Funktionelle Charakterisierung von zwei stressinduzierbaren Glutathion S-Transferasen in *Caenorhabditis elegans*

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Britta Leiers

aus Billerbeck

Düsseldorf, 2002

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Referent: Prof. Dr. Werner Kunz

2. Referent: PD. Dr. Kimberly Henkle-Dührsen

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juni 2002

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1 1.1. Nematoda 1 1.2. Der Nematoda Czenarhabditis elegans 1 1.2.1. Klassifikation 2 1.2.2. Lebenszyklus 2 1.2.3. C. elegans als experimenteller Modellorganismus 3 1.3. Oxidativer Stress und zelluläre Schutzmechanismen 4 1.3.1. Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies 5 1.3.2. Oxidative Schädigung biologischer Systeme 6 1.3.3. Glutathion 8 1.3.4. Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen 9 1.4.1. Biologische Funktionen 11 1.4.2. Struktur und Klassifikation 12 1.4.3. Glutathion S-Transferasen in Nematoden 14 1.5. Zielsetzang 17 2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1.2. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtstandards 20 2.1.6. Enzyme 23 2.1.9. Medien 21 2.1.0. Stammlöstngen 21 2.1.1. Antiseren und Antikörper 23 2.1.1.2. Chemikalien 24			Seite
1.1. Nematode 1 1.2. Der Nematode Caenorhabdilis elegans 1 1.2.1. Klassifikation 2 1.2.2. Lebenszyklus 2 1.2.3. C. elegans als experimenteller Modellorganismus 3 1.3. Oxidativer Stress und zelluläre Schutzmechanismen 4 1.3.1. Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies 5 1.3.2. Oxidative Schüdigung biologischer Systeme 6 1.3.3. Glutathion 8 1.3.4. Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen 9 1.4. Chutathiontransferasen 11 1.4.1. Biologische Funktionen 11 1.4.2. Struktur und Klassifikation 12 1.4.3. Glutathion S-Transferasen in Nematoden 14 1.5. Zielsetzung 17 2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1.2. Gaenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.5. Molekulargewichtstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medicn 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antiktörper	1. EIN	LEITUNG	1
1.2. Der Nematode Caenorhabdilis elegans 1 1.2.1. Klassifikation 2 1.2.2. Lebenszyklus 2 1.2.3. C. elegans als experimenteller Modellorganismus 3 1.3. Oxidativer Stress und zelluläre Schutzmechanismen 4 1.3.1. Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies 5 1.3.2. Oxidative Schüdigung biologischer Systeme 6 1.3.3. Glutathion 8 1.3.4. Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen 9 1.4. Ghtrathiontransferasen 11 1.4.1. Biologische Funktionen 11 1.4.3. Glutathion S-Transferasen in Nematoden 14 1.5. Zielsetzung 17 2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1.2. Gaenorhabdilis elegans-Stämme 18 2.1.2. Gaenorhabdilis elegans-Stämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.2. Chemikalien	1.1. No	ematoda	1
1.2.2. Lebenszyklus 2 1.2.3. C. elegans als experimenteller Modellorganismus 3 13. Oxidativer Stress und zelluläre Schutzmechanismen 4 1.3.1. Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies 5 1.3.2. Oxidative Schädigung biologischer Systeme 6 1.3.3. Glutathion 8 1.3.4. Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen 9 1.4. Biologische Funktionen 11 1.4.1. Biologische Funktionen 11 1.4.2. Struktur und Klassifikation 12 1.4.3. Glutathion S-Transferasen in Nematoden 14 1.5. Zieketzung 17 2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1.2. Gaenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Bakterienstämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 21 2.1.9. Med	1.2. Do	er Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> Klassifikation	1 2
1.2.3. C. elegans als experimenteller Modellorganismus 3 1.3. Oxidativer Stress und zelluläre Schutzmechanismen 4 1.3.1. Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies 5 1.3.2. Oxidative Schädigung biologischer Systeme 6 1.3.3. Glutathion 8 1.3.4. Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen 9 1.4. Glutathionen 11 1.4.1. Biologische Funktionen 11 1.4.2. Struktur und Klassifikation 12 1.4.3. Glutathion S-Transferasen in Nematoden 14 1.5. Zielsetzung 17 2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1.2. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Moleklulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10.	1.2.2.	Lebenszyklus	2
1.3. Oxidativer Stress und zelluläre Schutzmechanismen 4 1.3.1. Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies 5 1.3.2. Oxidative Schädigung biologischer Systeme 6 1.3.3. Glutathion 8 1.3.4. Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen 9 1.4. Glutathiontransferasen 11 1.4.1. Biologische Funktionen 11 1.4.2. Struktur und Klassifikation 12 1.4.3. Glutathion S-Transferasen in Nematoden 14 1.5. Zielsetzung 17 2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1.2. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antikörper 23 2.1.2. Chemikalien 24 2.1.3. Software 24 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.2. Eukaryontische Zellkultur 25	1.2.3.	C. elegans als experimenteller Modellorganismus	3
1.3.2. Oxidative Schädigung biologischer Systeme 6 1.3.3. Glutathion 8 1.3.4. Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen 9 1.4. Glutathiontransferasen 11 1.4.1. Biologische Funktionen 11 1.4.2. Struktur und Klassifikation 12 1.4.3. Glutathion S-Transferasen in Nematoden 14 1.5. Zielsetzung 17 2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1.2. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Bakterienstämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antikörper 23 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.13. Software	1.3. O: 1.3.1.	xidativer Stress und zelluläre Schutzmechanismen Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies	4 5
1.3.3. Glutathion 8 1.3.4. Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen 9 1.4. Glutathiontransferasen 11 1.4.1. Biologische Funktionen 11 1.4.2. Struktur und Klassifikation 12 1.4.3. Glutathion S-Transferasen in Nematoden 14 1.5. Zielsetzung 17 2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1.2. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Bakterienstämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antisörne 23 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.13. Software 24 2.1.13. Software 25	1.3.2.	Oxidative Schädigung biologischer Systeme	6
1.3.4. Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen 9 1.4. Glutathiontransferasen 11 1.4.1. Biologische Funktionen 11 1.4.2. Struktur und Klassifikation 12 1.4.3. Glutathion S-Transferasen in Nematoden 14 1.5. Zielsetzung 17 2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Bakterienstämme 18 2.1.2. Bakterienstämme 19 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 23 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.13. Software 24 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25	1.3.3.	Glutathion	8
1.4. Glutathiontransferasen 11 1.4.1. Biologische Funktionen 11 1.4.2. Struktur und Klassifikation 12 1.4.3. Glutathion S-Transferasen in Nematoden 14 1.5. Zielsetzung 17 2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Gaenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Bakterienstämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.13. Software 24 2.1.13. Software 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25	1.3.4.	Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen	9
1.4.2. Struktur und Klassifikation 12 1.4.3. Glutathion S-Transferasen in Nematoden 14 1.5. Zielsetzung 17 2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Bakterienstämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.3. Software 24 2.2. Kukovontische Zellkultur 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.1. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.1. C. legans-Kultur 25	1.4. G 1.4.1.	lutathiontransferasen Biologische Funktionen	11 11
1.4.3. Glutathion S-Transferasen in Nematoden 14 1.5. Zielsetzung 17 2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1. Material 18 2.1.2. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Bakterienstämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.2. Chemikalien 24 2.1.3. Software 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.3. DNA-Präparation 26	1.4.2.	Struktur und Klassifikation	12
1.5. Zielsetzung 17 2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1. Material 18 2.1.2. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Bakterienstämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.0. Stammlösungen 21 2.1.1. Antiseren und Antikörper 23 2.1.2. Chemikalien 24 2.1.3. Software 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.3. DNA-Präparation 26	1.4.3.	Glutathion S-Transferasen in Nematoden	14
2. MATERIAL UND METHODEN 18 2.1. Material 18 2.1.2. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Bakterienstämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antikörper 23 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.13. Software 24 2.2. Methoden 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.3. DNA-Präparation 26 2.2.3. Genomische DNA aus C elegans 26	1.5. Zi	elsetzung	17
2.1. Material 18 2.1.2. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Bakterienstämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antikörper 23 2.1.13. Software 24 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.3. DNA-Präparation 26 2.2.3.1 Graponische DNA aus C. elegans 26	2. MA ⁻	TERIAL UND METHODEN	18
2.1.2. Caenorhabditis elegans-Stämme 18 2.1.2. Bakterienstämme 18 2.1.2. Bakterienstämme 19 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antikörper 23 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.13. Software 24 2.2. Methoden 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.3. DNA-Präparation 26 2.2.3.1 Genomische DNA aus C elegans 26	2.1. Mater	rial	18
2.1.2. Bakterienstämme 18 2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antikörper 23 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.13. Software 24 2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.1. Genomische Zellkultur 25 2.2.3. DNA-Präparation 26 2.2.3.1 Genomische DNA aus C elegans 26	2.1.2.	Caenorhabditis elegans-Stämme	18
2.1.3. Vektoren 19 2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antikörper 23 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.13. Software 24 2.2. Methoden 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.3. DNA-Präparation 26 2.2.3. DNA aus C. elegans 26	2.1.2.	Bakterienstämme	18
2.1.4. Oligonukleotide 19 2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antikörper 23 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.3. Software 24 2.2. Methoden 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.3. DNA-Präparation 26 2.2.3. Genomische DNA aus C. elegans 26	2.1.3.	Vektoren	19
2.1.5. Molekulargewichtsstandards 20 2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antikörper 23 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.13. Software 24 2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.3. DNA-Präparation 26 2.2.3. DNA aus C elegans 26	2.1.4.	Oligonukleotide	19
2.1.6. Enzyme 20 2.1.7. Eukaryontische Zelllinie 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antikörper 23 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.13. Software 24 2.2 Methoden 25 2.2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.3. DNA-Präparation 26 2.2.3.1 Genomische DNA aus C. elegans 26	2.1.5.	Molekulargewichtsstandards	20
2.1.7. Edital yolitische Zellinhe 20 2.1.8. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antikörper 23 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.13. Software 24 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.3. DNA-Präparation 26 2.2.3.1 Genomische DNA aus C elegans 26	2.1.0.	Enzyme Eukamontische Zelllinie	20
2.1.0. Kits 21 2.1.9. Medien 21 2.1.0. Stammlösungen 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antikörper 23 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.13. Software 24 2.2. Methoden 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.3. DNA-Präparation 26 2.2.3.1 Genomische DNA aus C. elegans 26	2.1.7.	Euka yohusene Zeminie	20
2.1.2. Medicit 21 2.1.10. Stammlösungen 21 2.1.11. Antiseren und Antikörper 23 2.1.12. Chemikalien 24 2.1.13. Software 24 2.2. Methoden 25 2.2.1. C. elegans-Kultur 25 2.2.2. Eukaryontische Zellkultur 25 2.2.3. DNA-Präparation 26 2.2.3.1 Genomische DNA aus C elegans 26	2.1.8.	Madian	21
2.1.10.Stammostingen212.1.11.Antiseren und Antikörper232.1.12.Chemikalien242.1.13.Software242.2.Methoden252.2.1.C. elegans-Kultur252.2.2.Eukaryontische Zellkultur252.2.3.DNA-Präparation262.2.3.1Genomische DNA aus C. elegans26	2.1.9.	Stammlösungen	21
2.1.11.Antibiotich and Antibioper252.1.12.Chemikalien242.1.13.Software242.2.Methoden252.2.1.C. elegans-Kultur252.2.2.Eukaryontische Zellkultur252.2.3.DNA-Präparation262.2.3.1Genomische DNA aus C. elegans26	2.1.10.	Antiseren und Antikörner	23
2.1.1.2.Communication2.1.1.2.2.1.13.Software24 2.2.Methoden25 2.2.1.C. elegans-Kultur252.2.2.Eukaryontische Zellkultur252.2.3.DNA-Präparation262.2.3.1Genomische DNA aus C. elegans26	2.1.12	Chemikalien	23 24
2.2.Methoden252.2.1.C. elegans-Kultur252.2.2.Eukaryontische Zellkultur252.2.3.DNA-Präparation262.2.3.1Genomische DNA aus C. elegans26	2.1.13.	Software	24
2.2.1.C. elegans-Kultur252.2.2.Eukaryontische Zellkultur252.2.3.DNA-Präparation262.2.3.1Genomische DNA aus C elegans26	2.2. M	ethoden	25
2.2.2.Eukaryonusche Zenkunur252.2.3.DNA-Präparation262.2.3.1Genomische DNA aus C elegans26	2.2.1. 2.2.2	C. elegans-Kultur	25
2.2.3.DINA-rraparation262.2.3.1Genomische DNA aus C elegans26	2.2.2.		25
	2.2.3. 2 2 3 1	Genomische DNA aus C elegans	20

2.2.3.2.	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	26
2.2.3.3.	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	27
2.2.4.	PCR	27
2.2.5.	Ligation	27
2.2.6.	Restriktionsverdau	28
2.2.7.	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	28
2.2.8.	Transformation	28
2.2.8.1.	Herstellung kompetenter Bakterien	28
2.2.8.2.	Transformation	29
2.2.9.	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.10.	Transfer von DNA auf Membranen (Southern Blot)	29
2.2.11.	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	30
2.2.12.	Sequenzierung von DNA	30
2.2.13.	Markierung von DNA-Sonden	30
2.2.13.1.	Radioaktive PCR	30
2.2.13.2.	Random Primed Labeling	31
2.2.13.3.	DIG High Primed Labeling	31
2.2.14.	Transfektion mammalischer Zellen	31
2.2.15.	Mikroinjektion	32
2.2.16.	RNA-interference	34
2.2.17.	Stress-Experimente mit C. elegans	35
2.2.18.	GFP-Fluoreszenzmessungen	35
2.2.19.	Konfokale Laserscanmikroskopie	36
2.2.20.	RNA-Präparation	36
2.2.21.	Reverse Transkription	36
2.2.22.	Formaldehyd-Gelelektrophorese	37
2.2.23.	Transfer von RNA auf Membranen (Northern Blot)	37
2.2.24.	Hybridisierung mit markierten DNA-Sonden und Detektierung	37
2.2.25.	Expression rekombinanter Proteine	38
2.2.26.	Aufreinigung rekombinanter Proteine aus E. coli	38
2.2.27.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	39
2.2.28.	Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.2.29.	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	40
2.2.30.	Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	40
2.2.31.	Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine	40
2.2.31.1.	Membrangebundene Proteine	40
2.2.31.2.	Immunohistochemie	41
2.2.31.2.1	Freeze-Crack-Methode	41
2.2.31.2.2.	Antikörperumsetzung	41
2.2.32.	GST-Enzymaktivitätstests	42

3. ERGEBNISSE

3.1. Die 3.1.1.	<i>C. elegans</i> Glutathion S-Transferase <i>Ce</i> -GST-p24 Warum ist dieses Gen aus <i>C. elegans</i> interessant?	44 44
3.1.2.	Struktur des Ce-GST-p24-Genes und des Ce-GST-p24-Proteins	44
3.1.3.	Etablierung des BL1-C. elegans-Stammes	46
3.1.3.1.	Nachweis der Ce-GST-p24-GFP-Plasmid-DNA in BL1-C. elegans	47
3.1.3.2.	Nachweis der Ce-GST-p24-GFP-mRNA in BL1-C. elegans	48
3.1.3.3.	Nachweis der Ce-GST-p24-Transgen-Expression mittels GFP-Fluoreszenz	49
3.1.3.4.	Lokalisation der Ce-GST-p24 über Immunhistochemie	51
3.1.3.5.	Lebensspanne von BL1-C. elegans unter Normalbedingungen	51
3.1.3.6.	Toleranz gegenüber oxidativem Stress	52
3.1.4.	Effekte des Ce-GST-p24-knock-outs	56
3.1.4.1.	Überprüfung des RNAi-Effekts in BL1-C. elegans	56
3.1.4.2.	Effekt des Ce-GST-p24-RNAi knock-outs unter Normalbedingungen	57
3.1.4.3.	Toleranz der RNAi-behandelten C. elegans gegenüber oxidativem Stress	59
3.1.4.4.	Unterschiede zwischen den Entwicklungsstadien unter oxidativem Stress	62
3.1.5.	Promotorstudien des Ce-GST-p24-Promotors	65
3.1.5.1.	Promotoranalyse in Säugerzelllinien	66
3.1.5.2.	Fluoreszenzmessungen im homologen C. elegans-System	67
3.1.5.3.	Auswertung am konfokalen Lasermikroskop	70
3.1.6.	Rekombinantes Protein und Enzymaktivität	71
3.1.6.1.	Expression und Aufreinigung der rekombinanten Ce-GST-p24	71
3.1.6.2.	Messung der Enzymaktivität	72
3.2. Die 3.2.1.	<i>C. elegans</i> Glutathion S-Transferase <i>Ce</i> -GST-p29 Warum ist dieses Gen aus <i>C. elegans</i> interessant?	73 73
3.2.2.	Struktur des Ce-GST-p29-Genes und des Ce-GST-p29-Proteins	73
3.2.3.	Etablierung des BL2-C. elegans-Stammes	74
3.2.3.1.	Nachweis der Ce-GST-p29-GFP-Plasmid-DNA in BL2-C. elegans	75
3.2.4.	Effekte des Ce-GST-p29-knock-outs	76
3.2.4.1.	Effekt des Ce-GST-p29-RNAi knock-outs unter Normalbedingungen	76
3.2.4.2.	Unterschiede zwischen den Entwicklungsstadien unter oxidativem Stress	77
3.2.5.	Rekombinantes Protein und Enzymaktivität	79
3.2.5.1.	Expression und Aufreinigung der rekombinanten Ce-GST-p29	79
3.2.5.2.	Messung der Enzymaktivität	80

4. **DISKUSSION**

81

4.1. St	rukturvergleich der untersuchten GSTs aus <i>C. elegans</i> Die Genstruktur der <i>Ce</i> -GST-p24 und der <i>Ce</i> -GST-p29	81 81
4.1.2.	Ce-GST-p24 passt strukturell in die nematodenspezifische GST-Klasse	83
4.1.3.	Ce-GST-p29 passt strukturell in die Omega-Klasse der GSTs	85

44

4.2.	Lokalisation der Ce-GST-p24 im Nematoden	87
4.3.	Ce-GST-p24 vermittelt Schutz gegen oxidativen Stress	89
4.4.	Verringerung der Stresstoleranz durch Ce-GST-p24-RNAi	92
4.5.	Unterschied in der Stressresistenz zwischen den Entwicklungsstadien der Wildtyp-C. elegans	94
4.6.	Regulatorische Promotorelemente der Ce-GST-p24	96
4.7.	Stressinduktion des Ce-GST-p24-Promotors	98
4.8.	Rekombinante Expression von Ce-GST-p24 und Ce-GST-p29	99
4.9.	Substratspezifität der rekombinanten Ce-GST-p24 und Ce-GST-p29	102
5.	ZUSAMMENFASSUNG	104
6.	LITERATURVERZEICHNIS	105
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	117

1. Einleitung

1.1. Nematoda

Die Nematoda bilden einen der arten- und individuenreichsten Stämme der Metazoen (Poinar, 1983). Sie kommen in den meisten terrestrischen und aquatischen (Salz- und Süsswasser) Biotopen der Erde vor. Selbst in extremen Lebensräumen, wie im Schlamm der Tiefseegräben oder im Permafrostboden der Antarktis, konnten Nematoden nachgewiesen werden. Die meisten Nematodenarten leben jedoch in den Böden der gemässigten bis tropischen Zonen. Neben den freilebende Nematoden ist eine grosse Nematodengruppe zur parasitären Lebensweise in Pflanzen und Tieren übergegangen (Kennedy & Harnett, 2001). Trotz der Vielfalt der genutzten Lebensräume, mit sehr variablen Lebensbedingungen, bleibt der Bauplan des Nematodenhabitus im Grossen und Ganzen konstant. Der Körperbau ist einfach strukturiert, zylindrischrund bis fadenförmig und unsegmentiert, was zu der deutschen Bezeichnung "Faden- bzw. Rundwürmer" führte. Die Nematoden sind von einer mehrschichtigen Cuticula umgeben, die von der darunterliegenden Hypodermis sezerniert wird. Die Flüssigkeit in der Leibeshöhle (Pseudocoelom) baut einen Turgordruck gegen die starre Aussenhülle auf (Hydroskelett), die als Widerlager für die Längsmuskulatur dient. Dieser Aufbau lässt nur die, für die Nematoden typische, schlängelnde Fortbewegung zu. Während ihrer Entwicklung häuten sich alle Nematoden viermal, wobei erst die vollständige Erneuerung der Cuticula eine Grössenzunahme des Individuums ermöglicht.

1.2. Der Nematode Caenorhabditis elegans

Caenorhabditis elegans ist ein 1 mm langer, freilebender Nematode, der in den Böden vieler Länder der Erde nachgewiesen werden kann. Er ernährt sich von bodenlebenden Bakterien und zeichnet sich durch eine sehr hohe Vermehrungsrate aus, welche durch Selbstbefruchtung begünstigt wird. Der Lebenszyklus des Nematoden (siehe Abb. 1.1) dauert unter optimalen Bedingungen bei 25°C rund drei Tage. Zusätzlich zu dieser kurzen Entwicklungsdauer zeichnet sich *C. elegans* durch seine gut zu analysierende Morphologie und Entwicklung und das relativ kleine Genom aus. All das war ausschlaggebend für seine Nutzung als experimenteller Modellorganismus (siehe 1.2.3). Das seit Dezember 1998 vollständig sequenzierte Genom umfasst 9,7 x 10^7 Basenpaare und enthält rund 20.000 proteinkodierende Gene (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Dies entspricht ungefähr dem Achtfachen des Saccharomyces cerivisiae-Genoms und ist ungefähr halb so gross wie das Genom von Drosophila melanogaster (Celniker, 2000) (Adams et. al., 2000)

1.2.1. Klassifikation

Caenorhabditis elegans wird nach Blaxter (http://nema.cap.ed.ac.uk/) folgendermassen im phylogenetischen Stammbaum eingeordnet:

STAMM:	Nemathelminthes
UNTERSTAMM:	Nematoda
KLASSE:	Secernentea
ORDNUNG:	Rhabditida
ÜBERFAMILIE:	Rhabditoidea
FAMILIE:	Rhabditidae
ART:	Caenorhabditis elegans

1.2.2. Lebenszyklus

C. elegans kommt in zwei Geschlechtsformen vor: Hermaphrodite und Männchen. Welches Geschlecht sich entwickelt, hängt von der Anzahl der X-Chromosomen pro Zelle ab. Neben den 5 autosomen Chromosomenpaaren besitzt ein Hermaphrodit zwei (XX), ein Männchen aber nur ein X-Chromosom (X0). Männchen entstehen durch spontane X-Chromosomennondisjunction und machen nur ca. 0,05 % einer *C. elegans*-Laborpopulation aus. Die hermaphroditen Tiere können sich durch Selbstbefruchtung fortpflanzen, oder sie paaren sich in selteneren Fällen mit männlichen Tieren. Durch die Selbstbefruchtung bringt ein adulter Hermaphrodit 250 - 300 Nachkommen hervor. Aus den abgelegten Eiern entwickeln sich die jungen *C. elegans* über 4 Larvenstadien wiederum zu adulten Würmern. Der Wechsel zum jeweils nachfolgenden Entwicklungsstadium wird dabei durch eine Häutung eingeleitet, die eine Grössenzunahme des Individuums ermöglicht. Der vollständige Lebenszyklus von *C. elegans* ist in Abb. 1.1 dargestellt. Die adulten Hermaphrodite sind vier Tage fertil und leben noch weitere 10-15 Tage bevor sie sterben.



Abb. 1.1 Der Lebenszyklus von *Caenorhabditis elegans* (modifiziert nach Riddel (1988)). Die Zeitangaben dokumentieren die Dauer der einzelnen Entwicklungsstadien unter Laborbedingungen und gelten für eine Umgebungstemperatur von 25°C. Der gesamte Zyklus dauert unter diesen Bedingungen rund 3 Tage. Durchgezogene Pfeile markieren einen Häutungsschritt.

Unter schlechten Lebensbedingungen - wie z.B. geringem Futterangebot oder zu hoher Populationsdichte – entwickeln sich die L2-Larven zu Dauerlarven, die mehrere Monate in diesem Dauerstadium verweilen können. Unter verbesserten Lebensbedingungen (z.B. nach der Zugabe von Bakterien) entwickeln sie sich innerhalb der nächsten 12 Stunden weiter zu L4-Larven, die anschliessend den normalen Entwicklungszyklus fortsetzten.

1.2.3. C. elegans als experimenteller Modellorganismus

C. elegans besitzt eine Zahl von Charakteristika, die zur Nutzung des Nematoden als bedeutenden experimentellen Modellorganismus in biologischen Studien führten. *C. elegans* ist leicht im Labor zu kultivieren (siehe 2.2.1) und aufgrund seines kurzen Lebenszyklus (siehe 1.2.2) und der Möglichkeit der Selbstbefruchtung können in kurzer Zeit grosse Mengen an Nachkommen gewonnen werden. Sein einfacher Aufbau, seine Zellkonstanz (959 Zellen im adulten Hermaphrodit), seine Transparenz und die geringe Genomgrösse trugen in den letzten Jahren zu einer detaillierten Analyse und Charakterisierung der Morphologie und des Genoms des Organismus bei, die im Internet für alle frei zugänglich zusammengetragen wurde (http://elegans.swmed.edu/). So wurde 1998 die Sequenzierung des gesamten Genoms fertiggestellt (*C. elegans* Sequenzing Consortium, 1998); die Klonierung und

Charakterisierung von Genen (Genomics) und Proteinen (Proteomics) wird stetig vorangetrieben. Die Expression von Genen zu einem definierten Zeitpunkt wird z.B. mit Hilfe von sogenannten "expressed sequence tags" (ESTs) konserviert und kann anschliessend analysiert werden. Des weiteren ist es möglich, durch Nutzung der RNA-interference (RNAi) in kurzer Zeit gezielt den funktionellen knock-out von genau definierten Genen in C. elegans zu erreichen (Bargmann, 2001). Die modernen computergestützten, molekularbiologischen Methoden bieten eine breitgefächerte Grundlage zur Bearbeitung von komplexen Fragestellungen innerhalb des Modellorganismus. Die Entschlüsselung von molekularbiologischen, morphologischen und physiologischen Zusammenhängen in C. elegans soll zu einem besseren Verständnis der Prozesse in höher entwickelten Lebewesen, wie z.B. den Säugetieren und dort insbesondere dem Menschen, beitragen.

1.3. Oxidativer Stress und zelluläre Schutzmechanismen

Als vor ca. 2,5 Milliarden Jahren am Ende des Archaikums (Präkambium) die ersten Organismen auf der noch jungen Erde begannen, mit Hilfe der Photosynthese grosse Mengen Sauerstoff zu produzieren und an die Atmosphäre abzugeben, war das zunächst eine ökologische Katastrophe. Viele Arten, die sich bis dahin an die anaeroben Bedingungen angepasst hatten, kamen mit der hohen Reaktivität des Sauerstoffs nicht klar, die unter anderem auf seinem hohen elektrochemischen Potential beruht, und starben aus. Im Laufe der Evolution entwickelten sich jedoch Mechanismen, die gerade dieses elektrochemische Potential des Sauerstoffs nutzen, um in jeder einzelnen Zelle Energie zu gewinnen. So wird bei der aeroben Atmung der Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor genutzt und dabei in einem mehrschrittigen Prozess zu Wasser (H₂O) reduziert. Diese so genial rückstandslos erscheinende Reaktion hat jedoch einen bedeutenden Nachteil für die aeroben Organismen. Bei der Reduktion des Sauerstoffs entstehenden unvollständig reduzierte, reaktive Sauerstoffspezies, welche lebensnotwendige Moleküle der Zellen (z.B. DNA, Proteine, Lipide) angreifen und irreversibel schädigen können. Diese Schädigung wird als oxidativer Stress bezeichnet.

Reaktive Sauerstoffspezies gelten inzwischen als Hauptauslöser für die Alterung von Organismen und für eine Reihe von Krankheiten. Nach Ashok und Ali (1999) gibt es mehr als 300 Theorien, die das Phänomen des Alterns zu klären versuchen. Die populärste ist die sogenannte "Free Radical Theory of Aging", die das allgegenwärtige Auftreten von freien Radikalen in aeroben Organismen und die von ihnen ausgelösten Schäden für den Alterungsprozess verantwortlich macht (Harman, 1991). Gleichzeitig konnten viele Krankheiten, die oft mit fortschreitendem Alter des Menschen auftreten, auf die Wirkung von Sauerstoffradikalen zurückgeführt werden. Als Beispiele sind Atheriosklerose, Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit und rheumathische Arthritis neben vielen anderen zu nennen (Bast & Goris, 1989; Davies, 1995; Forsberg et. al., 2001; Sayre et. al., 2001; Warner, 1994). Über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, ihre Schädigung zellulärer Moleküle und über nichtenzymatische und enzymatische Schutzmechanismen in der aeroben Zelle wird in den folgenden Abschnitten berichtet.

1.3.1. Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies entstehen bei der unvollständigen Reduktion von Sauerstoff (O₂) in einem mehrstufigen Prozess (Fridovich, 1978):



Durch Aufnahme eines Elektrons entsteht aus dem Sauerstoff zunächst das hochreaktive, jedoch kurzlebige Superoxidanionradikal (O_2^-), das durch die Reaktion mit Protonen in das stabilere Wasserstoffperoxid (H_2O_2) übergeht. Wasserstoffperoxid besitzt neben seinen oxidierenden Eigenschaften auch das Merkmal, Elektronen von Metallionen aufzunehmen (Fenton-Reaktion), wodurch hochreaktive Hydroxylradikale ('OH⁻) entstehen (Cohen, 1994). In einem letzten Schritt werden die Hydroxylradikale zu Wasser oxidiert. Neben diesen Sauerstoffspezies existiert noch der kurzlebige Singulettsauerstoff (1O_2), ein energetisch höherer Zustand des molekularen Sauerstoffs (Saltman, 1989). Er entsteht durch Energie-absorption. Die aufgenommene Energie kann an andere Moleküle weitergegeben werden, wodurch diese Radikalcharakter annehmen können.

In biologischen Systemen entstehen reaktive Sauerstoffspezies durch verschiedene Prozesse. Neben der mitochondrialen Atmungskette als Hauptquelle für reaktive Sauerstoffspezies in der Zelle, werden sie auch als Nebenprodukte einer Reihe von anderen metabolischen Reaktionen im Cytoplasma, im Endoplasmatischen Reticulum, in der Plasmamembran und in Peroxisomen freigesetzt (Patel & Day, 1999). Während der mitochondrialen Elektronentransportkette können insbesondere am Komplex III (Ubichinon-Cytochrom c-Reduktase) Superoxidanionradikale entstehen. Dort werden die Elektronen zunächst vom Komplex I auf Ubichinon (Q) übertragen, wodurch dieses zu Ubichinol (QH₂) reduziert wird. In zwei Schritten werden die Elektronen weiter auf Cytochrom c übertragen, wobei kurzzeitig ein Semichinonradikal ('Q') entsteht. Das freie Elektron kann auf Sauerstoff übertragen werden, und ein Superoxidanionradikal wird frei. Die Menge der entstehenden Sauerstoffradikale ist direkt abhängig von der Stoffwechselrate und der aktuellen Sauerstoffkonzentration im Organismus. Je höher der Metabolismus ist, desto stärker steigt die Rate des oxidativen Stresses an (Finkel & Holbrook, 2000).

Es sind mehrere zytosolische Enzyme bekannt, die die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Zellen fördern. Wichtige Beispiele sind unter anderem die Cytochrom P450-Oxidase (Bondy & Naderi, 1994) und die Dioxygenasen (Dalton et. al., 1999). In Peroxisomen werden durch Aktivierung einer Acetyl-CoA-Oxidase Elektronen und Protonen auf Sauerstoff übertragen, wodurch H_2O_2 entsteht (Keller et. al., 1993). Auch bei der von der Glyoxylat-Oxidase katalysierten Oxidation des in den Peroxisomen vorliegenden Glykolats in Glyoxylat entsteht H_2O_2 , das jedoch in den Peroxisomen zum grössten Teil durch die Katalse in H_2O und O_2 gespalten wird (Streyer, 1988).

Reaktive Sauerstoffspezies können zusätzlich auch durch exogene Einwirkungen wie UV-Licht, Strahlungen, Zigarettenrauch oder bestimmte Chemikalien - wie z.B. den Chinonen Juglon oder Plumbagin – entstehen. Die pflanzlichen Chinone Juglon (5-Hydroxy-1,4naphtoquinone, aus der Schale der Walnuss (*Juglans nigra*)) und Plumbagin (2-Methyl-5hydroxy-1,4-naphtoquinone, aus dem Bleiwurz (*Plumbago indica*)) zum Beispiel sind in der Lage, Zellmembranen zu überwinden, und werden experimentell als intrazelluläre Induktoren für oxidativen Stress genutzt. Ihre Toxizität beruht auf einem radikalischen Prozess, der dem in der mitochondrialen Atmungskette sehr ähnlich ist. Ihre enzymatisch katalysierte Reduktion führt zur Bildung von Semichinonradikalen, die wiederum Sauerstoff zu Superoxidanionradikalen umsetzen, wobei das Chinon regeneriert wird (O'Brien, 1991).

1.3.2. Oxidative Schädigung biologischer Systeme

Die freigesetzten Sauerstoffradikale gehen unspezifische Reaktionen mit beliebigen Molekülen der Zelle ein, d.h. sie entziehen den Molekülen ein Elektron, um ihr leeres Orbital aufzufüllen und übertragen damit den Radikalcharakter auf die zelleigenen Moleküle. Die entstandenen reaktiven Moleküle sind wiederum in der Lage weitere Moleküle anzugreifen. Diese radikalische Kettenreaktion setzt sich bis zur Termination fort, die von nichtenzymatischen oder enzymatischen Antioxidantien eingeleitet wird (Bast & Goris, 1989; Girotti, 1998). Oft werden lebensnotwendige Makromoleküle wie DNA, RNA, Proteine und Lipide irreversibel durch radikalische Reaktionen geschädigt. Dabei entstehen DNA-Hydroperoxide, angeregte Carbonylverbindungen und Phospholipidhydroperoxide. Die Angriffe auf die Nukleinsäuren können Mutationen im Genom und Chromosomenaberrationen hervorrufen (Burkhardt et. al., 2001). Durch Schädigung von Aminosäuren in Proteinen kann die enzymatische Aktivität der Proteine verlorengehen. Die Peroxidation von Phospholipiden kann zur Deformation von Zellmembranen führen, was den Verlust der Membranintegrität und eine Einschränkung des Stoffaustausches mit der Zellumgebung nach sich zieht (Davies, 1995; Girotti, 1998).

Der radikalische Peroxidationsprozess der Membranphospholipide, die zum grössten Teil aus ungesättigten Fettsäuren (LH) bestehen, wird durch Sauerstoffradikale ('OH) induziert, wobei Alkylradikale (L') entstehen. Die Doppelbindungen in den ungesättigten Fettsäuren sind dabei bevorzugte Angriffspunkte der Sauerstoffradikale. Das Alkylradikal kann mit einem noch intakten ungesättigten Phospholipidmolekül reagieren, wobei ein weiteres Alkylradikal und ein Lipidhydroperoxid (LOOH) frei werden. Das stabile Lipidhydroperoxid kann z. B. durch Reaktion mit Metallionen zu einem Alkoxyl- (LO') bzw. einem Peroxylradikal (LOO') oxidiert werden (Fenton-Raktion), die wiederum die Kettenreaktion fortsetzen können (Ketterer & Meyer, 1989).

Beispiele für die radikalische Peroxidation von Phospholipiden:

LH + OH.	\rightarrow	$L' + H_2O$	(Initiation)
$L' + O_2$	\rightarrow	LOO.	(Kettenfortsatz)
LOO' + LH	\rightarrow	LOOH + L'	
$LOOH + Me^{2+}$	\rightarrow	$LO' + OH^- + Me^{3+}$	(Reinitiation durch Fenton-Reaktion)
$LOOH + Me^{3+}$	\rightarrow	LOO' + H^+ + Fe^{2+}	

Auf diese Weise entstehen eine grosse Anzahl von stabilen, hochreaktiven Molekülen, die das Überleben der aeroben Zelle beeinflussen, und die von ihr nicht toleriert werden können. Im Laufe der Evolution sind antioxidative Schutzmechanismen entstanden, die neben nichtenzymatischer auch enzymatisch-katalytischer Natur sind. Aufgrund der Mannigfaltigkeit der Reaktionen werden in den nächsten Abschnitten nur das nichtenzymatische Detoxifikationsmolekül Glutathion und die enzymatischen Antioxidantien der eukaryontischen Zelle detailliert vorgestellt. Es sollte jedoch nicht vergessen werden, dass auch so wichtige nichtenzymatische Antioxidantien wie zum Beispiel die fettlöslichen Moleküle β -Carotin und α -Tocopherol (Vitamin E) und das wasserlösliche Molekül Ascorbinsäure (Vitamin C) an der Detoxifikation von reaktiven Molekülen im Organismus beteiligt sind (Ames et. al., 1993; Chaudiere & Ferrari-Iliou, 1999).

1.3.3. Glutathion

Glutathion, ein ubiquitär in Organismen vertretenes, wasserlösliches Tripeptid (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin), spielt eine bedeutende Rolle bei der Detoxifikation von elektrophilen bzw. radikalischen Substanzen innerhalb des Zellmetabolismus. Das niedermolekulare Peptid entsteht durch einen enzymatisch katalysierten zweistufigen Prozess. Zunächst wird eine Peptidbindung zwischen Glutamat und Cystein ausgebildet, eine Reaktion, die von der γ -Glutamylcystein-Synthetase katalysiert wird. In einem zweiten Schritt katalysiert die Glutathionsynthetase die Kondensation der Carboxylgruppe des Cysteins mit der Aminogruppe des Glycins.



Abb. 1.2 Struktur des Tripeptids Glutathion. Die nukleophile Sulfhydrylgruppe des Cysteins ist markiert (Kreis).

Glutathion wirkt in der Zelle als Sulfhydrylpuffer. Es wechselt zwischen einer reduzierten Thiolform (GSH) und einer oxidierten Form (GSSG), in der zwei Glutathionmoleküle über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Die Reduktion von GSSG zu GSH - unter Verwendung von NADPH - wird von der Glutathion-Reduktase katalysiert. Das Verhältnis von GSH zu GSSG ist in vielen Zellen ungefähr 500:1 (Streyer, 1988). In vielen Zellen kann eine GSH-Konzentration von bis zu 10 mM nachgewiesen werden (Hayes & McLellan, 1999). Glutathion stellt als Antioxidant einen zentralen Bestandteil des zellulären Schutzes gegen reaktive Sauerstoffspezies dar, es sind aber zusätzlich noch glutathionabhängige Detoxifikationsenzyme wichtig, die bei der Bekämpfung des oxidativen Stresses mithelfen. Mit der nukleophilen Sulfhydrylgruppe (SH-Gruppe) des Cysteins können kovalente Bindungen zu elektrophilen funktionellen Gruppen von Molekülen in der Zelle ausgebildet werden. Die Hydrophilie des entstehenden Konjugates ist auf die freien Carbonyl- und Aminogruppen des Glutathions zurückzuführen. Diese Eigenschaft wird in der Zelle unter anderem genutzt, um reaktive Moleküle einzufangen und in wasserlöslicher Form dem weiteren Metabolismus zugänglich zu machen.

Glutathion spielt auch eine zentrale Rolle bei der Detoxifikation von reaktiven Oxidationsprodukten des aeroben Zellmetabolismus. Dabei werden mit Hilfe der Glutathiontransferasen – die auch eine selenunabhängige Peroxidaseaktivität aufweisen – und der selenabhängigen Glutathionperoxidasen die reaktiven Oxidationsprodukte (z. B. DNA-Hydroperoxide) zu den entsprechenden Alkoholen reduziert. Als Elektronendonor fungiert Glutathion, das in der oxidierten GSSG-Form aus der Reaktion hervorgeht (Ketterer & Meyer, 1989). Der wichtigste Unterschied zwischen den glutathionumsetzenden Enzymgruppen der Glutathiontransferasen und der Glutathionperoxidasen ist. dass Glutathionperoxidasen sowohl reaktive Oxidationsprodukte (z.B. Peroxide) als auch H₂O₂ reduzieren können. Die Glutathiontransferasen können ausschliesslich Oxidationsprodukte und keinen H_2O_2 umsetzen; ihre Aktivität wird durch H_2O_2 sogar gehemmt (Hayes & McLellan, 1999). Damit wurden bereits zwei wichtige Enzyme angesprochen, die beim antioxidativen Schutz der Zelle eine bedeutende Rolle spielen.

1.3.4. Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen

Als Antwort auf die hochreaktiven Radikale, die während des oxidativen Stresses entstehen, besitzen aerobe Zellen ein vielschichtiges, enzymatisch-antioxidatives Schutzsystem (siehe Abb.1.3). Es gliedert sich grob in zwei Abwehrlinien. In der ersten Phase werden direkt die reaktiven Sauerstoffspezies (siehe 1.3.1) gebunden und detoxifiziert. Als wichtigste Enzyme der Phase I sind zu nennen: die Superoxiddismutasen (SOD), Katalasen (CAT), Peroxiredoxine (PRX), Glutathionperoxidasen (GPX) und Thioredoxinperoxidasen (TPX). Die SODs dismutieren das Superoxidanionradikal, während die Gruppe der Peroxidasen und die Katalasen Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff umsetzen. Da diese erste Enzymgruppe nicht alle reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle vollständig vernichten kann, gibt es in einer zweiten Detoxifikationsphase Enzyme, die die entstandenen oxidativen Reaktionsprodukte, sprich die geschädigten Makromoleküle (siehe 1.3.2) binden und detoxifizieren.



Abb. 1.3 Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies in eukaryontischen Zellen und enzymatisch-antioxidative Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress (modifiziert nach Hayes & McLellan, 1999).

Diese vielgestaltigen, radikalischen Oxidationsprodukte, die aus so unterschiedlichen Molekülen wie der DNA oder Proteinen hervorgehen, werden mit Hilfe der Glutathionperoxidasen (GPX), der Aldehydreduktasen, der Alkoholdehydrogenasen und der grossen Gruppe der Glutathion S-Transferasen (GST) neutralisiert. Durch die Glutathionperoxidasen wird die Reduktion der Oxidationsprodukte zu Alkoholen katalysiert, wobei Glutathion als Elektronendonor fungiert (siehe 1.3.3).

Das Tripeptid GSH spielt aber auch bei der Konjugation mit oxidierten Makromolekülen eine zentrale Rolle, die von den Glutathion S-Transferasen katalysiert wird. Die GSH-Konjugate (GS-X) sind weniger reaktiv als die radikalischen Oxidationsprodukte und aufgrund der zwei freien Carboxylgruppen und der Aminogruppe des GSH hydrophil. Sie werden über Membrantransporter, die oft ATP-abhängig sind, aus den Zellen ausgeschleust. Wichtige Transporter sind z.B. die ATP-abhängige GS-X-Pumpe (auch als multiple drug resistance associated protein (MRP) bezeichnet) (Hayes & McLellan, 1999; Ishikawa, 1992), ein

multispezifischer organische Anionentransporter (Heijn et. al., 1992) und ein Anionentransporter für Dinitrophenol S-GSH-Konjugate (Saxena et. al., 1992).

1.4. Glutathiontransferasen

1.4.1. Biologische Funktionen

Glutathiontransferasen (auch Glutathion S-Transferasen (GST)) sind in vielen Organismen die wichtigsten Phase-II-Entgiftungsenzyme. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, die Reaktion zwischen wasserlöslichen Molekülen wie reduziertem Glutathion, Glycin oder UDP-Glucuronsäure und einer Reihe von elektrophilen, meist toxischen Substanzen (Xenobiotika) zu katalysieren (Hayes & McLellan, 1999). Die Konjugation mit GSH ist dabei quantitativ deutlich bevorzugt. Als Primärfunktion der multifunktionalen GSTs gilt die Entgiftung von endogenen als auch xenobiotischen, alkylierten Substanzen, wie z.B. Epoxiden, Peroxiden, Alkyl- und Arylhaliden, α - und β -ungesättigten Ketonen und Aldehyden (Ketterer & Meyer, 1989). Die Bindung an GSH führt zu einer Detoxifizierung der Substanzen, indem die hydrophilen GSH-Konjugate aktiv vom Zellmetabolismus umgesetzt werden können bzw. durch Membrantransporter aus der Zelle heraustransportiert werden können (siehe Abb. 1.3).

Die Konjugation von Glutathion mit Xenobiotika kann jedoch auch zur Resistenzbildung gegenüber Chemotherapeutika bei Krebs (McLellan & Wolf, 1999), gegen Insektizide (Ranson et. al., 1997), Herbizide (Edwards et. al., 2000) und Antibiotika (Arca et. al., 1997) führen. Die medizinische Wirkung einiger Krebstherapeutika wird dabei durch die Konjugation mit Glutathion zum Teil oder vollständig herabgesetzt. Ein weiteres Beispiel ist die Resistenz von Insekten gegen DDT (1,1,1-Trichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethan), die auf einen durch eine GST katalysierten Mechanismus zurückzuführen ist (Brown, 1986). Die Aktivität der Glutathion S-Transferasen kann aus medizinischer oder landwirtschaftlicher Sicht also auch Nachteile mit sich bringen.

Neben der beschriebenen Katalyse einer Thioesterbindung zwischen GSH und elektrophilen Substanzen weisen viele GSTs auch eine Peroxidaseaktivität auf. Dabei werden organische Hydroperoxide (z.B. aus DNA oder Phospholipiden) zu den entsprechenden Alkoholen reduziert (siehe 1.3.3). Die für diese Reaktion benötigten Elektronen werden reduziertem Glutathion entzogen, das dabei zur GSSG-Form oxidiert wird (Ketterer & Meyer, 1989).

Eine weitere Funktion der GSTs besteht im intrazellulären Transport einer Reihe von hydrophoben Liganden (Hormone, endogene Metabolite, exogene Moleküle). Die Substanzen

werden gebunden, aber nicht metabolisiert, was zu einer Hemmung der enzymatischen Aktivität der Glutathiontransferase führt (Boyer & Vessey, 1987). Durch die Bindung an die GST werden die sonst nur fettlöslichen Chemikalien in Lösung gebracht und somit ihre metabolische Umsetzung bzw. ihr Abbau ermöglicht (Abramovitz et. al., 1988).

1.4.2. Struktur und Klassifikation

Es wird vermutet, dass die Glutathiontransferasen von einem thioredoxinähnlichen Vorläuferenzym abstammen, das sich unter Einfluss des aeroben Metabolismus und des damit verbundenen oxidativen Stresses in den Zellen entwickelte (Martin, 1995). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Glutathiontransferasen deutliche Strukturübereinstimmungen mit ubiquitär in vielen Stämmen des Pflanzen- und Tierreichs und der Mikroorganismen vorkommenden Enzymen aufweisen, die in der Bekämpfung von Schäden durch oxidativen Stress involviert sind.

GSTs bilden keine homogene Enzymfamilie, wie man bereits an den vielen verschiedenen von ihnen katalysierten Reaktionstypen ablesen kann (siehe 1.4.1). Die GST-Superfamilie ist in mehrere Klassen eingeteilt worden (siehe Tabelle 1.1), die sich durch ihre primäre Aminosäuresequenz, die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine, die Lokalisation in spezifischen Geweben, den isoelektrischen Punkt und das umgesetzte Substratmuster voneinander unterscheiden.

Es sind 13 verschiedenen GST-Klassen beschrieben worden: speziesübergreifend sind die Klassen Alpha, Mu, Pi, Theta, Omega, Sigma, Kappa und Zeta bekannt (Sheehan et. al., 2001). Ausschliesslich in Bakterien kommt die Beta-Klasse vor (Vuilleumier et. al., 1997), in Invertebraten wurde die Delta-Klasse nachgewiesen (Zhou & Syvanen, 1997) und in Pflanzen wurde die Phi- und die Tau-Klasse beschrieben (Edwards et. al., 2000).

All diese GST-Klassen liegen löslich im Cytosol vor. Eine Ausnahme bildet die Kappa-Klasse, die in den Mitochondrien lokalisiert ist, aber trotzdem zu den löslichen GSTs gezählt wird (Pemble et. al., 1996). Neben diesen löslichen GSTs gibt es noch die Klasse der MAPEG (Membran-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism), die in den Mikrosomen gebunden sind und bei der Lipidperoxidation in der Membran eine zentrale Aufgabe übernehmen (Jakobsson et. al., 1999).

Klasse	Vorkommen	Charakteristika
Alpha	Mammalia	N-terminales Tyrosin interagiert mit GSH, in Ratten und Menschen sind verschiedene Allele bekannt (Polymorphismus), Ausbildung von Isoenzymen, Peroxidase-Aktivität, bei Ratten in Ovar und Testis auch Steroid-Isomerase-Aktivität.
MU	Helminthen, Mammalia	In Ratten und Menschen sind verschiedene Allele bekannt (Polymorphismus), Ausbildung von Isoenzymen, sind involviert im Schutz gegen oxidativen Stress, z.B. GST-M1-Nullallel in 50 % der menschlichen Bevölkerung könnte zu geringerer Resistenz gegen Xenobiotika führen: erhöhtes Krebsrisiko möglich.
Рі	Mammalia	Nur ein humanes Gen (GST-P), inhibiert die Jun N-Kinase, was die Zellen vor H_2O_2 -induziertem Zelltod schützt, Pi-Klasse-ähnliche GST in <i>Ascaris suum</i> .
ТНЕТА	Bakterien, Hefe, Pflanzen, Insekten, Mammalia	N-terminales Tyrosin ist gegen Serin ausgetauscht, keine Bindung an GSH-Sepharose, sehr geringe CDNB-Aktivität (Ausnahme: Broccoli Theta-Klasse GST), homolog zu Delta-Klasse GSTs.
OMEGA	Helminthen, Mammalia	N-terminales Tyrosin ist gegen Cystein (Cys-32) ausgetauscht, prolinreiche 19-20 AS-Verlängerung am N-Terminus formt mit dem C-Terminus eine spez. Domäne, hohe Thioltransferase-Aktivität.
SIGMA	Helminthen, Mammalia	 > 40 % Aminosäuresequenz-Identität zum S-Crystallin der Cephalopoden (Hauptbestandteil der Augenlinse), Strukturverwandtschaft zu Prostaglandin-Isomerasen bzw. – Synthetasen zeigt Verbindung zur Prostaglandinsynthese.
Карра	Mammalia	Nur ein Gen pro Organismus. In Mitochondrien.
ZETA	Weit verbreitet von Pflanzen bis Mammalia	Hoch konserviert, humane Zeta- Klasse GST hat geringe Enzymaktivität mit CDNB, geringe Peroxidase-Aktivität, detoxifiziert Dichloressigsäure (DCA), N-terminales Tyrosin ist gegen Serin ausgetauscht, Serin-14 interagiert mit GSH.
BETA	Bakterien spez.	Aus Theta-Klasse entstanden, bindet Antibiotika, N-terminales Tyrosin ist gegen Cystein ausgetauscht.
Рні	Pflanzen spez.	Auch Typ I-GST, Gen enthält meist 3 Exons, detoxifiziert Herbizide.
TAU	Pflanzen spez.	Auch Typ III-GST, Gen enthält meist 2 Exons, Auxin-induzierbar.
DELTA	Insekten spez.	Coding-Region ohne Introns, keine C-terminale Helix, vermutlich gleiches Ausgangsgen wie Theta-Klasse (Homologe).
MAPEG	Mikrosomale Membranen	Einzige membrangebundene GST-Klasse.

 Tabelle 1.1 Klassifizierung der Glutathiontransferasen (Zusammenfassung nach Sheehan (2001)).

Glutathiontransferasen sind aus zwei Untereinheiten aufgebaute Enzyme. Innerhalb einer GST-Klasse gibt es allele Gene, die verschiedene Untereinheiten (Monomer) codieren. Es können sich nur Untereinheiten aus einer GST-Klasse zu Homo- bzw. Heterodimeren verbinden (Hayes & Pulford, 1995). Untereinheiten verschiedener GST-Klassen verbinden sich nicht miteinander zu einer funktionellen Enzymeinheit. Dieses System ermöglicht die Bildung von vielen verschiedenen Enzymen aus einer kleinen Anzahl von Genen.

Innerhalb einer Klasse beträgt die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mindestens 60 %, während zwischen zwei GST-Klassen nur etwa 30 % Übereinstimmung besteht. Immunologische Kreuzreaktionen zwischen GST-Klassen sind deshalb selten. Besondere Bedeutung kommt der hochkonservierten Primärstruktur des N-Terminus zu, die einen wichtigen Teil des aktiven Zentrums der GST codiert. Der Teil des aktiven Zentrums, der für die Bindung des Glutathions wichtig ist, wird als "g-site" bezeichnet. Diese Region enthält ein für die Bindung mit der Thiolgruppe des Glutathions essentielles Tyrosin (viele GST-Klassen), das bei manchen Klassen jedoch durch ein Serin (Theta- und Zeta-Klasse GSTs) oder durch ein Cystein (Omega- und Beta-Klasse GSTs) ausgetauscht ist (siehe Tabelle 1.1).

1.4.3. Glutathion S-Transferasen in Nematoden

Im Gegensatz zu Glutathion S-Transferasen aus Vertebraten (Maus, Ratte, Mensch etc.) ist relativ wenig über GSTs in Nematoden bekannt. Die meisten Studien wurden an parasitischen Nematoden wie z.B. *Ascaris suum* (Liebau et. al., 1997), *Ascarida galli* (Meyer et. al., 1996), *Brugia* spec. (Rao et.al., 2000), *Heligmosomoides polygyrus* (Brophy et. al., 1995a), *Onchocerca volvulus* (Liebau et. al., 2000; Wildenburg et. al., 1998), *Trichinella spiralis* (Rojas et. al., 1997) oder *Necator americanus* (Brophy et. al., 1995b) durchgeführt. Die Gene der *As*-GST-1 aus *A. suum* und der *Ov*-GST-1, *Ov*-GST-2 und *Ov*-GST-3 aus *O. volvulus* wurden vollständig sequenziert, die Sequenz der GST aus *A. galli* ist teilweise bekannt. Viele der anderen Studien wurden auf dem Proteinlevel durchgeführt, wobei z.B. durch Immunhistochemie die Kreuzreaktionen zwischen den unbekannten GSTs und dem Immunserum gegen eine bekannte Parasiten-GST genutzt wurde, um die unbekannte GST zu lokalisieren (Rao et. al., 2000).

Besonders intensiv wurden die drei verschiedenen GSTs aus Onchocerca volvulus untersucht. Die Ov-GST-1 wird durch zwei Gene (Ov-GST-1a und Ov-GST-1b) codiert und die resultierenden Proteine unterscheiden sich in nur 10 Aminosäuren voneinander (Sommer et. al., 2001). Die Glutathion S-Transferasen werden aufgrund von Sequenzhomologien in die Sigma-GST-Klasse eingeordnet Die Ov-GST-1 ist bis jetzt die einzige GST, die ein Signalpeptid beinhaltet, das im Verlaufe der Proteinprozessierung abgespalten wird (Krause et. al., 2001). Dieses Signalpeptid ist für die Sekretion der GST wichtig, die als extrazellulär aktives Glykoprotein nachgewiesen werden konnte (Liebau et. al., 1994). Die Ov-GST-2 ist ein intrazellulär vorliegendes cytosolisches Protein, das in die Klasse der Pi-GSTs eingeordnet wurde (Liebau et. al., 1996). Aufgrund ihrer ubiquitären Lokalisation im Parasiten wird ihr eine Rolle als "housekeeping"-Enzym zugesprochen, während Ov-GST-1 mehr in dem kutikulären zum Wirt hin exponierten Gewebe aktiv ist (Wildenburg et. al., 1998). Bei der dritten *Ov*-GST handelt es sich ebenfalls um ein intrazelluläres Protein, dass aufgrund der Aminosäuresequenzhomologie zu der Omega-Klasse der Glutathion S-Transferasen gezählt wird. Die *Ov*-GST-3 weist nur 14 bzw 21 %-Sequenzhomologie zu den anderen GSTs aus *O. volvulus* auf, und es konnte eindeutig eine durch oxidativen Stress induzierte differentielle Expremierung nachgewiesen werden (Liebau et. al., 2000).

GSTs repräsentieren in Helminthen - und in parasitischen Nematoden im speziellen - den Hauptteil der Phase-II-Detoxifikationsenzyme. Während bestimmte Gruppen der Phase-I-Enzyme fehlen, helfen sie dem Parasiten, sich gegen Angriffe des Wirt-Immunsystems zu schützen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Eosinophile des Wirtes verschiedene reaktive Sauerstoffspezies in unmittelbarer Nähe zum Parasiten freisetzen, und dass der Parasit Schutzsysteme gegen diesen oxidativen Stress besitzt (Maizles et. al., 1993; Rosen et. al., 1995). Es wird vermutet, dass die *Ov*-GST-3, die durch oxidativen Stress induziert wird, auch beim Schutz des Parasiten *O. volvulus* gegen die Attacken des Wirtsimmunsystems eine Rolle spielt (Kampkötter, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund werden GSTs als wichtige Ziele für die Entwicklung von Medikamenten zur Chemotherapie von Parasitosen des Menschen und der Tiere angesehen. Durch eine Blockierung der Proteinfunktion könnte die Abwehr des Parasiten gegen das Wirtsimmunsystem herabgesetzt werden, wodurch eine effizientere Bekämpfung des Parasiten durch den Wirt möglich wäre.

Der Modellorganismus *C. elegans* spielt bei der detaillierten Untersuchung von GSTs aus parasitischen Nematoden mehr und mehr eine zentrale Rolle. Viele parasitische Nematoden können nicht unter Laborbedingungen gehalten und vermehrt werden, was zu einer starken Limitierung des verwendbaren Untersuchungsmaterials führt. Aus diesem Grunde ist die Transgenexpression der parasitären Proteine in einem vergleichbaren Modellorganismus ein wichtiger Schritt, um ausreichende Aussagen über eine parasitäre GST machen zu können. *C. elegans* bietet aufgrund seiner phylogenetischen Ähnlichkeit zu den parasitischen Nematoden eine nahezu identische Zellumgebung, die bei der Expression und Analyse von parasitischen GSTs in *C. elegans* von grosser Bedeutung ist. So gelang bereits die Überexpression der *Ov*-GST-1 in transgenen *C. elegans*, und zusätzlich konnte die Promotoraktivität dieser GST in *C. elegans* analysiert werden (Krause et. al., 2001).

Desweiteren machen die vollständige Sequenzierung des *C. elegans*-Genoms und eine weit fortgeschrittene theoretische Entschlüsselung des Proteoms es zum ersten Mal möglich, die Gesamtheit der GST-Superfamilie in einem Metazoen zu betrachten (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Eine Computeranalyse des *C. elegans*-Genoms führte zur Erkennung von

57 Genen, die aufgrund der hergeleiteten Aminosäuresequenzhomologie jeweils mit grosser Wahrscheinlichkeit für eine GST codieren (Henkle-Dührsen, unveröffentlichte Daten). Durch Computeranalysen des theoretischen *C. elegans*-Proteoms wurden parallel mehr als 30 Proteine gefunden, die zum Teil aufgrund ihrer Aminosäuresequenzhomologie in die bekannten GST-Klassen Alpha, Mu, Sigma, Omega und Theta eingeordnet werden konnten (Campbell et. al., 2001). Ein grosser Teil der putativen *C. elegans*-GSTs weist jedoch weniger als 30 %-Übereinstimmung mit diesen Klassen auf, so dass vermutet wird, dass eine nematodenspezifische GST-Klasse – die vielleicht auch in anderen niederen Invertebraten auftritt – existiert (Campbell et. al., 2001). Die Analyse der Glutathion S-Transferasen in *C. elegans* soll helfen die Struktur, Lokalisation und Funktion der einzelnen Proteine in Nematoden besser zu verstehen und wichtige Grundlagen für ähnliche Organismen zu schaffen, die aufgrund ihrer Lebensweise nicht so detailliert untersucht werden können.

1.5. Zielsetzung

Aerob lebende Organismen kommen ständig mit reaktiven Sauerstoffspezies und zellulären Oxidationsprodukten in Kontakt und sind deshalb auf ein effektives enzymatisches Schutzsystem gegen oxidativen Stress angewiesen. Enzyme wie die Glutathion S-Transferasen stellen einen wichtigen Bestandteil der Phase-II-Detoxifikationsenzyme dar, welche die Reaktion von reaktiven Oxidationsprodukten mit Glutathion katalysieren und dadurch zur Entgiftung der Moleküle beitragen.

Im Nematoden *C. elegans* wurden zwei Glutathion S-Transferasen beschrieben, die durch oxidativen Stress induziert werden bzw. die eine grosse Ähnlichkeit zu stressinduzierbaren Genen aufweisen (Kodym et. al., 1999; Tawe et. al., 1998). Diese Enzyme wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit strukturell auf dem Gen- und Proteinlevel analysiert und die biochemischen Eigenschaften untersucht, um die Enzyme in das bestehende Klassensystem der GSTs eingliedern zu können.

Da es sich bei den untersuchten Molekülen um Proteine handelt, die durch oxidativen Stress induziert werden, lag der besondere Schwerpunkt auf der Aufdeckung einer Korrelation zwischen dem Expressionslevel der GSTs und der Stresstoleranz bzw. der Lebensspanne der Nematoden. Es war von grossem Interesse, ob diese Phase-II-Detoxifikationsenzyme die Toleranz von *C. elegans* gegenüber oxidativen Schädigungen beeinflussen würden. Dazu wurde der Expressionslevel der Glutathiontransferasen durch die Herstellung von transgenen *C. elegans*-Stämmen - welche jeweils eine GST überexpremieren - und durch den Einsatz von RNA-interference und genetischen Mutationen moduliert, und die Stresstoleranz der Nematoden detektiert und verglichen.

Die Regulation der Genexpression unter Einfluss vom oxidativem Stress wurde anhand von Aktivitätsstudien unterschiedlich langer GST-Promotorfragmente sowohl im Säugerzellsystem als auch im homologen *C. elegans*-System untersucht. Desweiteren sollte das von den nativ aufgereinigten rekombinanten GSTs umgesetzte Substratmuster eine genauere Einordnung in eine GST-Klasse ermöglichen.

Die Arbeit soll zu einem besseren Verständnis der Abwehr des oxidativen Stresses in freilebenden Nematoden beitragen und neue Einblicke in die beteiligten molekular und biochemischen Prozesse liefern.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Caenorhabditis elegans-Stämme

Folgende C. elegans-Stämme wurden in dieser Arbeit verwendet:

Name	Beschreibung
C. elegans N2 (var. Bristol) Wildtyp	Caenorhabditis Genetics Center (University of
	Minnesota)
CL2070	dvIs70 [pCL25 (<i>hsp-16</i> /GFP) + pRF4 roller], 9 x
	ausgekreuzt, (Link et. al., 1999)
CL2166	dvIs19 [pAF15 (gst(727bp)::GFP-NLS), kein Marker],
	6x ausgekreuzt, (Link & Johnson, 2002)
CL3166	dvIs20 [pAF15 (gst(727bp)::GFP-NLS), kein Marker],
	(Link & Johnson, 2002)
CH1035	rol-6 (su1006), Roller-Phänotyp, (Cox et.al., 1981)
BL1	gst(1000bp)::GST-p24::GFP, Roller, nichtintegriert
BL2	gst(1000bp)::GST-p29::GFP, Roller, nichtintegriert
K08F4.7-Deletionsmutante	ein Ce-GST-p24-Allel mutiert, hergestellt für diese
	Arbeit im Rahmen des C. elegans Gene Knockout
	Projects am OMRF (Oklahoma City)

2.1.2. Bakterienstämme

Es wurden die folgenden *Escherichia coli*-Stämme für Klonierungs-und Expressionsstudien und RNA-interference durch Bakterienverfütterung verwendet:

DH5a	F, endA1, hsdR17, (r_k, m_k^+) , supE44, thi-1, λ , recA1, gryA96, relA1,
	Δ (argF- laczya)U196, Φ 80dlacZ Δ M15 (Hanahan, 1993)
BL21 (DE3):	F , ompT, hsdS _B , (r_B , m_B), gal dcm (DE3) pLyseE / pLysS (cam ^R) (Novagen,
	Merck KGaA, Darmstadt)
HT115:	F, mcrAa, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14::Tn10 (DE3 lysogen: lacUV5
	promotor-T7 polymerase) (IPTG-ind. T7 polymerase) (RNAse III-) (tet ^R);
	(Timmons et. al., 2001)

2.1.3. Vektoren

Vektorname	Funktion und Besonderheiten	Herkunft/Firma
pGEM Teasy	Klonierungsvektor, Ampicillin-	Promega (Mannheim)
	resistenz, T3- und T7-Promotor,	
	3,0 kb groß	
pPD95.77	Ampicillinresistenz, 4,5 kb groß	1995 Fire laboratory vector kit
pPD129.36	Zwei T7-Promotoren flankieren	1999 Fire laboratory vector kit
	die MCS, zur Transkription von	
	dsRNA in <i>E. coli</i> HT115,	
	Ampicillinresistenz, 2,8 kb groß	
pJC40	10 His-tag, Ampicillinresistenz,	(Clos & Brandau, 1994)
	2,4 kb groß	

Zur Klonierung wurden folgende Vektoren verwendet:

2.1.4. Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden bei der Firma Gibco BRL (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) bestellt und synthetisiert:

Name	Sequenz
5'PM-47 (Ce-GST-p24 Promoter)	ccc <u>ctcgagg</u> ctggtttaacaatatctcg Xho I
3'PM-47 (Ce-GST-p24 Promoter)	tgc <u>aagett</u> aattagaattcagtaattgaatcg Hind III
5'CecGSTP (GST-p24 Protein)	ggcatatgccaaactataagctattg Nde I
3'CecGSTP (GST-p24 Protein)	ggggatccttaaacaatactatcctttcttgttgcc Bam H I
5'Cecp29P (GST-p29 Protein)	ggaagettatggttttaaccgcactaac Hind III
3'Cecp29P (GST-p29 Protein)	gg <u>ggatcc</u> tcaaaggcccaaatcataattc Bam H I
5´CeGST (gDNA p24)	ggggtaccatgccaaactataagctattg Kpn I
3'CeGST (gDNA p24)	ggcgtacgcacataataataattattacgctc Spl I
5´gCeGST2 (Mikroinjektion)	ggcgtacgatgccaaactataagctattg Spl I
3´gCeGST2	ggggatccccacataataataattattacgctc Bam H I
3´gCeGST2a	ggggateeaacaatactateetttettgttgee Bam H I
5´gp <i>Ce</i> GST	gg <u>gtcgac</u> ttattgtgatccgacttttatagc Sal I
5'Cegp29M (Mikroinjektion)	ggtctagaatggttttaaccggtgtaac Xba I
3´Cegp29M1	gg <u>gcggccgc</u> aataaatcaaaggcccaaatcat Not I
3´Cegp29M1a	gggcggccgcaaggcccaaatcataattc Not I

5´pCegp29M	gggtcgacctgtttaaaaaaacagtgagcc Sal I
3´pCegp29M2	ggggatccaataaatcaaaggcccaaatca BamH I
3´pCegp29M2a	ggggatccaaggcccaaatcataattc Bam H I
5´cCe-GST-p24 RNAi	gg <u>tctaga</u> atgccaaactataagctattg Xba I
3´cCe-GST-p24 RNAi	gg <u>gtcgac</u> ttaaacaatactatcctttcttgttgcc Sal I
3´Cecp29 RNAi	gg <u>ctcgag</u> tcaaaggcccaaatcataattc Xho I
5´GFP-Primer	gggaactacaagacacgtgc
3'GFP-Primer	acctgcagatccttatttgtatagttcatcc

2.1.5. Molekulargewichtsstandards

DNA:	100 bp DNA-Leiter und 1,0 kb DNA-Leiter (Gibco BRL)
RNA:	RNA-Marker 0,28-6,58 kb (Promega)
Proteine:	10 kDa Protein-Leiter (Gibco BRL)

2.1.6. Enzyme

Restriktionsendonukleasen, *Taq*-Polymerase, Reverse Transkriptase, DNAse, RNAse, T4-DNA-Ligase, Proteinase K, Lysozym, Glutathione S-transferase aus Pferde-Leber, Glutathion-Reduktase und alkalische Phosphatase wurden bei folgenden Firmen bestellt: Gibco BRL (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Fluka (Neu-Ulm) und Promega (Mannheim).

2.1.7. Eukaryontische Zelllinie

Es wurde folgende Zelllinie im Labor kultiviert und für Promotorstudien verwendet:

- CHO-Zellen: Zelllinie aus dem Ovar des Chinesischen Hamsters (*Crisetulus griseus*) (ATCC: CRL-9606).
- COS-7-Zellen: modifizierte Zelllinie aus der Niere der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) (ATCC: CRL-1651).

2.1.8. Kits

DNA Midi Prep Kit (Qiagen, Hilden), DNA Mini Prep Kit (Machery & Nagel, Düren), QIAEX Gelextraktions Kit (Qiagen), RNeasy Mini Kit (Qiagen), Random Primed Labeling Kit (Boehringer, Mannheim).

Name	Zusammensetzung
Luria-Broth-Medium (LB-Medium):	1,0 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl.
LB-Agar:	LB-Medium mit 1,5 % Bactoagar.
OP50-Minimalmedium:	10 ml M9-Puffer mit 0,1 ml 2 M NH ₄ Cl, 0,1 ml 20 % D-Glukose und 0,02 ml Uracil (2 mg/ml).
NGM-Medium:	3 g NaCl, 2,5 g Soja-Pepton, ad 1000 ml aqua demin., autoklavieren; nach dem Abkühlen Zugabe von 1,3 mM Cholesterin (Lsg. A), 1 mM CaCl ₂ (Lsg. B), 0,5 mM MgCl ₂ (Lsg. C), 0,8 mM KH ₂ PO ₄ und 0,16 mM K ₂ HPO ₄ (Lsg. D).
NGM-Agar:	NGM-Medium mit 2,5 % Bactoagar (Brenner, 1974).
Peptonangereicherter NGM-Agar:	Wie NGM-Agar, aber mit der 8-fachen Soja-Pepton- konzentration (20 g auf 1000 ml).
RPMI-1640-Medium "ready":	RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco BRL) mit 25 mM HEPES pH 7,4, 0,05 mg/ml Gentamycin und 10 % FCS.

2.1.9. Medien

2.1.10.	Stammlösungen	
---------	---------------	--

Name	Zusammensetzung
C. elegans-Kultur:	
M9-Puffer:	6 g Na ₂ HPO ₄ , 3 g KH ₂ PO ₄ , 5 g NaCl, 0,25 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O, ad 1000 ml aqua demin.
Lsg. A:	5 mg/ml Cholesterin in 96 % Ethanol.
Lsg. B :	1 M CaCl ₂
Lsg. C:	1 M MgSO ₄
Lsg. D:	1 M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 6,0
Agarose-Gelelektrophorese:	
50 x TAE:	242 g Trisbase, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 EDTA (pH 8,0), ad 1000 ml mit aqua demin., 1000 ml 1 v TAE mit 100 vil 5 mg/ml Ethidiumhramid
	1000 mi i x i AE mit 100 µl 5 mg/ml Ethidiumbromid

	versetzen.
DNA-Gelauftragspuffer:	50 % Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 % Xylencyanol in 1 x TAE.
<u>RNA</u> :	
RNA-Gelauftragspuffer:	900 µl deionisiertes Formamid, 100 µl 10 x MOPS, 161 µl 37 % Formaldehyd, 20 µl 1 % Bromphenol- blau, 20 µl 1 % Xylene Cyanol FF, 10 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid, Lagerung lichtgeschützt bei 4°C.
10 x MOPS:	0,2 M 3-(N-Morpholino)propane-sulfonic acid (MOPS), 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, in aqua demin., pH 7,0 einstellen.
Prähybridisierungslösung:	50 % deionisiertes Formamid, 3,3 x SSC, 0,1 % SDS, 2 x Denhardt`s Reagenz (s.u.), 0,1 mg/ml denaturierte Herings-Sperma-DNA, ad 100 ml aqua demin.
20 x SSC:	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat in aqua demin., pH 7,4 einstellen.
<u>SDS-PAGE</u> :	
5x SDS-Laufpuffer:	15,5 g Tris-HCl, 94,0 g Glycin, 50 ml 10 % SDS, ad 1000 ml aqua demin.
Trenngellösung:	380 mM Tris-HCl pH 8,8, 12 % Acryl- amid/Bisacrylamid (29:1) (30% Lösung, Sigma), 0,1 % SDS, 0,1 % TEMED (N,N,N`,N`-Tetramethyl- ethylendiamin), 0,1 % APS (Ammoniumperoxo- disulfat).
Sammelgellösung:	124 mM Tris-HCl pH 6,8, 3 % Acrylamid / Bisacrylamid (29:1) (30 % Lösung, Sigma), 0,1 % SDS, 0,1% TEMED, 0,1 % APS.
2 x SDS-Probenpuffer:	100 mM Tris HCl pH 6,8, 2 % SDS, 0,1 % Brom- phenolblau, 10 % Glycerin, 100 mM Dithiotreithol (DDT, als 1 M Stock-Lösung) kurz vor Gebrauch zugeben.
Coomassie-Färbelösung:	0,1 % Coomassie Brilliant Blue, 10 % Essigsäure, 20 % Ethanol.
Entfärbelösung:	10 % Essigsäure, 20 % Ethanol.
Western Blot:	
10 % SDS (w/v):	100 g Sodiumdodecylsulfat ad 1000 ml aqua demin. (Im Abzug arbeiten!).
Anodenpuffer:	200 mM Trisbase pH 10,4, 20 % Methanol.
Kathodenpuffer:	40 mM ε-Aminocapronsäure, 25 mM Trisbase pH 9,4, 20 % Methanol.
100 x Denhardt's Reagenz:	2 x SSC, 2 % Ficoll (w/v), 2 % Polyvinylpyrolidon (w/v), 2 % BSA (Bovin Serum Albumin), in aqua demin., sterilfiltrieren.

10 x Ponceau Rot S:	2 % Ponceau Rot S (Sigma), 30 % Sulfosalicylsäure, 30 % Trichloressigsäure, in aqua demin.
Antikörperblockierlösung:	3 % BSA in Antikörperwaschlösung.
Antikörperwaschlösung:	1 x PBS, 0,05 % Tween 20.
Maleinsäurepuffer:	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl in aqua demin., pH 7,5 einstellen.
Maleinsäurewaschpuffer:	0,3 % Tween 20 in Maleinsäurepuffer.
Detektionspuffer:	0,1 M TrisHCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5 einstellen.
Polylysin-Lösung:	200 ml aqua demin. (60°C), 400 mg Gelatine darin lösen und auf 40°C abkühlen, 40 mg $CrK(SO)_2 \times 12$ H ₂ O hinzufügen, 1 mg Polylysin (Sigma) auf 1 ml Lösung; Lösung für 12 h bei 4°C ruhen lassen.
Mowiol-Lösung:	5 g Elvanol (Höchst) in 20 ml 1 x PBS, pH 7,4 lösen, 16 h rühren, 10 mg Glycerin hinzufügen, 16 h rühren, 15 min bei 12.000 rpm zentrifugieren, Überstand abnehmen, 1 Spatelspitze DABCO (1,4-Diaza- bicyclo[2,2,2]octan) auf 1 ml Lösung.
10 x PBS:	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 15 mM KH ₂ PO ₄ , 65 mM Na ₂ HPO ₄ , in aqua demin., pH 7,1 einstellen.
STET-Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 % Sucrose, 50 mM EDTA, 5 % Triton X-100.
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, in aqua demin., pH 7,5 einstellen.

2.1.11. Antiseren und Antikörper

Antiseren:

- Antiserum der 4. Blutung von einem Kaninchen, das mit aufgereinigter, rekombinanter *Ce*-GST-p24 immunisiert wurde. Bei jeder Injektion wurden 100 ng Protein gespritzt.
- Antiserum der 2. Blutung von einem Kaninchen, das mit aufgereinigter, rekombinanter Katalase aus *C. elegans* immunisiert wurde.

Antikörper:

- Anti-GFP-IgG, monoklonal (Chemicon, Hofheim).
- Ziege-anti-Kaninchen-IgG, ganzes Molekül, mit gekoppelter alkalischer Phosphatase (Sigma).
- Ziege-anti-Maus-IgG, ganzes Molekül, mit gekoppelter alkalischer Phosphatase (Sigma).
- Ziege-anti-Kaninchen-IgG, ganzes Molekül, mit gekoppeltem TRITC-Konjugat (Sigma).
- Anti-DIG-IgG (Roche).

2.1.12. Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Chemikalien in p.A.-Qualität bei den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deissenhofen) bezogen. Wenn möglich, wurden die Lösungen 20 min bei 120°C sterilisiert. Lösungen, die nicht auf diese Weise sterilisiert werden konnten, wurden durch einen 0,2 µm Membranfilter (Satorius) sterilfiltriert.

2.1.13. Software

- Windows 95/98, Word 97/2000, Excel 97/2000, Power Point 97/2000
- Reference Manager 9.0
- Adope Photoshop 6.0, Corel Draw 8.0
- Clone Manager 4.0 (Scientific and Educational Software)
- Statistica
- Internet-Programme (Blast, Multialignment, Internet Explorer etc.).

2.2. Methoden

2.2.1. C. elegans-Kultur

Die C. elegans wurden in 5 cm- bzw. 9 cm-Petrischalen auf NGM-Agar bei 18-20°C gezüchtet. Als Futter dienten Escherichia coli OP50-Bakterien, welche in Minimalmedium-Flüssigkultur vorgezogen wurden. Die Bakterienkultur wurde auf ungefähr der Hälfe des NGM-Agars aufgetragen, und die Platten wurden anschliessend mit leicht geöffneten Deckel unter der Sterilbank getrocknet, damit die überschüssige Flüssigkeit verdunsten konnte. Anschliessend konnten die C. elegans auf die Platten aufgebracht werden. Wurden grosse Mengen Wurmmaterial benötigt, wurde die Ausbeute durch Haltung der Nematoden in bis zu 2 1 Flüssigmedium (NGM-Flüssigmedium mit OP50) oder auf Pepton-angereicherten NGM-Agarplatten gesteigert. Zur Trennung der Nematoden von den Bakterien wurden die Tiere mit kaltem 1 x PBS von den Platten gewaschen, in Falcon-Röhrchen oder kleineren Eppendorf-Gefäßen gesammelt und durch 5 minütige Zentrifugation (1000 x g, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mindestens dreimal mit kaltem 1 x PBS gewaschen, bis der Überstand keine sichtbaren Verunreinigungen mit Bakterien mehr aufwies. Während einer halbstündigen Inkubation in M9-Puffer konnten die Nematoden die noch im Darm verbliebenen Bakterien verdauen. Die Flüssigkeit wurde möglichst vollständig über den Nematoden abgezogen und das Feuchtgewicht des Pellets bestimmt. Je nach Aufarbeitungsmethode wurde das Wurmmaterial direkt frisch verwendet oder bei -20°C (Proteine, DNA) bzw. bei -70°C (RNA) gelagert.

2.2.2. Eukaryontische Zellkultur

CHO- und COS-Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im sterilen Wärmeschrank in Zellkulturflaschen (Greiner) in 12 ml RPMI 1640-Medium "ready" kultiviert. Sobald die Zellen Koherenz erreichten, wurde das Nährmedium samt freischwimmender, meist toter Zellen abgesaugt und die adherenten Zellen am Grund der Flasche mit sterilem 1 x PBS gewaschen. Die angehefteten Zellen wurden während einer 5 minütigen Inkubation mit 5 ml Trypsin-EDTA (5 ml 1 x PBS plus 100 μ l Trypsin-EDTA) bei 37°C vom Flaschenboden abgelöst. Nach dreimaligem Waschen in sterilem 1 x PBS wurden die Zellen in RPMI-Medium "ready" aufgenommen und die Zellzahl pro Milliliter mittels einer Neubauer-Kammer bestimmt. Zur Fortführung der Kultur wurden 2 x 10⁵ Zellen in 12 ml RPMI- Medium "ready" in einer grossen Zellkulturflasche angeimpft. Für Transfektionsexperimente wurden 5 x 10^4 Zellen pro well in 600 µl RPMI-Medium "ready" in 24-well-Platten überführt.

2.2.3. DNA-Präparation

2.2.3.1. Genomische DNA aus C. elegans

Eine *C. elegans*-Kultur (von mindestens 6 vollbewachsenen 9 cm-NGM-Agarplatten) wurden in kaltem M9-Puffer oder 1 x PBS gewaschen und von Bakterien befreit. Das Nematoden-Pellet wurde mit dem doppelten Volumen Lysis-Puffer (1,5 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5, 280 μ l 5 M NaCl, 1 ml 0,5 M EDTA, 1 ml 10 % SDS, ad 10 ml aqua demin.) und 15 μ l Proteinase K (20 mg/ml) versetzt und 1 h bei 65°C inkubiert. Die Nukleinsäuren wurden durch Extraktion mit je 500 μ l reinem Phenol, einer Mischung aus gleiche Teilen Phenol:Chloroform (1:1) und anschliessend reinem Chloroform aufgereinigt und nach einer Salzfällung mit 10 % 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol 96 % Ethanol mit RNase 1 h bei 37°C verdaut. Die Probe wurde nochmals mit 500 μ l Phenol:Chlorophorm (1:1) versetzt, um die RNase abzutrennen, und die extrahierte, gewaschene DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung der genomischen *C. elegans*-DNA erfolgte bei 4°C.

2.2.3.2. Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die im folgenden beschriebene Methode zur Plasmid-DNA-Aufreinigung aus Bakterien macht es möglich, in sehr kurzer Zeit Plasmid-DNA zu erhalten. Nach Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm eines 1,5 ml Aliquots einer *E. coli*-über-Nacht-Kultur wurde das Bakterienpellet in 200 μ l STET-Puffer (mit frisch zugefügtem 0,5 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Nach der Lyse des Pellets wurden die Proben für 30 s in kochendem Wasser erhitzt und 20 min mit 13.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Pellet getrennt und mit 180 μ l –20°C-kaltem Isopropanol versetzt. Das DNA-Pellet, welches sich nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 4°C am Grund des Eppendorfgefäßes absetzte, wurde mit 500 μ l –20°C-kaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die DNA wurde anschliessend in 30 μ l aqua demin. resuspendiert. Wurde sehr reine DNA benötigt, so erfolgte die Präparation mit Hilfe des DNA Mini Prep Kits (Machery und Nagel) nach Angaben des Herstellers.

2.2.3.3. Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von bis zu 200 μ g reiner Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des DNA Midi Prep Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde abschliessend in 50-100 μ l TE-Puffer resuspendiert und bei –20°C gelagert.

2.2.4. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde standardgemäß zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragments eingesetzt. Dazu wurden 20-100µl-Ansätze mit folgender Zusammensetzung verwendet:

10-100 ng Template-DNA (C. elegans gDNA, cDNA oder Plasmid-DNA)

je 1 pM 5'- und 3'-Primer

PCR-Supermix (Gibco BRL, Endkonz.: 18,7 mM Tris-HCl (pH 8,4), 46,75 mM KCl,

1,4 mM MgCl₂, 190 µM dNTPs, 18,7 U *Taq*-Polymerase).

Der Reaktionsansatz wurde mit 2 Tropfen Parafinöl überschichtet, um das Verdunsten der erhitzten Flüssigkeit zu verhindern. Nach einer einmaligen Denaturierung der DNA bei 93°C für 3 min wurden 25–35 Amplifikationszyklen durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus einer 1 minütigen Denaturierung bei 93°C, der eine 1 minütige Phase der Primerbindung an die DNA bei 55-65°C (abhängig von der Struktur und Länge des Primers) folgte, und der mit einer 1-3 minütigen Elongationsphase bei 72°C (abhängig von der Länge des DNA-Fragments) abgeschlossen wurde. Die Reaktion wurde mit einer einmaligen Elongationsphase über 5 min bei 72°C beendet. Zur Überprüfung der Reinheit der eingesetzten Komponenten wurde parallel ein Ansatz ohne Template–DNA angesetzt. Ein Teil der Reaktionsansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die restliche PCR-Probe bei –20°C aufbewahrt.

2.2.5. Ligation

In dieser durch die T4-DNA-Ligase (Gibco BRL) katalysierten Reaktion werden zwei DNA-Fragmente (meistens Plasmid-DNA und Insert-DNA) miteinander verbunden. Dabei weisen der Vektor und das Insert entweder zueinander komplementäre Basen-Überhänge auf (sticky ends) oder sie haben Enden ohne Basenüberhänge (blunt ends), die miteinander verbunden werden. Die Ligation erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers mit einem Insert:Vektor-Verhältnis von 3:1 entweder für 5 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C im Wasserbad. Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der pGEM Teasy-Vektor (Promega) eingesetzt. Er besitzt Thymidin-Überhänge, die mit den Adenin-Überhängen (werden von der *Taq*-Polymerase angehängt) der PCR-Produkte hybridisieren können. Die Durchführung der Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.6. Restriktionsverdau

Nach Herstellerangabe erfolgte die Restriktion der Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen unter Verwendung des entsprechenden Reaktionspuffers während einer Inkubation für ein bis zwei Stunden bei 37°C. Es wurden in der Regel 0,5-5,0 µg DNA pro Reaktion eingesetzt.

2.2.7. Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen von DNA-Molekülen soll die intramolekulare Religationsrate der Molekülenden herabsetzen. Die Reaktion wird durch die alkalische Phosphatase CIAP (Promega) katalysiert und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.8. Transformation

2.2.8.1. Herstellung kompetenter Bakterien

Nach der Methode von Nishimura (1990) wurde eine über-Nacht-Kultur eines Bakterienstamms (DH5 α , Bl21pLysS/pLysE, HT115) 1:100 in 100 ml LB-Medium verdünnt und bis zur OD₆₀₀ = 0,5 herangezogen. Die Kultur wurde 10 min auf Eis aufbewahrt, die Bakterien für 5 min bei 2000 x g bei 4°C zentrifugiert, und das Bakterienpellet in 500 µl 4°C-kaltem TFB I (LB-Medium mit 10 mM MgSO₄, 500 mM CaCl₂ und 0,2 % Glucose) resuspendiert und auf Eis gelagert. Anschliessend wurden dem Ansatz 2,5 ml 4°C-kalter TFB II (LB-Medium mit 36 % Glycerin, 12 % PEG 6000, 12 mM MgSO₄) zugefügt und die Bakteriensuspension in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei –70°C. Die beschriebene Behandlung der Bakterien führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Bakterienmembran für z. B. Plasmid-DNA. Dieser Effekt wird bei der Transformation (2.2.8.2) genutzt.

2.2.8.2. Transformation

Bei der Transformation wird Plasmid-DNA durch die poröse Zellmembran kompetenter Bakterien eingeschleust. Dazu wurde 10 μ l eines Ligationsansatzes 1:5 mit aqua demin. verdünnt und zu 200 μ l auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen hinzugefügt. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C, nach dem die Zellen sofort wieder auf Eis gekühlt wurden. Anschliessend wurden die Bakterien mit 700 μ l LB-Medium für 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Wachstumsphase wurde mit einer 5-minütigen Zentrifugation mit 3000 x g bei Raumtemperatur beendet. Das Bakterienpellet wurde in 200 μ l des Überstands resuspendiert, auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht gelagert.

2.2.9. Agarose-Gelelektrophorese

Unterschiedlich grosse DNA-Fragmente können aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dazu wurden 0,8 - 2,0 %-ige Agarosegele in 1 x TAE-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid gegossen. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 1/10 Volumen DNA-Gelauftragspuffer versetzt. Das Anlegen einer elektrischen Spannung führte dazu, daß die DNA-Moleküle in Richtung der Anode wandern. Gleichzeitig wurden größere DNA-Fragmente durch das Netz der Agarosemoleküle stärker abgebremst als kleinere, so daß eine Auftrennung der DNA-Moleküle nach ihrer Größe erfolgte. Das Ethidiumbromid, welches sich in die DNA-Helix einlagerte, wurde im UV-Licht sichtbar und die DNA-Bandenmuster konnten somit photographiert und analysiert werden.

2.2.10. Transfer von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Der Transfer von DNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Pharmacia) wurde nach einer von Southern (1975) abgeleiteten Methode durchgeführt (Sambrook et. al., 1989). Die im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde zweimal für 10 min mit 0,2 M HCl depuriniert, dreimal für 10 min denaturiert (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl, pH \geq 12 eingestellt) und dreimal für 10 min in Neutralisierungspuffer (1 M TrisHCl pH 7-8, 1,5 M NaCl) geschwenkt. Zwischen den einzelnen Lösungen wurde das Gel kurz in aqua demin. gewaschen. Anschliessend erfolgte der Kapillartransfer der DNA auf die Nylonmembran über Whatman- und Saugpapier mit 20 x SSC als mobile Phase. Die DNA wurde durch einminütiges "UV-Crosslinking" (UV-Crosslinker 2400, Stratagen) und gegebenenfalls durch eine 30-minütige Inkubation bei 80°C auf der Membran fixiert.

2.2.11. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Zur Isolierung ausgewählter DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde das QIAEX II Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. So konnten bis zu 2 μ g reine DNA nach der gelelektrophoretischen Auftrennung gewonnen werden.

2.2.12. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von reiner Plasmid-DNA wurde am BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum) der Universität Düsseldorf maschinell (ABI, Applied Biosystems) nach der nichtradioaktiven Didesoxy-Ketten-Reaktion (Sanger et al, 1977) durchgeführt.

2.2.13. Markierung von DNA-Sonden

2.2.13.1. Radioaktive PCR

Abweichend von der in 2.2.4 beschriebenen Methode wurde der Reaktionsansatz der radioaktiven PCR aus Einzelkomponenten zusammengesetzt. In einem Reaktionsvolumen von 50 µl wurden 1-100 ng Template-DNA, je 1 µM 5'-und 3'-Primer, 1 x PCR-Puffer (passend zur verwendeten Taq-Polymerase), 200 µM dNTP-Mix, 0,6 mM MgCl₂ und 2,5 U Taq-Polymerase eingesetzt. Der verwendete dNTP-Mix enthielt das Nukleotid, welches später als radioaktive Komponente zugefügt wird, in 1 mM Konzentration; die übrigen drei Nukleotide lagen in einer Konzentration von 2 mM vor. Zum Reaktionsansatz wurden abschliessend 5 µl des radioaktiven Nukleotids hinzugefügt und die Reaktion durchgeführt. Primer und nicht-eingebaute Nukleotide wurden über eine Sephadex-G50-Säule abgetrennt. Aufgrund ihres grösseren Molekulargewichts und Durchmessers lagert sich die radioaktiv markierte DNA-Sonde nicht in die Zwischenräume der Sephadex-Matrix und verläßt die Säule schneller als die nichteingebauten Nukleotide. Das Eluat, in welchem sich die Sonde befindet, wurde mit Hilfe eines Geiger-Müller-Zählrohrs ermittelt und in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Der Einbau der radioaktiv markierten Nukleotide wurde durch Szintillationsmessungen überprüft.
2.2.13.2. Random Primed Labeling

Nach Angaben des Herstellers des "Random Primed Labeling Kits" (Boehringer Mannheim) wurden 50-100 ng eines durch PCR gewonnenen DNA-Fragments zunächst durch Hitzeeinwirkung denaturiert. Anschliessend erfolgte das Primerannealing, worauf mit Hilfe der DNA-Polymerase (Klenow-Enzym) eine Verdopplung der DNA erzielt wurde. Dabei wurde der neusynthetisierte Strang mit α^{32} P-dCTP radioaktiv markiert. Die Reinigung der DNA-Sonde und die Überprüfung des Isotopeneinbaus erfolgte wie in 2.2.13.1 beschrieben.

2.2.13.3. DIG High Primed Labeling

Als Alternative zur radioaktiven DNA-Sonden-Markierung wurde ein System zur nichtradioaktiven Markierung der Firma Roche eingesetzt. Dabei wird in einem ersten Schritt an die DNA-Sonde Digoxigenin angehängt, welches in einer zweiten Reaktion mittels eines mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelten anti-DIG-IgG erkannt wird. Die Detektion erfolgte durch Umsetzung mit dem Chemilumineszenzfarbstoff CSPD. Das Signal wird auf einem Photofilm sichtbar gemacht. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.14. Transfektion mammalischer Zellen

CHO- und COS-Zellen wurden parallel mit dem pGL3-Enhancer-Vektor mit oder ohne Promotor des zu untersuchenden Gens und mit dem Referenzplasmid pRL-TK (Promega) mit Hilfe des Trans-FastTM Transfektionsreagenz (Promega) nach Angaben des Herstellers transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen verschiedenen Arten von oxidativem Stress ausgesetzt. Sie wurden in 1 x PBS/0.2 % Glukose/0.3 g/l Glutamine mit 5 mM Paraquat, 5 mM H₂O₂ oder 1 mM Xanthin/1 mU/ml Xanthinoxidase für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Konzentrationen der Induktoren wurden in Vorversuchen ausgewählt: es wurde die Konzentration eines Induktors benutzt, bei der höchstens 10 % der Zellpopulation während der Inkubation abstarben. Kontrollen wurden parallel für eine Stunde in 1 x PBS ohne Stressinduktor gelagert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und anschliessend in Passive Lyses Puffer (Dual LuciferaseTM Assay System Kit, Promega) resuspendiert und lysiert. Die duale Luziferaseaktivität wurde am Luminometer (Luminoscan Ascent, Labsystems) nach Angaben von Promega durchgeführt.

In diesem dualen Luziferasesystem fungiert die Aktivität der *Renilla*-Luziferase als eine interne Kontrolle und die Expression der *Firefly*-Luziferase wird durch den zu

untersuchenden Promotor kontrolliert. Die *Firefly*-Luziferaseaktivität in jeder Probe wurde proportional zu der *Renilla*-Luziferaseaktivität berechnet. Die Aktivität der Luziferasen in den Kontrollzellen (pGL3-Enhancer-Vektor ohne Promotor) in Kontakt mit den verschiedenen Stressoren wurde gleich "eins" definiert, und die Aktivität in den transfizierten Zellen proportional berechnet.

2.2.15. Mikroinjektion

Es sind mehrere Methoden bekannt, mit deren Hilfe es möglich ist, DNA in den Nematoden *C. elegans* zu transfizieren. Die Mikroinjektion ist die für *C. elegans* am häufigsten angewendete Transfektionsmethode (gute Zusammenfassung im Kapitel "DNA-Transformation" von C. Mello und A. Fire im Buch von Epstein & Shakes, 1995). Dabei wird mit Hilfe einer Mikroglasnadel eine DNA-Lösung direkt in die distale Gonade des Wurms eingespritzt. Dieser Bereich des Nematoden-Geschlechtssystems weist einen syncytialen Zellverband auf, in dem die Eizellkerne ohne vollständige Zellmembran vorliegen. Eingespritzte Plasmid-DNA kann direkt in die Zellkerne gelangen und in der fertigen Zelle vom Transkriptionsapparat erkannt und kopiert werden. Aus der Eizelle, die einen solchen Zellkern enthält, entsteht ein transgener Wurm.

Die Transgenplasmide wurde vorher auf folgende Weise hergestellt: Mittels PCR wurde 1000 bp der upstream liegenden Promotorregion plus die gDNA der *Ce*-GST-p24 bzw. der *Ce*-GST-p29 ohne Stopcodon amplifiziert – flankiert von primerspezifischen *Sal* I- und *Bam* HI-Schnittstellen. Das Produkt wurde gerichtet in die spezifische *Sal VBam* HI-Restriktionsschnittstelle im pPD95.77-Vektor (1995 Fire vector kit) ligiert. Die so entstandenen Transgenplasmide (siehe Abb. 3.3 und Abb. 3.21) wurde in *E. coli* DH5α transformiert, vermehrt und mittels einer Midi DNA-Präperation (Qiagen) in reiner Form isoliert. Der pPD95.77-Vektor enthält die modifizierte codierende Region des GFP-Genes, die mit der *Ce*-GST-p24 aufgrund des fehlenden Stopcodons zwischen GST und GFP fusioniert transkribiert wird. Die DNA-Lösung wurde vor der Verwendung mittels Spin-X-Filtern (Corning Costar) von möglichen minimalen Verunreinigungen befreit.

Die Mikroglasnadeln wurden an einem Micropipette-Puller (Model P-67, Flaming/Brown) aus Borosillatglas-Kapillaren (GB120-F10, Science Products GmbH) angefertigt und konnten nach der Herstellung direkt verwendet werden. Eine Lagerung der Nadeln bei Raumtemperatur ist möglich. Die Nadeln wurden am offenen Ende mit 0,8 µl der Plasmid-DNA-Lösung (Mikroinjektionsmix) befüllt, wobei sich die Flüssigkeit alleine über Kapillarkräfte in die Spitze der Nadel hineinzog. Der Mikroinjektionsmix bestand aus einem Plasmidgemisch, das sich aus dem Transgenplasmid und dem Markerplasmid pRF4 (Mello et. al., 1991) zusammensetzte, beide in einer Endkonzentration von 100 ng DNA/µl. Das Markerplasmid pRF4 induziert einen Defekt im *rol*-6 Kollagen-Gen, wodurch es zu einer Verdrehung der Cuticula kommt, die nur eine Bewegung um eine zentrale Achse des Tieres zulässt. Daraus resultiert die rollende Fortbewegung der transgenen Tiere (Roller-Phänotyp). Die beladene Nadel wurde in den Mikroinjektor (Pneumatic Pico Pump PV820-E (World Precision Instruments) gekoppelt mit dem Piezo-Translator PM-10 (Marzhäuser GmbH)) eingespannt und die Durchlässigkeit der Nadel für die DNA-Lösung überprüft, indem der Druck im Inneren der Nadel durch einströmendes Stickstoff-Gas (Qualität 4.0, Messer Griesheim) erhöht wurde.

Die *C. elegans* müssen für die Mikroinjektion für kurze Zeit fixiert werden, um ein exaktes Eindringen der Nadel in die Gonade zu gewährleisten. Zu diesem Zweck wurden Agarosepads angefertigt, auf die die Nematoden kurzzeitig befestigt werden konnten. Zwischen zwei grossen Deckgläschen wurde eine 2 %ige Agarose-Lösung in aqua demin. zum Erkalten gebracht und eines der Deckgläschen entfernt. Die mit der Agaroseschicht überzogenen Deckgläschen wurden für zwei bis drei Stunden bei 37°C getrocknet. Die Agarosepads können über Wochen bei Raumtemperatur in einem staubfreien Gefäss gelagert werden.

Für die Mikroinjektion eignen sich am besten junge adulte Würmer des Wildtyp-Stammes. Diese wurden am Tag vor der Mikroinjektion als L4-Larven auf NGM-Platten gesammelt und waren zum Zeitpunkt der Injektion zu jungen Adulten herangewachsen. Die Tiere wurden in kleinen Gruppen (meist drei Individuen) auf einem vorher durch Anhauchen leicht klebrig gemachten Agarosepad fixiert und mit einem Tropfen Halocarbonöl (Chemie-Mineralien GmbH) benetzt. Das Öl verhindert zum einen das Austrocknen der Nematoden und sorgt trotzdem für eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Tiere. Der Mikroinjektionsvorgang wurde an einem Inversmikroskop (Axiovert 25, Zeiss) kontrolliert und in möglichst kurzer Zeit durchgeführt. Die Tiere wurden anschliessend sofort mit einem Tropfen 1 x PBS-Puffer für 5 min rehydriert, und die lebenden Würmer wurden auf eine frische 5 cm-NGM-Platte mit E. coli OP50 überführt. Dabei wurden höchstens 4 Individuen auf einer Platte gehalten, um die nachfolgende Beobachtung dieser Parentalgeneration zu erleichtern, und um die Anzahl der Tiere in der F1-Generation pro Platte gering zu halten. Die Platten wurden für 3-4 Tage bei 18°C gelagert, bis die F1-Generation zu L4-Larven bzw. jungen Adulten herangewachsen war. Die Individuen der F1-Generation, die den Roller-Phänotyp zeigten, wurden wiederum in Vierergruppen auf frische NGM-Platten umgesetzt. Mit den nachfolgenden Generationen

wurde ebenso verfahren, wobei die Anzahl der Roller pro Generation langsam auf 40-60 % anstieg.

2.2.16. RNA-interference

Mittels PCR wurde die codierende Region von *Ce*-GST-p24 (623 bp) und *Ce*-GST-p29 (753 bp) amplifiziert – flankiert von primerspezifischen *Xba* I und *Sal* I-Schnittstellen -, und die Produkte wurden gerichtet in die spezifische *Xba I/Sal* I-Restriktionsschnittstelle im pPD129.36-Vektor (1999 Fire vector kit) ligiert. Die codierenden Regionen werden im Vektor beidseitig von T7-Bindestellen umgrenzt, so dass eine Transkription in beiden Richtungen möglich ist. Die so entstehenden RNA-Einzelstränge sind zueinander komplementär und hybridisieren zu doppelsträngiger RNA (dsRNA). Die pPD129.36-*Ce*GSTx-Konstrukte wurden zunächst in *E. coli* DH5α transformiert und vermehrt, bevor sie in *E. coli* HT115 (Timmons et. al., 2001) transformiert wurden. Die *E. coli* HT115 sind besonders für die Transkription von grossen Mengen dsRNA geeignet, weil sie RNAse III- negativ sind und die T7-RNA-Polymerase in ihnen expremiert wird.

Der RNAi-Effekt in den *C. elegans* wurde in den Versuchsansätzen über die "Feeding"-Methode erreicht (Timmons et. al., 2001). Dazu wurde eine Einzelkolonie *E. coli* HT115 + RNAi-Plasmid über Nacht im 3 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin und 12,5 μ g/ml Tetrazyklin bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde 1:50 mit demselben Medium verdünnt und bis zu einer OD_{600nm} von 0,4 herangezogen. Die Induktion der dsRNA-Produktion erfolgte durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 0,4 mM. Die Kultur wurde wiederum für 2 h bei 37°C geschüttelt. Anschliessend wurden Antibiotika und IPTG in den bereits oben erwähnten Konzentrationen zur Kultur hinzugegeben. Die Bakterien wurden auf NGM-Agar-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin, 12,5 μ g/ml Tetrazyklin und 0,4 mM IPTG ausgestrichen. Die Platten wurden danach unter der Sterilbank mit offenem Deckel getrocknet und konnten anschliessend mit *C. elegans* (L4-Larven) besetzt werden. Die Nematoden wurden 2-3 Tage auf den Bakterien belassen, wobei die Platten bei 18 °C gelagert wurden.

2.2.17. Stress-Experimente mit C. elegans

Die Experimente unter oxidativen Stressbedingungen dienten der Überprüfung der Stressresistenz der Nematoden. Dabei wurde die Lebensspanne der transgenen und der knockout-*C. elegans* im Vergleich zum Wildtyp-Stamm gemessen.

50 L4-Larven eines *C. elegans*-Stammes wurden am Tag vor dem Experiment auf eine frische NGM-Agar-Platte mit *E. coli* OP50 überführt und über Nacht bei 18°C gelagert. NGM-Agar bzw. NGM-Flüssigmedium, auf dem bzw. in dem die *C. elegans* während des Versuchs inkubiert wurden, wurde direkt vor Beginn des Experiments mit den frisch angesetzten Stammlösungen der chemischen Induktoren (siehe Tabelle 2.1) versetzt. Dabei wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Bedingungen eingestellt. 25 junge adulte *C. elegans* wurden auf eine Stress-NGM-Platte bzw. in das Flüssigmedium mit einem Induktor für Sauerstoffradikale überführt. Parallel wurden die anderen 25 Tiere eines Stammes unter Normalbedingungen ohne zusätzlichen oxidativen Stress beobachtet. Tiere, die sich nach einem mechanischen Stimulus nicht bewegten, wurden als "tot" definiert. Jede halbe Stunde wurden die toten Tiere abgesammelt und gezählt und der prozentuale Anteil der Überlebenden zur Gesamtzahl der Individuen ermittelt.

 Tabelle 2.1 Die verwendeten chemischen Induktoren von oxidativem Stress und ihre Endkonzentration im Ansatz. Die Stammlösung wurden immer frisch am Versuchstag angesetzt.

Induktor	Stammlösung	Endkonzentration
Paraquat (Methylviologen)	1 M in aqua demin.	100 mM
Plumbagin	50 mM in 70 % Ethanol	200, 250 oder 500 µM
Juglon	10 mM in 96 % Ethanol	200, 230, 290 oder 350 µM
Hypoxanthin	5 mM in NGM-Medium; 1-2 h bei 37°C schütteln	5 mM
Xanthinoxidase (XOD)	1,75 U/ml in 0,1 M Phospat- puffer, 1 mM EDTA (pH 7.8)	100 mU/ml

2.2.18. GFP-Fluoreszenzmessungen

Die GFP-Fluoreszenzmessungen in *C. elegans* wurden am Fluorometer (Fluoroscan Ascent, Labsystems) in 96-well-Platten durchgeführt. Pro well wurden 50 adulte Tiere eines Stammes (oxidativ gestresste Würmer oder als Kontrolle Würmer desselben Stammes ohne zusätzlichen Stress) in 100 µl 4°C-kalten 1 x PBS gegeben. In der kalten Flüssigkeit wurde die Bewegung der Tiere reduziert, so dass sie kurz vor der Messung durch vorsichtiges Schütteln der Platte im Zentrum der wells konzentriert werden konnten. Die GFP-Moleküle wurden bei 485 nm angeregt, und die Fluoreszenz-Emission wurde bei 538 nm gemessen.

2.2.19. Konfokale Laserscanmikroskopie

Digitale Photos fixierter *C. elegans* wurden am konfokalen Lasermikroskop (TCS NT confocal laser scanning microscope (Leica)) erstellt. Es wurde ein 10x- und ein 20x-Objektiv für Übersichtsaufnahmen verwendet und ein 100x-Objektiv für detailierte Analysen. Die Dateien wurden digital mit Adobe Photoshop 6.0 bearbeitet, um Kontrast und Helligkeit der Bilder einzustellen. Dabei wurden Bilder derselben Serie auf exakt dieselbe Art nachbearbeitet.

2.2.20. RNA-Präparation

Gesamt-RNA aus *C. elegans* wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) nach genauen Angaben des Herstellers isoliert. Es wurden Wurmmengen von 25 adulten Tieren bis zu 30 mg Frischgewicht eingesetzt.

2.2.21. Reverse Transkription

Bei der RT-PCR diente die als Ausgangsmaterial vorliegende Gesamt-RNA aus *C. elegans* zunächst als Vorlage für die Synthese von einzelsträngiger cDNA durch die Reverse Transkriptase. Anschließend wurde diese cDNA in einer PCR amplifiziert. Bei der reversen Transkription wurde die RNA zusammen mit einem spezifischen 3'-Primer (downstream) in einem Volumen von 10 µl für 5 Minuten bei 70°C erhitzt und anschliessend sofort auf Eis abgekühlt. Dem Ansatz wurden 1 µl RNasin (400 U/µl; Promega), 4 µl 5x Erststrang-Puffer (250 mM Tris-HCl pH 8,0; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; Gibco BRL), 2 µl 0,1 M DTT (Gibco BRL), 2 µl 10x dNTPs (10 mM) und 1 µl SuperscriptTM RNase H Reverse Transkriptase (200 U/µl; Gibco BRL) auf Eis zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C und einer anschliessenden Erwärmung auf 70°C wurden 1 - 4 µl des RT-Ansatzes in eine PCR eingesetzt. Der Rest der cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.22. Formaldehyd-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Gesamt-RNA erfolgte in 1 %-igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen (1 g Agarose in 10 ml 10 x MOPS und 73,8 ml aqua demin. aufkochen, auf ca. 70°C abkühlen lassen, 16,2 ml 37 %-ige Formaldehyd-Lösung zugeben, sofort in die vorbereitete Form gießen). Die RNA-Proben (30-50 μ g) wurden vor dem Auftragen mit 1 Vol RNA-Gelauftragspuffer versetzt und für 10 min auf 65°C erhitzt. Die Auftrennung der RNA erfolgte in 1 x MOPS als Laufpuffer und konnte durch die Ethidiumbromid-Anfärbung der Nukleotidstränge unter UV-Licht überprüft werden.

2.2.23. Transfer von RNA auf Membranen (Northern Blot)

Die Übertragung von RNA aus denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen erfolgte nach einer von Thomas (1983) abgeleiteten Methode (Sambrook et. al., 1989). Das Gel wurde dreimal kurz in autoklaviertem aqua demin. gewaschen und für 45 min in 10 x SSC äquilibriert, bevor die RNA mittles Kapillarkräfte über Whatman-Papier und Saugpapier mit 20 x SSC als mobile Phase auf eine Nylon-Membran (Hybond N, Amersham) transferiert wurde. Nach einer Transferzeit von ca. 12 Stunden (meist über Nacht bei Raumtemperatur) wurde die RNA-Übertragung kurz mittels UV-Licht überprüft und die RNA anschliessend durch "UV-crosslinking" (UV-Crosslinker 2400, Stratagene) und gegebenenfalls durch eine 30-minütige Inkubation bei 80°C an die Membran gebunden.

2.2.24. Hybridisierung mit markierten DNA-Sonden und Detektierung

Die Filter (Membranen eines Southern (2.2.10) oder Northern Blots (2.2.23)) wurden nach Sambrook et. al. (1989) zunächst bei 42°C in Hybridisierungslösung (mit Formamid) ohne DNA-Sonde für mindestens 4 Stunden prähybridisiert. Anschliessend wurden sie über Nacht ebenfalls bei 42°C in Hybridisierungslösung (0,2 ml/cm² Membran) mit einer denaturierten radioaktiven oder nichtradioaktiven DNA-Sonde inkubiert. Während dieser Zeit hybridisierte die DNA-Sonde mit der komplementären, an die Membran gebundene DNA. Das anschliessende Waschen erfolgte - unter Kontrolle der verbleibenden Radioaktivität auf dem Filter - in 0,1 % SDS-Lösung mit abnehmender SSC-Konzentration (< 2 %) bis zur gewünschten Stringenz. Die Lokalisation der DNA-Sonden auf den Membranen erfolgte durch Exposition der Filter zu einem Photofilm (Fuji Medical X-Ray-Film 100 NIF, Fujifilm). Dieser wurde bei der radioaktiven Sonde durch die α -Strahlen belichtet und bei der nichtradioaktiven Sonde durch die Umsetzung eines Chemilumineszenzfarbstoffes (2.2.13.3), wobei die Lumineszenz den Film schwärzte. Nach der Entwicklung des Photofilms wiesen die schwarz gefärbten Areale auf die Lage der gesuchten DNA auf dem Filter hin. Die Entfernung filtergebundener Hybridisierungsproben wurde mit 0,1 % SDS-Lösung für 2-3 Stunden bei 70°C durchgeführt (",Strippen").

2.2.25. Expression rekombinanter Proteine

Mittels PCR wurde die codierende Region von *Ce*-GST-p24 und *Ce*-GST-p29 aus cDNA amplifiziert – flankiert von primerspezifischen *Nde* I und *Bam* HI-Schnittstellen -, und die Produkte wurden gerichtet in die spezifische *Nde* I/*Bam* HI Restriktionsschnittstelle im pJC40-Vektor (Clos & Brandau, 1994) ligiert. Die pJC40-*Ce*GSTx Konstrukte wurden zunächst in *E. coli* DH5α transformiert und vermehrt, bevor sie in BL21 (pLysS bzw. pLysE) (Novagen) Bakterien transformiert wurden, einem *E. coli*-Stamm, der für die Expression von rekombinanten Proteinen verwendet wird.

Für analytische Zwecke wurden 10 ml LB-Medium plus 100 µg/ml Ampicillin mit 400 µl einer E. coli BL21-Übernachtkultur (mit den Plasmiden pJC40, pJC40-GST-p24 oder pJC40-GST-p29) beimpft, für die präparative Nutzung wurden zu 500-1000 ml Medium 20 bzw. 40 ml Bakterienübernachtkultur hinzugegeben. Die Kulturen wurden bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 geschüttelt. Aus der Bakterienkultur wurde 1 ml als Kontrolle entnommen, und die verbleibende Kultur mit 0,4 mM IPTG zur Expression des gewünschten Proteins induziert. Die Bakterienkultur wurde für weitere 2-3 Stunden bei 37°C geschüttelt; währenddessen kam es zur Überexpression des gewünschten Proteins. Anschliessend wurden die Bakterien durch zehnminütige Zentrifugation bei 10.000 x g (4°C) pelletiert. Das Bakterienpellet wurde für analytische Zwecke direkt in 1 Volumen 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bis zu gelelektrophoretischen Auftrennung (siehe 2.2.28) bei -20°C gelagert, oder es wurde in 5 Volumen 1 x PBS/ 1 % Triton X-100 resuspendiert und die Bakterien durch Sonifizierung mit Hilfe einer Sonifiziernadel (Labsonic U, B. Braun Biotech International; 3 x 15 Sekunden auf Eis) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation für 15 min mit 13.000 rpm wurden die lösliche (im Überstand) und die membrangebundene (im Pellet) Proteinfraktion voneinander getrennt. Die Proteinfraktionen wurden separat bei -20°C bis zur Aufreinigung der Proteine aus der löslichen Fraktion tiefgefroren.

2.2.26. Aufreinigung rekombinanter Proteine aus E. coli

Bei der Translation von Transgenen im Expressionsvektor pJC40 (Clos & Brandau, 1994) wird eine Verlängerung (tag) aus 10 Histidinen an das entstehende Protein angefügt. Diese interagieren mit Nickel-Ionen (Ni²⁺), welche an Sepharose gekoppelt sind (Ni²⁺-NTA-Sepharose (Novagen)), und ermöglichen so eine Abtrennung der gewünschten Proteine aus dem Proteinlysat. Die Bindung an Nickel ist reversibel. Durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 1 M im Elutionspuffer wird das rekombinante Protein durch das Imidazol von den Nickel-Ionen verdrängt und kann anschliessend mit dem Eluat aufgefangen werden. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.27. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration einer Proteinlösung kann mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum des verwendeten Farbstoffes Coomassie Brilliantblau wird im sauren Milieu durch die Bindung an Proteine von 465 auf 595 nm verschoben, was photometrisch gemessen werden kann. Die Eichkurve wurde aus einer 0,1 mg/ml BSA-Stammlösung erstellt. Anhand der Eichkurve konnte die Proteinkonzentration in einer Probe ermittelt werden. 10 bzw. 20 µl der Probe wurden auf 800 µl mit aqua demin. aufgefüllt und gut vermischt, bevor 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad) unter Mischen zugegeben wurden. Nach exakt 20 min wurde die Absorption der Probe bei 595 nm photometrisch bestimmt.

2.2.28. Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels der denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Tris-Glycin-Puffer nach der Methode von Laemmli (1970). Die 12 %ige Trenngellösung wurde zwischen zwei Glasplatten gefüllt und mit aqua demin. überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation wurde das Wasser abgegossen und die Sammelgellösung eingefüllt, wobei der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt wurde. Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min auf 100°C erhitzt und nach dem Abkühlen auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung wurde bei kleinen Gelen (9 x 8 cm) für 1,5 h bei 35 mA und bei grösseren Gelen (18 x 14 cm) über Nacht bei 20 mA durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die 10 kDa Protein-Leiter (Gibco BRL) verwendet.

2.2.29. Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Für die Färbung der aufgetrennten Proteine mit Coomassie Brilliantblue wurden die SDS-Polyacrylamidgele für 30 min bei Raumtemperatur in Coomassi-Färbelösung geschwenkt. Zur Entfärbung der proteinfreien Bereiche wurden die Gele anschliessend für mindestens eine Stunde in Entfärbelösung unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Färbemethode lassen sich Proteinmengen ab ca. 100 ng/Bande nachweisen.

2.2.30. Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Protran[®], Schleicher&Schuell) elektrotransferiert, die entsprechend den Herstellerangaben vorbehandelt wurde. Der Transfer erfolgte nach dem "semi dry blotting"-Verfahren in einem Zwei-Puffer-System aus Anoden- und Kathodenpuffer für 1 - 3 Stunden bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Membranfläche. Nach dem Transfer wurde die Transfereffektivität der Proteine auf die Membran durch die reversible Anfärbung mit Ponceau Rot S (Sigma) kontrolliert und die Membran konnte nach der Entfärbung in aqua demin. für einen immunologischen Nachweis genutzt werden (siehe 2.2.31).

2.2.31. Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine

2.2.31.1. Membrangebundene Proteine

Nach dem Elektrotransfer auf eine Membran können Proteine durch die Umsetzung mit mono- bzw. polyklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran zunächst für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Antikörperblockierlösung (siehe 2.1.10) behandelt und dann für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem spezifischen Antikörper (1:200 verdünnt in Antikörperblockierlösung) unter ständigem Drehen inkubiert. Nach zweimaligen Waschen für 15 Minuten in Antikörperwaschlösung erfolgte eine ein- bis zweistündige Inkubation mit einem Zweitantikörper (1:20000)verdünnt in Antikörperblockierlösung), an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist, zur Markierung der Antigen-Antikörper-Konjugate. Dem erneuten zweimaligen Waschen für 15 Minuten in Antikörperwaschlösung folgte die durch Chemolumineszens vermittelte Detektion (CDP StarTM, Amersham Life Science) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.31.2. Immunohistochemie

2.2.31.2.1. Freeze-Crack-Methode

Eine gemischte *C. elegans*-Population wurde mit kaltem 1 x PBS von zwei 9 cm-NGM-Agar-Petrischalen gespült und in einem Falcon-Gefäss nach zweimaligem Waschen aufkonzentriert. Ein Tropfen des Wurmpellets wurden anschliessend auf Poly-L-Lysin (Sigma) beschichtete Objektträger überführt und mit einem Deckglas bedeckt. Hiernach wurde ein Grossteil der Flüssigkeit mit Hilfe von Papiertüchern abgesaugt (Quetschen). Der Quetschvorgang wurde unter dem Mikroskop beobachtet und gestoppt, sobald das Platzen des ersten adulten Wurmes beobachtet wurde. Die so vorbereiteten Objektträger wurden sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Ein mechanischer Aufschluss der *C. elegans* erfolgte durch das schnelle "Abschnippsen" des Deckglases von der gefrorenen Wurmschicht mit einem Skalpell (Freeze-Crack). Die sich sofort anschliessende Fixierung der Nematoden bestand aus folgenden Schritten:

- 10 min Methanol -20°C
- 10 min Aceton $-20^{\circ}C$
- 5 min 96 % Ethanol -20° C
- 5 min 60 % Ethanol -20°C
- 5 min 30 % Ethanol RT
- 5 min 1 x PBS RT

2.2.31.2.2. Antikörperumsetzung

Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Objektträger zunächst für 30 min in Antikörperblockierlösung inkubiert. Die spezifische Umsetzung mit dem Erst-Antikörper (1:200 verdünnt in Antikörperblockierlösung) in einem Volumen von 30-40 µl pro Objektträger fand über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer statt. Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal 10 min in Antikörperwaschlösung langsam geschwenkt und anschliessend für eine Stunde bei Raumtemperatur in 1:400 in Antikörperblockierlösung verdünnten Zweitantikörper (TRITC-Konjugat Anti Rabbit IgG aus der Ziege, Sigma) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten in Antikörperwaschlösung, wurden die Präparate mit Mowiol-Lösung benetzt und luftblasenfrei mit einem Deckglas versiegelt. Die Auswertung der Präparate erfolgte am konfokalen Lasermikroskop (TCS NT confocal laser scanning microscope (Leica)). Eine Lagerung der Präparate war bei 4°C möglich. Digitale Photos fixierter *C. elegans* wurden am konfokalen Lasermikroskop (TCS NT confocal laser scanning microscope (Leica)) erstellt. Es wurde ein 10x und ein 20x Objektiv für Übersichtsaufnahmen verwendert, und ein 100x Objektiv für detailierte Analysen. Die Dateien wurden digital mit Adobe Photoshop 6.0 bearbeitet, um Kontrast und Helligkeit der Bilder einzustellen. Dabei wurden Bilder derselben Serie auf exakt dieselbe Art nachbearbeitet.

2.2.32. GST-Enzymaktivitätstests

Neben den strukturellen Merkmalen wird auch das spezifische Substratmuster von Glutathiontransferasen zu ihrer Einordnung in eine GST-Klasse herangezogen. Neben dem Universalsubstrat 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB), das von den meisten GST-Klassen umgesetzt wird, wurde auch Cumenhydroperoxid als Substrat eingesetzt, um die Peroxidase-Aktivität des Enzyms nachzuweisen. Der Abbau von Lipidperoxidations-Produkten wurde durch Zugabe des Enals *Trans*-2-nonenal als Substrat simuliert.

CDNB nach (Mannervik & Guthenberg, 1981)

Extinktions-Koeffizient: 9,6 mM⁻¹cm⁻¹

Wellenlänge: 340 nm

Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Proteinprobe gestartet und die Extinktionsänderung bei 340 nm im Abstand von 30 Sekunden über einen Zeitraum von 5 Minuten gemessen.

200 mM	Natriumphospat, pH 6,5	500 µ1
20 mM	reduziertes Glutathion	50 µl
20 mM	CDNB	50 µl
	Proteinprobe	x μl
	Aqua demin.	ad 1 ml

Cumenhydroperoxid

Extinktions-Koeffizient: 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ Wellenlänge: 340 nm

1 mM	Tris HCl, pH 7,6	100 µ1
30 mM	EDTA	100 µl
24 mM	NADPH	10 µl
300 mM	red. GSH	20 µl

$25 \; \mu g/ml \; (5U/ml)$	Glutathionreduktase	10 µl
75 mM	NaN ₃	50 µl
24 mM	Cumenhydroperoxid	10 µl
	Proteinprobe	x μl
	Aqua demin.	ad 1 ml

Trans-2-nonenal

Extinktions-Koeffizient: 19,2 mM⁻¹cm⁻¹ Wellenlänge: 225 nm

0,2 M KH ₂ PO ₄ , pH 6,5	500 µl
10 mM reduziertes Glutathion	100 µ1
100 µM Trans-2-nonenal	10 µ1
Proteinprobe	x μl
Aqua demin.	ad 1 ml

3. Ergebnisse

3.1. Die C. elegans Glutathion S-Transferase Ce-GST-p24

3.1.1. Warum ist dieses Gen aus *C. elegans* interessant?

Die *C. elegans* Glutathion S-Transferase *Ce*-GST-p24 (M-47, Cosmidnummer *K08F4.7*) wurde ursprünglich durch Differential-Display-RT-PCR entdeckt, bei der nach differentiell expremierten Genen in *C. elegans* unter Einfluss von oxidativem Stress gesucht wurde. Nach der Sequenzierung des zu dieser Zeit noch M-47 genannten Genes konnte durch Northern Blot-Analyse ein signifikanter Anstieg des mRNA-Levels durch intrazellulär erhöhte Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies nachgewiesen werden (Tawe et. al., 1998). Die Studie zeigte, dass in einer gemischten *C. elegans*-Kultur mit verschiedenen Entwicklungsstadien der *Ce*-GST-p24-mRNA-Level durch Kontakt mit 100 mM Paraquat um das Doppelte anstieg; in Proben, die ausschliesslich RNA aus L3-Larven enthielten, wurde sogar ein 42-facher Anstieg des *Ce*-GST-p24-mRNA-Levels gemessen. Deshalb war es von grossem Interesse zu untersuchen, inwieweit diese stressinduzierbare Glutathion S-Transferase den aerob lebenden Nematoden *Caenorhabditis elegans* vor Schäden durch oxidativen Stress schützt.

3.1.2. Struktur des Ce-GST-p24-Genes und des Ce-GST-p24-Proteins

Das Gen der *Ce*-GST-p24 ist auf Chromosom IV des *C. elegans*-Genoms in direkter Nachbarschaft zu den GSTs *K08F4.6* und *K08F4.11* lokalisiert (The *C. elegans* Sequenzing Consortium, 1998), die auf dem Gegenstrang der DNA codiert sind. Zwischen der putativen GST *K08F4.6* und *Ce*-GST-p24 liegen 727 bp nichtcodierende Region, wohingegen der Abstand zwischen *K08F4.6* und *K08F4.11* nur 204 bp beträgt.

Ein Vergleich der bekannten cDNA-Sequenz der *C. elegans* Glutathion S-Transferase p24 (623 bp lang ohne die 3'-untranslatierte Region) (Tawe, 1998) mit der genomischen *K08F4*.7-Cosmidsequenz (768 bp lang ohne die 3' UTR) zeigte, dass das *Ce*-GST-p24-Gen drei Introns enthält (Intron 1: bp-Position 135-189, Intron 2: bp-Position 282-325, Intron 3: bp-Position 453-498) (siehe Abb. 3.1 A). Die codierende Region der gespleißten mRNA besteht demnach aus vier Exons (Exon 1: bp-Position 1-134, Exon 2: bp-Position 190-281, Exon 3: bp-Position 326-452, Exon 4: bp-Position 499-768) und ist 623 bp lang (siehe Abb. 3.1 B). In der cDNA-

Sequenz der *Ce*-GST-p24 wurde kein "spliced leader"-Sequenz gefunden. Als "spliced leader" wird eine 5′-angehängte Sequenz bezeichnet, die bei *C. elegans* 22 Nukleotide lang ist und eine entscheidende Rolle für das *trans*-Spleißen in Nematoden spielt (siehe Diskussion 4.1.1).



Abb. 3.1 Die Genstruktur der Ce-GST-p24. (A) Vergleich der codierenden Region der Ce-GST-p24-cDNA (ohne die 3'-untranslatierte Region) mit der genomischen K08F4.7-Cosmid-sequenz zur Identifikation der Introns. An die mit Pfeilen markierten Sequenzen binden Primer, die für die Amplifikation der Ce-GST-p24-cDNA verwendet wurden. (B) Schematische Darstellung des Spleißens der Ce-GST-p24. Die genomische Sequenz enthält 3 Introns (I), die bei der Transkription herausgespleißt werden. Die mRNA besteht aus den Sequenzstücken der vier Exons (E) und umfasst im codierenden Bereich 623 bp.

Die mRNA codiert für das *Ce*-GST-p24-Proteinmonomer, welches aus 207 Aminosäuren zusammengesetzt ist (siehe Abb. 3.2). In Abb. 3.2 sind die zwischen verschiedenen GST-Klassen hochkonservierten Aminosäuren dunkelgrau unterlegt, die für die Bindung des Glutathion an das aktive Zentrum der Glutathion S-Transferase (g-site) von Bedeutung sind (Cowan et. al., 1989; Dirr et. al., 1994). Das Monomer der *Ce*-GST-p24 hat eine aus der

Aminosäurezusammensetzung berechnete Masse von 23,9 kDa. Der isoelektrische Punkt wurde ebenso anhand der Aminosäuresequenz ermittelt und beträgt pI = 5,6. *Ce*-GST-p24 zählt demnach zu den sauren Glutathion S-Transferasen.

1 MPNYKLLYFD ARALAEPIRI MFAMLNVPYE DYRVSVEEWS 41 KLKPTTPFGQ LPILQVDGEQ FGQSMSITRY LARKFGLAGK 81 TAEEEAYADS IVDQYR**D**FIF FFRQFTSSVF YGSDADHINK 121 VRFEVVEPAR DDFLAIINKF LAKSKSGFLV GDSLTWADIV IADNLTSLLK NGFLDFNKEK KLEEFYNKIH SIPEIKNYVA 161 201 TRKDSIV

Abb. 3.2 Aminosäuresequenz des *Ce*-**GST-p24-Proteins.** Basierend auf der vorliegenden Sequenz wurde ein Molekulargewicht von 23,9 kDa berechnet. Die für die Glutathionbindung essentiellen Aminosäuren (g-site) sind dunkelgrau unterlegt. Diese hochkonservierten Aminosäuren kommen in unterschiedlichen GST-Klassen vor (siehe auch Abb. 4.1).

3.1.3. Etablierung des BL1-C. elegans-Stammes

Es wurde zunächst ein transgener *C. elegans*-Stamm etabliert, der die *Ce*-GST-p24 als Fusionsprotein mit GFP überexpremierte. In Wildtyp-*C. elegans* wurde mit der in 2.2.15 beschriebenen Methode ein Plasmidgemisch aus dem *Ce*-GST-p24-pPD95.77-Transgenplasmid und dem Markerplasmid pRF4 mikroinjiziert.



Abb. 3.3 Struktur des Transgenplasmids zur Etablierung des BL1-C. elegans-Stammes. Es enthält die genomische Sequenz des Ce-GST-p24-Genes ohne Stopcodon, wodurch die Fusion mit dem im pPD95.77-Vektor codierten GFP möglich ist. Die Transkription des Fusionskonstrukts steht unter der Kontrolle von 1000 bp des Ce-GST-p24-Promotors.

Die Vorteile dieses Aufbaus des Mikroinjektionskonstrukts sind vielfältig. Erstens wird die Transkription des Transgenes vom eigenen Promotor kontrolliert, was zu einer möglichst realistischen Wiedergabe der Transkriptionskontrolle im homologen *C. elegans*-System führt. Der GFP-Fluoreszenzlevel des Fusionsproteins spiegelt direkt die Promotoraktivität wieder.

Desweiteren ermöglicht die Fusion des Transgenes mit GFP eine einfache Lokalisation im Nematoden mit Hilfe der auftretenden Fluoreszenz.

Der BL1-Stamm ist ein nichtintegrierter Stamm, bei dem die Trangene *Ce*-GST-p24 und das pRF4-Plasmid extrachromosomal, d.h. in grossen Plasmidclustern zusätzlich zur genomischen DNA im Zellkern der Zellen vorliegen. Ab der F5-Generation und in allen später herangezogenen Generationen zeigten 50-60 % der BL1-Tiere stabil den Rollerphänotyp, d.h. die Tiere waren transgen für das pRF4-Plasmid und damit überexpremierten sie auch die *Ce*-GST-p24.

3.1.3.1. Nachweis der Ce-GST-p24-GFP-Plasmid-DNA in BL1-C. elegans

Mittels einer "single worm"-PCR wurde die Anwesenheit des Mikroinjektionsplasmids pPD95.77 mit dem in ihm enthaltenen Ce-GST-p24-GFP-Fusionskonstrukt in den BL1-Würmern überprüft. Dabei wurde die in 2.2.4 beschriebene PCR-Methode verwendet, wobei statt der Template-DNA in diesem Fall in jeden PCR-Ansatz ein einzelner C. elegans-Wurm gegeben wurde. Die Zellen des Wurms wurden während der 93°C-Perioden des PCR-Zyklus aufgeschlossen, so dass die in ihnen enthaltenen DNA frei wurde und als Template für die PCR zur Verfügung stand. Als Oligonukleotide wurden der 5'- und der 3'-GFP-Primer (siehe 2.1.4) verwendet. Es zeigte sich nach der Auftrennung der PCR-Amplifikate in einem Agarosegel, dass sowohl in der Positivkontrolle mit einem CL2166-Wurm (siehe 2.1.1) als auch in dem Ansatz mit dem BL1-Wurm das erwartete GFP-Produkt von 507 bp Grösse amplifiziert wurde (siehe Abb. 3.4). Das Signal in der Probe mit dem BL1-Wurm fiel jedoch deutlich schwächer aus als das in der Positivkontrolle. Besonders deutlich war die Amplifikation in der Positivkontrolle, in der als Template pure Plasmid-DNA des Mikroinjektionsplasmids zugefügt wurde. In der Negativkontrolle mit einem Wildtyp-Wurm - der kein GFP enthalten sollte - entstand erwartungsgemäß kein Amplifikationsprodukt. Dieser Versuch wurde mit anderen Individuen des BL1-Stammes wiederholt, wobei das beschriebene Ergebnis reproduziert wurde.



Abb. 3.4 Elektrophoretische Auftrennung der "single-worm"-PCR-Proben in einem Agarosegel. Als Template für die PCR wurden folgende DNA-Proben eingesetzt: MiP GSTp24 = reine Plasmid-DNA des Transgenplasmids *Ce*-GST-p24-pPD95.77; Wildtyp, CL2166, BL1 = Einzelwürmer des jeweiligen aufgeführten *C. elegans*-Stammes.

3.1.3.2. Nachweis der Ce-GST-p24-GFP-mRNA in BL1-C. elegans

Nachdem mit dem in 3.1.3.1 beschriebenen Ergebnis gezeigt wurde, dass der BL1-Stamm die injizierte Plasmid-DNA enthielt, wurde im nachfolgenden Experiment die mRNA des Ce-GST-p24-GFP-Fusionstranskripts detektiert, um die erfolgreiche Transkription des Transgenes nachweisen zu können. Aus je 25 oxidativ ungestressten bzw. mit 200 µM Juglon oxidativ gestressten adulten C. elegans (Wildtyp- und BL1-Stamm) wurde die Gesamt-RNA extrahiert (siehe 2.2.18) und mittels reverser Transkription (siehe 2.2.19) in cDNA transkribiert. Als spezifischer downstream-Primer wurde der 3'-GFP-Primer verwendet. Die Ce-GST-p24-GFP-cDNA wurde als Template in eine PCR eingesetzt, die die Primerkombination 5'-Ce-GST-p24-RNAi/3'-GFP enthielt. Die Amplifikationsprodukte wurden anschliessend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Auf diese Weise konnte eindeutig in beiden Ansätzen mit cDNA aus BL1-Würmern das Ce-GST-p24-GFP-Fusionstranskript mit 1,8 kb Grösse nachgewiesen werden (siehe Abb.3.5). In der Probe mit cDNA aus oxidativ gestressten BL1-Würmern trat eine erhöhte Konzentration des Amplifikationsprodukts im Vergleich zu der ungestressten Probe auf. Da es sich bei der beschriebenen PCR jedoch nicht um eine quantitative PCR handelt, kann über die Quantität der Amplifikationsprodukte in den einzelnen Proben im Vergleich zu anderen Proben keine eindeutige Aussage gemacht werden. Weder in der Negativkontrolle noch in der Wildtyp-Kontrolle zeigte sich ein Amplifikationsprodukt.



Abb. 3.5 RT-PCR-Analyse des *Ce*-GST-p24-GFP-Transkripts in oxidativ ungestressten (-) und gestressen (+) adulten BL1-*C. elegans*. Die RT-PCR wurde mit dem 5'-c*Ce*-GST-p24-RNAi/3'-GFP-Primerpaar zur Amplifikation des *Ce*-GST-p24-GFP-Fusionstranskripts in BL1-*C. elegans* durchgeführt. Der Pfeil markiert die spezifischen Transkripte. K = Negativkontrolle ohne Template-cDNA, W = cDNA aus Wildtyp-*C. elegans* als Template.

3.1.3.3. Nachweis der Ce-GST-p24-Transgen-Expression mittels GFP-Fluoreszenz

Nachdem die Anwesenheit der Plasmid-DNA des *Ce*-GST-p24-GFP-pPD95.77-Konstrukts im BL1-*C. elegans*-Stamm detektiert (siehe 3.1.3.1) und die vollständige Transkription des Transgenes (siehe 3.1.3.2) nachgewiesen wurde, wurde in einem nächsten Schritt die Translation des exogenen Proteins überprüft. Dieses Vorhaben wurde durch die Fusion des *Ce*-GST-p24-Proteins mit GFP erleichtert.

Zunächst wurden die BL1-Würmer durch eine einstündige Inkubation in NGM-Flüssigmedium mit 200 μ M Juglon oxidativ gestresst, und nach einer 20-stündigen Erholungsphase unter Normalbedingungen wurden sie auf Polylysin-beschichteten Objektträgern fixiert. Die Fluoreszenz des GFP wurde am konfokalen Laserscanmikroskop (siehe 2.2.30) visualisiert und digital ausgewertet.

Es zeigte sich, dass in adulten BL1-Hermaphroditen GFP-Signale des *Ce*-GST-p24-GFP-Fusionproteins über die gesamte Länge des Wurms auftraten (siehe Abb. 3.6). Das Transgen wurde demnach in hohen Konzentrationen im Nematoden expremiert. Die Signale dominierten in den Muskelfasern der Längsmuskulatur und in der Hypodermis (siehe Abb. 3.6 C).



Abb. 3.6 Konfokale Laserscanmikroskopie der transgenen BL1-C. elegans. Die Würmer wurden 1 Stunde mit 200 μM Juglon oxidativ gestresst und 20 Stunden nach der Stressinduktion fixiert und fotografiert. (A) Adulter BL1-Wurm mit starker Expression des Ce-GST-p24-GFP-Fusionsproteins in den Muskelfasern (mus), der Hypodermis (hyp) und den Zellen rund um den Pharynx (pha) ((B) zeigt dazu mehr Details). (C) Transgenexpression in den Muskelfasern und der Hypodermis eines BL1-Adulten. (D) In Kontrast zu adulten Hermaphroditen, zeigten die BL1-L3-Larven GFP-Fluoreszenz im Isthmus (is) und im terminalen Bulbus (tb) des Pharynx. Eine Expression in Muskelfasern und Hypodermis konnte ebenfalls beobachtet werden.

Eine deutliche Expression konnte ebenfalls in den Zellen rund um den Pharynxbereich nachgewiesen werden, jedoch nicht im Pharynx selbst (siehe Abb. 3.6 B). In Kontrast dazu zeigte sich im Isthmus und im terminalen Bulbus des Pharynx der BL1-L3-Larven eine erhöhte Expression des *Ce*-GST-p24-GFP-Fusionsproteins (siehe Abb. 3.6 D). Es konnte jedoch auch – wie bei den erwachsenen Hermaphroditen - eine Expression in den Längsmuskelzellen und in der Hypodermis beobachtet werden. Da die Expression des *Ce*-GST-p24-GFP-Fusionsproteins in Larven stärker war als in Adulten, und in keinem der BL1-

Embryonen je GFP-Fluoreszenz beobachtet wurde, ist eine entwicklungsabhängige Regulation der *Ce*-GST-p24-Expression in *C. elegans* wahrscheinlich.

3.1.3.4. Lokalisation der Ce-GST-p24 über Immunhistochemie

Mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz konnte die Expression und die Lokalisation des *Ce*-GST-p24-GFP-Transgenes in BL1-*C. elegans* genau bestimmt werden. In diesen Zusammenhang war es von grossem Interesse, ob das endogene *Ce*-GST-p24-Protein, das durch Translation des genomischen *Ce*-GST-p24 in den Nematoden natürlicherweise entsteht, im gleichen oder ähnlichen Expressionsmuster in Wildtyp-*C. elegans* bzw. in BL1-*C. elegans* (die aus Wildtyp-Würmern hervorgegangen sind) vorliegt. Ergänzend dazu wurde die *Ce*-GST-p24-Expression im heterozygoten *K08F4.7*-Deletionsmutanten untersucht. Zu diesem Zweck wurden Präparate mit unterschiedlichen Stadien der genannten drei *C. elegans*-Stämme nach der in 2.2.31.2 beschriebenen Methode der Immunhistochemie zunächst fixiert und anschliessend mit 1:200 verdünntem anti-*Ce*-GST-p24-Kaninchenserum umgesetzt. Als Zweitantikörper diente ein anti-Kaninchen-TRITC-Konjugat.

Alle Präparate, ob mit Wildtyp-Würmern, BL1-Würmern oder *K08F4.7*-Deletionsmutanten, zeigten das gleiche homogene Bild. Adulte und Larvenstadien wiesen an partiellen Brüchen der Cuticula eine unspezifische TRITC-Färbung auf, wohingegen keine spezifischen Signale in inneren Geweben der fixierten Nematoden detektiert werden konnten. Die beschriebene unspezifische Färbung ist wahrscheinlich auf eine unzureichende Permeation der Nematoden-Cuticula durch die Freeze-Crack-Methode (siehe 2.2.31.2) zurückzuführen, wodurch das gleichmässige Eindringen der Antikörper in die Präparate verhindert wurde. Deshalb war mit der verwendeten Methode der immunhistochemische Nachweis der endogenen *Ce*-GST-p24 aufgrund der widerstandsfähigen Cuticula von *C. elegans* nicht durchführbar.

3.1.3.5. Lebensspanne von BL1-C. elegans unter Normalbedingungen

Nachdem durch Tawe (1998) die Induktion der *Ce*-GST-p24 durch oxidativen Stress auf dem mRNA-Level nachweisen werden konnte, lag es nahe zu untersuchen, ob die Überexpression der *Ce*-GST-p24 - einem Mitglied der Phase-II-Entgiftungsenzyme - zu einer erhöhten Toleranz der BL1-*C. elegans* gegenüber oxidativem Stress führt. Zunächst wurde die Lebensspanne von BL1-Tieren, *K08F4.7*-Deletionsmutanten und Wildtyp-Tieren unter Normalbedingungen parallel beobachtet (siehe Abb. 3.7). Denn bereits unter normalen

Lebensbedingungen entstehen durch die Zellatmung und den Metabolismus der Nematoden reaktive Sauerstoffspezies, die zur Schädigung von Makromolekülen führen können.



Abb. 3.7 Lebensspanne verschiedener *C. elegans*-Stämme unter Normalbedingungen. Die Lebensspanne des BL1-Stammes, welcher die *Ce*-GST-p24 überexpremiert und der *K08F4*.7-Deletionsmutante, die ein *Ce*-GST-p24-Allel deletiert hat, wurde mit der Lebensspanne des Wildtyp-Stammes verglichen. Es zeigte sich kein deutlicher Unterschied in der Lebenspanne zwischen den drei Stämmen. Der Versuch fand unter Normalbedingungen (18°C, normaler Luftdruck) ohne zusätzlichen oxidativen Stress statt. Der Versuch wurde zweimal mit je 50 Tieren pro Stamm durchgeführt.

Ab dem vierten Tag starben in allen drei Fällen die ersten Tiere und die Zahl der überlebenden Individuen nahm daraufhin stetig ab. Bis zum 21. Tag überlebten 3 % der Wildtyp-Tiere und 6 % der BL1-Würmer. Dagegen waren nach 18 Tagen bereits alle *K08F4.7*-Deletionsmutanten tot. Es zeigt sich, dass die Überexpression des *Ce*-GST-p24-Proteins unter normalen Lebensbedingungen ohne zusätzlichen oxidativen Stress keinen Überlebensvorteil vermittelt.

3.1.3.6. Toleranz gegenüber oxidativem Stress

Nachdem gezeigt wurde, dass die Überexpression der *Ce*-GST-p24 keinen Einfluss auf die Lebensspanne unter normalen Lebensbedingungen hat (siehe 3.1.3.5), wurde in einer Versuchsreihe die Toleranz der BL1-Tiere gegenüber künstlich erhöhten Sauerstoffradikalkonzentrationen überprüft. Die Überlebensrate der jungen, adulten BL1-*C. elegans* unter oxidativen Stressbedingungen wurde mit der Überlebensrate von jungen, adulten Wildtyp-

und CH1035-C. elegans unter denselben Bedingungen verglichen (siehe Abb. 3.8). Der CH1035-Stamm, der eine Deletion des rol-6-Genes aufweist und den Rollerphänotyp zeigt, wurde als Kontrolle verwendet, um ausschliessen zu können, dass der Rollerphänotyp und die damit verbundenen Bewegungseinschränkungen einen Einfluss auf die Stresstoleranz der Tiere haben könnten. Als Induktoren für intrazellulär erhöhte oxidative Stressbedingungen wurden 230 µM Juglon bzw. 100 mM Paraquat dem Medium zugesetzt. Beide Chemikalien dringen in die Zellen des Nematoden ein und induzieren intrazellulär erhöhte Superoxidanionradikalkonzentrationen. Durch Verwendung von 5 mM Hypoxanthin plus 100 mU/ml Xanthinoxidase wurde die H₂O₂-Konzentration im Medium, das die Tiere während des Versuches umgab, erhöht. Das entstandene Wasserstoffperoxid musste zunächst in die Zellen des Nematoden eindringen, bevor es dort zu Hydroxylradikalen umgesetzt wurde. Parallel zu den mit erhöhten Sauerstoffradikalkonzentrationen inkubierten C. elegans wurden auch immer Tiere derselben Charge unter Versuchsbedingungen ohne zusätzlichen oxidativen Stress inkubiert und beobachtet. Diese Kontrolle wurde genutzt, um den möglichen Einfluss etwaiger Artefakte bei den gegebenen Kulturbedingungen ausschliessen zu können. Es konnte jedoch in keinem Fall ein totes Tier unter Normalbedingungen beobachtet werden, weshalb die im Folgenden beschriebenen Effekte auf den Einfluss des oxidativen Stresses zurückzuführen sind. Die Werte der Negativkontrollen ohne Stress werden in den folgenden Abbildungen nicht aufgeführt.

Wurden die Tiere der drei Stämme in Medium mit 230 μ M Juglon inkubiert, so konnte eine signifikant höhere Überlebensrate der BL1-Würmer gegenüber dem Wildtyp- und dem CH1035-Stamm ermittelt werden (siehe Abb. 3.8). Während die Überlebensrate der BL1-Würmer nach einer Stunde bei 93 ± 9 %, nach 5 Stunden bei 51 ± 10 % und nach 7 Stunden Inkubation bei 33 ± 12 % lag, lebten zu denselben Zeitpunkten nur noch 73 ± 18 %, 9 ± 8 % und 8 ± 7 % der Wildtyp-Würmer. Die Überlebensrate der CH1035-Würmer wurde noch stärker vom oxidativen Stress beeinflusst. Nach einer Stunde lebten noch 67 ± 9 % der Population, doch bereits nach 4 Stunden waren alle CH1035-Tiere tot. Im Schnitt lag die Überlebensrate der BL1-Würmer um rund 50 % über der Rate der Kontrollstämme.

In Kontakt mit 100 mM Paraquat oder 5 mM Hypoxanthin/100 mU/ml XOD war die Überlebensrate der BL1-Würmer weniger deutlich erhöht im Vergleich zu den Kontrollstämmen (siehe Abb. 3.8). Unter Einfluss von 100 mM Paraquat lag die Überlebensrate der BL1-Würmer während der gesamten Beobachtungszeit leicht über der Rate der Wildtyp-Würmer. Nach 7 Stunden Inkubation lebten $87 \pm 5 \%$ (BL1), $77 \pm 2 \%$ (Wildtyp) und $58 \pm 18 \%$ (CH1035) der beobachteten Tiere. Der Trend setzte sich auch im weiteren Verlauf des

Experiments fort, denn nach 10 Stunden Inkubation wurden noch 70 ± 6 % der BL1-Tiere, 56 ± 8 % der Wildtyp-Tiere und 26 ± 18 % der CH1035-Tiere lebend registriert.

In Stressmedium mit dem Hypoxanthin/XOD-System zur Erhöhung der H₂O₂-Konzentration begannen die Tiere aller drei Stämme nach vier Stunden Inkubation zu sterben. Bei den Wildtyp- und den CH1035-Würmern wurde eine stark erhöhte Mortalität in den folgenden drei Stunden beobachtet, die bei den BL1 gemäßigter ausfiel. Nach 4 Stunden lebten noch 95 \pm 4 % (Wildtyp), 99 \pm 2 % (CH1035) und 95 \pm 3 % (BL1) der beobachteten Tiere, wohingegen die Raten nach 8 Stunden auf 7 \pm 5 % (Wildtyp), 0 % (CH1035) und 28 \pm 17 % (BL1) abgesunken waren. Es konnte demnach eine leichte Erhöhung der Toleranz gegenüber extrazellulär gebildetem oxidativen Stress in BL1-Tieren durch eine Überexpression der *Ce*-GST-p24 festgestellt werden.

In allen Experimenten zeigt der CH1035-Stamm mit der *rol*-6-Mutation eine höhere Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress als die Wildtyp-Würmer. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die erhöhte Stressresistenz der BL1-Würmer auf die Überexpression der *Ce*-GST-p24 und nicht auf den veränderten Bewegungsablauf der transgenen Tiere bedingt durch das cotransfizierte Rollerplasmid pRF4 zurückzuführen ist.



Abb. 3.8 Stresstoleranz der BL1-*C. elegans* in Kontakt mit verschiedenen Induktoren für oxidativen Stress. Intrazellulär induzierte Superoxidanionradikale wurden durch 230 μ M Juglon bzw. 100 mM Paraquat freigesetzt; das enzymatische Hypoxanthin-Xanthinoxidase-System erhöhte die Wasserstoffperoxidkonzentration im Medium, das die Nematoden während des Versuches umgab. Jedem Diagramm liegen drei unabhängige Experimente mit jeweils 25 Tieren pro Stamm zugrunde. Die mit (*) gekennzeichneten Werte unterscheiden sich nach statistischer Auswertung mit dem Students-t-Test signifikant von denen des Wildtyps (p = 0,05, Statistica).

3.1.4. Effekte des Ce-GST-p24-knock-outs

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Funktion eines Genes in einem Organismus auszuschalten. Bei der bewährten Methode der Herstellung von "knock-out-Mutanten" handelt es sich um eine gezielte Mutation des gewünschten Genes im Genom des Organismus. Diese genetische Veränderungen führen zu einer Fehlfunktion des translatierten Proteins, so dass die von ihm katalysierte Reaktion nicht ausgeführt werden kann. Eine neuere Methode greift erst nach der Transkription des Genes in den Prozess ein und verhindert durch die gezielte Zerstörung der mRNA die Translation in das codierte Protein. Diese Methode heisst "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) oder RNA-interference (RNAi).

Beide Methoden wurden in dieser Studie genutzt, um den Translationslevel der *Ce*-GST-p24 in *C. elegans* zu vermindern. Die Methode der RNAi (siehe 2.2.16) wurde verwendet, um zum einen die Expression des transgenen *Ce*-GST-p24-GFP-Fusionsproteins in BL1-Würmern zu reduzieren, und zum anderen, um das endogene *Ce*-GST-p24 in Wildtyp-Würmern posttranskriptionell auszuschalten. Zusätzlich konnte eine heterozygote Deletionsmutante für *Ce*-GST-p24 (*K08F4.7*) in die Studie mit einbezogen werden. Diese war beim Team des *C. elegans* Gene Knockout Projects der OMRF (Oklahoma City) zu Beginn meiner Arbeit in Auftrag gegeben und eigens für das Projekt erzeugt worden. Die Deletionsmutante wurde zusätzlich noch mit *Ce*-GST-p24 dsRNA behandelt, was zu einer weiteren Reduktion der verbliebenen *Ce*-GST-p24 führen sollte.

3.1.4.1. Überprüfung des RNAi-Effekts in BL1-C. elegans

Zunächst wurde in einem Experiment die Effizienz der *Ce*-GST-p24 RNAi in BL1-*C. elegans* überprüft. Dazu wurde der GFP-Fluoreszenzlevel in Kontroll-BL1-Würmern mit dem in BL1-Würmern verglichen, die drei Tage lang mit Bakterien gefüttert wurden, die *Ce*-GST-p24 dsRNA enthielten. Zur Verstärkung des Effekts wurden die Tiere für eine Stunde mit 200 µM Juglon oxidativ gestresst, um die Expression des Transgenes zu stimulieren. Bei der Visualisierung der GFP-Fluoreszenz am konfokalen Lasermikroskop zeigte sich, dass der Fluoreszenzlevel in RNAi-behandelten BL1-Würmern deutlich unter dem Level in Kontroll-BL1-Würmern lag (siehe Abb. 3.7). Die Fluoreszenz in den Kontrollwürmern - die drei Tage lang mit HT115 *E. coli* gefüttert wurden, die den pPD129.36-Vektor ohne Insert enthielten - war vergleichbar mit der in unbehandelten, gestressten BL1-Tieren, die mit *E. coli* OP50 gefüttert wurden (siehe Abb. 3.7). Durch die RNAi-Behandlung konnte jedoch kein vollständiger knock-out des *Ce*-GST-p24-GFP-Transgenes in BL1 erreicht werden. Sowohl in

L3-Larven als auch in adulten Hermaphroditen wurde eine deutliche Fluoreszenz im Pharynx beobachtet, und die Hypodermis beider Stadien zeigte ebenfalls eine leichte GFP-Fluoreszenz (siehe Abb. 3.9). In den Muskelfasern von RNAi-behandelten Würmern hingegen konnte keine Transgenexpression mehr nachgewiesen werden. Mit Hilfe des RNAi-feedings war es also möglich die Expression des *Ce*-GST-p24-GFP-Transgenes signifikant um mindestens 50 % zu verringern.



Abb. 3.9 RNAi-Effekt auf den GFP-Fluoreszenzlevel in oxidativ gestressten BL1-C. *elegans*. Der Fluoreszenzlevel spiegelt dabei direkt die Expression des Ce-GST-p24-GFP-Fusionsproteins wieder. Die RNAi-behandelten Tiere wurden drei Tage mit Bakterien gefüttert, die Ce-GST-p24 dsRNA produzierten. Kontrolltiere wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten, nur dass die von ihnen gefressenen Bakterien den pPD129.36-Vektor ohne Insert enthielten. Die RNAi-behandelten Würmer wiesen eine deutlich verringerte Transgenexpression auf, es konnte jedoch kein vollständiger knock-out des Transgens beobachtet werden.

3.1.4.2. Effekt des Ce-GST-p24-RNAi knock-outs unter Normalbedingungen

Zunächst wurde die Fragestellung untersucht, ob der funktionelle knock-out der *Ce*-GST-p24 in adulten Wildtyp-*C. elegans* durch RNAi-feeding einen Einfluss auf die Lebensspanne der Tiere unter Normalbedingungen hat. In einem Langzeitversuch wurde dazu die Lebenspanne von Wildtyp-*C. elegans* verglichen, die in der einen Population über die gesamte Versuchszeit

hinweg mit *Ce*-GST-p24 dsRNA-haltigen Bakterien gefüttert wurden. Die Kontrollpopulation wurde unter den gleichen Bedingungen gehalten, erhielt jedoch Futterbakterien, die nur den pPD129.36-Vektor ohne Insert enthielten und somit keinen RNAi-Effekt auslösen sollten. Pro RNAi-Behandlung wurden 50 Hermaphrodite bis zu ihrem natürlichen Tod beobachtet und die Überlebensrate festgehalten.



Abb. 3.30 Lebensspanne der Ce-GST-p24-RNAi-behandelten Wildtyp-C. elegans unter Normalbedingungen. Es wurde die Lebenspanne von RNAi-behandelten Wildtyp-Würmern mit der Lebensspanne von Wildtyp-Kontrollwürmern verglichen, die unter denselben Bedingungen mit Bakterien gefüttert wurden, die keine Ce-GST-p24 dsRNA produzierten. Der Versuch fand unter Normalbedingungen (18°C, normaler Luftdruck) statt. Pro Wurmpopulation wurden 50 Individuen beobachtet.

Es zeigte sich, dass die ersten Tiere bereits nach 4 Tagen starben, die Überlebensrate beider Populationen bis zum 9. Tag jedoch nur langsam bis auf 90 % (Kontrollwürmer) und 88 % (*Ce*-GST-p24-RNAi-behandelte Wildtyp-Würmer) absank (siehe Abb. 3.10). Die Überlebensraten der Wurmpopulationen setzten sich im weiteren Verlauf nahezu deckungsgleich fort und lassen darauf schliessen, dass der funktionelle knock-out der *Ce*-GST-p24 unter Normalbedingungen keine Veränderung der Lebenspanne in adulten Wildtyp-Hermaphroditen bewirkt. Nach 21 (RNAi-behandelte Wildtyp-Würmer) bzw. 23 Tagen (Kontrollwürmer) waren alle Würmer tot.

3.1.4.3. Toleranz der RNAi-behandelten *C. elegans* gegenüber oxidativem Stress

Die Toleranz der *C. elegans*-Stämme mit einer verringerten *Ce*-GST-p24-Expression gegenüber intrazellulär erhöhten Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies wurde anhand von drei verschiedenen Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Wird in RNAi-behandelten BL1-*C. elegans* die Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress erhöht?
- Zeigt die heterozygote Deletionsmutante f
 ür Ce-GST-p24 (K08F4.7) eine verringerte Resistenz gegen
 über oxidativem Stress, obwohl nur ein Allel des Genes deletiert ist?
- 3) Wie wirkt sich eine zusätzliche Behandlung mit Ce-GST-p24 dsRNA auf die K08F4.7-Deletionsmutante bzw. auf Wildtyp-C. elegans in Bezug auf ihre Toleranz gegenüber oxidativem Stress aus?



Abb. 3.11 Lebensspanne der RNAi-behandelten BL1-*C. elegans* in Kontakt mit intrazellulär erhöhten Superoxidanionradikalkonzentrationen. Die Lebensspanne der RNAi-behandelten BL1 liegt deutlich unter der der Kontroll-BL1, die mit Bakterien gefüttert wurden, die nur den pPD129.36-Vektor ohne Insert enthielten. Der Wildtyp-Phänotyp unter den gegebene Bedingungen konnte durch die *Ce*-GST-p24 dsRNA-Behandlung der BL1-Tiere nicht wieder erreicht werden. Die Experimente fanden in NGM-Flüssigmedium mit 230 μ M Juglon statt. Der Auswertung liegen drei unabhängige Experimente mit 25 Tieren pro Stamm zugrunde. Die mit (*) gekennzeichneten Werte unterscheiden sich nach statistischer Auswertung mit dem Students-t-Test signifikant von denen der unbehandelten BL1-Tieren (p = 0,05, Statistica).

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Überlebensrate von RNAi-behandelten BL1-Würmern mit der Überlebensrate von Kontroll-BL1-Würmern ohne RNAi-Effekt und Wildtyp-Würmern unter Einfluss von 230 μ M Juglon verglichen (siehe Abb. 3.11). Während nach 2 Stunden Inkubation noch 94 ± 5 % der unbehandelten BL1-Würmer, 93 ± 6 % der RNAi-behandelten BL1-Würmer und 39 ± 17 % der Wildtyp-Würmer lebten, sank die Überlebensrate nach 5 Stunden auf 82 ± 12 % der unbehandelten BL1-Würmer, 67 ± 10 % der RNAi-behandelten BL1-Würmer und 8 ± 7 % der Wildtyp-Würmer ab. Die Überlebensrate der Wildtyp-Würmer blieb nach diesen Zeitpunkt konstant, während die Rate der beiden anderen Stämme stetig bis auf 72 ± 8 % (Kontroll-BL1) und 49 ± 10 % (RNAibehandeltet BL1) nach 8 Stunden Inkubation absank. Die *Ce*-GST-p24 dsRNA-behandelten BL1-Würmer zeigten eine signifikant herabgesetzte Toleranz gegenüber intrazellulär induziertem oxidativen Stress. Durch die RNAi-Behandlung konnte jedoch nicht die unter diesen Bedingungen beobachtete Mortalitätsrate der Wildtyp-Tiere erreicht werden.

Die Überlebensrate der heterozygoten K08F4.7-Deletionsmutante wurde mit der Überlebensrate von BL1-Würmern und Wildtyp-Würmern unter Einfluss von oxidativem Stress verglichen (siehe Abb. 3.12 A). Die Juglonkonzentration musste dabei auf 150 μ M herabgesetzt werden, da bei der ursprünglich verwendeten Konzentration von 230 μ M Juglon die Tiere beider Stämme zu früh starben, um einen Unterschied zwischen den Wildtyp-Würmern und den Würmern der K08F4.7-Deletionsmutante messen zu können. In Kontakt mit der geringeren Juglonkonzentration zeigte sich eine deutlich verringerte Toleranz der K08F4.7-Deletionsmutante gegenüber dem induzierten oxidativen Stress.

Während nach 6 Stunden Inkubation noch nahezu 100 % der BL1- und Wildtyp-Würmer überlebten, war die Anzahl der überlebenden K08F4.7-Deletionsmutanten bereits um mehr als 25 % reduziert (74 ± 6 %). Nach 10 Stunden Inkubation lag die Überlebensrate der einzelnen Stämme bei 78 ± 2 % (BL1), 50 ± 10 % (Wildtyp) und 24 ± 8 % (K08F4.7-Deletionsmutante), d.h. die Überlebensrate der heterozygoten K08F4.7-Deletionsmutante lag unter den gegebenen Bedingungen um ca. 25 % unter der der Wildtyp-Würmern und noch deutlicher unter der Rate der BL1-Würmer. Die Deletion einer der *Ce*-GST-p24-Allele im Genom von *C. elegans* reicht also aus, um die Stresstoleranz der Tiere signifikant gegenüber der Stresstoleranz von Wildtyp-Würmern absinken zu lassen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, ob durch den zusätzlichen posttranskriptionellen knock-out der noch intakten *Ce*-GST-p24-Kopie durch RNAi eine weitere Verringerung der Toleranz gegenüber oxidativem Stress erreicht werden kann. Parallel dazu wurde der Effekt der Verfütterung von *Ce*-GST-p24 dsRNA-haltigen Bakterien auf die Stresstoleranz von Wildtyp-*C. elegans* untersucht.



Abb. 3.12 Effekt der heterozygoten Ce-GST-p24–Deletion (K08F4.7) und der zusätzlichen RNAi-Behandlung mit Ce-GST-p24 dsRNA auf die Stresstoleranz. Die Experimente fanden alle unter Einfluss von 150 μM Juglon statt. (A) Vergleich der Lebensspanne der heterozygoten K08F4.7-Deletionsmutante mit der Lebensspanne von BL1-Würmern und Wildtyp-Würmern. Die Daten basieren auf zwei unabhängigen Experimenten mit je 25 Tieren pro Stamm. (B) Lebensspanne der RNAi-behandelten K08F4.7-Deletionsmutante bzw. Wildtyp-C. elegans im Vergleich zu der Lebensspanne von Kontrolltieren derselben Stämme. Die Daten basieren auf drei unabhängigen Experimenten mit je 25 Tieren pro Stamm. Die mit (*) gekennzeichneten Werte unterscheiden sich signifikant von denen der RNAibehandelten Wildtyp-Tiere, der mit (§) gekennzeichnete Wert unterscheidet sich signifikant von dem der unbehandelten Wildtyp-Tiere und der mit (+) markierte Wert unterscheidet sich signifikant von dem der unbehandelten K08F4.7-Deletionsmutante (Students-t-Test, p = 0,05, Statistica).

Die Beobachtung der Überlebensrate unter Einfluss von 150 μ M Juglon zeigte in beiden Stämmen eine Verringerung der Stresstoleranz nach der Fütterung mit *Ce*-GST-p24 dsRNAhaltigen Bakterien (siehe Abb. 3.12 B). Die Tiere - egal von welchem Stamm bzw. mit welche Bakterien gefüttert – begannen nach 5 Stunden Inkubation zu sterben. Die Überlebensrate der Kontroll-*K08F4.7*-Deletionsmutanten sank daraufhin stetig bis auf 35 ± 11 % nach 10 Stunden Inkubation ab, während sich die Anzahl der überlebenden Tiere der RNAibehandelten *K08F4.7*-Deletionsmutante stetig bis auf 11 ± 9 % verringerte. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch im Falle der Wildtyp-Würmer. Nach 10 Stunden Inkubation lebten noch $55 \pm$ 3 % der Kontroll-Wildtyp-Würmer und 32 ± 25 % der RNAi-behandelten Wildtyp-Würmer. Die Stresstoleranz der *K08F4.7*-Deletionsmutanten halbierte sich durch die RNAi-Behandlung gegenüber den unbehandelten Tieren desselben Stammes. Wurden hingegen in Wildtyp-*C. elegans* die *Ce*-GST-p24 funktionell stillgelegt, so erreichte die verringerte Stresstoleranz nur das Level der heterozygoten *K08F4.7*-Deletionsmutanten. Dies entspricht einer Verringerung der Stresstoleranz um ca. 25 %, die damit nicht so deutlich ausfällt wie bei den *K08F4.7*-Deletionsmutanten.

3.1.4.4. Unterschiede zwischen den Entwicklungsstadien unter oxidativem Stress Wie bereits von Tawe (1998) durch Northern Blot-Analysen gezeigt werden konnte, gibt es einen signifikanten Unterschied bei der Induktion der *Ce*-GST-p24-Transkription zwischen Adulten und Larven des *C. elegans*-Wildtyp-Stammes (siehe 3.1.1). Larven produzieren nach einer Erhöhung des oxidativen Stresses in ihren Zellen über 40 mal mehr *Ce*-GST-p24 mRNA, wohingegen in einer gemischten *C. elegans*-Kultur nach oxidativer Stressinduktion die *Ce*-GST-p24-mRNA nur um das Doppelte anstieg. Damit drängt sich die Frage auf, ob ein totaler knock-out der *Ce*-GST-p24 durch RNAi in den Larvenstadien eine stärker herabgesetzte Stresstoleranz erzeugen würde, als in adulten Hermaphroditen.

Die Überlebensraten von L3-Larven und Adulten des Wildtyp-Stammes mit und ohne *Ce*-GST-p24 RNAi-Effekt wurden unter Einfluss von intrazellulär erhöhtem oxidativen Stress verglichen (siehe Abb. 3.13). Das erste Einzelexperiment fand unter Einfluss von 350 μ M Juglon statt und das zweite unter 230 μ M Juglon.

Es zeigte sich, dass bereits die L3-Larven ohne RNAi-Effekt in beiden Versuchen eine deutlich geringere Überlebensrate hatten als die erwachsenen Kontrollwürmer. Bereits nach zwei Stunden Inkubation unter Einfluss von 350 µM Juglon waren alle Larven tot, während die Überlebensrate der Kontrolladulten zu diesem Zeitpunkt bei 68 % und die der RNAibehandelten Adulten bei 44 % lag. Aber auch die Adulten wurden durch die hohe Konzentration reaktiver Sauerstoffradikale stark geschädigt: nach 4 Stunden Inkubation lebten nur noch 4,5 % der RNAi-behandelten Adulten und 9 % der Kontrolladulten. Unter Einfluss der hohen Juglonkonzentration war keine erhöhte Mortalität, d.h. kein deutlicher Überlebensnachteil durch die RNAi-Behandlung messbar.



Abb. 3.43 Effekt der Ce-GST-p24 dsRNA-Aufnahme auf die Überlebensrate verschiedener Entwicklungsstadien der Wildtyp-C. elegans unter Einfluss von intrazellulär erhöhten Sauerstoffradikalkonzentrationen. Es wurde die oxidative Stresstoleranz von RNAi-behandelten und -unbehandelten Wildtyp-L3-Larven mit der Toleranz von RNAi-behandelten und -unbehandelten Wildtyp-Würmern verglichen. Der intrazelluläre oxidative Stress wurde durch 350 und 230 µM Juglon induziert. Es sind jeweils die Daten von Einzelexperimente mit je 25 Individuen pro Stamm und Behandlung dargestellt.

Um die Unterschiede zwischen den RNAi-behandelten und unbehandelten *C. elegans* deutlicher herauszustellen, wurde die Juglonkonzentration im Medium auf 230 μ M gesenkt. Interessanterweise wurde in Kontakt mit der geringeren Juglonkonzentration deutlich, dass die *Ce*-GST-p24 RNAi-Behandlung die Stresstoleranz der Wildtyp-L3-Larven merklich verringerte. Nach einer Stunde Inkubation lebten bei beiden Larvenpopulationen 72 % der untersuchten Tiere. Nach 3,5 Stunden Inkubation waren alle RNAi-behandelten L3-Larven tot, während noch 28 % der unbehandelten Larven lebten. In den darauffolgenden 1,5 Stunden konnte keine weiteren tote Larve mehr gefunden werden. Die RNAi-behandelten Wildtyp-Adulten zeigten ebenfalls eine geringere Stresstoleranz unter Einfluss von 230 µM Juglon als die unbehandelten Adulten. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde lebten 100 % der Kontrolladulten und 89 % der RNAi-behandelten Adulten; die Überlebensrate sank stetig auf 70 % (Kontrolladulte) und 44% (RNAi-behandeltet Adulte) nach 3,5 Stunden Inkubation ab. In den darauffolgenden 1,5 Stunden starb kein RNAi-behandelter Wildtyp-Adulter mehr, während die Überlebensrate der Kontrolladulten weiter auf 50 % absank.

3.1.5. Promotorstudien des Ce-GST-p24-Promotors

3.1.5.1. Promotoranalyse in Säugerzelllinien

Es wurden Promotoraktivitätsstudien des *Ce*-GST-p24-Promotors in unterschiedlichen Säugerzelllinien durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Transfektionsplasmid hergestellt: 1500 bp upstream-Promotorregion der *Ce*-GST-p24-Genes wurde mit Hilfe der PCR aus genomischer *C. elegans*-DNA als Template amplifiziert. Dazu wurde das Primerpaar 5'PM-47/3'PM-47 verwendet. Das Amplifikationprodukt wurde gerichtet in die *Xho I/Hind* III-Restriktionsschnittstelle upstream des Luziferase-Reportergenes im pGL3-Enhancer-Vektor (Promega) ligiert. Die mammalischen CHO-Zellen wurden mit dem beschriebenen Transfektionsplasmid und mit dem Referenzplasmid pRL-TK (Promega) nach der in 2.2.14 aufgeführten Methode transfiziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit dem originalen pGL3-Enhancer-Plasmid ohne Promotor plus dem Referenzplasmid pRL-TK transfiziert.



Abb. 3.54 Relative Promotoraktivität des *Ce*-GST-p24-Promotors in CHO-Zellen unter Einfluss von oxidativem Stress. Die Aktivität des Promotors (1500 bp lang) wurde über die Luziferaseaktivität im Zellysat bestimmt. Diese wurde relativ zur basalen Luziferaseaktivität im Lysat von Zellen berechnet, die nur mit dem pGL3-Enhancer-Vektor transfiziert wurden. Der Messung liegen vier unabhängige Messreihen zugrunde.

Unter normalen Bedingungen ohne zusätzlichen oxidativen Stress konnte in den CHO-Zellen, in denen der *Ce*-GST-p24-Promotor die Aktivität der Luziferase regulierte, eine 4,7-mal höhere Lumineszenz gemessen werden als in den Zellen ohne Promotor (siehe Abb. 3.14).

Das zeigt, dass der Nematodenpromotor im mammalischen Zellsystem funktioniert. Wurden die transfizierten Zellen mit erhöhten Sauerstoffradikalkonzentrationen in Kontakt gebracht, wurde wiederum in den mit Promotorkonstrukten transfizierten Zellen eine erhöhte Lumineszens gemessen. Nach Inkubation mit 5 mM Paraquat lag der Messwert 4-mal höher, mit 5 mM H₂O₂ 3,2-mal höher, und mit 1 mM Xanthin/1 mU/ml Xanthinoxidase 5-mal höher als in den Kontrollzellen ohne Promotor. Durch den Kontakt zu erhöhten Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies wurde jedoch keine erhöhte Lumineszens und damit keine Induktion des Promotors beobachtet.



Abb. 3.15 Vergleich der relativen Promotoraktivität des *Ce*-GST-p24-Promotors in unterschiedlichen Säugerzelllinien. Die Luziferaseaktivität in transfizierten CHO-Zellen wurde mit der in COS-Zellen in Kontakt mit und ohne zusätzlichem oxidativem Stress gemessen. Die dargestellten Daten beruhen auf zwei unabhängigen Messreihen.

Um ausschliessen zu können, dass die ausbleibende Stressinduktion auf die Verwendung der CHO-Zellinie zurückzuführen ist, wurde der Versuch in COS-Zellen parallel zu CHO-Zellen in Kontakt mit 5 mM Paraquat wiederholt (siehe Abb. 3.15). In dieser Messreihe zeigte sich eine höhere Aktivität des Promotors in COS-Zellen (5-mal höher als die Kontrolle) gegenüber den parallel transfizierten CHO-Zellen (2,6-mal höher als die Kontrolle). Es fällt jedoch auf, dass die Aktivität in den CHO-Zellen bei dieser Versuchsreihe nur ungefähr 50 % der zuvor gemessenen Werte beträgt (s.o.). Auch in den COS-Zellen wird der Ce-GST-p24-Promotor durch den oxidativen Stress nicht induziert. Möglicherweise fehlen wichtige Transkriptionsfaktoren im heterologen mammalischen Zellsystem, die für die Aktivierung des C. elegans-Promotors essentiell sind, so dass die Stressinduktion in den Säugerzellen nicht
funktionieren kann. Die Studien wurden deshalb im heterologen System abgebrochen und im homologen *C. elegans*-System fortgesetzt.

3.1.5.2. Fluoreszenzmessungen im homologen C. elegans-System

Für die Promotoraktivitätsstudien in transgenen *C. elegans*-Stämmen wurden zwei Stämme mit unterschiedlich langen Fragmenten des *Ce*-GST-p24-Promotors verwendet (siehe Abb. 3.16). Der BL1-Stamm enthält 1000 bp des *Ce*-GST-p24-Promotors, die die Transkription des *Ce*-GST-p24-GFP-Fusionskonstrukts kontrollieren. Computeranalysen dieser 1000 bp der 5′- upstream-Region führten zur Identifikation von verschiedenen Transkriptionsfaktor-Bindestellen wie GATA-Boxen, vier NF-AT-Bindestellen, drei AP-1-Bindestellen und mehreren Boxen, die zur SOX-Familie gehören (SOX-5 und SRY). Die analysierte Promotor-region der *Ce*-GST-p24 enthält keine TATA-Box.

Parallel wurde noch zwei weitere transgene Stämme untersucht, die die Arbeitsgruppe von Chris Link bereits etabliert hatte. Der CL2166-Stamm enthält 727 bp des *Ce*-GST-p24-Promotors, die die Transkription von GFP kontrollieren (siehe Abb. 3.16). Dasselbe gilt auch für den CL3166-Stamm, der in Vergleich zu CL2166 jedoch nicht ausgekreuzt wurde. Durch die Verkürzung um 273 bp am 5'-Ende des Promotors fallen eine GATA-Box, eine NF-AT-Bindestelle, eine AP-1-Bindestelle und eine SRY-Bindestelle weg. Die Aktivität der Promotorfragmente konnte am GFP-Fluoreszenzlevel in den Nematoden detektiert werden. Dazu wurden die *C. elegans* der verschiedenen Stämme unter Bedingungen mit künstlich erhöhtem oxidativen Stress gehalten, und ihre GFP-Fluoreszenz mit der Fluoreszenz in Kontrollwürmern derselben Stämme ohne zusätzlichen oxidativen Stress verglichen. Die Messung erfolgte nach der in 2.2.18 beschriebenen Methode.

verschiedenen Chemikalien, intrazellulär In Kontakt mit drei die erhöhte Sauerstoffradikalkonzentrationen freisetzen – Plumbagin, Paraquat und Juglon - zeigte sich in allen drei Fällen eine deutlich erhöhte GFP-Fluoreszenz in den gestressten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren desselben Stammes (siehe Abb. 3.17). In Kontakt mit 200 µM Plumbagin lag der Fluoreszenzlevel in gestressten CL2166-Tieren 2,8-fach über dem der CL2166-Kontrolltiere, und in gestressten BL1 wurde eine gegenüber den BL1-Kontrolltieren 3,1-fach erhöhte Fluoreszenz gemessen. Bei Einsatz von 100 mM Paraquat zeigte sich ein ähnliches Bild: hier lag der Fluoreszenzlevel in gestressten Tieren um 2,1-mal (CL2166) und 2,9-mal (BL1) höher als in ungestressten. Ein besonders deutlicher Effekt wurde in Kontakt mit 200 μ M Juglon erzielt. Die Fluoreszenz war in gestressten Tieren um das 4,3-fache (CL2166) bzw. das 6,2-fache (BL1) gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Daraus folgt, dass der *Ce*-GST-p24-Promotor im homologen System durch intrazellulär erhöhten oxidativen Stress induziert wird. Es konnte jedoch kein deutlicher Unterschied zwischen der Promotoraktivität in CL2166-Würmern mit dem kürzeren Promotorfragment und der Aktivität in BL1-Würmern mit dem längeren Promotorfragment gemessen werden.



Abb. 3.66 Aufbau der Promotorfragmentkonstrukte in BL1- und CL2166/CL3166-C. *elegans*. Das Konstrukt in den BL1-Tieren liegt im pPD95.77-Vektor vor, das Konstrukt in den CL2166/CL3166-Tieren wurde in den pPD95.69-Vektor kloniert. In den BL1-Würmern wird die Transkription des Ce-GST-p24-GFP-Fusionsproteins von 1000 bp des Ce-GST-p24-Promotors kontrolliert, während in CL2166/CL3166-Würmern 727 bp des Ce-GST-p24-Promotors vor GFP kloniert sind.

Zusätzlich intrazellulär induzierten oxidativen Stress wurden zum noch das Hypoxanthin/XOD-System verwendet, um exogen erhöhte H₂O₂-Konzentrationen zu erzeugen. Unter diesen Bedingungen konnte kein Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden und damit eine Stimulation des Ce-GST-p24-Promotors mit grosser Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden (siehe Abb. 3.17). Auch unter UV-Lichtbestrahlung (1 min 10 J/m^2) und unter Einwirkung eines Hitzeschocks (1h 37°C) konnte der Ce-GST-p24-Promotor nicht aktiviert werden. In beiden Fällen wurden der CL2166- und der CL3166-Stamm mit dem kurzen Promotorfragment getestet. In beiden Stämmen konnte keine erhöhte Fluoreszenz unter Stress gemessen werden. Der BL1-Stamm wurde in diesen Experimenten nicht verwendet, da in den zusätzlichen 273 bp des Promotorfragments keine Hitzeschock- bzw. UV-Licht-abhängigen Boxen durch Computeranalysen gefunden werden konnten. Die Wirkung des Hitzeschocks auf den hsp-Promotor im CL2070-Stamm wird deutlich durch eine erhöhte Fluoreszenz sichtbar. Sie lag 2,7-fach höher als die in den Kontrolltieren ohne Hitzeschock.



Abb. 3.17 GFP-Fluoreszenzmessungen zur Detektion der Stressinduktion des Ce-GST-p24-Promotors. Vergleich der Aktivität von zwei Fragmenten des Ce-GST-p24-Promotors (727 bp und 1000 bp 5'-upstream-Region) im homologen C. elegans-System unter Einfluss von verschiedenen intrazellulär oder extrazellulär induzierten oxidativen Stresssituationen, UV-Licht oder Hitzeschock. Die Werte basieren auf Daten von jeweils drei unabhängigen Messreihen mit je 50 adulten hermaphroditen Würmern pro Messung. Standardabweichungen sind angegeben. CL2166/CL3166: (727 bp) pGST::GFP; BL1: (1000 bp) pGST::Ce-GST-p24-GFP. CL2070: hsp::GFP Positivkontrolle für das Hitzeschock-Experiment.

3.1.5.3. Auswertung am konfokalen Lasermikroskop

Die Aktivierung des *Ce*-GST-p24-Promotors und die damit verbundene GFP-Fluoreszenz in den CL2166- und den BL1-Würmern wurde zusätzlich noch am konfokalen Lasermikroskop visualisiert. Bereits in den Kontrollwürmern des CL2166- und des BL1-Stammes, die unter Normalbedingungen gehalten wurden, konnte eine schwache Fluoreszenz und damit eine Expression des *Ce*-GST-p24-GFP-Proteins detektiert werden (siehe Abb. 3.18). Im Vergleich dazu war in Wildtyp-Würmern unter denselben Bedingungen keine Fluoreszenz zu beobachten. Wurden die CL2166- und die BL1-Würmer mit erhöhten intrazellulären Sauerstoffkonzentrationen (200 μ M Juglon) in Kontakt gebracht, konnte in beiden Stämmen ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz detektiert werden. Der Effekt war in beiden Stämmen in L3-Larven stärker als in adulten Tieren.



Abb. 3.78 Induktion des *Ce*-GST-p24-Promotors durch intrazellulär erhöhte Sauerstoffradikalkonzentrationen in CL2166- und BL1-*C. elegans*. Die Position des Wildtyp-Tieres ist im Hellfeldphoto zu erkennen. Alle Photos entstanden 4 Stunden nach der Stressinduktion.

3.1.6. Rekombinantes Protein und Enzymaktivität

3.1.6.1. Expression und Aufreinigung der rekombinanten Ce-GST-p24

Die rekombinante *Ce*-GST-p24 wurde nach der in 2.2.25 beschriebenen Methode in Bakterien überexpremiert. Anschliessend erfolgte die Aufreinigung der nativen rekombinanten *Ce*-GST-p24 über Ni²⁺-NTA-Sepharose (siehe 2.2.26). Abb. 3.19 zeigt eine SDS-PAGE-Auftrennung von Proben der wichtigsten Zwischenschritte der Aufreinigung.



Abb. 3.89 SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression und Aufreinigung der rekombinanten *Ce*-GST-p24. Es sind Proben der einzelnen Zwischenschritte der Aufreinigung aufgetragen. Der Pfeil markiert die Stelle der fehlenden r*Ce*-GST-p24-Bande in der Durchflussfraktion. M = Protein-Leiter, P = Pelletfraktion mit den unlöslichen, membrangebundenen Proteinen, ÜS = Überstandsfraktion mit den löslichen Proteinen, FT = Durchflussfraktion nach der Ni²⁺-NTA-Sepharose-Säulenpassage, E1-E4 = Eluate mit aufgereinigter, nativer *Ce*-GST-p24. Die Molmasse der rekombinanten *Ce*-GST-p24 im SDS-PA-Gel beträgt 27 kDa.

Die rekombinante *Ce*-GST-p24 kann sowohl in der unlöslichen wie auch in der löslichen Proteinfraktion nach dem Aufschluss der Bakterien nachgewiesen werden. Nach der Säulenpassage der löslichen Proteine fehlt die r*Ce*-GST-p24-Bande in der Durchflussfraktion (Pfeil), was auf die gute Bindung des His-tags der r*Ce*-GST-p24 an die Ni²⁺-Ionen zurückzuführen ist. In den Eluatproben ist die reine rekombinante *Ce*-GST-p24 enthalten. Die rekombinante *Ce*-GST-p24 weist eine Molmasse von 27 kDa im SDS-Polyacrylamidgel auf. Aus 500 ml Bakterienkultur konnten 10-20 mg aufgereinigte native *Ce*-GST-p24 gewonnen werden. Das native Protein wurde für die Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung von *Ce*-GST-p24-Antiserum, aber auch für Enzymaktivitätstest genutzt.

3.1.6.2. Messung der Enzymaktivität

Die verschiedenen Klassen der Glutathion S-Transferasen können unter anderem aufgrund der spezifisch umgesetzten Substratmuster voneinander abgegrenzt werden. Es ist noch sehr wenig über die spezifische Aktivität der Glutathion S-Transferasen in Nematoden bekannt. Um mehr über die *Ce*-GST-p24 herauszufinden, wurde die Enzymaktivität des aufgereinigten, rekombinanten Proteins mit verschiedenen Substraten nach den in 2.2.32 aufgeführten Enzymaktivitätstests detektiert. Neben der Aktivitätsbestimmung mit dem GST-Universalsubstrat CDNB, wurde besonders auf die Umsetzung von Lipid-Peroxidationsprodukten – die leicht bei der radikalischen, oxidativen Schädigung von zellulären Lipiden entstehen – geachtet. Die Aktivität der aufgereinigten, rekombinanten *Ce*-GST-p24 mit CDNB war mit 123.0 ± 4.0 µmol min⁻¹ mg⁻¹ hoch. Die gute Umsetzung von Cumenhydroperoxid (45.5 ± 10.6 µmol min⁻¹ mg⁻¹) weist auf die Peroxidaseaktivität der GST hin. Die Konjugation von reduziertem Glutathion und *Trans*-2-nonenal wurde ebenfalls von der *Ce*-GST-p24 katalysiert. Es wurde eine spezifische Aktivität mit *Trans*-2-nonenal von 4.5 ± 0.65 µmol min⁻¹ mg⁻¹ gemessen.

3.2. Die C. elegans Glutathion S-Transferase Ce-GST-p29

3.2.1. Warum ist dieses Gen aus C. elegans interessant?

Die Glutathion S-Transferase *Ce*-GST-p29 aus *C. elegans* (Cosmidnummer *C29E4.7*) wurde aufgrund ihrer Aminosäuresequenzhomologie zu verschiedenen stressinduzierbaren Proteinen in die vorliegende Studie aufgenommen (Kodym et. al., 1999). Die *Ce*-GST-p29 weist zum Beispiel 28 % Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz der stressinduzierbaren *Ov*-GST-3 auf (Kampkötter, persönliche Mitteilung). Aufgrund dieser strukturellen Übereinstimmung mit verschiedenen Proteinen, die in Stresssituationen im Organismus aktiv sind, ist zu vermuten, dass die *Ce*-GST-p29 ebenfalls eine wichtige Rolle in der Familie der antioxidativen Enzyme spielt.

3.2.2. Struktur des Ce-GST-p29-Genes und des Ce-GST-p29-Proteins

Durch Recherchen in der *C. elegans*-Genomdatenbank konnte die genomische Sequenz der *Ce*-GST-p29 ausfindig gemacht (Cosmidnummer *C29E4.7*) und analysiert werden. Das Gen der *Ce*-GST-p29 (ohne die 3'-untranslatierte Region) hat eine Grösse von 1430 bp und beinhaltet vier Exons und drei Introns (Intron 1: bp-Position 150-229, Intron 2: bp-Position 450-987, Intron 3: bp-Position 1114-1164). Die codierende Region der cDNA ist 753 bp lang und codiert für ein aus 250 Aminosäuren zusammengesetztes Protein (siehe Abb. 3.20). Die daraus resultierende berechnete Masse des *Ce*-GST-p29-Monomers beträgt 28,5 kDa.

Die in Abb. 3.20 in der Sequenz der *Ce*-GST-p29 hellgrau unterlegten Aminosäuren spielen bei der Bindung zwischen dem aktiven Zentrum der Omega-Klasse-GSTs und reduziertem Glutathion eine zentrale Rolle (Board et. al., 2000). Sie finden sich hochkonserviert in der Sequenz der *Ce*-GST-p29 wieder. Dies gibt einen ersten Hinweis auf die nahe Verwandtschaft zu den Omega-Klasse GSTs. Zusätzlich zu diesen Bindestellen konnten noch zwei weitere Sequenzmotive gefunden werden, die hochkonserviert sowohl in der stressinduzierbaren *Ov*-GST-3 (Liebau et. al., 2000) als auch in der *C. elegans*-GST *F13A7.10* – die die höchste Homologie innerhalb der *C. elegans*-GSTs zu *Ce*-GST-p29 aufweist - vorkommen: das zentral im Protein lokalisierte EYLDD- bzw. ILP-Motiv.

Der isoelektrische Punkt der *Ce*-GST-p29, der anhand der Aminosäuresequenz ermittelt wurde, beträgt pI = 5,35. Demnach zählt die GST-p29, genauso wie die GST-p24 aus *C. elegans*, zu den sauren Proteinen.

1	ATG	GTT	TTA	ACC	GGA	GTA	ACA	TCA	AAA	GCA	ATT	'CGA	AAA	GGA	.GAT	'GCG	GAA	CCT	CCG	СТА
	М	V	L	т	G	V	т	S	K	Α	I	R	K	G	D	А	\mathbf{E}	Ρ	Ρ	L
61	TCA	AAG	GGA	TCT	TTT	'CGT	GTC	TAC	AAC	ATG	AGA	TTC	TGT	CCA	TGG	GCT	GAA	AGA	GCA	ATG
	S	К	G	S	\mathbf{F}	R	V	Y	N	М	R	F	C	Р	W	А	\mathbf{E}	R	А	м
121	CTT	'TAT	GTT	GCA	GCT	'AAA	GGA	ATT	'G AA	GCG	GAG	GTA	GTC	AAT	CTC	AAC	GTA	ACT	GAC	AAA
	L	Y	v	А	А	ĸ	G	I	E	A	\mathbf{E}	V	V	N	T.	N	V	т	D	ĸ
181	CTT	'GAA	TGG	TAC	TGG	ACA	AAA	CAT	TAT	'CAG	GGA	AAG	GCT	CCA	.GCA	GTA	GAG	CAC	AAT	GGA
	L	\mathbf{E}	W	Y	W	т	ĸ	н	Y	0	G	ĸ	А	Р	A	V	\mathbf{E}	н	N	G
241	AAA	GTG	GTC	'ATT	'GAG	TCT	'GGA	TTT	'ATT	CCT	'GAA	TAT	TTG	GAT	GAT	'GCA	TTT	CCA	GAA	ACT
	ĸ	v	v	Т	E	S	G	F	Т	Р	E	Y	L	D	D	А	F	Р	\mathbf{E}	т
301	CGT	'ATT	CTT	CCA	ACT	'GAC	CCG	TAC	GAA	AAG	GTG	CAA	CAA	AAG	CTG	СТА	GCG	GAC	AGG	TTA
	R	I	L	Р	т	D	Р	Y	E	ĸ	v	0	0	ĸ	L	L	А	D	R	L
361	ACT	'GC G	GTA	GCC	CAT	'GCA	GTT	CCA	TTG	CTC	TTC	:GCC	GTC	ATG	CGA	GAC	CGA	ACT	TTG	AAA
	т	A	v	А	н	А	v	Р	L	L	F	А	v	М	R	D	R	т	L	К
421	GAT	'GAA	AAG	CAG	CGA	ААА	GTT	TTT	'GAA	GTT	TTG	AAA	CAA	GCT	'GAA	AAT	CTC	TTG	GCC	AAT
	D	F	ĸ	0	R	ĸ	v	 न	F	v	Т.	ĸ	0	A	F	N	т.	т.	A	N
481	GAT	TTT	TAT	'GCT	' GG A	TCT	'CAA	CCA		- TAT		GAC	TAC	TTA	TCA	TTT	CCA	TTT	TTT	'GAG
	D	 न	Y	A	G	S	0	P	G	Y	P	D	Y	т.	S	 ਸ	P	 ਸ	 ਸ	E
541	AAA	ATT	TGG	 TGC	TCA	GCT	'AGT	_ 'TTG	GAT	'GGA	GTT	GTC	GAT	 ТТА	CCA	ACA	ATT	GAA	TTC	CCA
011	ĸ	т	W	W	S	Δ	S	т.	D	G	v	v	D	т.	P	т.	т	E.	ਾ	P
601	GGA	GAA	GAA	GAA	тат	ירריד	בם מממי	TTG			TGG	י דידר			атс	 АТТ	 ТСТ	 ТСА	- GAT	- 'GTT
001	G	F.	F:	F.	Y	P	ĸ	т.	T	ĸ	W	ਿਸ	0	ĸ	M	т	S	S	D	V
661	GTT	 מביחי		<u></u> 'GTС	- 1200	ב ממיחי	TCT	 'TTG	- CDD	Сат		- 'GСТ	, rac⊿	 TTC	ם דר מידר		GCA	тат	GCC	ACG
001	37	0	S	37	-100 Т	0	S	т.	н. Т	н	G	Δ	A	 	M	N	D	v	A	т Т
721	CAC			v TTTC	ב. יאמי	ע יד⊿ידי	ы Парт	 הידידים			с тса	-	А	т.	1.1	ТЛ		Ŧ		-
121	H	0	E	L	N	Y	D	L	G	L	*	-								

Abb. 3.20 cDNA-Sequenz der Ce-GST-p29 (Cosmidnummer C29E4.7) und die resultierende Aminosäuresequenz des Proteins. Zwischen den in der Nukleinsäuresequenz markierten Basen (unterstrichen und fett gedruckt) wurde jeweils ein Intron herausgespleißt. Die in der Aminosäuresequenz dunkelgrau unterlegten Aminosäuren spielen bei der Bindung des Glutathions am aktiven Zentrum der Omega-Klasse GSTs eine wichtige Rolle (Board et. al., 2000). Die mit dunkelgrau unterlegten Aminosäuren kommen sowohl in der stressinduzierbaren Ov-GST-3 als auch in der C. elegans-GST F13A7.10 vor, die die höchste Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz der Ce-GST-p29 in C. elegans aufweist.

3.2.3. Etablierung des BL2-C. elegans-Stammes

Die Etablierung des transgenen BL2-*C. elegans*-Stammes – der die *Ce*-GST-p29 als GFP-Fusionsprotein überexpremieren soll - verlief parallel zu der Etablierung des BL1-Stammes. In Wildtyp-*C. elegans* wurde mit der in 2.2.15 beschriebenen Methode in diesem Fall ein Plasmidgemisch des *Ce*-GST-p29-Konstrukts im pPD95.77-Vektor und des Markerplasmids pRF4 mikroinjiziert. Der BL2-Stamm ist - wie der BL1-Stamm - ein nichtintegrierter Stamm. Bei ihm zeigten nach der F6-Generation und den darauffolgenden Generationen 40-50 % der Nachkommen den Rollerphänotyp, d.h. sie waren transgen.



Abb. 3.21 Struktur des Mikroinjektionsplasmids zur Etablierung des BL2-*C. elegans-Stammes.* Es enthält die genomische Sequenz des *Ce-*GST-p29-Genes ohne Stopcodon, wodurch die Fusion mit dem im pPD95.77-Vektor codierten GFP möglich ist. Die Transkription des Fusionskonstrukts steht unter der Kontrolle des *Ce-*GST-p29-Promotors.

3.2.3.1 Nachweis der Ce-GST-p29-GFP-Plasmid-DNA in BL2-C. elegans

Die Anwesenheit des Mikroinjektionsplasmids pPD95.77 mit dem in ihm enthaltenen *Ce*-GST-p29-GFP-Transgen wurde ebenfalls mittels einer "single-worm"-PCR überprüft. Mit Hilfe des 5′- und des 3′-GFP-Primers wurde die im pPD95.77-Plasmid enthaltene GFP-Sequenz amplifiziert. Es zeigte sich eine im Vergleich zur CL2166-Positivkontrolle sehr schwache Bande in der erwarteten Grösse von 507 bp (siehe Abb. 3.22).



Abb. 3.22 Elektrophoretische Auftrennung der "single-worm"-PCR-Proben in einem Agarosegel. Als Template für die PCR wurden (von links nach rechts) folgende DNA-Proben eingesetzt: MiP GST-p24 bzw. -p29 = reine Plasmid-DNA des Mikroinjektions-plasmids pPD95.77-*Ce*-GST-p24 bzw. pPD95.77-*Ce*-GST-p29; Wildtyp, CL2166, BL2 = Einzelwürmer des jeweiligen aufgeführten *C. elegans*-Stammes im PCR-Ansatz.

Die restlichen Proben entsprechen den bereits in 3.1.2.1 besprochenen Ergebnissen. Bei der Reproduktion des Ergebnisses mit weiteren Einzelindividuen des BL2-Stammes konnte die Amplifikationsrate immer nur in der präsentierten sehr niedrigen Konzentration beobachtet werden.

3.2.4. Effekte des Ce-GST-p29-knock-outs

3.2.4.1. Effekt des Ce-GST-p29-RNAi knock-outs unter Normalbedingungen

Der funktionelle posttranskriptionelle knock-out der endogenen *Ce*-GST-p29 in Wildtyp-*C. elegans* wurde mit Hilfe der RNAi-feeding-Methode erreicht (siehe 2.2.16). Die Bakterien, die dabei von den Wildtyp-*C. elegans* gefressen wurden, enthielten hohe Konzentration der *Ce*-GST-p29 dsRNA. Wie bei der *Ce*-GST-p24 wurde auch hier die Frage untersucht, ob die Verringerung der *Ce*-GST-p29-Expression im Wildtyp-Wurm eine Veränderung der Toleranz des Wurms gegenüber oxidativem Stress nach sich zieht. Zunächst wurde unter Normalbedingungen die Lebenspanne von Wildtyp-Würmern mit und ohne funktionellem knock-out der *Ce*-GST-p29 verglichen.

Im Falle des funktionellen knock-outs der *Ce*-GST-p29 in Wildtyp-Würmern konnte wie im Falle der *Ce*-GST-p24 auch keine veränderte Lebenspanne unter Normalbedingungen beobachtet werden (siehe Abb. 3.23). Die beiden Überlebenskurven der Wurmpopulationen mit und ohne RNAi-Effekt zeigten einen nahezu parallelen Verlauf, wobei die Überlebensrate der Kontrolltiere in diesem Experiment immer leicht unter der Rate der RNAi-behandelten Tiere lag. Es kann jedoch nicht von einem deutlichen Effekt gesprochen werden. Nach 23 Tagen waren auch in diesem Experiment alle Tiere tot.



Abb. 3.23 Lebensspanne von Ce-GST-p29-RNAi-behandelten Wildtyp-C. elegans unter Normalbedingungen. Es wurde die Lebenspanne von RNAi-behandelten Wildtyp-Würmern mit der von Wildtyp-Kontrollwürmern verglichen, die unter denselben Bedingungen HT115-Bakterien frassen, die keine Ce-GST-p29 dsRNA produzierten. Der Versuch fand unter Normalbedingungen (18°C, normaler Luftdruck) statt. Pro Wurmpopulation wurden 50 Individuen beobachtet.

3.2.4.2. Unterschiede zwischen den Entwicklungsstadien unter oxidativem Stress

Daraufhin wurde die Überlebensraten von L3-Larven und Adulten des Wildtyp-Stammes mit und ohne *Ce*-GST-p29-RNAi-Effekt unter Einfluss von intrazellulär erhöhtem oxidativen Stress verglichen (siehe Abb. 3.24). Die Einzelexperimente fanden wie bei den Versuchen mit *Ce*-GST-p24 dsRNA unter Einfluss von 350 μ M Juglon und 230 μ M Juglon statt. Pro Entwicklungsstadium und RNAi-Bedingung wurden jeweils 25 Individuen beobachtet. Es zeigte sich, dass bereits die L3-Larven ohne RNAi-Effekt in beiden Versuchen eine deutlich geringere Überlebensrate hatten als die erwachsenen Kontrollwürmer. Schon nach 1,5 Stunden Inkubation unter 350 μ M Juglon waren alle Larven tot, während die Überlebensrate der Kontrolladulten zu diesem Zeitpunkt bei 73 % und die der RNAi-behandelten Adulten bei 61 % lag. Aber auch die Adulten wurden durch die hohe Konzentration reaktiver Sauerstoffradikale stark geschädigt: nach 4 Stunden Inkubation lebten nur 9 % der Kontrolladulten, während alle RNAi-behandelten Adulten zu diesem Zeitpunkt bereits tot waren. Unter Einfluss der hohen Juglonkonzentration war kein deutlicher Überlebensnachteil durch die RNAi-Behandlung messbar.



Abb. 3.24 Effekt der Ce-GST-p29 dsRNA-Aufnahme auf die Überlebensrate unterschiedlicher Entwicklungsstadien der Wildtyp-C. elegans unter Einfluss von intrazellulär erhöhten Sauerstoffradikalkonzentrationen. Es wurde die oxidative Stresstoleranz von RNAi-behandelten und –unbehandelten Wildtyp-L3-Larven mit der Toleranz von RNAi-behandelten und -unbehandelten Wildtyp-Würmern verglichen. Der oxidative Stress wurde durch 350 bzw. 230 µM Juglon induziert. Es sind jeweils die Daten von Einzelexperimenten mit je 25 Individuen pro Stamm und Behandlung dargestellt.

In der Versuchsreihe mit geringerer Juglonkonzentration (230 μ M) wurde die Stresstoleranz der Larven durch die *Ce*-GST-p29-RNAi-Behandlung deutlich verringert. Nach einer Stunde Inkubation lebten bei der RNAi-behandelten Larvenpopulation 50 % der untersuchten Tiere und 72 % der unbehandelten Kontrolltiere. Im Laufe der nächsten 4 Stunden nahm die Zahl der überlebenden RNAi-behandelten L3-Wildtypwürmer parallel zu der der unbehandelten Larven ab, wobei die Kurve der RNAi-behandelten Larven stets unter der der unbehandelten Larven blieb. Die RNAi-behandelten Adulten zeigten deutlich eine geringere Stresstoleranz unter Einfluss von 230 μ M Juglon als die unbehandelten Adulten. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde lebten 100 % der Kontrolladulten und 95 % der RNAi-behandelten Adulten; die Überlebensrate sank danach stetig auf 70 % (Kontrolladulte) und 35 % (RNAi-behandelte Adulte) nach 3,5 Stunden Inkubation ab. In den darauffolgenden 1,5 Stunden sank die Überlebensrate der RNAi-behandelten Adulten langsam auf 25 % ab, während sich die Überlebensrate der Kontrolladulten auf 50 % verringerte.

3.2.5. Rekombinantes Protein und Enzymaktivität

3.2.5.1. Expression und Aufreinigung der rekombinanten Ce-GST-p29

Die rekombinante Glutathion S-Transferase *Ce*-GST-p29 wurde nach der in 2.2.25 beschriebenen Methode in Bakterien überexpremiert. Anschliessend erfolgte die Aufreinigung des nativen *Ce*-GST-p29-Proteins über Ni²⁺-NTA-Sepharose (siehe 2.2.26). Abb. 3.25 zeigt eine SDS-PAGE-Auftrennung von Proben der wichtigsten Zwischenschritte der Aufreinigung.



Abb. 3.25 SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression und Aufreinigung der rekombinanten *Ce*-GST-p29. Es sind Proben der einzelnen Zwischenschritte der Aufreinigung aufgetragen. Der Pfeil markiert die in der unlöslichen Proteinfraktion vorliegende r*Ce*-GST-p29, die für die native Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-Sepharose nicht verwendet werden konnte. M = Proteinleiter, P = Pelletfraktion mit den unlöslichen, membrangebundenen Proteinen, ÜS = Überstandsfraktion mit den löslichen Proteinen, FT = Durchflussfraktion nach der Ni²⁺-NTA-Sepharose-Säulenpassage, E1-E4 = Eluate mit aufgereinigter, nativer *Ce*-GST-p29. Die Molmasse der rekombinanten *Ce*-GST-p29 im SDS-PA-Gel beträgt 31 kDa.

Die Aufreinigung von nativem r*Ce*-GST-p29 stellte sich als deutlich schwieriger heraus als bei der *rCe*-GST-p24, da der Hauptteil der r*Ce*-GST-p29 in unlöslicher Form vorlag. Er konnte deutlich in der Probe mit den unlöslichen Proteinen nachgewiesen werden (Pfeil). Diese unlösliche Fraktion der r*Ce*-GST-p29 konnte für die native Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-Sepharose nicht verwendet werden und ging damit bei jeder Aufarbeitung verloren. Es ist kein Unterschied zwischen den Proben mit löslichen Proteinen vor und nach der Säulenpassage im SDS-Polyacrylamidgel zu erkennen. Trotzdem muss ein kleiner Teil der GST in löslicher Form vorgelegen haben, denn in den Eluatproben 1 bis 3 ist mit abnehmender Konzentration die aufgereinigte native r*Ce*-GST-p29 nachzuweisen. In der Eluatprobe 4 ist so wenig Protein enthalten, dass es nicht mehr im Gel mit der Coomassiefärbung sichtbar gemacht werden kann. Die Molmasse der rekombinanten *Ce*-GST-p29 liegt im SDS-Polyacrylamidgel bei 31 kDa. Aus 500 ml Bakterienkultur konnten nur 1-2 mg aufgereinigte native *Ce*-GST-p29 gewonnen werden. Das isolierte, native rekombinante Protein wurde zu Messung der Enzymaktivität verwendet.

3.2.5.2. Messung der Enzymaktivität

Die Aktivität der aufgereinigten, rekombinanten *Ce*-GST-p29 mit dem GST-Universalsubstrat CDNB war mit 18,4 \pm 1,4 µmol/min/mg um 90 % niedriger als die Aktivität der *Ce*-GST-p24 unter denselben Bedingungen. Die Konjugation von reduziertem Glutathion und *Trans*-2-nonenal wurde ebenfalls von der *Ce*-GST-p29 katalysiert. Es wurde eine spezifische Aktivität mit *Trans*-2-nonenal von 6,1 \pm 1,75 µmol/min/mg gemessen, d.h. die *Ce*-GST-p29 setzte auch Lipidperoxidationsprodukte um. Eine Peroxidaseaktivität und eine Thioltransferaseaktivität der r*Ce*-GST-p29 wurden nicht detektiert.

4. Diskussion

Alle aerob lebenden Organismen kommen ständig mit reaktiven Sauerstoffspezies in Kontakt, die unter anderem zu einer Schädigung des Genoms, Störung essentieller Stoffwechselprozesse und zu Membrandeformierungen führen können. Der Schutz gegen die Sauerstoffradikale und die von ihnen induzierten reaktiven Oxidationsprodukte stellt deshalb einen lebensnotwendigen Prozess in der aeroben Zelle dar. Dabei greifen nichtenzymatische und enzymatische Systeme ineinander, wie bereits in der Einleitung geschildert wurde (Bast & Goris, 1989; Girotti, 1998; Sies, 1986; Sies, 1991).

Besondere Bedeutung kommt dabei dem Zusammenspiel des Tripeptids Glutathion und den von ihm abhängigen Detoxifikationsenzymen (Glutathionperoxidasen, Glutathion S-Transferasen) bei der Bekämpfung von oxidativem Stress zu (Hayes & McLellan, 1999; Ketterer & Meyer, 1989; Sheehan et. al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei stressinduzierbare Glutathion S-Transferasen aus *C. elegans* strukturell und funktionell analysiert. Die Mitglieder der GST-Superfamilie des Modellorganismus wurde bisher noch nicht detailliert untersucht, so dass ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Einordnung der GSTs aufgrund von strukturellen und biochemischen Eigenschaften in das bereits existierende System der GST-Klassen lag. Ein viel wichtigerer Punkt bestand aber in der Aufdeckung einer möglichen Korrelation zwischen dem Expressionslevel der *Ce*-GST-p24 und der Stresstoleranz bzw. der Lebensspanne des Nematoden.

4.1. Strukturvergleich der untersuchten GSTs aus C. elegans

4.1.1. Die Genstruktur der Ce-GST-p24 und der Ce-GST-p29

C. elegans-Gene bestehen - wie Gene in anderen Eukaryonten auch - aus codierenden Exonsequenzen, die durch nichtcodierenden Intronsequenzen voneinander getrennt sind. Die Introns in *C. elegans* sind mit einer mittleren Grösse von 50 bp im Vergleich zu anderen Eukaryonten relativ klein (Blumenthal & Thomas, 1988). Das *Ce*-GST-p24-Gen hat drei Introns mit einer Länge von 55 bp, 44 bp und 46 bp. Intron 1 und Intron 3 des *Ce*-GST-p29-Genes liegen mit 79 bp und 50 bp ebenfalls in diesem Bereich. Das mittlere Intron 2 des *Ce*-GST-p29-Genes fällt jedoch mit einer Grösse von 537 bp deutlich aus dem Rahmen. Mit fortschreitender Analyse der *C. elegans*-Gene wird deutlich, dass auch grosse Introns mit mehr als 500 bp im Nematoden keine Ausnahme sind (Kennedy et. al., 1993)(The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Sie bilden im Vergleich zu den kurzen Introns aber eine Minderheit.

Wie in anderen Eukaryonten werden die Grenzen eines Introns in *C. elegans* meist nach der sogenannten GT/AG-Regel festgelegt, die besagt, dass eine Intronsequenz mit den Basen GT beginnt und mit dem Basenpaar AG endet. Die Introns im *Ce*-GST-p24-Gen und im *Ce*-GST-p29-Gen werden alle streng nach dieser Regel herausgespleißt. Desweiteren konnte für *C. elegans*-Gene eine erweiterte Consensussequenz für Introngrenzen beschrieben werden. Viele Introns in *C. elegans* beginnen danach mit der Sequenz **GT**RART (wobei R eine Purinbase ist) und enden mit der Sequenz TTTC**AG** (Fields, 1990). Diese Sequenzen wurde auch an Beginn und Ende der Intron der beiden untersuchten GST-Gene gefunden, wobei besonders die 3'-Endsequenz in den Introns des *Ce*-GST-p29-Genes gut konserviert ist.

Neben dem bei Eukaryonten üblichen cis-Spleißen, bei dem die Intronsequenzen aus einem Gen gezielt herausgeschnitten werden, gibt es in C. elegans zusätzlich noch das sogenannte trans-Spleißen. Bei diesem Prozess werden die Transkripte von Exons miteinander ligiert, die an vollständig unabhängigen Orten des Genoms codiert sind. Das trans-Spleißen wurde erstmalig in Trypanosomen beschrieben (Murphy et. al., 1986; Nelson et. al., 1983), konnte jedoch später auch in Kinetoplastida, Flaggellaten, Nematoden und Trematoden nachgewiesen werden (Bektesh, 1988; Nilsen, 1989; Nilsen, 1992; Zeng et. al., 1990). Bei Trypanosomen werden 100 % der Gene trans-gespleißt, bei Ascaris suum 90 % und bei C. elegans rund 70 % (Davis, 1996). Nematoden sind damit die einzige Tiergruppe, die cis- und trans-Spleißen innerhalb der Prozessierung eines einzigen mRNA-Stranges aktivieren. An trans-gespleißten mRNAs bzw. cDNAs befindet sich am 5'-Ende eine zusätzlich angehängte Sequenz, der "spliced leader" (SL). Es wird vermutet, dass mRNAs mit einem 5'spliced leader-Cap eine erhöhte Stabilität und Lebensdauer haben und dadurch eine erhöhte Translationseffizienz aufweisen (Davis et. al., 1995). In C. elegans wurden zwei Hauptformen des SL beschrieben, SL1 und SL2, die jeweils eine spezifische Sequenz aus 22 Nukleotiden aufweisen (Huang & Hirsh, 1989; Krause & Hirsh, 1987). Neben diesen Hauptformen existieren in C. elegans für SL2 noch mehrere Nebenformen, deren Sequenz sich in ein bis vier Basenpositionen von der Hauptform unterscheiden (Kuwabara & Kimble, 1992). In den cDNA-Sequenzen von Ce-GST-p24 und Ce-GST-p29 konnte bis jetzt jedoch keine SL-Sequenz gefunden werden, was darauf hindeutet, dass die beiden GSTs zu den rund 30 % der C. elegans-Transkripten gehören, die nicht trans-gespleißt werden.

4.1.2. Ce-GST-p24 passt strukturell in die nematodenspezifische GST-Klasse

Glutathion S-Transferasen sind eine sehr heterogene Enzymfamilie. Die Primärstruktur der Proteine gibt jedoch einen wichtigen Hinweis auf die mögliche Zugehörigkeit zu einer spezifischen GST-Klasse. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der Ce-GST-p24 mit homologen Glutathion S-Transferasen macht deutlich, dass die C. elegans-GST strukturell nur schwierig in das bestehende Schema der GST-Klassen einzuordnen ist. Die grösste Homologie - mit 53 % Übereinstimmung - weist das Protein zu einer GST aus C. elegans mit der Cosmidnummer Y53F4B.33 auf, über die noch keine genaueren Analysen angefertigt wurden. Nähere Schlüsse auf eine mögliche strukturelle Einordnung lässt die Homologie zur As-GST-1 aus Ascaris suum zu. Die Aminosäuresequenz der Ce-GST-p24 stimmt in 51 % mit der Sequenz der As-GST-1 überein, was auf eine nahe Verwandtschaft der beiden GSTs schliessen lässt. Desweiteren weist die Ce-GST-p24 hohe Homologien zu den zwei C. elegans-GSTs K08F4.6 (49 %) und K08F4.11 (47 %) auf, mit denen sie in 5'- zu 3'-Ausrichtung im Genom benachbart ist. K08F4.6 und K08F4.11 liegen mit nur 204 bp Abstand im Genom direkt hintereinander. Eine ähnliche Anordnung wurde bereits für zwei Pi-Klasse GSTs aus der Maus beschrieben, die ebenfalls ein Tandem ausbilden, und die zueinander ein hohe Homologie von über 90 % in der Aminosäuresequenz aufweisen (Xu & Stambrook, 1994). Die Sequenzen der K08F4.6 und K08F4.11 hingegen gleichen sich in nur 43 %.

Auffällig ist, dass *Ce*-GST-p24 ausschliesslich zu nematodischen Glutathion S-Transferasen mehr als 40 % Sequenzhomologien aufweist. Die höchste Übereinstimmung mit einem mammalischen Protein konnte zu einer haematopoetischen Prostaglandin D2-Synthase-2 aus *Mus musculus* (Genbank Nr. D82072) nachgewiesen werden. Sie betrug 37 %. Diese strukturelle Differenz der Glutathion S-Transferasen aus Nematoden zu GSTs aus höheren Vertebraten ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass sich vermutlich im Laufe der Evolution eine nematodenspezifische GST-Klasse ausgebildet hat. Durch Vergleiche putativer GSTs aus dem theoretischen Proteom von *C. elegans* mit Aminosäuresequenzen von GSTs anderer Organismen fanden Campbell *et. al.* (2001) viele *C. elegans*-GSTs, die nicht in das bisher beschriebene GST-Klassensystem eingeordnet werden konnten. Untereinander weisen diese GSTs jedoch in manchen Fällen hohe Sequenzhomologien mit mehr als 60 % auf. Dies spricht für die Entdeckung einer neuen GST-Klasse. Zu diesen nematodenspezifischen GSTs zählen auch die bereits oben erwähnte *As*-GST-1 und eine GST aus *Haemonchus contortus* (Campbell et. al., 2002; van Rossum, 2002 im Druck).

Ce-GST-p24	MPNYKLL YF DARALA	EPIRIMFAMLNVPYE	DYRVSVEEWSKLK	PTTPFGQLPILQVDG
Y53F4B.33	MPLYKLT Y FDARGYA	EPARILFHLAGVPFE	DNRLTHGDGSWEKIK	DKTPFGQVPVLSVDG
As-GST-1	MPQYKLT Y FDIRGLG	EGARLIFHQAGVKFE	DNRLKREDWPALK	PKTPFGQLPLLEVDG
K08F4.11	MVHYKLT Y FNARGLA	EISRQLFHMAGVEFE	DERINEEKFSQLK	PTFPSGQVPILCIDG
K08F4.6	MVHYKLMCFDVRGLG	EVIRQLFYLGDVSFE	DFRVSREEFKSLK	SNLPSGQLPVLEIDG
Hc-GST	MVHYKLT Y FNGRGAA	EIIRQVFVLAGQDYE	DVRLTHEEWPKHK	ASMPFGQLPVLEVDG
R05F9.5a	MVSYKLI Y FQSRGNG	EIARQVFAFAGQEFI	DERISKEQWAEIK	NMTPFGQVPVLEVDG
Ce-GST-p24 Y53F4B.33 As-GST-1 K08F4.11 K08F4.6 Hc-GST R05F9.5a	EQFGQSMSITRYLAR FDIPQSAAIIRYLAN EVLAQSAAIYRYLGR AQFSQSTAIARYLAR VMISQSASIGRFLAR KQLPQSVAIVRYLAR RQLAQSITIVRYLSK	KFGL KFGL KF QYGEFFFNKMSYKSY KFGY QFGI	AGKTAEEEAYADSIV AGKTPEEQAWADAIV AGKTPMEEAQVDSIF EEELQADEVV SGKTPTEEMQVDSII AGKSAWEEAVVDSIA SGKSSWEEAQVDALG	DQYR D FIFFFRQFTS DQFK D FMGAFRQLIM DQFK D FMAELRPCFR DTFK D FIESFRKFVI DLFK D FMLTFRQFFF DQFK D FLNEVRPYFK DQFK D YRVEARPFFR
Ce-GST-p24	SVFYGSDADHINKVR	FEVVEPARDDFLAII	NKFLAKSKSGFLVGD	SLTWADIVIADNLTS
Y53F4B.33	AQRSGKPAEEIAKIS	SEVAIPARDSYFKIL	NGLLEKSKSGFLVGD	GLTFADIVVVENLTT
As-GST-1	-VLAGFEEGDKEKVL	KEVAVPARDKHLPLL	EKFLAKSGSEYMVGK	SVTWADLVITDSLAS
K08F4.11	AVLSGESEEILKNIR	EEVIKPAVKTYTAYL	KAILEKSSSGYLVGN	ELTWADLVIADNLTT
K08F4.6	AVIHGYPEYEKERMK	RDIVKPAIKNYFIAL	NKILLRSKSGFLVGD	DLTWADLQIADNLST
Hc-GST	-VLLGMDQGDLKALE	KDVFEPARQKFFTIV	TKILKENKTGYLVGD	SLTFADLYVAEMTTF
R05F9.5a	-AKMGFSDGDVDQLY	KDLFVPAFNKMYSIF	TESLKSSGSGFLVGD	SLTWMDLAIAQHSAD
Ce-GST-p24	LLKNGFLDFNKEKKL	EEFYNKIHSIPEIKN	YVATRKDSIV	
Y53F4B.33	LEKNQFFTASEHPKL	SALREKVHAVPAIKT	WVATRPDTQF	
As-GST-1	WESLIPDFLSGHLQL	KKYIEHVRELPNIKK	WIAERPKTPY	
K08F4.11	LINAELLDIENDKLL	KEFREKIIETPKLKE	WLAKRPETRF	
K08F4.6	LINIRLFAEKEPHLN	VFIRKL		
Hc-GST	TEHYP-KLYDGFPEV	KAHAEKVRSNPKLKK	WIETRPASKF	
R05F9.5a	LLEADGKILDTFLEM	KDHQKKIHSIPNVKK	WIEKRPVTSR	

Abb. 4.1 Vergleich der Ce-GST-p24-Aminosäuresequenz mit homologen Glutathion S-Transferasen. Y53F4B.33: C. elegans-GST mit 53 % Sequenzhomologie zur Ce-GST-p24; As-GST-1: GST aus Ascaris suum (Genbank Nr. Y10613), 51 % Homologie zur Ce-GST-p24; K08F4.11/K08F4.6: zwei C. elegans-GSTs, deren zugehörige Gene in Nachbarschaft zu Ce-GST-p24 auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang im Genom vorliegen, 47 bzw. 49 % Homologie zur Ce-GST-p24; Hc-GST: Haemonchus contortus-GST (Genbank Nr. AF281663), 43 % Homologie zur Ce-GST-p24; R05F9.5a: C. elegans-GST mit hoher Homologie zu S-Crystallin, 39 % Homologie zur Ce-GST-p24. Das Alignment der Moleküle erfolgte mit dem Programm ClustalW 1.8; Bereiche, in denen sechs von sieben Aminosäuren übereinstimmen, sind grau unterlegt. In fettgedruckten Buchstaben wurden die zwischen den GST-Klassen hochkonservierten Aminosäuren hervorgehoben, die bei der Ausbildung der GSH-Bindung (g-site) wichtig sind.

Trotz der Heterogenität der Glutathion S-Transferasen sind meist die Aminosäuren klassenübergreifend hochkonserviert, die für die Bindung des Glutathions am aktiven Zentrum des Enzyms (g-site) wichtig sind. Die drei wichtigsten Aminosäuren der g-site der Alpha-Klasse Glutathion S-Transferasen Tyr-8, Gln-66 und Asp-100 (Cowan et. al., 1989) konnten auch in der *Ce*-GST-p24 und in den mit ihr verglichenen GSTs hochkonserviert wiedergefunden werden. In den ebenfalls genauer untersuchten humanen Pi- und Mu-Klassen der GSTs sah die Struktur der g-site wie folgt aus: Tyr-7 (Pi)/ Tyr-6 (Mu), Gln-62 (Pi)/Gln-71 (Mu) und Asp-96 (Pi)/Asp-105 (Mu) (Dirr et. al., 1994; Reinemer et. al., 1991).

Tabelle4.1VergleichderfürdieAusbildungderg-sitekonserviertenAminosäurenderGSTsmithoherHomologiezuCe-GST-p24.DieAminosäurenderg-sitefürdiemammalischePi-KlassewurdenvonReinemer et. al. (1991)ermittelt.Aminosäuren, dienicht mitdenenderPi-Klasseübereinstimmen, sind hervorgehoben.

Pi-GSTY7G12R13W38K42Q49P51Q62S63E95D96As-GST-1Y8G13L14W38K43Q50P52Q63S64K96D97Ce-GST-p24Y8A13L14W38K43Q50P52Q63S64R96D97K08F4.11Y8G13L14F38K43Q50P52Q63S64K96D97K08F4.11Y8G13L14F38K43Q50P52Q63S64K96D97

In Tabelle 4.1 sind die GSH-Bindungsstellen verschiedener Glutathiontransferasen aus Nematoden mit der g-site der mammalischen Pi-Klasse der GSTs verglichen. Dabei fallen teilweise sehr deutliche Unterschiede auf. In den nematodischen GSTs ist an Position 14 ein Leucin konserviert, dessen Stelle in mammalischen GSTs ein Arginin einnimmt. Das heisst, eine basische Aminosäure wurde durch eine Aminosäure mit nichtreaktiver, aliphatischer Seitengruppe ersetzt, die zu hydrophoben Bindungen im Protein beiträgt. In Ce-GST-p24 ist zusätzlich das Glycin-13 durch ein Alanin ausgetauscht. Auffällig ist, dass die Nematoden-GSTs an Position 96 alle eine basische Aminosäure (Lysin oder Arginin) besitzen, wohingegen die Säuger-GSTs an dieser Stelle die saure Aminosäure Glutaminsäure aufweisen. Diese Aminosäurenaustausche scheinen aber keinen gravierenden Einfluss auf die GSH-Bindung der Ce-GST-p24 zu haben, da es auf der einen Seite möglich war die GST-p24 über GSH-Sepharose nativ aufzureinigen (Leiers, nicht gezeigte Daten). Desweiteren wurde eine hohe Enzymaktivität in Enzymtests gemessen, die auf der Umsetzung von reduziertem GSH basieren (siehe 3.1.6.2). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass Ce-GST-p24 mit grosser Wahrscheinlichkeit zu einer nematodenspezifischen Klasse der Glutathiontransferasen gehört, die wenig Strukturübereinstimmung mit bekannten GST-Klassen aufweist.

4.1.3. Ce-GST-p29 passt strukturell in die Omega-Klasse der GSTs

Ein Vergleich der *Ce*-GST-p29-Animosäuresequenz mit anderen Proteinen lässt die strukturelle Ähnlichkeit mit der Omega-Klasse der Glutathion S-Transferasen erkennen. Die grösste Übereinstimmung mit 41 % weist *Ce*-GST-p29 zu einer anderen GST aus *C. elegans* mit der Cosmidnummer *F13A7.10* auf. Desweiteren konnten in *C. elegans* noch zwei weitere homologe GSTs durch Genbankanalysen gefunden werden, die in 32 % (Cosmidnummer *K10F12.4*) bzw. 31 % (Cosmidnummer *C02D5.3*) mit *Ce*-GST-p29 übereinstimmen. Diese vier GSTs bilden innerhalb der GSTs in *C. elegans* eine sehr abgegrenzte Gruppe.

C29F4.7		MVLTGVTSKAIR			
F13A7.10	M	SVLEGINSKALK			
K10F12.4	MVLPGNCSTSAALCM	QFLTQLASVAIDQAY	QPPQQPAYNPHEKLF	VSYRSVPPPGSSPSS	AAVPIRFSSYSSVG-
GSTO 1-1		MSGESARSLG			
Ov-GST-3	M	SRFPQQGNKKQKQDL	STEY		
C29F4.7	KGD	AEPPLSKGSFRVY	NMRF CP WAERAMLYV	AAKGIEAEVVNLNVT	DKLEWYWTKHYQGKA
F13A7.10	-TGNAGKNLKFKKIG	DLPPPSPSPNTFRIY	SMRF CP AAQRALIYA	SVKKIPSEVININLQ	Q K PDWYFTKNYKGQ V
K10F12.4	-SNIRGLNSPTLHPG	-SIEPPLTPGNYRLY	SMRF CP YAQRVLIYL	AKKNIPVEVVNVNPD	RSPNWYLPKSPIGRV
GSTO 1-1	KG	SAPPGPVPEGSIRIY	SMRF CP FAERTRLVL	KAKGIRHEVININ L K	NKPEWFFKKNPFGLV
Ov-GST-3		PEP-SSNSVRIY	SLPF CP YGESVILAA	YKKGIQFDIGYINHP	YQMNWFLAKNPEGAL
C29F4.7	PAVEHNGKVVI ES	GFIPEYLDDAFPETR	ILPTDPYEKVQQKLL	ADR-LTAVAHAVPLL	FAVMRDRTLKDEKQR
F13A7.10	PTLEHAEGKKLVI ES	AVIPEYLDDIFPETK	ILPSDPYEKVQQKLL	LERLSDQLTPAFGRV	FRAIKNPEELKEKFE
K10F12.4	PALEINGKVVW ES	NVIVEYLDELFPTNT	ILPRDAYEKAHOKIL	VER-LSPIMNALFEF	YGSSNNPOAORONDM
GSTO 1-1	PVLENSOG-OLIYES	AITCEYLDEAYPGKK	LLPDDPYEKACOKMI	LELFSKVPSLVGS	FIRSONKEDYAGLKE
Ov-GST-3	PAVEHNGELVIDS	LVIMEYLDDVFSENS	ILPDEPYLRAKORYE	AIKLDSICDAIRKVS	YSKKLTGNITMLTME
			~		
C29F4.7	KVFEVLKQAEN-LLA	NDFYAGSQPGYPDYL	SFPFFEKIWWSASLD	GVVDLPTIEFPGEEE	YPKLTKWFQKMISSD
F13A7.10	SILKAFEEAESLLEG	AFYSGTSSPGFVDYL	IYPSFQRVYWLTFLL	EIFPLPSDNFPGPG-	YPKLSQWFKAITAIP
K10F12.4	NVHSALRNSEN-LLR	DTFYGGROPGYADYL	MWPFLERLOLLTMSP	NSOFRYFPGLH-	YPKIGAYIARMONOP
GSTO 1-1	EFRKEFTKLEEVLTN	KKTTFFGGNSISMID	YLIWPWFERLEAMKL	NECVDH	TPKLKLWMAAMKEDP
Ov-GST-3	LTEAEOMLES	PFYSGETFGLPDIVL	YPCIORLYMIGOTIN	DSFLHNYFPDHF-	-PKLSEWFTRMOTLR
	~		~ ~		~
C29F4.7	VVQSVTQSLEHGAAF	MNAYATHQELNYDLG	L		
F13A7.10	EVAAASQSTENGVGS	CKEYMKGLPY-FDYG	L		
K10F12.4	EVLGFCKHDFFLKKT	GEKIW	-		
GSTO 1-1	TVSALLTSEKDWOGF	LELYLQNSPEACDYG	L		
$O_V - GST - 3$	ETOAMOETKOYLONE	VYGSGYYNA	-		

Abb. 4.2 Vergleich der Ce-GST-p29-Aminosäuresequenz mit homologen Glutathion S-Transferasen. C29F4.7: C. elegans-GST Ce-GST-p29; F13A7.10: C. elegans-GST, 41 % Homologie zur Ce-GST-p29; K10F12.4: C. elegans-GST mit 32 % Homologie zur Ce-GST-p29; GSTO 1-1: humane GST der Omega-Klasse (Genbank Nr. AF188838), 24 % Homologie zur Ce-GST-p29; Ov-GST-3: GST aus Onchocerca volvulus mit Homologie zur Omega-Klasse (Genbank Nr. AF203814), 23 % Homologie zur Ce-GST-p29. Das Alignment der Moleküle erfolgte mit dem Programm ClustalW 1.8; Bereiche, in denen mindestens drei von fünf Aminosäuren übereinstimmen, sind grau unterlegt. In fettgedruckten Buchstaben wurden die Aminosäuren hervorgehoben, die bei der Ausbildung der GSH-Bindung (g-site) in der Omega-Klasse der GSTs wichtig sind.

Das Protein ausserhalb von *C. elegans*, das die grösste Homologie zu *Ce*-GST-p29 hat, ist das stressinduzierbare Protein p28 aus Mäusezellen (Kodym et. al., 1999), dessen Expression durch zytotoxische Substanzen und Strahlung reguliert wird und dem eine Rolle im zellulären antioxidativen Schutzsystem zugeschreiben wird. *Ce*-GST-p29 weist zu diesem Protein 33 % Sequenzübereinstimmung auf. Kodym et. al. (1999) beschreibt die strukturelle Ähnlichkeit des Proteins p28 mit den GSTs und insbesondere mit den Omega-Klasse GSTs. Die hohe Homologie der *Ce*-GST-p29 zu hochkonservierten Bereichen in der humanen GSTO 1-1 und der GST-3 aus *O. volvulus* (siehe Abb. 4.2), lässt zusätzlich auf ihre Zugehörigkeit zur Omega-Klasse der GSTs schliessen.

Die g-site der Omega-Klasse GSTs unterscheidet sich signifikant von den bereits besprochenen GSH-Bindestellen der Alpha-, Mu- und Pi-Klasse. Bei der Omega-Klasse GSTO 1-1 des Menschen sind folgende Aminosäuren für die g-site essentiell: Cys-32, Pro-33,

Leu-56, Val-72, Glu-85 und Ser-86 (Board et. al., 2000). Cys-32 bildet eine gemischte Disulfidbindung mit dem Glutathion aus, welche durch das Pro-33 begünstigt und stabilisiert wird. Desweiteren wird das aktive Zentrum durch Glu-85 und Ser-86 stabilisiert. Cystein-32, Prolin-33, Glutaminsäure-85 und Serin-86 konnten hochkonserviert in *Ce*-GST-p29 wiedergefunden werden. Leucin-56 und Valin-72 wurde in *Ce*-GST-p29 konservativ durch Valin-56 und Alanin-72 ersetzt. Diese Befunde sprechen für die Bindung und Umsetzung von Glutathion durch die *Ce*-GST-p29 und die nahe Verwandtschaft der GST zur Omega-Klasse.

Tabelle 4.2Vergleich der für die Glutathionbindung konservierten Aminosäuren
der GSTs mit hoher Homologie zu Ce-GST-p29. Die Aminosäuren für die
Ausbildung der g-site für die Omega-Klasse wurde von Board et. al. (2000) ermittelt.
Aminosäuren, die nicht mit denen der Omega-Klasse übereinstimmen, sind hervorgehoben.

GSTO 1-1	C32	P33	L56	K59	L71	V72	E85	S86
<i>Ce-</i> GST-p29	C33	P34	L55	кбО	A74	V75	E85	S86
Ov-GST-3	C36	P37	G56	N59	A78	V79	D88	S89

4.2. Lokalisation der Ce-GST-p24 im Nematoden

Über die Expressionsmuster von GSTs in Nematoden ist bisher relativ wenig bekannt. Bisher wurden Studien in *Ascaris suum* (Liebau et. al., 1997), in *O. volvulus* und in *Brugia*-Species (Rao et. al., 2000; Wildenburg et. al., 1998), und mit der GST-1 aus *O. volvulus* im heterologen *C. elegans*-System durchgeführt (Krause et. al., 2001). Eine Lokalisationsstudie über die GSTs von *C. elegans* wurde bisher noch nicht veröffentlicht. Deshalb wurde das Expressionsmuster der *Ce*-GST-p24 in *C. elegans* mit dem GST-Muster aus parasitischen Nematoden verglichen. Die Expressionsbedingungen für die transgene GST-p24 wurden möglichst naturgetreu durch die auf dem eigenen Promotor basierende Transkriptionskontrolle eingestellt. Die Lokalisation der transgenen *Ce*-GST-p24 wurde in BL1-*C. elegans* durch die Fusion mit GFP erleichtert.

Das Protein konnte in allen postembryonischen Stadien des Nematoden nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Expression zum Entwicklungsstadium, denn in L3-Larven konnte die stärkste Expression nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.18). Dieser Befund korreliert zum einen mit den Daten von Tawe (1998), der die stärkste Transkription des Genes unter oxidativem Stress in L3-Larven nachwies. Zum anderen bestätigt der Befund auch Daten von Jiang *et. al.*, die die Expressionsmuster von unterschiedlichen *C. elegans*-Genen unter normalen Lebensbedingungen mittels der Microchiptechnik analysierten (Jiang et. al., 2001). Für die *Ce*-GST-p24 (*K08F4.7*) wurde keine Expression in Eiern und Embryonen festgestellt, eine geringere Expression in Adulten als in Larven gemessen, und es wurde kein Unterschied in der Expression zwischen Hermaphrodit und Männchen gefunden (http://cmgm.stanford.edu/~kimlab/dev/).

Unter Einfluss von intrazellulär erhöhtem oxidativen Stress scheint die transgene *Ce*-GSTp24 zunächst im gesamten BL1-Nematoden ubiquitär expremiert zu werden. Bei genauerer Analyse sind die Bereiche mit GST-p24-Expression jedoch gut definiert (siehe Abb. 3.6). Der Eindruck der gleichmässigen Verteilung über die Gewebe des Nematoden wird durch die starke Expression in den Muskelsträngen und der Hypodermis erzeugt (siehe Abb. 3.6 A und C), da diese einen Grossteil des Lumens einnehmen. Zusätzlich kann die Expression der *Ce*-GST-p24 in den Zellen rund um den Pharynxbereich nachgewiesen werden. In adulten Tieren wurde nur eine sehr geringe Expression im terminalen Bulbus des Pharynx detektiert. In Kontrast dazu tritt das Transgen in L3-Larven des BL1-Stammes im Isthmus und im terminalen Bulbus des Pharynx auf. Zusätzlich kann die GST aber auch in den Muskeln und der Hypodermis der L3-Larven nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.6 D).

Das beschriebenen Expressionsmuster ist vergleichbar zu den Ergebnissen von vorausgegangenen GST-Lokalisationsstudien in parasitischen Nematoden. In *Onchocerca volvulus* und unterschiedlichen *Brugia*-Species wurden GSTs in Muskeln und der Hypodermis nachgewiesen (Rao et. al., 2000; Wildenburg et. al., 1998). Die *As*-GST-1, die 51 % Sequenzhomologie zu *Ce*-GST-p24 aufweist, wird in der Längsmuskulatur, in der Darmwand und in den Geweben der Fortpflanzungsorgane von *Ascaris suum* produziert (Liebau et. al., 1997). Die heterologe Expression der *Ov*-GST-1 in *C. elegans* fand nachweislich in allen postembryonischen Stadien in der Hypodermis, dem Isthmus und dem terminalen Bulbus des Pharynx statt (Krause et. al., 2001).

Es ist auffällig, dass die meisten GSTs aus Nematoden in der Muskulatur, der Hypodermis und dem Pharynx und seiner Umgebung expremiert werden. Andere Proteine, von denen bekannt ist, dass sie bei erhöhtem Stress eine Schutzfunktion einnehmen, werden ebenfalls in Geweben expremiert, die in direktem Kontakt mit der Umgebung stehen. Beispiel hierfür sind die MAP-Kinase MEK-1 und das für die Resistenz gegen verschiedene Chemikalien zuständige *mrp*-Gen (Broeks et. al, 1996; Koga et. al. , 2000). Die Hypodermis und der Pharynx spielen eine wichtige Rolle beim Nahrungs- und Stoffaustausch des Nematoden mit der Umgebung und bilden somit eine erste Barriere gegen den Einstrom von toxischen Molekülen. Eine hohe Konzentration von Detoxifikationsenzymen wie den GSTs in diesen Geweben unterstreicht die wichtige Rolle der Enzyme bei der Detoxifikation. In Muskelgewebe ist die Metabolismusrate wegen des hohen Verbrauchs an ATP im Vergleich zu anderen Geweben sehr hoch. Muskeln gehören zu den Geweben mit dem höchsten Sauerstoffverbrauch (Fielding & Meydani, 1997), was die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies fördert, die von Detoxifikationsenzymen abgefangen werden müssen, um die Gewebe vor oxidativen Schäden zu schützen. In Muskelzellen, insbesondere im Herzmuskel des Menschen, wurden hohe Konzentrationen der antioxidativen Enzyme wie SOD, Katalase, Glutathionperoxidasen und Glutathion S-Transferasen nachgewiesen (Maytin et. al., 1999). Erhöhte Peroxiredoxinkonzentrationen wurden ebenso in den Muskelzellen und der Hypodermis der Filarie *Dirofilaria immitis* detektiert (Chandrashekar et. al., 2000).

4.3. Ce-GST-p24 vermittelt Schutz gegen oxidativen Stress

Eine Vielzahl von Theorien beschäftigt sich mit dem Zusammenhang zwischen oxidativen Schäden innerhalb eines Organismus und der Lebensspanne bzw. der Seneszenz (Ashok & Ali, 1999). Es wird postuliert, dass die Rate an freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies und die Lebensspanne negativ korreliert sind. Diese These konnte durch viele Untersuchungen gestützt werden, die zeigten, dass in Invertebraten bis zu den Mammalia eine verringerte Metabolismusrate – und damit eine verringerte Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies zu einer verlängerten Lebensspanne führt (Braeckman & Vanfleteren, 1999; Lints, 1989; Masoro, 1996). So wurde eine um 50 % verlängerte Lebensspanne in *C. elegans* nachwiesen, die durch eine Mutation in *eat*-Genen eine verringerte Nahrungsaufnahme gegenüber den Wildtyp-Tieren zeigten (Lakowski & Hekimi, 1998). Ähnlich wirken auch Mutationen in *clk*-Genen, die zu einer Verlangsamung des Metabolismus und einer verlängerten Lebensspanne führen (Ewbank et. al., 1997; Lakowski & Hekimi, 1996; Wong et. al., 1995). Neben der Verringerung der Metabolismusrate stellt die erhöhte Aktivität von Detoxifikationsenzymen eine sehr effektive Methode zur Vernichtung bereits entstandener reaktiver Sauerstoffspezies dar.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von antioxidativen Enzymen zu einer erhöhten Lebensspanne führen kann. In Dauerlarven von *C. elegans*, die sich durch ein stark verlängertes Überleben unter schlechten Lebensbedingungen auszeichnen, werden nachweislich Superoxiddismutasen und Katalasen überexpremiert (Honda & Honda, 1999; Taub et. al., 1999). In einer anderen Studie wurde die Lebensspanne von *C. elegans* durch Behandlung mit synthetischen SOD- und Katalase-Nachbildungen positiv beeinflusst (Melov et. al., 2000). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die

gleichzeitige Überexpression von Cu-Zn-SOD und Katalase in *Drosophila melanogaster* zu einem Anstieg der mittleren Lebensspanne um 30 % führte (Orr & Sohal, 1994). Es scheint demnach eine eindeutig positive Korrelation zwischen oxidativem Schutz durch antioxidative Enzyme und Langlebigkeit bzw. einem langsameren Alterungsprozess zu geben.

Eine wichtige Frage, die innerhalb der vorliegenden Arbeit behandelt wurde, war, ob auch ein Phase-II-Detoxifikationsenzym wie die GST (siehe 1.3.4) in der Lage ist, durch eine erhöhte Aktivität zu einem besseren Schutz gegen reaktive Moleküle und dadurch zu einer Lebensverlängerung beizutragen. Ce-GST-p24 ist nachweislich ein stressinduziertes Gen, dem eine wichtige Rolle im Schutz von C. elegans vor oxidativem Stress aufgrund seiner Eigenschaften als antioxidatives Enzym zugeschrieben wird (Tawe et. al., 1998). Bereits ohne zusätzlichen oxidativen Stress wurde in BL1-C. elegans eine Expression der transgenen Ce-GST-p24 anhand der leichten GFP-Fluoreszenz nachgewiesen (siehe Abb. 3.18). Ich fragte mich daraufhin, ob diese erhöhte GST-Konzentration zu einer verlängerten Lebensspanne unter normalen Lebensbedingungen ohne zusätzlichen oxidativen Stress beiträgt. Ein Unterschied zwischen der Lebensspanne von BL1-C. elegans und Wildtyp-Tieren unter Normalbedingungen wurde jedoch nicht detektiert (siehe Abb. 3.7). Auch eine Überexpression der aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu stressinduzierten Genen interessanten Ce-GST-p29 verlieh den BL2-C. elegans keinen Überlebensvorteil unter normalen Lebensbedingungen. Demnach ist die Belastung mit reaktiven Sauerstoffspezies unter normalen Lebensbedingungen ohne zusätzlichen oxidativen Stress vermutlich zu gering, um einen detektierbaren Phänotyp zu erzeugen.

Viel deutlicher konnte die veränderte Stresstoleranz in BL1-*C. elegans* in Kontakt mit intrazellulär erhöhten Sauerstoffradikalkonzentrationen beobachtet werden. Der stärkste Effekt wurde unter Einfluss von 230 μ M Juglon detektiert. Unter diesen Bedingungen lebten die BL1-Würmer mindestens 50 % länger als die Wildtyp-Würmer (siehe Abb. 3.8). In Medium mit 100 mM Paraquat oder in Kontakt mit erhöhten H₂O₂-Konzentrationen war nur ein leichter Überlebensvorteil der BL1-Tiere gegenüber den Wildtyp-Tieren zu beobachten. Die Überexpression der GST-p24 aus *C. elegans* bringt demnach deutliche Vorteile gegenüber intrazellulär erhöhten Sauerstoffradikalkonzentrationen, die Lebensspanne der Nematoden wird durch sie jedoch nicht verlängert. Ein vergleichbares Ergebnis konnte bisher in Nematoden für ein Phase-II-Detoxifikationsenzym noch nicht beschrieben werden.

In nur zwei weiteren Studien in anderen Organismen wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression eines Phase-II-Entgiftungsenzyms und der Stressresistenz bzw. dem Altern hergestellt. In einer SY5Y-Neuroblastenkultur führte die Überexpression einer GST zu einer

um 46,5 % erhöhten Toleranz gegenüber oxidativem Stress im Vergleich zu Kontrollzellen (Xie et. al., 2001). In *Drosophila melanogaster* wurde durch die Deletion der mikrosomalen Glutathion S-Transferase I (MGST-I) die Lebensspanne der Tiere signifikant verkürzt (Toba & Aigaki, 2000). Es ist also durchaus möglich, die Stressresistenz bzw. die Lebensspanne eines Organismus durch die Überexpression einer Glutathiontransferase positiv zu stimulieren. Im Falle von *Ce*-GST-p24 wie auch in den beiden anderen geschilderten Studien konnte jedoch entweder nur eine erhöhte Stressresistenz oder ein verlängertes Leben beobachtet werden. Eine Korrelation der beiden Phänomene wurde nicht nachgewiesen. Dasselbe gilt auch für die Phase-I-Detoxifikationsenzyme.

Bis jetzt konnte erst zwei Gene in C. elegans beschrieben werden, dessen Überexpression sowohl die Stressresistenz als auch die Lebensspanne des Nematoden positiv beeinflusst. Die Überexpression des Tyrosinkinaserezeptors OLD-1 (früher *tkr*-1) vermittelt den transgenen C. elegans ein längeres Leben und eine erhöhte Toleranz gegenüber UV-Bestrahlung und Hitzeeinwirkung (Murakami & Johnson, 1998; Murakami & Johnson, 2001). Die Expression des OLD-1 steht in direkter Verbindung zur DAF-2-AGE-1-DAF-16-Signaltransduktionskaskade, denn die erhöhte Lebensspanne kann durch eine Mutation in daf-16 rückgängig gemacht werden (Murakami et. al., 2000). Der Gabelkopftranskriptionsfaktor DAF-16 gilt als wichtiger Modulator der Stressantwort in C. elegans. Seine Expression wird von der DAF-2-AGE-1-DAF-16-Signaltransduktionskaskade gesteuert, die eine wichtige Rolle in der Ausbildung des Dauerlarvenstadiums in C. elegans spielt. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass Einzelgenmutationen z.B. im daf-2- und age-1-Gen zu einer verlängerten Lebensspanne der Nematoden führten. Inzwischen wurde der Aufbau der Signalkaskade aufgeklärt und einen Verbindung zur Veränderung der Lebensspanne hergestellt (Honda & Honda, 1999; Murakami et. al., 2000; Vanfleteren & Braeckman, 1999). Die Kaskade wird unter normalen Lebensbedingungen durch die Bindung eines insulinähnlichen Liganden an die Rezeptorkinase DAF-2 gestartet. Es folgt eine Phosporylierungskaskade - bei der unter anderem AGE-1 (PI3-Kinase) aktiv beteiligt ist - die AKT-1 aktiviert, welches den Gabelkopftranskriptionsfaktor DAF-16 inhibiert. Unter schlechten Lebensbedingungen fällt die Signalkaskade aus und DAF-16 aktiviert im Nukleus verschiedene Gene, die zu einem besseren Schutz vor oxidativem Stress führen bzw. blockiert gleichzeitig Gene, die am Metabolismus und Wachstum des Nematoden beteiligt sind. So konnten in Dauerlarven erhöhte Konzentrationen einer SOD (Honda & Honda, 1999) und einer zytolsolischen Katalase nachgewiesen werden (Taub et. al., 1999). Bei Mutationen in einem der beteiligten Gene kann die Kaskade nur unvollständig oder in verringerter Intensität ablaufen, was z.B. zu einer unvollständigen Hemmung des DAF-16 führen kann. Dies hat zu Folge, dass es in adulten *C. elegans* zur Ausbildung eines für Dauerlarven typischen Metabolismus kommen kann, der zu einem besseren Schutz gegen reaktive Sauerstoffspezies und zu einem verlängerten Leben führt (Vanfleteren & Braeckman, 1999).

Eine ähnliche Signaltransduktionskaskade, die für die Stressantwort einer Zelle verantwortlich ist, konnte auch in Säugern gefunden werden. Der Knock-out des $p66^{shc}$ -Genes in Fibroblasten aus Mausembryos führt zu einer erhöhten Resistenz gegen Paraquat- und H₂O₂-induzierten oxidativen Stress und verlängerte zusätzlich das Leben der Mäuse im Mittel um 30 % (Migliaccio et. al., 1999). $p66^{shc}$ wird eine Aufgabe in einem Signaltransduktionsweg zugesprochen, der für die Regulation der apoptotischen Stressantwort der Zellen zuständig ist und die Lebensspanne des Organismus mitbestimmt.

Schon diese beiden Beispiele machen deutlich, wie komplex eine Zelle auf einen Stimulus wie oxidativen Stress reagiert. Bereits ein defekter Baustein in den Signalkaskaden kann zu einer drastischen Veränderung des Phänotyps (z.B. ein um 100 % verlängertes Leben im Falle von age-1) führen. Bisher ist nur wenig über die Zielgene bekannt, die von den Signaltransduktionswegen aktiviert werden. Aber zumindest DAF-16 scheint für die Aktivierung unterschiedlicher Gerontogene verantwortlich zu sein, die das lange Überleben der Dauerlarven ermöglichen. Es wäre in diesen Zusammenhang sehr interessant zu untersuchen, ob DAF-16 auch bei der Expressionsregulation von Glutathiontransferasen, wie der *Ce*-GST-p24, eine Rolle spielt.

4.4. Verringerung der Stresstoleranz durch Ce-GST-p24-RNAi

Eine Aufnahme von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in *C. elegans* führt zu einem posttranskriptionellen knock-out der Gene, deren Sequenz mit der Sequenz der dsRNA übereinstimmt (RNA-interference oder RNAi). Dieser funktionelle knock-out-Effekt konnte zunächst bei *C. elegans* beobachtet werden, denen die dsRNA injiziert wurde (Fire et. al., 1998). Er wurde wenig später auch in *C. elegans* beobachtet, die mit dsRNA-produzierenden Bakterien gefüttert wurden (Timmons & Fire, 1998), und in Nematoden, die in hochkonzentrierter dsRNA-Lösung gehalten wurden (soaking) (Tabara et. al., 1998). Inzwischen wurde RNAi unter anderem auch in Protozoen (Galvani & Sperling, 2002; Shi et. al., 2000), in Insekten (Misquitta & Paterson, 1999; Brown et. al., 1999) und in Vertebraten wie dem Zebrafisch (Wargelius et. al., 1999) und der Maus (Wianny & Zernicka-Goetz, 2000) erfolgreich verwendet.

Durch den spezifischen funktionellen knock-out der *Ce*-GST-p24 durch RNAi-feeding wurde demonstriert, dass die erhöhte Resistenz der BL1-*C. elegans* eindeutig auf die Überexpression der GST zurückzuführen ist. In RNAi behandelten BL1-Tieren ist die Expression des *Ce*-GST-p24-GFP-Fusionsproteins deutlich verringert (siehe Abb. 3.9). Es wurde jedoch in keinem Fall – weder in Larven noch in Adulten des BL1-Stammes - ein vollständiger knock-out des Transgens erzielt. Sowohl in der Hypodermis als auch besonders intensiv im Pharynxbereich konnte GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.9). Auch eine Langzeitkultivierung der BL1-Tiere auf *Ce*-GST-p24-dsRNA-produzierenden Bakterien führte zu keiner Verstärkung des RNAi-Effekts. Der RNAi-Effekt könnte demnach als ein knock-down der Proteinexpression bezeichnet werden.

Eine mögliche Erklärung für den unvollständigen RNAi-Effekt könnte unter anderem auf der Tatsache beruhen, dass der BL1-Stamm ein nichtintegrierter Stamm ist. In nichtintegrierten Stämmen liegen die Transgenplasmide extrachromosomal in hoher Kopienzahl vor, so dass durch die Transkription eine hohe Anzahl an mRNA-Kopien produziert werden kann. Diese mRNA-Konzentration ist vermutlich so hoch, dass nicht alle Transkripte von der RNAi-Maschinerie zerstört werden können und das Transgen - wenn auch in verringerter Konzentration – translatiert wird. Von einem unvollständigen RNAi-Effekt konnte jedoch auch bei transgenen C. elegans-Stämmen berichtet werden, deren Transgen in das Genom integriert war (Timmons et. al., 2001). Desweiteren wurde in anderen Arbeitsgruppen, die RNAi bei C. elegans anwenden, auch bei Einzelkopiegenen ein unvollständiger Effekt beobachtet, der besonders den Pharynxbereich betraf (O. Bossinger, persönliche Mitteilung). Eine Erklärung für dieses Phänomen konnte bis heute nicht gefunden werden, es scheint aber im Pharynx Mechanismen zu geben, die die Wirkung der RNAi herabsetzen, bzw. es könnten dort wichtige Komponenten fehlen, die für den Ablauf der RNA-interference essentiell sind. Die Aufklärung dieser Beobachtungen kann zu einem besseren Verständnis des RNAi-Effekts beitragen.

Die deutlich um mindestens 50 % reduzierte Transgenexpression in BL1-Tieren führte zu einer signifikant verringerten Toleranz gegenüber intrazellulär erhöhtem oxidativen Stress im Vergleich zu unbehandelten BL1-Tieren (siehe Abb. 3.11). Aufgrund des unvollständigen knock-outs zeigten diese RNAi-behandelten BL1-Tiere unter Stressbedingungen jedoch nicht den Wildtyp-Phänotyp, sondern wiesen im Vergleich zum Wildtyp eine höhere Stresstoleranz auf. Diese Beobachtung festigt die These, dass es eine Korrelation zwischen der *Ce*-GST-p24-Konzentration und der Stresstoleranz der *C. elegans* gibt.

Eine verringerte Stressresistenz konnte auch in heterozygoten K08F4.7-Deletionsmutanten detektiert werden, die mit erhöhtem oxidativen Stress konfrontiert wurden (siehe Abb. 3.12). Bereits die Mutation eines *Ce*-GST-p24-Allels im Genom von *C. elegans* führte zu einer signifikanten Verringerung der Überlebensrate unter Einfluss von 150 µM Juglon im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Dieser Effekt konnte durch die zusätzliche Einwirkung von *Ce*-GST-p24-dsRNA – um einen homozygoten knock-out-Phänotyp zu erreichen - noch verstärkt werden. Parallel war es auch möglich die Stresstoleranz von Wildtyp-*C. elegans* durch *Ce*-GST-p24-dsRNA-Behandlung abzusenken (siehe Abb. 3.12). Der Effekt war in diesem Fall jedoch geringer als in den RNAi-behandelten *K08F4.7*-Deletionsmutanten und erreichte nur den Phänotyp des heterozygoten Deletionsmutanten. Dieses Beobachtung kann auf einen möglicherweise unvollständigen RNAi-knock-out zurückgeführt werden. Unter normalen Lebensbedingungen hingegen, ohne zusätzlichen oxidativen Stress, hatte der RNAi knock-out der *Ce*-GST-p24 genauso wie der knock-out der *Ce*-GST-p29 in Wildtyp-*C. elegans* keinen messbaren Einfluss auf die Lebenspanne der Würmer (siehe Abb. 3.10).

Die Ergebnisse weisen alle auf die extrem wichtige Rolle der *Ce*-GST-p24 innerhalb der Schutzmechanismen von *C. elegans* gegen erhöhten oxidativen Stress hin. Der Ausfall des Detoxifikationsenzyms wird scheinbar nicht von anderen GST-Familienmitgliedern kompensiert, was auf die Spezialisierung der einzelnen Enzyme innerhalb des enzymatischen Schutzwalls schliessen lässt. Auch die mit 47 und 49 % Sequenzhomologie nahverwandten GSTs mit den Cosmidnummern *K08F4.11* und *K08F4.6* scheinen den Ausfall der *Ce*-GSTp24 nicht auffangen zu können. Ein ähnliches Phänomen konnte auch bei einer *Drosophila*-Nullmutante für die MGST-1 beschrieben werden, die eine deutliche Verkürzung der Lebensspanne zeigte (Toba & Aigaki, 2000). Auch in diesem Fall wurde die Deletion der mikrosomalen GST nicht durch ähnliche GST-Familienmitglieder kompensiert, wozu es zur deutlichen Veränderung des Phänotyps kommen konnte.

4.5. Unterschied in der Stressresistenz zwischen den Entwicklungsstadien der Wildtyp-*C. elegans*

In L3-Larven der Wildtyp-*C. elegans* wurde unter Einfluss von oxidativem Stress eine signifikant höhere Transkription der *Ce*-GST-p24 als in adulten Tieren desselben Stammes nachgewiesen (Tawe et. al., 1998). Diese Daten wurden durch die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse gestützt, die nach Kontakt mit Juglon eine deutlich stärkere *Ce*-GST-p24-GFP-Expression in L3-Larven des BL1-Stammes zeigten als in Adulten (siehe 4.2).

Desweiteren wurde innerhalb dieser Arbeit nachgewiesen, dass eine Überexpression der *Ce*-GST-p24 zu einer erhöhten Stresstoleranz unter Bedingungen mit intrazellulär erhöhten Sauerstoffradikalkonzentrationen führt (siehe 4.3). Ein Zusammenschluss dieser Resultate würde zu der These führen, dass Larven einen besseren Schutz gegen intrazellulär induzierten oxidativen Stress durch die hohen GST-Konzentrationen aufweisen und unter Bedingungen mit erhöhtem oxidativen Stress besser überleben können als adulte Würmer.

In Stressexperimenten unter Einfluss von Juglon wurde durch die Aufnahme von *Ce*-GSTp24- und *Ce*-GST-p29-dsRNA sowohl in Adulten als auch in Larven eine deutliche Verringerung der Stresstoleranz detektiert. Das bedeutet, dass der RNAi-knock-down jeweils einer GST ausreicht, um auch in Wildtyp-*C. elegans* eine geringere Toleranz gegenüber oxidativem Stress hervorzurufen. Diese Beobachtung bestätigt die bereits in Kapitel 4.4 vorgestellten Ergebnisse. Es stellte sich allerdings auch heraus, dass die L3-Larven trotz der nachgewiesenen höheren *Ce*-GST-p24-Konzentrationen keinen Überlebensvorteil gegenüber den Adulten unter oxidativem Stress aufwiesen, sie starben sogar signifikant schneller als die Adulten (siehe Abb. 3.13 und Abb. 3.24).

Eine mögliche Erklärung für das beobachtete Phänomen könnte in der unterschiedlichen Cuticulastruktur der einzelnen Entwicklungsstadien gefunden werden. Die Cuticula stellt im Allgemeinen eine relativ undurchlässige Barriere zwischen dem Nematoden und seiner Umgebung dar. Im Laufe seines Lebens synthetisiert C. elegans fünf verschiedene Cuticulae, die sich in ihrer Zusammensetzung deutlich voneinander unterscheiden (Cox et. al., 1981; Johnstone, 1994). Die Cuticula besteht aus einer inneren und einer äusseren Schicht. In Larven erscheinen diese beide Lagen unstrukturiert und kaum voneinander getrennt, wohingegen Cox (1981) in der Cuticula von adulten C. elegans eine zusätzliche Schicht zwischen den genannten Schichten beobachtete. Durch diese Mehrfachschichtung der Membran wird in adulten Tieren das Eindringen für Juglon durch die Membran deutlich erschwert. In Larven hingegen muss der Stressinduktor eine um 50 % dünnere Cuticula passieren. Zusätzlich herrscht in den Larven eine aufgrund der Wachstumsprozesse höhere Metabolismusrate vor, was eine extrem schnelle Umsetzung des Stressinduktors einhergehend mit einer schnelleren Entwicklung von reaktiven Sauerstoffspezies - erlaubt. Voraussichtlich kann dieser hohe Jugloninflux und der mit ihm verbundene Anstieg der Radikalkonzentration im Nematoden trotz der erhöhten GST-Konzentration nicht bewältigt werden, so dass es zum frühzeitigen Tod der Larven kommt.

4.6. Regulatorische Promotorelemente der Ce-GST-p24

Es ist seit langem bekannt, dass bestimmte Gene durch erhöhte Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies bzw. eine Veränderung des Redoxpotentials der Zelle differentiell expremiert werden. In den letzten 10 Jahren ist die Suche nach regulatorischen Promotorelementen sowie beteiligen Transkriptionsfaktoren intensiviert worden, da viele der aktivierten Gene eine wichtige Rolle im Schutzsystem der Zelle gegen oxidativen Stress und den mit ihm verbundenen Krankheiten nachgesagt wird. In der Promotorregion unterschiedlicher stressinduzierbarer Vertebratengene konnte die Sequenz des ARE (antioxidant response element) beschrieben werden. Das ARE wurde ursprünglich in der Promotorregion der murinen GST-Ya entdeckt (Friling et. al., 1990; Rushmore, King et. al., 1990). Wasserman und Fahl (1997) identifizierten 12 weitere Vertebratengene mit ARE in der Promotorregion durch Gendatenbankanalysen. Davon gehören mehrere den Detoxifikationsenzymen an, während andere mit neurodegenerativen Krankheiten in Verbindung gebracht werden. Die Coresequenz des ARE beinhaltet mehr oder weniger konserviert die Sequenzen von mindestens zwei TRE (TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) response element) in einem kurzen Bereich von 40-50 Nukleotiden. Es ist bekannt, dass an die TRE-Sequenz der AP-1-Transkriptionsfaktor bindet (Hayes & Pulford, 1995). AP-1 ist entweder ein Homodimer aus dem Proteinen der JUN-Klasse oder ein Heterodimer aus den Proteinen der JUNund FOS-Klasse. Die Konzentration des AP-1 hängt direkt von der reversiblen posttranslationalen Modifizierung der JUN/FOS-Proteine ab, die durch das Redoxpotential der Zelle bestimmt werden (Buscher et. al., 1988; Devary et. al., 1991).

Core-Sequenz des ARE (Wasserman & Fahl, 1997):

TMANNGR<u>TGAY</u>NNN<u>GC</u>RWWW

Sequenz des TRE:

TGACTCA

M = A oder C, R = A oder G, Y = C oder T, W = A oder T.

Bei dem humanen NQ01-Gen wurde eine Stressaktivierung durch AP-1 postuliert, weil das ARE eine vollständige TRE-Sequenz enthält (Jaiswal, 1994). Desweiteren konnten AP-1-Bindestellen auch in der Promotorregion von Thioredoxinen gefunden werden, die ebenfalls unter Einfluss von oxidativem Stress induziert werden (Tanaka et. al., 2000).

In der 5'-upstream Region der *Ce*-GST-p24 konnten drei TRE-Sequenzen gefunden werden (Basenpaarposition 247 (-), 778 (-) und 829 (-)), wobei bei einer Sequenz die letzte Base A durch ein G ausgetauscht ist, und bei den anderen beiden die vorletzte Base C durch ein T

ausgetauscht ist. Bei einem Vergleich zwischen der Coresequenz des ARE mit der Sequenz des TRE fällt auf, dass die letzten drei Basen des TRE im ARE nicht konserviert sind. Nur die ersten vier Basen der Box scheinen für eine antioxidative Aktivierung von Bedeutung zu sein. Aus diesem Grund kann AP-1 an die drei TRE im *Ce*-GST-p24-Promotor binden und für die Expressionsinduktion des Phase-II-Detoxifikationsproteins unter oxidativem Stress zum Teil mitverantwortlich sein.

Zusätzlich zu den drei TRE enthält der *Ce*-GST-p24-Promotor vier NF-AT-Bindestellen und zwei CCAAT-Boxen. Zemzoumi *et al.* (1995, 1996) konnte in *Schistosoma mansoni* drei CCAAT-Boxen im Promotor der Sm28GST nachweisen, an die der ubiquitäre NF-Y-Faktor bindet. Es wird vermutet, dass die Box bei der Regulation von stressinduzierbaren Genen eine wichtige Rolle spielt.

Desweiteren konnten mehrere GATA-Boxen identifiziert werden. An GATA-Boxen binden Transkriptionsfaktoren, die für die gewebespezifische Expression eines Proteins von Bedeutung sind. Die Expression der *Ce*-GST-p24 konnte auch in spezifischen Geweben des Nematoden wie z.B. den Muskeln und der Hypodermis nachgewiesen werden (siehe 4.3).

Der Promotor der *Ce*-GST-p24 enthält keine TATA-Box, ein Phänomen, das bereits für die drei Superoxiddismutasen aus *O. volvulus* beschrieben wurde (Tawe et. al., 2000). Auch in mammalischen Genomen konnten Promotoren ohne TATA-Box gefunden werden, in denen die Transkription des Genes in manchen Fällen durch die Bindung eines Initiatorproteins an das Inr-Element initiiert wird (siehe das Review von Smale (1997)). Aber auch die normaler-weise direkt am Startcodon des Genes lokalisierte Inr-Sequenz konnte nicht im *Ce*-GST-p24-Promotor nachgewiesen werden, so dass ein anderer Initiationsmechanismus der Transkription für die Nematoden-GST postuliert wird. *Ce*-GST-p24 liegt in 5'- zu 3'-Orientierung mit zwei weiteren, strukturell sehr ähnlichen GSTs im *C. elegans*-Genom vor (Tawe et. al., 1998). Es wäre sehr interessant, mehr über diese direkten Nachbargene zu erfahren und ihre Expressionsregulation mit der der *Ce*-GST-p24 zu vergleichen. Die strukturelle Ähnlichkeit (ca. 50 % Sequenzhomologie) der drei GSTs spricht dafür, dass sie in dieselbe GST-Klasse eingeordnet werden können. Ein möglicher Nachweis einer differentiellen Expremierung dieser Nachbar-GSTs unter Einfluss von oxidativem Stress würden Hinweise auf eine ähnliche Detoxifikationsaufgabe in der Zelle geben.

4.7. Stressinduktion des Ce-GST-p24-Promotors

Zur Analyse der Promotoraktivität des Ce-GST-p24-Promotors standen zwei verschiedene Modellsysteme zur Verfügung: ein Zellkultursystem und der Nematode C. elegans. Der Vorteil der Zellkultur besteht darin, dass in relativ kurzer Zeit viele Deletionskonstrukte oder Konstrukte mit mutierter Sequenz mit Hilfe gut etablierter Transfektionsprotokolle getestet werden können, wohingegen die Etablierung einer transgenen C. elegans-Linie sehr viel mehr Zeit in Anspruch nimmt. Ein Nachteil der Zellkultur ist jedoch, dass es bis heute noch nicht gelungen ist, eine Zelllinie aus Helminthen zu isolieren. Die Promotoranalyse musste deshalb in Säugetierzellen durchgeführt werden. Bereits in früheren Studien wurden Promotoren aus Helminthen erfolgreich in mammalischen Zellen analysiert (Serra et. al., 1997; Tawe et. al., 2000), so dass auch für den Ce-GST-p24-Promotor in CHO- und COS-Zellen eine Aktivität erwartet wurde. In beiden Zelllinien konnte eine Aktivität des 1500 bp langen Ce-GST-p24-Promotorfragments nachgewiesen werden (siehe 3.1.5.1). Es war jedoch in beiden Fällen nicht möglich, diese Aktivität durch oxidativen Stress zu induzieren (siehe Abb. 3.14 und 3.15). Dieses Phänomen könnte eventuell auf das Fehlen von essentiellen Transkriptionsfaktoren in den mammalischen Zellen zurückzuführen sein, die für die durch oxidativen Stress ausgelöste Signalkaskade in C. elegans gebraucht werden.

Die zentrale Suche nach regulatorischen Promotorelementen wurde daraufhin im mammalischen Zellsystem abgebrochen und alternativ die Aktivität von zwei unterschiedlich langen Fragmenten des *Ce*-GST-p24-Promotors im homologen *C. elegans*-System untersucht. Dabei wurde die durch die Promotorfragmente kontrollierte GFP-Expression in ungestressten und oxidativ gestressten BL1-Würmern (1000 bp Promotor) und CL2166-Würmern (727 bp Promotor) fluorometrisch gemessen und miteinander verglichen (siehe Abb. 3.16 und 3.17). Durch die Verkürzung um 273 bp am 5`-Ende des Promotors fallen unter anderem eine AP-1, eine GATA-, eine NF-AT- und eine SRY-Bindestelle weg. Dies scheint jedoch keinen Einfluss auf die Aktivierung des *Ce*-GST-p24-Promotors zu haben, da in allen Versuchsreihen zwischen den BL1-Tieren und den CL2166-Tieren kein signifikanter Unterschied in der GFP-Expression gemessen wurde (siehe Abb. 3.18). Für eine detailliertere Analyse des Promotors müssten weitere transgene *C. elegans*-Linien mit *Ce*-GST-p24-Promotorfragmenten etabliert werden, in denen gezielt z.B. die verbliebenen AP-1-Bindestellen deletiert wurden.

Interessant ist auch, dass die Expression des Fusionsproteins aus *Ce*-GST-p24 und GFP die gleiche Intensität erreicht wie die Expression des GFP-Proteins in CL2166. Die Fusion mit

der GST scheint also die korrekte Faltung des GFP nicht zu behindern, was an der intensiven GFP-Fluoreszenz in BL1-*C. elegans* abgelesen werden kann.

Die Induktion des *Ce*-GST-p24-Promotors erfolgte nur unter Einfluss von Chemikalien, die intrazellulär zu einer erhöhten Superoxidanionradikalkonzentration beitrugen (siehe Abb. 3.17). So konnte in Kontakt mit 100 mM Paraquat eine dreimal höhere Aktivität in BL1-Tieren im Vergleich zu ungestressten Kontrolltieren gemessen werden. Dieser Wert korreliert gut mit der von Tawe (1998) in adulten Wildtyp-Würmern gemessenen stressinduzierten Erhöhung der *Ce*-GST-p24-Transkriptkonzentration. Die Northern-Blot-Auswertung wurde damit direkt über die in dieser Arbeit gewonnenen Daten der *Ce*-GST-p24-Promotoraktivität bestätigt.

Desweiteren wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Induktion des *Ce*-GST-p24-Promotors und der Stresstoleranz der transgenen BL1-Würmer unter definierten Bedingungen aufgedeckt. So konnte gezeigt werden, dass der Promotor unter Einfluss von Juglon deutlich stärker induziert wird als in Kontakt mit Paraquat (siehe Abb. 3.17). Gleichzeitig erwiesen sich die BL1-Tiere gegenüber Juglon deutlich stresstoleranter als gegenüber Paraquat (siehe Abb. 3.8). Dies ist ein weiterer wichtiger Hinweis darauf, dass es eine Korrelation zwischen der GST-p24-Konzentration und der Stresstoleranz unter definierten Bedingungen zu geben scheint. Eine stärkere Aktivität des Promotors führt zu einer verstärkten Transkription der GST, was wiederum die Expression des Proteins fördert. Die höhere GST-Konzentration scheint in den adulten BL1-*C. elegans* zu einem besseren Schutz gegen Juglon zu führen. In Medium mit Paraquat hingegen fällt die Induktion des Promotors geringer aus, was zu der nur wenig gesteigerten Stresstoleranz der BL1-Tiere gegenüber der Wildtyp-Tiere beiträgt.

4.8. Rekombinante Expression von Ce-GST-p24 und Ce-GST-p29

Die rekombinante Expression von Proteinen in Bakterien stellt eine sehr gute Möglichkeit dar, um gezielt grosse Mengen eines spezifischen Proteins herzustellen. Die Methode wird oft bei Proteinen angewendet, die nicht in ausreichenden Mengen bzw. in hoher Reinheit aus dem untersuchten Organismus gewonnen werden können. Parasitische Filarien können unter Laborbedingungen nicht gezüchtet werden, so dass für die Isolation ausreichender Proteinkonzentrationen nicht genügend grosse Mengen Wurmmaterial verfügbar sind (Liebau, 1994).

Bei *C. elegans* besteht nicht das Problem, dass zu wenig Ausgangsmaterial genutzt werden kann, denn unter normalen Laborbedingungen können innerhalb von zwei bis drei Wochen

bis zu 100 g Nematoden (Feuchtgewicht) gezüchtet werden. Problematisch war, dass in C. elegans viele Glutathion S-Transferasen mit sehr ähnlichen Charakteristika vorkommen, die nur schwer voneinander getrennt und in ausreichender Menge aufgereinigt werden können. Van Rossum et. al. (in press) gelang es über ein GSH-Bindungsverfahren 26 Proteine aus der löslichen C. elegans-Fraktion zu isolieren und über 2D-Gelelektrophorese zu separieren. Die genauere Untersuchung der einzelnen Proteine ergab, dass sie auf 12 Gene des C. elegans-Genoms zurückgehen, die alle der Glutathion S-Transferase-Familie angehören. Dies zeigt, dass die Isolation von GSTs aus dem Nematoden möglich ist, aber auf jeden Fall zu einem Gemisch aus einer Vielzahl verschiedener GSTs führt. Eine weitere Aufreinigung führt vermutlich zu einem hohen Verlust nativen Proteins - einhergehend mit einer verringerten Enzymaktivität - führen. Zusätzlich können über diese Methode nur GSTs gewonnen werden, die an glutathiongekoppelte Säulen binden. Einige GSTs zeigen nachweislich eine zu schwache Bindung an immobilisiertes Glutathion, als dass sie über GSH-gekoppelte Säulen aufgereinigt werden könnten (Sheehan et. al., 2001). Ein Beispiel hierfür ist die Ov-GST-3, die nicht über GSH-Sepharose aufgereinigt werden konnte, die aber mit ungebundenem Glutathion durchaus eine Bindung eingeht und es umsetzen kann (Kampkötter, persönliche Mitteilung).

Um die genannten Probleme zu umgehen, wurden die beiden *C. elegans*–GSTs *Ce*-GST-p24 und *Ce*-GST-p29 in der vorliegenden Studie rekombinant in einem prokaryontischen Expressionssystem hergestellt (siehe 2.2.25). Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Herstellung enzymatisch aktiver, rekombinanter GSTs aus *Schistosoma*-Arten (Walker et. al., 1993), aus *Onchocerca volulus* (Liebau, 1994) und aus *Ascaris suum* (Liebau et. al., 1997) eingesetzt. Der verwendete Expressionsvektor pJC40 ist so konzipiert, dass die Expression des Proteins unter der Kontrolle der T7-RNA-Polymerase steht. Am N-terminalen Ende des rekombinanten Proteins wird zusätzlich ein Peptid aus 10 Histidinen angehängt, der eine Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-Sepharose ermöglicht (Clos & Brandau, 1994). Auf diese Weise konnte eine Alternative zur Aufreinigung der GSTs über GSH-Sepharose geschaffen werden. Die enzymatische Aktivität der GSTs scheint durch die fehlenden posttranskriptionellen Proteinmodifizierungen im Prokaryonten nur wenig beeinflusst zu werden, da mit typischen GST-Substraten vergleichbar hohe Umsatzraten gemessen werden konnten (siehe 4.9).

Die Gewinnung von ausreichenden Mengen nativer rekombinanter *Ce*-GST-p29 war deutlich aufwendiger, als bei der rekombinanten *Ce*-GST-p24. Nach dem Aufschluss der Bakterien, die die *Ce*-GST-p29 überexpremierten, konnte der Hauptteil des Proteins in der Fraktion mit den unlöslichen Proteinen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.25). In Bakterien, die grosse Mengen eines transgenen Proteins expremieren, kommt es in manchen Fällen zur Ausbildung sogenannter "inclusion bodies". In diesen Vesikeln wird das rekombinante Protein eingeschlossen und unlöslich, wodurch es auf den Metabolismus der Bakterienzelle nicht mehr einwirken kann. Die Ausbildung von inclusion bodies dient dem Selbstschutz der Bakterien und wird häufig bei toxischen Proteinen beobachtet. In inclusion bodies eingeschlossene Proteine sind inaktiv und können deshalb in dieser Form nicht für Enzymaktivitätstests benutzt werden. Im Fall der r*Ce*-GST-p29 lag jedoch zusätzlich ein kleiner Teil des Proteins in löslicher Form vor, so dass ausreichend natives r*Ce*-GST-p29 aus der löslichen Proteinfraktion gewonnen werden konnte (siehe Abb. 3.25).

Bei einem Vergleich der im SDS-Gel ermittelten Molekulargewichte der untersuchten rekombinanten GST-Monomere mit der aus der cDNA berechneten Molmasse fällt auf, dass in beiden Fällen das Molekulargewicht der rekombinanten GSTs um ca. 3000 Einheiten grösser ist (siehe Tabelle 4.3). Der an das rekombinante Protein zusätzlich angehängte Histidinschwanz vergrössert die Molmasse um ca. 1,3 kDa. Desweiteren könnte dieser Unterschied auf der relativ ungenauen Grössenbestimmung der Proteine im SDS-Gel beruhen. Für diesen Fehler spricht auch, dass bei beiden Proteinen eine sehr ähnliche Abweichung gemessen wurde. Das berechnete Molekulargewicht des *Ce*-GST-p24- und des *Ce*-GST-p29-Monomer korreliert jedoch gut mit dem für Evertebraten-GSTs durchschnittlichen Molekulargewicht von 24 900 \pm 3 100 Einheiten (Clark, 1989).

Tabelle 4.3 Molekulargewichtsbestimmung der zwei GSTs aus C. elegans undAngabe des isoelektrischen Punktes. Die Molmasse wurde anhand der bekannten
cDNA-Sequenz berechnet bzw. für die rekombinanten GSTs anhand des Grössenstandards im
SDS-Gel bestimmt. Der isoelektrische Punkt wurde anhand der Aminosäurezusammensetzung
berechnet.

GST	Berechn. Molmasse (aus cDNA)	Molmasse rGST (SDS-PAGE)	Isoelektr. Punkt (pI)
Ce-GST-p24	23 900	27 000	5,6
Ce-GST-p29	28 500	31 000	5,35

Der isoelektrische Punkt pI einer Glutathiontransferase galt lange neben der Primärstruktur, der Lokalisation und der umgesetzten Substratmuster als zusätzliches Kriterium für die Einteilung in eine spezifische GST-Klasse. Er stellte sich jedoch heraus, dass der isoelektrische Punkt der GSTs weniger auf eine spezifische Klasse als auf eine bestimmte Tiergruppe hindeutet. So gehören die meisten Glutathiontransferasen aus Säugetieren zu den basischen Enzymen (Mannervik et. al., 1985), wohingegen viele der Helminthen-GSTs ihren isoelektrischen Punkt im neutralen bis sauren Bereich haben (Brophy et. al., 1994; Brophy et. al., 1989). Auch die isoelektrischen Punkte der zwei Glutathiontransferasen aus *C. elegans* entsprechen diesem Schema und liegen mit 5,6 (*Ce*-GST-p24) und 5,35 (*Ce*-GST-p29) deutlich im sauren Bereich.

4.9. Substratspezifität der rekombinanten Ce-GST-p24 und Ce-GST-p29

Die Umsetzung von spezifischen Substratmustern durch einzelne GSTs ist ein guter Hinweis auf ihre Zugehörigkeit zu einer bestimmten GST-Klasse. So wird z. B. das Substrat 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB) von den meisten bekannten GST-Klassen gut bis sehr gut umgesetzt, wohingegen die Mitglieder der Omega-Klasse-GSTs nur eine sehr geringe Aktivität mit dieser Substanz aufweisen (Board et. al., 2000; Hayes & McLellan, 1999). Ähnliches gilt für die Umsetzung von Cumenhydroperoxid, welches nur von GSTs mit einer Peroxidasefunktion umgesetzt wird. Diese konnte bisher eindeutig für die Alpha-, Pi-, Mu-, Theta- und Nematoden-Klasse Glutathion S-Transferasen nachgewiesen werden, wobei die Mu-Klasse GSTs die geringste Aktivität mit Cumenhydroperoxid zeigen (Hayes & McLellan, 1999; Hayes & Strange, 1995; Liebau et. al., 1997). GSTs spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von Produkten, die bei der Lipidperoxidation in der Zelle freigesetzt werden. In vitro werden diese Produkte durch verschiedene Substanzen simuliert, die den Gruppen der *trans-trans*-Alk-2,4-Dienale und der *trans*-Alk-2-enale angehören. Eine Umsetzung der Carbonyle wurde bisher bei nahezu allen GST-Klassen nachgewiesen, nur die Omega-Klasse GST bilden auch in diesem Fall wieder eine Ausnahme (Board et. al., 2000).

Bisher war es noch nicht möglich, ein genaues Substratmuster für die nematodenspezifische GST-Klasse zu erstellen (Liebau, 1994; Liebau et. al., 1997). Viele GST-Aktivitätstests wurden in der Vergangenheit mit der löslichen Fraktion von Nematodenhomogenaten durchgeführt. Bei diesen Studien konnte in allen untersuchten Arten GST-Aktivität mit dem "universellen" Substrat CDNB gemessen werden (Brophy & Barret, 1990). Es war auf diese Weise jedoch nicht möglich, die Aktivität einzelner GSTs detailliert zu untersuchen.
	Spezi	fische Aktivität [µmol/		
Aufgereinigte rGST	CDNB	Cumenhydroperoxid	Trans-2-nonenal	Literatur
Ce-GST-p24	123,4	45,5	4,5	
Ce-GST-p29	18,4	ND	6,1	
As-GST-1	38,2	0,3	0,55	Liebau et. al., 1997
Ov-GST-1	2,52	ND	ND	Liebau, 1994
Ov-GST-2	2,13	0,19	0,29	Liebau, 1994
Ov-GST-3	24,1	ND	10,27	Kampkötter (unveröffentlicht)

 Tabelle 4.4 Spezifische Aktivitäten rekombinanter Glutathion S-Transferasen aus Nematoden. Die Tabelle fasst die spezifischen Substratumsätze der bisher rekombinant hergestellten Glutathion S-Transferasen zusammen. ND = keine Aktivität detektierbar.

Die rekombinante *Ce*-GST-p24 setzte alle drei verwendeten Substrate um, genauso wie die strukturell sehr ähnliche *As*-GST-1 (siehe Tabelle 4.4). Besonders hohe Aktivitäten wurden mit CDNB und Cumenhydroperoxid gemessen, was auf die Peroxidasefunktion der GST schliessen lässt. Zusätzlich wurde auch Lipidperoxidationsprodukte wie das *Trans*-2-nonenal umgesetzt. Die Aktivität der *Ce*-GST-p24 war in allen drei Fällen deutlich höher als die der *As*-GST-1. Der Wert für die *Ce*-GST-p24-Aktivität war 3-mal höher mit CDNB, über 140-mal höher mit Cumenhydroperoxid und 8-mal höher mit *Trans*-2-nonenal. Die Umsetzung derselben Substrate ist aber zusätzlich zu der strukturellen Ähnlichkeit der Moleküle ein guter Hinweis dafür, dass diese Glutathion S-Transferasen in dieselbe Klasse der nematoden-spezifischen GSTs eingeordnet werden können.

Beim Substratmuster der rekombinanten *Ce*-GST-p29 fällt sofort ins Auge, dass Cumenhydroperoxid nicht umgesetzt wird, was für eine mögliche Einordnung in die Omega-Klasse GSTs sprechen würde. Diese Hypothese wird auch durch die strukturelle Ähnlichkeit mit anderen GSTs gestützt, die der Omega-Klasse zugeordnet werden (Board et. al., 2000; Kodym et. al., 1999). Dazu zählt auch die *Ov*-GST-3, für die mit den drei verwendeten Substraten ein sehr ähnliches Aktivitätsmuster beobachtet werden konnte (Kampkötter, unveröffentlichte Daten). Zu der Einordnung in die Omega-Klasse passt jedoch nicht, dass sowohl mit CDNB als auch mit *Trans*-2-nonenal hohe Umsatzraten erzielt werden. Bisher konnte für die typische Omega-Klasse GSTO 1-1 des Menschen mit beiden Substraten nur eine deutlich geringere Aktivität gemessen werden (Board et. al., 2000). Es darf nicht vergessen werden, dass drei Substrate nicht ausreichen, um eine GST eindeutig in eine spezifische GST-Klasse einzuordnen. Deshalb sind fortführende Studien mit mehr Substraten nötig, um ein detaillierteres Substratmuster für die verwendeten rekombinanten GSTs aus *C. elegans* zu erstellen.

5. Zusammenfassung

Aerob lebende Organismen stehen in ständigem Kontakt mit reaktiven Sauerstoffspezies, die aufgrund ihrer Schädigung von lebensnotwendigen zellulären Molekülen für den Alterungsprozess eines Individuums bzw. für die Entstehung von Krankheiten verantwortlich gemacht werden. Das Überleben unter aeroben Bedingungen kann deshalb nur durch ein effektives antioxidatives Schutzsystem gesichert werden. Glutathion S-Transferasen stellen hierbei wichtige Phase-II-Detoxifikationsenzyme dar, die zur Umsetzung reaktiver Moleküle in aeroben Organismen beitragen. In dieser Studie wurden die stressinduzierbaren Glutathiontransferasen *Ce*-GST-p24 und *Ce*-GST-p29 aus *C. elegans* detailliert analysiert. Es konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Expressionslevel der Glutathiontransferasen und der Stresstoleranz von *C. elegans* nachgewiesen werden.

Es wurden transgene *C. elegans*-Stämme etabliert, die jeweils eine Glutathion S-Transferase überexpremieren (BL1: *Ce*-GST-p24, BL2: *Ce*-GST-p29). Die Toleranz dieser Tiere gegenüber oxidativem Stress lag deutlich über der Toleranz von Wildtyp-*C. elegans*. Ein signifikanter Unterschied wurde besonders in Kontakt mit dem Chinon Juglon detektiert. Sowohl in BL1-Würmern als auch in Wildtyp-Würmern führte ein verringerter Expressionslevel der transgenen bzw. endogenen *Ce*-GST-p24 durch RNAi-feeding zu einer deutlich verringerten Stresstoleranz dieser Tiere. Der gleiche Effekt wurde auch in *C. elegans* mit einem mutierten *Ce*-GST-p24-Allel beobachtet. Demnach gibt es eine deutliche Korrelation zwischen der GST-Konzentration und der Toleranz gegenüber oxidativem Stress. Ein Einfluss des GST-Levels auf die Lebenspanne unter Normalbedingungen wurde dagegen nicht festgestellt.

Die transgene *Ce*-GST-p24 konnte spezifisch in den Muskeln, in der Hypodermis und im Pharynxbereich des BL1-Stammes nachgewiesen werden, was dem Expressionsmuster von parasitischen GSTs entspricht. Das Protein wurde nach Stressinduktion entwicklungsabhängig stärker in Larven als in Adulten des BL1-Stammes expremiert, es konnte jedoch keine erhöhte Toleranz der Larven gegenüber oxidativem Stress nachgewiesen werden.

Im *Ce*-GST-p24-Promotor wurden stressinduzierbare regulatorische Elemente gefunden. Eine Stressinduktion des Nematodenpromotors konnte eindeutig im homologen *C. elegans*-System anhand von zwei unterschiedlich langen Promotorfragmenten nachgewiesen werden. Dabei wurde die Induktion durch unterschiedliche Chemikalien erreicht, die intrazellulär erhöhte Sauerstoffradikalkonzentrationen freisetzen; durch UV-Licht und Hitzeschock hingegen wurde der Promotor nicht aktiviert. In Säugerzelllinien konnte keine Stressinduktion des GST-Promotors nachgewiesen werden. Die Glutathiontransferasen wurden in *Escherichia coli* rekombinant expremiert und konnten nativ aufgereinigt werden. Die enzymatische Aktivität der rekombinanten Proteine wurde mit unterschiedlichen Substraten bestimmt. Aufgrund der Primärstruktur und der umgesetzten Substratmuster konnte die *Ce*-GST-p24 in eine nematodenspezifische GST-Klasse eingeordnet werden. *Ce*-GST-p29 wurde aufgrund struktureller Merkmale der Omega-Klasse der GSTs zugeordnet, sie wich jedoch im umgesetzten Substratmuster von dieser Klasse ab.

6. Literaturverzeichnis

- Abramovitz, M., Homma, H., Ishigaki, S., Transey, F., Cammer, W. und Listowsky, I. (1988). Characterisation and localization of glutathione S-transferase in rat-brain and binding of hormones, neurotransmitters and drugs. J. Neurochem. 50: 50-57.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A. A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T. C., McLeod, M. P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacleb, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A. H., Wang, X., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., WoodageT, Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J. S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X. H., Zhong, F. N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H. O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M. und Venter, J. C. (2000). The genome sequence of Drosophila melanogaster. Science 287: 2185-2195.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. und Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 7915-7922.
- Arca, P., Reguera, G. und Hardisson, C. (1997). Plasmid-encoded fosfomycin resistance in bacteria isolated from the urinary tract in a multicentre survey. J. Antimicrob. Chemother. 40: 393-399.
- Ashok, B. T. und Ali, R. (1999). The aging paradox: free radical theory of aging. Exp. Gerontol. **34**: 293-303.
- Bargmann, C. I. (2001). High-throughput reverse genetics: RNAi screens in *Caenorhabditis elegans*. Genome Biol. **2**: 1005

- Bast, A. und Goris, R. J. (1989). Oxidative stress. Biochemistry and human disease. Pharm. Weekbl. Sci. **11**: 199-206.
- Bektesh, S. L. (1988). *C. elegans* mRNAs acquires a spliced leader through a *trans*-splicing mechanism. Nucleic Acids Res. **16**: 5692
- Blumenthal, T. und Thomas, T. (1988). *Cis-* and *Trans-splicing in C. elegans*. Trends Genet. 4: 305-308.
- Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L. S., Schulte, G. K., Danley, D. E., Hoth, L. R., Griffor, M. C., Kamath, A. V., Rosner, M. H., Chrunyk, B. A., Perregaux, D. E., Gabel, C. A., Geoghegan, K. F. und Pandit, J. (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. J. Biol. Chem. 275: 24798-24806.
- Bondy, S. C. und Naderi, S. (1994). Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. Biochem Pharmacol. **48**: 155-159.
- Boyer, T. D. und Vessey, D. A. (1987). Inhibition of human cationic glutathione S-transferase by nonsubstrate ligands. Hepatology. **7**: 843-848.
- Braedford, M. M. (1976). A rapide and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.
- Braeckman, B. P. und Vanfleteren, J. R. (1999). Stress-inducible mechanisms of life-span extention in Yeast, eubacteria and metazoans. Trends in Microbiology. 7: 270-271.
- Brenner, S. (1974). The Genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics. 77: 71-94.
- Broeks, A., Gerrard, B., Allikmets, R., Dean, M. und Plasterk, R. H. (1996). Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. EMBO J. **15**: 6132-6143.
- Brophy, P. M., Southan, C. und Barrett, J. (1989). Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. Biochem. J. **262**: 939-946.
- Brophy, P. M. und Barret, J. (1990). Glutathione transferase in helminths. Parasitology. **100**: 345-349.
- Brophy, P. M., Ben Smith, A., Brown, A., Behnke, J. M. und Pritchard, D. I. (1994). Glutathione S-transferases from the gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* and mammalian liver compared. Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol. **109**: 585-592.
- Brophy, P. M., Ben Smith, A., Behnke, J. M., Brown, A. und Pritchard, D. I. (1995a). Glutathione binding proteins in the gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus*. J. Parasitol. 81: 302-303.
- Brophy, P. M., Patterson, L. H., Brown, A. und Pritchard, D. I. (1995b). Glutathione S-transferase (GST) expression in the human hookworm *Necator americanus*: potential roles for excretory-secretory forms of GST. Acta Trop. **59**: 259-263.

- Brown, A. W. A. (1986). Insecticide resistance in mosquitoes: A pragmatic review. J. Am. Mosq. ControlAssoc. 2: 123-140.
- Brown, S. J., Mahaffey, J. P., Lorenzen, M. D., Denell, R. E. und Mahaffey, J. W. (1999). Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. Evol.Dev. 1: 11-15.
- Burkhardt, S., Reiter, R. J., Tan, D. X., Hardeland, R., Cabrera, J. und Karbownik, M. (2001). DNA oxidatively damaged by chromium (III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine, reseratrol and uric acid. Int. J. Biochem. Cell. Biol. **33**: 775-783.
- Buscher, M., Rahmsdorf, H. J., Litfin, M., Karin, M. und Herrlich, P. (1988). Activation of the c-fos gene by UV and phorbol ester: different signal transduction pathways converge for the same enhancer element. Oncogene. **3**: 301-311.
- Campbell, A. M., Teesdale-Spittle, P. H., Barrett, J., Liebau, E., Jefferies, J. R. und Brophy, P. M. (2001). A common class of nematode glutathione S-transferase (GST) revealed by the theoretical proteome of the model organism *Caenorhabditis elegans*. Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol. **128**: 701-708.
- Celniker, S. E. (2000). The Drosophila genome. Curr. Opin. Genet. Dev. 10: 612-616.
- Chandrashekar, R., Tsuji, N., Morales, T. H., Carmody, A. B., Ozoles, V. O., Welton, J. und Tang, L. (2000). Removal of hydrogen peroxide by a 1-cysteine peroxiredoxin enzyme of the filarial parasite *Dirofilaria immitis*. Parasitol. Res. **86**: 200-206.
- Chaudiere, J. und Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food Chem. Toxicol. **37**: 949-962.
- Clark, A. G. (1989). The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. Comp. Biochem. Physiol. **3**: 419-446.
- Clos, J. und Brandau, S. (1994). pJC20 and pJC40 two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. Protein Expr. Purif. **5**: 133-137.
- Cohen, M. S. (1994). Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. Clin. Infect. Dis. **18**: 170-179.
- Cowan, S. W., Bergfors, T., Jones, T. A., Tibbelin, G., Olin, B., Board, P. G. und Mannervik,
 B. (1989). Crystallization of GST2, a human class alpha glutathion transferase. J. Mol. Biol. 208: 369-370
- Cox, G. N., Straprans, S. und Edgar, R. S. (1981). The cuticle of *Caenorhabditis elegans*. II. Stage-specific changes in ultrastructure and protein composition during embryonic development. Dev. Biol. 86: 456-470.
- Dalton, T. P., Shertzer, H. G. und Puga, A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **39**: 67-101.
- Davies, K. J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. Biochem. Soc. Symp. **61**: 1-31.

- Davis, R. E. (1996). Spliced leader RNA *trans*-spliced in metazoa. Parasitol. Today. **12**: 33-40.
- Davis, R. E., Hardwick, C., Tavernier, P., Hodgson, S. und Singh, H. (1995). RNA *trans-splicing in flatworms*. Analysis of *trans-spliced mRNAs and genes in the human parasite Schistosoma mansoni*. J. Biol. Chem. 270: 21813-21819.
- Devary, Y., Gottlieb, R. A., Lau, L. F. und Karin, M. (1991). Rapid and preferential activation of the c-jungege during the mammalien UV response. Mol. Cell Biol. **11**: 2804-2811.
- Dirr, H., Reinemer, P. und Huber, R. (1994). X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Eur. J. Biochem. **220**: 645-661.
- Edwards, R., Dixon, D. P. und Walbot, V. (2000). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. Trends Plant Sci. **5**: 193-198.
- Epstein, H. F. und Shakes, D. C. (1995). *Caenorhabditis elegans* Modern biological analysis of an organism. Methods in cell biology, Volume 47. Academic Press. London.
- Ewbank, J. J., Barnes, T. M., Lakowski, B., Lussier, M., Bussey, H. und Hekimi, S. (1997). Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene clk-1. Science. **275**: 980-983.
- Fielding, R. A. und Meydani, M. (1997). Exercise, free radical generation, and aging. Aging (Milano). 9: 12-18.
- Fields, C. (1990). Information content of *Caenorhabditis elegans* splice site sequences varies with intron length. Nucleic Acids Res. **18**: 1509-1512.
- Finkel, T. und Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. **408**: 239-247.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello, C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded-RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. **391**: 806-811.
- Forsberg, L., de Faire, U. und Morgenstern, R. (2001). Oxidative stress, human genetic variation, and disease. Arch. Biochem. Biophys. **389**: 84-93.
- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. Science. 201: 875-880.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide Anion Radical (O₂⁻), Superoxide Dismutases, and Related Matters. The Journal of Biological Chemistry. **272**: 18515-18517.
- Friling, R. S., Bensimon, A., Tichauer, Y. und Daniel, V. (1990). Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophilic-response element. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **87**: 6258-6262.
- Galvani, A. und Sperling, L. (2002). RNA-interference by feeding in *Paramecium*. Trends Genet. **18**: 11-12.
- Girotti, A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J. Lipid Res. **39** : 1529-1542.

- Hanahan, D. (1993). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166** : 557-580.
- Harman, D. (1991). The aging process: Major risk factor for diseases and death. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **88**: 5360-5363.
- Hashmi, S., Tawe, W. und Lustigman, S. (2001). *Caenorhabditis elegans* and the study of gene function in parasites. Trends Parasitol. **17**: 387-393.
- Hayes, J. D. und Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev. Biochem. Mol. Biol. **30**: 445-600.
- Hayes, J. D. und Strange, R. C. (1995). Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. Free Radic. Res. 22: 193-207.
- Hayes, J. D. und McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. Free Radic. Res. **31**: 273-300.
- Heijn, M., Oude Elferink, R. P. und Jansen, P. L. (1992). ATP-dependent multispecific organic anion transport system in rat erythrocyte membrane vesicles. Am. J. Physiol. 262: C104-C110.
- Honda, Y. und Honda, S. (1999). The daf-2 gene network for longvity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. The FASEB journal. **13**: 1385-1393.
- Huang, X. Y. und Hirsh, D. (1989). A second *trans*-spliced RNA leader sequence in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **86** : 8640-8644.
- Ishikawa, T. (1992). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. Trends Biochem. Sci. 17: 463-468.
- Jaiswal, A. K. (1994). Jun and Fos regulation of NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene expression. Pharmacogenetics. **4**: 1-10.
- Jakobsson, P. J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A. und Persson, B. (1999). Common structural features of MAPEG - a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. Protein Sci. 8: 689-692.
- Jiang, M., Ryu, J., Kiraly, M., Duke, K., Reinke, V. und Kim, S. K. (2001). Genome-wide analysis of developmental and sex-regulated gene expression profiles in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98: 218-223.
- Johnstone, I. L. (1994). The cuticle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: a complex collagen structure. Bioessays. **16**: 171-178.
- Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K. und Wahli, W. (1993). Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferationactivated receptor-retinoid X receptor heterodimers. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 2160-2164.

- Kennedy, B. P., Aamodt, E. J., Allan, F. L., Chung, M. A., Heschl, M. F. P. und McGhee, J. D. (1993). The gut esterase gene (ges-1) from the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. J. Mol. Biol. **229**: 890-908.
- Kennedy, M. W. und Harnett, W. (2001). Parasitic Nematodes Molecular Biology, Biochemistry and Immunology. CABI Publishing. UK.
- Ketterer, B. und Meyer, D. J. (1989). Glutathione transferases: a possible role in the detoxication and repair of DNA and lipid hydroperoxides. Mutat. Res. **214**: 33-40.
- Kodym, R., Calkins, P. und Story, M. (1999). The cloning and characterization of a new stress response protein. A mammalian member of a family of theta class glutathione S-transferase-like proteins. J. Biol. Chem. **274**: 5131-5137.
- Koga, M., Zwaal, R., Guan, K. L., Avery, L. und Ohshima, Y. (2000). A *Caenorhabditis* elegans MAP kinase kinase, MEK-1, is involved in stress responses. EMBO J. 19: 5148-5156.
- Krause, M. und Hirsh, D. (1987). A *trans*-splicer leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. Cell. **49**: 753-761.
- Krause, S., Sommer, A., Fischer, P., Brophy, P. M., Walter, R. D. und 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.
- Kuwabara, P. E. und Kimble, J. (1992). tra-2 encodes a membrane protein and may mediate cell communication in the *Caenorhabditis elegans* sex dertermination pathway. Mol. Biol. Cell. 3: 461-473.
- Lakowski, B. und Hekimi, S. (1996). Determination of life span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. Science. **272**: 1010-1013.
- Lakowski, B. und Hekimi, S. (1998). The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95**: 13091-13096.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.
- Liebau, E. (1994). Charakterisierung von Glutathion S-Transferasen parasitischer Nematoden. Dissertation. Universität Hamburg.
- Liebau, E., Wildenburg, G., Walter, R. D. und Henkle-Dührsen, K. (1994). A novel type of glutathione S-transferase in *Onchocerca volvulus*. Infect.Immun. **62**: 4762-4767.
- Liebau, E., Wildenburg, G., Brophy, P. M., Walter, R. D. und Henkle-Dührsen, K. (1996). Biochemical analysis, gene structure and localization of the 24 kDa glutathione Stransferase from *Onchocerca volvulus*. Mol. Biochem. Parasitol. **80**: 27-39.
- Liebau, E., Eckelt, V. H., Wildenburg, G., Teesdale-Spittle, P., Brophy, P. M., Walter, R. D. und Henkle-Dührsen, K. (1997). Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. Biochem. J. **324**: 659-666.

- Liebau, E., Eschbach, M. L., Tawe, W., Sommer, A., Fischer, P., Walter, R. D. und 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.
- Link, C. D., Cypser, J. R., Johnson, C. J. und Johnson, T. E. (1999). Direct observation of stress response in *Caenorhabditis elegans* using a reporter transgene. Cell Stress. Chaperones. **4**: 235-242.
- Link, C. D. und Johnson, C. J. (2002). Reporter transgenes for the study of oxidant stress in *Caenorhabditis elegans*. Meth. Enzymol. In Druck.
- Lints, F. A. (1989). The rate of living theory revisited. Gerontology. 35: 36-57.
- Maizles, R. N., Bundy, D. A., Selkirk, M., Smith, D. F. und Anderson, R. M. (1993). Immunologica modulation and evasion by helminth parasites in human populations. Nature. 365: 797-805.
- Mannervik, B. und Guthenberg, C. (1981). Glutathione transferase (human placenta). Methods Enzymol. **77:231-5.**: 231-235.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. K., Warholm, M. und Jörnvall, H. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structure data and enzymatic properties. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82: 70202-70206.
- Martin, J. L. (1995). Thioredoxin a fold for all reasons. Structure 3: 245-250.
- Masoro, E. J. (1996). Possible mechanisms underlying the antiaging actions of caloric restriction. Toxicol. Pathol. 24: 738-741.
- Maytin, M., Leopold, J. und Loscalzo, J. (1999). Oxidant stress in the vasculature. Curr. Atheroscler. Rep. 1: 156-164.
- McDermott, L., Moore, J., Brass, A., Price, N. C., Kelly, S. M., Cooper, A. und Kennedy, M. W. (2001). Mutagenic and chemical modification of the ABA-1 allergen of the nematode *Ascaris*: consequences for structure and lipid binding properties. Biochemistry 40: 9918-9926.
- McLellan, L. I. und Wolf, C. R. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. Drug Resist. Updat. 2: 153-164.
- Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D. und Ambros, V. (1991). Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. EMBO J. 10: 3959-3970.
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M. S., Walker, D. W., Clayton, P. E., Wallace, D. C., Malfroy, B., Doctrow, S. R. und Lithgow, G. J. (2000). Extension of Life-Span with Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics. Science 289: 1567-1569.
- Meyer, D. J., Muimo, R., Thomas, M., Coates, D. und 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.

- Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P. P., Lanfrancone, L. und Pelicci, P. G. (1999). The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. Nature **402**: 309-313.
- Misquitta, L. und Paterson, B. M. (1999). Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA-interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **96**: 1451-1456.
- Murakami, S. und Johnson, T. E. (1998). Life extension and stress resistance in *Caenorhabditis elegans* modulated by the tkr-1 gene. Curr. Biol. 8: 1091-1094.
- Murakami, S., Tedesco, P. M., Cypser, J. R. und Johnson, T. E. (2000). Molecular genetic mechanisms of life span manipulation in *Caenorhabditis elegans*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 908: 40-49.
- Murakami, S. und Johnson, T. E. (2001). The OLD-1 positive regulator of longevity and stress resistance is under DAF-16 regulation in *Caenorhabditis elegans*. Curr. Biol. **11**: 1517-1523.
- Murphy, W. J., Watkins, K. P. und Agabian, N. (1986). Identification of a novel Y-branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for *trans*-splicing. Cell **47**: 517-525.
- Nelson, R. G., Parson, M., Barr, P. J., Stuart, K., Selkirk, M. und Agabian, N. (1983). Sequences homologous to the variant antigen mRNA spliced leader are located in tandem repeats and variable orphons in *Trypanosoma brucei*. Cell **34**: 901-909.
- Nilsen, T. W. (1989). Trans-splicing in nematodes. Exp. Parasitol. 69: 413-416.
- Nilsen, T. W. (1992). *Trans*-splicing in protozoa and helminths. Infect. Agents. Dis. 1: 212-218.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. und Sugino, Y. (1990). A rapide and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. Nucleid Aci. Res. **18**: 6169
- O'Brien, P. J. (1991). Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. Chem. Biol. Interact. **80**: 1-41.
- Orr, W. C. und Sohal, R. S. (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. Science **263**: 1128-1130.
- Patel, M. und Day, B. J. (1999). Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. Trends Pharmacol. Sci. **20**: 359-364.
- Pemble, S. E., Wardle, A. F. und Taylor, J. B. (1996). Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. Biochem J. **319**: 749-754.
- Poinar, G. O. (1983). The natural history of Nematodes. Prentice-Hall International. New Jersey.

- Ranson, H., Prapanthadara, L. und Hemingway, J. (1997). Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT-resistant strain of *Anopheles gambiae*. Biochem. J. **324**: 97-102.
- Rao, U. R., Salinas, G., Mehta, K. und Klei, T. R. (2000). Identification and localization of glutathione S-transferase as a potential target enzyme in *Brugia* species. Parasitol. Res. 86: 908-915.
- Redmond, D. L., Clucas, C., Johnstone, I. L. und Knox, D. P. (2001). Expression of *Haemonchus contortus* pepsinogen in *Caenorhabditis elegans*. Mol. Biochem. Parasitol. 112: 125-131.
- Reinemer, P., Dirr, H., Ladenstein, R., Schaffer, J., Galley, O. und Huber, R. (1991). The three-dimentional structure of class pi glutathine S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 A resolution. EMBO J. **10**: 1997-2005.
- Riddle, D.L. (1988). The dauer larvae. In: Wood, W.B. The nematode *Caenorhabditis elegans*. pp 393-412. Cold Spring Habor Laboratory Press. New York.
- Rojas, J., Rodriguez-Osorio, M. und Gomez-Garcia, V. (1997). Immunological characteristics and localization of the *Trichinella spiralis* glutathione S-transferase. J. Parasitol. 83: 630-635.
- Rosen, G. M., Pou, S., Ramos, C. L., Cohen, M. S. und Britigan, B. E. (1995). Free radicals and phagocytic cells. The FASEB J. 9: 200-209.
- Rushmore, T. H., King, R. G., Paulson, K. E. und Pickett, C. B. (1990). Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-response element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87: 3830
- Saltman, P. (1989). Oxidative stress: a radical view. Semin. Hematol. 26: 249-256.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, second edition.
- Saxena, M., Singhal, S. S., Awasthi, S., Singh, S. V., Labelle, E. F., Zimniak, P. und Awasthi, Y. C. (1992). Dinitrophenyl S-glutathione ATPase purified from human muscle catalyses ATP hydrolysis in the presence of leukotrienes. Arch. Biochem. Biophys. 298: 231-237.
- Sayre, L. M., Smith, M. A. und Perry, G. (2001). Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. Curr. Med. Chem. 8: 721-738.
- Serra, E., Zemzoumi, K. und Dissous, C. (1997). Deletion analysis of the Schistosoma mansoni 28-kDa glutathione S-transferase gene promoter in mammalian cells. Eur. J. Biochem. 248: 113-119.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. und Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem. J. **360**: 1-16.

- Shi, H., Djikeng, A., Mark, T., Wirtz, E., Tschudi, C. und Ullu, E. (2000). Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. RNA **6**: 1069-1076.
- Sies, H. (1986). Biochemie des oxidativen Stress. Angew. Chem. 98: 1067-1075.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Academic Press. London.
- Smale, S. T. (1997). Transcription initiation from TATA-less promotors within eukaryotic protein-coding genes. Biochim. Biophys. Acta. 1351: 73-88.
- Sommer, A., Nimtz, M., Conradt, H. S., Brattig, N., Boettcher, K., Fischer, P., Walter, R. D. und Liebau, E. (2001). Structural analysis and antibody response to the extracellular glutathione S-transferases from *Onchocerca volvulus*. Infect. Immun. 69: 7718-7728.
- Storz, G. und Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. Curr. Opin. Microbiol. 2: 188-194.
- Streyer, L. (1988). Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.
- Tabara, H., Grishok, A. und Mello, C. C. (1998). RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. Science **282**: 430-431.
- Tanaka, T., Nakanura, H., Nishiyama, A., Hosoi, F., Masutani, H., Wada, H. und Yodoi, J. (2000). Redox regulation by thioredoxin superfamily: protection against oxidative stress and aging. Free Radic. Res. 33: 851-855.
- Taub, J., Lau, J. F., Ma, C., Hahn, J. H., Hoque, R., Rothblatt, J. und Chalfie, M. (1999). A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans* daf-2 and clk-1 mutants. Nature **399**: 162-166.
- Tawe, W. N., Eschbach, M. L., Walter, R. D., und Henkle-Dührsen, K. (1998). Identification of stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans* using RT-PCR differential display. Nucleic Acids Res. 26: 1621-1627.
- Tawe, W., Walter, R. D. und Henkle-Dührsen, K. (2000). Onchocerca volvulus superoxide dismutase genes: identification of functional promoters for pre-mRNA transcripts which undergo *trans*-splicing. Exp. Parasitol. 94: 172-179.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. Science **282**: 2012-2018.
- Timmons, L. und Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA [letter]. Nature **395**: 854
- Timmons, L., Court, D. L. und Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. Gene. **263**: 103-112.
- Toba, G. und Aigaki, T. (2000). Disruption of the microsomal glutathione S-transferase-like gene reduces life span of *Drosophila melanogaster*. Gene **253**: 179-187.

- van Rossum, A. J., Brophy, P. M., Tait, A., Barrett, J. und Jefferies, J. R. (2002). Proteomic identification of Glutathione S-transferase from the model nematode *Caenorhabditis elegans*. In Druck.
- Vanfleteren, J. R. und Braeckman, B. P. (1999). Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans*. Neurobiol. Aging. 20: 487-502.
- Vuilleumier, S., Sorribas, H. und Leisinger, T. (1997). Identification of a novel determinant of glutathione affinity in dichloromethane dehalogenases/glutathione S-transferases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 238: 452-456.
- Walker, J., Crowley, P., Moreman, A. D. und Barret, J. (1993). Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. Mol. Biochem. Parasitol. 61: 255-264.
- Wargelius, A., Ellingsen, S. und Fjose, A. (1999). Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. Biochem. Biophys. Res. Commun. 263: 156-161.
- Warner, H. R. (1994). Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. Free Radic. Biol. Med. **17**: 249-258.
- Wasserman, W. W. und Fahl, W. E. (1997). Functional antioxidant responsive elements. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94: 5361-5366.
- Wianny, F. und Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. Nat. Cell Biol. 2: 70-75.
- Wildenburg, G., Liebau, E. und Henkle-Dührsen, K. (1998). *Onchocerca volvulus*: ultrastructural localization of two glutathione S- transferases. Exp. Parasitol. **88**: 34-42.
- Wong, A., Boutis, P. und Hekimi, S. (1995). Mutations in the *clk*-1 gene of *Caenorhabditis elegans* affect development and behavioral timing. Genetics **139**: 1247-1259.
- Xie, C., Lovell, M. A., Xiong, S., Kindy, M. S., Guo, J., Xie, J., Amaranth, V., Montine, T. J. und Markesbery, W. R. (2001). Expression of glutathione-S-transferase isozyme in the SY5Y neuroblastoma cell line increases resistance to oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. **31**: 73-81.
- Xu, X. und Stambrook, P. J. (1994). Two murine GSTpi genes are arranged in tandem and are differentially expressed. J. Biol. Chem. 269: 30268-30273.
- Zemzoumi, K., Dissous, C., Cochu, A., Trolet, J., Capron, A. und McNair, A. (1995). *Schistosoma mansoni*: interaction of nuclear extracts with the CCAAT-binding site revealed by the gel shift assay. Exp.Parasitol. **80**: 149-154.
- Zemzoumi, K., Serra, E., Mantovani, R., Trolet, J., Capron, A. und Dissous, C. (1996). Cloning of *Schistosoma mansoni* transcription factor NF-YA subunit: phylogenic conservation of the HAP-2 homology domaine. Mol.Biochem.Parasitol. **77**: 161-172.
- Zeng, W., Alarcon, C. M. und Donelson, J. E. (1990). Many transcribed regions of the *Onchocerca volvulus* genom contain the spliced leader sequence of *Caenorhabditis elegans*. Mol. Cell. Biol. **10**: 2765-2773.

Zhou, Z. H. und Syvanen, M. (1997). A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. Mol. Gen. Genet. **256**: 187-194.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	OH [.]	Hydroxylradikal
Aqua demin.	Demineralisiertes Wasser	Ov	Onchocerca volvulus
Amp	Ampicillin	PAGE	Polyacrylamidgelelektophorese
AP	Adaptorprotein	PBS	Phosphate-buffered saline
ARE	Anioxidant response element	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
AS	Aminosäure	pН	H ⁺ -Ionenkonzentration
As	Ascaris suum	pI	Isoelektrischer Punkt
ATP	Adenosintriphosphat	PRX	Peroxiredoxine
bp	Basenpaar	Q	Ubichinon
BSA	Bovines Serumalbumin	RNA	Ribonukleinsäure
CAT	Katalase	mRNA	"messenger" RNA
Ce	Caenorhabditis elegans	RNAi	RNA-interference
°C	Grad Celsius	rpm	Umdrehungen pro Minute
СНО	Chinese Hamster Ovary Cells	ŔŢ	Raumtemperatur, Reverse Transkription
DIG	Digoxigenin	s	Sekunden
DNA	Desoxyribonukleinsäure	S	Schwefel
gDNA	Genomische DNA	SDS	Natriumdodecvlsulfat
cDNA	Komplementäre DNA	SOD	Superoxiddismutase
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	TPA	12-O-Tetradecanovlphorbol-13-acetat
DTT	Dithiotreitol	TPX	Thioredoxinperoxidase
E coli	Escherichia coli	TRE	TPA response element
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
FST	Expressed sequence tag"	U	Unit
EtBr	Fthidiumbromid	UTR	Untranslatierte Region
FCS	Fötales Kälberserum		Ultraviolett
n CD	Gramm Frdbeschleunigung	Vol	Volumen
5 GFP	Grünes Eluoreszenzprotein	voi	-fach
GPX	Glutathionperovidase	X	X-Chromosom
GSH	Reduziertes Glutathion	XOD	Yanthinovidase
GSSG	Ovidiertes Glutathion	V	Volt
GST	Glutathion & Transferase	v	Voit
h	Stunde		
	Salzeäure		
	Histidin		
H.O.	Wasserstoffperovid		
H_2O_2	Hitzeschockpromotor		
Isp	Immunoglobulin		
IgO	Initiator		
IIII II INI	a Jun N terminale Kinase		
JUN	Vilobasonnaara		
kU IzDo	Kilodalton		
KDa Vonz	Kiloualloli		
KUIIZ.	L orvenstadium 3		
1	Laivenstaulum 5		
I M	Liter		
	Millionen oro		
MCS	Multiple cloping site"		
MCS	, Multiple cloning site		
mg	Milingramm		
μg	Mikrogramm		
m mM	millimolar		
NADPH	Nikotinamiaainukleotidphosphat		
NF	INUKIEARTAKTOR		
O_2	Sauerstoff		
O_2^{\cdot}	Superoxidanionradikal		
OD	Optische Dichte		
	±		

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

(Britta Leiers) Düsseldorf, März 2002

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. W. Kunz für die Begutachtung dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor. Mit seiner Gabe, Ding aus einem vollständig anderem Blickwinkel zu betrachten, hat er in anregenden Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Desweiteren möchte ich mich auch für seinen Einsatz bedanken, meinen ornithologischen und botanischen Wissensschatz zu erweitern. Möge der Wendehals (*Jynx torquilla*) wiederkommen und die Osterluzei (*Aristolochia clematitis*) noch lang blühen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. Kimberly Henkle-Dührsen. Durch ihre unermüdliche Betreuung, die vielen unterstützenden Diskussionen und die ausgezeichneten wissenschaftlichen Ratschläge hat sie entscheidend zur Realisierung dieser Promotionsarbeit beigetragen.

Bei Dr. Andreas Kampkötter und Thorsten E. Volkmann möchte ich mich ganz herzlich für eine einmalige, unvergessliche Zeit im Labor 68 bedanken. Andreas hat mit grossem Elan und sehr viel Geduld dazu beigetragen, aus einer biochemisch denkenden Tierphysiologin eine Molekularbiologin zu machen (obwohl das bestimmt eine harte Nuss war). Thorsten schaffte es, insbesondere durch seine grosse Hilfsbereitschaft in Computerfragen und in technischen Problemen, mich davon abzuhalten, die Geräte schlussendlich doch aus dem Fenster zu schmeissen. Vielen Dank Ihr zwei, dass Ihr die Adrenalinschübe - insbesondere vor Vorträgen - und meine Putzattacken mit soviel Humor ertragen habt!

PD. Dr. Christoph G. Grevelding möchte ich herzlich für sein grosses Interesse an meiner Arbeit und für die vielen sehr hilfreichen Diskussionen und Ratschläge danken. Ich danke auch Volker Wippersteg, Jürgen Knobloch, Anja Buchheiser, Steffi Liedtke, Stephan Sroka und Frau Didina David (und allen Ehemaligen) für drei unvergessliche Jahre im Genetikinstitut. Ich möchte mich auch bei allen anderen Mitgliedern des Instituts für Genetik insbesondere bei der Arbeitsgruppe von Dr. Olaf Bossinger - für die Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima bedanken. Den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie danke ich für die Unterweisung in der Fluorometer- bzw. Luminometermesstechnik und der Bereitstellung des Gerätes. Der Arbeitsgruppe von Dr. Chris Link (University of Boulder, Colorado, USA) danke ich für die Übersendung der transgenen C. elegans-Stämme und die Diskussionsbereitschaft bezüglich dieser per E-Mail. Desweiteren möchte ich mich beim Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota, St. Paul, USA) für die zugesendeten C. elegans-Stämme, beim Team des C. elegans Gene Knockout Projects (OMRF) für die kostenlose Etablierung der K08F4.7-Deltionsmutante und beim Labor von A. Fire für die Bereitstellung der Vektorkits bedanken. Diese Promotionsarbeit wurde finanziell durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt (DFG-Projekte HE 2974/2-1 und 2-2).

Ich möchte mich ganz herzlich bei Corinna, Karin, Katja und Sandra dafür bedanken, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir halfen, auch in stressigen Zeiten auf dem Boden der Tatsachen zu bleiben. Jetzt habe ich Euch noch mal drei Jahre mit Würmern genervt - wahrscheinlich seit Ihr inzwischen schon immun gegen dieses Wort ...

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für das grosse Interesse und die stetige Unterstützung, mit der sie meinen Weg bis zur Promotion begleitet und ermöglicht hat.

Vielen Dank Uli, für Dein grosses Vertrauen in mich. Du warst in dieser Zeit immer für mich da und hast mir, trotz der räumlichen Trennung, mit Rat und Tat zur Seite gestanden.