. volvulus* Würmern mit dem 280 bp Fragment gescreent, wobei 14 Phagen isoliert und durch *in vivo* Excision in das Plasmid pBluescript-SK⁺ eingebracht wurden.

3.3.1.2 Vergleich der isolierten cDNA-Sequenzen der Ov-GST3

Bei der Sequenzierung der positiven, aus der λ ZAPII cDNA-Bank isolierten Ov-GST3-Klone zeigte sich, dass diese im 5'- und im 3'-Bereich identisch sind, im mittleren Sequenzbereich

jedoch eine Deletion bzw. ein 63 bp umfassendes Intron enthalten (Abb.3.3.1.2.B). Dargestellt ist die Sequenz des längsten gefundenen cDNA-Transkripts (*Ov*-GST3c) von 861 bp, das hier vorkommende Intron (dunkelgrau unterlegt) führt zur Ausbildung eines Stopcodons und damit zu einem nur 171 Aminosäuren umfassenden offenen Leserahmen. Das zweite identifizierte Transkript, im Folgenden *Ov*-GST3b genannt, ist korrekt gespleisst und bildet mit 816 bp einen offenen Leserahmen für 265 Aminosäuren. Die *Ov*-GST3a, als kürzestes Transkript, unterscheidet sich von der *Ov*-GST3b durch das Fehlen des mittleren Sequenzbereichs (349 – 471 bp in Abb. 3.3.1.2.B, hellgrau unterlegt). Der offene Leserahmen beträgt hier 675 bp und kodiert damit für ein Protein von 224 Aminosäuren. Die Größen der isolierten 3 Transkripte der *Ov*-GST3 liegen mit dem nichttranslatierten 5'-Bereich und dem langen, nichttranslatierten 3'-Bereich mit Poly(A)-Schwanz bei 834 bp, 957 bp und 1038 bp (*Ov*-GST3a, -3b, -3c; s. Abb. 3.3.1.2.B). Als Polyadenylierungssignal wurde mit der „Hammer-Clustering“ Methode, basierend auf bekannten Poly(A)-Signalen von Sequenzen aus der EMBL Datenbank, die Sequenz 5'-CGATTCAATC-3' (Abb. 3.3.1.2..B, unterstrichen) bestimmt (<http://www.itba.mi.cnr.it/webgene>). Das Vorkommen von 3 verschiedenen *Ov*-GST3 Transkripten konnte auch mit Hilfe einer PCR mit spezifischen Oligonukleotidprimern und *O. volvulus* mRNA nachgewiesen werden (Abb. 3.3.1.2.A). Der Nachweis der 3 Transkripte durch einen „virtuellen Northern“ Blot zeigte nur 2 der 3 gefundenen Transkripte. Dies deutet möglicherweise auf sehr geringe Mengen an *Ov*-GST3 mRNA unter physiologischen Bedingungen, also frei von oxidativem Stress, hin.

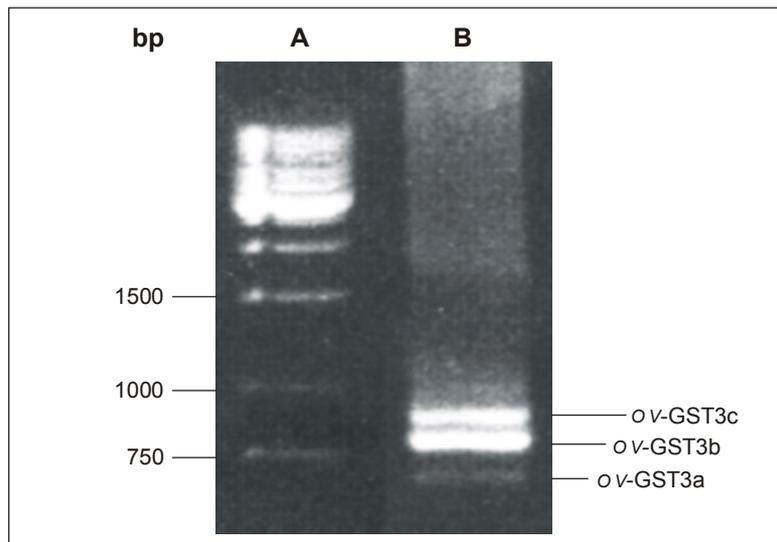


Abb. 3.3.1.2.A Nachweis der 3 *Ov*-GST3 Transkripte in *O. volvulus* durch PCR

Die PCR zum Nachweis der 3 *Ov*-GST3 Transkripte wurde unter stringenten Bedingungen mit 100 ng *O. volvulus* cDNA und mit spezifischen Oligonukleotidprimern durchgeführt. 1/10 (v/v) der PCR (30 Zyklen) wurde auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und die Produkte mit Ethidiumbromid gefärbt. Die erhaltenen DNA-Fragmente (Spur B) von ~700, 800 und 850 bp (vergl. DNA-Größenstandard Spur A) stimmen in ihrer Größe mit den erwarteten

3.3 Ergebnisse *Onchocerca volvulus* GST3

Fragmenten überein und bestätigen damit das Vorkommen der 3 verschiedenen Ov-GST3 Transkripte.

															Ov-GST				
															-3a	-3b	-3c		
5' -TAATATTACTGTACGACA																	18		
M	F	G	S	L	L	I	C	I	L	C	F	S	F	A	D	I			17
ATG	TTT	GGC	TCA	TTA	TTG	ATA	TGC	ATC	CTG	TGT	TTC	TCA	TTC	GCA	GAT	ATA			69
A	T	A	I	S	L	N	Q	F	M	S	R	F	P	Q	Q	G			34
GCG	ACA	GCA	ATC	AGT	CTA	AAT	CAA	TTT	ATG	TCA	AGA	TTT	CCT	CAA	CAA	GGG			120
N	K	K	Q	K	Q	D	L	S	T	E	Y	P	E	P	S	S			51
AAT	AAA	AAG	CAA	AAG	CAA	GAT	TTG	AGT	ACA	GAG	TAT	CCA	GAA	CCT	TCA	TCG			171
N	S	V	R	I	Y	S	L	P	F	C	P	Y	G	E	S	V			68
AAC	TCT	GTC	CGG	ATT	TAT	TCG	CTG	CCA	TTT	TGT	CCG	TAT	GGT	GAA	AGT	GTC			222
I	L	A	A	Y	K	K	G	I	Q	F	D	I	G	Y	I	N			85
ATC	CTT	GCT	GCG	TAT	AAA	AAA	GGC	ATT	CAA	TTT	GAC	ATT	GGA	TAT	ATT	AAT			273
H	P	Y	Q	M	N	W	F	L	A	K	N	P	E	G	A	L			102
CAC	CCA	TAT	CAA	ATG	AAC	TGG	TTT	CTC	GCG	AAG	AAT	CCT	GAA	GGG	GCT	CTA			324
P	A	V	E	H	N	G	E	L	V	I	D	S	L	V	I	M	110	119	
CCA	GCT	GTA	GAA	CAT	AAT	GGA	GAG	CTT	GTG	ATT	GAC	TCC	CTA	GTA	ATT	ATG	348	375	
E	Y	L	D	D	V	F	S	E	N	S	I	L	P	D	E	P			136
GAA	TAT	CTG	GAT	GAT	GTG	TTC	TCG	GAA	AAC	AGC	ATT	TTG	CCC	GAT	GAA	CCA			426
Y	L	R	A	K	Q	R	Y	E	A	I	K	L	D	S	V	R			151 153
TAT	CTG	AGA	GCA	AAG	CAA	CGA	TAT	GAG	GCA	ATT	AAA	CTA	GAT	TCG	GTG	CGT	471	477	
R	L	V	F	K	T	S	S	I	R	T	F	D	N	T	F	L			170
CGA	TTA	GTT	TTT	AAA	ACT	TCA	TCT	ATC	CGA	ACT	TTT	GAT	AAT	ACC	TTT	CTA			528
L	@	I	C	D	A	I	R	K	V	S	Y	S	K	K	L	T	125	166	171
TTA	TAG	ATA	TGT	GAT	GCA	ATA	CGG	AAA	GTA	TCA	TAT	TCA	AAA	AAG	CTA	ACT	393	516	579
G	N	I	T	M	L	T	M	E	L	T	E	A	E	Q	M	L	142	183	
GGC	AAT	ATC	ACC	ATG	CTT	ACG	ATG	GAG	CTT	ACC	GAG	GCT	GAA	CAA	ATG	CTA	444	567	630
E	S	P	F	Y	S	G	E	T	F	G	L	P	D	I	V	L	159	200	
GAA	TCT	CCT	TTT	TAT	TCA	GGC	GAA	ACA	TTC	GGC	TTG	CCA	GAT	ATT	GTC	TTG	495	618	681
Y	P	C	I	Q	R	L	Y	M	I	G	Q	T	I	N	D	S	176	217	
TAT	CCG	TGT	ATT	CAA	CGA	TTA	TAT	ATG	ATC	GGA	CAA	ACC	ATT	AAC	GAC	AGT	546	669	732
F	L	H	N	Y	F	P	D	H	F	P	K	L	S	E	W	F	193	234	
TTC	CTT	CAC	AAT	TAT	TTC	CCA	GAT	CAC	TTT	CCA	AAA	CTT	TCA	GAA	TGG	TTC	597	720	783
T	R	M	Q	T	L	R	E	I	Q	A	M	Q	E	I	K	Q	210	251	
ACC	AGA	ATG	CAA	ACT	CTG	AGA	GAG	ATC	CAG	GCA	ATG	CAA	GAA	ATA	AAA	CAG	648	771	834
Y	L	G	N	F	V	Y	G	S	G	Y	Y	N	A	#			224	265	
TAT	TTA	GGA	AAT	TTT	GTA	TAC	GGC	AGT	GGA	TAT	TAC	AAT	GCC	TAA			693	816	897
ATTCGACATCGATCTCTTTAGCCTAAATTGAAATTTTCGAGCGATTCAATCAATTCCTAATTTTTTGT	760	883	964																
GAATTATATTTTTATATTTACTACTTTTTTGTTCATGAAATTTTTTCCCTTTTAAAAAAAAAAAA	827	950	1031																
AAAAAAAA-3'	834	957	1038																

Abb. 3.3.1.2.B Nukleotid- und abgeleitete Proteinsequenz der Ov-GST3a, -3b, -3c

Die Sequenz der Ov-GST3c als längstes isoliertes Transkript umfasst mit 5'- und 3'-nichttranslatiertem Bereich 1038 bp; das hier vorkommende Intron (dunkelgrau unterlegt) beinhaltet ein Stopcodon (534 bp) und bildet damit einen offenen Leserahmen von 171 Aminosäuren (AS). Die Ov-GST3b (957 bp) enthält dieses Intron nicht und kodiert damit für ein Protein von 265 AS. Der Ov-GST3a als kleinstem Spleissprodukt fehlt im Vergleich zur Ov-GST3b ein Bereich von 123 bp (hellgrau) und bildet damit einen offenen Leserahmen von 224 AS. Translationsstartpunkt und Stopcodons sind fett markiert, die Poly(A)-Signalsequenz ist unterstrichen. In der rechten Spalte ist die Anzahl der Aminosäuren (AS; obere Zeile) und

Nukleotide (bp; untere Zeile) neben der Sequenz für die einzelnen Transkripte angegeben; bei Übereinstimmung der Anzahl ist diese stellvertretend für alle Transkripte in der Spalte der *Ov*-GST3b angegeben.

3.3.1.3 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der 3 mRNA-Transkripte der *Ov*-GST3

Die 3 identifizierten Transkripte der *Ov*-GST3 kodieren für 3 Proteine mit errechneten molekularen Massen von 25 700 Da (*Ov*-GST3a), 30 500 Da (*Ov*-GST3b) und 19 500 Da (*Ov*-GST3c). Die berechneten isoelektrischen Punkte (pI) der Proteine liegen bei pH 5,68, 4,9 und 5,37. Basierend auf einer ersten Analyse der Genstruktur der *Ov*-GST3 konnte festgestellt werden, dass die *Ov*-GST3c nicht korrekt gespleisst wird und noch Intron V enthält. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines Stopcodons im offenen Leserahmen an AS-Position 172 und somit weist die *Ov*-GST3c ausschließlich die typische N-terminale Domänenstruktur der GST Superfamilie auf (Abb. 3.3.1.3 A).

Der *Ov*-GST3a fehlen die durch Exon V kodierten Aminosäuren 111 - 151, wodurch das N-terminale GST-Sekundärstrukturmotiv $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ unterbrochen wird und nur die typische C-terminale, ausschließlich α -helikale Domäne als GST-Motiv erhalten bleibt (Abb. 3.3.1.3 A).

Die *Ov*-GST3b hat einem offenen Leserahmen von 265 Aminosäuren besitzt somit die für GST typischen N- und C-terminalen Domänen (s. Abb. 3.3.1.3 A).

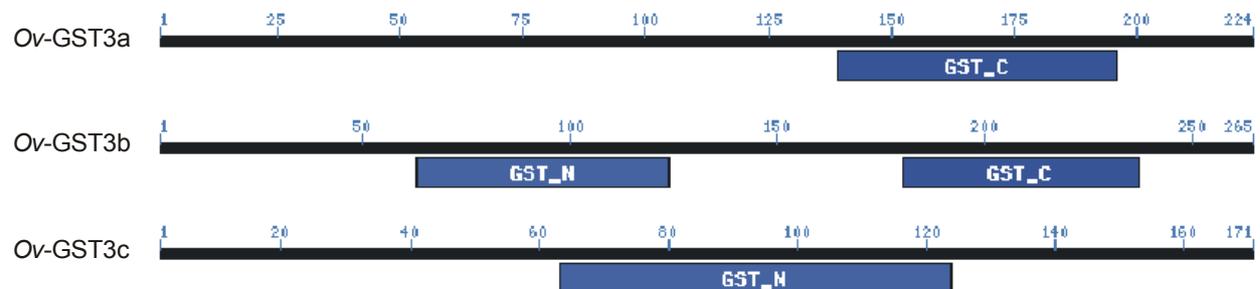


Abb. 3.3.1.3 A Konservierung der GST Domänenstruktur der *Ov*-GST3a, -3b, -3c

Die drei verschiedenen Transkripte führen möglicherweise zur Bildung von drei Proteinen, die sich grundlegend in ihrer Domänenstruktur unterscheiden. Während bei der *Ov*-GST3a die N-terminale Domäne mit dem Strukturmotiv für die GSH-Bindung fehlt, ist die *Ov*-GST3c durch das Fehlen der C-terminalen Domäne für die Ausbildung der hydrophoben Substratbindungstasche gekennzeichnet. Die *Ov*-GST3b hingegen weist beide typischen GST-Struktur motive auf.

In Abb. 3.3.1.3 B ist die Sekundärstrukturvorhersage für die *Ov*-GST3b, basierend auf 5 verschiedenen Berechnungsmethoden (Jnet Vorhersage, Jnet Alignment Vorhersage, Jnet hmm Profil, Jnet PSIBLAST pssm Profil, Jnet PSIBLAST Häufigkeit; <http://www.cse.ucsc>.

edu/research/compbio/) dargestellt. Aufgrund dieser Analyse und der Sequenzhomologie zu anderen bekannten GST, ist die *Ov*-GST3 der Omega-Klasse zuzuordnen.

```

1-----11-----21-----31-----41-----51-----61-----71-----81-
MFGSLILICILCFSFADIATAISLNQFMSRFPQQGNKKQKQDLSTEYPEPSSNSVRIYSLPFCPYGESVILAAAYKKGIQFDIGY
---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---E-----HHHHHHHHHH---E-----

-----91-----101-----111-----121-----131-----141-----151-----161---
INHPYQMNWFLAKNPEGALPAVEHNGELVIDSLVIMEYLDVDFSENSILPDEPYLRAKQRYEAIKLDSCDAIRKVSYSKKLT
-----HHHHHH---E-----E-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHHH---H

-----171-----181-----191-----201-----211-----221-----231-----241-----
GNITMLTMELTEAEQMLSEPFYSGETFGLPDIIVLYPCIQRLYMIGQTINDSFLHNYFPDHFPKLSEWFTRMQTLREIQAMQEI
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHHH---

-251-----261--
KQYLGNFVYVYSGYYNA
---HHHHHHHH---

```

Abb. 3.3.1.3 B Sekundärstrukturvorhersage der *Ov*-GST3b

Basierend auf der AS-Zusammensetzung, sowie Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinstrukturen konnte eine Konsensusstruktur der *Ov*-GST3 erstellt werden. Die 4 β -Faltblattstrukturen (E) und 10 α -helikalen Bereiche (H) im homologen Bereich ab AS-Position 32, entsprechen in Lage und Länge weitgehend den durch Röntgenstrukturanalyse bekannten GST der Omega-Klasse.

Die Homologie zu den bekannten Omega-GST der Säugetiere (Ratte, Acc. AB00880; Maus, Acc. U80819 und Mensch Acc. AF212303) beginnt erst an AS-Position 32 der *Ov*-GST3b und weist eine Sequenzähnlichkeit von 39% bei einer Identität von 23% auf. Die für die GSH-Bindung essentiellen Aminosäuren, basierend auf der Röntgenstrukturanalyse der humanen GSTO1-1, sind weitgehend konserviert bzw. konserviert ausgetauscht (L56/H86, K59/Q89, L71/A101, V72/L102, E85/D114, S86/S115 (GSTO1-1/*Ov*-GST3b)). Die für eine S-Thioltransferaseaktivität der *Ov*-GST3 nötige Sequenz „FCP“, mit dem für die Aktivierung der Thiolgruppe essentiellen Cysteinrest, ist in der *Ov*-GST3b an äquivalenter Position konserviert (C32/C62). Neben den genannten strukturellen Eigenschaften der *Ov*-GST3, ist diese durch einen langen N-terminalen Sequenzbereich ohne Homologien zu anderen GST der Omega-Klasse gekennzeichnet. Die Analyse dieses N-terminalen Bereichs (AS 1-70) mit dem Programm SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/Services/SignalP-2.0/>) führte zur Identifizierung eines Signalpeptids mit einer potentiellen Spaltstelle zwischen den Aminosäuren A20 und I21. Diese Vorhersage wurde unter Verwendung anderer Programme (TargetP V1.0; www.dtu.dk/Services/TargetP/; SigFind V2.10; www.stepc.gr/~synaptic/

sigfind.html) bestätigt und weist damit auf eine Translokation der *Ov*-GST3 in das endoplasmatische Retikulum hin^{101,102}.

3.3.2 PCR-basierte Analyse der Genstruktur der *Ov*-GST3

3.3.2.1 Isolierung des *Ov*-GST3 Gens

Das haploide Genom von *O. volvulus* umfasst etwa $1,5 \times 10^8$ Basenpaare. Für eine erste Charakterisierung der drei verschiedenen Transkripte der *Ov*-GST3 wurde die genomische Organisation der GST analysiert. Aufgrund der bekannten cDNA Sequenzen der 3 Transkripte war es möglich mit Hilfe von PCR und genomischer DNA von *O. volvulus*, die Genstruktur der *Ov*-GST3 zu untersuchen. Durch Verwendung von Oligonukleotiden im 5'- und 3'-Bereich der bekannten cDNA Sequenzen wurde ein Fragment von 2171 bp isoliert und im Folgenden sequenziert. Mit diesem PCR-basierten Verfahren konnte nur ein Fragment, d. h. ein Gen, der *Ov*-GST3 isoliert werden. Die 3 verschiedenen Transkripte der *Ov*-GST3 lassen sich aufgrund der ermittelten Sequenz wie in Abb. 3.3.2.2.A dargestellt, den entsprechenden Exons zuordnen. Um eine Aussage treffen zu können, ob es sich bei den 3 Transkripten um alternative Spleissprodukte oder um verschiedene Gene handelt, ist allerdings die Analyse einer genomischen Phagenbank von *O. volvulus* vonnöten. Dies soll im Rahmen in einer weiterführenden Doktorarbeit durchgeführt werden.

Das durch PCR isolierte Gen der *Ov*-GST3 umfasst 2171 bp mit 8 Exons und 7 Introns (Abb. 3.3.2.2.A). Den beiden nur 23 und 77 bp langen Exons I und II folgen die beiden längsten Intronsequenzen des Gens (372 bp Intron I, 271 bp Intron II). Alle Intron- und Exongrenzen sind im Sinne der 5'-GT - AG-3' Regel konserviert. Durch diese Analyse konnte festgestellt werden, dass die *Ov*-GST3c in ihrer Sequenz einen der hier als Intron identifizierten Bereiche enthält (Intron V), was die Ausbildung eines Stopcodons zur Folge hat. Der Unterschied der 3 Transkripte liegt in dem hier als Exon V identifizierten Sequenzbereich. Während dieser Bereich in den Transkripten der *Ov*-GST3b und -3c vorkommt, ist er in dem Transkript der *Ov*-GST3a nicht vorhanden.

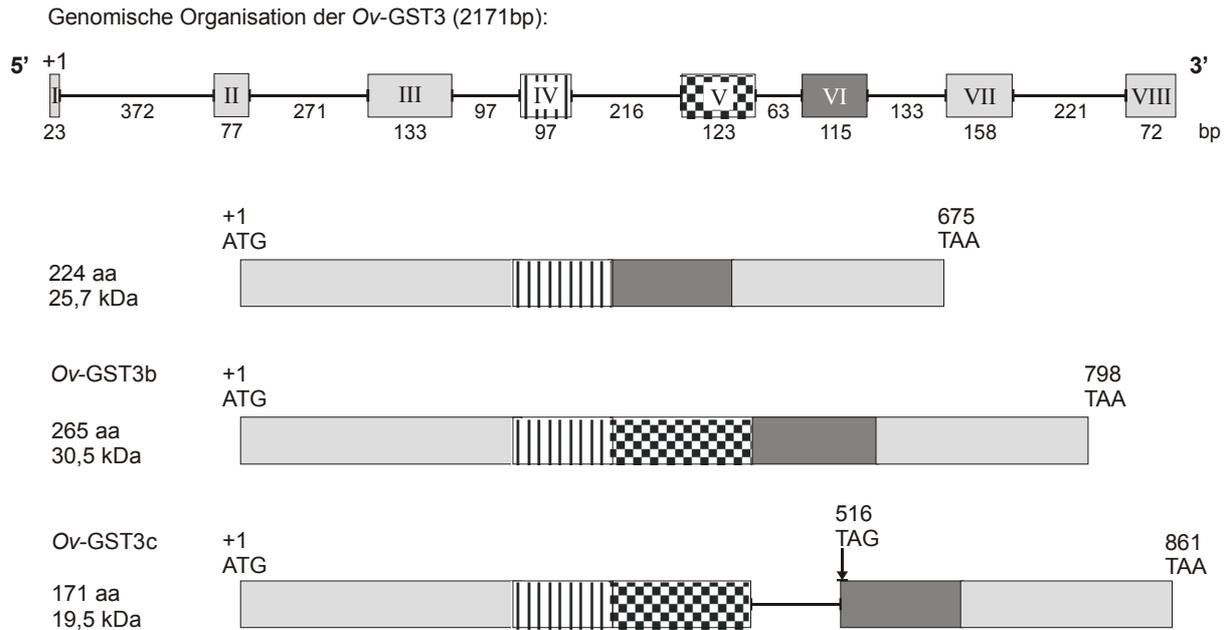


Abb. 3.3.2.2.A Schematische Darstellung der Genstruktur der *Ov*-GST3

Darstellung der genomischen Struktur der *Ov*-GST3 einschließlich der ermittelten Intron- und Exonlängen. Das isolierte Gen umfasst ~ 2,2 kb und besteht aus 8 Exons. Exon I und II folgen die beiden längsten Introns des Gens. Die bekannten Sequenzen der 3 Transkripte der *Ov*-GST3 wurden den einzelnen Exons zugeordnet.

3.3.3 Promotoranalyse der *Ov*-GST3-homologen *C. elegans* GST F13A7.10

3.3.3.1 Analyse der Promotorregionen des *Ov*-GST3 Homologs F13A7.10 aus *C. elegans*

Die Suche nach *Ov*-GST3-homologen Genen in den bekannten Datenbanken führte zur Identifizierung von 3 potentiellen Omega-Klassen GST von *C. elegans* (WormPD C29E4.7, K10F12.4 und F13A7.10). Aufgrund der Ähnlichkeit der AS-Sequenzen von über 40% zwischen der *Ov*-GST3b und F13A7.10 wurde diese GST für die Untersuchung der stadien- und gewebespezifischen Regulation anhand von Promotorstudien in *C. elegans* ausgewählt. Basierend auf den Sequenzdaten des *C. elegans* Genomprojekts konnte die potentielle Promotorregion des Gens auf Cosmid F13A7 lokalisiert und dieser Bereich auf potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen hin untersucht werden. Das Gen besitzt 3 Exons und 2 Introns und umfasst 1345 bp. Es liegt auf dem Cosmid F13A7 an Position 18 888 – 20232. Die Analyse des 5'-Bereichs zeigte, dass der nächste kodierende Bereich mehr als 10 kb von F13A7.10 entfernt vorkommt. Es wurde ein 3 kb Bereich (-3000 bis -1 bp, relativ zum Translationsstartpunkt, +1 bp) auf potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen hin untersucht.

Die Analyse der potentiellen Bindungsstellen wurde mit den Programmen MatInspector 2.0, TESS und PatSearch (http://www.genomatix.de/mat_fam; <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess33?WELCOME>) durchgeführt. Angegeben sind ausschließlich die Bindungsstellen, bei denen die Konsensusmatrix für die Bindung der Faktoren vollständig und ohne Fehler im Promotorbereich von F13A7.10 vorliegt. Ausserdem wurde die Analyse auf die Faktoren beschränkt, denen bereits eine Funktion bei der Regulation von GST bzw. von Entgiftungsenzymen unter Einfluss von endogen oder exogen ausgelöstem oxidativem Stress und Xenobiotika zugeordnet werden konnte.

In dem Bereich von -67 bis -61 bp vom Translationsstartpunkt konnte eine TATA-Box mit der Sequenz 5'-tatttaa-3' identifiziert werden. Im folgenden 5'-Bereich bei ~ -200 bp liegen 2 direkt aufeinanderfolgende Bindungsstellen für das „Activator Protein-1“ (AP-1), die für die schnelle Regulation von F13A7.10 unter oxidativem Stress von Bedeutung sein können. Als weitere Elemente, welche auf die Induktion der Transkription einen Einfluss haben könnten, sind die AP-1 und „Polyoma Virus Enhancer“ (PEA3) Bindungsstelle bei ~ -1360 bp zu nennen, da die Bindungsstellen den entsprechenden Abstand für eine synergistische Wirkung beider Transkriptionsfaktoren bei einer Bindung aufweisen. Eine weitere Interaktion von Transkriptionsfaktoren der AP-1 Bindungsstellen ist auch mit Faktoren der „Activator Protein-4“ (AP-4) Bindungsstellen, in F13A7.10 an Position -1701 bis -1692 bp, möglich. Eine „Transcription Factor-11“/„Maf Protein G“ (TCF11/MafG) Bindungsstelle, als Unterklasse der AP-1 Bindungsstellen an Position -2040 bis -2030 bp, könnte als negatives regulatorisches Element wirken. Ein als XRE („Xenobiotic Response Element“) bekanntes genomisches Induktorelement liegt im 5'-Bereich des F13A7.10 Gens an Position -2436 bis -2451. Diese Sequenz im F13A7.10 Promotorbereich ist spezifisch für die Bindung von AHR/ARNT („Aryl-Hydrocarbon Receptor“/„AHR Nuclear Translocator“) Heterodimeren, welche nachweislich bei der Regulation von Genen im xenobiotischen Metabolismus eine Rolle spielen. Weiterhin konnte an Position -2742 bis -2756 des Promotorbereichs eine BARBIE Box („Barbiturate-Inducible Element“) identifiziert werden. An Position -2338 bis -2332 und -1635 bis -1630 konnten 2 NF-1 („Nuclear Factor-1“) Bindungsstellen identifiziert werden. Die Regulation von NF-1 abhängigen Genen ist abhängig vom Redoxstatus der Zelle.

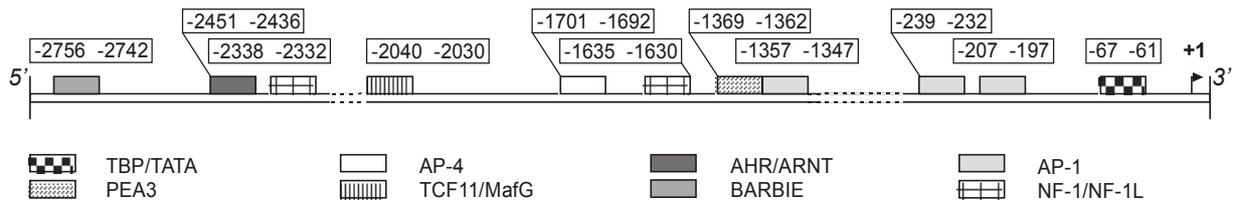


Abb. 3.3.3.1.A Schematische Darstellung der Transkriptionsfaktorbindungsstellen der Promotorregion von F13A7.10

Darstellung der ~ 3 kb umfassenden Promotorregion von F13A7.10 und der Lage der potentiellen regulatorischen Elemente des (+)-Stranges. TBP: „TATA Binding Protein“; AP: „Activator Protein“; NF-1: „Nuclear Factor-1“; BARBIE: „Barbiturate Inducible Element“; PEA3: „Polyoma Virus Enhancer“; TCF11/MafG: „Transcription Factor-11“/„Maf Protein G“; AHR/ARNT: „Aryl-Hydrocarbon Receptor“/„AHR Nuclear Translocator“.

3.3.3.2 Untersuchung des Expressionsmusters von F13A7.10 in transgenen *C. elegans*

Da die *Ov*-GST3 auf Transkriptionsebene durch oxidativen Stress sehr stringent reguliert wird⁶⁵, ist die Untersuchung möglicher regulatorischer Mechanismen dieses Gens von besonderem Interesse. Basierend auf der großen Ähnlichkeit der AS-Sequenz wurde für die Untersuchung der Regulation der Omega-Klassen die GST F13A7.10 aus *C. elegans* ausgewählt. Durch die Mikroinjektion von DNA: „Green Fluorescence Protein“ (GFP) Reporter genkonstrukten in *C. elegans* ist es möglich, transgene Organismen zu erzeugen, anhand derer die stadien- und gewebespezifische Expression von Genen analysiert werden kann.

Basierend auf der genomischen Sequenz von F13A7.10 wurden Oligonukleotide synthetisiert, mit Hilfe derer der potentielle Promotorbereich, das 1. Intron und ein kurzer Teil des 2. Exons erhalten werden konnten. Mittels PCR mit genomischer *C. elegans* DNA konnte so ein ~ 3,5 kb Fragment des Gens amplifiziert und über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen an den Oligonukleotiden in den für die Mikroinjektion benötigten GFP - Vektor pPD 95.77 kloniert werden. Nach Coinjektion dieses F13A7.10-Promotor::GFP-Reporter genkonstrukts mit dem Markerplasmid pBX in die Gonaden junger Hermaphroditen (*phal*-Mutanten) und folgender Selektion aufgrund von Thermotoleranz, wurden zwei transgene Linien erhalten, deren Folgegenerationen die injizierte DNA in Form von extrachromosomalen Arrays tragen.

Bereits die frühen embryonalen Stadien zeigen eine deutliche Expression von F13A7.10. Die ersten GFP-Signale können in den Embryonen etwa 10h nach der Befruchtung beobachtet werden (s. Abb. 3.3.3.2.A). Da die Zellteilungen zu diesem Zeitpunkt bereits vollendet sind, konnten die GFP-Signale den anterioren und den posterioren Regionen des Darms zugeordnet werden. F13A7.10 wird zu jedem Zeitpunkt des Lebenszyklus von *C. elegans* in

den Darmzellen 1 und 9 (int 1, int 9) sowie den Zellen des Intestinal-Rektal-Ventils (vir) und den Rektal-Epithelial-Zellen (rep) exprimiert. In den ersten 3 Juvenilstadien (L1, L2 und L3) ist die Fluoreszenz der posterior gelegenen vir, rep und int 9 Zellen (Abb. 3.3.3.2.B) deutlich ausgeprägter als die der anterior gelegenen int 1 Zellen (s. Abb. 3.3.3.2.C). Ab dem 4. Juvenilstadium scheint die Expression von F13A7.10 in den anterioren Darmzellen zuzunehmen, so dass das GFP-Signal der int 1 Zellen (s. Abb. 3.3.3.2.D/D') in seiner Intensität dem der posterioren Darmzellen entspricht (Abb. 3.3.3.2.E).

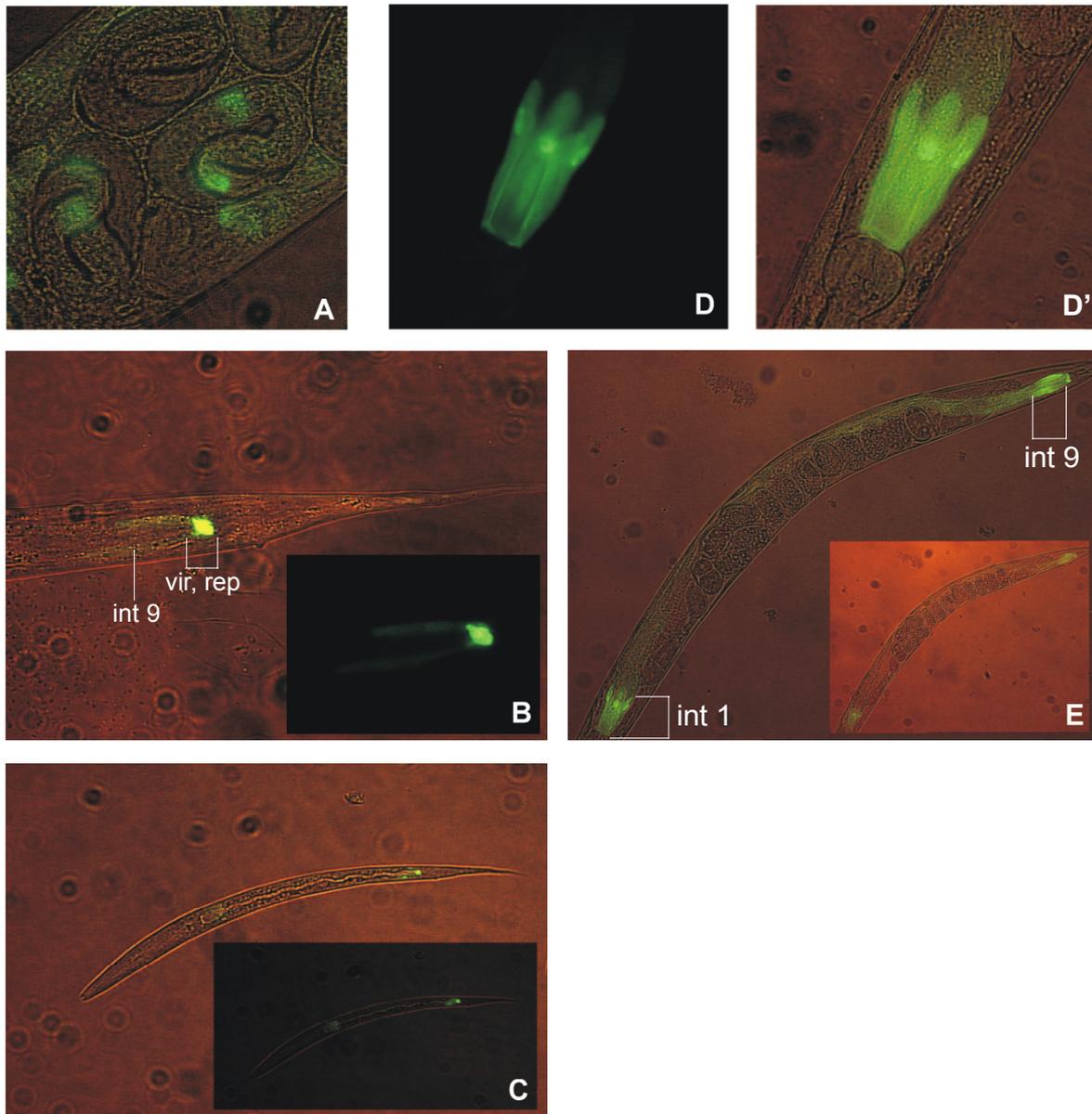


Abb. 3.3.3.2.A – E Gewebe- und stadienspezifische Expression des F13A7.10-Promotor::GFP-Reportergenkonstrukts in transgenen *C. elegans*

Die Expression von F13A7.10 kann bereits in den postembryonalen Stadien der Würmer beobachtet werden (A). Die stärksten GFP-Signale sind in den intestinalen Zellen 1 und 9 (int 1, int 9; B,C,D, D'), sowie in den Zellen des Intestinal-Rektal-Ventils (vir) und den Rektal-Epithelial-Zellen (rep) nachzuweisen (B). In den adulten Tieren erstreckt sich die GFP-

Fluoreszenz zum Teil über alle Darmzellen, erreicht aber nie die Stärke des Signals der int 1 und int 9 Zellen (E).

Neben diesen Zellen in denen F13A7.10 in allen Entwicklungsstadien von *C. elegans* exprimiert wird, ist vor allem in den adulten Stadien auch eine Expression von Zellen des pharyngealen Nervensystems zu beobachten (s. Abb. 3.3.3.2.F/F' und 3.3.3.2.I). Die neuronalen Zellkörper des insgesamt 302 Neuronen umfassenden Nervensystems der adulten Tiere sind vor allem im zirkumpharyngealen Nervenring und in den ventralen und dorsalen Nervensträngen konzentriert. In den adulten Tieren kann eine deutliche Fluoreszenz im Bereich dieses zirkumpharyngealen Nervenringes beobachtet werden. Die GFP-Signale in Abb. 3.3.3.2.G/G' und H deuten darauf hin, dass F13A7.10 im Ringinterneuron (RIR), als Teil des Nervenringes, exprimiert wird. Der Zellkörper dieses bipolaren Neurons liegt ventrolateral des Isthmus und anterior zum terminalen Bulbus. Die beiden davon ausgehenden Dendriten umfassen den Isthmus und sind wahrscheinlich über Desmosomen mit nicht-neuronalen Zellen verbunden (Abb. 3.3.3.2.G/G'). Neben diesem Ringinterneuron ist auch die Fluoreszenz zweier neuronaler Zellen des anterioren Ganglions zu beobachten (Abb. 3.3.3.2.F/F', G, H). Die Neuronen dieses Ganglions sind nicht sehr eng assoziiert und liegen im Bereich des anterioren Bulbus. Eine genaue Zuordnung dieser Zellen ist nicht möglich, da diese abhängig von der Grösse des Bulbus bei verschiedenen Tieren oft verschoben sind und sich auch bei der Bewegung des Pharynx mit verschieben. In dem Bereich anterior des 1. Bulbus befinden sich vor allem die Zellkörper von Neuronen, welche Teil der Sensillen sind. Die Dendriten dieser Zellen durchdringen zumeist die Cuticula und sind somit entweder als Chemo- oder Tastsensoren tätig oder an der Umwandlung der Signale dieser Sensoren beteiligt.

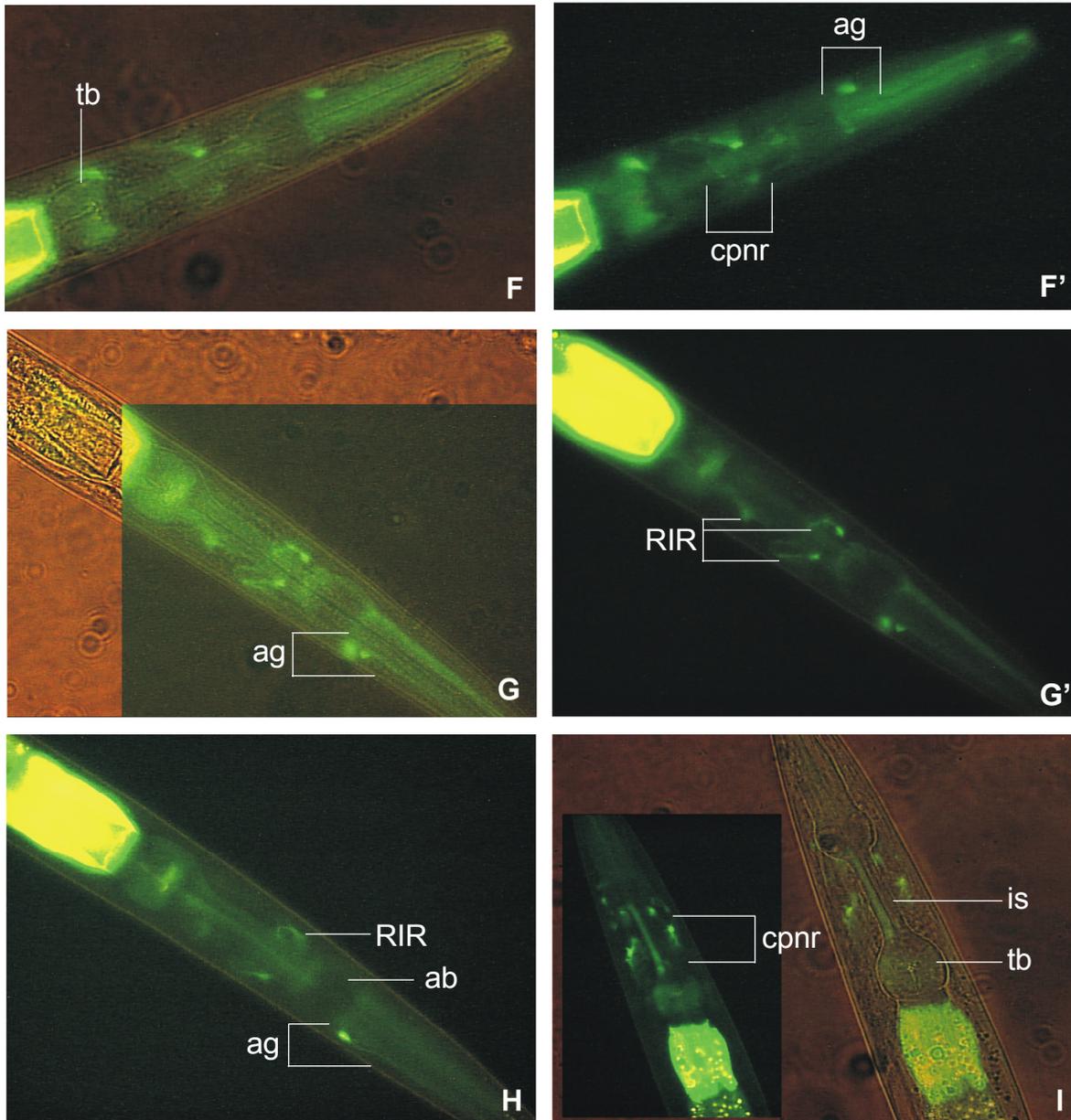


Abb. 3.3.3.2.F – I Gewebe- und stadiespezifische Expression des F13A7.10-Promotor::GFP-Reportergenkonstrukts in transgenen *C. elegans*

In den adulten *C. elegans* ist eine Fluoreszenz der im Pharynxbereich liegenden Nervenzellen zu beobachten. Neben dem zirkumpharyngealen Nervenring (cpnr) im Bereich des Isthmus (is), befinden sich dort die Neuronen des anterioren Ganglions (ag), im Bereich des anterioren Bulbus (ab) (F, F', I). Die Lage des Zellkörpers nahe des terminalen Bulbus (tb) und der den Isthmus umfassenden Dendriten spricht für eine Expression von F13A7.10 in dem als RIR bezeichneten Ringinterneuron (G', H). Weiterhin ist eine Fluoreszenz von Zellkörpern im Bereich des anterioren Ganglions festzustellen (F', G, H).

3.3.4 Untersuchung der transkriptionellen Regulation der Ov-GST3-homologen GST aus *C. elegans*

Die Suche von Ov-GST3-homologen Sequenzen in der *C. elegans* Datenbank „WormBase“ hat zur Identifizierung von 3 potentiellen GST der Omega-Klasse in *C. elegans* geführt. Um Rückschlüsse auf die Regulation dieser GST-Klasse bei Nematoden ziehen zu können, wurde der Einfluss verschiedener Xenobiotika auf die Transkriptmenge der 3 homologen GST von *C. elegans* in Induktionsversuchen mit *C. elegans* Wildtyp-Kulturen getestet. Die aus den Juvenilstadien isolierte RNA wurde durch „virtuelle Northern Blot“ Analyse auf eine transkriptionelle Regulation untersucht.

3.3.4.1 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *C. elegans* GST K10F12.4, C29E4.7 und F13A7.10 mit der Ov-GST3b

Basierend auf der Homologie der AS-Sequenzen wurden bei der Datenbanksuche die 3 Ov-GST3 Homologa K10F12.4, F13A7.10 und C29E4.7 von *C. elegans* identifiziert. Aufgrund der bekannten DNA-Sequenzen wurden Oligonukleotide synthetisiert und die entsprechenden DNA-Fragmente durch PCR mit *C. elegans* cDNA isoliert. Die Sequenzierung der erhaltenen cDNA-Sequenzen haben die in der Datenbank angegebenen Nukleotidsequenzen für K10F12.4 und C29E4.7 bestätigt. Der kodierende Bereich von F13A7.10 beträgt aufgrund der falschen Angabe einer Spaltstelle an der Grenze zum 1. Introns nur 762 bp statt 798 bp, wodurch der offene Leserahmen nicht verschoben, sondern lediglich um 12 Aminosäuren verkürzt wird. Alle drei Proteine weisen die typische GST-Domänenstruktur mit N-terminal gelegener GSH-Bindungsstelle und C-terminalem, hydrophoben α -Helixbereich auf.

K10F12.4 ist mit 309 Aminosäuren und einer berechneten molekularen Masse von 35 000 Da das grösste der drei Proteine. Der besonders lange N-terminale Bereich könnte möglicherweise, wie bei der Ov-GST3, eine Signalsequenz darstellen. Durch die Analyse der Sequenz mit dem Programm PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) wurde für K10F12.4 eine Lokalisierung im Zellkern vorhergesagt. Diese basiert allerdings nicht auf vorhandenen klassischen Lokalisierungsmotiven, sondern auf der AS-Zusammensetzung und dem hohen Anteil an basischen Aminosäuren (R/K) und stellt damit lediglich eine Vermutung dar. F13A7.10 und C29E4.7 weisen mit 254 bzw. 250 Aminosäuren berechnete molekulare Massen von ~25 000 Da auf und besitzen somit ein zur Ov-GST3b (ohne Einbeziehung des wenig homologen, N-terminalen Bereichs) vergleichbares Molekulargewicht. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei C29E4.7 und F13A7.10 um cytosolische Proteine. Die Sequenzidentität der Ov-GST3b und C29E4.7 im Alignment beträgt ~24%, die AS-Identität von F13A7.10 und Ov-GST3b beträgt ~30%

(Abb. 3.3.4.1.A). Im Gegensatz zu den bekannten Omega-Klassen GST der Säugetiere, sind die entsprechenden GST der beiden Nematoden in vielen Bereichen ihrer AS-Sequenzen nicht so stark konserviert. Der für die Aktivierung von GSH benötigte Cysteinrest, sowie die für die Positionierung dieses Rests benötigten Aminosäuren, sind allerdings auch in diesen Proteinen in dem Motif „FCP“ (Abb. 3.3.4.1.A, *) streng konserviert. Weitere Aminosäuren des aktiven Zentrums sind ebenfalls konserviert bzw. konserviert ausgetauscht (Abb. 3.3.4.1.A, *), so dass diese Proteine in die Klasse der Omega-GST eingeordnet werden können.

Der Vergleich der Genstrukturen von F13A7.10, K10F12.4, C29E4.7 mit der für die *Ov*-GST3 bekannten Genstruktur hat aufgezeigt, dass die vorhandenen Exon-Introngrenzen, v. a. in den Bereichen, die die typischen GST-Domänen kodieren, konserviert sind. Neben der Konservierung der AS-Sequenzen, verstärkt diese Beobachtung die Annahme, dass die GST zu einer Klasse gehören (s. Abb. 3.3.4.1.A).

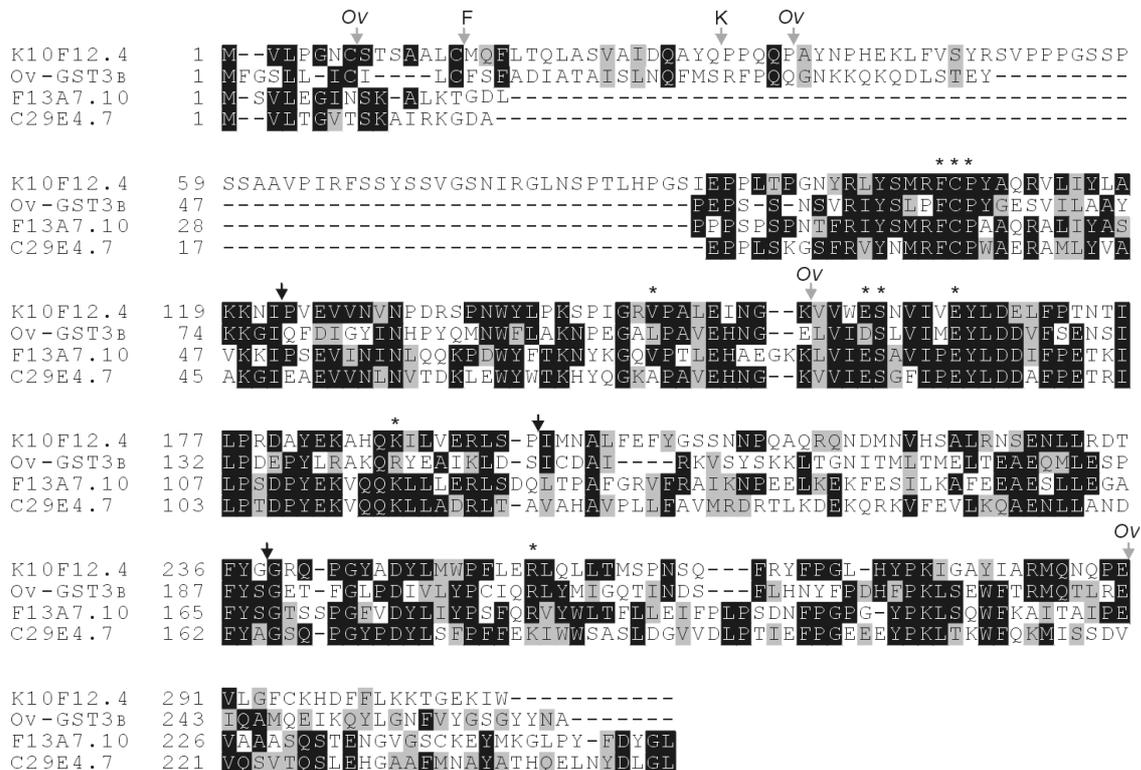


Abb. 3.3.4.1.A Alignment der *Ov*-GST3b mit den homologen GST C29E4.7, F13A7.10 und K10F12.4 aus *C. elegans*

Konservierte Aminosäuren sind schwarz, homologe AS-Austausche zwischen den Proteinen sind grau unterlegt. Besonders konservierte, für die katalytische Aktivität und die GSH-Bindung essentielle Bereiche, sind mit * markiert. Die schwarzen Pfeile markieren gemeinsame Exon-/Introngrenzen der Proteine. Die hellgrauen Pfeile stehen für individuelle Exon-/Introngrenzen und sind entsprechend der jeweiligen Proteine beschriftet. Ov: *Ov*-GST3; F: F13A7.10; K: K10F12.4.

3.3.4.2 Regulation der Transkription von K10F12.4, C29E4.7 und F13A7.10 unter oxidativen Stressbedingungen: „Virtuelle Northern Blot“ Analysen

Der Einfluss von verschiedenen, oxidativen Stress auslösenden Verbindungen auf die Transkriptmenge der *Ov*-GST3 konnte bereits durch DD RT-PCR nachgewiesen werden⁶⁵ und diente damit als Ausgangspunkt für die Untersuchung der transkriptionellen Regulation homologer Proteine in *C. elegans*. In Induktionsversuchen mit Paraquat, Dexamethason und tert-Butylhydroperoxid (tBOOH) wurde die zeit- und konzentrationsabhängige Regulation der *Ov*-GST3 Homologa in *C. elegans* durch „virtuelle Northern Blot“ Analyse untersucht.

Die für die Untersuchung verwendeten Juvenilstadien von *C. elegans* (N2 var. Bristol) wurden aufgereinigt und nach einer Erholungsphase in M9-Puffer als Medium für die Induktionsversuche eingesetzt. Die subletale Konzentration der verschiedenen getesteten Verbindungen wurde vorab durch Verdünnungsreihen bestimmt.

Der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Regulation der *Ov*-GST3 Homologa wurde durch den Redoxzykler Paraquat getestet. Paraquat wird durch die NADPH-abhängige Reaktion der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase oxidiert und initiiert aufgrund seines Radikalcharakters eine Kettenreaktion. Der durch tBOOH verursachte oxidative Stress hingegen beruht nicht auf der Initiation einer Radikalkettenreaktion, sondern führt in den Zellen zu einer S-Thiolierung essentieller Polypeptide. Da oxidativer Stress zu einer Veränderung der hormonellen Regulation der Transkription führt und die dafür verantwortlichen „Glucocorticoid Responsive Elements“ (GRE) auch bei der Regulation verschiedener GST eine Rolle spielen, wurde das auch als Medikament gegen inflammatorische Prozesse eingesetzte Glucocorticoid-Analog Dexamethason in den Induktionsversuchen eingesetzt.

Für die Induktionsversuche mit Paraquat wurde die als subletal bestimmte Konzentration von 50 mM verwendet und die *C. elegans* Juvenilstadien für bis zu 16h bei dieser Konzentration inkubiert. Als Negativkontrollen wurden gleichzeitig *C. elegans* Juvenilstadien in Puffer, ohne Zusatz von Paraquat inkubiert. Die Analyse der Transkriptmenge auf den „virtuellen Northern Blots“ erfolgte durch Hybridisierung mit den Digoxigenin-markierten gesamten DNA-Fragmenten von K10F12.4, C29E4.7 oder F13A7.10. Um die Transkriptmengen untereinander vergleichen zu können, sollte sich in jeder Spur des Blots (d. h. zu jedem Messpunkt) die gleiche Menge an DNA befinden. Dies kann indirekt über den Nachweis der DNA-Menge von Transkripten, die keiner Regulation durch oxidativem Stress unterliegen, erfolgen. Als sogenannte Ladekontrolle der DNA-Menge wurde bei dem Induktionsversuch mit Paraquat das ribosomale Protein-21 (rpl-21) von *C. elegans* verwendet. Als Ladekontrolle der Blots der Induktionsexperimente mit tBOOH und Dexamethason wurde der Initiationsfaktor 4A (WormPD F57B9.6) verwendet.

Während sich bei K10F12.4 kein Einfluss auf die Transkriptmenge durch Paraquat feststellen

lässt (Abb. 3.3.4.2.A, oben), wird die Transkriptmenge von C29E4.7 unter Einfluss von Paraquat drastisch reduziert (Abb. 3.3.4.2.A, Mitte). Bereits nach 30' kann kein Transkript der C29E4.7 mehr nachgewiesen werden. Diese drastische Herabsetzung des Transkriptlevels der C29E4.7 ist auch nach 2h noch im gleichen Ausmaß zu bemerken. Erst danach ist wieder eine Transkriptbildung dieser GST nachzuweisen.

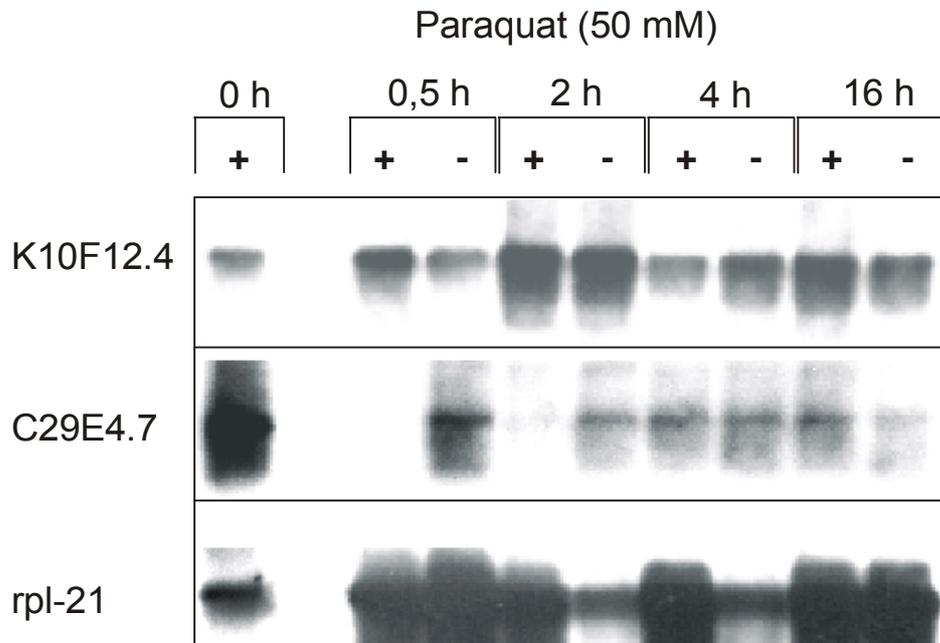


Abb. 3.3.4.2.A Einfluss von Paraquat auf die Regulation von C29E4.7 und K10F12.4

C. elegans Juvenilstadien wurden mit der als subletal bestimmten Konzentration von 50 mM Paraquat für 30', 2h, 4h und 16h inkubiert und die mRNA im Folgenden für die „virtuellen Northern Blot“ Analysen isoliert. Die Negativkontrollen (-) wurden für die gleiche Zeit in M9-Puffer ohne Paraquat inkubiert. Der Blot wurde zuerst mit K10F12.4 und dann mit C29E4.7 Digoxigenin-markierter cDNA beprobt. Als Ladekontrolle diente Digoxigenin-markierte cDNA des Proteins rpl-21 von *C. elegans*.

Um den Einfluss von Dexamethason auf die mRNA-Bildung der *C. elegans* GST zu untersuchen, wurden die Jungtiere für 1h bzw. 3h mit je 0,25 mM und 2 mg/ml Dexamethason in M9-Puffer inkubiert. Während sich bei K10F12.4 (Abb. 3.3.4.2.B, untere Abb., Mitte) und F13A7.10 (Abb. 3.3.4.2.B, obere Abb., oben) kein Einfluss von Dexamethason auf die Transkriptmenge feststellen ließ, wird C29E4.7 verstärkt transkribiert (Abb. 3.3.4.2.B, untere Abb., oben). Nach einer 3h Inkubation der Juvenilstadien mit 0,25 bzw. 2 mg/ml Dexamethason ist im Vergleich zu den Kontrollen eine deutliche Erhöhung der Transkriptmenge zu erkennen. Eine konzentrationsabhängige Regulation ist bei den gewählten Konzentrationen nach 3h allerdings nicht zu erkennen.

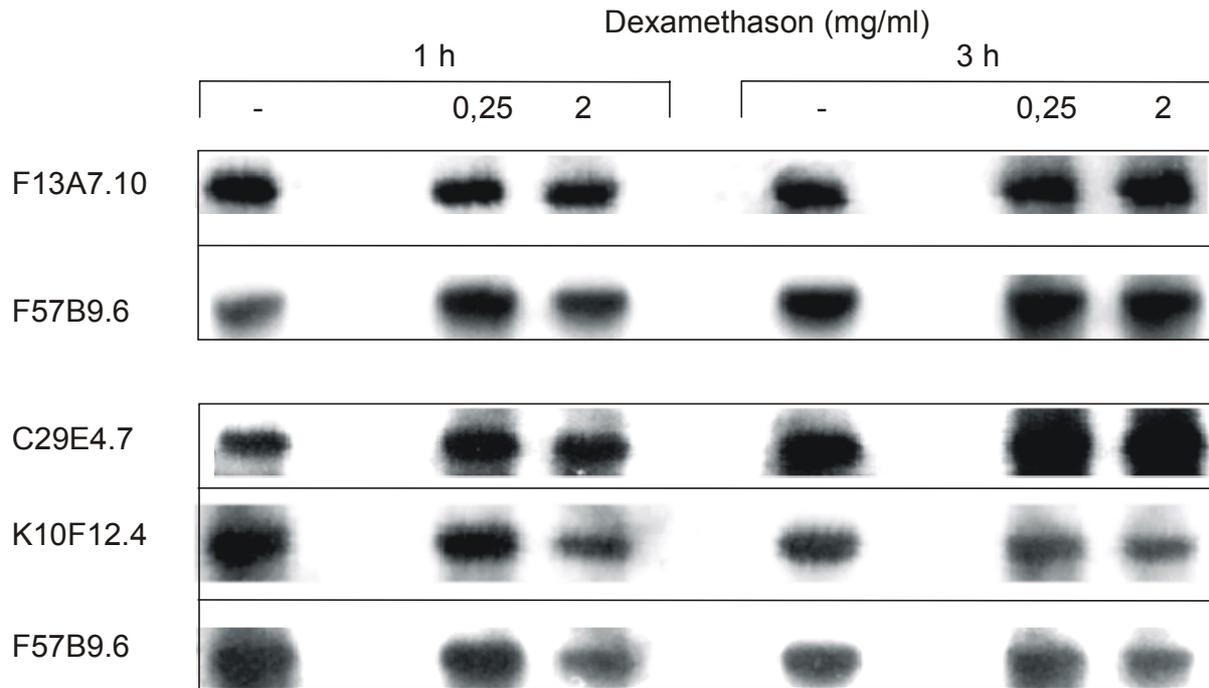


Abb. 3.3.4.2.B Einfluss von Dexamethason auf die mRNA Transkriptbildung von C29E4.7, K10F12.4 und F13A7.10

Juvenilstadien von *C. elegans* wurden mit 0,25 und 2 mM Dexamethason in M9-Puffer für 1h bzw. 3h inkubiert und die mRNA für die „virtuellen Northern Blot“ Analysen verwendet. Als Negativkontrollen wurden die Würmer für 1h bzw. 3h in M9-Puffer ohne Dexamethason inkubiert. Zum Nachweis der Transkriptmenge wurde jeweils die vollständige Digoxigenin-markierte DNA der verschiedenen Transkripte genutzt. Als Ladekontrolle der DNA-Menge in den einzelnen Spuren des Blots wurde die DNA des *C. elegans* Initiationsfaktors 4A (F57B9.6) nachgewiesen.

Der Einfluss von tBOOH auf die Transkriptmenge der GST wurde zeit- (1h, 3h) und konzentrationsabhängig (0,5, 1, 1,5 mM) untersucht. Bei C29E4.7 und K10F12.4 (Abb. 3.3.4.2.C, unterer Teil der Abb.) konnte keine Änderung der Transkriptmenge verzeichnet werden. F13A7.10 wird allerdings sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig reguliert: bereits nach 1h ist eine deutliche Zunahme der F13A7.10 Transkriptmenge im Vergleich zu der Kontrolle zu erkennen, die mit der Inkubationszeit noch weiter zuzunehmen scheint (Abb. 3.3.4.2.C, oberer Teil der Abb.).

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass die gewählten Substanzen keinen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von K10F12.4 haben, während die Transkriptmenge der GST F13A7.10 unter Einfluss von oxidativem Stress, induziert durch tBOOH, sehr schnell konzentrationsabhängig zunimmt. Die Transkriptmenge von C29E4.7 wird unter oxidativen Stress Bedingungen mit dem Redoxcycluser Paraquat drastisch reduziert, während tBOOH keinen Einfluss auf die Regulation dieser GST auf transkriptioneller Ebene hat. Die Transkription dieser GST scheint aber durch Steroidverbindungen

(Glucocorticoiden) reguliert zu werden, da die Inkubation mit Dexamethason zu einer deutlichen Induktion geführt hat.

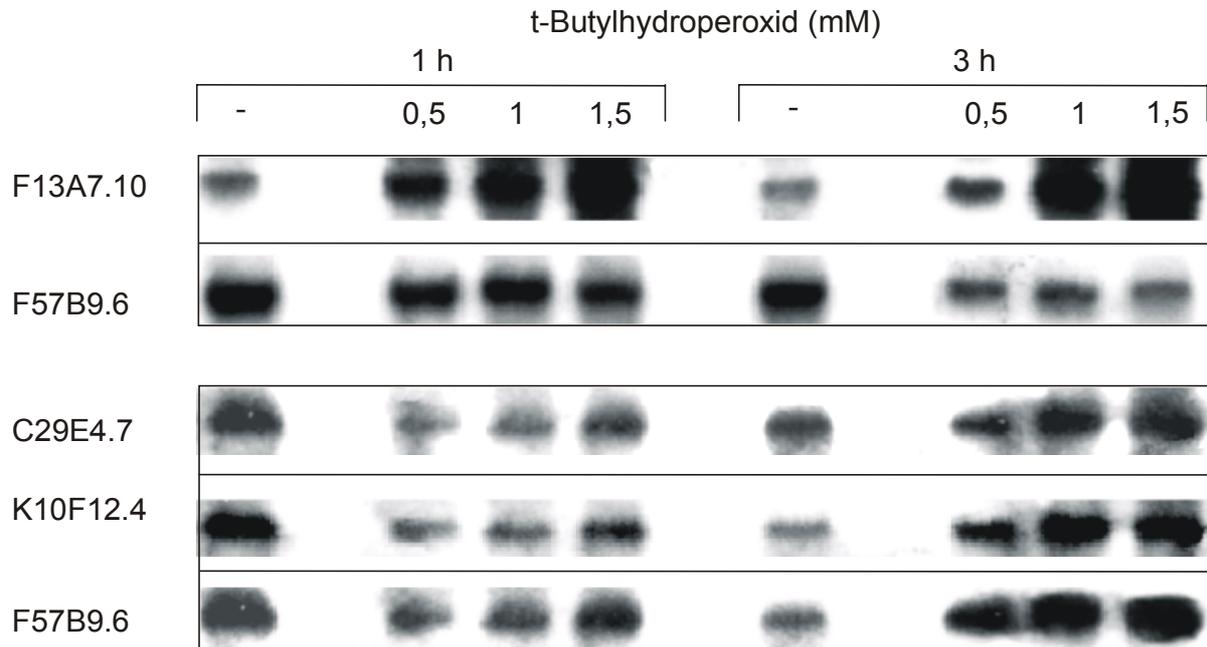


Abb. 3.3.4.2.C Einfluss von tert-Butylhydroperoxid auf die mRNA Transkriptbildung von C29E4.7, K10F12.4 und F13A7.10

C. elegans Juvenilstadien wurden mit 0,5, 1 und 1,5 mM tBOOH in M9-Puffer für 1h bzw. 3h inkubiert und die mRNA für die „virtuellen Northern Blot“ Analysen verwendet. Als Negativkontrollen wurden die Würmer für 1h bzw. 3h in M9-Puffer ohne Zusatz von tBOOH inkubiert. Zum Nachweis der Transkriptmenge wurde jeweils die vollständige Digoxigenin-markierte DNA der verschiedenen Proteine genutzt. Als Ladekontrolle der DNA-Menge wurde der *C. elegans* Initiationsfaktor 4A (F57B9.6) auf den Blots nachgewiesen.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Ov-GloI Ergebnisse

4.1.1 Das Glyoxylase-System von *O. volvulus*

Die weite Verbreitung des Glo-Systems und die Entdeckung des physiologischen Substrats Methylglyoxal haben bisher zur Zuordnung verschiedener Aufgaben dieses Systems geführt: Die Entgiftung toxischer 2-Oxoaldehyde, der glykolytische Bypass des Embden-Meyerhof-Weges und die Kontrolle der Zellproliferation¹⁰³.

Da die Helminthen als Lactat- oder „mixed-acid“-Fermenter ihren Energiebedarf vor allem über den Embden-Meyerhof-Weg decken, ist die Bildung von phosphorylierten C3-Einheiten und damit auch von Methylglyoxal entsprechend hoch im Vergleich zum Wirtsorganismus. Daher ist eine Entgiftung über die Enzyme des Glo-Systems für das Überleben der Parasiten von entscheidender Bedeutung. Die direkte Assoziation dieser Enzyme als Teil des Fremdstoffmetabolismus und als Entgiftungssystem bei oxidativem Stress, wurde erst 1996 anhand von Untersuchungen der Überlebensrate oxidativ gestresster *S. cerevisiae* Zellen festgestellt^{104,105}.

4.1.2 Sequenzanalyse der Ov-GloI

Die EST-Analyse einer *O. volvulus* cDNA-Bank Ivermectin behandelter Wümmern, führte zur Isolierung eines cDNA-Fragments von ~ 400 bp aus dem 3'-Bereich der Ov-GloI. Im Folgenden konnte durch das Screening einer λ Uni-Zap XR cDNA-Bank die vollständige mRNA der Ov-GloI ermittelt werden. Die Ov-GloI ist Teil des Glo-Systems, welches in vielen pro- und eukaryotischen Organismen vorkommt, bei Parasiten aber bisher kaum untersucht worden ist¹⁰⁶. Eine erste biochemische Charakterisierung des Glo-Systems bei Helminthen, basierend auf der Untersuchung von Rohextrakten und Homogenaten, zeigt die Diversität dieses eigentlich gekoppelten Enzymsystems auf: während im Extrakt verschiedener Nematoden sowohl GloI- und GloII-Aktivität gemessen werden konnte, wurde bei Trematoden und Cestoden lediglich GloII-Aktivität nachgewiesen¹⁰⁶. Außer der Entgiftung von Nebenprodukten des Energiestoffwechsels, kommt der Ov-GloI auch bei der Abwehr von Oxidantien endogenen und xenobiotischen Ursprungs eine entscheidende Rolle zu: die Bestimmung der mRNA Transkriptmenge durch quantitatives ELISA zeigte, dass die Transkription der Ov-GloI durch endogene H₂O₂-Bildung, verursacht durch das Xanthin/Xanthin-Oxidase-System um das 3,2-fache und durch das Ubichinon-Analog Plumbagin, um fast das 2-fache erhöht wird¹⁰⁷. Schon durch ein geringes Maß an oxidativem Stress wird eine Vielzahl von Entgiftungsenzymen verstärkt exprimiert. Die Induktion dieser

Gene wird auch mit der Entwicklung von Resistenzen, v. a. bei anhaltend hohen Konzentrationen von Oxidantien, in Verbindung gebracht¹⁸⁸. Die Entwicklung von Resistenzen gegenüber oxidativen Schäden ist daher auch mit einer verstärkten Expression von Genen zur Abwehr dieser Stoffe assoziiert. Diese Induktion der Transkription der Ov-GloI kann somit auch als adaptive Antwort des Parasiten gegenüber oxidativem Stress verstanden werden.

Der offene Leserahmen von 579 bp der Ov-GloI kodiert für 193 Aminosäuren und führt zur Expression eines Proteins mit einem theoretischen Molekulargewicht von 21 930. Bisher sind die Sequenzen von sieben GloI beschrieben worden: die humane GloI¹⁰⁸, zwei GloI aus Hefe, *S. cerevisiae*^{109,110} und *Schizosaccharomyces pombe*, eine GloI aus *Lycopersicon esculentum*¹¹¹, sowie die Sequenzen der bakteriellen GloI von *E. coli*, *P. putida*¹¹² und *Salmonella typhimurium*¹¹³. Während die GloI des Menschen, sowie die GloI aus Pflanzen und Bakterien als Dimere mit einem Molekulargewicht von 19 000 – 24 000 pro Monomer vorliegen, sind die bisher beschriebenen GloI aus Hefe Monomere (32 000 – 38 000 Da). Das mittels Gelfiltration bestimmte Molekulargewicht von ~45 000 der enzymatisch aktiven Ov-GloI entspricht etwa dem der Säugetier-GloI^{114,115} und lässt darauf schließen, dass die Ov-GloI als Homodimer vorliegt. Während die Ov-GloI eine besonders hohe Homologie zu dem humanen Enzym aufweist (Abb. 3.1.2.A), sind die GloI der Hefe durch einen langen C-terminalen Bereich mit Ähnlichkeit zu bakteriellen GloI gekennzeichnet. Es wird angenommen, dass die Hefe GloI durch zweifache Genduplikation dieses Bereichs entstanden sind¹¹⁰.

Auch die GloI anderer Organismen sind durch Genduplikation entstanden: Die beiden Domänen einer Untereinheit weisen zwar keine besonders hohe AS-Identität auf, zeigen aber eine funktionell äquivalente AS-Zusammensetzung und damit auch eine ähnliche Sekundärstruktur. Als Beispiel für die Theorie der Genduplikation führen Cameron *et al.* den konservierten Austausch des Q33 der humanen GloI gegen einen Histidinrest in den GloI aus *P. putida*, *E. coli*, *S. typhimurium* und den Enzymen aus Hefe an. Die Funktion dieses Glutaminrests der ersten Domäne wird in allen GloI in der Domäne 2 von einem Histidin übernommen¹¹⁶.

Die monomere Struktur der Ov-GloI ist durch einen langen N-terminalen Bereich im Vergleich mit anderen GloI gekennzeichnet (Abb. 3.1.2.A). Sie besteht im Folgenden aus zwei strukturbildenden Domänen (Abb. 3.1.2.C), welche, wie auch in der Hs-GloI¹¹⁶, funktionell äquivalent sind. Diese Äquivalenz konnte auch durch die Darstellung eines vollständigen aktiven Zentrums, gebildet durch nur eine Untereinheit, in einem 3D Modell der Hs-GloI bestätigt werden¹¹⁶.

In Proteinen, welche sowohl in einer monomeren als auch oligomeren Form vorliegen, wird oft eine Domäne des Monomers durch eine äquivalente Domäne einer anderen Untereinheit

in der Oligomerform des Proteins ersetzt¹¹⁷. Diese, als „3D domain swapping“ bezeichnete strukturelle Eigenschaft von Proteinen, konnte auch bei der Untersuchung der Kristallstruktur der *Hs*-GloI festgestellt werden.

Die große Homologie der *Ov*-GloI zur *Hs*-GloI wurde für die Erstellung eines 3D Modells der *Ov*-GloI, basierend auf den Kristallstrukturdaten der *Hs*-GloI, genutzt¹⁰⁷. Die Überlagerung der Tertiärstruktur beider Proteine in Abb. 4.1.2.A zeigt, wie stark die für die Aktivität der GloI notwendigen Struktur motive evolutiv, auch unter verschiedenen Spezies, konserviert sind und bestätigt die Annahme, dass das „3D domain swapping“ auch bei der Dimerisierung der *Ov*-GloI stattfindet. Als konservierte Bereiche von Proteinen gelten vor allem Strukturen, die für die Bindung von Cosubstraten, Liganden und Cofaktoren von Bedeutung sind: geringfügige Änderungen (z. B. durch Mutation einer Aminosäure) führen oft zum Funktionsverlust der Proteine, so dass diese Strukturen im Laufe der Evolution als „feste“ Motive konserviert weitergegeben wurden. Die Feststellung, dass GSH-bindende Enzyme eine große Übereinstimmung in der Topologie der GSH-Bindungsstellen aufweisen unterstützt diese Hypothese¹¹⁸. So ist anzunehmen, dass diese Enzyme von einem GSH-bindenden Vorläuferprotein abstammen und sich die sekundäre Substratbindungsstelle auf Genebene nachträglich entwickelt hat. Das bereits für die *Hs*-GloI beschriebene Motiv S-L-Y-F-L-A-Y, welches eine Homologie zur Selenium-abhängigen Glutathion-Peroxidase des Menschen und der Ratte aufweist¹¹⁹ ist, bis auf einen konservierten AS-Austausch (V80L), auch in äquivalenter Position in der *Ov*-GloI zu finden (Abb. 3.1.2.B). Gegen diese Hypothese allerdings spricht ein Vergleich der Struktur der GSH-Bindungsstelle der *Ov*-GloI mit den typischen Bindungsstellen anderer GSH-bindender Enzyme. Bei der Auflösung der Kristallstruktur der humanen GSTA1-1 wurde festgestellt, dass alle 3 Aminosäuren von GSH durch Wasserstoff- und Salzbrücken fest mit dem Peptidrückgrat der GST koordiniert sind¹²⁰. Hingegen sind polare Wechselwirkungen des Peptidrückgrats bei der *Hs*-GloI nur mit dem γ -Glutamylrest des GSH festgestellt worden, auch wenn diese sehr spezifisch sind¹¹⁶. Alle anderen polaren Wechselwirkungen werden von Wassermolekülen übernommen. Für die katalytische Aktivität der GloI ist die Bindung zweier Zn^{2+} -Ionen/Dimer von entscheidender Bedeutung. Zwar sind die gebundenen Zn^{2+} -Ionen gegen Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} austauschbar, ohne dass die kinetischen Konstanten wie k_{cat} und K_m sich signifikant von denen des nativen Zn^{2+} -Metalloenzym unterscheiden, die Apoenzyme jedoch sind katalytisch inaktiv^{121,122,123}. An der Zn^{2+} -Bindung sind, wie auch bei der Bildung der hydrophoben Substratbindungstaschen, beide Untereinheiten (UEH) des Dimers beteiligt, wobei je zwei konservierte AS-Reste pro Domäne für die Koordination verantwortlich sind. Die AS-Reste Q41, E107 (Domäne 1; UEH A) und H134, E180 (Domäne 2; UEH B) der *Ov*-GloI liegen im Vergleich zu anderen bekannten GloI an äquivalenten Positionen (vergl. Abb. 3.1.2.A, B und Abb. 4.1.2.C). Die Glutamatreste und der Histidinrest sind in den

GloI zwischen den verschiedenen Spezies konserviert. Der Glutaminrest der Zn^{2+} -Bindungsstelle der Säugetiere ist hingegen bei den GloI der Hefe und der Bakterien durch einen Histidinrest ersetzt^{124,125}. Die Konservierung dieser Reste ist für die außergewöhnliche Koordination der Zn^{2+} -Ionen in oktaedrischer Form von Bedeutung. Neben den Wechselwirkungen der AS-Reste des Peptidrückgrats der GloI sind zwei Wassermoleküle als weitere Liganden an der Koordination des Zn^{2+} beteiligt^{116,124}. Während in den meisten Proteinen eine tetraedrische Anordnung der Liganden für die Zn^{2+} -Koordination verantwortlich ist¹²⁶, sind neben den GloI nur zwei weitere Proteine mit oktaedrischer Koordination des Zn^{2+} bekannt. Im Gegensatz zu den GloI haben diese aber keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität der Enzyme^{127,128}.

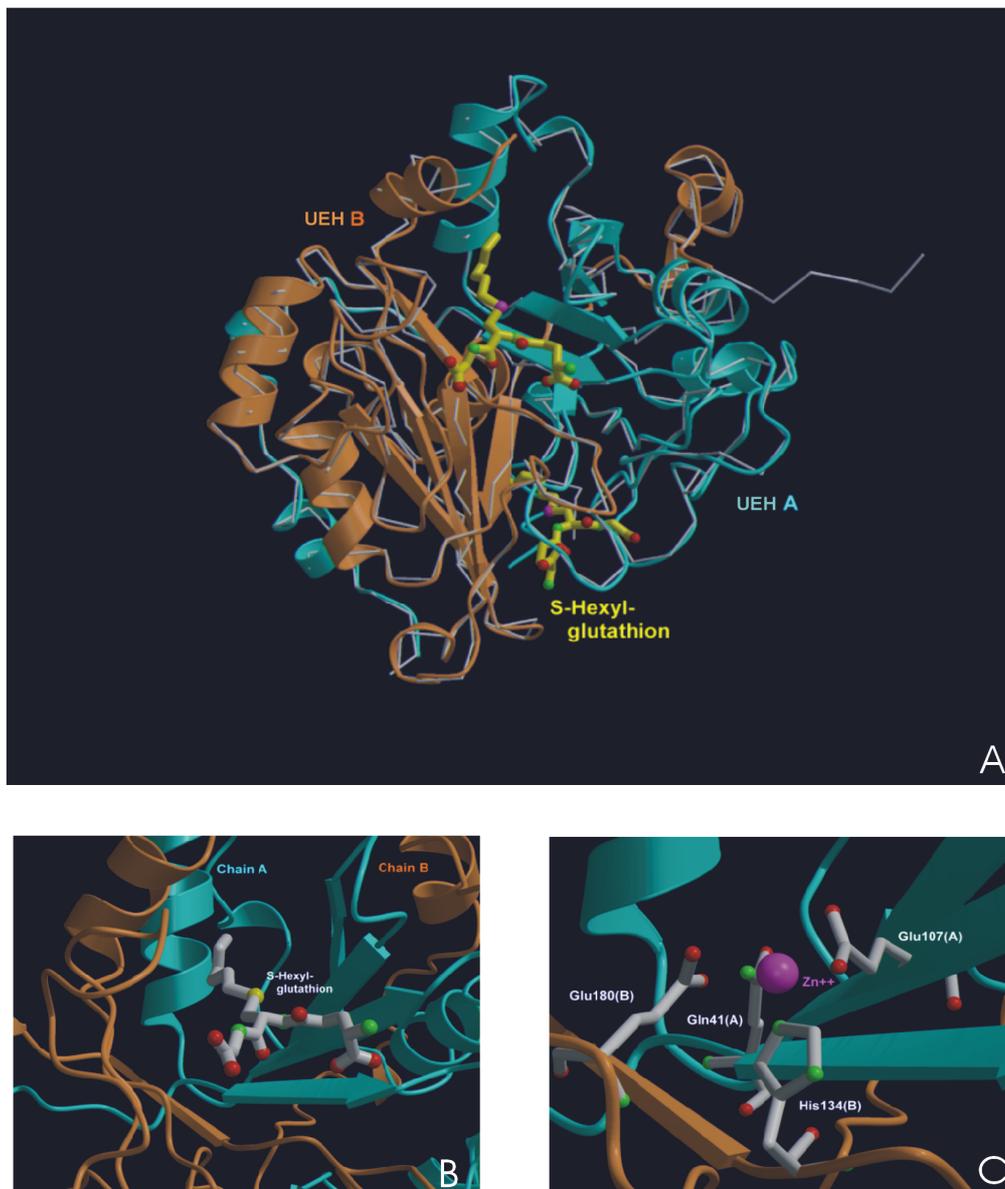


Abb. 4.1.2.A/B/C Modell der 3D Struktur der Ov-GloI, basierend auf der Kristallstruktur der Hs-GloI

Aufgrund der hohen Konservierung der Ov-GloI und der Hs-GloI konnte ein Homologiestrukturmodell des *O. volvulus* Enzyms erstellt werden. Die Überlagerung der

Tertiärstrukturen beider Proteine bestätigt die auf Basis der AS-Sequenz vorhergesagte große Übereinstimmung der Strukturen (A). In Ausschnitt B ist eine der hydrophoben Bindungstaschen mit dem gebundenen Inhibitor S-Hexyl-Glutathion vergrößert abgebildet, Ausschnitt C zeigt eines der für die katalytische GloI-Aktivität notwendigen Zn^{2+} -Ionen, welches von streng konservierten AS-Resten beider Untereinheiten in Position gehalten wird.

4.1.3 Analyse der katalytischen Eigenschaften der *Ov*-GloI

Durch das Glo-System wird in den zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen der GloI und II eine Entgiftung toxischer α -Oxoaldehyde gewährleistet. Die GloI katalysiert dabei die Isomerisierung des nicht enzymatisch gebildeten Hemithioacetals aus GSH und 2-Oxoaldehyd. Für die *Ov*-GloI wurde nach Präinkubation von GSH und Methylglyoxal eine spezifische Aktivität von $284 \pm 32 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ pro mg Protein festgestellt, mit Phenylglyoxal als Substrat ergab sich eine spezifische Aktivität von $105 \pm 10 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ pro mg Protein. Die spezifischen Aktivitäten der affinitätschromatographisch gereinigten *Ov*-GloI sind wesentlich höher als die im Extrakt von *O. gutturosa* gemessenen Aktivitäten von 0,33 und $0,17 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ pro mg Protein für Methylglyoxal und Phenylglyoxal¹²⁹. Ein Vergleich der Aktivität der *Ov*-GloI mit dem humanen Enzym zeigt allerdings, dass die *Hs*-GloI mit einer spezifischen Aktivität von $2340 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ pro mg Protein Methylglyoxal wesentlich effizienter umsetzt¹³⁰. Die für die *Ov*-GloI gemessenen K_m -Werte für Methyl- und Phenylglyoxal von 340 bzw. 311 μM unterscheiden sich trotz der sehr unterschiedlichen Hydrophobizität der Substrate nicht wesentlich voneinander. Bei der rekombinant exprimierten *Hs*-GloI hingegen, beträgt der K_m -Wert für Phenylglyoxal etwa die Hälfte dessen von Methylglyoxal⁷⁸. Dieser Zusammenhang zwischen abnehmendem K_m -Wert bei zunehmender Hydrophobizität der Seitenkette des Substrats ist bereits 1990 von Thornelley beschrieben worden⁷⁸. Ein Vergleich der Wechselzahlen pro Untereinheit zwischen der *Hs*-GloI und der *Ov*-GloI (k_{cat} Methylglyoxal: $11\,900 \text{ min}^{-1}$; k_{cat} Phenylglyoxal: $4\,900 \text{ min}^{-1}$) zeigt, dass das humane Enzym 4- bzw. 9-mal so viele Substratmoleküle in der gleichen Zeit zu binden vermag. Die k_{cat}/K_m -Werte als Maß der Spezifität eines Enzyms für ein Substrat liegt bei bisher untersuchten GloI nahe am Diffusionslimit¹¹⁰. Die *Ov*-GloI weist im Vergleich zu anderen Entgiftungsenzymen mit breiter Substratspezifität, wie z. B. den GST, eine recht hohe katalytische Effizienz auf ($3,52$ und $1,57 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für Methyl- resp. Phenylglyoxal), erreicht dabei aber nicht die Werte anderer GloI. GSH ist als kompetitiver Inhibitor der GloI *in vivo* beschrieben worden^{131,132}; ein Einfluss auf die Enzymaktivität der *Ov*-GloI durch einen Überschuss an freiem GSH ist allerdings eher unwahrscheinlich, da die Konzentration in den Messungen konstant auf 0,1 mM eingestellt wurde und somit weit unter der zellulären, physiologischen Konzentration lag.

Eine mögliche Ursache für den Unterschied in der Substratspezifität der Ov-GlIol im Vergleich zu anderen GlIol könnte in der AS-Zusammensetzung der hydrophoben Bindungstaschen liegen. Im humanen Enzym sind, bis auf einen AS-Rest (N32) am Boden der Tasche, ausschließlich Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten an der Koordination des Substrats beteiligt¹¹⁶. Die hydrophobe Bindungstasche der Ov-GlIol (Abb. 4.1.2.B) weist einige konservierte AS-Austausche auf, die zu einer Veränderung in der Größe der Tasche beitragen könnten. Besonders auffällig im Vergleich zu dem humanen Enzym ist das Vorkommen geladener Aminosäuren in der Bindungstasche der Ov-GlIol. Die Seitenketten von K96 (an der Position von I88) und D187 (statt M180) liegen am Eingang der Bindungstasche und geben dieser somit einen geladenen Charakter. Diese Aminosäuren könnten auch die Unterschiede in der Inhibierung der Ov-GlIol im Vergleich zu dem Enzym des Menschen, erklären.

Der genaue katalytische Mechanismus der Isomerisierungsreaktion der GlIol ist bisher nicht eindeutig geklärt, umfasst aber die Bildung eines Hemithioacetal-Zwischenprodukts und eine nachfolgende, schnelle Ketonisierung zum Thiolesterprodukt^{133,116,124}. Während Mannervik *et al.* einen Protonentransfer von C1 auf C2 des Hemithioacetals durch eine als Base wirkende Aminosäure des aktiven Zentrums vorhersagen^{134,135}, postulieren Cameron *et al.*, basierend auf der Kristallstruktur des humanen Enzyms, eine Übertragung des Protons durch einen der Zn²⁺-Liganden, am wahrscheinlichsten durch E172^{116,124}. Obwohl durch die Erstellung des 3D Modells eine Aussage über die Aminosäuren der Substratbindungstasche der Ov-GlIol ermöglicht worden ist, wäre der potentielle Einfluss von K96 oder D187 als Basen bei der Katalyse der Ov-GlIol nur durch eine Cokristallisation in Form eines Enzym-Substratkomplexes zu klären.

4.2 Diskussion der Untersuchungen der Ov-GST1a und -1b

4.2.1 Proteinaufreinigung, Diskussion des Mengenverhältnisses von Ov-GST1a und Ov-GST1b in *O. volvulus*, Vergleich der Aminosäuresequenzen und der Sekundärstruktur

Durch affinitätschromatographische Aufreinigung mit GSH-Sepharose konnten aus *O. volvulus* Homogenat 3 Proteine isoliert werden. Neben der cytosolischen Ov-GST2, einem Protein mit einer Masse von 24 kDa¹³⁷, binden die beiden Isoformen der Ov-GST1 an die GSH-Sepharose¹³⁸.

Neben diesen GSH-bindenden GST von *O. volvulus* konnte bereits eine GST nachgewiesen werden, die keine GSH-Bindungskapazität aufweist. Die Ov-GST3 wurde im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Regulation von Proteinen unter oxidativen Stress Bedingungen bei

DD RT-PCR Analysen identifiziert⁶⁵. Damit sind in *O. volvulus* bisher GST 3 verschiedener Klassen identifiziert worden. Die cytosolische Ov-GST2 ist aufgrund ihrer Substratspezifität und Tertiärstruktur in die Pi-Klasse der GST eingeordnet worden, die Ov-GST3 gehört, basierend auf der Homologie der AS-Sequenz mit bekannten Enzymen aus Säugetieren, zur Omega-Klasse und die Ov-GST1a und -1b, welche strukturell sehr eng verwandt sind mit GST und S-Cystallinen aus dem Tintenfisch, können der Sigma-Klasse zugeordnet werden. Durch die Charakterisierung der hPGDS aus der Ratte wurde auch eine Ähnlichkeit der Ov-GST1a und -1b mit diesem Enzym offenbar¹⁶². Die Homologie der AS-Sequenzen dieser Proteine diente als Ausgangspunkt für die Untersuchung der PGD₂-Isomeraseaktivität der Ov-GST1 und damit der Identifizierung von PGD₂ als physiologischem Substrat. Während Untersuchungen anderer Helminthen bisher zur Identifizierung von GST der Alpha- oder Mu-Klasse geführt haben, konnten diese GST in *O. volvulus* bisher nicht identifiziert werden^{139,140,71}. Da diese GST-Klassen, mit Dissoziationskonstanten von 10 – 200 µM, eine sehr hohe Affinität für GSH besitzen, müssten sie über GSH-Sepharose zu reinigen sein¹⁴¹. Es ist allerdings möglich, dass diese GST in *O. volvulus* nur in geringer Konzentration vorliegen, während die Ov-GST1a und -1b mit ~ 0,5 µg pro adultem weiblichen Wurm als hoch anzusehen ist. Im Gegensatz zu *O. volvulus* sind bei *C. elegans* bereits sehr viele verschiedene GST-Klassen identifiziert worden. Durch 2 D-Gelelektrophorese und anschließender MS-Analyse wurden allein 12 verschiedene GSH-bindende GST identifiziert²²². Diese hohe Anzahl verschiedener GST bei *C. elegans* kann auch als Hinweis für die Existenz weiterer GST bei *O. volvulus* betrachtet werden.

Die besondere Stellung der GST im xenobiotischen Metabolismus von Helminthen beruht auf fehlenden Phase I-Entgiftungsmechanismen, wie dem Cytochrom P450-abhängigen Entgiftungssystem, welches in Säugetieren eine zentrale Rolle bei der Entgiftung xenobiotischer Verbindungen einnimmt²³. Die hohe Konzentration der Ov-GST1a und -1b weist auf eine zentrale Rolle dieser GST im Stoffwechsel von *O. volvulus* hin. Die für GST ungewöhnliche extrazelluläre Lokalisierung sowie die N-Glykansstruktur stellen damit einen potentiellen Angriffspunkt für eine Vakzineentwicklung oder Chemotherapie dar¹³⁸. Die massenspektrometrische Analyse der nativen Ov-GST1a und -1b hat das Vorkommen der sehr ähnlichen Isoformen dieser GST in *O. volvulus* bestätigt und deckt sich damit mit der genomischen Analyse, welche zu einer Identifizierung von 2 verschiedenen Genen für die Ov-GST1a und -1b geführt hat¹⁷⁵. Die Ov-GST1a und -1b unterscheiden sich auf Proteinebene nur durch 10 AS-Austausche voneinander, wobei diese Unterschiede keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität haben.

Durch die enge Verwandtschaft mit den Sigma-Klassen GST^{142,162} und der bekannten 3D Struktur der GST des Tintenfischs (PDB: 1GSQ), war es möglich, ein Homologie basiertes 3D Modell der Ov-GST1 zu erstellen. Neben einer bereits bekannten durch

Röntgenstrukturanalyse gesicherten Kristallstruktur als Basis des Modells, ist eine besonders große Homologie zwischen den beiden Proteinen für die Modellerstellung erforderlich. Die GST eignen sich generell gut für die Erstellung von Homologiemodellen, da ihre Domänenstruktur sehr stark konserviert ist^{143,53}. Die Polypeptidkette jedes Monomers faltet sich in 2 distinkte Domänen, welche über eine Hexamerstruktur verbunden sind. Die Konservierung der Domäne I erklärt sich durch die Bindung der Tripeptids GSH in dieser Domäne, so dass die dafür benötigte $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ Topologie auch bei anderen GSH-bindenden Proteinen oft in dieser Form konserviert ist^{144,145,53}. Durch Erstellung eines Alignments der GSH-Bindungsstellen von GST verschiedener Klassen, basierend auf deren Kristallstrukturen, wurden nur kleine Abweichungen von 1,4 bis maximal 2 Å zwischen den GSH-Bindungsmotiven der GST festgestellt¹²⁰. Die Variabilität der einzelnen GST-Klassen beruht v. a. auf der Domäne II, welche für die Ausbildung der hydrophoben Substratbindungstasche verantwortlich ist und damit die Substratspezifität der Enzyme diktiert. Dennoch besteht eine Übereinstimmung zwischen allen bisher daraufhin untersuchten GST, da diese Region ausschließlich durch α -Helices gebildet wird¹⁴⁶. Das Modell der *Ov*-GST1a kann aufgrund der großen Ähnlichkeit von > 45%, bei einer Identität der Aminosäuren von 25% im Alignment mit der GST des Tintenfischs als zuverlässig angesehen werden. Die N-terminale Verlängerung der *Ov*-GST1a konnte wegen fehlender Vergleichsmöglichkeiten, nicht mit in das Modell einbezogen werden, so dass die Modellstruktur der *Ov*-GST1a an Position Q22 beginnt.

Durch das Modell konnte im Vergleich zur *Ov*-GST2 eine wesentlich breitere und offenere Topologie der hydrophoben Bindungstasche festgestellt werden. Die Bindungstasche der *Ov*-GST2 ist eher als „Tunnel“-ähnlich zu bezeichnen und diese enge Struktur deckt sich mit den Strukturen der bevorzugten Substrate (α,β -ungesättigte Aldehyde und Ketone) dieser GST. Die offenere Struktur der hydrophoben Bindungstasche der *Ov*-GST1 könnte so die Präferenz dieser Enzyme für grössere, aromatische Verbindungen widerspiegeln (Sommer *et al.*, unveröffentlicht). Dies erscheint gerade im Zusammenhang mit der festgestellten PGD₂-Isomeraseaktivität der *Ov*-GST1 sehr wahrscheinlich.

Durch das Modell war es auch möglich, die N-Glykosylierungsstellen der *Ov*-GST1a genau zu lokalisieren. Die erste N-Glykosylierungsstelle (N50) befindet sich in einer Loop-Region, direkt anschliessend an die α -Helix 1. Die zweite N-Glykosylierungsstelle (N79) befindet sich im β -Faltblatt 3 und die dritte N-Glykosylierungsstelle (N134) befindet sich in einer Loop-Region aus 5 AS-Resten zwischen α -Helix 4 und 5. Die vierte N-Glykosylierungsstelle befindet sich nahe einer kurzen Loop-Region in α -Helix 5. Damit wird deutlich, dass die N-Glykane, mehr oder weniger, das gesamte Enzym abschirmen. Es ist damit auch durchaus möglich, dass die für die Sigma-Klassen GST des Tintenfischs beschriebene Bindungstasche für Nichtsubstratliganden, welche im Bereich der α -Helices 4 und 5 liegt, bei

der *Ov*-GST1a und -1b durch die N-Glykane der N-Glykosylierungsstellen 3 und 4 abgeschirmt wird¹⁴⁷. Die GSH-Bindungskapazität der *Ov*-GST1a und -1b scheint aber, im Vergleich zu dem rekombinant in *E. coli* exprimierten Enzym, nicht durch die N-Glykane beeinflusst zu sein. Weiterhin konnte durch Enzymtests kein Unterschied in der katalytischen Aktivität zwischen deglykosyliertem und glykosyliertem Enzym festgestellt werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die N-Glykane für die *Ov*-GST1a und -1b eine andere, nicht im Zusammenhang mit der enzymatischen Katalyse stehende Funktion haben.

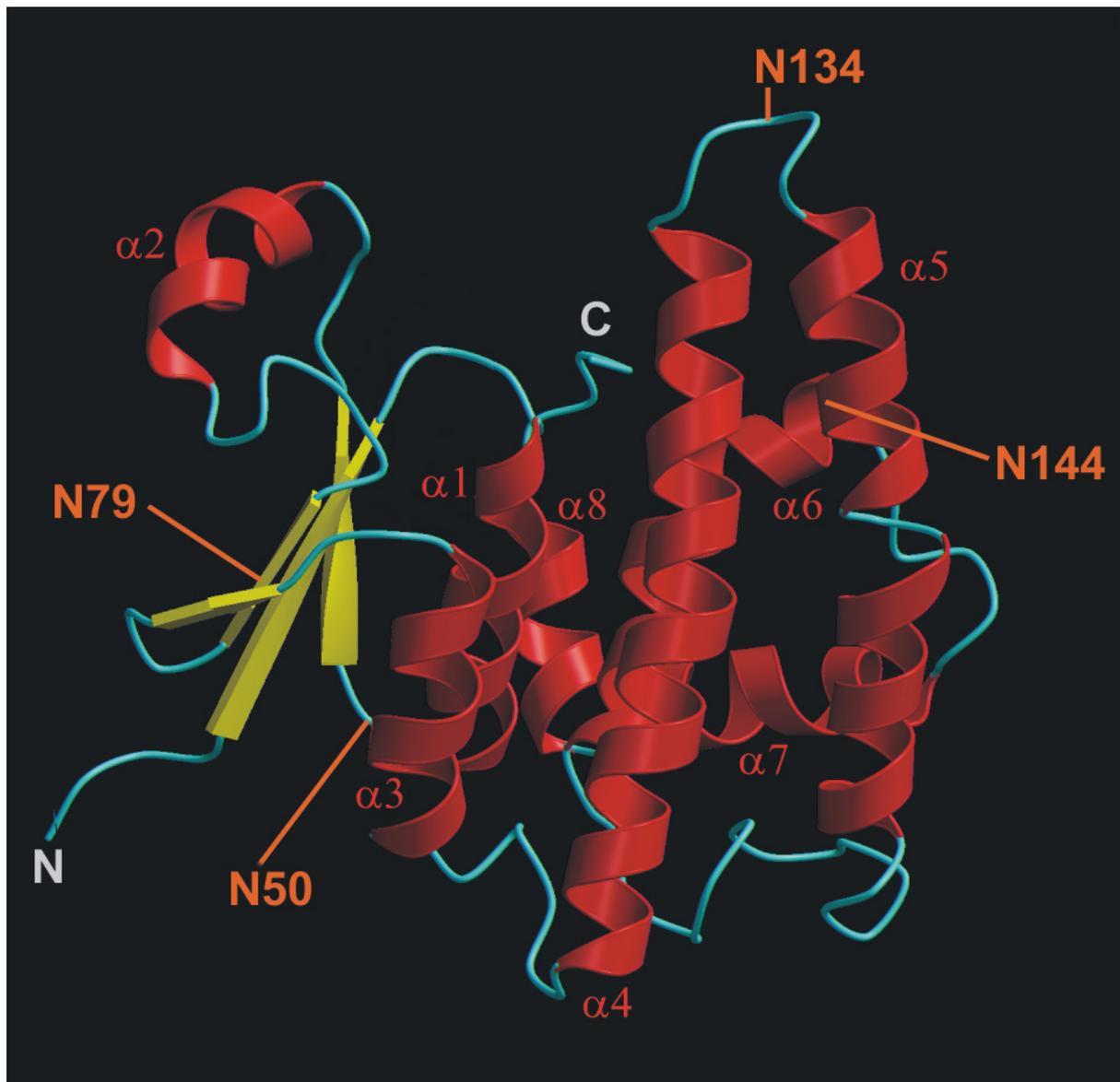


Abb. 4.2.1.A 3D Modell der *Ov*-GST1a, basierend auf der homologen Struktur der Sigma-Klassen GST (1GSQ)

Topologische Darstellung eines *Ov*-GST1a Monomers, basierend auf der durch Röntgenstrukturanalyse bekannten Struktur der GST 1GSQ. α -Helices sind Rot, β -Faltblattstrukturen Gelb angegeben. Der besseren Übersicht halber, sind die α -Helices, ausgehend vom N-Terminus, durchnummeriert. Die Lage der 4 N-Glykosylierungsstellen sind durch die Angabe der AS-Position und Verbindungslinien kenntlich gemacht (Orange).

Das Modell wurde ohne Einbeziehung der N-terminalen Verlängerung erstellt und beginnt somit an Position Q22.

4.2.2 Diskussion der N-Glykanstrukturen der *Ov*-GST1a und -1b

Die Cuticula und Hypodermis der Helminthen und die von ihnen exkretierten oder sezernierten Antigene stellen die erste Angriffsfläche der Immunabwehr des Wirtes dar. Die von den Parasiten im Laufe der Evolution entwickelten Abwehrstrategien (s. Kap. 1.2.2) stellen große Anforderungen an das Immunsystem. Eine Aufklärung dieser an der Verteidigung des Parasiten beteiligten Strukturen, kann der Schlüssel für die Entwicklung neuer Medikamente und Vakzine sein.

In vielen Studien konnte durch Perjodat- und N-Glykanase F- Behandlung festgestellt werden, dass immunodominante Epitope oft durch Glykostrukturen gekennzeichnet sind. Zahlreiche Lektinbindungsstudien haben bereits das Vorkommen glykosylierter antigener Determinanten auf der Oberfläche von Parasiten bestätigt^{148,149}. Dennoch sind bisher erst wenige Kohlenhydratstrukturen in Helminthen strukturell charakterisiert worden^{150,151}.

Die N-Glykanstrukturen beider Isoformen der *Ov*-GST1 wurden durch MS Analysen charakterisiert. Da sich die *Ov*-GST1a und -1b nur an wenigen Stellen in ihrer AS-Sequenz unterscheiden und dementsprechend die Spaltprodukte verschiedener Proteinasen nur zu geringen Unterschieden in den entstehenden Peptidfragmenten führen, ist eine Unterscheidung beider Isoformen nur begrenzt möglich.

Ein entscheidender Unterschied zwischen dem Glykosylierungsmuster des parasitischen Nematoden und den N-Glykanen der Säugetiere, besteht in der Grösse der gebundenen N-Glykane: während die oligomannosidischen Strukturen der Säugetiere meist nicht weniger als 5 Mannosereste an 2 N-Acetylglukosaminresten tragen (s. Abb. 4.2.2.A), sind 30% der N-Glykane der *Ov*-GST1a und -1b mit $\text{Man}_{2-4}\text{GlcNAc}_2$ deutlich kleiner. Diese stark verkürzten Man-Strukturen mit nur 1 bis 2 Mannoseresten sind bereits in anderen Untersuchungen beschrieben worden und scheinen ein Merkmal für die N-Glykosylierung in Nematoden zu sein¹⁵⁰. Im Vergleich mit den N-Glykanstrukturen des jeweiligen Wirtes weisen die für Parasiten beschriebenen Strukturen oft Besonderheiten auf. Ein Beispiel dafür sind die Phosphorylcholin enthaltenden N-Glykane der Filarie *Acanthocheilonema vitae*. Diese Glykoproteine werden von den adulten Filarien sezerniert und scheinen einen Einfluss auf die Signaltransduktionsprozesse bei der Aktivierung von B Lymphocyten zu haben¹⁵². Neben diesen N-Glykanen sind bei Parasiten bisher besonders stark fucosylierte oder GlcNAc-reiche Strukturen bestimmt worden. Die Analyse der durch *D. immitis* gebildeten N-Glykane zeigte, wie vielfältig die durch die Parasiten gebildeten Strukturen sind: Kang *et al.* konnten neben gängigen Formen (d. h. oligomannosidischen, hybriden und komplexen

N-Glykanstrukturen) auch bis auf einen GlcNAc-Rest verkürzte oder zusätzlich mit IacdiNAc (GalNAc β 1-4GlcNAc) versehene N-Glykane nachweisen¹⁵³.

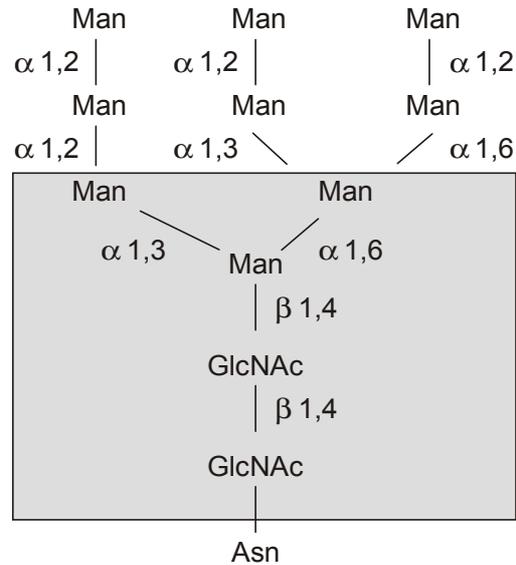


Abb. 4.2.2.A Schematische Darstellung der typischen oligomannosidischen Kohlenhydratstruktur der Säugetiere

Asn: Asparaginrest; Man: Mannoserest; GlcNAc: N-Acetylglukosaminrest

4.2.3 ELISA-Analyse zur Antigenizität der *Ov*-GST1a und -1b

Um dem Einfluss der verkürzten N-Glykanstrukturen auf die Erkennung der *Ov*-GST1a und -1b durch das Immunsystem des Wirtes zu analysieren, wurden 29 Seren von Patienten mit der generalisierten Form der Onchocerciasis auf eine Antikörperantwort hin untersucht. Dabei konnte eindeutig ein Zusammenhang zwischen der N-Glykosylierung und der Erkennung der *Ov*-GST1a und -1b als Antigene festgestellt werden. Die Antikörperantwort gegenüber den glykosylierten Proteinen war signifikant stärker als die Reaktion gegenüber den deglykosylierten Proteinen und bestätigt damit die Annahme, dass die ungewöhnlich kurzen N-Glykane des parasitischen Nematoden eine Immunantwort des Wirtes hervorrufen¹⁵⁰. Bisher sind nur sehr wenige Studien bekannt, die den Einfluss von N-Glykanen auf die Erkennung durch das Immunsystem beschreiben. Der Einfluss bestimmter Bereiche des Peptidrückgrats für die Erkennung durch das Immunsystem hingegen, ist auch für GST von Helminthen schon untersucht worden. Die Untersuchung einzelner Epitope der *S. mansoni* 28 kDa GST hat zu Identifizierung von 3 besonders antigenen Bereichen in dieser GST geführt¹⁵⁴. Ein Vergleich der *Ov*-GST1a mit der *S. mansoni* GST zeigt, dass 3 der 4 N-Glykosylierungsstellen in diesen antigenen Bereichen des Peptidrückgrats liegen.

Posttranslationelle Modifikationen von Pathogenen, wie z. B. N-Glykane, können sehr unterschiedliche Arten von Immunreaktionen auslösen. Exkretorisch-sekretorische oder mit

der Oberfläche des Parasiten assoziierte Antigene, werden durch Antikörper oder Lymphocyten erkannt, welche in der Folge wiederum zur Aktivierung einer Vielzahl verschiedener Immunreaktionen beitragen. Die Bindung von Mannoseresten an Lektine im Serum, oder auch an Mannoserezeptoren auf der Zelloberfläche führt beispielsweise zu einer Komplementaktivierung¹⁵⁵. Weiterhin konnte durch mannosylierte Peptide eine Stimulation der MHC Klasse II (Haupthistokompatibilitätskomplex) abhängigen Präsentation der Antigene auf der Oberfläche von dendritischen Zellen nachgewiesen werden¹⁵⁶. Den Einfluss unterschiedlicher N-Glykosylierungsmuster auf die Erkennung von Proteinen als Antigene, konnte auch bei der vergleichenden Untersuchung der glykolysierten und nichtglykosylierten, sezernierten Retinolbindungsproteine von *O. volvulus*, *B. malayi* und *A. vitae* (Ov20, Bm20, Av20) festgestellt werden. Ov20 und Av20 besitzen 3 ähnliche N-Glykosylierungsstellen, Bm20 hingegen unterscheidet sich in einer der N-Glykosylierungsstellen. Im Gegensatz zu Bm20 konnte für Av20 und Ov20 eine starke Erkennung durch Seren von Patienten mit Onchocerciasis, nicht aber von Patienten mit lymphatischer Filariasis festgestellt werden¹⁵⁷.

Die Untersuchung der N-terminalen Verlängerung der Ov-GST1a hat gezeigt, dass diese einzigartige Struktur ebenfalls eine antigene Determinante darstellt. Die Funktion dieser Verlängerung ist bisher nicht bekannt. Die für die Omega-Klassen GST beschriebenen N-terminalen Verlängerungen sind mit der der Ov-GST1a nicht zu vergleichen. Bei der Untersuchung der Kristallstruktur der GSTO1-1 des Menschen konnte festgestellt werden, dass die N-terminale Verlängerung dieser Enzyme an der Ausbildung der Substratbindungstasche beteiligt ist¹⁸⁹.

Da die GST in vielen Bereichen ihrer Struktur sehr konserviert sind (s. Kap. 4.2.1), sind Kreuzreaktionen der Antikörper auf diese Proteine nicht auszuschließen. Beispielsweise ist bei Antikörpern, die gegen die affinitätsgereinigte Ov-GST1a gerichtet sein sollten, eine sehr starke Kreuzreaktion mit GST aus *B. pahangi* und *B. malayi* beschrieben worden¹⁵⁸, die N-terminale Verlängerung dieser GST scheint hingegen einzigartig zu sein.

4.2.4 Diskussion der Prostaglandin D₂-Isomeraseaktivität der Ov-GST1a

Die Prostaglandine (C₂₀-Fettsäuren mit einem Cyclopentanring) sind bekannte Modulatoren zellulärer Funktionen in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen. Die Synthese und der Metabolismus der Prostaglandine beginnt mit der Freisetzung von Arachidonat aus der Plasmamembran. Durch die sukzessive Oxygenierung und Hydroperoxylierung von Arachidonat durch die Cyclooxygenasen entsteht PGH₂, welches als Substrat für verschiedene spezifische Prostaglandin Isomerasen dient¹⁵⁹. Die sehr spezifische Isomerisierungsreaktion von PGH₂ zu PGD₂ kann durch zwei sehr unterschiedliche Enzyme, die GSH-unabhängige Lipocalin-ähnliche PGDS, bzw. durch die

GSH-abhängige hämatopoetische PGDS katalysiert werden^{160,161}. Erst durch die biochemische und immunologische Charakterisierung der hämatopoetischen PGDS (hPGDS) aus den T-Zellen der Rattenmilz wurde deren enge Verwandtschaft mit den GST der Sigma-Klasse entdeckt¹⁶². Damit wurde erstmals gezeigt, dass einige Helminthen-GST an der Prostaglandinsynthese beteiligt sein können.

Die *Ov*-GST1a und -1b ist aufgrund der Ähnlichkeit der AS-Sequenz von ~ 50% mit den GST des Tintenfischs und *C. elegans*, wie auch dem Substrat- und Inhibitorprofil eindeutig der Sigma-Klasse der GST zuzuordnen. Der Vergleich mit den bekannten Sequenzen verschiedener hPGDS höherer Organismen (aus dem Menschen¹⁶³, Maus¹⁶⁴, Ratte, Huhn) wies, durch die hohe AS-Identität von ~ 30% auf eine mögliche Beteiligung der *Ov*-GST1a und -1b im Cyclooxygenasestoffwechsel hin. Die Kristallstruktur der hPGDS aus der Ratte¹⁶¹ und die darauffolgenden Mutagenesestudien zur Identifizierung der an der Isomeraseaktivität beteiligten Aminosäuren¹⁶⁵ wurden für einen Vergleich mit der *Ov*-GST1a und -1b herangezogen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die *Ov*-GST1a und -1b die essentiellen Aminosäuren in äquivalenter Position besitzen: Y8 und R14 für die Aktivierung der SH-Gruppe des GSH, W105 als Verbindung der α -Helices 4 und 5 für die Ausbildung der sehr weiten und tiefen hydrophoben Bindungstasche, K112 und K198 für die Stabilisierung des PGH₂ durch die Ausbildung von Salzbrücken¹⁶⁵. Die Messung der potentiellen Isomeraseaktivität durch HPLC-MS führte zur Identifizierung von PGH₂ als physiologischem Substrat der *Ov*-GST1a und -1b. Die Konversion von PGH₂ durch andere GST der Sigma-Klasse führt zur Bildung drei verschiedener Produkte (resp. PGD₂, PGE₂ und PGF_{2 α}), wobei PGD₂ nur in sehr geringem Maß gebildet wird¹⁶⁶. Die *Ov*-GST1a und -1b hingegen katalysiert sehr spezifisch die Isomerisierung von PGH₂ zu PGD₂. Diese selektive PGH₂-D₂ Isomeraseaktivität der *Ov*-GST1a und -1b ist, bisherigen Untersuchungen zufolge, für Helminthen einzigartig. Basierend auf der großen Homologie der Primärstruktur einer Sigma-Klassen GST von *Ascaridia galli* zur hPGDS der Ratte wurde das Helminthenenzym als spezifische Prostaglandin H₂ – E₂ Isomerase identifiziert¹⁶⁷. Damit wurde erstmals auf eine mögliche Modulation der Wirtsabwehr durch die Sigma-Klassen GST von Parasiten als Folge der von ihnen synthetisierten und freigesetzten Prostaglandine hingewiesen. PGE₂ ist als Modulator der Cytokinsekretion der T-Helferzellen bekannt, wodurch es zu einer Immunsuppression oder der Entwicklung einer Th2-Immunantwort kommen kann^{168,169}. Die festgestellte Stimulierung der PGE₂ Bildung in Monocyten und Makrophagen konnte bereits mit Infektionen durch *Entamoeba histolytica* und auch *Leishmania major* in Verbindung gebracht werden^{170,171}. In vielzelligen Parasiten, wie den Helminthen, scheint die endogene Prostaglandinsynthese überlebenswichtig zu sein: eine Inhibierung der PG-Synthese hat das Absterben der Parasiten, aber auch starke immunologische Reaktionen zufolge¹⁷². Untersuchungen der parasitischen Nematoden *B. malayi* und *W. bancrofti* haben gezeigt,

dass deren Mikrofilarien an der Oberfläche mit PGE₂ bedeckt sind. Welche Funktion diese Prostaglandine für die Parasiten haben, konnte allerdings noch nicht geklärt werden¹⁷³.

Obwohl die Funktion der Prostaglandine für Helminthen noch nicht geklärt ist, deutet die Konservierung der Genstruktur d. h. hier der Intron/Exon-Grenzen der Sigma-Klassen GST der Helminthen mit denen der hPGDS der höheren Organismen^{174,175}, auf eine essentielle Funktion hin.

Zu den verschiedenen physiologischen Funktionen von PGD₂ gehört die Inhibierung der Thrombozytenaggregation, die Entspannung der glatten Muskulatur, die Vasodilatation und die Bronchokonstriktion¹⁷⁶. PGD₂ gilt als das Haupteikosanoid, das bei allergischen Reaktionen von Mastzellen produziert und auch nach Antigenstimulation von T-Helferzellen des Typs 2 (Th2-Zellen) gebildet wird. Die von den Th2-Zellen freigesetzten Cytokine fördern eine humorale Immunantwort und lösen das Wachstum und die Differenzierung von Mastzellen wie auch eosinophilen Leukocyten aus¹⁷⁷. Aufgrund immunhistologischer Studien ist die Ov-GST1a und -1b vor allem in der Cuticula und der Hypodermis von *O. volvulus*, d. h. direkt an der Wirt-Parasiten-Grenzfläche, lokalisiert und kommt somit mit der Immunabwehr des Wirtes direkt in Kontakt¹³⁸. Bei der Überexpression der Ov-GST1a und -1b in Insektenzellen konnten die GST im Überstand nachgewiesen werden, so dass diese möglicherweise auch aktiv vom Wurm sezerniert werden (Liebau *et al.*; nicht publizierte Ergebnisse).

Neben der verstärkten Freisetzung von Mediatoren durch PGD₂, ist auch die Suppression der T-Zell Mitogenese und die Inhibierung der Bildung von Superoxidanionen durch neutrophile Granulocyten auf den Einfluss von PGD₂ zurückzuführen^{178,179,180}. Diese letztgenannte Wirkung des Lipidmediators auf das Immunsystem ist bei Helminthosen und gerade bei der Onchocerciasis, von besonderer Bedeutung: in histologischen Untersuchungen von Knotenquerschnitten hat sich gezeigt, dass in der Nähe der Onchocerkome die neutrophilen Granulocyten den Hauptteil der Immuneffektorzellen des Wirtes ausmachen²⁴⁰. Auch die beschriebene inhibierende Wirkung auf die Stickoxidfreisetzung im peripheren Gewebe durch PGD₂ weist auf dessen immunmodulatorische Eigenschaften hin¹⁸¹. In Kulturen von Mastzellen der Maus ist durch Behandlung mit dem Cytokin „c-Kit Ligand“ und Sensibilisierung der Zellen mit IgE vor der Antigenaktivierung der Zellen, eine Induktion der hPGDS und damit verbundene Hochregulation der PGD₂-Synthese festgestellt worden¹⁶⁴. Die Untersuchung der immunsuppressiven Eigenschaften des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* zeigte, dass diese auf die Produktion von Prostaglandinen durch den Parasiten zurückzuführen sind¹⁸². Die Analyse der Immunantwort auf eine Infektion mit *S. mansoni* im Mausmodell hat den Einfluss von PDG₂ auf die Inhibierung der Wanderung der Langerhansschen Zellen der Haut in die Lymphknoten aufgedeckt: Die Zellen werden zwar aktiviert, eine Wanderung und

darauffolgende Auslösung der Immunantwort des Wirts aufgrund der Schistosomula wird von diesen aktiv, durch Freisetzung von PGD₂, verhindert. Damit könnte die PGD₂-Freisetzung einen zusätzlichen „Escape“-Mechanismus der Schistosomen darstellen⁷⁴.

Aufgrund der Lokalisierung der Ov-GST1a und -1b und der PGH₂ – D₂ Isomeraseaktivität könnte diesem Entgiftungsenzym eine essentielle Rolle im Verteidigungssystem des Parasiten gegen die Immunabwehr des Menschen zukommen. Die bisher beschriebenen vielfältigen modulatorischen Einflüsse von PGD₂ könnten vom Parasiten zur Abwehr von Immuneffektormolekülen, zur Suppression oder Verzögerung, bzw. auch zur Verhinderung einer gerichteten Immunantwort des Wirts genutzt werden. Damit stellt die Ov-GST1a und -1b einmal mehr ein gutes Ziel für die Entwicklung von Vakzinen oder Medikamenten gegen die Onchocerciasis dar.

4.2.5 Analyse des Expressionsmusters der Ov-GST1a in *C. elegans*

Durch die Expression der 5'-Region des Gens der Ov-GST1a in *C. elegans*, sollte untersucht werden, ob der freilebende Nematode in der Lage ist, die für die basale Transkription nötigen Elemente eines Parasitenpromotors zu erkennen. Die Mikroinjektion von Plasmid DNA in die Gonaden der Hermaphroditen führt zu einer Rekombination in lange extrachromosomale Arrays, die zwar als normale Chromosomen replizieren, aber in einer nicht der Mendelschen Vererbungslehre entsprechenden Weise an 10 – 90% der Folgegeneration weitergegeben werden¹⁸³. Die Untersuchung des Expressionsmusters dieses Parasitenpromotors in *C. elegans* bot sich auch in Hinblick auf die bereits bekannte Lokalisierung der Ov-GST1a und -1b in *O. volvulus* an¹⁸⁴. Damit war es möglich, das Expressionsmuster der verschiedenen Juvenilstadien und der adulten transgenen Würmer mit dem durch Immunlokalisierung bestimmten Expressionsmuster der Ov-GST1a und -1b in *O. volvulus* zu vergleichen. Durch licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung konnte die Ov-GST1a und -1b bereits in den Mikrofilarien, dem infektiösen L3-Stadium und in den adulten Tieren nachgewiesen werden. Soweit zulässig, kann man aufgrund der Ergebnisse davon ausgehen, dass die Expression der Ov-GST1a in *C. elegans* nicht zu einer Veränderung in der stadienspezifischen Expression führt. Neben einer Expression der Ov-GST1a im Isthmus, sowie der Hypodermis, wird die Ov-GST1a auch in den Drüsenzellen im Bereich des terminalen Bulbus exprimiert. Die Lokalisierung der Ov-GST1a im Hypodermisbereich von *C. elegans* stimmt gut mit der für die native Ov-GST1a und -1b in *O. volvulus* überein. Dort konnte die stärkste Färbung im äußeren lamellären Bereich der Hypodermis, aber auch in Ausbuchtungen der Cuticula (oberhalb der Hypodermis) und der Epicuticula nachgewiesen werden¹³⁷. Die Funktion der Drüsenzellen bei *C. elegans* ist noch nicht vollständig geklärt, es wird aber von einer Beteiligung dieser Drüsen an der Sekretion von Verdauungsenzymen ausgegangen. Weiterhin wird angenommen, dass diese Drüsen bei

den Häutungsprozessen eine Rolle spielen. Zu diesen Zeitpunkten kommt es zu einer Ausbildung von Vesikeln in den Drüsenzellen¹⁸⁵. Erste Untersuchungen hinsichtlich einer Lokalisierung der Ov-GST1a im Pharynxbereich von *O. volvulus* Weibchen deuten darauf hin, dass die Ov-GST1a und -1b nicht in diesem Bereich lokalisiert ist. Die Lokalisierung des GFP-Signals in den Drüsenzellen von *C. elegans* könnte auf den Unterschied im Verdauungssystem der beiden Nematoden zurückzuführen sein. Während die Verdauungsprozesse und die Absorption der Nährstoffe bei *C. elegans* im Darm stattfinden, findet der Import und Export von löslichen Verbindungen bei *O. volvulus* durch transcuticuläre Permeation statt und es wird sogar davon ausgegangen, dass sich der Darm bei den adulten Tieren mit zunehmendem Alter zurückbildet¹⁸⁶.

4.2.6 Diskussion der ektopischen Expression der Ov-GST1a in *C. elegans*

Die Expression von Proteinen in prokaryotischen Expressionssystemen wie *E. coli* ist hinsichtlich der molekularen Masse von Proteinen und posttranslationaler Modifikationen sehr eingeschränkt. Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen bisher nicht bekannt sind, hat sich in Vakzinierungsstudien mit verschiedenen in *E. coli* exprimierten potentiellen Vakzinekandidaten herausgestellt, dass diese Proteine entgegen der auf Vorversuchen basierenden Erwartung einer guten Protektion, nur einen geringen Schutz gegen Filarieninfektionen boten¹³⁹. Für einen Unterschied spricht auch die in den ELISA Studien dieser Arbeit festgestellte schwächere Antikörperantwort auf das rekombinant in *E. coli* exprimierte Protein im Vergleich zu der deglykosylierten nativen Ov-GST1a und -1b. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine native, oder „fast“ native Form der *O. volvulus* Antigene wahrscheinlich besser für Vakzinierungsstudien geeignet sind. Bei der Vakzinierung gegen den Rinderparasiten *Haemonchus contortus* ist bereits festgestellt worden, dass die Erhaltung der Konformation bestimmter Epitopbereiche, die Glykosylierung und auch die Aktivität der verwendeten Enzyme für eine schützende Immunität von Bedeutung sind.¹⁸⁷ Der Vorteil einer Expression möglicher Vakzinekandidaten von *O. volvulus* in *C. elegans* als nahe verwandtem Nematoden wird damit schnell offensichtlich. Die Expression von *O. volvulus* Proteinen in *C. elegans* ist nicht nur aufgrund möglicher posttranslationaler Modifikationen von Bedeutung, sondern bietet sich auch durch die Konservierung der basalen Aspekte der Molekularbiologie und der Entwicklungsmechanismen der Nematoden an. Durch die ektopische Expression der posttranslational modifizierten Ov-GST1a in *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass *C. elegans* in der Lage ist, das Protein korrekt zu prozessieren und, basierend auf ersten Versuchen unter Einsatz verschiedener Glykosidasen, eine zumindest sehr ähnliche Glykostruktur im Vergleich zu dem nativen *O. volvulus* Enzym zu bilden.

4.3 Diskussion der Ergebnisse der Ov-GST3 und der homologen GST F13A4.10, C29E4.7, K10F12.4 aus *C. elegans*

Vielfältige Untersuchungen von Abwehrmechanismen und Entgiftungssystemen in verschiedenen Organismen haben bereits zur Identifizierung der am Schutz der Zellstrukturen und des Zellstoffwechsels beteiligten Proteine geführt. Die Beobachtung, dass in den Zellen schon bei einem geringen Maß an oxidativem Stress zahlreiche an der Abwehr beteiligte Enzyme verstärkt exprimiert werden, hat das allgemeine Interesse an diesen zellulären Entgiftungssystemen verstärkt und weiterführende Studien nach sich gezogen¹⁸⁸. Die Induktion dieser Gene wird inzwischen mit der Vermittlung von Resistenzen gegenüber andauerndem oxidativem Stress in Verbindung gebracht. Der Erwerb einer stabilen Resistenz gegenüber oxidativen Schädigungen wird oft mit einer Zunahme der Expression von Genen des antioxidativen Verteidigungssystems verbunden. Von besonderem Interesse ist es daher, den möglichen Einfluss der GST von *O. volvulus* bei der Verteidigung gegen toxische Oxidantien zu untersuchen, die während der Immunantwort des Wirtes auf den Parasiten einwirken. Eine besondere Rolle in dieser Abwehr könnte der durch oxidativen Stress hochregulierten Ov-GST3 zukommen⁶⁵.

4.3.1 Diskussion der 3 Transkripte der Ov-GST3 und eine Analyse ihrer Primär- und Sekundärstruktur

Obwohl der GSH-Stoffwechsel und die GSH-abhängigen Entgiftungsenzyme bei *O. volvulus* schon seit langem Bestandteil vielfältiger Untersuchungen dieses parasitischen Nematoden sind, ist die Ov-GST3 einer Identifizierung bislang entgangen^{65,138,137}. Einer der Hauptgründe dürfte in der fehlenden Bindungskapazität an GSH-Sepharose liegen. Weiterhin ist auch die geringe mRNA-Menge der Ov-GST3 bei ungestressten Würmern von Bedeutung; während durch semi-quantitative RT-PCR-ELISA Analyse ein extrem starker Anstieg (~125-fach) der mRNA-Menge der Ov-GST3 als Antwort auf durch Xanthin/Xanthin-Oxidase verursachten oxidativen Stress nachgewiesen werden konnte, liegt die Transkriptmenge dieser GST unter normalen physiologischen Bedingungen noch unterhalb der für die Ov-GST2 und Ov-GST1a und -1b bestimmten Werte⁶⁵. Trotz intensiver Untersuchungen der humanen GST, gelang die Isolation der ersten beschriebenen GST der Omega-Klasse (GSTO1-1) erst im Jahr 2000 und basierte ausschließlich auf der Datenbanksuche in den für *H. sapiens* vorliegenden ESTs („Expressed Sequence Tags“)¹⁸⁹.

Nach der Identifizierung eines kurzen 3'-Bereichs der Ov-GST3 mit DD-RT-PCR wurden beim nachfolgendem Screening einer *O. volvulus* λ ZAPII cDNA-Bank 3 verschiedene cDNA-Sequenzen (Ov-GST3a, -3b und -3c) isoliert. Bei der Ov-GST3a und -3b könnte es sich um

alternative Spleissprodukte handeln, die sich im mittleren Bereich durch das Vorkommen bzw. Fehlen einer Sequenz von 123 bp unterscheiden. Dafür spricht die Analyse des mit Hilfe einer PCR isolierten Gens der *Ov*-GST3, durch die dieser Bereich einem Exon (Exon V) zugeordnet werden konnte. Diese Annahme muss allerdings noch durch das Screening einer genomischen Bank von *O. volvulus* bestätigt werden, damit das Vorkommen eines 2. Gens der *Ov*-GST3 sicher ausgeschlossen werden kann. Bei der *Ov*-GST3c könnte es sich um ein Pseudogen handeln: Basierend auf der durch PCR ermittelten Genstruktur entspricht der DNA-Bereich, der den offenen Leserahmen der *Ov*-GST3c unterbricht einem Intron (Intron V). Das durch diesen Sequenzbereich erzeugte Stopcodon würde zur Bildung einer „GST“ führen, der die gesamte C-terminale Domäne fehlt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass es sich bei der *Ov*-GST3c um ein nicht funktionelles, alternatives Spleissprodukt handelt, welches durch das sogenannte „splice/don't splice“-Phänomen gebildet wird. Sofern es sich bei der *Ov*-GST3a und -3b um alternative Spleissprodukte handelt, könnte der als „exon skipping“ bezeichnete Mechanismus eines vorhandenen bzw. während des Spleissprozesses entfernten Exons, ein Schalter für die Bildung einer funktionellen bzw. nicht-funktionellen *Ov*-GST3 sein. Eine Möglichkeit, die Spleissproduktbildung zu regulieren besteht in der Bindung von Liganden. Weiterhin können spezielle Spleissproteine bei der Erkennung von „Exon-Verstärkersequenzen“ eine Rolle spielen und auch die zellulären Bedingungen (Konzentration der Faktoren des Spleissosoms, Temperatur) haben einen Einfluß auf den Spleissprozess^{190,191,192}. Alternatives Spleissen stellt somit einen wichtigen Mechanismus für die Modulation der Genfunktion dar.

Alternatives Spleissen ist für GST bisher nur für eine GST von *Anopheles dirus* (Acc. Nr. AF251478) beschrieben worden, bei der 4 alternative Spleissprodukte gebildet werden²³⁹. Drei weitere alternativ gespleisste GST können durch BLAST-Suche in den bekannten Datenbanken gefunden werden (*A. gambiae*, Acc. Nr. AF071160; *H. sapiens*, Acc. Nr. M99422; *H. sapiens* MIGST04, Acc. Nr. AF092926), wobei ein mRNA Transkript (M99422) lediglich aufgrund homologer Bereiche als potentielle GST der Mu-Klasse identifiziert worden ist und es sich bei der *Hs*-MIGST04 nicht um eine cytosolische, sondern mikrosomale GST handelt. Bei einer anderen, ebenfalls aufgrund der erhöhten mRNA-Transkriptbildung durch DD RT-PCR isolierten humanen GST, dem Protein p28, mit Ähnlichkeit zu den Enzymen der Theta-Klasse, konnten ebenfalls 2 unterschiedlich lange Transkripte identifiziert werden. Die Variation in der Transkriptlänge beruht hier allerdings auf der Erkennung zweier leicht unterschiedlicher Polyadenylierungssignale und nicht auf alternativen Spleissprozessen¹⁹³. Bei der Untersuchung einer GST der Omega-Klasse aus *Sus scrofa* wurde ebenfalls eine differentielle Transkriptbildung nachgewiesen. Die 2 identifizierten Transkripte werden Organ-spezifisch gebildet: das kürzere der beiden Transkripte wurde ausschließlich in Muskelgewebe (Herz, Diaphragma, Skelettmuskulatur) nachgewiesen. Die Autoren gehen

hier ebenfalls von einer differentiellen Bildung der Transkripte aufgrund verschiedener Poly(A)-Signale aus, alternatives Spleissen wurde aufgrund des übereinstimmenden Molekulargewichts der Proteine im Western Blot ausgeschlossen¹⁹⁴.

Die Domänenstruktur der *Ov*-GST3a, -3b und -3c unterscheidet sich von den typischen GST, welche durch eine N-terminale, GSH-bindende β -Faltblattstruktur und eine C-terminale, α -helikale Domäne für die Ausbildung der hydrophoben Substratbindungstasche gekennzeichnet sind⁵³. Der *Ov*-GST3a, als verkürztem Transkript, fehlen damit die Aminosäuren für die Wechselwirkung des Cosubstrats GSH mit dem Peptidrückrad und bei der *Ov*-GST3c ist lediglich die GSH-bindende Domäne voll ausgebildet (Abb. 3.3.1.3.A). Die *Ov*-GST3b, als typische GST mit N- und C-terminaler Domäne, konnte im Alignment mit bisher bekannten GST der Omega-Klasse (*Mus musculus*, Acc. Nr. U80819; *H. sapiens*, AF212303; *Rattus rattus*, AB008807; *S. scrofa*, AF188838), dieser eindeutig zugeordnet werden. Als Omega-Klassen GST eines Nematoden wurde auch die *C. elegans* GST C29E4.7 durch die hohe Identität von 34% der Aminosäuren im Vergleich zur *Hs*-GSTO1-1 bereits identifiziert, die anderen beiden *C. elegans* GST mit Homologie zur Omega-Klasse (K10F12.4, F13A7.10) wurden in diesem Zusammenhang allerdings nicht identifiziert¹⁸⁹. Ein entscheidender Unterschied zu den typischen, cytosolischen GST, deren Hauptaufgabe in der GS-X-Konjugatbildung toxischer elektrophiler Verbindungen mit GSH liegt⁵³, wird durch einen Cysteinrest in der N-terminalen Domäne der Omega-GST vermittelt. Die Konjugatbildung der cytosolischen GST beruht auf einem Tyrosin- bzw. Serinrest, dessen Hydroxylgruppe für die Stabilisierung des Thiolatanions von GSH vonnöten ist¹⁹⁵. In den Omega-GST dient der Cysteinrest der Bindung von GSH¹⁸⁹, so dass die Enzyme in ihrer aktiven Form als gemischte Disulfide vorliegen und als GSH-abhängige Thioltransferasen im Zellstoffwechsel aktiv sind. Von Interesse ist dabei auch der erst kürzlich für die GSTB1-1 von *P. mirabilis* publizierte mögliche Reaktionsmechanismus. Die Autoren betrachten die GSTB1-1 als ein intermediäres Enzym, welches die Entwicklung von Redox-, hin zu Konjugationsenzymen in der Evolution aufzeigt¹⁹⁶, da die GSTB1-1 sowohl Konjugations- als auch Redoxaktivität aufweist. Für die GSH-abhängige S-Thioltransferaseaktivität ist auch hier ein Cysteinrest (C10) verantwortlich. Neben dem kovalent an C10 gebundenen GSH liegt in der Bindungstasche dieses Enzyms ein zweites GSH-Molekül vor, dass über einen Thiol-Disulfidaustausch zur Reduktion der GSTB1-1 führt. Das reduzierte Enzym bindet nun mit extrem hoher Affinität gemischte Disulfide, wird selbst wieder oxidiert, durch erneuten zwei-maligen Thiol-Disulfidaustausch mit GSH wieder reduziert und kann so wieder zur Reduktion von Thiol-disulfidbindungen beitragen. Der für die katalytische Aktivität essentielle Cysteinrest ist in *Ov*-GST3a, -3b und -3c an AS-Position 62 (*Hs*-GSTO1-1: C32) zwischen den ebenso strikt konservierten Resten F61 (F31) und P63 (P33) eingebettet. Die AS-Folge „FCP“ ist zwischen den verschiedenen Spezies in allen Omega-GST konserviert und erklärt

die Ähnlichkeit dieser Enzyme zu Glutaredoxinen und Thioredoxinen¹⁹⁷: Das aktive Cystein liegt im N-terminalen Bereich einer α -Helix, und die Lage der Cysteinseitenkette nahe dem positiven Ende des Helixdipols bewirkt eine Erniedrigung des Thiol-pK_a-Wertes, d. h. dadurch wird eine sehr hohe Nukleophilizität des Cysteinrestes erzeugt, also ein nukleophiles Zentrum. Das auf das Cystein in der Sequenz folgende Prolin unterstützt eine optimale Positionierung des Cysteinthiols für die Stabilisierung der Thiolatform¹⁹⁷. Der Vergleich des aktiven Zentrums eines Glutaredoxins höherer Pflanzen (*Vernicia fordii*) mit der Ov-GST3 zeigt deutlich die Konservierung des proximalen Cysteinrestes und benachbarter Aminosäuren (*V. fordii*: N-term. FCPYCTSV C-term; Ov-GST3: N-term. FCPYGESV C-term.) und bestärkt damit die Annahme, dass die Ov-GST3 als Thioltransferase aktiv ist²¹².

Ein weiterer genereller Unterschied zu den Konjugat-bildenden GST besteht in der nur schwach ausgeprägten Wechselwirkung des GSH mit dem Peptidrückgrad der Proteine. Während diese durch eine Salzbrücke zwischen dem aminoterminalen Stickstoff des GSH und sauren AS-Resten der α -Helix 4 zur Stabilisierung beitragen, ist dieser Sequenzbereich in den Omega-GST, besonders innerhalb der Nematoden, überhaupt nicht konserviert. Weitere, an der GSH-Bindung beteiligte Aminosäuren, wie z. B. E85 in der Hs-GSTO1-1 (Ov-GST3b: D114) sind bei der Ov-GST3b konserviert oder konserviert ausgetauscht an äquivalenter Position vorhanden. Ebenfalls für die GSH-Bindung von Bedeutung sind die Wechselwirkungen der Untereinheiten des katalytisch aktiven Dimers. Da die Wechselwirkungen zwischen den UEH nicht-polaren Charakters sind, d. h. keine Wasserstoffbrückenbindungen beinhalten, sondern über Salzbrücken (Ov-GST3b/Hs-GSTO1-1: E120/E91, R143/K114) vermittelt werden, ist die Bindungsstelle wesentlich grösser und leichter zugänglich. Diese gravierenden Unterschiede in der GSH-Bindung und Form der Bindungsstelle könnte v. a. für die Funktion der Ov-GST3a von Bedeutung sein, da diesem Transkript eine typische GSH-bindende Domäne fehlt (AS 111 - 151), der für die Thioltransferaseaktivität Sequenzbereich aber erhalten ist. Damit ist es durchaus möglich, dass die Ov-GST3a als Redox-Enzym wirkt, dabei aber nicht GSH-abhängig ist.

Neben der GSH-Bindungsstelle ist auch die hydrophobe Substratbindungstasche der Enzyme der Omega-Klasse wesentlich grösser und offener, so dass nicht nur kleine Substratmoleküle, sondern auch grössere Polypeptide oder kleinere Proteine als Bindungspartner in Frage kommen. Für diese Funktion als S-Thioltransferase spricht auch der wesentlich hydrophilere Charakter der AS-Reste der Bindungstasche im Vergleich zu den Bindungsstellen „typischer“ GST^{189,53}.

Aufgrund der beschriebenen strukturellen Eigenschaften der Ov-GST3 kann von einer für GST eher untypischen Funktion dieser Enzyme ausgegangen werden. Der Vergleich der AS-Sequenz und die ermittelte Sekundärstruktur der Ov-GST3b lassen auf eine Funktion als

GSH-abhängige Thioltransferase schliessen. Als physiologische Substrate dieser GST kommen somit S-thiolierte Proteine in Frage. Dafür spricht auch die verstärkte mRNA-Bildung der *Ov*-GST3 unter oxidativem Stress⁶⁵. Die als S-Thiolierung bekannte Bildung gemischter Disulfide von Proteinen mit verschiedenen niedermolekularen Thiolen (GSH, Cystein, Homocystein, γ -Glutamylcystein) und Cysteinresten resultiert oft in dem Funktionsverlust essentieller Proteine unter konstantem oxidativen Stress^{198,199}. Bei der Bildung der gemischten Disulfide kommt dem GSH eine besondere Rolle zu: Aufgrund der millimolaren Konzentration von GSH in der Zelle stellt es bei diesem Prozess den Hauptanteil der an die Proteine gebundenen niedermolekularen Thiole dar (>85%)^{200,201} (S-Glutathiolierung). Die bisher beschriebenen Funktionen einer S-Glutathiolierung von Proteinen sind mannigfaltig: sie dient als Puffer bei oxidativem Stress, zur Stabilisierung extrazellulärer Proteine, dem Schutz von Proteinen vor irreversiblen oxidativen Schädigungen (d. h. dem Schutz von Cysteinresten des aktiven Zentrums von Proteinen) und der Regulation der Enzymaktivität^{202,203}. Auch die Inhibierung der Proteinsynthese aufgrund einer durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelten Disulfidbildung ist bereits beschrieben worden²⁰⁴. Die S-Glutathiolierung von Proteinen ist also nicht als ausschließlich „negativer“ Effekt zu betrachten, sondern kann auch ein Schutz vor irreversiblen oxidativen Schädigungen sein²⁰⁵. Ein regulatorischer Einfluss durch Protein S-Thiolierung ist auch schon bei GST beobachtet worden: ein Beispiel dafür ist die vom Thiolstatus abhängige Regulation einer Membran-gebundenen mikrosomalen GST^{206,207}. Als Thioltransferase sollte es der *Ov*-GST3 also möglich sein, das Gleichgewicht von GSH und gemischten Disulfiden in die eine, wie auch in die andere Richtung zu verschieben, d. h. eine S-Glutathiolierung auch zu erleichtern²⁰⁸. Die verstärkte Expression der *Ov*-GST3 bei einem Redoxungleichgewicht in der Zelle, lässt allerdings darauf schliessen, dass das Enzym in die Reduktion der unter oxidativen Stress Bedingungen vermehrt gebildeten S-Thioladdukten involviert ist und diese durch seine Thioltransferaseaktivität wieder in einen enzymatisch aktiven Zustand überführt.

Eine strukturelle Besonderheit der *Ov*-GST3 ist auch die besonders lange, N-terminale Verlängerung. Bei den Omega-Klassen GST vom Menschen, Maus, Schwein und *C. elegans* C29E4.7 ist eine Verlängerung von 19 – 20 Aminosäuren ohne Homologie zu anderen GST beschrieben worden, die Homologie der *Ov*-GST3 zu diesen GST beginnt aber erst bei G32¹⁸⁹. Eine Analyse des N-terminalen Bereichs bezüglich potentieller Signalsquenzen, weist auf eine mögliche Lokalisierung im endoplasmatischen Retikulum, bzw. auf eine extrazelluläre Lokalisierung der *Ov*-GST3 hin. Die bisherigen Untersuchungen zur Lokalisierung von Omega-Klassen GST bzw. strukturell nahe verwandten Proteinen, hat eine sehr divergente Verteilung der GST aufgezeigt. Die immunhistochemische Untersuchung der GSTO1-1 des Menschen hat gezeigt, dass die GST in fast jedem Gewebe und Zelltyp

exprimiert wird. Neben einer cytosolischen Lokalisierung wurde die GST auch im Nukleus von Gliazellen, Nieren- und Leberzellen identifiziert²⁰⁹. Eine Signalsequenz für diese Lokalisierung im Zellkern ist bisher aber nicht beschrieben worden. Bereits 1999 ist die durch oxidativen Stress hochregulierte GST p28, aus einer Lymphomzelllinie von Mäusen isoliert und als GST mit Ähnlichkeit zur Theta-Klasse charakterisiert worden. Eine neuere Analyse der AS-Sequenz dieses Proteins führte zur Zuordnung in die Omega-Klasse, was in Übereinstimmung mit der Lokalisierung von p28 im Vergleich zur humanen GSTO1-1 steht. p28 wurde als cytosolisches Enzym charakterisiert, welches in Folge von Temperaturerhöhungen vom Cytosol in den Nukleus transportiert und somit relokalisiert wird¹⁹³. In einer weiteren Studie wurde eine Ähnlichkeit der GSTO1-1 zu einem Chlorid-Kanal des Zellkerns (NCC27) festgestellt und der GSTO1-1 eine physiologische Funktion als modulatorisch wirkendes Protein bei der Steuerung der Ca²⁺-Ionen Freisetzung durch Ryanodin-Rezeptoren zugewiesen²¹⁰. Diese Funktion könnte auch für die *Ov*-GST3 in Bezug auf das N-terminale Lokalisierungssignal von Bedeutung sein, da die Ryanodin-Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums integriert sind. Während des „respiratory burst“ der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten kommt es zu einer massiven Protein S-Thiolierung. Als exkretorisch-sekretorisches Protein wäre die *Ov*-GST3 an der Wirts-Parasiten-Oberfläche für den Erhalt der katalytischen Aktivität essentieller Proteine von Bedeutung und würde damit zu der Persistenz des Parasiten beitragen¹⁹⁸.

4.3.2 Diskussion der Genstruktur der *Ov*-GST3 im Vergleich zu den genomischen Strukturen der homologen GST in *C. elegans*

Mit Hilfe einer PCR konnte ein Gen der *Ov*-GST3 identifiziert werden, dem die bekannten Sequenzen der 3 mRNA-Transkripte der *Ov*-GST3 zugeordnet werden konnten. Die Konservierung der Sequenzen der 3 Transkripte der *Ov*-GST3 mit der ermittelten Exonsequenz des isolierten Gens deutet möglicherweise auf die Entstehung der 3 Transkripte durch alternative Spleissprozesse hin. Für eine abschließende, endgültige Bestätigung dieser Annahme ist jedoch eine ausführlichere genomische Analyse nötig.

Die Größe des isolierten Gens, die den gesamten kodierenden Bereich einschliesst, beträgt 2171 bp und liegt damit, im Vergleich zu Genen anderer GST parasitischer Nematoden, im zu erwartenden Bereich^{137,211}. Obwohl das Gen der *Ov*-GST3 und der kodierende Bereich nicht größer als die bekannten Genstrukturen und kodierenden Bereiche der GSH-bindenden GST von *O. volvulus* sind, wird der offene Leserahmen durch 8 Exons gebildet, während die Gene der *Ov*-GST2 und der *Ov*-GST1a und -1b 7 Exons enthalten¹⁷⁵. Auf die ersten beiden sehr kurzen Exons (23 bp und 77 bp) folgen die längsten Introns (372 bp; 271 bp) des *Ov*-GST3 Gens. Die ersten beiden Exons kodieren damit das potentielle Signalpeptid und die folgende N-terminale Verlängerung. Die Tatsache, daß Signalsequenzen und ungewöhnliche

N-terminale Bereiche durch „eigene“ Exons kodiert werden, ist bereits für andere GST beschrieben worden. Auch bei der *Ov*-GST1a und -1b, welche nachweislich ein Signalpeptid und eine N-terminale Verlängerung besitzen, wurde bei der Analyse der Genstruktur festgestellt, dass diese durch das 1. Exon kodiert werden. Ebenfalls auffällig ist, dass auch bei der *Ov*-GST1a/1b das längste Intron direkt auf die durch Exon 1 kodierte Signalsequenz folgt¹⁷⁵. Weiterhin beginnt bei der *Ov*-GST3, wie bei der *Ov*-GST1a und -1b, die Ähnlichkeit zu den GST derselben Klasse genau mit der 1. durch das folgende Exon kodierten Aminosäure. Die Kodierung von Signalsequenzen durch 1 bzw. 2 Exonbereiche von Genen erscheint evolutiv sinnvoll und ist auch in höheren Organismen verbreitet. Als Beispiel für eine Thioltransferase ist die Genstruktur des Glutaredoxin II von Bedeutung, dessen mitochondriale Signalsequenz auch durch erste Exon kodiert wird²¹². Ab der ersten, durch Exon 3 kodierten Aminosäure (G34) der *Ov*-GST3 ist eine Homologie dieser GST zu den Omega-Klassen GST der Säugetiere nachzuweisen. Der Vergleich der Genstruktur der *Ov*-GST3 mit der berechneten Sekundärstruktur für die *Ov*-GST3b zeigt, welche Exons für bestimmte, GST typische, konservierte Bereiche kodieren. Neben den bereits erwähnten Exons I und II, welche die Signalsequenz der *Ov*-GST3 kodieren, bilden Exon III bis V die im Protein konservierte GSH-Bindungsstelle aus. In dem mRNA-Transkript der *Ov*-GST3a fehlt damit einer der β -Faltblattbereiche der für die Ausbildung der GSH-Bindungsstelle verantwortlich ist. Dadurch wird die N-terminale, GST typische, Domäne in diesem Transkript nicht voll ausgebildet. Alle folgenden Exons der *Ov*-GST3 kodieren den ausschließlich α -helikalen Bereich der GST, wobei der für die Ausbildung der hydrophoben Bindungstasche der GST allein durch Exon VII kodiert wird. Das für GST eher ungewöhnliche Exon VIII, kodiert einen zusätzlichen Helixbereich der Omega-GST, welcher den oberen und rückwärtigen, d. h. den der GSH-Bindungsstelle abgewandten Teil der hydrophoben Bindungsstelle bildet¹⁸⁹. Basierend auf der genomischen Struktur der *Ov*-GST3 konnte somit gezeigt werden, dass das 7. Exon der *Ov*-GST3 für einen funktionell relevanten Bereich der elektrophilen Substratbindungstasche kodiert.

Die kodierenden Bereiche der zur *Ov*-GST3 homologen GST aus *C. elegans* sind mit ~ 1,4 kb (C29E4.7, F13A7.10) bzw. ~ 3 kb (K10F12.4) nicht wesentlich grösser als das Gen der *Ov*-GST3.

Wie die Transkripte der *Ov*-GST3, ist auch die humane GSTO1-1 durch einen N-terminalen Bereich ohne Homologie zu anderen GST-Klassen gekennzeichnet. Dieser Bereich wird von 14 Aminosäuren des Exon I kodiert. Das Exon II kodiert für die Glutaredoxin ähnliche Domäne mit dem aktiven Zentrum und Exon III beinhaltet die GSH-Bindungsstelle, welche in dem isolierten Gen der *Ov*-GST3 durch 3 Exons kodiert wird. Exon IV bis VI kodieren für die Aminosäuren der elektrophilen Substratbindungstasche.

Das isolierte *Ov*-GST3-Gen zeichnet sich durch wesentlich kleinere und dadurch vermehrt auftretende Exons aus als die untersuchten Omega-GST von *C. elegans*, welche, bei ähnlicher mRNA Transkriptgröße, lediglich 3 (F13A7.10), 4 (C29E4.7) bzw. 5 (K10F12.4) Exons enthalten.

Auffällig ist, dass die Exon-/Introngrenzen dieser GST in dem für die typischen GST Domänen kodierenden Bereich, identisch sind. Die untersuchten, zur *Ov*-GST3 homologen GST von *C. elegans*, besitzen also weniger Introns als das isolierte Gen der *Ov*-GST3, die vorhandenen Spleisstellen in den für GST typischen N-terminalen und C-terminalen Domänen, stimmen jedoch überein (s. Abb. 3.3.4.1.A) und können damit als weiterer Hinweis für die Zugehörigkeit dieser GST zu einer Klasse angesehen werden. Diese Beobachtung spricht weiterhin für die Hypothese, dass im Laufe der evolutionären Entwicklung funktionelle Bereiche zu einer Einheit zusammengefasst wurden und damit ein Austausch funktionsfähiger konservierter Strukturen, z. B. zwischen Klassen von Proteinen ähnlicher Funktionalität, auf genomischer Ebene ermöglicht und erleichtert worden ist. Als Beispiel dafür sind die GSH-bindenden Domänen der GST zu nennen, die auch in Proteinen mit ganz anderen katalytischen Eigenschaften, wie den Prostaglandin D-Synthetasen (hPGDS), konserviert sind^{165,174}. Als übergeordnete Thiothionin/Glutathion-Domäne wiederum ist ein Teil der α/β -Struktur der GSH-Bindungsstelle anzusehen, der evolutiv konserviert in den GST, Glutathion-Peroxidasen und Thioltransferasen wiederzufinden ist²¹³. Ein Vergleich der Gene der Sigma-Klassen GST vom Tintenfisch, *C. elegans* und *O. volvulus* mit den hPGDS der Maus und des Menschen haben ebenfalls eine strikte Konservierung der Intronpositionen offenbart. Bei einem Vergleich der Sigma-Klassen GST mit GST anderer Klassen konnte hingegen keine Übereinstimmung in der Position der Introns beobachtet werden^{164,174,175}. Die Autoren vermuten aufgrund der gemeinsamen Exon/Intronstruktur der Gene einen gemeinsamen Vorläufer für die Entwicklung der hPGDS und der Sigma-Klassen GST, wobei sie davon ausgehen, dass dieser zur GST-Superfamilie gehört. Neben der Ähnlichkeit der hPGDS mit GST der Sigma-Klasse, ist auch für das Gen der Prostaglandin E-Synthetase aus dem Menschen und der mikrosomalen MGST1 eine Übereinstimmung der Exon-/Introngrenzen festgestellt worden. Wie für die *Ov*-GST3 vermutet, wird auch die MGST1 alternativ gespleisst, so dass 3 verschiedene mRNA-Transkripte gebildet werden können. Die Autoren gehen hier aufgrund der Genorganisation und der Homologie der AS-Sequenzen von einer Duplikation der Gene aus²¹⁴. Bei der Untersuchung der transkriptionellen Regulation konnte festgestellt werden, dass die MGST1 durch oxidativen Stress, ausgelöst durch den Redoxzykler Paraquat, zu induzieren ist. Als regulatorische Elemente der TATA-losen Promotorregion konnten neben 2 SP-1 Bindungsstellen, die für die basale Promotoraktivität vonnöten sind, auch HNF-

(Hepatozyten-spezifischer Transkriptionsfaktor) Bindungsstellen und eine ARE- („Antioxidant Responsive Element“) Bindungsstelle identifiziert werden.

4.3.3 Promotoranalyse und Charakterisierung des Expressionsmusters des F13A7.10-Promotor::GFP-Reportergenkonstrukts in transgenen *C. elegans*

Für die Untersuchung der gewebe- und stadienspezifischen Regulation einer GST der Omega-Klasse wurde die potentielle Promotorregion der GST F13A7.10 des nahe verwandten Nematoden *C. elegans* untersucht. Neben den Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation durch „virtuelle Northern Blot“ Analysen, wurde das Expressionsmuster der GST in transgenen *C. elegans* charakterisiert.

Untersuchungen bezüglich der Regulation der Gene der Alpha-Klassen GST der Ratte, sowie der Alpha- und Pi-Klassen GST des Menschen haben zur Erkennung von Elementen, die für die Induktion bzw. die Repression von Genen unter Einfluss von oxidativem Stress beitragen geführt. Die regulatorischen 5'-Bereiche der Gene sind v. a. durch Bindungsstellen für den Glucocorticoid Rezeptor („Glucocorticoid Responsive Element“), den Aryl-Hydrocarbon Rezeptor („Xenobiotic Responsive Element“), Proteine der AP-1 Familie („Antioxidant Responsive Element“) und NF κ B („Nuclear Factor *kappa* B-site“) gekennzeichnet²¹⁵. Durch die Analyse potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in der Promotorregion von F13A7.10 konnten mehrere für Entgiftungsenzyme typische Elemente identifiziert werden. Neben mehreren AP-1 und einer AP-4 Bindungsstelle, konnte auch eine TCF11/MafG-Bindungsstelle identifiziert werden, die eine Repression von F13A7.10 bewirken könnte²¹⁶. Ebenfalls von Bedeutung könnten die nahe beieinanderliegenden AP-1 und PEA3 Bindungsstellen sein. Der Abstand zwischen den Bindungsstellen könnte eine synergistische Wirkung beider Faktoren ermöglichen. Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivierung des Collagenase-Gens mit 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) haben gezeigt, dass eine sehr starke Induktion durch die Interaktion der Faktoren möglich ist²¹⁷. Stromaufwärts im 5'-regulatorischen Bereich von F13A7.10 konnte ein Barbie-Element identifiziert werden, welches eine durch Phenobarbital ausgelöste Induktion der Expression bewirken könnte²¹⁸. Ob die identifizierten Bindungsstellen bei der Regulation dieser GST *in vivo* eine Rolle spielen ist allerdings nicht abzuleiten.

Durch Mikroinjektion des F13A7.10-Promotor::GFP-Reportergenkonstrukts in *C. elegans* wurden transgene Nachkommen erzeugt, bei denen eine gewebespezifische Expression von F13A7.10 schon in den Embryonalstadien beobachtet werden konnte. Während des gesamten Lebenszyklus der Würmer konnte eine Expression der intestinalen Zellen (v. a. in int 1 und int 9), sowie des Intestinal-Rektal-Ventils und der Rektal-Epithelial-Zellen

festgestellt werden. Die Stärke der Expression von F13A7.10, gemessen an der Stärke des GFP-Signals, variierte zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien des Wurms. Da die Hauptaufgabe der intestinalen Zellen neben der Sekretion von Verdauungsenzymen v. a. in der Absorption von Nährstoffen liegt, erscheint das beobachtete Expressionsmuster für F13A7.10 als Entgiftungsenzym in diesen Zellen sinnvoll. Bei der Verdauung der Nahrung im Darm entstehen ebenfalls potentiell reaktive Verbindungen, so dass die Darmzellen, die auch der Speicherung von Kohlehydraten und Lipiden in Form von Granula dienen, auf ein enzymatisches Entgiftungssystem angewiesen sind. Die posterior gelegenen Zellen des Intestinal-Rektal-Ventils bilden zusammen mit den Rektal-Epithelial-Zellen einen Ring, der den Übergang zu dem kurzen Rektum von *C. elegans* markiert²¹⁹.

In den adulten Tieren konnte auch eine Fluoreszenz neuronaler Zellen im anterioren Bereich des Wurms nachgewiesen werden. Das Nervensystem von *C. elegans* ist im Pharynxbereich in 2 Nervenringen konzentriert. Neben dem zirkumpharyngealen Nervenring im Bereich des Isthmus, existiert ein anterior gelegenes Ganglion im dem die Neuronen eher lose angeordnet sind²²⁰. Die zu diesem Ganglion gehörenden Neuronen sind vorwiegend an sensorischen Prozessen beteiligt. In immunhistochemischen Untersuchungen der Omega-Klassen GST des Menschen ist neben einer abundanten Expression der GST in „normalen“ Geweben wie der Leber, den Nieren und der Lunge auch eine deutliche Expression in neuroendokrinen Zellen des Darms und eine Expression in den Gliazellen des Gehirns festgestellt worden²⁰⁹. Bei Untersuchungen verschiedener Gehirnbereiche der Ratte, konnten GST im Bereich des Stammhirns, Vorderhirns und Cerebellums nachgewiesen werden²²¹.

4.3.4 Analyse der Aminosäuresequenzen und Regulation der Transkription von K10F12.4, F13A7.10 und C29E4.7 unter Einfluss xenobiotischer Verbindungen

Aufgrund der beschriebenen Induktion der *Ov*-GST3 des Parasiten unter oxidativem Stress, wurden für *in vivo* Studien der Regulation verwandte GST mit Homologie zur Omega-Klasse in *C. elegans* identifiziert.

Die 3 zur *Ov*-GST3 homologen GST weisen die für Thioltransferasen typischen Aminosäuren auf, und sind, wie die *Ov*-GST3b, durch eine N- und C-terminale GST-typische Domäne gekennzeichnet. In der berechneten molekularen Masse entsprechen die C29E4.7 und F13A7.10 weitgehend der für die *Ov*-GST3b vorhergesagten molekularen Masse. Eine Ausnahme in diese Hinsicht ist die GST K10F12.4, welche sich durch ihre besonders lange N-terminale Verlängerung von den anderen GST unterscheidet. Die Vorhersage der Lokalisierung dieser GST im Nukleus könnte auf eine andere, nicht im Zusammenhang mit der Regulation des zellulären Redoxstatus stehende Funktion hinweisen. Dies steht auch in

Übereinstimmung mit den Ergebnissen der „virtuellen Northern Blot“ Analysen, die keine Stress-abhängige oder auch hormonelle Regulation dieser GST aufgezeigt haben.

Die bereits von Board *et al.* (2000) als Nematoden GST der Omega-Klasse beschriebene C29E4.7 zeigt eine für diese GST-Klasse eher unerwartete Regulation: Bei oxidativem Stress durch Paraquat und der damit verbundenen Bildung von Superoxidanionen^{223,224}, wird die Bildung dieser GST stark reprimiert, während tBOOH und die damit induzierte Bildung S-thiolierter Polypeptide, keinen Einfluss auf die Expression der GST haben. Durch Untersuchungen von Ratten-Hepatocyten, inkubiert mit verschiedenen tBOOH-Konzentrationen, konnte ein Übergang von Nekrose zu Apoptose auslösenden Signalen bei Konzentrationen von 0,4 – 0,5 mM tBOOH festgestellt werden²²⁵. Die starke Induktion der Transkriptbildung von C29E4.7 durch das Glucocorticoid-Analog Dexamethason und die Repression durch Radikalverbindungen sprechen für eine hormonelle Regulation dieser GST. Eine Veränderung der hormonellen Regulation durch oxidativen Stress ist bereits in vielen Studien gezeigt worden. Die Oxidation von Cysteinresten der DNA-Bindungsdomäne des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) führt zu einer Inhibierung von GRE-abhängig exprimierten Genen^{226,227,228}. Reporterstudien von GRE-abhängigen, durch Dexamethason zu induzierenden Genen haben eine Abhängigkeit der Expression vom Redoxstatus der Zelle aufgezeigt: die Depletion von GSH hat eine Repression der Expression zur Folge gehabt²²⁹. Die Redoxmodulation der GR-Antwort ist auch in *in vivo* Studien an Ratten nachgewiesen worden: die Erzeugung von endogenem oxidativen Stress hat zu einer veränderten hormonellen Antwort geführt. Unter diesen Bedingungen wurde nur eine schwache Expression der GRE-abhängigen Tyrosin Aminotransferase- und Tryptophan 2,3-Dioxygenasegene festgestellt²²⁸. Das die zelluläre Glucocorticoid- und in geringerem Maß auch die Östrogen- und Katecholamin-abhängige Signaltransduktion durch den Redoxstatus endokriner Zellen beeinflusst wird, haben Makino *et al.* durch Transfektionsversuche mit „antisense“ Thioredoxin mRNA gezeigt. Dadurch wurde der repressive Effekt von H₂O₂ auf GRE-abhängige Gene nachgeahmt. Durch eine gleichzeitige Überexpression von Thioredoxin konnte die Inhibierung wieder aufgehoben werden²³⁰.

Im Gegensatz zu der GST C29E4.7 wird F13A7.10 entgegengesetzt reguliert. Während Dexamethason keinen Einfluss auf die mRNA-Bildung hat, bewirkt tBOOH schon nach 1h bei Einsatz geringer Konzentrationen eine starke Induktion dieser GST. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der Analyse der Promotorregion bezüglich potentieller Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Während in der Promotorregion Bereiche für eine hormonelle Regulation fehlen, sind bekannte, für eine adaptive Antwort auf oxidativen Stress verantwortliche Bindungsstellen z. T. mehrfach vorhanden. Für die Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren, wie „Nuclear Factor-*kappa* B“ (NFκB) und AP-1 ist der GSH Redoxstatus der Zelle entscheidend, da die DNA-Bindungskapazität dieser Faktoren

über Cysteinreste reguliert wird^{231,232}. Bei ungewöhnlich hohen zellulären Konzentrationen an GSSG kommt es zu einer Protein-Disulfidbildung und Glutathiolierung, so dass AP-1 regulierte Gene reprimiert werden. Dieser Effekt kann durch Thioredoxin und das „Nuclear Redox Protein“ Ref-1 aufgehoben werden²³³. Neben dieser möglichen Inhibierung der AP-1 Aktivierung, kann es durch oxidativen Stress (UV-Bestrahlung, H₂O₂, TNF- α , GSH Depletion durch DL-Buthionin-(SR)-Sulfoximin, Veränderung des Verhältnis von GSH/GSSG durch Diamid) zu einer Stimulation von AP-1 kommen²³⁴. Wilhelm *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass die Störung des zellulären Thiol Redoxstatus ein Signal für die AP-1 Aktivierung darstellt, besonders durch die Induktion der Stress aktivierten Signaltransduktionswege über die JNK („Jun N-terminal protein kinase“) und p38 Kinase²³⁵. Der regulatorische Einfluss von AP-1 bei proinflammatorischen Prozessen, wie der Transkription der Cytokingene, aber auch bei der verstärkten Expression schützender antioxidativer Gene, wie der GSTP1-1 des Menschen²³⁶, ist bereits eindeutig nachgewiesen worden^{237,238}. Das Vorliegen mehrerer AP-1 Bindungsstellen im Promotor des F13A7.10 Gens könnte zur Gewährleistung einer sicheren Expression (unter Kontrolle von AP-1) bei Verschiebung des Redoxgleichgewichts beitragen. Neben den beschriebenen redox-sensitiven Regulatoren wie AP-1 kann die Genregulation bei starkem oxidativen Stress auch über die Bindung von weniger redox-sensitiven Faktoren, wie dem Aryl-Hydrocarbon Rezeptor, gewährleistet werden.

5. Zusammenfassung

Onchocerca volvulus ist der Erreger der auch als Flussblindheit bezeichneten Onchocerciasis, an der etwa 18 Millionen Menschen in den tropischen Gebieten Afrikas leiden. Eine der wesentlichen pathologischen Konsequenzen dieser Krankheit ist die Beeinträchtigung der Sehfähigkeit durch die Juvenilstadien (Mikrofilarien), die zu Millionen von den weiblichen Würmern während ihrer 10 - 14 jährigen Lebensdauer freigesetzt werden.

Die Behandlung der Onchocerciasis beruht bisher allein auf dem mikrofilariziden Medikament Ivermectin. Aufgrund des Fehlens makrofilarizider Medikamente oder Vakzine werden zwei parallele Strategien zur Bekämpfung der Onchocerciasis verfolgt: Neben einer flächendeckenden Behandlung der Bevölkerung mit Ivermectin soll mit Hilfe von Insektiziden der Verbreitung der Filarien durch die Kriebelmücken (Familie: Simuliidae) entgegengewirkt werden. Das Ziel, die Onchocerciasis durch diese Maßnahmen auszurotten, konnte bisher nicht erreicht werden und macht damit die Erforschung neuer chemotherapeutischer Angriffspunkte für die Entwicklung makrofilarizider Wirkstoffe notwendig.

Die Fähigkeit, die Immunantwort des Wirtes zu modulieren und immunologische Abwehrmechanismen auszuschalten, ist für das Überleben der Parasiten von entscheidender Bedeutung. Eine zentrale Stellung in den Abwehrstrategien des Parasiten nehmen die Glutathion- (GSH-) abhängigen Entgiftungsenzyme ein.

Ein bisher kaum untersuchtes GSH-abhängiges System, das an der Entgiftung zytotoxischer α -Oxoaldehyde beteiligt ist, ist das Glyoxylase-System. Die Isolierung und biochemische Charakterisierung der Glyoxylase I (GloI) aus *O. volvulus* (Ov-GloI) stellt die erste molekularbiologische Untersuchung einer Komponente dieses Systems bei Parasiten dar. Die isolierte cDNA enthält einen offenen Leserahmen von 579 Basenpaaren und kodiert für ein Protein mit einer molekularen Masse von 21 930 Da. Die Ov-GloI konnte rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert werden. Durch Gelfiltration wurde festgestellt, dass es sich bei dem Enzym um ein Dimer handelt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz und der Sekundärstruktur im Alignment mit der bekannten GloI des Menschen zeigte eine weitgehende Übereinstimmung der Enzyme in den für die Struktur und katalytische Aktivität relevanten Bereichen. Die rOv-GloI besitzt mit $284 \pm 32 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ pro mg Protein eine hohe spezifische Aktivität für das physiologische Substrat Methylglyoxal. Die spezifische Aktivität für Phenylglyoxal beträgt $105 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ pro mg Protein. Die K_m -Werte betragen $340 \mu\text{M}$ für Methylglyoxal und $311 \mu\text{M}$ für Phenylglyoxal. Die Wechselzahl pro katalytischem Zentrum der rOv-GloI beträgt $11\,900 \text{ min}^{-1}$ für Methylglyoxal bzw. $4\,900 \text{ min}^{-1}$ für Phenylglyoxal und liegt damit im unteren für Glyoxylasen erwarteten Bereich. Die k_{cat}/K_m -

Werte von $3,52 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für Methylglyoxal und $1,57 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für Phenylglyoxal zeigen aber deutlich die hohe katalytische Effizienz dieses Enzyms. Bei der Erstellung eines Inhibitorprofils für die rOv-Glcl zeigte sich, dass viele für ihre starke Inhibierung der katalytischen Aktivität bei Säugetieren bekannten Verbindungen keinen Einfluss auf die Aktivität der rOv-Glcl haben. Der Unterschied in der katalytischen Effizienz und in dem Inhibitorprofil zwischen den Enzymen der Säugetiere und der rOv-Glcl weist auf Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der hydrophoben Substratbindungstaschen der Enzyme hin. Dafür spricht auch ein für die Ov-Glcl erstelltes 3D Strukturmodell.

Eines der Hauptabwehrsysteme gegen toxische endogene und xenobiotische Substanzen stellen die Glutathion S-Transferasen (GST) dar, die in allen daraufhin untersuchten Helminthen nachgewiesen werden konnten. Bei den hier untersuchten Ov-GST1a und Ov-GST1b handelt es sich um erstmals beschriebene N-glykosylierte GST, die ausgeschieden werden und so direkt an der Kontaktfläche von Parasit und Wirt zu liegen kommen. Die vorkommenden Signalpeptide werden bei der posttranslationalen Prozessierung abgespalten. Die Homologie zu anderen bekannten GST beginnt erst an Aminosäureposition 25, so dass die Ov-GST1a und -1b eine sehr ungewöhnliche N-terminale Verlängerung besitzen.

Da Glykokonjugate vielfach Zielmoleküle des Immunsystems darstellen, können diese auch bei der Auseinandersetzung parasitischer Nematoden mit dem Immunsystem des Wirtes eine wichtige Rolle spielen. Das N-Glykosylierungsmuster der nativen Ov-GST1a und -1b wurde mit verschiedenen massenspektrometrischen Methoden analysiert. Die durch Verdau mit Trypsin erhaltenen Peptidfragmente konnten durch „High Pressure Liquid Chromatography“-Massenspektrometrie (HPLC-MS) den Proteinen zugeordnet und die Belegung der 4 N-Glykosylierungsstellen (5 N-Glykosylierungsstellen bei der Ov-GST1b) nachgewiesen werden. Dabei konnte auch festgestellt werden, dass die Ov-GST1a in einer 7-fach höheren Konzentration in *O. volvulus* vorliegt als die Ov-GST1b. Durch „Electrospray Ionisation“ (ESI)-MS konnte gezeigt werden, dass alle N-Glykosylierungsstellen der Ov-GST1a oligomannosidische N-Glykanstrukturen mit 2 bis 9 Mannoseresten tragen, die über 2 N-Acetylglucosaminreste mit dem Peptidrückgrat der GST verbunden sind (allg. Struktur: $\text{Man}_{2-9}\text{GlcNAc}_2$). Während die N-Glykosylierungsstellen 1, 2 und 3 (Aminosäureposition N50, N79 und N134) kürzere Strukturen mit bis zu 5 Mannoseresten tragen, ist die 4. N-Glykosylierungsstelle (N144) durch größere N-Glykanstrukturen mit bis zu 9 Mannoseresten belegt. Durch ESI-MS und „Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation“-„Time of Flight“ (MALDI-TOF) Analyse konnte ebenfalls gezeigt werden, dass $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ die Hauptglykanstruktur darstellt. Durch ESI-MS/MS konnte das Verknüpfungsmuster der einzelnen Hexosen analysiert werden. Es zeigte sich, dass die Mannosereste untereinander

in dem auch für Säugetiere typischen Muster verbunden sind. Ein wesentlicher Unterschied in der N-Glykosylierung der Ov-GST1 im Vergleich zu den oligomannosidischen Strukturen der Säugetiere liegt im Vorkommen der sehr stark verkürzten N-Glykane; während bei Säugetieren die kleinste vorliegende Struktur normalerweise $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ darstellt, sind ~30% der N-Glykane der Ov-GST1a mit $\text{Man}_{2-4}\text{GlcNAc}_2$ deutlich kleiner. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die humorale Immunantwort generalisierter Onchocerciasis-Patienten auf die nativen glykosylierten und deglykosylierten Ov-GST1a und -1b mit ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die nativen glykosylierten Ov-GST1a und -1b von > 90% der Patienten (n = 29) als Antigene erkannt wurden. Ein direkter Vergleich der Immunantworten auf die glykosylierten bzw. deglykosylierten Ov-GST1a und -1b ergab eine signifikant schwächere Immunantwort bei Verwendung der deglykosylierten Form (gepaarter Wilcoxon Test; $P < 0,01$) im ELISA.

Ein weiteres besonderes Merkmal dieser GST stellt die beschriebene N-terminale Verlängerung dar. Um die Antikörperantwort von Onchocerciasis-Patienten auf diesen Bereich hin zu untersuchen, wurde die Ov-GST1a mit und ohne diese Verlängerung in *E. coli* exprimiert und die Immunglobulin G (IgG) Antwort durch ELISA gemessen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die N-terminale Verlängerung ein Epitop für die Erkennung durch die Antikörper darstellt, was in Übereinstimmung mit einer vorausgegangenen vergleichenden Analyse potentieller antigener Bereiche steht. Die Unterschiede in der Erkennung der rOv-GST1a mit N-terminaler und ohne N-terminale Verlängerung können als signifikant betrachtet werden ($P = 0,046$). Von den 38 untersuchten Patientenseren haben 4 keine IgG Antwort auf die rOv-GST1a gezeigt, 22 der 38 Seren haben eine stärkere Erkennung gegenüber der rOv-GST1a mit N-terminaler Verlängerung gezeigt.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Ov-GST1a und -1b mit bekannten GSH-bindenden Prostaglandin D_2 Isomerasen (hPGDS) aus Säugetieren, zeigte eine große Homologie zwischen diesen Enzymen und gab den Anstoß für eine Untersuchung der Prostaglandin (PG) $\text{H}_2\text{-D}_2$ Isomeraseaktivität der rOv-GST1a. Die Isomeraseaktivität der rOv-GST1 wurde mit PGH_2 als Substrat gemessen und die möglichen Produkte (PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$) nach Extraktion durch HPLC-MS ermittelt. Die dabei festgestellte spezifische $\text{PGH}_2\text{-D}_2$ Isomeraseaktivität ist bisherigen Untersuchungen zufolge für Helminthen einzigartig. Dieses Ergebnis wurde daraufhin in einem gekoppelten Enzymtest mit Cyclooxygenase I bestätigt. Eine Bestimmung der spezifischen Aktivität der rOv-GST1a für diese Reaktion war bisher aufgrund der Instabilität des Substrats nicht möglich. Die Identifizierung des physiologischen Substrats der Ov-GST1a und -1b ist besonders in Hinsicht auf die Lokalisierung der GST und die bekannten immunmodulatorischen Eigenschaften der Prostaglandine von Bedeutung.

Die Analyse der stadien- und gewebespezifischen Expression der *Ov*-GST1a erfolgte anhand transgener *Caenorhabditis elegans*. Der Nematode ist inzwischen als gutes Labormodell anerkannt, und die Analyse des Expressionsmusters eines *Ov*-GST1a:“Green Fluorescence Protein“ (GFP) Reportergenkonstruktes in den transgenen Organismen bestätigt die Eignung dieses freilebenden Nematoden für die Untersuchung der Regulation von Genen aus parasitischen Nematoden. In allen postembryonalen Stadien von *C. elegans* konnte eine GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. In den Juvenilstadien war eine deutliche Fluoreszenz der hyp 7 Zelle (Hypodermiszelle) zu detektieren. In den adulten Tieren war das Fluoreszenzsignal auf den anterioren Bereich von *C. elegans* beschränkt und neben der starken Fluoreszenz der Hypodermis (hyp 7) wurde eine Expression der *Ov*-GST1a in dem Isthmus, dem terminalen Bulbus und den Arkadenzellen festgestellt. Neben der Analyse des Expressionsmusters wurde die *Ov*-GST1a in *C. elegans* auch ektopisch überexprimiert. Damit wurde die Eignung dieses Nematoden, posttranslational modifizierte Proteine eines Parasiten zu bilden, untersucht. Die *Ov*-GST1a wird abhängig vom Vorkommen bzw. Fehlen ihres Signalpeptides in *C. elegans* posttranslational modifiziert, d. h. *C. elegans* ist in der Lage, die r*Ov*-GST1a korrekt zu prozessieren. Eine erste Analyse der N-Glykosylierung der r*Ov*-GST1a aus *C. elegans* deutet darauf hin, dass die *Ov*-GST1a auch bei Expression in *C. elegans* eine oligomannosidische N-Glykanstruktur aufweist. Entgiftungsenzyme, die an der Abwehr reaktiver Sauerstoffverbindungen oder dem Erhalt des Redoxstatus der Zellen beteiligt sind, werden unter oxidativem Stress oft verstärkt exprimiert. Die Identifizierung der *Ov*-GST3 durch „Differential Display“ RT-PCR beruht auf der starken Erhöhung der mRNA Transkriptmenge unter exogen ausgelöstem oxidativen Stress.

Für den vollständigen Erhalt der cDNA-Sequenz wurde eine Phagenbank von *O. volvulus* gesichtet und daraufhin 3 verschiedene Transkripte dieser GST isoliert. Die *Ov*-GST3a, -3b und -3c unterscheiden sich in nur einem Sequenzbereich voneinander: Die cDNA der *Ov*-GST3b kodiert für den längsten offenen Leserahmen von 265 Aminosäuren, in der cDNA der *Ov*-GST3a fehlt ein Teilbereich dieser Sequenz, so dass diese GST für einen offenen Leserahmen von 224 Aminosäuren kodiert, und die *Ov*-GST3c als längstes Transkript enthält ein Stopcodon, so dass hier der offene Leserahmen für ein Protein von 171 Aminosäuren vorliegt. Eine erste genomische Analyse hat zu der Identifizierung eines 2971 Basenpaare umfassenden Gens der *Ov*-GST3 geführt. Basierend auf der dadurch erhaltenen Genstruktur konnte der in der cDNA der *Ov*-GST3a fehlende Bereich Exon V zugeordnet werden, während der den Leserahmen der *Ov*-GST3c unterbrechende Sequenzbereich einem Intron (Intron V) entspricht. Die Vermutung, dass es sich bei der *Ov*-GST3a, -3b und -3c um alternative Spleissprodukte handelt, muss in weiterführenden Studien noch durch eine umfassende Genanalyse gesichert werden. Die Untersuchung der

Primär- und Sekundärstruktur der Ov-GST3 hat zur Einordnung in die erst kürzlich definierte Omega-Klasse der GST geführt, deren Vertreter sich durch eine Dehydroascorbat-Reduktase- und Thioltransferaseaktivität auszeichnen. Um den Einfluss von oxidativem Stress und xenobiotischen Verbindungen auf die transkriptionelle Regulation von Omega-Klassen GST zu untersuchen, wurden homologe GST aus *C. elegans* identifiziert (F13A7.10, C29E4.7 und K10F12.4). *C. elegans* Juvenilstadien wurden mit Dexamethason, tert-Butylhydroperoxid und Paraquat inkubiert und eine Veränderung in der Transkriptbildung mit Hilfe virtueller Northern Blots detektiert. Während für K10F12.4 keine Regulation der Transkription unter diesen Bedingungen festzustellen war, wurde die Transkriptbildung von C29E4.7 unter Einfluss von oxidativem Stress reprimiert. Ein starker Anstieg in der Transkriptmenge konnte hingegen durch Inkubation mit Dexamethason bereits nach 1 Stunde festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass diese GST hormonell reguliert wird. Für F13A7.10 konnte eine starke, konzentrationsabhängige Transkriptbildung unter Einfluss von tert-Butylhydroperoxid festgestellt werden. Da die Ov-GST3 und F13A7.10 eine besonders große Homologie der Primärsequenzen aufweisen und das *C. elegans* Enzym vergleichbar mit der Ov-GST3 bei oxidativem Stress hochreguliert wird, wurde das Expressionsmuster dieser GST in *C. elegans* analysiert. Durch Mikroinjektion der potentiellen Promotorregion in Fusion mit GFP konnte die Expression von F13A7.10 in *C. elegans* in den intestinalen Zellen 1 und 9, den Zellen des Intestinal-Rektal-Ventils und den Rektal-Epithelial-Zellen lokalisiert werden. Die ersten GFP-Signale sind in den postembryonalen Stadien zu detektieren. In den adulten Tieren konnte außerdem eine Expression von Zellen des zirkumpharyngealen Nervenrings beobachtet werden.

6. Abürzungsverzeichnis

AHR	„Aryl-Hydrocarbone Receptor“
ARNT	„AHR Nuclear Translocator“
AMP	Ampicillin
ARE	“Antioxidant Responsive Element”
AS	Aminosäure
BARBIE	“Barbiturate-Inducible-Element”
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp, kb	Basenpaare, Kilobasen
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	„copy“ Desoxyribonukleinsäure
CHO	Kohlenhydrate
Cox-1	Cyclooxygenase I
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
ϵ_x	molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	„Electrospray Ionization“
g	Gramm
GFP	„Green Fluorescent Element“
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
Glo	Glyoxylase(n)
GRE	„Glucocorticoid-Responsive-Element“
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GST	Glutathion S-Transferase(n)
h	Stunde
HO·	Hydroxylradikal
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	„High Pressure Liquid Chromatography“

6. Abkürzungsverzeichnis

IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, die zur Halbierung der Enzymaktivität (Standardbedingungen) führt
Ig _x	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JNK	„Jun N-terminal Protein Kinase“
l	Liter
λ	Wellenlänge in nm
L1 – 4	Larvalstadien
LB	Luria-Bertani
M	Molar
Man	Mannose
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	“messenger” Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NF-1	„Nuclear Factor-1“
NFκB	„Nuclear Factor <i>kappa</i> B“
NGM	„Nematode Growth Medium“
O ₂ ^{·-}	Superoxidanion
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEA3	„Polyoma Virus Enhancer“
PG _x	Prostaglandinderivat
PGDS	Prostaglandin D-Synthetase
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rOv-GST	rekombinante <i>Onchocerca volvulus</i> Glutathion S-Transferase
rOv-GloI	rekombinante <i>Onchocerca volvulus</i> Glyoxylase I
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	wenn nicht anders vermerkt: Raumtemperatur; sonst: Retentionszeit
RT-PCR	Reverse Transkription von RNA durch PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TBE	Tris-Borat-EDTA
tBOOH	tert-Butylhydroperoxid
TCF11	„Transcription Factor 11“
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
UEH	Untereinheit
XRE	“Xenobiotic Response Element”

7. Literaturverzeichnis

- ¹ Hartwich, G. (1984) Nematelminthes. In: Lehrbuch der speziellen Zoologie, Bd. 1, Teil 2. Gruner, H. – E. (Hrsg.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 463 – 542.
- ² Schierenberg, E., Cassada, R. (1986) Der Nematode *Caenorhabditis elegans* - ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus unserer Zeit. *Biologie in unserer Zeit*; 1: 1 – 7.
- ³ Blaxter, M. L., De Lay, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldemann, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J. T., Thomas, W. K. (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*; 392: 71 – 75.
- ⁴ Wood, W.B. (1988) Introduction into *C. elegans* biology. In: The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Wood, W. B. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1 - 16.
- ⁵ Nowell, M. A., de Pomerai, I. D., Pritchard, D. I (1999) *Caenorhabditis elegans* as a biomonitor for immunological stress in nematodes. *Parasite Immunol*; 21: 495 – 505.
- ⁶ Bird, A. F., Bird, J. (1991) The structure of Nematodes. Bird, A. F., Bird, J. (Hrsg.), 2nd Ed. Academic Press London.
- ⁷ Sies, H. (1989) Biochemie des oxidativen Stress. *Angew Chem*; 98: 1061 – 1075.
- ⁸ Del Maestro, R. F. (1980) An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl*; 429: 153 – 168.
- ⁹ Bast, A., Goris, R. J. A. (1989) Oxidative stress. *Biochemistry and human disease. Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*; 11: 199 – 206.
- ¹⁰ Esterbauer, H., Zollner, H., Schaur, R. J. (1988) Hydroxyalkenals: Cytotoxic products of lipid peroxidation. In: *ISI Atlas of Science: Biochemistry*, 311 – 317.
- ¹¹ Krinsky, I. H. (1989) Membrane antioxidants. *NY Acad Sci*; 1: 17 – 33.
- ¹² Hauptmann, N., Cadenas, E. (1997) The oxygen paradox: biochemistry of active oxygen. In: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Scandalios, J. G. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1 – 20.
- ¹³ Cohen, G. (1994) Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann NY Acad Sci*; 738: 8 – 14.
- ¹⁴ Farber, J. L., Kyle, M. E., Coleman, J. B. (1990) Biology of disease. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. *Lab Investigation*; 62: 670 – 679.
- ¹⁵ Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*; 215: 213 – 219.
- ¹⁶ Nuhn, P. (1993) The biochemical basis of toxic actions of drugs and other xenobiotics. *Pharm Unserer Zeit*; 22: 119 – 133.
- ¹⁷ Jakoby, B. W., Bend, J. R., Cadwell, J. (1983) Metabolic basis of detoxification. Jakoby, B. W., Bend, J. R., Cadwell, J. (Hrsg.), Academic Press London, 1 – 375.

- 18 Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegemann, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D. W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*; 6: 1 – 42.
- 19 Nebert, D. W., Gonzales, F. J. (1987) P450 genes: structure, evolution and regulation. *Ann Rev Biochem*; 56: 945 – 993.
- 20 Maizels, R. M., Don, A. P. B., Selkirk, M. E., Smith, D. F., Anderson, R. M. (1983) Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature*; 365: 797 – 805.
- 21 Maizels, R. M., Holland, M. J., Falcone, F. H., Zang, X., Yazdanbakhsh, M. (1999) Vaccination against helminth parasites – the ultimate challenge for vaccinologists ? *Immunol Rev*; 171: 125 - 147.
- 22 Englund, P. T. (1988) Vaccination against parasites: special problems imposed by the adaption of parasitic organisms to the host immune response. In: *The Biology of Parasitism*. Sher, A. (Hrsg.), Lissmark Records Inc., 169 – 182.
- 23 Precious, W. Y., Barrett, J. (1989) The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths. *Biochim Biophys Acta*; 992: 215 – 222.
- 24 Precious, W. Y., Barrett, J. (1989) Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitol Today*; 5: 156 – 161.
- 25 Callahan, H. L., Crouch, R. K., James, E. R. (1991) *Dirofilaria immitis* superoxide dismutase: purification and characterization. *Mol Biochem Parasitol*; 49: 245 – 251.
- 26 Ou, X., Thomas, G. R., Chacon, M. R., Tang, L., Selkirk, M. E. (1995) *Brugia malayi*: differential susceptibility to and metabolism of hydrogen peroxide in adults and microfilariae. *Exp Parasitol*; 80: 515 – 529.
- 27 Sanchez-Moreno, M., Leon, P., Monteoliva, M., Garcia-Ruiz, M. A. (1988) Superoxide dismutase activity in extracts of specimens of *Ascaris suum* and several analogous tissues in both sexes. *Comp Biochem Physiol*; 89: 521 – 523.
- 28 Tripp, C., Frank, R. S., Selkirk, M. E., Tang, L., Grieve, M. M., Frank, G. R., Grieve, R. G. (1998) *Dirofilaria immitis*: molecular cloning and expression of a cDNA encoding a selenium-independent secreted glutathione peroxidase. *Exp Parasitol*; 88: 43 – 50.
- 29 Tang, L., Gounaris, K., Griffiths, C., Selkirk, M. E. (1995) Heterologous expression and enzymatic properties of a selenium-independent glutathione peroxidase from the parasitic nematode *Brugia pahangi*. *J Biol Chem*; 270: 18313 – 18318.
- 30 Eckelt, V. H., Liebau, E., Walter, R. D., Henkle-Dührsen, K. (1998) Primary sequence and activity analyses of a catalase from *Ascaris suum*. *Mol Biochem Parasitol*; 5: 203 - 214.
- 31 Tracy, J. W., Vande Waa, E. A. (1995) Xenobiotic metabolism. In: *Biochemistry and molecular biology of parasites*. Marr, J. J., Müller, M. (Hrsg.), Academic Press, 161 – 171.
- 32 Brophy, P. M., Pritchard, D. I. (1997) Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. *Exp Parasitol*; 79: 89 – 96.

- 33 Tate, S. S., Meister, A. (1976) Subunit structure and isozymic forms of gamma-glutamyl transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 73: 2599 - 2603.
- 34 Fahey, R. C., Sundquist, A. R. (1991) Evolution of glutathione metabolism. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*; 64: 1 - 53.
- 35 Kosower, N. S., Kosower, E. M. (1978) The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol*; 54: 109 - 160.
- 36 Meister A. (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*; 263: 17205 - 17208.
- 37 Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T., Cerami, A. (1985) Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*; 227: 1485 – 1487.
- 38 Fahey, R. C., Newton, G. L. (1983) Occurrence of low molecular weight thiols in biological systems. In: *Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological, and Clinical Aspects*. Larsson, A., Orrenius, S., Holgrem, A., Mannervik, B. (Hrsg.), Raven Press, New York, 251 – 250.
- 39 Mannervik, B. (1986) Glutathione and the evolution of enzymes for detoxification of products of oxygen metabolism. In: *Molecular Evolution of Life*. Baltscheffsky, H., Jörnvall, H., Rigler, R. (Hrsg.), Cambridge University Press, Cambridge, 281 – 284.
- 40 Fahey, R. C. (1977) Biologically important thiol-disulfide reactions and the role of cyst(e)ine in proteins: an evolutionary perspective. *Adv Exp Med Biol*; 86A: 1 – 30.
- 41 Meister, A., Anderson, M. E. (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem*; 52: 711 - 760.
- 42 Schirmer, R. H., Krauth-Siegel, R. L. and Schulz, G. E. (1989) Glutathione reductase. In: *Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects*. Part A. Dolphin, D., Poulson, R. and Avramovic, O. (Hrsg.), Wiley, New York, 553 - 596.
- 43 Ingold, K. U., Webb, A. C., Witter, D., Buton, G. W., Metcalfe, T. A., Muller, D. P. R. (1987) Vitamin E remains the major soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. *Arch Biochem Biophys*; 259: 224 – 225.
- 44 Cadenas, E., Sies, H. (1985) Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Adv Enzyme Regul*; 23: 217 - 237.
- 45 Sies, H. (1989) Zur Biochemie der Thiolgruppe: Bedeutung des Glutathions. *Naturwissenschaften*; 76: 57 - 64.
- 46 Thornalley, P. J. (1998) Glutathione-dependent detoxification of alpha-oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors. *Chem Biol Interact*; 111 - 112: 137 - 151.
- 47 Cornett, R., James, M. O., Henderson, G. N., Cheung, J., Shroads, A. L. and Stacpoole, P. W. (1999) Inhibition of glutathione S-transferase zeta and tyrosine metabolism by dichloroacetate: a potential unifying mechanism for its altered biotransformation and toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*; 262: 752 - 756.
- 48 Duine J. A. (1999) Thiols in formaldehyde dissimilation and detoxification. *Biofactors*; 10: 201 - 206.

- 49 Urade, Y., Hayaishi, O. (2000) Prostaglandin D synthase: structure and function. *Vitam Horm*; 58: 89 - 120.
- 50 Armstrong, R.N. (1991) Glutathione S-Transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chem Res Toxicol*; 4: 131 - 140.
- 51 Ketterer, B. (1988) Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res*; 202: 343 - 361.
- 52 Eaton, D. L., Bammler, T. K. (1999) Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci*; 49: 156 - 164.
- 53 Salinas, A. E., Wong, M. G. (1999) Glutathione S-transferases - a review. *Curr Med Chem*; 6: 279 - 309.
- 54 Rushmore, T. H. and Pickett, C. B. (1993) Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *J Biol Chem*; 268: 11475 - 11478.
- 55 Listowski, I. (1993) Glutathione S-transferases: intracellular binding, detoxication and adaptive responses. In: *Hepatic transport and bile secretion: Physiology and pathophysiology*. N. Tavoloni and D. Berk (Hrsg.), 397 - 405.
- 56 Hayes, J. D. and Pulford, D. J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzyme to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 30: 445 - 600.
- 57 Board, P. G., Baker, R. T., Chelvanayagam, G., Jerim, L. S., (1997) Zeta, a novel class of glutathione S-transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem J*; 328:929 - 935.
- 58 Vuilleumier, S., Sorribas, H. and Leisinger, T. (1997) Identification of a novel determinant of glutathione affinity in dichloromethane dehalogenases/glutathione S-transferases. *Biochem Biophys Res Commun*; 238: 452 - 456.
- 59 Tomarev, S. I., Piatigorsky, J. (1996) Lens crystallins of invertebrates - diversity and recruitment from detoxification enzymes and novel proteins. *Eur J Biochem*; 235: 449 - 465.
- 60 Pinzar, E., Miyano, M., Kanaoka, Y., Urade, Y. and Hayaishi, O. (2000) Structural basis of hematopoietic prostaglandin D synthase activity elucidated by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*; 275: 31239 - 31244.
- 61 David, J.R. (1993) MIF as a GST. *Parasitol Today*; 9: 315 - 316.
- 62 Dulhunty, A., Gage, P., Curtis, S., Chelvanayagam, G. and Board, P. (2001) The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J Biol Chem*; 276: 3319 - 3323.
- 63 Liebau, E., Walter, R. D., Henkle-Dührsen, K. (1994) Isolation, sequence and expression of an *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase cDNA. *Mol Biochem Parasitol*; 63: 305 - 309.
- 64 Liebau, E., Walter, R. D., Henkle-Dührsen, K. (1994) *Onchocerca volvulus*: Isolation and sequence of a second glutathione S-transferase cDNA. *Exp Parasitol*; 79: 68 - 71.
- 65 Liebau, E., Eschbach, M., Tawe, W., Sommer, A., Fischer, P., Walter, R. D., Henkle-Dührsen, K. (2000) Identification of a stress-responsive *Onchocerca volvulus*

- glutathione S-transferase (Ov-GST-3) by RT-PCR differential display. Mol Biochem Parasitol; 109: 101 - 110.
- 66 Liebau, E., Müller, V., Lucius, R., Walter, R. D. und Henkle-Dührsen, K. (1995) Molecular cloning, expression and characterization of a recombinant glutathione S-transferase from *Echinococcus multilocularis*. Mol Biochem Parasitol; 77: 49 - 56.
- 67 Hong, S. J., Kang, S. Y., Chung, Y. B., Chung, M. H., Oh, Y. J., Kang, I., Bahk, Y. Y., Kong, Y., Cho, S. Y. (2000) *Paragonimus westermani*: a cytosolic glutathione S-transferase of a sigma-class in adult stage. Exp Parasitol; 94: 180 - 189.
- 68 Trottein, F., Kieny, M.P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R. J., Balloul, J. M., Schmitt, D., Lecocq, J. P. and Capron, A. (1990) Molecular cloning and tissue distribution of a 26-kilodalton *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. Mol Biochem Parasitol; 41: 35 - 44.
- 69 McNair, A. T., Dissous, C., Duvaux-Miret, O. and Capron, A. (1993) Cloning and characterisation of the gene encoding the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. Gene; 124: 245 - 249.
- 70 Meyer, D. J., Muimo, R., Thomas, M., Coates, D. and Isaac, R. E. (1996) Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli*. Biochem J; 313: 223 - 227.
- 71 Liebau, E., Schönberger, Ö. L., Walter, R. D. und Henkle-Dührsen, K. (1994) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. Mol Biochem Parasitol; 63: 167 - 170.
- 72 Brophy, P. M., Brown, A., Pritchard, D. I. (1994) A PCR strategy for the isolation of glutathione S-transferases from nematodes. Int J Parasitol; 24: 1059 - 1061.
- 73 Muro, A., Rodriguez-Medina, J. R., Hillyer, G. V. (1993) Sequence analysis of a *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase cDNA clone. Am J Trop Med Hyg; 48: 457 - 463.
- 74 Angeli, V., Faveeuw, C., Roye, O., Fontaine, J., Teissier, E., Capron, A., Wolowczuk, I., Capron, M., Trottein, F. (2001) Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration in schistosomiasis infection. J Exp Med; 193: 1135 - 1147.
- 75 O' Leary, K., Tracy, J. W. (1991) *Schistosoma mansoni*: Glutathione S-transferase-derived detoxification of dichlorvos. Exp Parasitol; 72: 355 - 361.
- 76 Brophy, P. M., Barrett, J. (1990) Glutathione transferases in helminths. Parasitology; 100: 345 - 349.
- 77 McLellan, A. C., Thornalley, P. J. (1989) Glyoxalase activity in human red blood cells fractionated by age. Mech Ageing Dev; 48: 63 - 71.
- 78 Thornalley, P. J. (1990) The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. Biochem J; 269: 1 - 11.
- 79 Casazza, P. J., Felver, M. E., Veech, R. L. (1984) The metabolism of acetone in rat. J Biol Chem; 259: 231 - 236.
- 80 Reichard, G. A., Skutches, C. L., Hoeldtke, R. D., Owen, O. E. (1986) Acetone metabolism in humans during diabetic ketoacidosis. Diabetes; 35: 668 - 674.

- 81 Ray, S., Ray, M. (1983) Formation of methylglyoxal from aminoacetone by amine oxidase from goat plasma. *J Biol Chem*; 258: 3461 – 3462.
- 82 Ray, M., Ray, S. (1987) Aminoacetone oxidase from goat liver. Formation of methylglyoxal from aminoacetone. *J Biol Chem*; 262: 5974 – 5977.
- 83 Thornalley, P. J. (1988) Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem J*; 254: 751 – 755.
- 84 Leoncini, G., Maresca, M., Buzzi, E. (1989) Inhibition of the glycolytic pathway by methylglyoxal in human platelets. *Cell Biochem Funct*; 7: 65 – 70.
- 85 Miglietta, A., Gabriel, L. (1986) Methylglyoxal-tubulin interaction: studies on the aldehyde effects on hepatoma, liver and purified microtubular protein. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*; 51: 245 – 260.
- 86 Shinohara, M., Thornalley, P. J., Giardino, I., Beisswenger, P., Thorpe, S. R., Onorato, J., Brownlee, M. (1998) Overexpression of glyoxalase I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest*; 101: 1142 – 1147.
- 87 Oya, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Miyata, S., Maeda, S., Osawa, T., Uchida, K. (1998) Methylglyoxal modification of proteins. Chemical and immunological characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *J Biol Chem*; 274: 18492 – 18501.
- 88 Sakamoto, H., Mashima, T., Kizaki, A., Dan, S., Hashimoto, Y., Naito, M., Tsururo, T. (2000) Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis. *Blood*; 95: 3214 – 3218.
- 89 Moldeus, P., Cotgraeve, I. A. (1994) N-Acetylcysteine. *Methods Enzymol*; 234: 482 – 492.
- 90 Vander Jagt, D. L., Hunsaker, L. A., Campos, N. M., Baack, B. A. (1990) D-Lactate production in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*; 42: 277 – 284.
- 91 Clos, J., Brandau, S. (1994) pJC20 und pJC40- two high copy number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Prot Express Purif*; 5: 133 – 137.
- 92 Fire, A. (1986) Integrative Transformation of *C. elegans*. *EMBO J*; 5: 2673 – 2680.
- 93 Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72: 248 - 254.
- 94 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T₄. *Nature*; 227: 680 - 685.
- 95 Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1986) Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamid: Bemerkungen zum Mechanismus der Silberfärbung. *LKB-Application Note RE-034*.

- 96 Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci USA; 69: 2110 - 2113.
- 97 Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl Acad Sci USA; 74: 5463 - 5467.
- 98 Schnabel, H., Schnabel, R. (1990) An organ-specific differentiation gene, Pha-1 from *C. elegans*. Science; 250: 686 – 688.
- 99 Granato, M., Schnabel, H., Schnabel, R. (1994) Genesis of an organ: molecular analysis of the pha-1 gene. Development; 120: 3005 – 3017.
- 100 Kolaskar, A. S., Tongaonkar, P. C. (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. FEBS Lett; 276: 172 - 174.
- 101 Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J Mol Biol; 300: 1005 - 1016.
- 102 Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Prot Eng; 10: 1 - 6.
- 103 Thornalley, P. J. (1993) The glyoxalase system in health and disease. Mol Aspects Med; 14: 287 – 371.
- 104 Cordeiro, C., Freire, A. P. (1996) 2-Oxoaldehydes, glyoxalase I and oxidative stress. Biochem Soc Trans; 24: 472S.
- 105 Cordeiro, C., Freire, A. P. (1996) Methylglyoxal assay in cells as 2-methylquinoxaline using 1,2-diaminobenzene as derivatizing reagent. Anal Biochem; 234: 221 – 224.
- 106 Brophy, P. M., Crowley, P., Barrett, J. (1990) Relative distribution of glutathione transferase, glyoxalase I and glyoxalase II in helminths. Int J Parasitol; 20: 259 – 261.
- 107 Sommer, A., Fischer, P., Krause, K., Boettcher, K., Brophy, P. M., Walter, R. D., Liebau, E. (2001) A stress-responsive glyoxylase I from the parasitic nematode *Onchocerca volvulus*. Biochem J; 353: 445 – 452.
- 108 Kim, N. S., Umezawa, Y., Ohmura, S., Kato, S. (1993) Human glyoxalase I: cDNA cloning, expression and sequence similarity to glyoxalase I from *Pseudomonas putida*. J Biol Chem; 268: 11217 – 11221.
- 109 Inoue, Y., Kimura, A. (1996) Identification of the structural gene for glyoxylase I from *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem; 271: 25958 – 25965.
- 110 Marmstal, E., Aronsson, A. C., Mannervik, B. (1979) Comparison of glyoxalase I purified from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with the enzyme from mammalian sources. Biochem J; 183: 23 - 30.
- 111 Espartero, J., Sanchez-Aguayo, I., Pardo, J. M. (1995) Molecular characterization of glyoxylase-I from a higher plant; upregulation by stress. Plant Mol Biol; 29: 1223 – 1233.

- 112 Lu, T., Creighton, D. J., Antoine, M., Fenselau, C., Lovett, P. S. (1994) The gene encoding glyoxalase I from *Pseudomonas putida*: cloning, overexpression, and sequence comparisons with human glyoxalase I. *Gene*; 150: 93 - 96.
- 113 Clugston, S. L., Daub, E., Kinach, R., Miedema, D., Barnard, J. F., Honek, J. F. (1997) Isolation and sequencing of a gene coding for glyoxalase I activity from *Salmonella typhimurium* and comparison with other glyoxalase I sequences. *Gene*; 186: 103 – 111.
- 114 Marmstal, E., Mannervik, B. (1979) Purification, characterization and kinetic studies of glyoxalase I from rat liver. *Biochim Biophys Acta*; 566: 362 - 370.
- 115 Oray, B., Norton, S. J. (1982) Glyoxalase I from mouse liver. *Methods Enzymol*; 90: 542 - 546.
- 116 Cameron, A. D., Olin, B., Ridderström, M., Mannervik, B., Jones, T. A. (1997) Crystal structure of human glyoxalase I – evidence for gene duplication and 3D domain swapping. *EMBO J*; 16: 3386 – 3395.
- 117 Bennett, M. J., Schlunegger, M. P., Eisenberg, D. (1995) 3D domain swapping: A mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci*; 4: 2455 – 2468.
- 118 Mannervik, B. (1985) The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*; 57: 357 – 417.
- 119 Ranganathan, S., Walsh, E. S., Godwin, A. K., Tew, K. D. (1993) Cloning and characterization of human colon glyoxalase-I. *J Biol Chem*; 268: 5661 – 5667.
- 120 Sinning, I. *et. al* (1993) Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the mu and pi class enzymes. *J Mol Biol*; 232: 192 – 212.
- 121 Aronsson, A.-C., Marmstal, E., Mannervik, B. (1978) Glyoxalase I, a zinc metalloenzyme of mammals and yeast. *Biochem Biophys Res Commun*; 81: 1235 – 1240.
- 122 Han, L.-P., Schimandle, C. M., Davidson, L. M., Vander Jagt, D. L. (1977) Comparative kinetics of Mg^{2+} -, Mn^{2+} -, Co^{2+} -, and Ni^{2+} -activated glyoxalase I. Evaluation of the role of the metal ion. *Biochemistry*; 16: 5478 – 5484.
- 123 Sellin, S., Eriksson, L. E. G., Aronsson, A.-C., Mannervik, B. (1983) Octahedral metal coordination in the active site of glyoxalase I as evidenced by the properties of Co(II)-glyoxalase I. *J Biol Chem*; 258: 2091 – 2097.
- 124 Ridderström, M., Cameron, A. D., Jones, T. A., Mannervik, B. (1998) Involvement of an active-site Zn^{2+} ligand in the catalytic mechanism of human glyoxalase I. *J Biol Chem*; 273: 21623 – 21628.
- 125 Clugston, S. L., Honek, J. F. (2000) Identification of sequences encoding the detoxification metalloisomerase glyoxalase I in microbial genomes from several pathogenic organisms. *J Mol Evol*; 50: 491 – 495.
- 126 Christianson, D. W. (1991) Structural biology of zinc. *Adv Protein Chem*; 42: 281 – 335.
- 127 Schad, E. M., Zaitseva, I., Zaitsev, V. N., Dohlsten, M., Kalland, T., Schlievert, P. M., Ohlendorf, D. H., Svensson, L. A. (1995) Crystal structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin type A. *EMBO J*; 14: 3292 – 3301.

- 128 Sträter, A, Klabunde, T., Tucker, P., Witzel, H., Krebs, B. (1995) Crystal structure of a purple acid phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active site. *Science*; 268: 1489 – 1492.
- 129 Pemberton, K. D., Barrett, J. (1989) The detoxification of xenobiotic compounds by *Onchocerca gutturosa* (Nematoda: Filarioidea). *J Parasitol*; 19: 875 – 878.
- 130 Ridderström, M., Cameron, A. D., Jones, T. A., Mannervik, B. (1997) Mutagenesis of residue 157 in the active site of human glyoxalase I. *Biochem J*; 328: 231 – 235.
- 131 Rae, C., Berners-Price, S. J., Bulliman, B. T. (1990) Kinetic analysis of the human erythrocyte glyoxalase system using ¹NMR and computer model. *Eur J Biochem*; 193: 83 – 90.
- 132 Allen, R. T., Lo, T. W. C., Thornalley, P. J. (1993) A simplified method for the purification of human red blood cell glyoxalase I. Characteristics, immunoblotting and inhibitor studies. *J Protein Chem*; 12: 111 – 119.
- 133 Thornalley, P. J. (1995) Advances in glyoxalase research. Glyoxalase expression in malignancy, anti-proliferate effects of methylglyoxal, glyoxalase I inhibitor diesters and S-D-lactoylglutathione, and methylglyoxal-modified protein binding and endocytosis by the advanced glycation endproduct receptor. *Crit Rev Oncology Hematology*; 20: 99 – 128.
- 134 Sellin, S., Eriksson, L. E. G., Mannervik, B. (1982) Fluorescence and nuclear relaxation enhancement studies of the binding of glutathione derivatives to manganese-reconstituted glyoxalase I from human erythrocytes. A model for the catalytic mechanism of the enzyme involving a hydrated metal ion. *Biochemistry*; 21: 4850 – 4857.
- 135 Sellin, S., Rosevear, P. R., Mannervik, B., Mildvan, A. S. (1982) Nuclear relaxation studies of the role of the essential metal in glyoxalase I. *J Biol Chem*; 257: 10023 – 10029.
- 136 Catmull, J., Wilson, M. E., Kirchhoff, L. V., Metwali, A. , Donelson, J. E. (1999) Induction of specific cell-mediated immunity in mice by oral immunization with *Salmonella* expressing *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase. *Vaccine*; 17: 31 - 39.
- 137 Liebau, E., Wildenburg, G., Brophy, P. M., Walter, R. D., 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.
- 138 Liebau, E., Wildenburg, G., Walter, R. D., Henkle-Dührsen, K. (1994) A novel type of glutathione S-transferase in *Onchocerca volvulus*. *Infect Immun*; 62: 4762 - 4767.
- 139 McTigue, M. A., Williams, R., Tainer, J. A. (1995) Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J Mol Biol*; 246: 21 – 27.
- 140 Rossjohn, J., Feil, S. C., Wilce, M. C. J., Sexton, J. L., Spithill, T. W., Parker, M. W. (1997) Crystallization, structural determination and analysis of a novel parasite vaccine antigen candidate: *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase. *J Mol Biol*; 273: 857 – 872.
- 141 Tsuchida, S., Sato, K. (1992) Glutathione transferases and cancer. *CRC Crit Rev Biochem Mol Biol*; 27: 337 – 384.

- 142 Zhou, Z. H., Syvanen M. (1997) A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. *Mol Gen Genet*; 256:187 - 194.
- 143 Sinning, I., Cleywegt, G., Cowan, S., Reinemer, P., Dirr, H., Huber, R., Gilland, G., Armstrong, R., Ji, X., Board, P., Loin, B., Mannervik, B., Jones, A. T. (1993) Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the Mu and Pi class enzymes. *J Mol Biol*; 232: 192 – 212.
- 144 Babbitt, P.C. (2000) Reengineering the glutathione S-transferase scaffold: a rational design strategy pays off. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97:10298 - 10300.
- 145 Mannervik, B., Cameron, A. D., Fernandez, E., Gustafsson, A., Hansson, L. O., Jemth, P., Jiang, F. Jones, T. A., Larsson, A. K., Nilsson, L. O., Olin, B., Pettersson, P. L., Ridderström, M., Stenberg, G., Widersten, M. (1998) An evolutionary approach to the design of glutathione-linked enzymes. *Chem Biol Interact* 111-112: 15 - 21.
- 146 Whalen, R., Boyer, T. D. (1998) Human glutathione S-transferases. *Semin Liver Dis*; 18: 345 - 358.
- 147 Ji, X., von Rosenvinge, E. C., Johnson, W. W., Armstrong, R. N., Gilliland, G. L. (1996) Location of a potential transport binding site in a sigma class glutathione transferase by x-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 8208 - 8213.
- 148 Cabrera, Z., Parkhouse, R. M. E. (1986) Identification of antigens of *Onchocerca volvulus* and *Onchocerca gibsoni* for diagnostic use. *Mol Biochem Parasitol*; 20: 225 – 231.
- 149 Selkirk, M. E., Maizels, R. M. Yazdanbakhsh, M. (1992) Immunity and the prospects for vaccination against filariasis. *Immunobiol*; 184: 263 – 281.
- 150 Dell, A., Haslam, S. M., Morris, H. R., Khoo, K. H. (1999) Immunogenic glycoconjugates implicated in parasitic nematode diseases. *Biochim Biophys Acta*; 1455: 353 - 362.
- 151 Maizels, R. M., Blaxter, M. L. , Selkirk, M. E. (1993) Forms and functions of nematode surfaces. *Exp Parasitol*; 77: 380 - 384.
- 152 Deehan, M. R., Frame, M. J., Parkhouse, R. M., Seatter, S. D., Reid, S. D., Harnett, M. M., Harnett, W. (1998) A phosphorylcholine-containing filarial nematode-secreted product disrupts B lymphocyte activation by targeting key proliferative signaling pathways. *J Immunol* 160: 2692 - 2699.
- 153 Kang, S., Cummings, R. D., McCall, J. W. (1993) Characterization of the N-linked oligosaccharides in glycoproteins synthesized by microfilariae of *Dirofilaria immitis*. *J Parasitol*; 79: 815 - 828.
- 154 Auriault, C., Gras-Masse, H., Wolowczuk, I., Pierce, R. J., Balloul, J.-M., Neyrinck, J.-L., Drobecq, H., Tartar, A., Capron, A. (1988) Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. *J Immunol* 141: 1678 - 1694.
- 155 Stahl, P. D., Ezekowitz, R. A. (1998) The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol*; 10: 50 - 55.
- 156 Tan, M. C. A. A., Mommaas, A. M., Drijfhout, J. W., Jordens, R., Onderwater, J. J. M., Verwoerd, D., Mulder, A. A., van der Heiden, A. N., Scheidegger, D., Oomen, L. C. J.

- M., Ottenhoff, T. H. M., Tulp, A., Neefjes, J. J., Koning, F. (1997) Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur J Immunol*; 27: 2426 – 2435.
- 157 Nirmalan, N., Cordeiro, N. J. V., Kläger, S. L., Bradley, J. E., Allen, J. E. (1999) Comparative analysis of glycosylated and nonglycosylated filarial homologues of the 20-kilodalton retinol binding protein from *Onchocerca volvulus* (Ov20). *Infect Immun*; 67: 6329 - 6334.
- 158 Rao, U. R., Salinas, G., Mehta, K., Klei T. R. (2000) Identification and localization of glutathione S-transferase as a potential target enzyme in *Brugia* species. *Parasitol Res*; 86: 908 - 915.
- 159 Ito, S., Narumiya, S., Hayaishi, O. (1989) Prostaglandin D₂: A Biochemical Perspective. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*; 37: 219 – 234.
- 160 Urade, Y., Nagata, A., Suzuki, Y., Fuji, Y., Hayaishi, O. (1989) Primary structure of rat brain prostaglandin D synthetase deduced from cDNA sequence. *J Biol Chem*; 264: 1041 – 1045.
- 161 Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., Fuji, Y., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y., Hayaishi, O. (1997) Cloning and Crystal Structure of Hematopoietic Prostaglandin D Synthase. *Cell*; 90: 1085 – 1095.
- 162 Meyer, D. J., Thomas, M. (1995) Characterization of rat spleen prostaglandin H D-isomerase as a sigma-class GSH transferase. *Biochem J*; 311: 739 – 742.
- 163 Mahmud, I. Ueda, N., Yamaguchi, N., Yamashita, R., Yamamoto, S., Kanaoka, Y., Urade, Y., Hayaishi, O. (1997) Prostaglandin D synthase in human megakaryoblastic cells. *J Biol Chem*; 272: 28263 – 28266.
- 164 Murakami, M., Matsumoto, R., Urade, Y., Austen, K. F., Arm, J. P. (1995) c-Kit Ligand Mediates Increased Expression of Cytosolic Phospholipase A₂, Prostaglandin Endoperoxide Synthase-1, and Hematopoietic Prostaglandin D₂ Synthase and Increased IgE-dependent Prostaglandin D₂ Generation in Immature Mouse Mast Cells. *J Biol Chem*; 270: 3239 – 3246.
- 165 Pinzar, E., Miyano, M., Kanaoka, Y., Urade, Y., Hayaishi, O. (2000) Structural Basis of Hematopoietic Prostaglandin D Synthase Activity Elucidated by Site-directed Mutagenesis. *J Biol Chem*; 359: 31293 – 31304.
- 166 Ujihara, M., Tsuchida, S., Satoh, K., Urade, Y. (1988) Biochemical and immunological demonstration of prostaglandin D₂, E₂ and F_{2α} formation from prostaglandin H₂ by various rat glutathione S-transferase isoenzymes. *Arch Biochem Biophys*; 264: 428 – 437.
- 167 Meyer, D. J., Muimo, R., Thomas, M., Coates, D., Isaac, R. E. (1996) Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli*. *Biochem J*; 313: 223 – 227.
- 168 Hilkens, M. U., Vermeulen, H., van Neerven, R. J. J., Snijedewint, F. G. M., Wierenga, E. A., Kapsenberg, M. L. (1995) Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E₂ critically depends on interleukin-2. *Eur J Immunol*; 25: 59 – 63.
- 169 Betz, M., Fox, B. S. (1991) Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol*; 146: 108 – 113.

- 170 Wang, W., Chandee, K. (1995) *Entamoeba histolytica* suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex Ia molecule and I-A beta mRNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *Infect Immun*; 63: 1089 – 1094.
- 171 Farrell, J. P., Kirkpatrick, C. E. (1987) Experimental cutaneous leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *J Immunol*; 138: 902 – 907.
- 172 Maizels, R. M., Denham, D. (1992) Diethylcarbamazine (DEC): immunopharmacological interactions of an anti-filarial drug. *Parasitology*; 105: S59 – S60.
- 173 Liu, L. X., Buhlmann, J. E., Weller, P. F. (1992) Release of prostaglandin E2 by microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. *Am J Trop Med Hyg*; 46: 520 – 523.
- 174 Kanaoka, Y., Fujimori, K., Kikuno, R., Sakaguchi, Y., Urade, Y., Hayaishi, O. (2000) Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthase. *Eur J Biochem* 267: 3315 – 3322.
- 175 Krause, S., Sommer, A., Fischer, P., Brophy, P. M., Walter, R. D., Liebau, E. (2001) Gene structure of the extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* and its overexpression and promoter analysis in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biochem Parasitol*; 117: 145 – 154.
- 176 Giles, H., Leff, P. (1988) The biology and pharmacology of PGD₂. *Prostaglandins*; 35: 227 – 234.
- 177 Tanaka, K., Ogawa, K., Sugamura, K., Nakamura, M., Takano, S., Nagata, K. (2000) Cutting Edge: Differential Production of Prostaglandin D2 by Human Helper T Cell Subsets. *J Immunol*; 164: 2277 – 2280.
- 178 Raible, D. G., Schulmann, E. S., DiMuzio, J., Cardillo, R., Post, T. J. (1992) Mast cell mediators prostaglandin-D2 and histamine activate human eosinophils. *J Immunol* 148: 3536 – 3542.
- 179 Burchiel, S. W., (1979) PGI₂ und PGD₂ effects on cyclic AMP and human T-cell mitogenesis. *Prostaglandins Med*; 3: 315 – 320.
- 180 Kanamori, Y., Niwa, M., Kohno, K., Al-Essa, L. Y., Matsuno, H., Kozawa, O., Uematsu, T. (1997) Migration of neutrophils from blood to tissue: alteration of modulatory effects of prostanoic acid on superoxide generation in rabbits and humans. *Life Sci*; 60: 1407 – 1417.
- 181 Nagaoshi, H., Uehara, Y., Kanai, F., Maeda, S., Ogura, T., Goto, A., Toyooka, T., Esumi, H., Shimizu, T., Omata, M. (1998) Prostaglandin D₂ inhibits inducible nitric oxide synthase expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*; 82: 204 – 209.
- 182 Kubata, B. K., Eguchi, N., Urade, Y., Yamashita, K., Mitamura, T., Tai, K., Hayaishi, O., Horii, T. (1998) Plasmodium falciparum Produces Prostaglandins that are Pyrogenic, Somnogenic, and Immunosuppressive Substances in Humans. *J Exp Med*; 188: 1197 – 1202.

- 183 Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D., Ambros, V. (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J*; 10: 3935 – 3970.
- 184 Wildenburg, G., Liebau, E., Henkle-Dührsen, K. (1998) *Onchocerca volvulus*: ultrastructural localization of two glutathione S-transferases. *Exp Parasitol*; 88: 34 – 42.
- 185 Albertson, D. G., Thomson, J. N. (1976) The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Phil Trans R Soc Lond*; 275: 299 – 325.
- 186 Franz, M., 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.
- 187 Knox, D. P. (2000) Development of vaccines against gastrointestinal nematodes. *Parasitology*; 120: 43 – 61.
- 188 Guyton, K. Z., Gorospe, M., Holbrook, N. J. (1997) Oxidative stress, gene expression, and the ageing process. In: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Scandalios, J. G. (Hrsg.), Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 189 Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermin, L. S., Schulte, G. K., Danley, D. E., Hoth, L. R., Griffor, M. C., Kamath, A. V., Rosner, M. H., Chrnyk, B. A., Perregaux, D. E., Gabel, C. A., Geoghegan, K. F., Pandit, J. (2000) Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem*; 275: 24798 - 24806.
- 190 McKeown, M. (1992) Alternative mRNA splicing. *Ann Rev Cell Biol*; 8: 133 – 155.
- 191 Kuo, H.-C., Nasim, F.-U., Grabowski, P. (1991) control of alternative splicing by differential binding of U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Science*; 1045 – 1050.
- 192 Valcarel, J., Green, M. R. (1996) The SR protein family: pleiotropic functions in pre-mRNA splicing. *TIBS*; 21: 296 – 301.
- 193 Kodym, R., Calkins, P., Story, M. (1999) The cloning and characterization of a new stress response protein. *J Biol Chem*; 274: 5131 – 5137.
- 194 Rouimi, P., Anglade, P., Benzekri, A., Costet, P., Debrauwer, L., Pineau, T., Tulliez, J. (2001) Purification and characterization of a glutathione S-transferase Omega in pig: evidence for two distinct organ-specific transcripts. *Biochem J*; 358: 257 - 262.
- 195 Armstrong, R. N. (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol*; 10: 2 – 18.
- 196 Caccuri, A. M., Antonini, G., Allocati, N., Di Ilio, C., De Maria, F., Innocenti, F., Parker, M. W., Masulli, M., Lo Bello, M., Turella, P., Federici, G., Ricci, G. (2002) GSTB1-1 from *Proteus mirabilis*: a snapshot of an enzyme in the evolutionary pathway from a redox enzyme to a conjugating enzyme. *J Biol Chem*; Mar 11 [epub ahead of print].
- 197 Kortemme, T., Creighton, T. E. (1995) Ionisation of cysteine residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to unusual thiol pKa values in proteins of the thioredoxin family. *J Mol Biol*; 253: 799 – 812.

- 198 Ravichandran, V., Seres, T., Moriguchi, T., Thomas, J. A., Johnston, R. B. Jr. (1994) S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by the phagocytosis-associated respiratory burst in blood monocytes. *J Biol Chem*; 269: 25010 – 25015.
- 199 Jahngen-Hodge, J., Obin, M. S., Gong, X., Shang, F., Nowell, T. R. Jr., Gong, J., Abasi, H., Blumberg, J., Taylor, A. (1997) Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress. *J Biol Chem*; 272: 28218 – 28226.
- 200 Cotgreave, I. A., Gerdes, R. G. (1998) Recent trends in glutathione biochemistry: glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*; 242: 1 – 9.
- 201 Thomas, J. A., Poland, B., Honzatko, R. (1995) Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch Biochem Biophys*; 319: 1 – 9.
- 202 Gilbert, H. F. (1984) Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods Enzymol*; 107: 330 – 351.
- 203 Ziegler, D. M. (1985) Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem*; 54: 305 – 329.
- 204 Latour, I., De Ros, E., Deneff, J. F., Buc Calderon, P. (1999) Protein S-thiolation can mediate the inhibition of protein synthesis induced by tert-butyl hydroperoxide in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*; 160: 1 – 9.
- 205 Seres, T., Ravichandran, V., Moriguchi, T., Rokutan, K., Thomas, J. A., Johnston, R. B. Jr. (1996) Protein S-thiolation and dethiolation during the respiratory burst in human monocytes. *J Immunol*; 156: 1973 – 1980.
- 206 Dafre, A. L., Sies, H., Akerboom, T. (1996) Protein S-thiolation and regulation of microsomal glutathione transferase activity by the glutathione redox couple. *Arch Biochem Biophys*; 332: 288 – 294.
- 207 Sies, H., Dafre, H. L., Akerboom, T. P. (1998) Protein S-thiolation and regulation of membrane-bound glutathione transferase. *Chem Biol Interact*; 111 – 112: 177 – 185.
- 208 Lind, C., Gerdes, R., Schuppe-Koistinen, I., Cotgreave, I. A. (1998) Studies of the mechanism of oxidative modification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by glutathione: catalysis by glutaredoxin. *Biochem Biophys Res Commun*; 247: 481 – 486.
- 209 Zhan-Li, Y., Dahlstrom, J. E., Le Couteur, D. G., Board, P. G. (2001) Immunohistochemistry of omega class glutathione S-transferase in human tissues. *J Histochem Cytochem*; 49: 983 – 987.
- 210 Dulhunty, A., Gage, P., Curtis, S., Chelvanayagam, G., Board, P. (2001) The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J Biol Chem*; 276: 3319 – 3323.
- 211 Liebau, E., Eckelt, V. H., Wildenburg, G., Teesdale-Spittle, P., Brophy, P. M., Walter, R. D., Henkle-Duehrsen, K. (1997) Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. *Biochem J*; 324: 659 – 666.
- 212 Gladyshev, V. N., Liu, A., Novoselov, S. V., Krysan, K., Sun, Q.-A., Kryukov, V. M., Kryukov, G. V., Lou, M. F. (2001) Identification and characterization of a new mammalian glutaredoxin (thioltransferase), Grx2. *J Biol Chem*; 276: 30374 – 30380.

- 213 Mannervik, B., Bolton-Grob, R., Cameron, A. D., Etahadieh, M., Gustafsson, A., Hansson, L. O., Hubatsch, I., Jemth, P., Johansson, A.-S., Jones, T., A., Larsson, A.-K., Nilsson, L. O., Olin, B., Pettersson, P. L., Ridderström, M., Stenberg, G., Widersten, M., Wisen, S. (2001) Evolutionary design of glutathione-linked proteins *in vivo* and *in vitro* based on sampling of modules from pre-existing structures. *Chem Biol Interact*; 133: 3 – 6.
- 214 Forsberg, L., Persson, L., Kelner, M. J., Jakobsson, P.-J., Morgenstern, R. (2001) Structure and transcriptional regulation of the human microsomal glutathione transferase 1 (MGST1) and prostaglandin E synthase (PGES) genes. *Chem Biol Interact*; 133: 301 – 303.
- 215 Whalen, R, Boyer, T. D. (1998) Human glutathione S-transferases. *Sem Liver Disease*; 18: 345 – 358.
- 216 Johnson, O., Murphy, P., Prydz, H., Kolste, A.-B. (1998) Interaction of the CNC-bZIP factor TCF11/LCR-F1/Nrf1 with MafG: binding-site selection and regulation of transcription. *Nucl Acids Res*; 26: 512 – 520.
- 217 Gutman, A., Wasylyk, B. (1990) The collagenase gene promotor contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J*; 9: 2241 – 2246.
- 218 Liang, Q., He, J. S., Fulco, A. J. (1995) The role of Barbie box sequences as cis-acting elements involved in the barbiturate-mediated induction of cytochromes P450BM-1 and P450BM-3 in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem*; 270: 4438 – 4450.
- 219 White, J. (1988) The Anatomy. In: *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Wood, W. B. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 81 – 125.
- 220 Chalfie, M., White, J. (1988) The nervous system. In: *The nematode Caenorhabditis elegans*. Wood, W. B. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 337 – 359.
- 221 Johnson, J. A., el Barbary, A., Kornguth, S. E., Brugge, F. J., Siegel, F. L. (1993) Glutathione S-transferase isoenzymes in rat brain neurons and glia. *J Neurosci*; 13: 2013 – 2023.
- 222 van Rosum, A. J., Brophy, P. M., Tait, A., Barrett, J., Jefferies, J. R. (2001) Proteomic identification of glutathione S-transferases from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics*; 1: 1463 – 1468.
- 223 Yamada, K., Fukushima, T. (1993) Mechanism of cytotoxicity of paraquat II. *Exp Toxicol Pathol*; 45: 375 – 380.
- 224 Fukushima, T., Yamada, K., Isobe, A., Shiwaku, K., Yamane, Y. (1993) Mechanism of cytotoxicity of paraquat I. NADH oxidation and paraquat radical formation via complex I. *Exp Toxic Pathol*; 45: 345 – 349.
- 225 Haidara, K., Morel, I., Abalea, V., Gascon Barre, M., DenizEAU, F. (2002) Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmatic reticulum. *Biochim Biophys Acta*; 1542: 173 – 185.
- 226 Silva, C. M., Cidlowski, J. A. (1989) Direct evidence for intra- and intermolecular disulfide bond formation in the human glucocorticoid receptor. Inhibition of DNA binding and identification of a new receptor-associated protein. *J Biol Chem* 264: 6638 – 6647.

- 227 Hutchison, K. A., Matic, G., Meshinchi, S., Bresnick, E. H., Pratt, W. (1991) Redox manipulation of DNA binding activity and BuGR epitope reactivity of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*; 266: 10505 – 10509.
- 228 Ashida, H., Ohue, K., Kanazawa, K., Danno, G. (1997) Effects of dietary lipid peroxidation products on hormonal responses in primary cultured hepatocytes of rats. *Biosci Biotechnol Biochem*; 61: 2089 – 2094.
- 229 Esposito, F., Cuccillo, F., Morra, F., Russo, T., Cimino, F. (1995) DNA binding activity of the glucocorticoid receptor is sensitive to redox changes in intact cells. *Biochim Biophys Acta*; 1260: 308 – 314.
- 230 Makino, Y., Okamoto, K., Yoshikawa, N., Aoshima, M., Hirota, K., Yodoi, J., Umesono, K., Makino, I., Tanaka, H. (1996) Thioredoxin: a redox-regulating cellular cofactor for glucocorticoid hormone action. Cross talk between endocrine control of stress response and cellular antioxidant defense system. *J Clin Invest*; 98: 2469 – 2477.
- 231 Klatt, P., Molina, E. P., De Lacoba, M. G., Padilla, C. A., Martinez-Galisteo, E., Barcena, J. A., Lamas, S. (1999) Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *FASEB J*; 13: 1481 – 1490.
- 232 Galter, D., Mihm, S., Droge, W. (1994) Distinct effects of glutathione disulfide on the nuclear transcription factor- κ B and the activator protein-1. *Eur J Biochem*; 221: 639 – 648.
- 233 Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., Yodoi, J. (1997) AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94: 3633 – 3638.
- 234 Meyer, M., Schreck, R., Baeuerle, P. A. (1993) Hydrogen peroxide and antioxidants have opposite effects on the activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J*; 12: 2005 – 2015.
- 235 Wilhelm, D., Bender, K., Knebel, A., Angel, P. (1997) The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Mol Cell Biol*; 17: 4792 – 4800.
- 236 Moffat, G. J., McLaren, A. W., Wolf, C. R. (1994) Involvement of Jun and Fos proteins in regulating transcriptional activation of human pi class glutathione S-transferase gene in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells. *J Biol Chem*; 269: 16397 – 16402.
- 237 Lakshminarayanan, V., Drab-Weis, E. A., Roebuck, K. A. (1996) Hydrogen peroxide and tumor necrosis factor alpha induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- κ B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelia cells. *J Biol Chem*; 273: 32670 – 32678.
- 238 Rahman, I., Smith, C. A., Antonicelli, F., MacNee, W. (1998) Characterization of γ -glutamylcysteine-heavy subunit gene promoter: critical role for AP-1. *FEBS Lett*; 427: 129 – 133.
- 239 Jirajaroenrat, K., Pongjaroenkit, S., Krittanai, C., Prapanthadara, L., Kettermann, A., J. (2001) Heterologous expression and characterization of alternatively spliced glutathione S-transferases from a single *Anopheles* gene. *Insect Biochem Mol Biol*; 31: 867 – 875.

- ²⁴⁰ Brattig, N., Buettner, D. W., Hoerauf, A. (2001) Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia* endobacteria. *Microbes Infect*; 3: 439 – 446.