

**Molekular- und zellbiologische Untersuchung zur Rolle des  
kanonischen Wnt-Signalwegs bei der Entwicklung von  
*Echinococcus multilocularis***

**Molecular and cell biological investigations on the role of canonical  
Wnt signaling in *E. multilocularis* development**



**DISSERTATION**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Graduiertenschule für Lebenswissenschaften, Fachbereich "Infection & Immunity"  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

vorgelegt von

**Ruth Magdalena Herrmann**

geboren in Würzburg

Würzburg 2021



Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. med. Manfred Gessler

1. Betreuer: Prof. Dr. Klaus Brehm

2. Betreuer: Prof. Dr. Christian Janzen

3. Betreuer: Prof. Dr. Christian Stigloher

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, diese Dissertation eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

---

Ort, Datum

---

Ruth Herrmann

## Affidavit

I hereby confirm that my thesis is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

---

Place, Date

---

Ruth Herrmann

***Curriculum Vitae***



## **Danksagung**

Ich möchte allen Personen danken, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Frosch für die Verfügungstellung der Laboreinrichtungen. Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Brehm, für die Möglichkeit diese Doktorarbeit anzufertigen, die vielen interessanten Diskussionen und Inspirationen und Unterstützung. Meinem Zweitgutachter Prof. Janzen, dessen Beiträge in Vorlesungen im Rahmen meines Masterstudiums mich besonders inspiriert und motiviert haben.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Georg Krohne, Herrn Prof. Christian Stigloher und den TAs Claudia Gehrig und Daniela Bunsen der zentralen Abteilung für Mikroskopie am Biozentrum der Universität Würzburg für die freundliche Unterstützung bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Dem Labor-Team der AG Brehm danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, interessanten Gespräche und humorvolle Zeit. Allen voran Herrn Dr. Markus Spiliotis, Monika Bergmann und Dirk Radloff für die Einarbeitung in Methoden und stets offenem Ohr und Rat bei aufkommenden Fragen. Zudem danke ich allen Weggefährten in der Arbeitsgruppe, am IHM und Promovenden der GSLS für den Austausch und die gegenseitige Unterstützung.

Ich danke der GSLS für die Unterstützung meiner Promotion und die interessanten und lehrreichen Kurse sowie den Mitarbeitern für stets freundliche und hilfreiche Auskunft.

Dankbar bin ich für meine Eltern, meinen Partner, Familie und Freunde, die mich stets inspirieren, unterstützen und mein Leben mit Begegnungen und Erlebnissen so sehr bereichern. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für deren grenzenloses Verständnis und bedingungslose Unterstützung. Ebenso gilt dieser Dank meinem Freund, seiner Schulter und den vielen motivierenden Worten. Ich danke meiner Schwester, meinen Freundinnen und Freunden für die Freundschaft und Unternehmungen, welche mir insbesondere in stressigen Phasen einen wertvollen Ausgleich boten.

## Zusammenfassung

Die alveoläre Echinokokkose (AE) ist eine lebensbedrohliche Erkrankung des Menschen, welche durch das infiltrative Wachstum des Metazestoden-Larvenstadiums des Fuchsbandwurms (*Echinococcus multilocularis*) in der Leber verursacht wird. Das tumorartige Wachstum des Metazestoden beruht auf einer *Echinococcus*-spezifischen Modifikation der anterior-posterioren-Körperachse (AP-Achse). Es wird vermutet, dass dabei der anteriore Pol der invadierenden Oncospären-Larve zunächst abgeschaltet wird und sich der Metazestode anschließend asexuell als vesikuläres, posteriorisiertes Gewebes im Wirt vermehrt. Nach massiver Proliferation wird der anteriore Pol reetabliert und führt zur Bildung zahlreicher Bandwurm-Kopfanlagen (Protoskolizes). Da die Ausbildung der AP-Körperachse evolutionsgeschichtlich konserviert über den wingless-related (Wnt)-Signalweg gesteuert wird, wurde in dieser Arbeit die Rolle von Wnt-Signaling bei der Musterbildung von *E. multilocularis* über molekular- und zellbiologische Studien näher beleuchtet.

Zentraler methodischer Ansatz der vorliegenden Arbeit war ein *E. multilocularis* Stammzell-Kultursystem, das Primärzellsystem, welches die *in vitro*-Generierung von Metazestoden-Vesikeln durch Proliferation und Differenzierung von germinativen Zellen (Stammzellen) erlaubt. Über RNA-Sequenzierung wurde zunächst gezeigt, dass in Primärzellkulturen sowohl Markergene für posteriore Entwicklung in Richtung Metazestode wie auch für Anterior- und Protoskolixmarker exprimiert werden. Unter Verwendung von RNA-Interferenz (RNAi) wurde anschließend ein erfolgreicher Knockdown des vermuteten Hauptregulators des kanonischen Wnt-Signalwegs,  $\beta$ -Catenin (*em-bcat1*), erreicht und führte zu einem charakteristischen, sogenannten ‚red-dot‘-Phänotyp, dem ersten jemals beschriebenen RNAi Phänotyp für *E. multilocularis*-Primärzellen. Primärzellkulturen nach *em-bcat1* RNAi zeigten eine stark verminderte Fähigkeit, Metazestoden-Vesikel zu bilden sowie eine Überproliferation von germinativen Zellen. Zusätzliche RNA-Seq-Analysen des Transkriptom von RNAi(*em-bcat1*)-Kulturen zeigten eine signifikant verringerte Expression von Posterior- und Metazestodenmarkern, während Anterior- und Protoskolixmarker deutlich überexprimiert wurden. Durch umfangreiche Whole-mount-in-situ-Hybridisierung (WMISH)-Experimente wurden diese Daten für eine Reihe ausgewählter Markergene für posteriore (Metazestode; *em-wnt1*, *em-wnt11b*,

*em-muc1*) und für anteriore Entwicklung (Protoskolex; *em-sfrp*, *em-nou-darake*, *em-npp36*, *em-frizzled10*) verifiziert. In allen genannten Fällen zeigte sich durch Änderung der Polarität eine verminderte Genexpression von Posteriormarkern, während Anteriormarker deutlich erhöht exprimiert wurden. Ähnlich wie bei den verwandten, freilebenden Planarien, führt demnach ein Knockdown des zentralen Wnt-Regulators  $\beta$ -Catenin bei *E. multilocularis* zu einer anteriorisierten, Anterior- und Protoskolexmarker dominierte Genexpression, welche der posteriorisierten Entwicklung zum Metazestoden entgegenwirkt.

Neben Markergenen für die Ausbildung der AP-Achse wurden in dieser Arbeit auch solche für die medio-laterale (ML)-Körperachse bei Zestoden erstmals beschrieben. So zeigte sich, dass ein Slit-Ortholog (*em-slit*) im *E. multilocularis* Protoskolex im Bereich der Körper-Mittellinie exprimiert wird und lieferte Hinweise darauf, dass, ähnlich zur Situation bei Planarien, die ML-Achse von *E. multilocularis* durch Morphogengradienten aus *slit* (Mittellinie) und *wnt5* (lateral) definiert wird. Im Metazestoden wird hingegen nur *em-slit* exprimiert. Der Metazestode besitzt damit als posterior-medianisiertes Gewebe Anlagen zur Polarität zur AP- und ML-Achse, welche erst mit Bildung von Protoskolizes vollständig etabliert werden. Schließlich deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass bei der Wiederherstellung der Körperachsen während der Entwicklung von Protoskolizes Hedgehog (Hh)-Signale entscheidend mitwirken.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit der zentrale Faktor des kanonischen Wnt-Signalwegs,  $\beta$ -Catenin, als Hauptregulator der Entwicklung des tumorartig wachsenden *E. multilocularis*-Metazestoden identifiziert. Zudem wurde gezeigt, dass zur Metazestodenbildung neben einer *Echinococcus*-spezifischen Modifikation der AP-Körperachse auch eine solche der ML-Achse beiträgt. In humanen malignen Tumoren sind der Wnt-, Slit-Robo- und Hh-Signalweg gut erforschte Wirkstofftargets und könnten in Zukunft in ähnlicher Weise für eine zielgerichtete Therapie von AE dienen.



## Abstract

Alveolar echinococcosis (AE) is a life-threatening human disease caused by the infiltrative growth of the metacestode larval stage of the fox tapeworm (*Echinococcus multilocularis*) within the host liver. According to previous research, the tumor-like growth of the metacestode is due to an *Echinococcus*-specific modification of the anterior-posterior (AP)-body axis formation. It is thus assumed that the invading oncosphere larva transiently represses the anterior pole, giving rise to metacestode vesicles which proliferate within the host as posteriorized tissue. Upon massive proliferation, the anterior pole is re-established at numerous sites within the metacestode tissue, yielding large numbers of tapeworm heads (protoscoleces). Since the formation of the AP-body axis is evolutionarily conserved and regulated by canonical wingless-related (Wnt) signaling, the present work investigated in detail the role of the Wnt-pathway in *Echinococcus* metacestode formation via molecular and cell biological studies.

Methodologically, this work focussed on an *Echinococcus* stem cell cultivation system, called the primary cell system, which allows the *in-vitro* generation of mature metacestode vesicles through proliferation and differentiation of germinative cells (stem cells). By genome-wide RNA-Seq transcriptomics it is shown that primary cell cultures express marker genes for both posterior development towards the metacestode as well as anterior development of head organizers. By RNA interference (RNAi), successful knockdown of the presumed central regulator of canonical Wnt-signaling,  $\beta$ -catenin (*em-bcat1*), was achieved, yielding a striking phenotype ('red dot'), the first RNAi phenotype described for *E. multilocularis* primary cells. Primary cell cultures after *em-bcat1* RNAi showed a greatly reduced ability to form metacestode vesicles as well as an overproliferation of germinative cells. Additional RNA-Seq analysis of the transcriptome of RNAi(*em-bcat1*) cultures indicated significantly decreased expression of posterior and metacestode markers whereas anterior and protoscolex markers were markedly overexpressed. These data were verified using whole-mount-in-situ-hybridization (WMISH) for several selected marker genes for posterior (metacestode; *em-wnt1*, *em-wnt11b*, *em-muc1*) and for anterior development (protoscolex; *em-sfrp*, *em-nou-darake*, *em-npp36*, *em-frizzled10*). In all cases, a change in polarity showed decreased gene expression of posterior markers whereas anterior markers were significantly increased in expression.

Similar to the situation in related planarians, knockdown of  $\beta$ -Catenin in *E. multilocularis* lead in anteriorized, anterior- and protoscolex marker-dominated gene expression and antagonized the formation of the posteriorized metacestode. In addition to marker genes for AP-axis formation, this work also established marker genes for the medio-lateral (ML)-body axis in cestodes for the first time. In particular, a *slit* orthologue (*em-slit*) was shown to be expressed in the *E. multilocularis* protoscolex at the body midline and provided evidence that, similar to the situation in planarians, the ML-axis of *E. multilocularis* is defined by morphogen gradients consisting of *slit* (midline) and *wnt5* (lateral). In contrast, only *em-slit* is expressed in the metacestode. Thus, the metacestode tissue is indeed posterior-medianized and the AP- and ML-axes are established only with formation of protoscoleces. Finally, the results of this work suggest that Hedgehog (Hh) signaling plays a critical role in the reestablishment of body axes during protoscoleces development.

In conclusion, this work identified the central regulator of the canonical Wnt-signaling pathway,  $\beta$ -catenin, as a master regulator of *E. multilocularis* metacestode development. Furthermore, it is herein established that metacestode formation not only involves *Echinococcus*-specific modification of the AP-axis but also of the ML-axis. In human malignant tumors, the Wnt, Slit-Robo, and Hh-pathway are well-studied drug targets and may similarly serve for AE targeted therapy in the future.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Der Fuchsbandwurm <i>Echinococcus multilocularis</i> .....	1
1.1.1	Taxonomie von <i>Echinococcus multilocularis</i> .....	1
1.1.2	Lebenszyklus .....	4
1.1.3	Epidemiologie .....	7
1.1.4	Alveoläre Echinokokkose .....	7
1.1.5	<i>In-vitro</i> Zellkultur von <i>E. multilocularis</i> .....	10
1.1.5.1	<i>In-vitro</i> Kultivierung von Metazestoden.....	10
1.1.5.2	<i>In-vitro</i> Kultivierung von Protoskolizes.....	11
1.1.5.3	Primärzellkultur und germinative Zellen.....	11
1.2	Körperachsen in <i>E. multilocularis</i> .....	14
1.2.1	Wnt-Signalweg.....	14
1.2.2	Slit-Robo-Signalweg .....	18
1.2.3	Hedgehog-Signalweg.....	19
1.2.4	TGF- $\beta$ /BMP-Signalweg .....	20
1.3	Ziel der Arbeit.....	21
1.3.1	Transkriptomanalysen zur <i>E. multilocularis</i> Primärzellkultur .....	21
1.3.2	Der Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Entwicklung des Metazestoden.....	22
1.3.3	Weitere Signalwege zur Ausbildung der Körperachsen in <i>E. multilocularis</i> .....	23
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Instrumente .....	24
2.2	Software .....	24
2.3	Online Tools .....	24
2.4	Chemikalien, Puffer und Kits .....	25
2.4.1	Chemikalien .....	25

2.4.2	Lösungen und Puffer.....	29
2.4.3	Kits.....	33
2.5	Verbrauchsmaterial .....	33
2.6	Oligonukleotide.....	35
2.7	Zellkultur.....	35
2.7.1	Generelle Regeln und Handhabung im Umgang mit <i>E. multilocularis</i> Kulturen und infizierten Geweben .....	35
2.7.2	Verantwortung und Ethik.....	36
2.7.3	<i>In-vitro</i> Kultivierung von <i>E. multilocularis</i> .....	36
2.7.3.1	Aufbereitung von Metazestodengewebe und verwendete Isolate ..	36
2.7.3.2	<i>In-vitro</i> Kultivierung vom Metazestoden.....	37
2.7.3.3	Axenische Kultivierung von <i>E. multilocularis</i> Metazestoden .....	37
2.7.3.4	Isolierung von Protoskolizes.....	38
2.7.3.5	<i>In-vitro</i> Kultivierung von Protoskolizes.....	39
2.7.3.6	Isolierung von Primärzellen aus <i>E. multilocularis</i> Metazestoden- Vesikeln zur Verwendung von RNAi-Experimenten .....	40
2.7.3.7	<i>In-vitro</i> Kultivierung von Primärzellen .....	41
2.7.4	Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien .....	41
2.8	Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen von adult-ähnlichen Würmern .....	42
2.9	RNA Interferenz (RNAi).....	42
2.9.1	siRNA Design.....	43
2.9.2	RNAi Protokoll.....	43
2.9.3	Bestimmung der Vesikelanzahl und Vesikeldurchmesser.....	45
2.10	Nachweis der Genexpression mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR)45	
2.10.1	RNA Isolierung.....	45
2.10.2	Bestimmung der RNA-Konzentration .....	46
2.10.3	cDNA Synthese (RT-PCR).....	46

2.10.4	Semi-quantitative Real-Time-PCR .....	46
2.11	Statistische Auswertung .....	47
2.12	Alkalische Phosphatase Histochemie.....	47
2.13	Whole-mount-in-situ-Hybridisierung (WMISH).....	48
2.13.1	Bioinformatische Analysen zur Herstellung von RNA Sonden und Primerdesign .....	48
2.13.2	Amplifikation der geeigneten cDNA Sequenzen mittels PCR.....	49
2.13.3	Analyse der PCR Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	50
2.13.4	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	50
2.13.5	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	50
2.13.6	Klonierung in den Vektor pJET1.2 .....	50
2.13.7	Transformation in <i>E. coli</i> .....	51
2.13.8	Kolonie PCR .....	51
2.13.9	Plasmid-Minipräparation aus transformierten <i>E. coli</i> .....	52
2.13.10	DNA-Sequenzierung .....	52
2.13.11	In-vitro-Transkription .....	53
2.13.12	RNA-Aufreinigung .....	54
2.13.13	Dot Blot .....	55
2.13.14	EdU Labeling und Fixierung von <i>E. multilocularis</i> Metazestoden- Vesikel, Protoskolizes und Primärzellen für WMISH .....	55
2.13.15	WMISH Durchführung.....	56
2.13.16	EdU Detektion.....	58
2.13.17	Flourescein-Tyramid-Synthese .....	59
2.13.18	Aufreinigung von Torula-RNA .....	59
3	Ergebnisse .....	60
3.1	Charakterisierung des <i>em-bcat1</i> (RNAi)-Phänotyps in Primärzellen .....	60
3.1.1	Effizienz und statistische Verifikation des angewandten RNAi-Protokolls .....	60

3.1.1.1	Verifizierung des <i>em-bcat1</i> Knockdown durch qPCR.....	60
3.1.2	<i>em-bcat1</i> Knockdown zeigt spezifischen Phänotyp mit verminderter Vesikel-Bildung.....	62
3.2	Transkriptomanalyse der <i>E. multilocularis</i> Primärzellkultur .....	64
3.2.1	Zellen der Primärzellkultur exprimieren Gene, die mit germinativen Zellen assoziiert sind (GZA) .....	65
3.2.2	Zellen der Primärzellkultur exprimieren Metazestoden-spezifische Gene (MZS).....	66
3.2.2.1	Zellen der Primärzellkultur exprimieren Protoskolex-spezifische Gene (PSS) .....	66
3.2.2.2	Zellen der Primärzellkultur exprimieren GZA-, MZS- und PSS.....	67
3.2.3	Genexpression von GZA, MZS und PSS in Primärzellkulturen nach RNAi ( <i>em-bcat1</i> ).....	68
3.2.3.1	GZA sind nach <i>em-bcat1</i> Knockdown überwiegend erhöht exprimiert.....	68
3.2.3.2	MZS sind nach <i>em-bcat1</i> Knockdown verringert exprimiert .....	68
3.2.3.3	PSS sind nach <i>em-bcat1</i> Knockdown überwiegend erhöht exprimiert.....	68
3.2.4	Genexpression ausgewählter Gene mit Schlüsselfunktion in Primärzellkulturen nach <i>em-bcat1</i> RNAi.....	69
3.2.5	GZA in Primärzellkulturen nach <i>em-bcat1</i> RNAi .....	69
3.2.6	MZS in Primärzellkulturen nach <i>em-bcat1</i> RNAi .....	70
3.2.6.1	PSS in Primärzellkulturen nach <i>em-bcat1</i> RNAi.....	70
3.2.6.2	Expression weiterer Gene von Interesse.....	70
3.2.7	Lokalisierung und Nachweis der Genexpression ausgewählter Gene in Primärzellkulturen nach RNAi durch WMISH.....	71
3.2.7.1	Metazestoden-Tegument-spezifische Marker werden in Primärzellkulturen nach <i>em-bcat1</i> Knockdown verringert exprimiert .....	72
3.2.7.2	Die Posteriormarker <i>em-wnt1</i> und <i>em-wnt11b</i> werden in Primärzellkulturen nach <i>em-bcat1</i> RNAi verringert exprimiert .....	75

3.2.7.3	Der Anteriommarker <i>em-sfrp</i> wird in Primärzellen nach <i>em-bcat1</i> RNAi stark erhöht exprimiert.....	79
3.2.7.4	<i>Em-ndk</i> , ein neu identifizierter Anteriommarker in <i>E. multilocularis</i> , wird in Primärzellen nach <i>em-bcat1</i> RNAi stark erhöht exprimiert. ....	80
3.2.7.5	Das Protoskolex-spezifische Neuropeptid <i>em-npp36</i> wird in Primärzellen nach <i>em-bcat1</i> RNAi hoch exprimiert.....	82
3.2.7.6	Der Wnt-Rezeptor <i>em-fz10</i> wird in Primärzellen nach <i>em-bcat1</i> RNAi stark erhöht exprimiert.....	83
3.2.7.7	Der TGF- $\beta$ -Antagonist <i>em-fst</i> wird in Primärzellkulturen nach <i>em-bcat1</i> RNAi verstärkt exprimiert .....	85
3.2.8	Der Knockdown von <i>em-bcat1</i> resultiert in erhöhter Proliferation der germinativen Zellen .....	88
3.3	Charakterisierung der medio-lateral Achse in <i>E. multilocularis</i> .....	91
3.3.1	<i>Em-slit</i> ist Teil der ML-Achse in <i>E. multilocularis</i> .....	91
3.3.2	<i>Roundabout</i> Homologe in <i>E. multilocularis</i> .....	94
3.3.3	<i>Em-wnt5</i> wird im Protoskolex lateral exprimiert .....	99
3.3.4	<i>Em-ror2</i> wird im <i>E. multilocularis</i> Protoskolex lateral exprimiert.....	102
3.3.5	<i>Nou-darake</i> ist ein neu identifizierter Anteriommarker in <i>E. multilocularis</i> .....	104
3.3.6	<i>Em-hh</i> , wird im Protoskolex im Bereich der Mittellinie exprimiert.....	112
3.4	<i>In-vitro</i> Kultivierung von <i>E. multilocularis</i> Protoskolizes.....	116
3.4.1	Kultivierung von adult-ähnlichen Würmern <i>in-vitro</i> .....	116
3.4.1.1	Entwicklung von mehrgliedrigen Würmern in FBS reichem Medium .....	116
3.4.1.2	Morphologische Charakterisierung von adult-ähnlichen Würmern .....	118
3.4.2	Redifferenzierung zu Metazestoden-Vesikeln.....	119
3.4.2.1	Redifferenzierung von Protoskolizes wird in FBS freiem Medium verstärkt .....	119

3.4.2.2	Microzysten entwickeln vollständig ausgebildete Protoskolizes ...	120
3.4.2.3	Redifferenzierung von adult-ähnlichen Würmern .....	121
4	Diskussion .....	122
4.1	Der Wnt-Signalweg ist essentiell für die Entwicklung der Primärzellkultur	122
4.1.1	RNAi resultiert in signifikantem Knockdown von <i>em-bcat1</i> in <i>E. multilocularis</i> Primärzellen .....	122
4.1.2	In Primärzellkulturen nach RNAi werden weniger Metazestoden-Vesikel gebildet .....	123
4.1.3	Die <i>E. multilocularis</i> Primärzellkultur entwickelt sich nicht unidirektional zum Metazestoden .....	123
4.1.4	Proliferation von germinativen Zellen und Expression von GZA sind abhängig vom Wnt-Signalweg .....	127
4.1.5	Der Knockdown von <i>em-bcat1</i> führt zu einer Anteriormarkerdominierten Entwicklung und resultiert in verringerter Bildung von Metazestoden-Vesikeln in Primärzellkulturen nach RNAi .....	131
4.1.6	Die Genexpression von Anterior- und Posteriormarkern im Bereich von Kavitäten ist mit Muskel- und Nervenzellen assoziiert .....	134
4.1.7	Die Entwicklung von germinativen Zellen ist abhängig von deren Lage in der Primärzellkultur .....	135
4.1.8	Follistatin gilt als möglicher Initiator der Genexpression von Anteriormarkern .....	136
4.1.9	Die RNAi Methode eignet sich zur Analyse der Entwicklung von Metazestoden-Vesikeln in der Primärzellkultur .....	137
4.2	Die ML-Körperachse wird in <i>E. multilocularis</i> durch Homologe zu Genen des Slit-Robo- und Hh-Signalweg definiert .....	138
4.2.1	Die ML-Achse ist im <i>E. multilocularis</i> Metazestoden nicht ausgebildet .....	138
4.2.2	Mögliche Rolle von Slit in Parasit-Wirt Interaktion .....	139
4.2.3	Robo-Rezeptoren sind vermutlich im ZNS von <i>E. multilocularis</i> exprimiert .....	140



4.2.4	Hh ist in <i>E. multilocularis</i> an der Ausbildung der Körperachsen beteiligt.....	141
4.2.5	<i>Em-ndk</i> ist ein neu identifizierter Anteriomarker in <i>E. multilocularis</i> ...	142
4.2.6	<i>Em-wnt5</i> ist vermutlich in der Ausbildung der ML-Achse in <i>E. multilocularis</i> beteiligt.....	142
4.2.7	<i>Em-ror2</i> als potentieller Rezeptor zu <i>em-wnt5</i> .....	143
4.2.8	Potentieller Crosstalk zwischen TGF- $\beta$ -, Hedgehog und Wnt-Signalweg.....	143
4.3	Erweiterung der <i>in-vitro</i> kultivierbaren Larvenstadien um adult-ähnliche Würmer .....	144
4.3.1	Die Entwicklung von Protoskolizes ist abhängig von FBS .....	144
4.3.2	Aus <i>in-vitro</i> kultivierten Metazestoden und Microzysten entwickeln sich vollständig ausgebildete Protoskolizes.....	145
4.3.3	Aus redifferenzierten adult-ähnlichen Würmer können sich Microzysten mit vollständig entwickelten Protoskolizes bilden .....	146
4.3.4	Adult-ähnliche Entwicklung von Protoskolizes .....	147
4.3.5	Adult-ähnliche Würmer zeigen auf Verletzung hin keine Regeneration.....	148
4.4	Fazit.....	149
4.4.1	Fazit und Ausblick Wnt-Signalweg.....	149
4.4.2	Fazit und Ausblick zu Körperachsen in <i>E. multilocularis</i> .....	150
4.4.3	Fazit und Ausblick zu <i>in-vitro</i> kultivierten adult-ähnliche Würmer .....	150
	Literaturverzeichnis.....	151
	Anhang .....	178

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomie von <i>Echinococcus spp.</i> .....	3
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>E. multilocularis</i> . .....	4
Abbildung 3: Gemeldete Fälle von alveolärer Echinokokkose (AE) in Deutschland. .....	8
Abbildung 4: Überblick über die <i>in-vitro</i> -Zellkultur von <i>E. multilocularis</i> . .....	11
Abbildung 5: Postulierte Entwicklung von Kavitäten und Vesikeln in der Primärzellkultur. ....	12
Abbildung 6: Primärzellaggregate mit Kavitäten und Metazestoden-Vesikel. ....	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Signalkaskade des kanonischen Wnt- Signalwegs. ....	16
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Expression von Wnt-Liganden und Wnt-Inhibitoren im Metazestode und Protoskolex. ....	18
Abbildung 9: Semi-quantitativer Nachweis (qPCR) der <i>em-bcat1</i> Genexpression nach <i>em-bcat1</i> Knockdown (RNAi) in <i>E. multilocularis</i> Primärzellen. ....	61
Abbildung 10: Phänotyp von <i>E. multilocularis</i> Primärzellen nach <i>em-bcat1</i> Knockdown (RNAi). ....	62
Abbildung 11: Anzahl an Vesikeln in <i>E. multilocularis</i> Primärzellkulturen an Tag 7 nach RNAi ( <i>em-bcat1</i> ). ....	63
Abbildung 12: Vesikelgröße in <i>E. multilocularis</i> Primärzellkulturen an Tag 7 nach RNAi ( <i>em-bcat1</i> ). ....	64
Abbildung 13: In <i>E. multilocularis</i> Primärzellkulturen werden neben Genen, die mit germinativen Zellen assoziiert sind (GZA), Metazestoden (MZS)- und Protoskolex spezifische Gene (PSS) exprimiert. ....	67
Abbildung 14: Genexpression von germinativen Zellen-, Metazestoden- und Protoskolex- spezifischen Genen in Primärzellkulturen an Tag 7 nach <i>em-bcat1</i> Knockdown (RNAi). ....	69
Abbildung 15: WMISH zu <i>em-muc1</i> in <i>E. multilocularis</i> Primärzellen nach RNAi. ....	74
Abbildung 16: Alkalische Phosphatase Histochemie in <i>E. multilocularis</i> Primärzellen nach RNAi. ....	75
Abbildung 17: WMISH zu <i>em-wnt1</i> in <i>E. multilocularis</i> Primärzellen nach RNAi. ....	77
Abbildung 18: WMISH zu <i>em-wnt11b</i> in <i>E. multilocularis</i> Primärzellen nach RNAi. .....	78

---

Abbildung 19: WMISH zu <i>em-sfrp</i> in <i>E. multilocularis</i> Primärzellen nach RNAi.....	80
Abbildung 20: WMISH zu <i>em-ndk</i> in <i>E. multilocularis</i> Primärzellen nach RNAi.....	81
Abbildung 21: WMISH zu <i>em-npp36</i> in <i>E. multilocularis</i> Primärzellen nach RNAi....	83
Abbildung 22: WMISH zu <i>em-fz10</i> in <i>E. multilocularis</i> Primärzellen nach RNAi.....	84
Abbildung 23: Alignment von FST in <i>S. mansoni</i> , <i>E. multilocularis</i> und <i>S. mediterranea</i> .....	86
Abbildung 24: WMSIH zu <i>em-fst</i> in <i>E. multilocularis</i> Primärzellen nach RNAi.....	88
Abbildung 25: Anzahl an proliferierenden Zellen in <i>E. multilocularis</i> Primärzellen nach RNAi.....	89
Abbildung 26: Proteindomänenanalyse der Slit Homologe in <i>S. mediterranea</i> und <i>E. multilocularis</i> .....	92
Abbildung 27: WMISH zu <i>em-slit</i> im <i>E. multilocularis</i> Metazestode und Protoskolex.....	94
Abbildung 28: Proteindomänenanalyse von ROBO-Homologen in <i>S. mediterranea</i> und <i>E. multilocularis</i> .....	96
Abbildung 29: WMISH zu <i>em-robo1</i> im <i>E. multilocularis</i> Protoskolex.....	98
Abbildung 30: WMISH zu <i>em-robo2</i> im <i>E. multilocularis</i> Protoskolex.....	99
Abbildung 31: WMISH zu <i>em-wnt5</i> im aktivierten, evaginierten und invaginierten <i>E. multilocularis</i> Protoskolex.....	101
Abbildung 32: Proteindomänenanalyse der ROR2 Homologie in <i>H. sapiens</i> , <i>D. melanogaster</i> und <i>E. multilocularis</i> .....	103
Abbildung 33: WMISH zu <i>em-ror2</i> im aktivierten, invaginierten und evaginierten <i>E. multilocularis</i> Protoskolex.....	104
Abbildung 34: Proteindomänenanalyse von NDK in <i>S. mediterranea</i> , <i>D. japonica</i> und <i>E. multilocularis</i> .....	106
Abbildung 35: WMISH zu <i>em-ndk</i> im <i>E. multilocularis</i> Metazestode und Protoskolex.....	108
Abbildung 36: Proteindomänenanalyse von NDL-3 in <i>S. mediterranea</i> und NDL in <i>E. multilocularis</i> .....	109
Abbildung 37: WMISH zu <i>em-ndl</i> im <i>E. multilocularis</i> Metazestode und Protoskolex.....	111
Abbildung 38: Proteindomänenanalyse der HH Homologe in <i>D. japonica</i> und <i>E. multilocularis</i> .....	113

---

Abbildung 39: WMISH zu <i>em-hh</i> im <i>E. multilocularis</i> Metazestode und Protoskolex.....	115
Abbildung 40: Entwicklung von adult-ähnlichen Würmern <i>in-vitro</i> . ....	117
Abbildung 41: Mehrgliedrige <i>in-vitro</i> kultivierte Würmer.....	118
Abbildung 42: REM von adult-ähnlichen Würmern. ....	119
Abbildung 43: Metazestoden-Vesikel aus redifferenzierten Protoskolizes mit vollständig ausgebildeten Protoskolizes. ....	120
Abbildung 44: Redifferenzierte adult-ähnliche Würmer mit Brutkapseln und vollständig entwickelten Protoskolizes.....	121

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete <i>E. multilocularis</i> Isolate.....	37
Tabelle 2: Vesikelanzahl und Durchmesser in <i>E. multilocularis</i> Primärzellkulturen nach <i>gfp</i> bzw. <i>em-bcat1</i> RNAi an Tag 7 nach Elektroporation. ....	63
Tabelle 3: Genexpression ausgewählter Gene in <i>E. multilocularis</i> Primärzellen nach RNAi ( <i>em-bcat1</i> ) an Tag 7. ....	72
Tabelle 4: Ermittelte Werte von Gesamtzellzahl (DAPI) und EdU <sup>+</sup> Zellen in <i>E. multilocularis</i> Primärzellaggregaten nach <i>gfp</i> - und <i>em-bcat1</i> RNAi. ....	90

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
AE	alveoläre Echinokokkose
Alexa 555	Alexa Fluor® 555
AP bzw. <i>alp</i>	Alkalische Phosphatase
bcat	beta(β)-Catenin
BK	Brutkapseln
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Caco-2	humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie
cMEM	konditioniertes (Modified-Eagle) Medium
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphat

---

dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. multilocularis</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<i>em</i>	<i>E. multilocularis</i>
ePS	evaginierter Protoskolex/Protoskolizes
FBS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMRFa	FMRF Amid (Neuropeptid)
Fst	Follistatin
Fz	Frizzled
g	(Pufferrezepte) Gramm
g	(Zentrifugation) vielfaches der Erdbeschleunigung 9,81 m/s
<i>gfp</i>	grün fluoreszierendes Protein
GZ	germinative Zellen
GZA	mit germinativen Zellen assoziierte Gene
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Hh	Hedgehog
IgG	Immunglobuline
iPS	invaginierter Protoskolex/Protoskolizes
ISH	In-situ-Hybridisierung
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LRP	Leucin-rich Protein
<i>M. fascicularis</i>	<i>Macaca fascicularis</i>

<i>M. mulatta</i>	<i>Macaca mulatta</i>
<i>M. unguiculatus</i>	<i>Meriones unguiculatus</i>
m/w	männlich/weiblich
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Milimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
Muc	Mucin
MC bzw. MZ	Metazestode
MZS	Metazestoden-spezifisch
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Ndk	Nou-darake
Ndl	Nou-darake-like
nM	Nanomolar
O	Onkosphäre
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PC bzw. PZ	Primärzellen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
POD	Peroxidase
PS	Protoskolex/Protoskolizes
PSZ	Protoskolex-spezifisch
Px	Pixel



qPCR	quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
RH-	Reuber-Hepatomazellen ( <i>Rattus norvegicus</i> )
Robo	Roundabout
Ror	Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor
rpm	rounds-per-minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<i>S. mediterranea (smed)</i>	<i>Schmidtea mediterranea</i>
Sfrp	Secreted frizzled protein
SSC	Saline Sodium Citrate
ssRNA	einzelsträngige RNA
sog.	sogenannt
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor-beta
u. a.	unter anderem
u. a.	unter anderem
WMIF	Whole-mount Immunfluoreszenz
WMISH	Whole-mount-in-situ-Hybridisierung
Wnt	Wingless
<i>X. leavis</i>	<i>Xenopus leavis</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

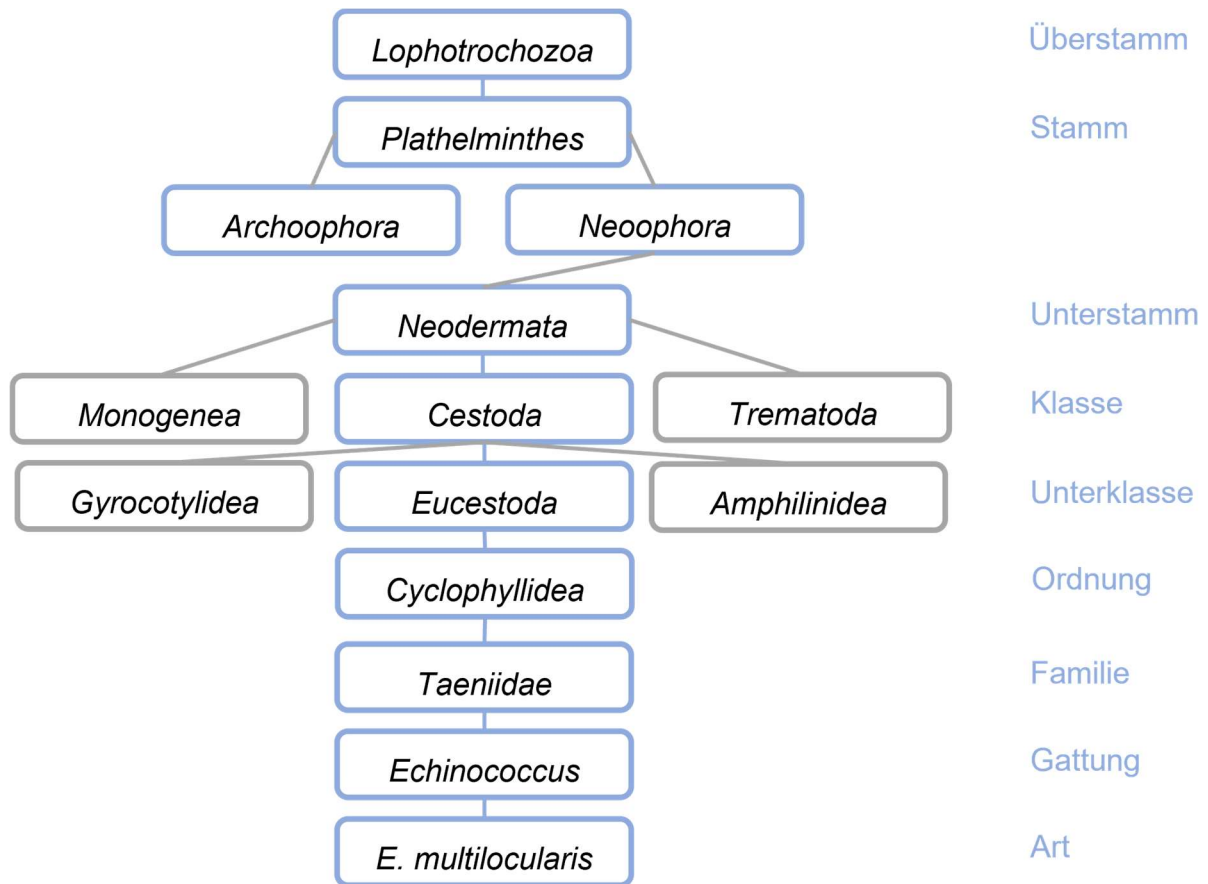
## 1.1 Der Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis*

### 1.1.1 Taxonomie von *Echinococcus multilocularis*

*Echinococcus multilocularis*, der Fuchsbandwurm, wird als ein in Carnivoren parasitär lebender Bandwurm systematisch dem Stamm der Plathelminthen (Plattwürmer) innerhalb des Überstamms der Lophotrochozoa zugeordnet (Gottstein 2010; Lucius et al. 2018a). Die Plathelminthen charakterisieren sich durch einen bilateralsymmetrischen-, meist dorsoventral abgeflachten Körper und sind zwittrig (hermaphroditisch). Sie zeichnen sich zudem durch das Fehlen einer festen Außenhülle, Atemorganen und Blutgefäßsystem aus (Lucius et al. 2018a). Die bisher traditionelle Einteilung der Plathelminthen in freilebende Turbellaria (Strudelwürmer), ekto- und endoparasitische Trematoda (Saugwürmer) und ausschließlich endoparasitär lebenden Cestoda (Bandwürmer) gilt als überholt (Burda et al. 2008). Nach neuesten Erkenntnissen unterteilen sich die Plathelminthen in Archoophora, Plathelminthen mit endolezithalen Eiern, welche für die Entwicklung benötigten Dotter enthalten und Neophora, mit ektolezithalen Eiern, die neben der Eizelle spezialisierte dotterproduzierende Zellen (Vitellarien) innerhalb der Eikapsel aufweisen (Martín-Durán und Egger 2012; Adell et al. 2015). Die unter den Neophora gruppierten Neodermata umfassen mit Monogenea (Hakensaugwürmer), Trematoda und Cestoda alle parasitären Gruppen (Burda et al. 2008; Adell et al. 2015). Die Namensgebung der Neodermata beruht darauf, dass die Larve, bevor sie eine Interaktion mit dem Wirt eingeht, eine neue, zilienlose sekundäre Haut (Neodermis) aus embryonalen Stammzellen, sog. Neoblasten, bildet. Deren Zellausläufer durchdringen die Basallamina, breiten sich subepidermal aus und verschmelzen schließlich zu einem einheitlichen Gewebe ohne Zellgrenzen (Synzytium). Dabei bleiben die Zellkörper der Neoblasten unter der basalen Matrix bestehen und die bewimperte Epidermis wird schließlich durch das zilienlose Synzytium verdrängt (Burda et al. 2008; Lucius et al. 2018b). Das so neu entstandene Tegument vermittelt die Nährstoffaufnahme sowie Exkretion und bietet der Larve, u. a. durch Sekretion immunmodulatorischer Botenstoffe, Schutz vor dem Immunsystem des Wirts (Burda et al. 2008; Lucius et al. 2018b). Die Cestoda werden neben den Gyrocotylidea und Amphilinidea, in die Eucestoda (echte Bandwürmer) eingeteilt (Olson et al. 2012; Lucius et al. 2018b).

Charakteristisch für die Eucestoda sind polyzoische Körper, in Proglottiden differenzierte Körper, das Fehlen eines Verdauungssystems und einen mit Haken und ggf. Saugnäpfen versehenen Skolex zur Anheftung am Wirtsgewebe. Der Lebenszyklus umfasst mindestens einen Wirtswechsel, wobei das adulte Stadium zumeist den Verdauungstrakt von Vertebraten besiedelt (Lucius et al. 2018b). Das Tegument, die Neodermis der Eucestoda, ist mit Mikrotrichen bedeckt und dient neben der Aufnahme von Nährstoffen als Schutz vor Verdauungssäften und dem Immunsystem des Wirts. Die Mikrotrichen bewirken zudem eine Oberflächenvergrößerung, um dadurch die Nährstoffversorgung des Parasiten zu optimieren. Die Entwicklung des Teguments ist aus evolutionärer Sicht die Grundvoraussetzung für die physiologische und funktionale Anpassung um eine spezifische, parasitäre Lebensweise zu ermöglichen (Littlewood 2006; Collins 2017; Wendt et al. 2018; Lucius et al. 2018b). *Echinococcus* ist innerhalb der Eucestoda der Ordnung der Cyclophyllidea zugeordnet, die sich morphologisch durch einen hervorstülpbaren Hakenkranz (Rostellum) und vier Saugnäpfen, von den Pseudocyclophyllidae mit zwei Saugnäpfen, unterscheiden (Lucius et al. 2018b). Weiterhin zählt *Echinococcus* zur Familie der Taeniidae. Deren Lebenszyklus umfasst zwei Wirte, einen carnivoren Endwirt und einen pflanzenfressenden Zwischenwirt, welcher die Beute der Endwirts darstellt. Charakteristisch für Taeniidae ist außerdem der Metazestode als Finnenstadium, wobei der Skolex eingestülpt ist. Zur Differenzierung innerhalb der Taeniidae dienen die Größe und die Anzahl der Haken im Doppelhakenkranz von Larven und Adulten (Eckert et al. 2008; Lucius et al. 2018b). *E. multilocularis* stellt eine von neun Arten der Gattung *Echinococcus* dar (Olson et al. 2012; Lucius et al. 2018a). Darunter fallen *E. vogeli*, *E. oligarthrus*, *E. shiquicus*, *E. felidis*, *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis* und *E. granulosus* (Hundebandwurm). Bei der letztgenannten Spezies handelt es sich um den Erreger der ‚cystischen Echinokokkose‘, der weltweit am weit verbreitetsten Art. In unseren geographischen Breiten stellt *E. multilocularis* als Auslöser der alveolären Echinokokkose (AE) die klinisch bedeutendste Art von *Echinococcus* dar (Nakao et al. 2010). Morphologisch ist *E. multilocularis* im adulten Stadium durch 2-6 Proglottiden, mit jeweils weiblichen und männlichen Sexualanlagen charakterisiert. Die im letzten Proglottis befindlichen reifen Eier werden entweder durch Abtrennung des gesamten Proglottis oder durch singuläre Ausscheidung der Eier in die Umwelt ausgeschieden wodurch jeweils ein neuer Lebenszyklus begründet wird (Eckert und Deplazes 2004).

Aufgrund der fortlaufenden molekularbiologischen und morphologisch vergleichenden Analysen ist die Systematik ein dynamischer Prozess. Bei der hier beschriebenen Systematik wurde versucht eine derzeit konsistente Darstellung wiederzugeben.

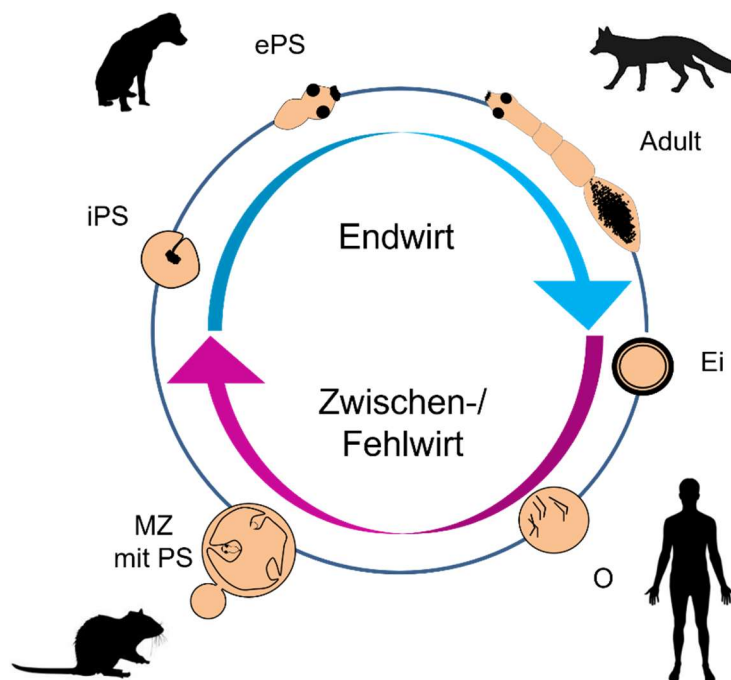


**Abbildung 1: Taxonomie von *Echinococcus* spp.**

Phylogenetische Systematik von *Echinococcus* spp. (farbig hervorgehoben). Systematik angelehnt an Martín-Durán und Egger 2012; Olson et al. 2012; Lucius et al. 2018b.

### 1.1.2 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *E. multilocularis* umfasst einen komplexen Wirtswechsel an dem zwei Wirte beteiligt sind. hundartige Carnivoren, vornehmlich der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) und Polarfuchs (*Vulpes lagopus*) gelten als Endwirt. Daneben können weitere Spezies als Endwirt fungieren, wie der Marderhund (*Nyctereutes procyonoides*), der Haushund (*Canis lupus familiaris*), seltener die Hauskatze (*Felis silvestris catus*) (Thompson et al. 2006; Gottstein 2010; Umhang et al. 2015). Als Zwischenwirt dienen deren pflanzenfressende Beutetiere, in aller Regel Mäuse der Gattungen *Microtus*, *Arvicola* und *Myodes spp.* (Conraths und Deplazes 2015). Fehlwirte, in denen sich die Zoonose wie im Zwischenwirt manifestieren kann, können neben dem Menschen auch Affen, Schweine und Hunde sein. Diese werden jedoch nicht als Teil des Lebenszyklus betrachtet, da die Entwicklung des Parasiten in ihnen zum Teil nicht vollständig erfolgt und der Lebenszyklus in aller Regel nicht vollendet wird (Conraths und Deplazes 2015).



**Abbildung 2: Lebenszyklus von *E. multilocularis*.**

Schematischer Überblick über den Lebenszyklus von *E. multilocularis*. Zwischen- bzw. Fehlwirt, wie Mäuse bzw. Mensch werden durch orale Aufnahme der Eier infiziert. Die Metamorphose der Onkosphäre (O) führt zum tumorartig wachsenden Metazestode (MZ) mit Entwicklung von Protoskoliziden (PS). Nach Aufnahme des Metazestoden durch den Endwirt werden invaginierte Protoskoliziden (iPS) durch Enzyme des Verdauungssystems aktiviert. Diese evaginierten PS (ePS) entwickeln sich zum adulten Wurm (Adult). Fuchssilhouette: Krawagna 2012; Weitere Tiersilhouetten zur freien Verfügung von Wikimedia Commons und Clipartbest.

Der Lebenszyklus von *E. multilocularis* umfasst, wie bereits erwähnt, zwei Wirte: den Zwischenwirt, welcher über seine Nahrung das infektiöse Ei in seinen Verdauungsapparat aufnimmt und den Endwirt, der durch Verzehr des Zwischenwirtes oder dessen Innereien das infektiöse Larvenstadium, die Protoskolyzes, aufnimmt. Im Magen des Zwischenwirts wird zunächst die Eihülle verdaut und die Sechshaken-Larve, auch Onkosphäre genannt, aktiviert. Mit ihren Haken kann die Onkosphäre die Darmwand penetrieren und gelangt über den Blutstrom der Pfortader in die Leber. Die Onkosphäre durchläuft eine Transformation und entwickelt sich u. a. durch Degeneration der Haken, Vesikularisierung und Bildung von Germinal- und Laminatschicht zum Metazestoden (Thompson 2017). Die Onkosphäre durchläuft dabei eine Metamorphose, wobei der Großteil an differenzierten Zellen degeneriert und die Entwicklung des Metazestoden vermutlich aus einer geringen Anzahl germinativer Zellen hervorgeht (Freeman 1973; Mehlhorn et al. 1983; Spiliotis et al. 2008; Brehm 2010a; Thompson 2017).

Der Metazestode charakterisiert sich durch die Fähigkeit der asexuellen, tumorartigen Vermehrung und wächst infiltrativ in das Lebergewebe, wobei diese multivesikuläre Zysten im Fehlwirt das Krankheitsbild der ‚alveolären Echinokokkose‘ hervorrufen (Lucius et al. 2018a; Lundström-Stadelmann et al. 2019). Der Metazestode besteht aus mit Hydatidenflüssigkeit gefüllten Vesikeln, welche nach außen durch das synzytiale Tegument und der azellulären Laminatschicht begrenzt sind (Hemphill und Gottstein 1995; Brehm und Spiliotis 2008). Dabei reichen Mikrotriche vom Tegument bis in die außen liegende Laminatschicht. Über das Tegument werden Nährstoffe aufgenommen, Stoffwechselprodukte exkretiert und Signalmoleküle sekretiert (Hemphill und Gottstein 1995; Brehm 2010b). Die Laminatschicht ist spezifisch für das Metazestoden-Larvenstadium und stellt einen Kohlenhydrat-Protein Komplex dar (Thompson 2017). Dieser besteht aus glykosylierten Mucin-Glykoproteinen, darunter einem Mucin, *em-muc-1*, welches spezifisch in der Laminatschicht des Metazestoden nachgewiesen werden konnte und nicht im Tegument des Protoskolyzes vorkommt (Díaz et al. 2011; Koziol et al. 2014). Unter dem Tegument befindet sich eine zelluläre Schicht, die Germinalschicht. Innerhalb dieser liegen neben Glykogenspeicher-, Muskel- und Nervenzellen, die sogenannten germinativen Zellen (Brehm und Spiliotis 2008). Diese weisen stammzellähnliche Charakteristika auf und sind die einzig proliferierenden Zellen in *E. multilocularis* (Koziol et al. 2014). Diese germinativen

Zellen können aus *in-vitro* kultivierten Metazestoden-Vesikeln isoliert und anschließend kultiviert werden (Spiliotis et al. 2010).

Im weiteren Fortschritt des Metazestoden Wachstums entwickeln sich aus der Germinalschicht heraus Brutkapseln, in welchen das nächste Larvenstadium, der Protoskolex, generiert wird. Dieser stellt den juvenilen Wurm, das infektiöse Larvenstadium, für den Endwirt dar. Die Entwicklung von Protoskolizes erfolgt in Fehlwirten in der Regel nicht und wurde in infizierten Menschen nur selten beobachtet (Gottstein und Hemphill 1997). Durch die Bildung von Protoskolizes im Metazestoden konnte *E. multilocularis* erstmals als Ursache einer Art Lebertumor beim Mensch von Rudolf Virchow identifiziert werden. Bei der Obduktion eines Patienten entdeckte Virchow, welcher an der Universität Würzburg als namhafter Pathologe wirkte, innerhalb des Tumors „die jungen Thiere“, welche die Protoskolizes des Fuchsbandwurmes darstellten. Damit leistete er einen maßgeblichen Beitrag zur Beschreibung einer der spektakulärsten parasitären Erkrankung bei Menschen (Virchow 1855; Tappe und Frosch 2007).

Da das Lebergewebe, wenn es mit bläschenförmigen Metazestoden-Vesikeln durchzogen ist, seiner Funktion immer weniger nachkommen kann, wird der Zwischenwirt durch eine damit verbunden generalisierte Verringerung seiner Fitness, zur leichten Beute für den Endwirt. Die innerhalb der Metazestoden entwickelten Protoskolizes (noch invaginiert) werden bei der Passage des Magen-Darmtrakts aktiviert (evaginierte Protoskolizes) (Gottstein und Hemphill 1997; Thompson 2017). Vom Skolex aus bilden sich Proglottiden mit weiblichen und männlichen Geschlechtsanlagen. Im jeweils letzten Proglottis reifen Hunderte von Eiern an, welche durch Abschnüren des gesamten Segmentes in die Umwelt gelangen. Vom Zwischenwirt werden die Eier oral, beispielsweise über kontaminierte Nahrung, aufgenommen, wodurch sich der Lebenszyklus schließt (Thompson 2017; Conraths et al. 2017).

Der enge Kontakt von Mensch zu einem infizierten Endwirt, wie Fuchs, Hund oder Katze gilt als möglicher Auslöser der alveolären Echinokokkose (Dyachenko et al. 2008; Conraths et al. 2017; Kapel et al. 2006; Knapp et al. 2016). Das Einatmen von kontaminiertem Staub wird als weiterer möglicher Infektionsweg diskutiert, wobei Landwirte und Jäger als besondere Risikogruppe gelten. Zudem könnten kontaminierte Waldfrüchte und gesammelte Kräuter eine Infektion verursachen (Lass

et al. 2016; Conraths et al. 2017). Die Eier sind entsprechend *in-vivo* Versuchen in der Umwelt bei durchschnittlichen sommerlichen Temperatur- und Luftfeuchtigkeit-Verhältnissen bezogen auf den Zwischenwirts *Microtus arvalis* (Feldmaus) bis zu 78 Tage infektiös. Hohe Luftfeuchtigkeit und niedrige Temperaturen, von bis zu  $-18^{\circ}\text{C}$ , wie sie im Herbst und Winter auftreten können, führen zu einer Verlängerung der infektiösen Eigenschaften auf bis zu 240 Tage. Erhöhte Temperaturen und geringe Luftfeuchtigkeit setzen die Infektionsfähigkeit der Eier dagegen herab. Das Einfrieren bei  $-83^{\circ}\text{C}$  für mindestens zwei Tage erwies sich als eine zuverlässige Methode um Eier abzutöten (Veit et al. 1995).

### 1.1.3 Epidemiologie

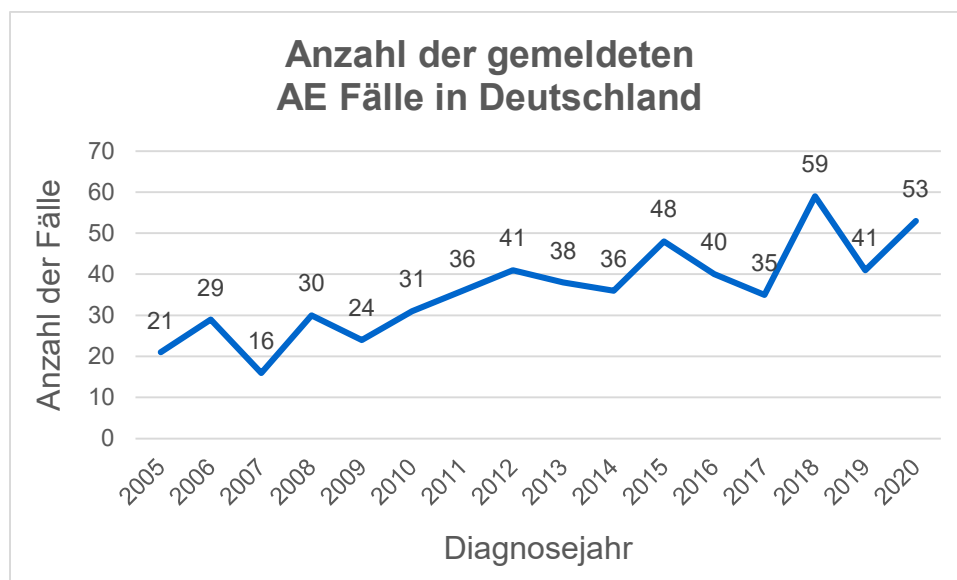
*E. multilocularis* ist in der nördlichen Hemisphäre weit verbreitet und dabei in Europa, Russland, dem mittleren Osten, China, Nordamerika und Kanada endemisch und epidemiologisch relevant. In dieser geographischen Lage sind prominente Endwirte, wie Fuchs und Koyote sowie die möglichen Zwischenwirte beheimatet (Conraths und Deplazes 2015; Deplazes et al. 2017; Houston et al. 2021). In den letzten Jahren konnte eine verstärkte Verbreitung des Parasiten u. a. in Nordeuropa und im Baltikum beobachtet werden (Marcinkutė et al. 2015; Davidson et al. 2016). Auch in Deutschland konnte *E. multilocularis* vermehrt in Füchsen und Marderhunden nachgewiesen werden (König et al. 2005; Staubach et al. 2011; Schwarz et al. 2011; Denzin et al. 2014). Endwirte, wie der Rotfuchs, erfahren einen Zugewinn an Lebensraum und breiten sich weiter aus (Conraths und Deplazes 2015; Houston et al. 2021). Dies scheint, neben weiteren Faktoren, eine Folge der oralen Vakzinierung der Fuchspopulationen gegen das Rabiesvirus zu sein (Chautan et al. 2000). Auch im Bereich der urbanen Gebiete breitet sich der Fuchs weiter aus. Hierbei stellen insbesondere Füchse, deren Reviere sich gleichermaßen über Stadt- und Landgebiete erstrecken, durch Fressen von infizierten Mäusen auf dem Land und das Abkoten in der Stadt, ein potentiell Risiko zur Übertragung des Parasiten auf den Menschen dar (Deplazes et al. 2004; Gottstein 2010).

### 1.1.4 Alveoläre Echinokokkose

Die AE ist eine der gefährlichsten helminthischen Zoonosen in Europa (Conraths und Deplazes 2015). Ausgelöst wird die Erkrankung durch das Metazestoden-Larvenstadium von *E. multilocularis*. Der Metazestode stellt eine multivesikuläre Struktur dar, welche sich umgeben von Blutgefäßen, tumorartig und infiltrativ in der



Leber des Zwischen- oder Fehlwirts durch autonome Proliferation entwickelt (Dennis et al. 2011; Thompson 2017). Daneben kann es auch zu Filialisierung in Lunge, Gehirn und Knochen kommen (Palmer et al. 2011). Der Metazestode des Fuchsbandwurms kann sich über Jahre asymptomatisch im Wirt vermehren. Bis zur klinischen Symptomatik wird eine Inkubationszeit von 5 bis 15 Jahren vermutet (Ammann und Eckert 1996; Conraths et al. 2017). In Deutschland sind seit November 2004 diagnostizierte Fälle von AE gemäß § 7 Abs. 3 Infektionsschutzgesetz (IfSG) dem Robert-Koch-Institut (RKI) meldepflichtig (Kratzer et al. 2019; Conraths und Maksimov 2020). Seit 2005 liegen die gemeldeten Fälle bei durchschnittlich 36 diagnostizierten Infektionen pro Jahr, bei seit 2005 bis 2020 kontinuierlich steigender Tendenz (Robert-Koch-Institut) (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Gemeldete Fälle von alveolärer Echinokokkose (AE) in Deutschland.**

Von 2005 bis 2020 erfolgten laut Robert-Koch-Institut (RKI) durchschnittlich 36 Neuinfektionen pro Jahr, maximal 59 Fälle in 2018 (Robert-Koch-Institut).

Die Diagnose erfolgt meist durch Kombination von klinischer Diagnose, bildgebenden Verfahren und serologischen Analysen (Kern et al. 2006). Klinische Symptome sind Abdominalbeschwerden, cholestatischer Ikterus (Gelbsucht), Fieber und Anämie. Insbesondere im fortgeschrittenen Stadium können Funktionsstörungen der Leber und portale Hypertonie als Folge von AE festgestellt werden (Ammann und Eckert 1996; Kern 2010). Mittels Sonografie, MRT, CT oder der Kombination aus PET und CT können die parasitären Zysten, resultierende Nekrosen und mögliche Filialisierungen lokalisiert werden (Kern et al. 2006). Zur Diagnose folgen daraufhin serologische Analysen, wobei im Patientenserum spezifische Immunglobuline (IgG) gegen

*E. multilocularis* mittels ELISA nachgewiesen werden können. Zusätzlich kann ein Western Blot erfolgen, um den serologischen Befund zu sichern. Weiterhin ist der Nachweis von Parasit-spezifischer DNA via PCR möglich (Ammann und Eckert 1996; Eckert 2001; Brunetti et al. 2010).

Da die Diagnosen zumeist wohl erst bei weit fortgeschrittener Entwicklung des Parasiten und weitreichender Dysfunktion der Leber erfolgt, ist die Heilung der Krankheit eher selten, und kann nur erfolgen, wenn das parasitierte Gewebe vollständig operativ entfernt werden kann (Kern et al. 2006). In allen anderen Fällen gilt die AE als nicht heilbar. Im Anschluss an eine mögliche operative Entfernung des parasitierten Gewebes erfolgt eine Chemotherapie mit Benzimidazolen (Kern 2010). Der Wirkmechanismus beruht auf der Bindung von Benzimidazolen an  $\beta$ -Tubulin des Parasiten und folglich einer Inhibierung der Ausbildung von Mikrotubuli (Brehm et al. 2000; Robinson et al. 2004). Aufgrund der hohen Homologie von humanen- und Zestoden- $\beta$ -Tubulinen, können Benzimidazole nur in niedriger Dosis eingesetzt werden, wodurch Nebenwirkungen weitestgehend eingedämmt, aber nicht vollständig verhindert werden können. Benzimidazole haben aufgrund der limitiert einsetzbaren Dosis nur eine parasitostatische Wirkung (Brehm und Koziol 2014). Bei Patienten mit inoperablem Befund kann die Therapie mit Albendazol oder Mebendazol jahre- bis lebenslang nötig sein (Kern 2010). Die Chemotherapie kann die Progression der Erkrankung inhibieren und die klinischen Symptome des Patienten verbessern. Während Patienten, denen 1970 AE diagnostiziert wurde, eine 10-Jahres-Überlebensrate von 25% bzw. 49% (m/w) hatten, konnte diese durch die Behandlung mit Benzimidazolen auf 93% bzw. 96% (m/w) in 2005 verbessert werden (Torgerson et al. 2008; Kern 2010). Eine erfolgreiche Therapie wird u. a. durch den Nachweis verringerter metabolischer Aktivität im PET/CT und kalzifizierten Läsionen beurteilt. Eine Kalzifizierung resultiert aus inaktiven, degenerierten Metazestoden und wird somit als eine erfolgreiche Eindämmung des Wachstums von *E. multilocularis* qualifiziert. Die Therapie mit Benzimidazolen birgt neben dem Erfolg jedoch auch eine hohe Rate an rezidivierenden Infektionen (Kern 2010; Brunetti et al. 2010). Da das Wachstum von *E. multilocularis* von germinativen Zellen, den einzig proliferierenden Zellen des Parasits, ausgeht wird angenommen, dass diese eine Art von ‚Toleranz‘ zu Benzimidazolen bergen. Dies beruht möglicherweise darauf, dass germinative Zellen eine Isoform des  $\beta$ -Tubulin, *em-tub2*, exprimieren, welches eine geringere Affinität zu Benzimidazolen aufweist (Schubert et al. 2014). *In-vitro* konnte eine Unempfindlichkeit

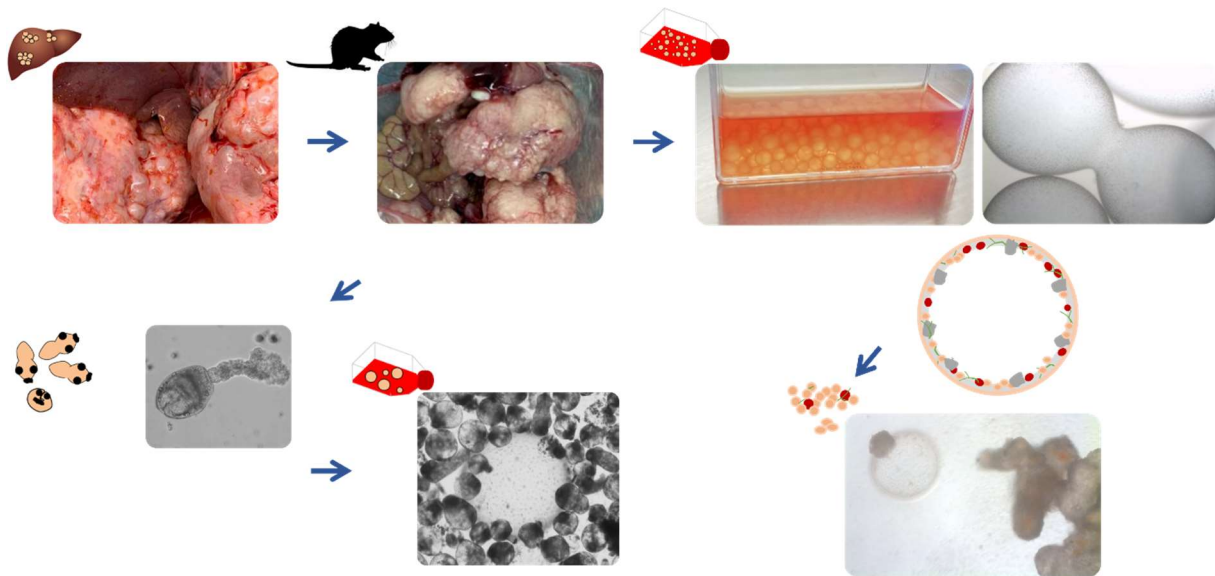
von Primärzellen, welche zum Großteil aus germinativen Zellen bestehen, selbst gegenüber hohen Konzentrationen an Albendazol bestätigt werden (Schubert et al. 2014).

AE zählt in Deutschland (im statistisch erfassbaren Kontext) zu den seltenen Erkrankungen. Aufgrund der limitierten und oft nicht zielführenden Therapiemöglichkeiten ist die Mortalitätsrate sehr hoch. Es ist deshalb von großer Bedeutung neue Möglichkeiten einer zielgerichteten Therapie zu finden, welche auch die germinativen Zellen von *E. multilocularis* einschließt (Brehm und Koziol 2014).

### 1.1.5 ***In-vitro* Zellkultur von *E. multilocularis***

#### 1.1.5.1 ***In-vitro* Kultivierung von Metazestoden**

Ein Teil des Lebenszyklus von *E. multilocularis*, wie er im Zwischenwirt abläuft, kann im Labor nachgebildet werden (Abbildung 4) (Spiliotis und Brehm 2009). So können aus homogenisiertem Metazestodengewebe eines infizierten Zwischen- oder Fehlwirts, Metazestoden in Co-Kultur mit Reuber H35 Hepatomazellen (RH<sup>-</sup>) und unter Zugabe von Serum kultiviert werden (Jura et al. 1996). Hierfür werden Isolate aus *Macaca fascicularis* verwendet und durch wiederkehrende Passage des Metazestodengewebes in mongolischen Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) am Leben erhalten (Tappe et al. 2007; Spiliotis und Brehm 2009). Die Fütterzellen sezernieren für das Wachstum und die Entwicklung des Parasiten notwendige Faktoren, weshalb der Parasit stets in Kombination mit RH<sup>-</sup> Zellen oder entsprechend deren konditioniertem Medium zu kultivieren ist. (Spiliotis et al. 2004; Brehm 2010b; Hemer et al. 2014). Die Verwendung von konditioniertem Medium der Fütterzellen ermöglicht die axenische Kultivierung von Metazestoden, um u. a. in Abwesenheit von Fütterzellen, Wachstumsfaktoren und mögliche Drug-Targets zu erforschen (Spiliotis et al. 2004). Je nach Isolat werden auch in *in-vitro* kultivierten Metazestoden Brutkapseln und Protoskolizes gebildet (Spiliotis et al. 2004).



**Abbildung 4: Überblick über die *in-vitro*-Zellkultur von *E. multilocularis*.**

Metazestodengewebe aus *M. fascicularis* (A) wird in *M. unguiculatus* kultiviert (B). Aus dem Metazestodengewebe von *M. unguiculatus* können Metazestoden-Vesikel kultiviert werden (C) oder Protoskolizes isoliert werden (D). Protoskolizes redifferenzieren in Kultur zu Metazestoden-Vesikel (E). Primärzellen aus der Germinalschicht von Metazestoden-Vesikeln bilden in Kultur wiederum Metazestoden-Vesikel aus (F).

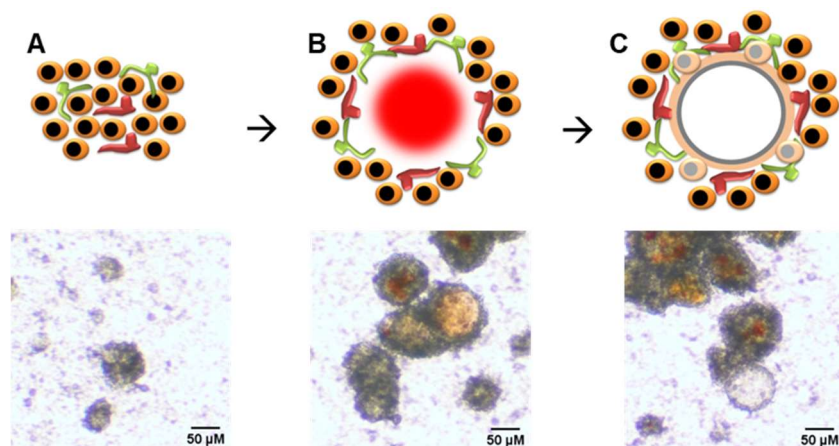
#### 1.1.5.2 *In-vitro* Kultivierung von Protoskolizes

Protoskolizes können ebenfalls *in-vitro* kultiviert werden. Diese können dafür in großen Mengen aus infizierten Wüstenrennmäusen isoliert werden (Jura et al. 1996; Brehm et al. 2003). Die Aktivierung von *Echinococcus* Protoskolizes erfolgt über Simulierung der Passage des Gastrointestinaltraktes durch niedrigen pH und Pepsin sowie anschließender Inkubation in Natriumtaurocholat (Smyth und Davies 1974; Mizukami et al. 2010). Die Protoskolizes sind sowohl in der Lage zu adulten Würmern, als auch zu Mikrozysten und vollständig zu Metazestoden zu redifferenzieren (Gottstein 1992). Die Redifferenzierung erfolgt dabei über mehrere Stadien. Zunächst erfolgt eine Vesikularisierung indem sich der Skolex oder das posteriore Ende zu einem Ball aufblähen. Hier sind zunächst die Saugnäpfe noch deutlich zu erkennen, welche jedoch mit der Zeit verschwinden, bis sich die Mikrozyste vollständig zum Metazestoden-Vesikel mit Laminatschicht ausgebildet hat (Möginger 2016; Camicia et al. 2013).

#### 1.1.5.3 Primärzellkultur und germinative Zellen

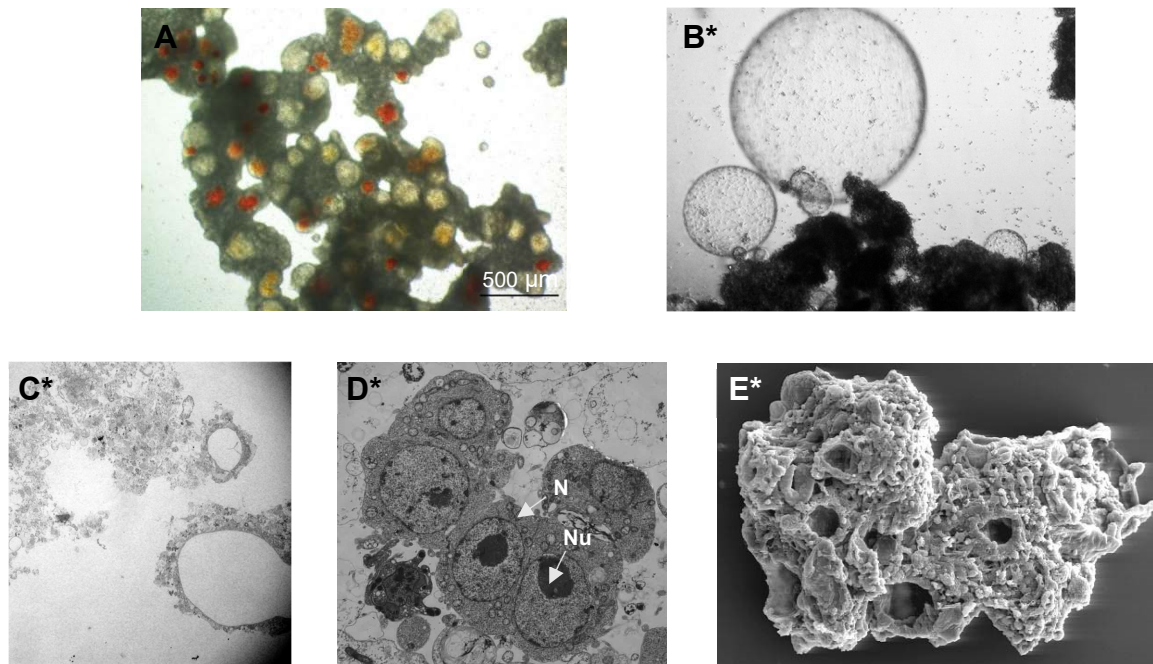
Aus der Germinalschicht von axenischen, *in-vitro* kultivierten Metazestoden-Kulturen können Primärzellen isoliert und axenisch kultiviert werden (Spiliotis und Brehm 2009).

Zwei Tage nach Isolierung setzen sich die Primärzellaggregate neben dem vorherrschenden Zelltyp der germinativen Zellen (bis zu 80%, je nach Isolierung), aus Muskel- und Nervenzellen zusammen (Koziol et al. 2014). Die Primärzellen bilden nicht adhärenzte Zellaggregate in Kultur aus. Im Verlauf der Entwicklung werden innerhalb der Primärzellaggregate Kavitäten gebildet. Diese Kavitäten sind rot gefärbt und charakteristisch für das Primärzellsystem (Spiliotis und Brehm 2009) (Abbildung 5; Abbildung 6). Während der Kultivierung werden innerhalb weniger Wochen aus diesen Aggregaten über Proliferation und Differenzierung der germinativen Zellen neue, vollständige Metazestoden-Vesikel generiert (Spiliotis et al. 2008). Dabei bildet sich die Laminatschicht innerhalb von 6 Wochen aus, wodurch sich Vesikel somit vollständig zu Metazestoden-Vesikeln regenerieren (Smyth 1968; Spiliotis et al. 2008) (Abbildung 5). Es wird angenommen, dass diese Entwicklung ähnlich zur Onkosphären-Metazestoden-Metamorphose verläuft, welche ebenfalls von germinativen Zellen ausgeht (Brehm und Spiliotis 2008). Die Primärzellkultur stellt daher ein geeignetes System dar, um durch Inhibitorversuche oder RNAi den Einfluss einzelner Gene und Signalwege auf germinative Zellen und die Entwicklung von Metazestoden-Vesikel zu untersuchen (Spiliotis et al. 2010; Koziol und Brehm 2015).



**Abbildung 5: Postulierte Entwicklung von Kavitäten und Vesikeln in der Primärzellkultur.**

Beispielbilder entsprechen Primärzellaggregaten 7 Tage nach RNAi (*em-bcat1*). Zunächst bilden Muskel-, Nerven- und germinative Zellen Zellaggregate aus (A). Innerhalb von wenigen Tagen entwickeln sich innerhalb der Primärzellaggregate Kavitäten aus, welche rot gefärbt sind (B). Mit zunehmender Entwicklung bilden sich wahrscheinlich aus diesen Kavitäten Metazestoden-Vesikel aus (C). Angelehnt an Brehm und Spiliotis (2008).



**Abbildung 6: Primärzellaggregate mit Kavitäten und Metazestoden-Vesikel.**

Primärzellaggregate mit Kavitäten (7 Tage, **A**), und Metazestoden-Vesikel (3 Wochen; **B\***). Semi-Dünnschnitte: Kavitäten sind umgeben von Zellen, vermutlich Muskel-, Nerven- und germinativen Zellen (5 Wochen; **C\***). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Primärzellaggregaten zeigen germinative Zellen, charakterisiert durch einen großen Nukleus (N) und Nukleolus (Nu) (**D\***), und Kavitäten (**E\***) umsäumt von verschiedenen Zelltypen der Primärzellkultur. \* aus Spiliotis et al. (2008)

In *E. multilocularis* gehen, wie in allen Plathelminthen, die differenzierten Zellen aus undifferenzierten, germinativen Zellen hervor, welche als einzige Zellen in Mitose nachgewiesen werden konnten (Ladurner et al. 2000; Koziol und Brehm 2015). Die totipotenten germinativen Zellen sind morphologisch ähnlich aufgebaut wie Neoblasten in Planarien: kleine Zellen (5  $\mu\text{m}$ ) mit einem großen Nukleus, einem bis drei kugelförmigen Nukleoli und wenig Zytoplasma (Spiliotis et al. 2008; Koziol et al. 2014). Die Neoblasten in Planarien sind pluripotente Stammzellen und verleihen diesen frei lebenden Plattwürmern eine außerordentliche Regenerationsfähigkeit, wobei ganze Körpersegmente ausgehend von einem einzelnen Neoblasten vollständig regeneriert werden können (Gurley et al. 2010; Gentile et al. 2011; Koziol und Brehm 2015). Neoblasten sind auf molekularer Ebene inhomogen und können anhand der exprimierten Marker in diverse Untergruppen eingeteilt werden, wobei nur eine bestimmte Untergruppe über pluripotente Eigenschaften verfügt (Koziol und Brehm 2015). Im Gegensatz zu Neoblasten in Planarien konnten in Zestoden keine Orthologe zu den Genen *piwi* und *vasa* nachgewiesen werden (Tsai et al. 2013). Diese Gene sind charakteristische Stammzellmarker und essentiell für die Entwicklung und Selbsterneuerung von Stammzellen in vielen Invertebraten und Vertebraten (Raz

2000; Tsai et al. 2013). In *Schistosoma mansoni* konnten Neoblasten-ähnliche Zellen identifiziert werden, welche ebenfalls weder *vasa* noch *piwi* exprimieren. Die germinativen Zellen in *E. multilocularis* unterscheiden sich im Expressionsmuster zu diesen Neoblasten-ähnlichen Zellen und stellen damit ein einzigartiges Stammzell-System innerhalb der Plathelminthen dar, welches wahrscheinlich für die einzigartige Entwicklung des Metazestoden verantwortlich ist (Koziol et al. 2014). Es wird daher davon ausgegangen, dass die hohe Regenerationsfähigkeit von *E. multilocularis* und die Filialisierung von den germinativen Zellen ausgeht (Mehlhorn et al. 1983; Koziol und Brehm 2015; Lundström-Stadelmann et al. 2019). Deshalb ist es von großer Bedeutung die Entwicklung der germinativen Zellen besser zu verstehen, um geeignete neue Therapiemöglichkeiten bei AE zu finden (Brehm und Koziol 2014).

## 1.2 Körperachsen in *E. multilocularis*

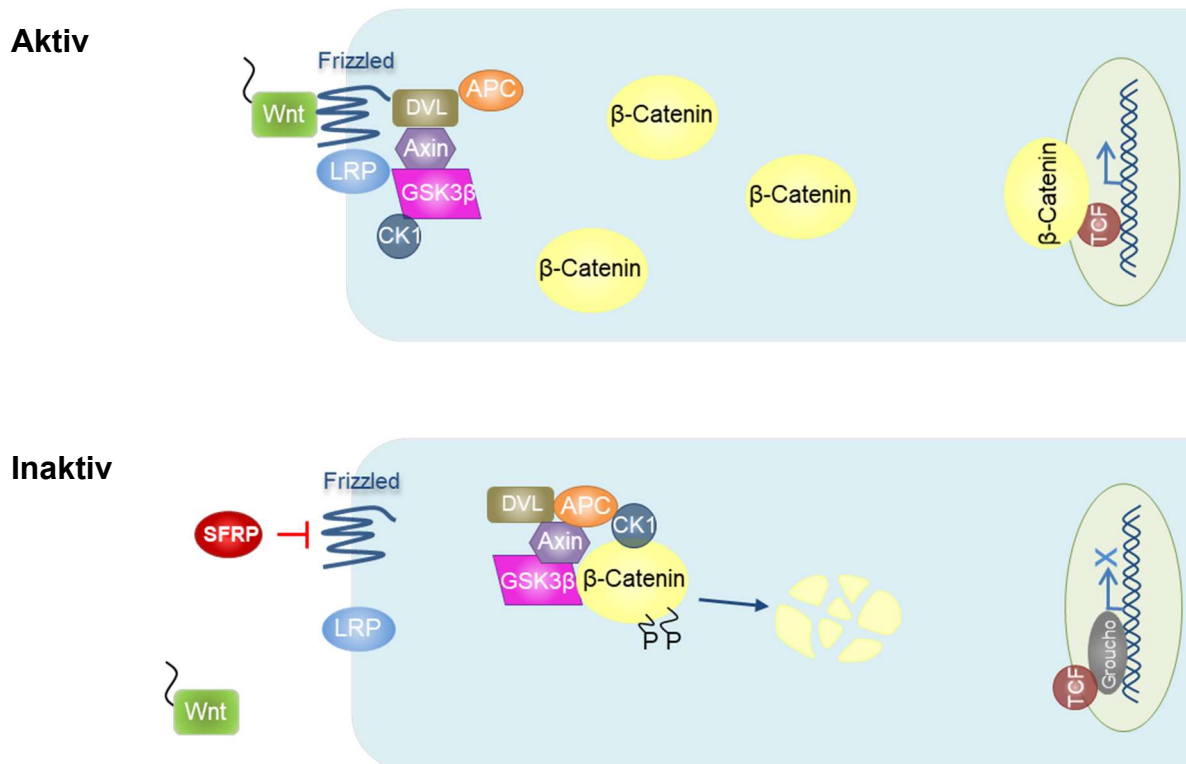
Laut Taxon zählt *E. multilocularis* zu den Bilateria (Olson et al. 2012). Morphologisch betrachtet zeigen weder der Metazestode noch der Protoskolex von *E. multilocularis* eine bilaterale Symmetrie auf. Durch die vesikuläre Form fehlt dem Metazestoden jegliche morphologische Ähnlichkeit zu einem Wurm und lässt nach ersten Erkenntnissen zur Anterior-Posterior (AP) -Achse auf eine Fehlregulation von Körperachsen schließen (Koziol et al. 2016a). Das komplexe Zusammenspiel verschiedener Signalwege führt zur Ausbildung von Körperachsen in Vertebraten und Invertebraten (Lobo et al. 2012). Inwiefern in *E. multilocularis* Körperachsen ausgebildet werden bzw. damit verbundene Signalwege aktiv sind ist bisher weitestgehend unbekannt.

### 1.2.1 Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist evolutionsgeschichtlich hochkonserviert und definiert in Metazoa die AP-Achse (Petersen und Reddien 2009; Holstein 2012). Dies wird durch einen Gradienten an  $\beta$ -Catenin, dem Hauptregulator des Signalwegs, bewirkt (Adell et al. 2010). Der Wnt-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in sämtlichen entwicklungsbiologischen Abläufen, wie Zellproliferation, Adhäsion, Migration, Apoptose, Morphogenese, Erhaltung und Differenzierung von Stammzellen und Zellpolarität (Mikels und Nusse 2006b; Gurley et al. 2010; Almuedo-Castillo et al. 2012; Swarup und Verheyen 2012). Deregulation des Wnt-Signalweg steht im Zusammenhang mit der Entwicklung-, Progression- und Metastasierung von Tumoren im Menschen (Logan und Nusse 2004; Herbst und Kolligs 2007; Chen et al. 2009).

Der bestuntersuchte Wnt-Signalweg ist der  $\beta$ -Catenin abhängige, kanonische Wnt-Signalweg (van Amerongen und Nusse 2009). Hierbei folgt auf die Bindung von Wnt-Liganden an Frizzled (Fz) und den Co-Rezeptoren Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP5/6) eine Signalkaskade. Durch diese Bindung wird Dishevelled (DVL) rekrutiert und gebunden (Almuedo-Castillo et al. 2012; Huang und He 2008). Dadurch wird der sogenannte  $\beta$ -Catenin Zerstörungskomplex destabilisiert. Dieser Multiproteinkomplex („destruction complex“) besteht aus den Proteinen Axin, Adenomatous polyposis coli (APC), Casein Kinase 1  $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) und der Glykogensynthase Kinase 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (Angers und Moon 2009; Parker und Neufeld 2020). Bei Abwesenheit von Wnt-Liganden ist dieser Komplex aktiv, wobei  $\beta$ -Catenin als Substrat für die beiden Kinasen GSK3 $\beta$  und CK1, fungiert. Nach Phosphorylierung wird  $\beta$ -Catenin ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut. Somit gibt es keine Signaltransduktion von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern und der Signalweg ist inaktiv, da T Cell Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor (TCF/LEF) Transkriptionsfaktoren durch Interaktion mit u. a. Groucho die Transkription reprimieren und die DNA-Bindungsstellen besetzen. Eine Liganden Bindung bewirkt dagegen eine Aktivierung von Dvl und Destabilisierung des Zerstörungskomplexes, wodurch  $\beta$ -Catenin erhalten bleibt, akkumuliert und dessen Translokation in den Zellkern folgt. Dort interagiert  $\beta$ -Catenin mit (TCF/LEF) wodurch die Repression aufgehoben und die Transkription von Zielgenen stattfinden kann (Eisenmann 2005; Huang und He 2008; Angers und Moon 2009; Almuedo-Castillo et al. 2012) (Abbildung 7).





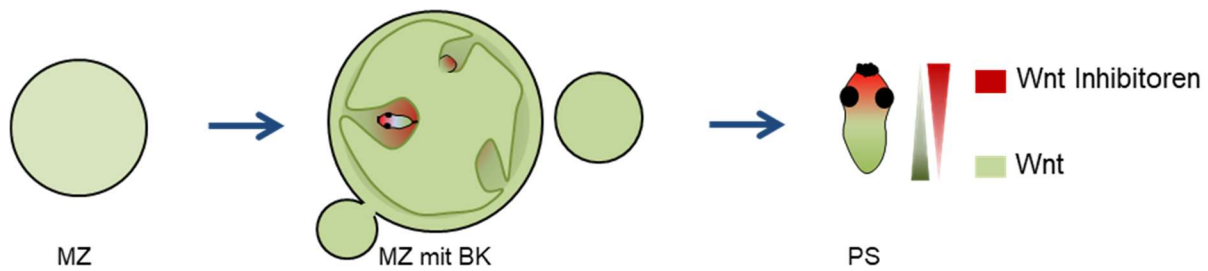
**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Signalkaskade des kanonischen Wnt-Signalwegs.**

Aktiv: Durch Bindung eines Wnt-Liganden an den Frizzled/LRP Rezeptorkomplex wird  $\beta$ -Catenin stabilisiert und kann durch Interaktion mit den TCF/LEF die Transkription von Zielgenen aktivieren. Inaktiv: In Abwesenheit eines Liganden oder Inhibierung durch Wnt-Inhibitoren, wie SFRP, ist der Zerstörungskomplex (CK1 $\alpha$ , GSK3 $\beta$ , APC, Axin) aktiv, wodurch  $\beta$ -Catenin im Proteasom abgebaut wird und keine Translokation in den Nucleus stattfindet. Angelehnt an Eisenmann 2005.

Neben den bereits erwähnten Zell- und Entwicklungsbiologischen-Funktionen, spielt der Wnt-Signalweg bei der AP-Entwicklung eine zentrale Rolle. Diese Funktion übernimmt der Signalweg über fast alle Metazoa hinweg (Petersen und Reddien 2009; Almuedo-Castillo et al. 2012; Duffy 2011; Sharma et al. 2014). Die räumliche Trennung von aktiven Wnt Signalen im posterioren Bereich und Wnt Inhibierung im anterioren Bereich kann innerhalb von Bilateria und in Cnidaria beobachtet werden (Duffy 2011; Kozin et al. 2019). Aber auch in einfachen Metazoa, wie dem Schwamm *Halisarca dujardini*, konnte kürzlich der Wnt-Signalweg als Determinant von AP-Entwicklung nachgewiesen werden (Kozin et al. 2019). Ausgiebig erforscht wurde der Wnt-Signalweg an Planarien. Insbesondere *Dugesia japonica* und *Schmidtea mediterranea* werden aufgrund ihrer Eigenschaft, sich aus einem winzigen Stück eines beliebigen Körperteils zum vollständigen, lebens- und reproduktionsfähigen Organismus entwickeln zu können, als Modellorganismen

verwendet (Petersen und Reddien 2008; Almuedo-Castillo et al. 2012). RNAi Experimente an *S. mediterranea* brachten hervor, dass nach Knockdown von *wnt*-Genen die Regeneration des Kopfes gestört ist. So bringt der Knockdown von *wnt* nach Amputation des Schwanzes einen ‚schwanzlosen‘ oder ‚zweiköpfigen‘ Phänotyp hervor. Ebenso der Knockdown von Transkripten zu  $\beta$ -Catenin (Sureda-Gómez et al. 2015; Almuedo-Castillo et al. 2012). Außerdem verursachte der Knockdown von  $\beta$ -Catenin sowohl in amputierten als auch in intakten Tieren durch RNAi den Verlust der AP-Achse und führte zur Entwicklung von nahezu runden, anteriorisierten Tieren (Gurley et al. 2008; Iglesias et al. 2008; Chai et al. 2010). Dies zeigt die Notwendigkeit von  $\beta$ -Catenin zur posterioren Regeneration. Bei Inhibierung von Wnt-Inhibitoren, wie *sfrp* oder *notum*, ist dagegen die Regeneration von Kopfgewebe gestört und resultiert in ‚kopflosen‘ Tieren mit zwei posterioren Enden.  $\beta$ -Catenin ist somit ein wichtiger Schlüsselfaktor in Bezug auf Erhaltung und Regeneration der AP-Körperachse (Petersen und Reddien 2011, 2008; Sureda-Gómez et al. 2015).

Auch in *E. multilocularis* ist der Wnt-Signalweg für die Ausbildung der AP-Achse zuständig. Laut Koziol et al. (2016a) werden posteriore Wnt-Liganden im Germinalgewebe des Metazestoden homogen exprimiert, während Wnt-Inhibitoren erst mit Bildung von Brutkapseln nachgewiesen werden konnten. Die Genexpression des Anteriomarkers und Wnt-Inhibitors *em-sfrp* markiert bei Brutkapselentwicklung und im aktivierten Protoskolex den Skolex als anterioren Pol, während die Wnt-Liganden *em-wnt1*, *em-wnt11a* und *em-wnt11b* in der Germinalschicht und am posterioren Pol des Protoskolex exprimiert werden (*em-wnt1* und *em-wnt11a*). Die Genexpression von *em-wnt11b* ist auf das Germinalgewebe des Metazestoden beschränkt, weshalb dieses Gen auch als Metazestodenmarker bezeichnet werden kann. Ein Homolog zum Frizzled (Fz) -Rezeptor, *em-fz4*, konnte identifiziert werden und auch dieser wurde, wie *em-wnt1* und *em-wnt11a* in der Germinalschicht exprimiert und bei Brutkapselentwicklung und im aktivierten Protoskolex am posterioren Pol. Ebenso wie ein Homolog des hochkonservierten Posteriormarkers *em-post2b*, wodurch die Expression der *wnt* Gene und *em-fz4* als posterior bestätigt werden konnten (Koziol et al. 2009; Koziol et al. 2016a). Außerdem konnte die Genexpression von *em-wnt1* und *em-wnt11a* in Muskelzellen nachgewiesen werden. Durch das Fehlen einer AP-Achse im Metazestoden stellt sich diese Larve als posteriorisiertes Gewebe dar, wobei der ‚Kopf‘ zunächst vollständig ‚abgeschaltet‘ ist und mit Bildung von Protoskolizes lokal reaktiviert wird (Koziol et al. 2016a) (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Expression von Wnt-Liganden und Wnt-Inhibitoren im Metazestode und Protoskolex.**

Der Metazestode (MZ) ist durch die stetige Expression von *wnt* Genen in der Germinalschicht posteriorisiertes Gewebe. Erst mit Bildung von Brutkapseln (BK) und Protoskolezen (PS) werden Wnt-Antagonisten und Anteriormarker, wie *em-sfrp*, lokal exprimiert. Basierend auf Ergebnissen aus Koziol et al. 2016a.

Neben den bereits genannten Wnt Liganden, kann *wnt5* je nach Rezeptorverfügbarkeit den kanonischen Signalweg aktivieren (FZ4- und LRP5-Rezeptoren) oder inhibieren (ROR2-Rezeptor) (Mikels und Nusse 2006a; Mikels et al. 2009; Topol et al. 2003). Dabei bindet WNT5 an den ROR2-Rezeptor und aktiviert dessen Tyrosin-Kinase-Aktivität (Mikels et al. 2009). In Planarien, wie *S. mediterranea*, wird *wnt5* lateral im Nervensystem, an der Grenze von dorsaler und ventraler Körperachse exprimiert und ist für die korrekte Ausbildung des Nervensystems nach Amputation notwendig (Adell et al. 2009; Gurley et al. 2010). Für *wnt5* in *E. multilocularis*, *em-wnt5*, ist bisher bekannt, dass dieses in Brutkapseln und im aktivierten Protoskolex lateral exprimiert wird (Koziol et al. 2016a).

### 1.2.2 Slit-Robo-Signalweg

Durch das wechselseitige Zusammenspiel von *wnt5* und *slit* wird die medio-lateral (ML)-Achse durch Begrenzung von medialem und lateralem Gewebe in Planarien ausgebildet. Dies ist wichtig für die korrekte Ausbildung des ZNS (Adell et al. 2009; Gurley et al. 2010; Almuedo-Castillo et al. 2012). *slit2* ist organismenübergreifend entlang der Mittellinie ventral und dorsal exprimiert, während *wnt5* lateral vom äußersten Bereich des ZNS bis zum ‚Rand‘ der Planarien exprimiert wird. Der Knockdown von *slit* führt zu Zusammenbruch des ZNS im Bereich der Mittellinie während der Knockdown von *wnt5* eine Fehlbildung und Deregulation des ZNS im lateralen Bereich hervorruft (Cebrià und Newmark 2007; Adell et al. 2009; Gurley et al. 2010; Almuedo-Castillo et al. 2012). *Slit* verhindert durch Interaktion mit Roundabout (Robo) -Rezeptoren die Passage von Axonen über die Mittellinie hinaus und reguliert die Passage von Kommissuralaxonen (Yuasa-Kawada et al. 2009; Blockus und

Chédotal 2016). Robo-Rezeptoren sind hochkonservierte Transmembranrezeptoren, die sekretierte Proteine der Slit-Familie binden und gemeinsam mit diesen Liganden eine wichtige Rolle in der Axonführung haben (Brose und Tessier-Lavigne 2000; Dickson und Gilestro 2006; Cebrià und Newmark 2007). Der Knockdown eines Robo-Homologs *roboA* führt in Planarien zu einer fehlerhaften Regeneration des ZNS, insbesondere der zentralen Ganglien (Cebrià und Newmark 2007). Der Slit-Robo-Signalweg ist neben den genannten Funktionen in malignen Tumoren des Menschen bekannt und spielt insbesondere in Angiogenese und Metastasierung eine Rolle (Wang et al. 2003; Koohini et al. 2019; Ding et al. 2020). In *E. multilocularis* ist der Slit-Robo-Signalweg bisher weitestgehend unerforscht.

### 1.2.3 Hedgehog-Signalweg

Namensgebend für diesen Signalweg ist der Phänotyp der Hedgehog (Hh) Mutante, die eine igelartige Kutikula in *Drosophila melanogaster* (Taufliege) hervorruft (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980; Varjosalo und Taipale 2008). Der Verlust oder die Inhibierung des Hh-Signalweges ist mit zahlreichen Krankheiten und Fehlbildungen, wie malignen Tumoren und Zyklopie assoziiert (Taipale und Beachy 2001; Chen 2016; Carballo et al. 2018). Der Hh-Signalweg ist in sämtliche entwicklungsbiologische Prozesse in Metazoen eingebunden, darunter Zelldetermination, Proliferation, Segmentierung, Entwicklung von Gliedmaßen und der Mittellinie (Taipale und Beachy 2001; Varjosalo und Taipale 2008; Ingham et al. 2011; Swarup und Verheyen 2012). Die Signaltransduktion erfolgt nach Bindung eines Hh-Liganden an den Rezeptor Patched (Ptch). Durch diese Interaktion wird die Repression des G-gekoppelten Rezeptors Smoothed (Smo) aufgehoben, welcher in Abwesenheit von Hh-Liganden durch den Rezeptor Patched (Ptch) inhibiert wird. Durch Bindung von Smo an den Suppressor of Fused (Sufu) wird die Inhibierung von Gli durch Sufu aufgehoben und es erfolgt eine Translokation von Gli in den Nukleus und die Genexpression von Zielgenen (Rink et al. 2009; Carballo et al. 2018). *Hh* wird in Planarien in Zellen des ZNS exprimiert und erstreckt sich von den cephalischen Ganglien bis zum Pharynx (Rink et al. 2009). Der Hh-Signalweg ist außerdem essenziell für die Ausbildung der AP-Achse und Regeneration des posterioren Pols in Planarien, u. a. durch die Regulation der Transkription von Genen der Wnt-Familie. Der Knockdown von *hh* in *D. japonica* Fragmenten geht mit einer verminderten Expression von *DjwntP-1* am posterioren Ende einher und einer ausbleibenden

Regeneration des posterioren Pols (Yazawa et al. 2009). Erhöhte Expression von *hh* dagegen führt mit Steigerung der Expression von Zyklopie über ‚kopflose‘ Tiere bis hin zu Tieren mit zwei posterioren Enden (Rink et al. 2009). Damit steht *hh* in Zusammenhang mit der Ausbildung posteriorer Identität (Yazawa et al. 2009). In *Danio rerio* (Zebrafisch) reguliert *hh* zudem die Expression von *slit* Genen und ist damit eingebunden in die korrekte Positionierung von Axonen entlang der Mittellinie (Carballo et al. 2018). Der Hh-Signalweg stellt einen wichtigen Schlüsselfaktor für eine korrekte Ausbildung von AP- und ML-Achse dar.

#### 1.2.4 TGF- $\beta$ /BMP-Signalweg

Der Bone morphogenic Proteins (BMP)-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Erhaltung von dorsal-ventraler (DV) Körperachse in Vertebraten und Invertebraten (Molina et al. 2007; Adell et al. 2010). Die BMP sind Teil der TGF- $\beta$ -Familie. Faktoren der TGF- $\beta$ -Familie übernehmen eine wichtige Rolle in einer Vielzahl an zellulären Prozessen, wie der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose, Immunantwort, Tumorentstehung- und Progression sowie bei der Ausbildung von Körperachsen (Moustakas und Heldin 2009; Epping und Brehm 2011; Wang et al. 2013b; Syed 2016). Liganden der TGF- $\beta$ -Familie, wie TGF- $\beta$ , Activin, Nodal und BMPs können an Typ II TGF- $\beta$ -Rezeptoren binden, wodurch ein Typ I Rezeptor rekrutiert wird und durch diesen der Typ II Rezeptor phosphoryliert und aktiviert wird (Massagué und Gomis 2006; Moustakas und Heldin 2009). Daraufhin werden Rezeptor-gebundene Smad Transkriptionsfaktoren (TGF- $\beta$ -Ligand: Smad2/3; BMP-Ligand: Smad1/5/8) aktiviert, welche mit Co-Smad (Smad4) interagieren und nach Translokation in den Nukleus die Transkription von Zielgenen erfolgt (Moustakas und Heldin 2009). Der BMP-Signalweg ist hochkonserviert in Planarien und ist dort für die Ausbildung und Regeneration der DV-Achse verantwortlich (Molina et al. 2007; Reddien et al. 2007). Dabei ist die DV-Achse, wie in *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) abhängig vom Zusammenspiel von BMP und Antidorsalizing morphogenetic protein (ADMP), welche durch Expression an entgegengesetzten Seiten, die DV-Achse definieren (Molina et al. 2007; Molina et al. 2011). Dabei wird *bmp* entlang der dorsalen Mittellinie exprimiert, während *admp* entlang der ventralen Mittellinie und an den lateralen Enden rund um das Tier exprimiert ist. Durch diese komplementäre Expression kann die DV-Achse und die Grenze zwischen dorsal und ventral identifiziert werden (Molina et al. 2007; Gaviño und Reddien 2011). Der BMP

Signalweg ist unter anderem durch Antagonisten, wie Follistatin und Noggin reguliert, welche durch Interaktion mit Activin bzw. BMP die Rezeptorbindung von BMP blockieren können (Zimmerman et al. 1996; Roberts-Galbraith und Newmark 2013). Dabei ist die Expression von *follistatin* in Planarien essentiell für die Regeneration des anterioren Pols (Roberts-Galbraith und Newmark 2013). Auch Homologe zu *noggin* (*nog*) und *noggin-like* (Insertion in Noggin-Dömäne), sind in Planarien identifiziert worden. Diese werden am Körperrand und ZNS bzw. auf der dorsalen Körperhälfte in *S. mediterranea* exprimiert. Knockdown von *noggin* Homologen verursacht eine Ventralisierung von Tieren und zeigt deren wichtige Rolle in der Ausbildung einer DV-Achse (Molina et al. 2011). Der BMP-Signalweg wurde in *E. multilocularis* bisher bezüglich auf eine mögliche Wirt-Parasit Interaktion durch Zytokine untersucht, wobei bereits Homologe zu BMP, ADMP und mehreren SMAD in *E. multilocularis* identifiziert werden konnten (Zavala-Góngora et al. 2008; Epping und Brehm 2011; Epping 2011). Bisher sind in Bezug auf die Ausbildung von Körperachsen keine Erkenntnisse zum BMP Signalweg in *E. multilocularis* bekannt.

### 1.3 Ziel der Arbeit

#### 1.3.1 Transkriptomanalysen zur *E. multilocularis* Primärzellkultur

Um die Entwicklung von Primärzellkulturen, welche maßgeblich von germinativen Zellen, den einzig proliferierenden Zellen in *E. multilocularis*, ausgeht, besser zu verstehen (Brehm und Koziol 2014; Herz 2019), wurden in dieser Arbeit Transkriptionsprofile von Primärzellkulturen näher analysiert. Aus Primärzellen, die der Germinalschicht des Metazestoden entstammen, entwickeln sich *in-vitro* wiederum Metazestoden-Vesikel (Spiliotis et al. 2008). Der Metazestode stellt durch beständige Expression von Wnt-Liganden posteriorisiertes Gewebe dar (Koziol et al. 2016a). Diese Entwicklung zu Metazestoden-Vesikeln wird den germinativen Zellen zugeschrieben und mit der Transformation der Onkosphäre zum Metazestode verglichen. In beiden Fällen wird davon ausgegangen, dass die germinativen Zellen für die vollständige Entwicklung von *E. multilocularis* verantwortlich sind (Brehm und Spiliotis 2008). Da die germinativen Zellen nicht auf die Therapiemaßnahmen mit Benzimidazolen bei AE ansprechen, ist es wichtig die Entwicklung der Primärzellkultur zu verstehen (Brehm und Koziol 2014). Für die Analyse lagen Transkriptomdaten von Primärzellkulturen in drei Entwicklungsstadien vor. Erste Analysen dieser Transkriptomdaten deuteten darauf hin, dass innerhalb der Primärzellkultur

insbesondere Gene, welche mit germinativen Zellen assoziiert sind, erhöht exprimiert werden (Koziol et al. 2014; Spiliotis et al. 2008; Herz 2019). In dieser Arbeit wurde das Transkriptom der Primärzellkultur weiter analysiert.

### 1.3.2 Der Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Entwicklung des Metazestoden

In Vorarbeiten hatte sich gezeigt, dass die Bildung der AP-Körperachse bei *Echinococcus*, wie generell bei Metazoen, sehr wahrscheinlich unter Kontrolle des Wnt-Signalweges steht. Dieser Signalweg könnte daher bei der Ausprägung der AP-Körperachse in *E. multilocularis* eine zentrale Rolle einnehmen. Dabei wird der posteriore Pol durch Expression des Morphogens *em-wnt1* und der anteriore Pol durch Expression des Wnt-Antagonisten *em-sfrp* definiert. Diese Untersuchungen zeigten auch, dass der *E. multilocularis* Metazestode posteriorisiertes Gewebe darstellt, indem während des infiltrativen Wachstums über die gesamte Germinalschicht hinweg *em-wnt1*, *em-wnt11a* und *em-wnt11b*, jedoch keine anterioren Markergene exprimiert werden. Erst bei der Entwicklung von Brutkapseln und Protoskolizes wird mutmaßlich der anteriore Pol vielfach etabliert, sodass eine Expression von *em-sfrp* zunächst punktuell in der Germinalschicht nachweisbar ist und anschließend stets anterior am sich entwickelnden Protoskolex beobachtet werden kann (Koziol et al. 2016a). Yeast-Two-Hybrid-Untersuchungen und Co-Immunopräzipitations-Studien hatten zudem gezeigt, dass *em-bcat1*, als einziges von drei *E. multilocularis* exprimierten  $\beta$ -Cateninen, als zentrale Komponente des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs fungiert (Montagne et al. 2019). Um die Bedeutung des kanonischen Wnt-Signalweges auf die Entwicklung des Metazestoden funktionell zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Rolle von *em-bcat1* auf die Entwicklung von Metazestoden-Vesikeln im *E. multilocularis* Primärzellsystem anhand von RNAi Experimenten analysiert. Unter Verwendung eines vorher etablierten RNAi-Protokolls nach Spiliotis et al. (2010) haben Vorversuche bereits Hinweise darauf, dass ein *em-bcat1*-Knockdown zu einem deutlich erkennbaren Phänotyp führen kann. Auf zellulärer Ebene war dieser sog. ‚red-dot‘-Phänotyp jedoch bislang noch nicht charakterisiert. Zudem lag keine statistische Absicherung vor, inwieweit ein *em-bcat1*-Knockdown verlässlich den Phänotyp hervorruft. Neben diesen vorläufigen RNAi-Experimenten lag ein erarbeiteter Datensatz an Transkriptomdaten zu Primärzellkulturen nach *em-bcat1*-RNAi und entsprechenden Kontrollen vor (Herz, Brehm, unpublizierte Daten). In der

vorliegenden Arbeit wurde der *em-bcat1* (RNAi) Phänotyp statistisch verifiziert, charakterisiert und zudem das RNAi Protokoll auf Effizienz und Reproduzierbarkeit überprüft. Die Transkriptomdaten nach *em-bcat1* RNAi lieferten Hinweise auf markant erhöht oder verringert exprimierte Gene, darunter auch Gene, welche Schlüsselfunktionen in der Ausbildung der AP-Achse besitzen. Die Verifikation der Transkriptomdaten sowie die Lokalisierung der Genexpression dieser Gene innerhalb von Primärzellaggregaten nach RNAi, wurde über Whole mount-in-situ-Hybridisierung (WMISH) untersucht.

### 1.3.3 **Weitere Signalwege zur Ausbildung der Körperachsen in *E. multilocularis***

Neben dem Wnt-Signalweg, welcher in Bilateria und Nicht-Bilateria die AP-Achse determiniert, ist bisher nicht geklärt, inwiefern in *E. multilocularis* weitere Körperachsen, wie medio-lateral und dorsal-ventral-, ausgebildet werden (Petersen und Reddien 2009; Holstein 2012). Deshalb wurden in dieser Arbeit Homologe zu Genen der ML-Körperachse beteiligten Signalwege, insbesondere Slit-Robo, identifiziert und deren Genexpressionsmuster mittels WMISH untersucht.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Instrumente

TFX-35M Geldokumentationssystem	INTAS
Thermocycler	Biometra
Thermomixer 5436	Eppendorf
Bactifuge Zentrifuge	Hareus
Rotina 380R Zentrifuge	Hettich
Mikro 200 Zentrifuge	Hettich
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific
NanoDrop™	Thermo Fisher Scientific
2800 Frigocut E Cryotom	Leica
Konfokales Mikroskop TCS SP5	Leica
Konfokales Mikroskop Nikon Eclipse Ti2	Nikon
Inverses Mikroskop Nikon Eclipse Ts2	Nikon
StepOnePlus Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific

### 2.2 Software

BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 7.2.5); (Hall 1999)

IGV: Integrative Genomic Viewer, Version 2.5.3; (Robinson et al. 2011)

qPCR Software: Step One, Version 2.3

MEGA X, Version 10.1.8; (Kumar et al. 2018)

### 2.3 Online Tools

BLAST WormBase ParaSite, <https://parasite.wormbase.org/Tools/Blast>, Version WBPS 15 (WS376); (Howe et al. 2017)

SIB BLAST+ EXPASY, <https://web.expasy.org/blast/>; (Artimo et al. 2012)

BLAST Uniprot <https://www.uniprot.org/blast/> (The UniProt Consortium 2019)

Uniprot, <https://www.uniprot.org/>, (The UniProt Consortium 2019)

MUSCLE, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>; (Edgar 2004)

CLUSTAL OMEGA ALIGNMENT (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Madeira et al. 2019)

PROSITE, <https://prosite.expasy.org/>; (Castro et al. 2006)

SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de/smart>; (Letunic und Bork 2018)

IDT Oligoanalyzer, <https://sg.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>

Sigma Oligoevaluator, <http://www.oligoevaluator.com/OligoCalcServlet>

siRNA Designer, <https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/rnaiDesign.jsp>

WormBase ParaSite, <https://parasite.wormbase.org/index.html>, Version: WBPS14 (WS271); (Howe et al. 2017)

## 2.4 Chemikalien, Puffer und Kits

### 2.4.1 Chemikalien

Name	Firma/Hersteller
10x DIG RNA Labeling mix	Roche
10x DIG-RNA Labeling mix	Roche
10x RNA-Polymerase Reaktionspuffer	New England Biolabs
50x Denhard's-Lösung	Sigma-Aldrich
5X Green GoTaq Reaktionspuffer	Promega
Acetanhydrid	Sigma-Aldrich
Advanced DMEM/F-12	Gibco
Alexa 647 Tyramid	Thermofisher Scientific
Anti-DIG-AP	Roche
Anti-DIG-POD	Roche
6x DNA-Probenpuffer (Gel Loading Dye)	New England Biolabs
Bathocuproindisulfonsäure	Sigma-Aldrich
Blockreagenz	Roche
BSA	Sigma-Aldrich
Carbenicillin (100 mg/ml)	Sigma-Aldrich

CHAPS	Sigma-Aldrich
Chloroform	Merck
DAPI (Dihydrochlorid (4',6-diamidino-2-phenylindol))	Thermo-Fisher-Scientific
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich
DIG-Labeled RNA Probe	Roche
Dimethylformamid (DMFA)	Sigma Aldrich
DMEM-GlutaMAX	Gibco
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Applichem
EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridin)	Thermofisher-Scientific
Entellan®	Merck
Essigsäure	Carl-Roth
FBS	Gibco
Fluorescein Tyramid	Sigma-Aldrich
Fluoroshield™	Sigma-Aldrich
Formamid	Sigma-Aldrich
Glycerin	Carl-Roth
Heparin	Sigma-Aldrich
Heparin (100 mg/ml)	Sigma-Aldrich
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Thermofisher-Scientific
HOT FIREPol®EvaGreen® qPCR Mix (ROX)	Solis BioDyne
Imidazol	Sigma-Aldrich
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dikaliumhydrogenphosphat)	Carl-Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Carl-Roth
Kaliumhydroxid	Carl-Roth
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)	Carl-Roth
L-Cystein	Sigma-Aldrich
Levofloxacin (5 mg/ml)	Ibigen
Maleinsäure	Sigma-Aldrich
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid)	Carl-Roth
Midori Green advanced	Nippon Genetics
Midori Green direct	Nippon Genetics

Myo-Inositol	Sigma-Aldrich
NaCl (Natriumchlorid)	Sigma-Aldrich
Natriumcitrat/Tri-Natriumcitrat	Sigma-Aldrich
Natriumtaurocholat	Sigma-Aldrich
NBT-BCIP® Lösung	Sigma-Aldrich
NEAA (non essential amino acids)	Gibco
NHS Fluorescein	Thermo Fisher Scientific
PBS	Gibco
Penicillin G / Streptomycin 10000 U/ml	Gibco
Pepsin	Sigma Aldrich
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific
RNAse Exitus Plus	Applichem
RNAse OUT™ RNAse Inhibitor (400 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
RQI RNAse freie DNase	Promega
Saccharose	Sigma-Aldrich
HCl (Salzsäure)	Sigma-Aldrich
Schafserum	Sigma-Aldrich
6x RNA-Probenpuffer (Gel Loading Dye Purple)	New England Biolabs
SL-Ladder (SmartLadder)	Eurogentech
SP6-RNA-Polymerase	New England Biolabs
β-Mercaptoethanol	Carl-Roth
Superior FBS	Sigma Aldrich
T7-RNA-Polymerase	New England Biolabs
Taq-Polymerase	New England Biolabs
Tissue Tek® O.C.T. Compound	Sigma-Aldrich
Torula RNA	Sigma-Aldrich
Trehalose	Sigma-Aldrich
TEA (Triethanolamine)	Sigma-Aldrich
Triethylamin	Sigma-Aldrich
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich
Triton® X-100	Sigma-Aldrich

---

TRIzol™ Reagenz	Thermo Fisher Scientific
Trypsin	Sigma-Aldrich
Tween®20	Sigma-Aldrich
Wasser "Aqua B. Braun" (steril, pyrogenfrei)	Braun

## 2.4.2 Lösungen und Puffer

<u>ALP-Puffer</u>	100 mM TRIS-HCl 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> pH 9.5
<u>1x TAE</u>	40 mM TRIS pH 8,0 1 mM EDTA 20 mM Essigsäure
<u>B1-Puffer</u>	100 mM TRIS -HCl 100 mM NaCl pH 7,5
<u>B2-Puffer</u>	Puffer B1 mit 0.5% Blockreagenz
<u>B3-Puffer</u>	100 mM TRIS-HCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub> pH 9,5
<u>LB-Medium</u>	1% Trypton 0,5% Hefe-Extrakt 1% NaCl pH 7,0

LB-Agar LB-Medium  
1,5% Bacto-Agar

Trypsin-EDTA Lösung 0.05% Trypsin  
0.02% EDTA  
PBS ad 400 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

DEPC-Wasser H<sub>2</sub>O  
0,1 % DEPC

Der Ansatz wurde über Nacht gerührt und anschließend zweimal autoklaviert.

PBS (DEPC) PBS  
0,1 % DEPC

Der Ansatz wurde über Nacht gerührt und anschließend zweimal autoklaviert.

4 % PFA in PBS (DEPC) 2 g PFA (Paraformaldehyd)  
ad 50 ml PBS (DEPC)

PBS-T (DEPC) PBS (DEPC)  
0,1% Tween-20

PBS +Imidazol 0,1 M Imidazol  
0,1% Tween-20  
pH 7,6

TEA

0.1 M TEA

ad 50 ml H<sub>2</sub>O (DEPC)

pH 7-8 HCl

Hybridisierungspuffer

50% Formamid

5x SSC

1 mg/ml Torula RNA

100 µg/ml Heparin

1x Denhardt's Lösung

0,1% Tween-20

0,1% CHAPS

ad 50 ml H<sub>2</sub>O (DEPC)

20x SSC

175,3 g NaCl

88,2 g Natriumcitrat

pH 7,0

0,1% DEPC

ad 1 l H<sub>2</sub>O (DEPC)

Der Ansatz wurde über Nacht gerührt und anschließend zweimal autoklaviert.



<u>2x SSC</u>	5 ml 20x SSC 0,1% Tween-20 ad 50 ml H <sub>2</sub> O (DEPC)
<u>0,2x SSC</u>	5 ml 2x SSC 0,1% Tween-20 ad 50 ml H <sub>2</sub> O (DEPC)
<u>MAB-Puffer</u>	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5
<u>MAB-T</u>	MAB-Puffer 0,1% Tween-20
<u>MAB+ Blockreagenz</u>	MAB-Puffer 0,1% Blockreagenz 0,1% Tween-20
<u>Elektroporationspuffer</u>	120 mM Trehalose 20 mM HEPES 1 mM Myo-Inositol 1 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

	0,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1 mM Gluthathion
	pH 6,9 KOH
Sörensen-Phosphatpuffer	12,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	81,8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	pH 7,4

### 2.4.3 Kits

SuperScript IV Reverse Transkriptase	Invitrogen
NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Exo-CIP™ Rapid PCR Cleanup Kit	New England Biolabs
PureLink™ RNA Mini-Kit	Invitrogen
Direct-zol™ RNA Mini Prep Kit	Zymo-Research
pJET1.2 CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific
Click-iT™ EdU Cell Proliferation Kit;	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor™ 555 dye	Thermo Fisher Scientific
KOD DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich

### 2.5 Verbrauchsmaterial

0,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
2,0 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
10 µl Pipettenspitzen	Sarstedt
200 µl Pipettenspitzen	Sarstedt

---

1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt
Biosphere® Filterspitzen 20	Sarstedt
Biosphere® Filterspitzen 100	Sarstedt
Biosphere® Filterspitzen 1000	Sarstedt
Petrischalen	Sarstedt
15 ml Röhrchen	Greiner Bio One
50 ml Röhrchen	Greiner Bio One
CELLSTAR® Zellkulturflaschen T75	Greiner Bio One
CELLSTAR® Zellkulturflaschen T175	Greiner Bio One
6-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio One
12-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio One
24-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio One
48-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio One
96-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio One
µ-Slides 8-Well ibiTreat	ibidi
Serologische Pipette 1 ml	Greiner Bio One
Serologische Pipette 5 ml	Greiner Bio One
Serologische Pipette 10 ml	Greiner Bio One
Serologische Pipette 25 ml	Greiner Bio One
Serologische Pipette 50 ml	Greiner Bio One
Hybond™-Nylonmembran	Amersham
MicroAmp® 96 Well Platte (0,1 ml)	Life-Technologies
40 µm Aufsatzfilter; EASYstrainer™	Greiner Bio-One
30 µm Gaze	Hartenstein
150 µm Gaze	Hartenstein

Objektträger	Thermo Fisher Scientific
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific
SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger	Thermo Fisher Scientific
Ratiomed Einmal-Skalpell	Hartenstein
Spritzen 50 ml, 25 ml (INFUJECT®)	Dispomed WITT oHG
Haushaltssieb	Fackelmann
Elektroporation-Küvette Plus 1 mm	Harvard Apparatus (BTX)

## 2.6 Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'-3'
pJET1.2 fwd	CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC
pJET1.2 rev	AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG
pJET1.2 T7 plus2 fwd	AGA AGA GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG
pJET1.2 SP6 rev	ATA ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG
Oligo dT CD3RT:	ATC TCT TGA AAG GAT CCT GCA GGT <sub>25</sub> T
qPCR_bcat1_fwd	GCT ACC AAC AGC AGC CCA TGA ATG
qPCR_bcat1_rev	GTG AGG CGC CAT TGT GTT TGC ATA C
qPCR_elp_fwd	TGA TGA AAG TGA AGC CAA GGA ACT TGA G
qPCR_elp_rev	TTC GTC TGG AGC GTC TCA TTC TTA GAG

Verwendete Primer für die Herstellung von RNA-Sonden in Anhang A.1.

## 2.7 Zellkultur

### 2.7.1 Generelle Regeln und Handhabung im Umgang mit *E. multilocularis* Kulturen und infizierten Geweben

Infiziertes Wirtsgewebe aus *Macaca fascicularis*, als auch aus *in-vivo* Kultivierung sowie die Parasitenzellkulturen selbst, unterliegen dem Arbeiten unter Sicherheitsverordnungen der Standards der biologischen Sicherheitsstufe 2. Dies beinhaltet, dass das Arbeiten immer unter Verwendung entsprechender persönlicher Schutzausrüstung an geeigneten Steril-Werkbänken zu erfolgen hat. Das Arbeiten

erfolgte stets unter sterilen Bedingungen und entsprechend mit geeigneten, sterilen Materialien und Lösungen.

### 2.7.2 Verantwortung und Ethik

Für die Erhaltung und Kultivierung von *E. multilocularis* in mongolischen Wüstenrennmäusen, *Meriones unguiculatus*, waren entsprechende Tierversuche nötig. Für die Durchführung der Tierexperimente wurden stets die Regularien des Tierschutzgesetzes und der Tierschutz-Versuchstierordnung eingehalten. Eine Genehmigung für das Versuchsvorhaben lag durch die Regierung von Unterfranken vor (Genehmigung-Nr. 55.2-2531.01/61/13).

### 2.7.3 In-vitro Kultivierung von *E. multilocularis*

Die Kultivierung des Metazestoden-, und Protoskolex-Larvenstadiums sowie der aus der Germinalschicht des Metazestoden isolierten Primärzellen von *E. multilocularis* ist *in-vitro* möglich. Die Kultivierung erfolgte entweder in Co-Kultur mit Reuber-Hepatoma (RH<sup>-</sup>) Zellen, ATCC® CRL-1600™, aus *Rattus norvegicus*, oder axenisch, unter Verwendung von konditioniertem Medium unter Sauerstoffausschluss (siehe 2.7.3.2.) (Reuber 1961; Spiliotis und Brehm 2009; Mizukami et al. 2010). Das verwendete Standardmedium setzte sich zusammen aus DMEM+ 10% FBS+ 1% Pen/Strep. Die Kultivierung erfolgte standardmäßig bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> bzw. im Falle von Sauerstoffausschluss unter Zugabe von N<sub>2</sub>.

#### 2.7.3.1 Aufbereitung von Metazestodengewebe und verwendete Isolate

Für die *in-vivo* und *in-vitro* Kultur von Metazestoden-Vesikeln wurde mit *E. multilocularis* infiziertes Lebergewebe aus mongolischen Wüstenrennmäusen präpariert und mit einem Skalpell so weit wie möglich zerkleinert. Unter Verwendung eines 25 ml Spritzenkolbens wurde das Parasitenmaterial über einen handelsüblichen Metallsieb gestrichen, wodurch das Material weiter zerkleinert und weitestgehend von Wirtsbindegewebe und größeren Partikeln getrennt wurde. Der Durchlauf wurde in ein 50 ml Greiner überführt und dreimal mit 1x PBS gewaschen. Hierzu wurde nach jeweiligem Absetzen des Materials der Überstand dekantiert, verworfen und das Röhrchen erneut mit 1x PBS ad 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Parasitenmaterial über Nacht in DMEM+ 5% Pen/Strep bei 4°C inkubiert und erneut dreimal mit 1xPBS gewaschen. Das so aufbereitete Metazestoden-Material konnte zur *in-vivo* Kultivierung peritoneal in Wüstenrennmäuse injiziert werden. Nach 3-4

Monaten erfolgte die Präparation aus dem Wirtstier und das Parasitenmaterial konnte erneut passagiert, in die *in-vitro* Zellkultur aufgenommen oder zur Isolierung von Protoskolizes verwendet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten *E. multilocularis* Isolate entstammen aus dem Fehlwirt *M. fascicularis* oder *M. mulatta*. Die Javaner- bzw. Rhesusaffen infizieren sich im Rahmen Ihrer Unterbringung im Bestand des Deutschen Primatenzentrums Göttingen (Tappe et al. 2007).

**Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete *E. multilocularis* Isolate.**

Isolat	Wirt	Jahr der Isolierung	Publiziert
GH09	<i>Macaca mulatta</i>	2009	(Epping und Brehm 2011)
Ingrid	<i>Macaca fascicularis</i>	2010	(Tsai et al. 2013)
J2012	<i>Macaca fascicularis</i>	2012	(Ancarola et al. 2020)
DDD16	<i>Macaca fascicularis</i>	2016	nicht publiziert
MB17	<i>Macaca fascicularis</i>	2017	nicht publiziert
TM19	<i>Macaca fascicularis</i>	2019	nicht publiziert

### 2.7.3.2 *In-vitro* Kultivierung vom Metazestoden

Angelegt wurden die Metazestoden-Zellkulturen in Co-Kultur mit ca.  $1 \times 10^6$  RH<sup>-</sup> in T75 Zellkulturflaschen unter Zugabe von 1 ml Metazestoden-Material, aufbereitet wie unter 2.7.3 beschrieben. Die Kultivierung erfolgte in 25 ml Standardmedium und zusätzlicher Beigabe von Levofloxacin (20 µg/ml) für 3-4 Wochen, um das Wachstum von Bakterien aus dem Wirtstier zu unterbinden. Nach ca. 6 Wochen wurden die Metazestoden-Vesikel in T175 Zellkulturflaschen überführt. Die Co-Kulturen wurden im wöchentlichen Rhythmus mit Standardmedium sowie ca.  $1 \times 10^6$  RH<sup>-</sup> versorgt.

### 2.7.3.3 Axenische Kultivierung von *E. multilocularis* Metazestoden

Für Inhibitor-Experimente sowie vor der Isolierung von Primärzellen wurden die Metazestoden-Zellkulturen axenisch geführt (Spiliotis et al. 2004; Spiliotis und Brehm 2009; Spiliotis et al. 2010). Dies bedeutet, dass der Parasit in Wirtszell-freiem Medium und unter Sauerstoffausschluss kultiviert wurde. Um die Nährstoffversorgung zu gewährleisten wurde konditioniertes Medium von RH<sup>-</sup> Zellen verwendet. Hierbei wurden im Labor zwei standardisierte Konditionsmedien verwendet (siehe 2.7.4). Für

die Überführung einer Co-Kultur in eine axenische Kultur wurden zunächst geschädigte Vesikel, erkennbar an Rotfärbung der Hydatidenflüssigkeit durch Medium, entfernt. So konnte eine potenzielle Übertragung von Hepatozyten unterbunden werden. Die übrigen, intakten Metazestoden-Vesikel wurden über einen Metallsieb vom Medium getrennt und anschließend in einem Becherglas dreimal mit 1xPBS gewaschen, um einen Großteil der Hepatozyten zu entfernen. Anschließend wurden die Metazestoden-Vesikel für 3 min in Wasser inkubiert, um durch den damit verbundenen osmotischen Druck restliche Hepatozyten zu eliminieren. Die Vesikel wurden mit konditioniertem Medium (cMEM) unter Zusatz von reduzierenden Agenzien (100 µm L-Cystein, 14,2 mM β-Mercaptoethanol, 10 µm Bathocuproindisulfonsäure) und nach Zugabe von N<sub>2</sub> in einer verschlossenen Zellkulturflasche über das Wochenende bei 37°C inkubiert. Im Anschluss konnte die Isolierung von Primärzellen erfolgen (siehe 2.7.3.6) oder Inhibitor-Versuche durchgeführt werden.

#### **2.7.3.4 Isolierung von Protoskolizes**

Die Isolierung von Protoskolizes erfolgte nach bekannter Methodik (Jura et al. 1996; Brehm et al. 2003; Mizukami et al. 2010; Herz und Brehm 2021). Das aus den Wüstenrennmäusen präparierte Parasitenmaterial (2.7.3) wurde zunächst mittels Skalpell so weit wie möglich zerkleinert und mit einem 25 ml Spritzenkolben über einen Metallsieb passiert. Der Durchlauf wurde je dreimal 10 min mit 1x PBS gewaschen. Nach 10 min hatte sich jeweils das Material am Boden abgesetzt und der Überstand wurde dekantiert. Anschließend wurde das Parasitenmaterial in 50 ml Greiner Röhren überführt und ad 25 ml mit 1x PBS aufgefüllt, oder gegebenenfalls auf mehrere Röhren aufgeteilt. Daraufhin wurden durch kräftiges Schütteln (10 min) die Protoskolizes aus dem Gewebe herausgelöst. Diese wurden zunächst über eine 150 µm Gaze von größeren Gewebestücken und Wirtsmaterial getrennt und anschließend in einer 30 µm Gaze aufgefangen. Bei diesen Schritten wurden die Suspensionen jeweils kräftig in 1x PBS resuspendiert und nachgespült, um die Ausbeute zu erhöhen. Es erfolgte ein weiterer Trennungsschritt durch Einsatz eines 40 µm Aufsatzfilters (50 ml Röhren), wobei Kalziumkörperchen das Sieb passieren konnten, während Protoskolizes im Filter aufgefangen wurden. Auch hier wurde durch mehrmaliges Resuspendieren der Protoskolizes in 1xPBS der Wascherfolg maximiert. Die Reinheit konnte weiter gesteigert werden, indem die Protoskolizes in eine große Petrischale mit 1xPBS überführt wurden und nach dem Goldwaschprinzip durch

langsam ausgeführte Kreisbewegungen in der Mitte der Schale gesammelt wurden. Die angesammelten Larven wurden abgenommen, während noch vorhandene Kalziumkörperchen am Boden der Petrischale verblieben. Anschließend erfolgte die Aktivierung der Protoskolizes. Hierfür wurde zunächst die Magenpassage im Wirt durch Inkubation in 0,05% Pepsin in DMEM, pH 2,0, bei 37°C und 125 rpm für 25 min imitiert. Die Reaktion wurde durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS ad 50 ml in Greiner Röhrchen gestoppt und anschließend durch Inkubation in 0,2% Natriumtaurocholat in DMEM die Passage des Dünndarms im Endwirt nachgestellt (4 h 37°C 125 rpm). Die Aktivierung wurde mikroskopisch überprüft und nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS wurden die Protoskolizes in Standardmedium überführt und kultiviert.

### **2.7.3.5 *In-vitro* Kultivierung von Protoskolizes**

Für die Kultivierung von adult-ähnlichen Würmern wurde zunächst untersucht, ob eine Aktivierung der Protoskolizes nötig ist. Hierfür wurden, wie unter 2.7.3.4 beschrieben, Protoskolizes isoliert und aktiviert (Pepsin+Natriumtaurocholat) oder ohne Aktivierung direkt nach Isolierung in Medium überführt. Als Standardmedium wurde, wie für Metazestoden auch, DMEM+ 1 % Pen/Strep+ 10 % FBS verwendet. Um die Bedingungen für die Entwicklung von adult-ähnlichen Würmern zu untersuchen, wurden die Protoskolizes in unterschiedlichen Medien kultiviert. Hierfür kam zum Einsatz: Co-Kultur mit RH<sup>-</sup> in Standardmedium, A6 cMEM RH<sup>-</sup>, Co-Kultur Caco-2, cMEM Caco-2, Standardmedium mit 20% FBS (entspricht Caco-2-Kultivierungsmedium), Kultivierung cMEM Mischung aus RH<sup>-</sup> und Caco-2, cMEM Dünndarmorganoide (Lehrstuhl Tissue Engineering Würzburg, Christina Fey) mit entsprechendem Organoid Kulturmedium (Medium Advanced DMEM/F-12+1% Pen/Strep) mit und ohne Zusätze als Kontrolle, Standardmedium mit 0,2% Natriumtaurocholat, Standardmedium ohne FBS. Für diese Experimente wurden die Protoskolizes zu ca. 1 000 Stück/Well in 48-Well Platten unter Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Die Beurteilung des Wachstums und der Entwicklung erfolgte nach lichtmikroskopischer Kontrolle anhand der Morphologie.



### 2.7.3.6 Isolierung von Primärzellen aus *E. multilocularis* Metazestoden-Vesikeln zur Verwendung von RNAi-Experimenten

Zur Durchführung von RNAi Experimenten, wurden zunächst Primärzellkulturen (innerhalb der Germinalschicht liegende Muskel-, Nerven- und germinative Zellen) anhand des bereits bekannten Protokolls isoliert und angelegt (Spiliotis und Brehm 2009; Spiliotis et al. 2010). Dafür wurde je zunächst eine axenische Metazestoden-Kultur, beschrieben unter 2.7.3.2, angelegt. Für die RNAi Experimente wurden 5-6 Monate alte Metazestoden-Kulturen des Isolats GH09 verwendet. 72 h nach Axenisierung wurden die Vesikel dreimal mit 1xPBS gewaschen und für 3 min in Wasser inkubiert, um sicher zu gehen keine Hepatozyten in die Primärzellpopulation zu überführen. Anschließend wurde zweimal mit 1xPBS gewaschen und die Metazestoden-Vesikel über einen Metallsieb vom PBS getrennt. Die Vesikel wurden durch Aufziehen mit einer 10 ml Pipette zerstört und in ein 50 ml Greiner Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 700 g wurde die Hydatiden-Flüssigkeit dekantiert und die geöffneten Vesikel unter Zugabe von 1xPBS ad 50 ml gewaschen (2 min, 400 g). Dieser Waschschrift wurde dreimal durchgeführt um restliche Hydatidenflüssigkeit entfernen. Anschließend wurden die geöffneten Metazestoden-Vesikel mit dem 8-fachen Volumen des Vesikel-Pellets mit Trypsin-EDTA bei 37°C für 30 min unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde durch Schütteln des Röhrchens mit zunehmend starker Frequenz in Intervallen von je 5 min die innerhalb der Germinalschicht liegenden Primärzellen gelöst. Wichtig war hierbei, dass die Kraft aus dem Handgelenk in Verlängerung des Ellenbogens kam und die Vesikel bei jedem Schütteln gegen den Boden des Greiner Röhrchens geschlagen wurden. Nach den jeweiligen 5 min Schritten wurden die Primärzellen über eine 30 µm Gaze von größeren Bestandteilen getrennt und in einem Becherglas aufgefangen. Die Vesikel wurden zurück in ein 50 ml Greiner überführt und nach Zugabe von 25 ml 1xPBS geschüttelt. Das Schütteln wurde wiederholt, bis die Lösung und Vesikelbestandteile klar blieben, als Zeichen dafür, dass keine Kalziumkörperchen und Zellen mehr isoliert wurden (nach ca. sechs-sieben Durchgängen). Die Zellsuspension der 30 µm Gaze wurde gleichmäßig auf 50 ml Greiner Röhrchen verteilt und durch Zentrifugation in einer Außenschwingrotor-Zentrifuge bei 80 g für 1 min von Kalziumkörperchen getrennt. Der Überstand wurde in neue Greiner Röhrchen überführt und erneut bei 80 g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die weitestgehend Kalziumkörperchen-freie Lösung bei 400 g für 10 min zentrifugiert und

damit die Primärzellen pelletiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, die gewonnenen Zellpellets vereint und über einen 40 µm Sieb von größeren Zellaggregaten getrennt. Zur Bestimmung der Konzentration wurde die Zellsuspension 1:100 und 1:200 in 1xPBS verdünnt und deren Absorption bei 600 nm bestimmt. Ein laborinterner Richtwert einer Absorption von 0,01 entspricht 1 Unit Zellen. Die Zellsuspension wurde zu 1000 Units/ Well in einer 6-Well Zellkulturplatte ausgesät und unter entsprechenden Bedingungen über Nacht inkubiert (2.7.3.7).

Am folgenden Tag wurden jeweils 2000 Units in einem Well vereint und für 4 h inkubiert, sodass sich kleine Zellaggregate bilden konnten. Diese wurden im Anschluss mittels 10 ml Pipette in 50 ml Greiner Röhrchen überführt und bei 80 g 3 min und einem weiteren Zentrifugationsschritt von 400 g, 2 min pelletiert. Die beiden gewonnenen Zellpellets wurden vereint und in B4/A6 Medium aufgenommen. Für RNA Interferenz Versuche wurden die Primärzellen zu je 600 U in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert (2.9.2).

#### **2.7.3.7 *In-vitro* Kultivierung von Primärzellen**

Die isolierten Primärzellen wurden in B4/A6 (1:2) konditioniertem Medium von RH<sup>-</sup> kultiviert (siehe 2.7.4). Außerdem wurden die Primärzellen stets in Zellkulturplatten unter Sauerstoffausschluss inkubiert. Dafür wurde die Zellkulturplatte sowie für die Luftfeuchtigkeit eine unverschlossene, mit sterilem Wasser gefüllte Platte, in eine Zip-verschließbare Plastiktüte gestellt. Der Kunststoffbeutel wurde mit Stickstoff gefüllt, verschlossen und bei 37°C inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich (Montag, Mittwoch, Freitag).

#### **2.7.4 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien**

Für konditioniertes Medium von Hepatozyten (RH<sup>-</sup>) wurden zwei cMEM hergestellt, wie in Spiliotis und Brehm (2009) beschrieben. Für sogenanntes A6 Medium wurden 1x10<sup>6</sup> RH<sup>-</sup> Zellen in 50 ml Medium für 6 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Für B4 Medium betrug die Startzellzahl 1x10<sup>8</sup> RH<sup>-</sup> Zellen, welche in 50 ml für 4 Tage kultiviert wurden. Das konditionierte Medium wurde jeweils anschließend sterilfiltriert und ggf. bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Für die Kultivierung von Primärzellen wurden die jeweiligen Medien wöchentlich frisch angesetzt und verwendet.

Für die Verwendung von A6 Medium zur axenischen Kultivierung von Metazestoden wurde cMEM mit „herkömmlichen FBS“ (Thermo Scientific) verwendet. Für die

Kultivierung von Primärzellen hatte sich im Labor hingegen die Verwendung von Superior FBS (Sigma Aldrich) etabliert.

Für Kultivierungsversuche von adult-ähnlichen Würmern wurden analog zum A6 Medium  $1 \times 10^6$  Caco-2 Zellen in DMEM+ 1%Pen/Strep+ 20% FBS kultiviert und bei Erreichen von ca. 80% Konfluenz gesplittet.

## **2.8 Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen von adult-ähnlichen Würmern**

Für Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden adult-ähnliche Würmer dreimal in 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Würmer in 6,25% Glutaraldehyd in Sörensen-Phosphatpuffer über Nacht bei 4°C fixiert.

Die fixierten, mehrgliedrigen Würmer wurden an die zentrale Abteilung für Mikroskopie des Biozentrum Würzburg weitergeleitet und von Claudia Gehrig und Daniela Bunsen für die Mikroskopie aufbereitet. Dort wurden die Proben zunächst fünfmal für 5 min in Sörensen-Puffer gewaschen. Daraufhin erfolgte die Entwässerung der Präparate durch Inkubation in aufsteigender Acetonreihe. So wurden die Würmer für 15 min in 30% Aceton, 20 min in 50% Aceton, 30 min in 70% Aceton, 45 min in 90% Aceton und abschließend sechsmal in 100% Aceton für je 30 min inkubiert. Die Lagerung erfolgte im Anschluss bei 4°C.

## **2.9 RNA Interferenz (RNAi)**

Die Methode der RNA-Interferenz basiert auf einem im Organismus natürlich vorliegenden Mechanismus des post-transkriptionalen Gen-Silencings. Dieser beruht auf dem Abbau von doppelsträngiger mRNA und dient neben zielgerichteter Translationskontrolle auch zum Schutz vor doppelsträngiger, viraler RNA. Diese wird vom Protein Dicer erkannt, einem Protein mit RNase III Endonuklease-Aktivität, wodurch die dsRNA in ca. 21-23 nt lange RNA-Fragmente, siRNAs, gespalten wird (Ui-Tei et al. 2004). Diese siRNA, ob endogen oder exogenen Ursprungs, werden vom Protein Argonaut erkannt und gebunden. Daraufhin wird die Reaktion der Spaltung der siRNA zu Einzelsträngen katalysiert. Infolgedessen bleibt der Leitstrang an Argonaut gebunden und der RNA-induzierte Silencing (RISC)-Komplex gebildet. Die einzelsträngige siRNA, auch als Guide-RNA bezeichnet, bindet spezifisch an eine komplementäre mRNA Zielsequenz. Dadurch wird die Endonuklease-Aktivität von Argonaut ermöglicht, die mRNA gespalten und daraufhin abgebaut (Jinek und Doudna

2009; Fire et al. 1998; Ui-Tei et al. 2004). Es resultiert ein gezielter Knockdown der Ziel-mRNA, wodurch keine Translation erfolgt (Ui-Tei et al. 2004). Dieser Mechanismus wird im Labor provoziert, indem spezifisch auf die mRNA des Zielgens synthetisierte siRNA in die Zellen eingebracht wird. Im Falle dieser Arbeit wurde siRNA durch Elektroporation in Primärzellen von *E. multilocularis* eingeschleust, um Silencing des Zielgens hervorzurufen.

### 2.9.1 siRNA Design

Die verwendete siRNA war aufgrund von Vorexperimenten bereits im Labor vorhanden (Duvoisin, Brehm, pers. Mitteilung). Das Design dieser siRNA erfolgte über ein Online-Tool und wurde anschließend manuell anhand festgelegter Kriterien ausgesucht. Dazu wurde das Online-Tool RNAi Designer von Thermo-Fisher Scientific genutzt. Die cDNA-Sequenz des Zielgens *em-bcat1*, EmuJ\_001007700, wurde eingegeben und das ORF als Zielsequenz ausgewählt. Zudem wurde angegeben, dass die siRNA über einen GC Gehalt von 35-50% verfügen sollte. Die resultierenden Ergebnisse wurden auf folgende Kriterien überprüft: geringer GC Gehalt, AU-reiche Seed-Region am 5' Ende, max. Seed-Duplex-Stabilität von 21,5 °C (Ui-Tei et al. 2004; Reynolds et al. 2004). Die siRNA der Wahl wurde auf 23 nt gekürzt. Um unspezifische Bindung der siRNA an andere Transkripte zu minimieren, wurden Homologievergleiche der gewählten Sequenz mit dem vorhergesagten Transkriptom des jeweiligen Larvenstadiums (BLAST, WormBase ParaSite) durchgeführt. Bei mehr als 14 Nukleotiden Übereinstimmung mit anderen Transkripten als dem Ziel Transkript, wurde die Sequenz verworfen. Die siRNA (5'-AACUCAACUGGUCUCAAGGAAA-3') wurde über Sigma-Aldrich ohne Überhänge und Modifikationen in entsalzter Qualität bezogen.

### 2.9.2 RNAi Protokoll

Die gewonnenen Primärzellen wurden angelehnt an das etablierte RNAi Protokoll von Spiliotis et al. (2010) isoliert, kultiviert und wie im Folgenden beschrieben, elektroporiert.

Da die Anzahl von 150 U pro Well laborintern als optimal für die Entwicklung der Primärzellen galt, wurden pro siRNA-Ansatz 600 U Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (2.7.3.6). Die Zellaggregate wurden bei 100 g, 1 min, pelletiert und der Überstand vollständig verworfen. Um zunächst die optimale Konzentration an siRNA

herauszufinden, wurden die Experimente mit zwei Konzentrationen durchgeführt. Dafür wurden pro Elektroporation 75 U Zellen in 90 µl Elektroporationspuffer inkl. 2 µl bzw. 4 µl siRNA (100 µM in Nuklease freiem Wasser) verwendet. Dieser Angaben entsprechend, wurde das Pellet 600 U Zellen, in 528 µl Elektroporationspuffer mit 12 µl bzw. 24 µl siRNA resuspendiert. Als Kontrolle wurde die siRNA *sigfp* in gleicher Konzentration verwendet. Das Gen *gfp* (*green-flourescent-protein*) codiert für ein grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea* und weist als spziesfremdes Gen keine Homologie zum Genom von *E. multilocularis* auf (Shimomura 2005; Spiliotis et al. 2010). Die Zellen wurden je Ansatz entsprechend auf sechsmal á 90 µl in einer 1 mm Küvette bei 200 V für 0.6 ms elektroporiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 37°C für 12 min im Brutschrank inkubiert und abschließend bei 400 g für 1 min zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde in B4/A6 cDMEM resuspendiert und zu je 150U /Well (4x 200 µl) einer 96-Well Platte ausgesät. Dabei dienten in der Regel drei Wells zur phänotypischen Beurteilung und ein Well zur Isolierung der mRNA für die Analyse der Genexpression des Zielgens mittels quantitativer Real-Time-PCR.

Neben der *sigfp* Kontrolle wurden außerdem eine Elektroporationskontrolle, mit entsprechendem Volumen Wasser anstelle von siRNA sowie unbehandelte, nicht elektroporierte Zellen zur optischen Kontrolle des Zellwachstums herangezogen. Die Kultivierung erfolgte unter Sauerstoffausschluss, beschrieben unter 2.7.3.7.. Am darauffolgenden Tag wurden je Well 100 µl Überstand abgenommen und durch 200 µl B4/A6 Medium ersetzt. Da die Zellen als nicht adhärente Zellschicht vorlagen, wurden diese durch Resuspension mittels 1000 µl Pipettenspitze in Zellaggregate vereinzelt. Dies war notwendig, um die Entwicklung der Zellaggregate und Vesikel beurteilen zu können. Die anschließende Kultivierung erfolgte für 14 Tage unter Sauerstoffausschluss wie beschrieben unter 2.7.3.7, wobei Montag, Mittwoch und Freitag jeweils 150 µl Medium durch frisches B4/A6 Medium ausgetauscht wurden. Für die Kontrolle der Genexpression wurden an Tag 3, Tag 7 und Tag 14 je ein Well geerntet und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (400 g, 1 min) wurde das Zellpellet in 500 µl TRIzol™ resuspendiert und 5 min inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Reaktionsgefäße invertiert und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Für die Verwendung der Zellaggregate für WMISH wurden die Zellaggregate an Tag 7 geerntet. Anschließend wurde ein EdU Pulse durchgeführt und die Zellen fixiert, beschrieben unter 2.13.14.

### 2.9.3 Bestimmung der Vesikelanzahl und Vesikeldurchmesser

Für die Charakterisierung des Phänotyps, wurden die Zellaggregate mit Vesikeln an Tag 7 fotografiert. Um die Vesikelanzahl nach *em-bcat1* RNAi statistisch zu verifizieren wurden Anzahl und Umriss der Vesikel mittels der Software Fiji manuell erfasst („Oval Selections Tool“). Für eine bessere Darstellung der Größe der Vesikel, wurde aus der so über Fiji erfassten Kreisfläche der entsprechende Durchmesser errechnet. Als Referenz wurde zunächst der Durchmesser der Wells (96-Well Platte) über die Software Fiji manuell vermessen. Es wurden je biologischem Replikat drei Wells je dreimal vermessen (in Pixel; px). Der aus diesen Vermessungen resultierende Mittelwert wurde den entsprechenden Maßen nach Herstellerangaben gleichgesetzt (in  $\mu\text{m}$ ). Über die allgemeine Formel zur Errechnung von Kreisflächen,  $A = r^2\pi$ , wurde der Radius und folgend der Durchmesser,  $d = r * 2$ , zu den jeweiligen Vesikeln errechnet.

## 2.10 Nachweis der Genexpression mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR)

### 2.10.1 RNA Isolierung

Zur Isolierung der RNA wurde der Direct-zol™ RNA Mini Prep Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden nach RNAi in TRIzol™ aufgenommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren (2.9.2). Nach Auftauen auf Eis, wurden die Proben bei 14 000 g und  $4^\circ\text{C}$  für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit gleichem Volumen an 96% Ethanol vermischt und die Lösung auf Säulen gegeben, um die Bindung der Nukleinsäuren an die Membran zu ermöglichen. Die Proben wurden für 1 min bei 12 000 g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurde zweimal mit 600  $\mu\text{l}$  RNA Waschpuffer gewaschen (12 000 g 1 min) und anschließend ein Waschschrift mit 400  $\mu\text{l}$  RNA-Pre Waschpuffer durchgeführt. Im Folgenden wurde die DNA durch Zugabe eines DNase Reaktionsgemisches verdaut. Im Reaktionsansatz enthalten waren 75  $\mu\text{l}$  „DNA Digestion mix“ und 5  $\mu\text{l}$  DNase. Dieser Ansatz wurde direkt auf die Säulen-Membran aufgetragen und für 15 min bei RT inkubiert. Der Verdau wurde durch Zentrifugation

gestoppt und die Säulen-Membran mit 400 µl Pre-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran durch Zentrifugation bei 12 000 g für 2 min getrocknet. Die RNA wurde nach einminütiger Inkubation mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert (12 000 g 1 min). Die Lagerung der RNA erfolgte in der Regel bei -80°C.

Das Protokoll wurde für die Isolierung von RNA aus adult-ähnlichen Würmern modifiziert. So wurde für einen effektiveren Aufschluss der Zellen und des Teguments, die Würmer mit oder ohne TRIzol™ in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Reaktionsgefäß gemörsert. Anschließend wurde analog zur Isolierung von RNA aus Primärzellen, wie oben beschrieben, verfahren.

#### 2.10.2 **Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch Messung von 2 µl Eluat mittels NanoDrop™. Die Reinheit der RNA wurde anhand der 260/280 nm Ratio bestimmt.

#### 2.10.3 **cDNA Synthese (RT-PCR)**

Für den Nachweis der Genexpression wurden 50 ng RNA für die cDNA Synthese eingesetzt. Die Reaktion wurde mittels SuperScript® IV Reverse-Transkriptase durchgeführt. Dafür wurde zunächst die entsprechende Menge RNA mit 4 µl 5x FirstStrand-Puffer, 1 µl dNTP's (10 mM), 1 µl Oligo-dT (CD3 RT) Primer (50 µM) ad 20 µl mit Nuklease-freiem Wasser gemischt. Die RNA-Primer Mischung wurde zum Annealing für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend für 1 min auf Eis gestellt. Zu jeder Reaktion wurde der RT-Reaktionsansatz, bestehend aus 4 µl 5x SSIV-Puffer, 1 µl DDT (100 mM), 1 µl RNase OUT™ RNase Inhibitor und 1 µl SuperScript IV Reverse Transkriptase (200U/µL) gegeben und bei 55°C für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde abschließend bei 80°C für 10 min inkubiert und damit gestoppt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 2.10.4 **Semi-quantitative Real-Time-PCR**

Die Genexpression von *em-bcat1* bzw. des Housekeeping Gens *em-elp*, wurde mittels qPCR bestimmt. Für jedes Primerpaar wurde zunächst die Effizienz über die Messung von Standardreihen bestimmt. Hierfür wurde die cDNA 1:5, 1:25, 1:125 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Für die Messung wurden pro Probe je 0,72 µl der entsprechenden Primer mit 2,4 µl SYBR Mix, 6,96 µl Nuklease-freiem Wasser und 1,4 µl cDNA gemischt und 10 µl des Reaktionsgemischs in ein Well einer 96-Well

Platte pipettiert. Jede Verdünnungsstufe wurde in Triplikaten gemessen. Die PCR Reaktion erfolgte nach folgendem Temperatur Protokoll: 95°C für 10 min und anschließenden 40 Zyklen von 95°C für 15 s, 60°C für 20 Sekunden und 72°C für 20 Sekunden. Zur Ermittlung der Schmelztemperatur folgten 95°C für 15 s, 60°C für 1 min und daraufhin eine kontinuierliche Erhöhung der Temperatur in 0,3°C-Schritten für 15 s bis auf 95°C. Die Messung der Emission des SYBR-Green erfolgte stets nach der Elongation sowie während der kontinuierlichen Erhöhung der Temperatur zum Erstellen der Schmelzkurve. Die Effizienzen lagen mit 106% für *em-bcat1* Primer bzw. 105% für *em-elp* im optimalen Rahmen (siehe A.4). Anhand dieser Ergebnisse konnten die Effizienzen für die Errechnung des delta-delta-Ct Wertes als 100% angenommen werden. Die Spezifität der Primer war ebenfalls gegeben, da je Primerpaar nur ein spezifisches DNA-Fragment amplifiziert wurde (siehe A.5).

Die Messung der Proben von Tag 3, 7 und 14 der RNAi Experimente erfolgte mit bereits genanntem Temperaturprogramm. Die cDNA der RNAi Experimente und korrespondierenden Kontrolle wurde je 1:5 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt eingesetzt und je in Triplikaten gemessen.

Für die semi-quantitative Auswertung der Genexpression wurden die CT Werte von *em-bcat1* zunächst zu denen des Referenz-Gens *em-elp* normalisiert. *Em-elp* stellt als konstitutiv exprimiertes Gen in *E. multilocularis* ein Housekeeping Gen dar (Espínola et al. 2014; Brehm et al. 2003). Durch Ermittlung der delta-delta-Ct Werte wurde anschließend die semi-quantitative Genexpression von *em-bcat1* nach *em-bcat1* bzw. *gfp* RNAi bestimmt und über GraphPad PRISM statistisch ausgewertet (Livak und Schmittgen 2001).

## 2.11 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde GraphPad Prism verwendet. Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurde stets der nicht parametrische Mann-Whitney-Test herangezogen. Als signifikant wurden Werte  $p \leq 0,05$  angenommen.

## 2.12 Alkalische Phosphatase Histochemie

Der Aktivitätsnachweis von alkalischer Phosphatase in Kryoschnitten von Primärzellkulturen (RNAi), wurde nach dem Protokoll von Cox und Singer 1999 durchgeführt. Für die Dünnschnitte wurden 7 Tage alte Primärzellaggregate nach RNAi (*em-bcat1* bzw. *gfp*) in 4% PFA (PBS) über Nacht fixiert. Anschließend wurden



die Zellen in Tissue Tek® eingebettet, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Kryoschnitte wurden mit 10 µm Dicke angefertigt und für 3 h bei RT getrocknet. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für den Nachweis von alkalischer Phosphatase Aktivität im Tegument der Primärzellen wurden die Dünnschnitte bei RT für 30 min aufgetaut und mit 4% PFA in PBS fixiert. Anschließend wurden die Objektträger fünfmal für 3 min mit 1x PBS gewaschen und dann für 5 min in ALP-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl/ml NBT/BCIP Substrat in ALP-Puffer gestartet. Nach 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 mM EDTA in PBS gestoppt. Die Dünnschnitte wurden bei RT getrocknet und mit Entellan® eingedeckt. Die Auswertung erfolgte durch lichtmikroskopische Beurteilung der Farbtintensität.

### **2.13 Whole-mount-in-situ-Hybridisierung (WMISH)**

Durch Whole-mount-in-situ-Hybridisierung (WMISH) wird eine Lokalisierung der Genexpression von Zielgenen durch den Einsatz von Fluorophor markierten RNA-Sonden nachgewiesen. Das Protokoll, beschrieben in Koziol et al. (2014), ermöglicht die Analyse in whole-mounts, also größeren Gewebeteilen, im Fall dieser Arbeit an Larven von *E. multilocularis*. Die RNA-Sonden wurden für die entsprechenden Zielgene selbst im Labor hergestellt, wie im Folgenden beschrieben.

Die cDNA-Sequenzen aller in dieser Arbeit analysierten Gene sind unter A.2 zu finden.

#### **2.13.1 Bioinformatische Analysen zur Herstellung von RNA Sonden und Primerdesign**

Die Identifikation von potentiellen Homologen in *E. multilocularis* zu Genen von Interesse erfolgte mittels BLASTP Analyse (WormBase ParaSite). Hierzu wurde vorzugsweise das entsprechende Protein in eng verwandten Planarien zur BLASTP Analyse gegen das vorhergesagte Proteom von *E. multilocularis* herangezogen. Anschließend erfolgte eine reziproke BLASTP Analyse und Proteindomänenanalyse (mittels SMART und/oder PROSITE), um die Homologie zu bestätigen und das entsprechende Protein auf charakteristische Merkmale zu untersuchen.

Eine RNA-Sonde war in der Regel zwischen 400-1800 nt lang. Die tatsächliche Länge war abhängig von der Länge des jeweiligen Gens und den für Primerdesign

geeigneten cDNA-Sequenzen. Das Primer-Design erfolgte manuell, indem die cDNA auf Sequenzabschnitte von ca. 18-25 nt untersucht wurde, welche den festgesetzten Kriterien zum Primer-Design entsprachen. Diese umfassten folgende Parameter: 18-25 nt Länge, 45-55% G/C Gehalt, ca. 60°C Schmelztemperatur, nicht mehr als drei gleiche Nukleotide in Folge, möglichst G/C reich am 5' Ende, innerhalb der letzten 5 nt am 3'-Ende möglichst nicht mehr als drei G/C und die Schmelztemperatur der forward und reverse Primer sollte sich nicht mehr als um 1-2 °C unterscheiden. Die Kriterien wurden unter Verwendung des Oligoevaluators (<http://www.oligoevaluator.com/OligoCalcServlet>) und Oligoanalyzers (<https://sg.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) überprüft und entsprechend angepasst. Im Falle von begrenzten Alternativen, wurden die genannten Regeln entsprechend gelockert.

Zum Schluss wurde die Spezifität der Primer für das Zielgen über BLAST gegen die cDNA Datenbank über WormBase ParaSite überprüft. Die resultierenden Primer wurden über Sigma-Aldrich in entsalzter Qualität, lyophilisiert bezogen (2.6).

### 2.13.2 **Amplifikation der geeigneten cDNA Sequenzen mittels PCR**

Für die Amplifikation der DNA-Sequenzen zur Herstellung der RNA-Sonden wurde die PCR mit der proofreading Polymerase, KOD-Polymerase (Sigma-Aldrich), durchgeführt.

Der PCR Ansatz erfolgte nach Herstellerangaben und setzte sich wie folgt zusammen:

5 µl 10x KOD Reaktionspuffer

5 µl dNTP's

3 µl MgSO<sub>4</sub>

1,5 µl Primer forward (10 µm)

1,5 µl Primer reverse (10 µm)

1 µl KOD-Polymerase

10-20 ng Template DNA

Ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Die PCR wurde im Thermocycler anhand des folgenden Programms durchgeführt:

95°C 2 min 00 s

95°C 0 min 20 s

58°C 0 min 20 s/1000 bp

70°C 0 min 20 s

} x35 Zyklen

70 °C 5 min 0 s

4°C

### 2.13.3 Analyse der PCR Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Ermittlung der DNA-Fragmentlängen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurden 5 µl des PCR-Produktes, mit 1 µl 6x DNA-Probenpuffer versetzt und auf einem, je nach erwarteter Fragmentgröße, 1-2%igen Agarosegel in 1xTAE-Puffer mit Midori-Green (0,05 µl/ml) aufgetragen und bei 150 V aufgetrennt. Für die Bestimmung der Fragmentgröße wurden 5 µl SmartLadder, als Marker mit DNA-Fragmenten bekannter Größe, mitgeführt. Die Detektion der DNA erfolgte bei 312 nm mittels INTAS Geldokumentationssystem.

### 2.13.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Agarosegel bzw. PCR-Ansatz erfolgte mittels NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in 10 mM TRIS, pH 7,5, eluiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.13.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurden 2 µl DNA mittels NanoDrop™ bei 260 nm gemessen und die Reinheit mittels 260/280 Ratio bestimmt.

### 2.13.6 Klonierung in den Vektor pJET1.2

Die Klonierung der DNA-Fragmente zur Herstellung von RNA-Sonden erfolgte standardmäßig in den Vektor pJET1.2. Hierfür wurde das CloneJET™ PCR-Klonierungskit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei die eingesetzte DNA-Konzentration entsprechend der Fragmentlänge angepasst wurde.

Zur Synthese der RNA-Sonden wurden zunächst die Gene von Interesse per PCR amplifiziert und in pJET1.2 Vektor kloniert. Hierfür wurden je nach Länge des Konstrukts 20-60 ng DNA verwendet.

Der Ligations-Ansatz wurde entsprechend der Hersteller Empfehlung hergestellt:

5 µl Reaktionspuffer

0,5 µl pJET1.2

0,5 µl T4 Ligase

3 µl Wasser

1 µl DNA (der entsprechenden Vorverdünnung)

### 2.13.7 Transformation in *E. coli*

Nach Ligation in den Vektor pJET1.2 (siehe 2.13.6) wurden 5 µl des 10 µl Ligations-Ansatzes zu 50 µl Kalzium-kompetenten *E. coli* TOP10 gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die *E. coli* durch Hitzeschock bei 42°C für 45 s transformiert und für 5 min auf Eis gestellt. Die Bakteriensuspension wurde zur Selektion auf vorgewärmte LB+Carbenicillin (100 µg/ml) Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.13.8 Kolonie PCR

Die erfolgreiche Klonierung der DNA-Fragmente in den Vektor pJET1.2 wurde durch eine Kolonie-PCR nachgeprüft. Hierfür wurden Kolonien gepickt und in je 30 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Der PCR-Ansatz setzte sich zusammen aus:

2 µl 5x GoGreen Taq Puffer

0,1 µl 20 mM dNTPs

0,1 µl pJET1.2 forward (50 µM)

0,1 µl pJET1.2 reverse (50 µM)

0,1 µl Taq Polymerase

2 µl Klonwasser

Ad 10 µl dH<sub>2</sub>O

Die PCR wurde nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

94°C 3 min 00 s

94°C 0 min 20 s

58°C 0 min 20 s

72°C 0 min 20 s/1000 bp

} ×30 Zyklen

72°C, 3 min 0 s

4°C

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt, wie unter 2.13.3 beschrieben, per Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Von positiven Klonen wurde eine Übernachtskultur angesetzt. Dafür wurden 10 µl Klonwasser in 3 ml LB+Carbenicillin (100 µg/ml) überimpft und bei 37°C, 125 rpm, inkubiert.

#### 2.13.9 Plasmid-Minipräparation aus transformierten *E. coli*

Die Isolierung der Plasmide erfolgte mittels NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aus 2 ml Übernachtskultur. Die DNA wurde in 30 µl 5 mM TRIS-HCl, pH 8,5, eluiert und bei -20 °C gelagert.

#### 2.13.10 DNA-Sequenzierung

Neben der unter 2.13.9 gewonnenen Plasmid-DNA, wurde teilweise auch zur Zeitersparung direkt das PCR-Produkt, hervorgehend aus der Kolonie-PCR verwendet. Hierfür wurden ca. 200 ng PCR Produkt, mittels Exo-CIP™ Rapid PCR Cleanup Kit (New England Biolabs) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA-Konzentration des PCR-Produktes ließ sich nach Agarose-Gelelektrophorese durch Abgleich der Bandenintensität des SL-Markers ableiten. Für die Sequenzierung wurden 5 µl des Eluats (ca.100 ng DNA) mit 5 µl entsprechendem pJET 1.2 forward- bzw. reverse Primer (10 µM) vermischt.

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 400 ng DNA in 5 µl H<sub>2</sub>O mit 5 µl Primer (pJET1.2 forward oder reverse;10 µM) verwendet.

Die resultierenden Sequenzen wurden durch Alignment mit der korrespondierenden cDNA Gensequenz in der Software BioEdit analysiert.

### 2.13.11 In-vitro-Transkription

Für die *in-vitro* Transkription zur Herstellung der RNA-Sonden wurde zunächst mittels PCR anhand der Plasmid-DNA als Template, jeweils ein T7-Promotor an das 5' Ende bzw. ein SP6-Promotor an das 3'-Ende des Inserts amplifiziert.

Hierfür wurden entsprechend modifizierte Primer des pJET1.2 Vektors für die PCR Reaktion verwendet:

5 µl 10x KOD Reaktionspuffer

5 µl dNTP's

3 µl MgSO<sub>4</sub>

1,5 µl pJET 1.2 T7 Plus2 forward (10 µm)

1,5 µl pJET 1.2 SP6 reverse (10 µm)

1 µl KOD-Polymerase

10-20 ng Plasmid-DNA

Ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Die PCR wurde im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

95°C 2 min 00 s

95°C 0 min 20 s

58°C 0 min 20 s/1000 bp } ×35 Zyklen

70°C 0 min 20 s

70 °C 5 min 0 s

4°C

Das PCR-Produkt wurde per Agarose-Gelelektrophorese, beschrieben unter 2.13.3, analysiert, die DNA aufgereinigt (siehe 2.13.4) und die Konzentration bestimmt (2.13.5). Für die *in-vitro*-Transkriptionen wurden je 1 µg der mit T7 und SP6-Promotor

flankierten DNA-Sequenz benötigt. Das Reaktionsgemisch wurde für jede RNA-Sonde je mit T7- bzw. SP6-Polymerase hergestellt um somit eine antisense Sonde und eine sense Sonde, welche zur Kontrolle der spezifischen Bindung diente, zu erhalten. Die Transkription erfolgte zudem unter Zugabe eines mit Digoxigenin-markierten Uracil-Analogons. Durch den spezifischen Nachweis von Digoxigenin resultierte der Nachweis der RNA-Sonde (2.13.15).

Für den Reaktionsansatz der *in-vitro*-Transkription wurden verwendet:

2 µl 10x RNA Polymerase Reaktionspuffer

2 µl RNA Labeling Mix (10x DIG-RNA Labeling mix)

2 µl 10x BSA

2 µl T7-RNA Polymerase oder SP6-RNA Polymerase

0,5 µl RNase OUT™ (400 U/µl)

1 µg DNA

ad 20 µl nuclease freies H<sub>2</sub>O

Die Reaktion erfolgte durch Inkubation bei 37°C für 2 Stunden. Verbliebende DNA wurde durch Hinzufügen von 1 µl RQ1 RNase-freier DNase und Inkubation bei 37°C, 15 min verdaut. Die Reaktion wurde gestoppt, indem der Ansatz entweder bei -20°C eingefroren wurde oder direkt mit der RNA-Aufreinigung fortgefahren wurde.

#### 2.13.12 RNA-Aufreinigung

Die RNA-Aufreinigung erfolgte mittels PureLink™ RNA Mini-Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 30 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert und bei -20 bis -80°C gelagert.

Die Qualität und Konzentration der RNA wurde über Agarose-Gelelektrophorese und Dot Blot durchgeführt. Für die Gelelektrophorese wurden 3 µl der RNA mit 6x RNA Probenpuffer versetzt und analog zur DNA-Gelelektrophorese, beschrieben unter 2.13.3, durchgeführt. Für die Agarose-Gelelektrophorese von RNA wurde die Elektrophoresekammer stets frisch aufbereitet und frisch angesetzter 1xTAE Laufpuffer verwendet.

### 2.13.13 **Dot Blot**

Zur Überprüfung der Konzentration an RNA wurde ein Dot Blot durchgeführt. Zur Kontrolle wurden 1 µg DIG-gelabelte-RNA verwendet und mit dem Signal der T7- bzw. SP6-Polymerase transkribierten RNA-Produkte (sense bzw. antisense RNA-Sonden) verglichen. Hierzu wurden für die sense und antisense Sonden jeweils Verdünnungsreihen angesetzt und die RNAs entsprechend 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 in Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Auf eine Nylonmembran wurden 2 µl der jeweiligen Verdünnungen aufgetragen und für 1 h bei 60°C getrocknet. Der Crosslink erfolgte bei 1 min mittels UV-Licht. Die Membran wurde in B1 Puffer für 5 min bei 125 rpm, RT, für 5 min gewaschen und anschließend für 20 min in B2 Puffer geblockt (125 rpm, RT). Die RNA wurde mittel Anti-DIG-Antikörper, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase markiert (1:2000 in B1-Puffer). Es folgte ein Waschschrift für 10 min in B1-Puffer und ein 1-minütiger Waschschrift in B3-Puffer. Das Entwickeln des Dot Blots erfolgte unter Zugabe von NBT-BCIP-Substrat (1:50 in B3-Puffer). Der Blot wurde dafür dunkel gestellt und die Farbreaktion alle 5 min kontrolliert. Die Reaktion wurde durch Waschen mit entionisiertem Wasser gestoppt und die Membran anschließend bei RT getrocknet.

### 2.13.14 **EdU Labeling und Fixierung von *E. multilocularis* Metazestoden-Vesikel, Protoskolizes und Primärzellen für WMISH**

Für den Nachweis von proliferierenden germinativen Zellen wurden Metazestoden-Vesikel, Protoskolizes und Primärzellen vor der Fixierung für WMISH unter Zugabe von 50 µM des Thymidin-Analogons EdU in entsprechendem Medium für 5 h inkubiert. Auf diese Weise wurde EdU in die DNA jener Zellen integriert, welche innerhalb der 5 h die S-Phase der Mitose durchliefen. Da bekannt ist, dass germinativen Zellen die einzigen proliferierenden Zellen in *E. multilocularis* sind, konnten auf diese Weise spezifisch proliferierende germinativen Zellen nachgewiesen werden (Koziol et al. 2014). Nach 5 h Inkubationszeit, wurden die Larven bzw. Primärzellen mit 1x PBS (bzw. im Falle für WMISH mit 1x PBS -DEPC) gewaschen, um Medium und ggf. Hepatozyten Rückstände zu entfernen. Metazestoden-Vesikel wurden vor Fixierung in eine Petrischale mit 1x PBS (DEPC) überführt und unter dem Binokular mittels Pinzette geöffnet. Anschließend wurden die Larven bzw. Primärzellen in 4% PFA in PBS (DEPC) über Nacht fixiert. Das PFA wurde am Folgetag durch Methanol ersetzt und



für 10 min bei 125 rpm inkubiert. Das Methanol wurde anschließend erneuert und die Larven bzw. Primärzellen darin bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 2.13.15 **WMISH Durchführung**

Die WMISH wurde nach dem Protokoll von Koziol et al. (2014) durchgeführt. Zunächst wurden die in Methanol aufbewahrten Larven (2.13.14) bzw. Primärzellen nach RNAi für 10 min in Ethanol inkubiert. Anschließend erfolgte die Rehydrierung der Larven in 10-minütigen Inkubationsschritten mit absteigender Alkoholreihe in 75% Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O und 50% Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O (125 rpm). Daraufhin wurde fünfmal für 5 min in PBS-DEPC gewaschen, ebenfalls auf einem Schüttler bei 125 rpm. Die Permeabilisierung erfolgte durch Inkubation in 15 µg/ml Proteinase K in PBS-DEPC für 10 min bei Primärzellen und Metazestoden-Vesikeln bzw. 15 min bei Protoskolizes und 20 min bei adult-ähnlichen Würmern. Im Anschluss wurde zweimal mit 5 ml 0,1 M TEA gewaschen und zum zweiten Waschschriff 7,5 µl Acetanhydrid hinzugefügt. Die Lösung wurde durch Invertieren gemischt und unter gelegentlichem weiteren Invertieren 5 min inkubiert. Es erfolgte eine weitere Zugabe von 7,5 µl Acetanhydrid und Inkubation für 5 min. Der Puffer wurde durch 1xPBS-DEPC ersetzt und dreimal für 5 min mit 1xPBS-DEPC gewaschen (125 rpm). Die Proben wurden in 4% PFA in PBS-DEPC für 20 min refixiert (125 rpm). Durch wiederholtes Waschen in 1xPBS-DEPC (fünfmal 5 min) wurde das Paraformaldehyd entfernt. Anschließend wurde das PBS-DEPC 1:4 mit Hybridisierungspuffer angereichert und die Larven bzw. Primärzellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Lösung wurde vollständig durch Hybridisierungspuffer ersetzt und die Proben für 10 min bei 60°C in den Heizblock gestellt (125 rpm). Der Hybridisierungspuffer wurde erneuert und die Prä-Hybridisierung erfolgte bei 60°C für mindestens 6 h. Für RNA-Sonden wurden ca. 250 ng RNA für 3 min bei 80°C denaturiert und anschließend für 3 min auf Eis gestellt. Die RNA wurde ad 500 µl mit temperiertem Hybridisierungspuffer (60°C) verdünnt und zur jeweiligen Probe gegeben. Zudem wurde für jede Sonde eine entsprechende sense Probe als Kontrolle mitgeführt. Die sense Sonde kann nicht an die Ziel-mRNA binden und resultierende Signale geben somit Aufschluss auf unspezifische Bindungen oder Autofluoreszenz. Die Hybridisierung der RNA-Sonden erfolgte über Nacht. Für Sonden mit einer Größe ab 1000 bp betrug die Hybridisierungstemperatur 57°C, für kürzere Sonden wurden 54°C zur Hybridisierung verwendet. Am Folgetag wurde die RNA-Sonde vollständig abgenommen und für weitere Experimente bei -

80°C gelagert. Die Proben wurden zweimal für 10 min mit Hybridisierungspuffer bei entsprechender Hybridisierungstemperatur gewaschen. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit vortemperiertem 0,2x SSC für je 20 min sowie weitere drei Waschschriffe mit 2x SSC für 30 min, jeweils im Heizblock unter Schütteln. Abschließend wurde einmal für 3 min mit MAB-T bei RT unter schütteln gewaschen und anschließend der Waschschriff mit MAB-T für 10 min wiederholt. Es folgte die Inkubation mit Blockpuffer, um für die nachfolgende Antikörperbehandlung die freien Bindungsstellen zu blockieren. Hierfür wurde der Blockpuffer aus MAB-Puffer+ 1% Blockreagenz und 5% Schafserum bei 60°C im Wasserbad für 30 min hitzeinaktiviert und auf Eis abgekühlt. Das Blocken erfolgte für 2 h bei RT, 125 rpm. Anschließend wurden die in der RNA-Sonde integrierten Uracil Analoga durch einen gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper markiert, woran eine Peroxidase gekoppelt war (Anti-DIG-POD, 1:50 in MAB-T+1% Blockreagenz). Die Antikörper Bindung erfolgte über Nacht bei 4°C 125 rpm.

Am nächsten Tag erfolgten zunächst drei Waschschriffe mit MAB-T-Puffer für 5 min. Anschließend wurde dreimal für 45 min mit MAB-T gewaschen. Weiterhin wurden die Proben mit 1xPBS+ 0,1 Imidazol für 3 min und 10 min gewaschen. Die Fluoreszenzmarkierung der Sonden erfolgte bei 10-minütiger Inkubation mit Fluorescein Tyramid (1:100 in 0,001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS+ 0,1% Imidazol). Abschließend wurde großzügig in 5 min Schritten mit 1x PBS-DEPC gewaschen bevor die EdU Detektion zum Nachweis von proliferierenden germinativen Zellen, erfolgten konnte (2.13.16).

Die mikroskopische Analyse der Signale für antisense, als auch sense-Sonden, erfolgte mittels konfokaler Mikroskope. Hier standen ein Leica TCS SP5 und ein Nikon Eclipse Ti2 zur Verfügung, wobei das Nikon nur für 3D Projektionen verwendet wurde. Hierfür wurden Protoskolizes mit PBS in 8-Wel µ-Slides (ibidi) überführt und Z-Stapel Aufnahmen im Abstand von 0,1 µm aufgenommen. Für die Aufnahmen am SP5 wurden Z-Stapel mit 2 µm Abstand aufgenommen.

Es kam außerdem vor, dass auch von sense-Sonden ein FITC-Signal detektiert werden konnte. Dies kann insbesondere bei Vorhandensein von antisense-Transkripten vorkommen (K. Brehm, persönliche Mitteilung). Nach Überprüfung lagen laut Transkriptomdaten und Analyse über die Software IGV, keine antisense-Transkripte für die in dieser Arbeit untersuchten Gene vor und das Signal konnte auf

unspezifische Bindung zurückgeführt werden. Die Farbbalance wurde entsprechend im antisense Bild mittels der Software Fiji angepasst, um unspezifische Signale ausschließen zu können.

Aufgrund von unspezifischen Hintergrundsignalen der sense Sonde wurden für die WMISH zu *em-muc1*, *em-fst*, *em-ndk*, *em-robo1* und *em-npp36* die Farbbalance des grünen Kanals (FITC) vom Minimum 0 auf 50 in Fotos von sense und antisense Sonden korrigiert. Für die WMISH zu *em-wnt1*, *em-wnt11b*, *em-fz10* und *em-fst* konnte durch Korrektur der Farbbalance des grünen Kanals von Minimum 0 auf 30 unspezifische Signale ausgeschlossen werden (Beispiel siehe Anhang A.15). Hierbei war für *em-wnt11b* der Fall, dass die sense Sonde mit Gain 30 fotografiert wurde, die WMISH der antisense Sonde dagegen mit Gain 20. Da bei der *em-wnt11b* sense Sonde leichte Hintergrundsignale auftraten wurde zur Sicherheit das Minimum des FITC Signals von auf 30 korrigiert. Da die sense Sonde von *em-robo2* ein starkes unspezifisches Signal hervorbrachte, wurde die Farbbalance des grünen Kanals auf ein Minimum von 80 in WMISH der antisense RNA-Sonde geändert.

#### 2.13.16 EdU Detektion

Die EdU Detektion erfolgte mittels Click-iT™ EdU Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Anleitung des Herstellers. Dafür wurden die Larven, zunächst über eine absteigende Alkoholreihe in PBS überführt und anschließend 2x 10 min in 3% BSA in PBS bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde zweimal für 20 min in PBS+0,1% Triton-X 100 die Larven permeabilisiert. Im Anschluss wurde für 10 min in 3% BSA in PBS gewaschen. Die Azid-Alkin-Cycloaddition erfolgte nach Zugabe des Reaktionsgemisch für 1 h im Dunkeln bei 125 rpm. Im Anschluss wurde einmal für 10 min mit 3% BSA in PBS gewaschen und dann die Zellkerne unter Verwendung von DAPI (1 µg/ml in 1xPBS; 10 min) angefärbt. Abschließend wurde fünfmal mit 1x PBS gewaschen und bei 4°C bis zur Mikroskopie gelagert. Die Präparate wurden auf Objektträgern unter Verwendung von Fluoroshield™ eingedeckt und mit handelsüblichem Nagellack versiegelt.

Die Auszählung der EdU<sup>+</sup> Zellen erfolgte manuell in der Software Fiji unter Zuhilfenahme des „Multi-count“-Tools. Da die Zellaggregate stets unterschiedlich groß waren, wurden die EdU<sup>+</sup> Zellen ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl, repräsentiert durch die Anzahl an DAPI-positiven Zellen, gesetzt.

### 2.13.17 **Flourescein-Tyramid-Synthese**

Die Herstellung von FITC-Tyramid, für die Verwendung im WMISH-Protokoll, erfolgte nach dem Protokoll von Hopman et al. 1998 (Kozioł 2014). Für die Synthese wurden zunächst zwei Lösungen hergestellt. Für Lösung 1 wurden 100 mg Flourescein-NHS in 10 ml DMFA gelöst und für Lösung 2 50 mg Tyramin in 5 ml DMFA+ 1% Triethylamin gegeben. Die Reaktion erfolgte durch das Mischen von je 1,37 ml Lösung 2 (in DMFA/Triethylamin) mit 2 ml Lösung 1 und anschließender zweistündiger Inkubation im Dunkeln. Abschließend wurde je Reaktionsansatz 4,6 ml Ethanol (100%) hinzugegeben und gemischt. Die erfolgreiche Synthese konnte durch Farbumschlag von orange in FITC-typisches, leuchtend-grün, nach Zugabe von wenigen Mikrolitern in 1xPBS kontrolliert werden. Das FITC-Tyramid wurde bei -20°C aufbewahrt.

### 2.13.18 **Aufreinigung von Torula-RNA**

Zur Isolierung und Aufreinigung von Torula RNA wurden 500 mg in 50 ml DEPC Wasser durch Inkubation bei 60°C für 3 h gelöst. Die Lösung wurde zu 10 ml in 50 ml Falcons aufgeteilt und gleichem Volumen an Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und für 30 s gevortext. Nach Zentrifugation für 10 min bei 10 000 g 4°C wurde die aquatische Phase in ein neues Falcon überführt und mit gleichem Volumen Chloroform durch vortexen vermischt. Es folgte ein die Zentrifugation bei 10 000g und 4°C für 20 min. Erneut wurde die aquatische Phase überführt und die RNA durch Zugabe des 2,5-fachen Volumen Ethanol (100%) und 0,1-fachem Volumen an Natriumacetat (3 M in DEPC-Wasser) und Invertieren gefällt. Die gefällte RNA wurde durch Zentrifugation für 20 min bei 10 000 g 4°C pelletiert und anschließend zweimal mit 25 ml 75% Ethanol gewaschen (20 min 10 000 g, 4°C). Der Überstand wurde vollständig verworfen und das Pellet bei 42°C getrocknet. Die RNA wurde in DEPC-Wasser resuspendiert und zu ca. 200 ng/ml gelöst. Bis zur weiteren Verwendung (zur Herstellung von Hybridierungspuffer) wurde die Torula-RNA bei -20°C gelagert.

### 3 Ergebnisse

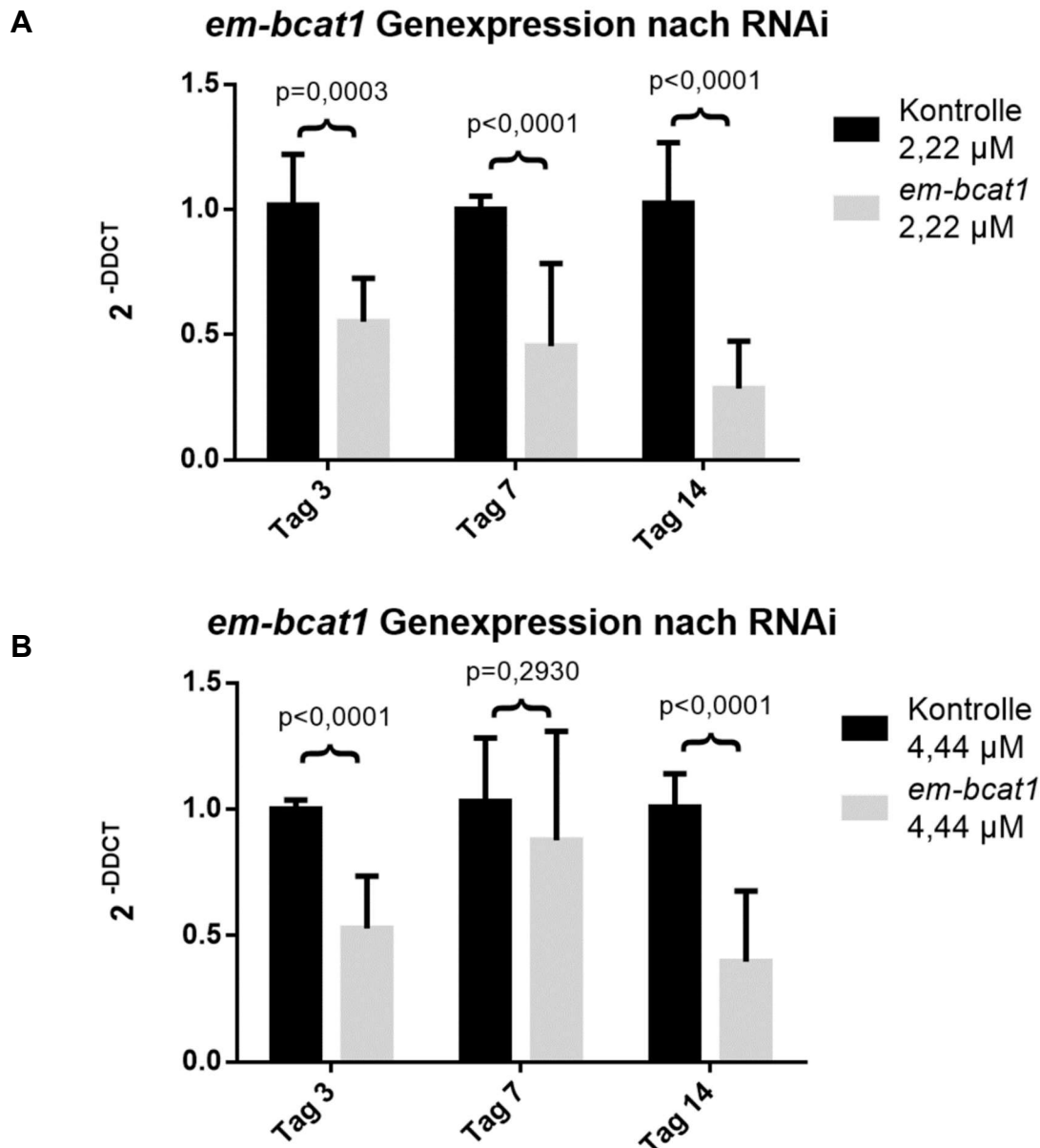
#### 3.1 Charakterisierung des *em-bcat1* (RNAi)-Phänotyps in Primärzellen

##### 3.1.1 Effizienz und statistische Verifikation des angewandten RNAi-Protokolls

###### 3.1.1.1 Verifizierung des *em-bcat1* Knockdown durch qPCR

Aus vorgehend generierten Transkriptomdaten, welche auf Primärzellkulturen an Tag 7 nach *em-bcat1* RNAi (2,22  $\mu$ M siRNA) basierten, war bereits ein signifikanter Knockdown des Zielgens von *em-bcat1* um 65% (FC=0,35;  $p < 0,05$ ) zur Kontrolle zu entnehmen (Anhang A.3). In der vorliegenden Arbeit wurde der *em-bcat1* Phänotyp weiter statistisch verifiziert, charakterisiert und zudem das RNAi Protokoll auf Effizienz und Reproduzierbarkeit überprüft. Dafür wurden zwei Konzentrationen an siRNA in den Experimenten eingesetzt, 2,22  $\mu$ M und 4,44  $\mu$ M. Der Knockdown der mRNA des Zielgens *em-bcat1* wurde mittels qPCR in den Primärzellkulturen an Tag 3, 7 und 14 nach Elektroporation überprüft.

Die Spezifität und Effektivität der Primer zum Nachweis der Gene *em-bcat1* und *em-elp*, wurden über Standardreihen überprüft (Anhang A.4 und A.5). Zur semi-quantitativen Bestimmung der Genexpression von *em-bcat1* wurden die aus der qPCR resultierenden CT-Werte mit denen des Housekeeping Gens *em-elp* ins Verhältnis gesetzt. Die ermittelten delta-delta-CT-Werte im Vergleich zur *gfp* (RNAi) Kontrolle sind in Abbildung 9 dargestellt. Der Einsatz von 2,22  $\mu$ M siRNA resultierte in einer kontinuierlich verringerten Genexpression von *em-bcat1* an Tag 3 um durchschnittlich 45%, an Tag 7 um 55% und 72% an Tag 14. In RNAi Experimenten mit 4,44  $\mu$ M siRNA war *em-bcat1* an Tag 3 um 47%, an Tag 7 um 12% und an Tag 14 um 60% im Vergleich zur Kontrolle verringert exprimiert. Durchgehend statistisch signifikant ( $p \leq 0,003$ ) war der Knockdown nur für die siRNA-Konzentration von 2,22  $\mu$ M, welche anhand dieser Ergebnisse für alle weiteren RNAi-Experimente zur Charakterisierung des Phäno- und Genotyps eingesetzt wurde. Um die Vergleichbarkeit zu den vorgehend generierten Transkriptomdaten zu gewährleisten, wurden für WMISH Analysen die Primärzellkulturen an Tag 7 nach Elektroporation fixiert.

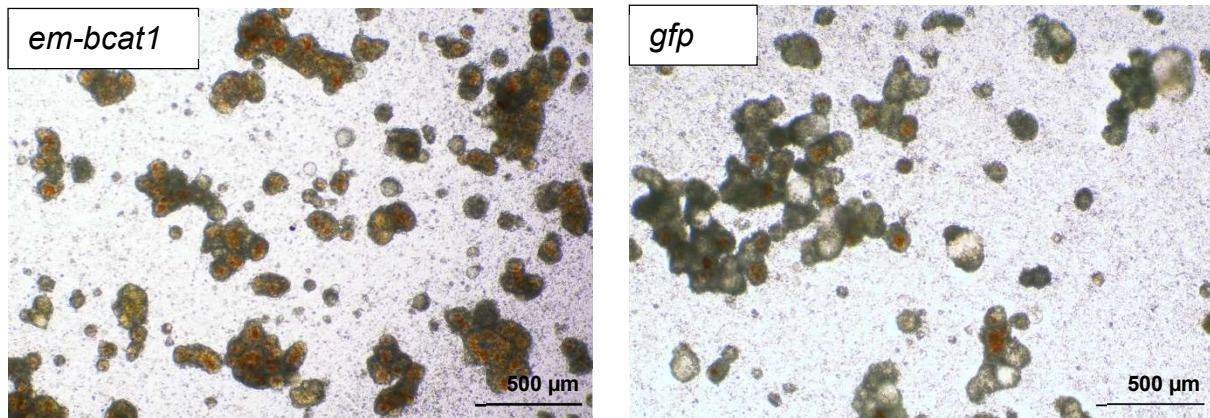


**Abbildung 9: Semi-quantitativer Nachweis (qPCR) der *em-bcat1* Genexpression nach *em-bcat1* Knockdown (RNAi) in *E. multilocularis* Primärzellen.**

Genexpression des Zielgens *em-bcat1* in Primärzellen nach RNAi an Tag 3, 7 und 14 nach Elektroporation. **A** zeigt die Genexpression nach Einsatz von 2,22  $\mu\text{M}$  siRNA und **B** mit 4,44  $\mu\text{M}$  siRNA. Als Kontrolle diente eine siRNA gegen das spezie fremde Gen *gfp*. Für die siRNA Konzentration 2,22  $\mu\text{M}$  (**A**) zeigte sich an allen gemessenen Tagen (3, 7, 14) ein signifikanter Knockdown der Genexpression von *em-bcat1* im Vergleich zur Kontrolle (*gfp*). Dabei wurde die Genexpression von *em-bcat1* Tag 3 ( $p=0,0003$ ) über Tag 7 ( $p<0,0001$ ) bis Tag 14 ( $p<0,0001$ ) zunehmend geringer, der stärkste Knockdown der *em-bcat1* Genexpression erfolgte an Tag 14. Der Einsatz von 4,44  $\mu\text{M}$  siRNA (**B**) bewirkte eine signifikant verringerte Expression von *em-bcat1* an Tag 3 und Tag 14 nach Elektroporation (je  $p<0,0001$ ). An Tag 7 nach RNAi war der Knockdown nicht signifikant ( $p=0,2930$ ). Die Daten repräsentieren drei RNAi Experimente, entsprechend drei biologischer Replikate. Analyse über GraphPad Prism; Mann-Whitney-Test.

### 3.1.2 *em-bcat1* Knockdown zeigt spezifischen Phänotyp mit verminderter Vesikel-Bildung

In Primärzellkulturen nach RNAi (*em-bcat1*) war die Rotfärbung von Kavitäten besonders ausgeprägt und charakterisiert diesen als ‚red-dot‘-Phänotyp (Abbildung 10). Zudem konnte eine signifikant geringere Anzahl an Vesikeln nach *em-bcat1* RNAi beobachtet werden.



**Abbildung 10: Phänotyp von *E. multilocularis* Primärzellen nach *em-bcat1* Knockdown (RNAi).**

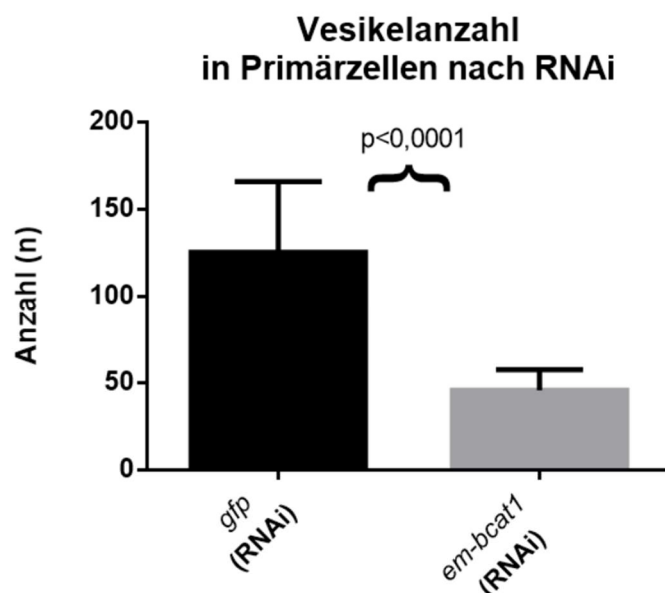
Charakteristischer ‚red-dot‘-Phänotyp in Primärzellen an Tag 7 nach *em-bcat1* RNAi. Abgebildet sind je repräsentative Primärzellaggregate nach *em-bcat1* RNAi bzw. *gfp* RNAi, als Kontrolle. Neben den roten Kavitäten ist eine geringere Anzahl an Vesikeln charakteristisch für den Phänotyp.

Um die Beobachtung der Entwicklung einer geringeren Vesikelanzahl nach *em-bcat1* Knockdown statistisch zu verifizieren wurden Anzahl und Umriss der Vesikel erfasst. Vesikel wurden als solche gezählt, wenn sich diese bereits deutlich am Rand von Zellaggregaten ausbildeten oder einzeln vorlagen (Beispielbild Anhang A.6). Bei der Analyse der Vesikelanzahl fiel auf, dass in Primärzellkulturen des biologischen Replikats (bRp 2) sowohl in der Kontrolle als auch nach RNAi jeweils deutlich weniger Vesikel gebildet wurden im Vergleich zu den anderen bRp (Tabelle 2). Im Mittel wurden in 7 Tage alten Primärzellkulturen nach *em-bcat1* Knockdown 46 Vesikel gezählt und 125 Vesikel in der korrespondierenden Kontrolle (*gfp*). Damit entwickelten sich nach *em-bcat1* RNAi 2,7-mal weniger Vesikel im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,0001$ ).

**Tabelle 2: Vesikelanzahl und Durchmesser in *E. multilocularis* Primärzellkulturen nach *gfp* bzw. *em-bcat1* RNAi an Tag 7 nach Elektroporation.**

Ausgezählt wurden je drei Wells von drei Experimenten, repräsentiert durch biologische Replikate (bRp).

Probe	Anzahl Vesikel (n)	Mittelwert (MW) von n	MW n gesamt	Durchmesser (d) Vesikel [ $\mu\text{m}$ ]	MW d [ $\mu\text{m}$ ]	MW d gesamt [ $\mu\text{m}$ ]	
<i>gfp</i> bRp 1	194	156	125	49,48	52,21	54	
	127			56,20			
	146			50,94			
<i>gfp</i> bRp 2	85	78		49,59	57,55		
	87			75,21			
	62			47,84			
<i>gfp</i> bRp 3	142	142		42,43	50,90		
	144			59,48			
	141			50,80			
<i>em-bcat1</i> bRp 1	57	47		31,17	41,28		51
	51			41,46			
	34			51,22			
<i>em-bcat1</i> bRp 2	45	37	56,70	71,93			
	31		72,20				
	34		86,90				
<i>em-bcat1</i> bRp 3	54	53	39,24	38,38			
	65		41,10				
	41		34,80				

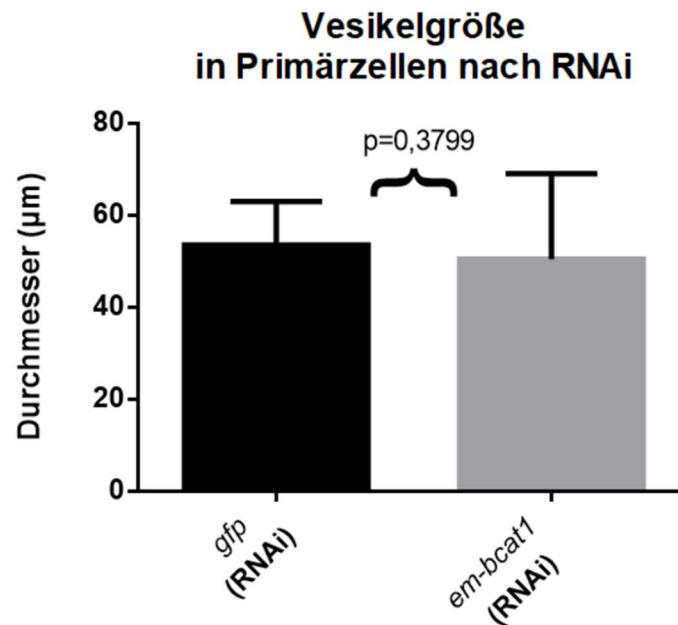


**Abbildung 11: Anzahl an Vesikeln in *E. multilocularis* Primärzellkulturen an Tag 7 nach RNAi (*em-bcat1*).**

Ausgezählt wurden je drei Wells von drei Experimenten, repräsentiert durch drei biologische Replikate. Analyse über GraphPad Prism; Mann-Whitney Test. p-Wert < 0,0001; signifikant.



Die Größe der gebildeten Vesikel unterschied sich mit durchschnittlich 51  $\mu\text{m}$  nach *em-bcat1* RNAi zu 54  $\mu\text{m}$  in Primärzellkulturen korrespondierender Kontrolle (*gfp*) nicht signifikant ( $p=0,3799$ ) (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Vesikelgröße in *E. multilocularis* Primärzellkulturen an Tag 7 nach RNAi (*em-bcat1*).**

Ausgezählt wurden je drei Wells von drei Experimenten, repräsentiert durch drei biologische Replikate (Tabelle 2). Analyse über GraphPad Prism; Mann-Whitney Test.  $p$ -Wert=0,3799; nicht signifikant.

### 3.2 Transkriptomanalyse der *E. multilocularis* Primärzellkultur

Ergebnisse der RNAi zeigten, dass nach *em-bcat1* Knockdown signifikant weniger Metazestoden-Vesikel gebildet wurden. Der Metazestode stellt posteriorisiertes Gewebe dar, da in der Germinalschicht Wnt-Liganden exprimiert werden und Anteriomarker dagegen nicht (Koziol et al. 2016a). Durch Analyse vorher erarbeiteter Transkriptomdaten für Primärzellkulturen (Herz 2019) wurde untersucht, wie sich die Primärzellkultur in diesem Hintergrund charakterisiert. Es standen dafür die Genexpressionsdaten von Primärzellkulturen in drei Entwicklungsstadien zur Verfügung. „PC1“ repräsentiert zwei Tage kultivierte Primärzellen, „PC2“ ca. eine Woche alte Zellaggregate mit Entwicklung von Metazestoden-Vesikeln und „PC3“, die Situation nach 11 Tagen Kultur. Zudem standen Transkriptomdaten von Primärzellkulturen nach *em-bcat1* Knockdown zur Verfügung. Hier wurde untersucht, wie die mit AP-Entwicklung assoziierten Gene in Primärzellen nach RNAi exprimiert werden.

### 3.2.1 Zellen der Primärzellkultur exprimieren Gene, die mit germinativen Zellen assoziiert sind (GZA)

Erste Analysen der Transkriptomdaten deuteten darauf hin, dass innerhalb der Primärzellkultur insbesondere Gene, welche mit germinativen Zellen assoziiert sind, erhöht exprimiert werden (Herz 2019). Zunächst wurden deshalb Gene analysiert, die potenziell mit germinativen Zellen assoziiert (GZA) sind. Definiert wurden diese anhand von Datensätzen von zwei Metazestoden-Kulturen, welche durch Behandlung mit Hydroxyurea (HU) bzw. Bi2536 spezifisch von germinativen Zellen depletiert waren (Herz 2019). HU wirkt über die Inhibierung der Ribonukleotidreduktase auf germinative Zellen ein und Bi2536 inhibiert die Polo-like-Kinase (PLK), *em-plk1*, welche spezifisch in germinativen Zellen von *E. multilocularis* exprimiert wird (Koziol et al. 2014; Schubert et al. 2014). Entsprechend wurden HU und Bi2536 sensitive Gene, die in behandelten Metazestoden-Vesikeln um mind. 50% verringert exprimiert waren ( $FC \leq 0,5$ ;  $p \leq 0,05$ ), als GZA definiert. Dafür ergaben sich 530 Gene, wovon 524 in Primärzellkulturen exprimiert werden ( $TPM \geq 1$  in „PC1“, „PC2“, „PC3“) (Abbildung 2; Anhang A.7).

Darunter befanden sich bereits bekannte Marker für germinative Zellen, *em-plk* (Polo-like-Kinase), *em-aurka* (Aurora Kinase A) und Densovirus-Gene (Cheng et al. 2019; Herz und Brehm 2019). Zudem befand sich unter den GZA der bereits bekannte Posteriormarker *em-post2b*. Alle diese genannten GZA sind im Entwicklungsstadium „PC1“, welches sehr stark an germinativen Zellen angereichert ist (bis zu 80%, Koziol et al., 2014) hoch exprimiert ( $TPM > 60$ ) und nahmen mit zunehmender Entwicklung (PC2, PC3) der Primärzellkulturen stetig ab (Anhang A.7). Außerdem fielen zwei Gene auf, EmuJ\_000938200 und EmuJ\_001105600, deren Genprodukte eine hohe Homologie zum humanen Mucin-1 aufweisen und somit vermutlich für germinative Zellen regulierte Mucine in *E. multilocularis* codieren (A.8). Die Genexpression beider Mucin-Homologe EmuJ\_000938200 (*em-muc2*) und EmuJ\_001105600 (*em-muc3*), nimmt von PC1 über PC2 zu PC3 stetig zu (TPM: EmuJ\_000938200 PC1: 13,52, PC2: 28,78, PC3: 55,27; EmuJ\_001105600 PC1: 5,29, PC2: 8,66; PC3: 22,39). Außerdem werden *em-muc2* und *em-muc3* kaum im Protoskolex exprimiert (TPM *em-muc2*: MCnoBC: 8,96; naPS: 0,65; aPS 0,29; TPM *em-muc3*: MCnoBC: 1,06; naPS: 0,28; aPS: 0,70).

### 3.2.2 Zellen der Primärzellkultur exprimieren Metazestoden-spezifische Gene (MZS)

Anhand der Transkriptomdaten wurden hier Gene identifiziert, die spezifisch im Metazestoden exprimiert werden (MZS). Anhand der gesetzten Kriterien der TPM für Metazestode ( $MC_{noBC} \geq 10$ , nicht aktivierter Protoskolex ( $naPS \leq 3$ ) und aktivierter Protoskolex ( $aPS \leq 3$ ), konnten 29 MZS identifiziert werden, wovon 27 Gene auch in Primärzellkulturen exprimiert wurden ( $TPM \geq 1$  in „PC1“, „PC2“, „PC3“). Unter den identifizierten MZS war der Posteriormarker *em-wnt11b*. Die Expression von *em-wnt11b* stieg in Primärzellkulturen zwischen Tag zwei und sieben an und blieb weiterhin auf hohem Niveau (TPM: PC1: 13,96; PC2: 65,85; PC3: 33,90).

#### 3.2.2.1 Zellen der Primärzellkultur exprimieren Protoskolex-spezifische Gene (PSS)

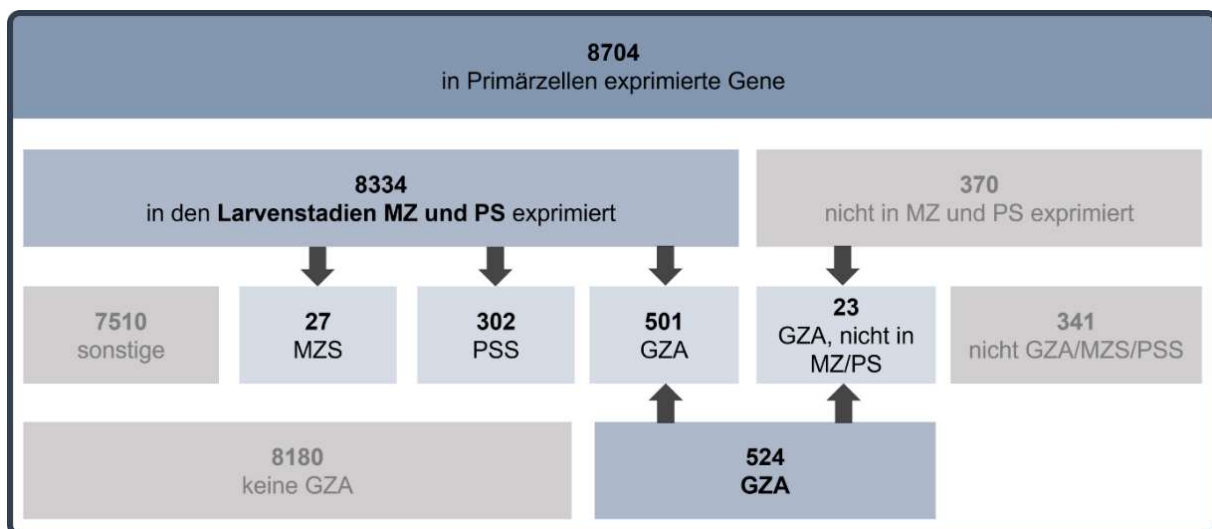
Die Primärzell-Transkriptomdaten wurden zudem auf Protoskolex-spezifische Gene (PSS) hin untersucht. Anhand der gesetzten Kriterien der TPM für Metazestode ( $MC_{noBC} \leq 3$ , nicht aktivierter Protoskolex ( $naPS \geq 10$ ) und aktivierter Protoskolex ( $aPS \geq 10$ ), konnten 444 PSS identifiziert werden, wovon 302 Gene auch in Primärzellkulturen unterschiedlicher Entwicklungsstadien mit je einem TPM von mind. 1 exprimiert waren ( $TPM \geq 1$  in „PC1“, „PC2“, „PC3“).

Darunter war auch ein bereits bekannter Wnt-Antagonist und Anteriorer Marker *em-sfrp* (Koziol et al. 2016a). Außerdem *em-ndk*, ein in dieser Arbeit neu identifizierter Anteriorer Marker. Dieser ist Teil der FGF-Rezeptor-Familie und ein bekannter Marker des anterioren Pols in Planarien, welcher im Laufe der Arbeit näher charakterisiert wurde (Cebrià et al. 2002) (3.3.5). Beide Anteriorer Marker werden im Metazestoden erst mit Brutkapselbildung exprimiert und markieren im Protoskolex spezifisch den anterioren Pol (Koziol et al. 2016a). Die Genexpression dieser beiden Protoskolex-spezifischen Gene nahm mit zunehmender Entwicklung der Primärzellkultur zu (TPM: *em-ndk* PC1: 5,82; PC2: 15,48; PC3: 17,11; *em-sfrp* PC1: 4,35; PC2: 7,55; PC3: 14,78). Zudem war unter den PSS ein bereits identifizierter Wnt-Rezeptor, *em-frizzled10* (*fz10*), dessen Genexpression noch nicht via WMISH analysiert wurde und im Weiteren näher beschrieben ist. Die Genexpression von *em-fz10* stieg mit zunehmender Entwicklung der Primärzellkultur und blieb in PC3 bestehen (TPM: PC1: 6,08; PC2: 14,02; PC3: 14,50).

In diesen Transkriptomanalysen erfüllte *em-bcat1* weder die Kriterien von GZA noch von MZS oder PSS. *em-bcat1* ist über alle Entwicklungs- und Larvenstadien stetig hoch exprimiert (PC1: 151,7; PC2: 94,17; PC3:158,29; MCnoBC: 180,0; naPS: 318,56; aPS:226,64).

### 3.2.2.2 Zellen der Primärzellkultur exprimieren GZA-, MZS- und PSS

Die Auswertung der vorliegenden Transkriptomdaten zeigte, dass in Primärzellkulturen neben Genen, die mit germinativen Zellen assoziiert sind, Gene exprimiert werden, welche sonst nur spezifisch im Metazestoden oder im Protoskolex exprimiert sind (Abbildung 13). Von 8704 Genen, die gesamt in Zellen der Primärzellkultur exprimiert waren (TPM: „PC1“ $\geq$ 1; „PC2“ $\geq$ 1; „PC3“ $\geq$ 1), fielen 8334 Gene, die zudem in den Larvenstadien Metazestode (MZ) und Protoskolex (PS) exprimiert waren (TPM: „MCnoBC“ $\geq$ 1; „naPS“ $\geq$ 1; „aPS“ $\geq$ 1). Darunter waren 27 Metazestoden spezifische (MZS) Gene und 302 Gene, die spezifisch im Protoskolex exprimiert wurden (PSS). Außerdem konnten 524 Gene identifiziert werden, die mit germinativen Zellen assoziiert waren (GZA). Davon waren 501 GZA in Primärzellen, MZ und PS exprimiert und 29 weitere GZA, die in Primärzellen nicht aber in PS und MZ exprimiert wurden (TPM $\geq$ 1) (Abbildung 13, Anhang A.7).



**Abbildung 13: In *E. multilocularis* Primärzellkulturen werden neben Genen, die mit germinativen Zellen assoziiert sind (GZA), Metazestoden (MZS)- und Protoskolex spezifische Gene (PSS) exprimiert.**

Zellen der Primärzellkultur exprimieren neben GZA, auch Gene die sonst nur spezifisch in Metazestode (MZS) oder Protoskolex (PSS) exprimiert werden (TPM $\geq$ 1). MZ: Metazestode, PS: Protoskolex, GZ, germinative Zellen. TPM: Transcripts per million reads. Grau hinterlegt dargestellt sind die jeweilige Anzahl an Genen, die nicht unter die entsprechenden Kriterien fielen. Detaillierte Daten sind Anhang A.7 zu entnehmen.

### 3.2.3 Genexpression von GZA, MZS und PSS in Primärzellkulturen nach RNAi (*em-bcat1*)

Es wurde untersucht, inwiefern sich der *em-bcat1* Knockdown (RNAi) in Primärzellkulturen an Tag 7 auf die Genexpression der identifizierten GZA, MZS und PSS auswirkte. Die Änderung der Genexpression wurde im Vergleich zur Kontroll-Primärzellkultur ins Verhältnis gesetzt und als Fold-Change (FC) angegeben. Da die statistische Auswertung der vorliegenden Transkriptomdaten auf drei Stichproben aus je drei biologischen Replikaten beruhte und somit eine kleine Stichprobengröße und damit geringe Verteilungsfunktion darstellte, besitzt der p-Wert eine geringe Trefferwahrscheinlichkeit. Deshalb wurde für die folgende Beurteilung der Genexpression eine statistisch signifikant veränderte Expression von mind. 50% festgelegt ( $FC \geq 1,5$ ;  $FC \leq 0,5$ ;  $p \leq 0,05$ ), um Zufallstreffer und nur geringfügig veränderte Genexpressionen auszuschließen. Die resultierenden Ergebnisse sind detailliert in Anhang A.7 aufgeführt.

#### 3.2.3.1 GZA sind nach *em-bcat1* Knockdown überwiegend erhöht exprimiert

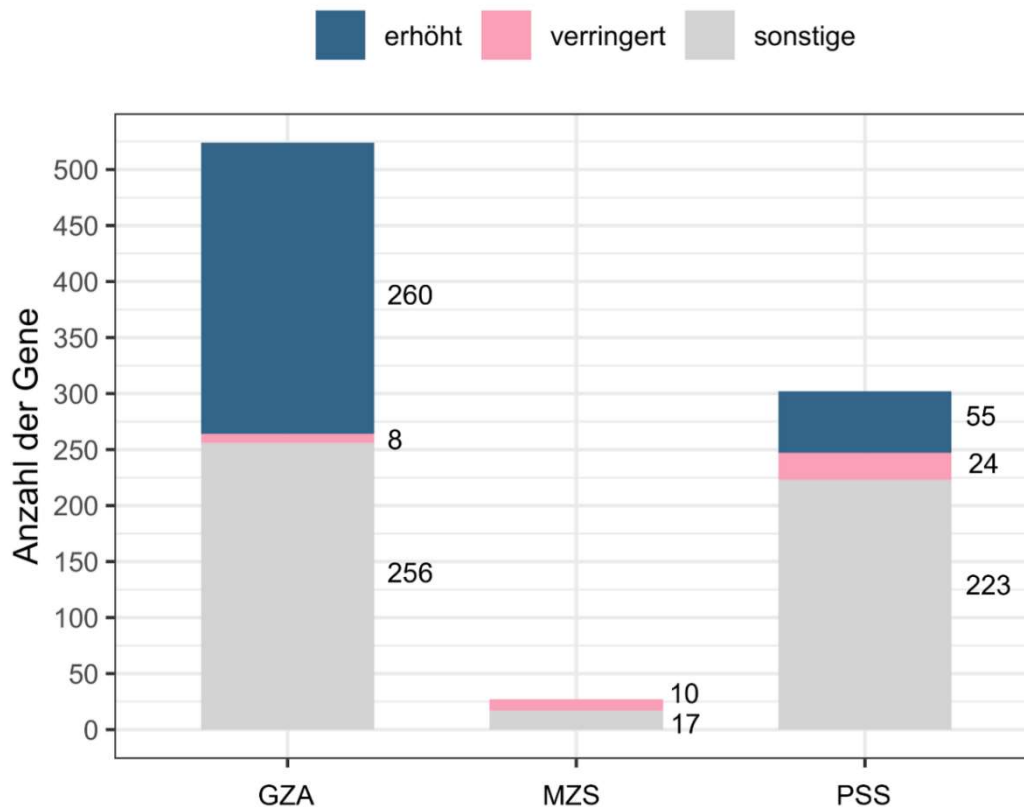
Von den zuvor identifizierten 524 GZA entsprachen 268 Gene den Kriterien. Davon waren 260 Gene um mind. 50% erhöht exprimiert und 8 Gene verringert exprimiert. (Abbildung 14). Diese Daten zeigten, dass die Mehrheit der GZA nach *em-bcat1* Knockdown um mind. 50% erhöht exprimiert waren.

#### 3.2.3.2 MZS sind nach *em-bcat1* Knockdown verringert exprimiert

Von 27 identifizierten MZS fielen 10 Gene unter die oben genannten Kriterien wovon alle 10 Gene nach RNAi (*em-bcat1*) um mind. 50% verringert exprimiert wurden.

#### 3.2.3.3 PSS sind nach *em-bcat1* Knockdown überwiegend erhöht exprimiert

Von zuvor 302 PSS, die in Zellen der Primärzellkultur exprimiert sind, zeigten 79 Gene eine um mind. 50% signifikante Genexpressionsänderung nach RNAi (*em-bcat1*). Davon wurde der Großteil der Gene (55 Gene) erhöht exprimiert und 24 Gene verringert exprimiert.



**Abbildung 14: Genexpression von germinativen Zellen-, Metazestoden- und Protoskolex- spezifischen Genen in Primärzellkulturen an Tag 7 nach *em-bcat1* Knockdown (RNAi).**

Die Beurteilung der veränderten Genexpression von GZS, MZS und PSS Genen nach RNAi erfolgte anhand eines statistisch signifikanten Fold-Change von mind. 50% („erhöht“:  $FC \geq 1,5$ ;  $p \leq 0,05$  „verringert“:  $FC \leq 0,5$ ;  $p \leq 0,05$ ). Gene, die nicht den genannten Kriterien entsprachen, fielen unter „sonstige“. Detaillierte Daten siehe Anhang A.7

### 3.2.4 Genexpression ausgewählter Gene mit Schlüsselfunktion in Primärzellkulturen nach *em-bcat1* RNAi

#### 3.2.5 GZA in Primärzellkulturen nach *em-bcat1* RNAi

Unter den 260 GZA, die nach *em-bcat1* Knockdown eine mind. 50% erhöhte Expression aufwiesen ( $p \leq 0,05$ ), waren bekannten Marker für germinative Zellen. Die Genexpression der Polo-like-Kinase *em-plk* war nach RNAi (*em-bcat1*) im Vergleich zur Kontrolle um 74% ( $FC 1,74$ ;  $p < 0,05$ ) und *em-aurka* um 78% ( $FC 1,78$ ;  $p < 0,05$ ) erhöht. Zudem war einer der fünf identifizierten Densovirus-Loci um 53% ( $FC 1,53$ ;  $p < 0,05$ ) erhöht exprimiert (Anhang A.7). Der Posteriormarker *em-post2b* war eines von 8 Genen, die verringert exprimiert waren (73%;  $FC 0,27$ ;  $p < 0,05$ ). Zudem waren die beiden neu identifizierte *mucin* Gene, *em-muc2* und *em-muc3*, um 93% ( $FC 0,07$ ;  $p < 0,05$ ) bzw. 92% ( $FC 0,08$ ;  $p < 0,05$ ) verringert exprimiert nach RNAi (Anhang A.7; A.8).

### 3.2.6 MZS in Primärzellkulturen nach *em-bcat1* RNAi

Unter den 10 MZS, die nach RNAi (*em-bcat1*) um mind. 50% verringert exprimiert waren ( $p \leq 0,05$ ), war der Metazestoden- und Posteriorer Marker *em-wnt11b*. Dieser wurde laut Transkriptomdaten nach *em-bcat1* Knockdown um 71% (FC 0,29;  $p < 0,05$ ) signifikant verringert im Vergleich zur Kontrolle exprimiert.

#### 3.2.6.1 PSS in Primärzellkulturen nach *em-bcat1* RNAi

Unter PSS Markergenen fiel der Anteriorer Marker *em-sfrp*, welcher in Primärzellen nach *em-bcat1* Knockdown um 296% (FC 2,96;  $p < 0,05$ ) erhöht exprimiert wurde und ein weiterer Anteriorer Marker, *em-ndk*, war um 366% (FC 3,66;  $p < 0,05$ ) erhöht exprimiert. Auffällig war der Wnt-Rezeptor, *em-fz10*, mit 892% erhöhter Expression (FC:8,92;  $p < 0,05$ ) in Primärzellen nach RNAi (*em-bcat1*).

#### 3.2.6.2 Expression weiterer Gene von Interesse

Weitere Gene, die nicht unter die oben gesetzten Kriterien für GZA, MZS, oder PSS fielen oder nicht um mind. 50% signifikant veränderter Genexpression zeigten, aber dennoch interessant für diese Arbeit waren, werden hier gesondert aufgeführt.

Die RNAi führte zur einer Verringerung der Transkripte des Zielgens der RNAi, *em-bcat1*. Die Genexpression zeigte mit 65% (FC=0,35;  $p < 0,05$ ) einen signifikanten Knockdown.

Außerdem von Interesse waren zwei bereits bekannte Tegumentmarker für den Metazestoden, die Alkalische Phosphatase *em-*alp2** und ein Mucin, *em-*muc1** (Koziol et al. 2014). Die Expression dieser Tegumentmarker nimmt mit zunehmender Entwicklung in Primärzellkulturen und damit verbundener Vesikel Entwicklung zu (Anhang A.3). Nach *em-bcat1* Knockdown (RNAi) zeigten die Tegumentmarker *em-*alp2** und *em-*muc1** eine um 34% (FC 0,66;  $p < 0,05$ ) bzw. um 98% (FC 0,02;  $p < 0,05$ ) verringerte Genexpression. Außerdem interessant war ein Wnt-Ligand und Posteriorer Marker *em-wnt1*, dessen Genexpression mit der Entwicklung der Primärzellkultur stark ansteigt (TPM: PC1: 52,15; PC2: 272,36; PC3: 634,60) (Koziol et al. 2016a). Nach *em-bcat1* Knockdown war *em-wnt1* um 24% verringert exprimiert, wenn auch nicht signifikant (0,76;  $p = 0,075$ ).

Als weitere mit dem Protoskolex-Larvenstadium assoziierte Gene war ein Neuropeptid, *em-*npp36**, welches in vorhergehenden Arbeiten im Labor als spezifisch im anterioren

Bereich des Protoskolex exprimiert identifiziert wurde (Koziol et al. 2016b). Dieses Gen wird in Primärzellen an Tag zwei (PC1) nicht exprimiert, aber die Expression nimmt mit der Entwicklung der Primärzellkultur zu (TPM: PC1: 0,56; PC2:3,43; PC3: 14,95). *em-npp36* zeigte eine Genexpressionssteigerung von 1824% (FC 18,24;  $p < 0,05$ ) nach *em-bcat1* Knockdown (RNAi).

Außerdem interessant im Bezug auf Anterorentwicklung war *em-follistatin* (*em-fst*). Follistatin spielt als TGF- $\beta$  Antagonist eine wichtige Rolle in der Entwicklung des anterioren Pols in Planarien (Gaviño et al. 2013). Die Genexpression von *em-fst* findet in PC kontinuierlich statt (TPM: PC1: 41,56; PC2: 129,88; PC3 99,96). Durch WMISH Vorexperimente im Labor konnte die Genexpression von *em-fst* in der Germinalschicht des Metazestoden nachgewiesen werden und war im Protoskolex vorwiegend anterior lokalisiert. *Em-fst* zeigte ebenfalls eine deutlich gesteigerte Expression nach *em-bcat1* Knockdown um 254% (FC 2,54;  $p < 0,05$ ), unter 3.2.7.7 näher charakterisiert.

Diese Daten gaben ergänzend zu denen der GZA, MZS und PSS Hinweise, dass Metazestoden- und Posteriormarker nach *em-bcat1* Knockdown verringert exprimiert wurden.

### 3.2.7 **Lokalisierung und Nachweis der Genexpression ausgewählter Gene in Primärzellkulturen nach RNAi durch WMISH**

Die unter 3.2.3 aufgeführten Ergebnisse zu den Transkriptomdaten gaben Hinweise auf veränderte Genexpression von Metazestoden und Protoskolex-spezifischen Genen. Diese Daten wurden in der Arbeit verifiziert und dabei speziell die Expressionsmuster ausgewählter Gene in Primärzellen nach *em-bcat1* Knockdown via WMISH näher analysiert. Hierfür wurde die Genexpression für die in Tabelle 4 aufgelisteten Metazestoden-, Anterior- und Posteriormarker mittels WMISH in Primärzellen nach RNAi analysiert. Der Begriff anterior wird im Folgenden für die spezifische Genexpression am anterioren Pol sowie in der anterioren Region des Protoskolex verwendet.



**Tabelle 3: Genexpression ausgewählter Gene in *E. multilocularis* Primärzellen nach RNAi (*em-bcat1*) an Tag 7.**

Die Änderung der Genexpression nach RNAi (*em-bcat1*) im Verhältnis zur Kontrolle ist in Fold Change (FC) angegeben sowie der jeweilige adjustierte p-Wert (padj) (siehe A.3).

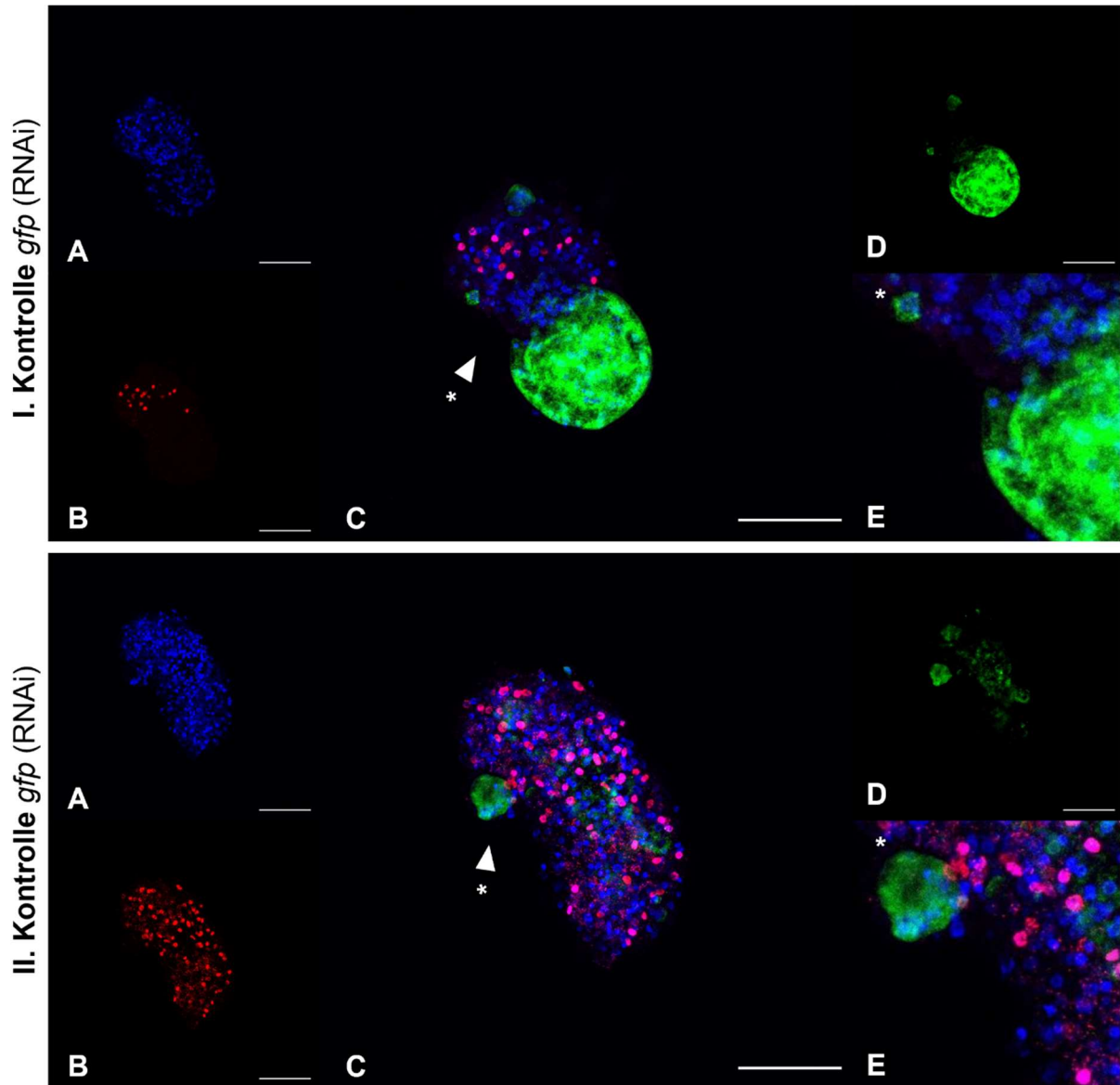
		<i>sibcat1</i> versus Kontrolle	
Transkript ID	Gen-Name	FC (MLE)*	padj**
EmuJ_000742900	<i>em-muc1</i>	0,02	2,89E-07
EmuJ_000393400	<i>em-alp2</i>	0,66	2,01E-03
EmuJ_000104000	<i>em-wnt11b</i>	0,29	4,59E-13
EmuJ_000349900	<i>em-wnt1</i>	0,76	1,78E-01
EmuJ_000838700	<i>em-sfrp</i>	2,96	4,80E-16
EmuJ_000770900	<i>em-ndk</i>	3,66	5,55E-39
EmuJ_000835400	<i>em-npp36</i>	18,24	9,28E-12
EmuJ_000278400	<i>em-fst</i>	2,54	5,06E-27
EmuJ_000085700	<i>em-fz10</i>	8,92	5,61E-41
	*	Fold-change (Maximum likelihood Estimate)	
	**	adjustierter p-Wert	
		höher exprimiert im Vergleich zur Kontrolle	
		geringer exprimiert im Vergleich zur Kontrolle	

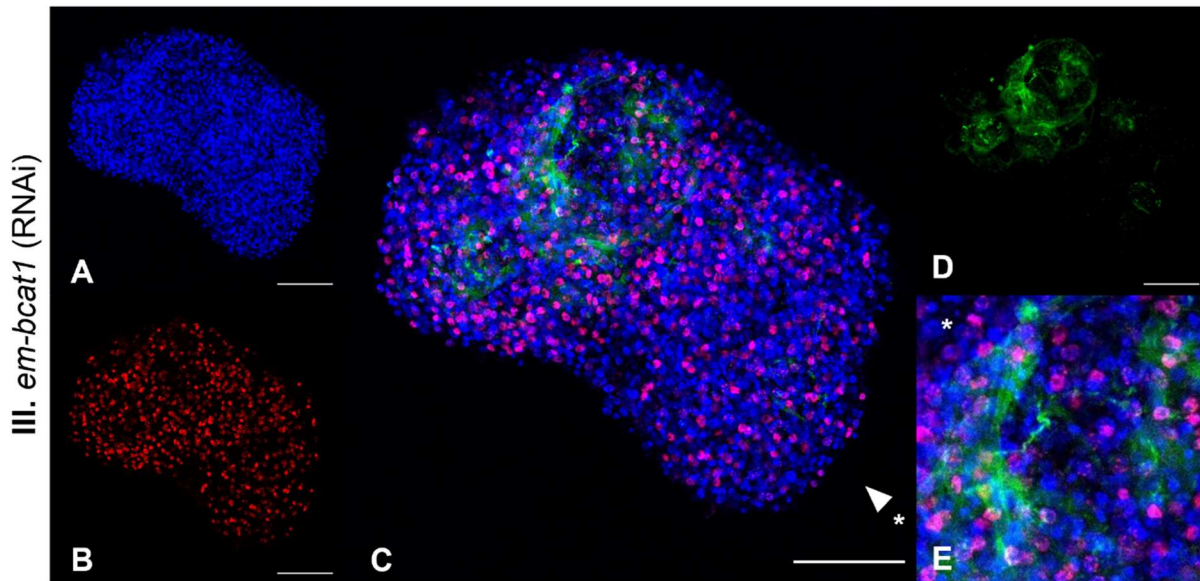
### 3.2.7.1 Metazestoden-Tegument-spezifische Marker werden in Primärzellkulturen nach *em-bcat1* Knockdown verringert exprimiert

In Primärzellen nach *em-bcat1* RNAi wurden signifikant weniger Vesikel gebildet (3.1.2). Zudem zeigten die Tegumentmarker *em-muc-1* und *em-alp2* eine signifikant verringerte Expression nach *em-bcat1* Knockdown (*em-muc1*: 98%;  $p < 0,05$ ; *em-alp2*: 34%,  $p < 0,05$ ) (Tabelle 3). Die Expression dieser Marker wurde daher näher untersucht, im Fall von *em-muc1* über WMISH.

In Primärzellen der Kontrolle (*gfp*) war *em-muc1* in Kavitäten-begrenzenden Geweben und in einem Vesikel hoch exprimiert (Abbildung 15 I und II D). In Primärzellaggregaten nach *em-bcat1* Knockdown wurden hingegen keine Aggregate mit randständigen Vesikeln beobachtet (Vgl. Abbildung 15 III). Eine kavitätsassoziierte Genexpression von *em-muc1*, zeigte sich jedoch auch nach *em-bcat1* Knockdown in einigen (randständigen) Kavitäten mit nahezu vergleichbarer Intensität wie in Zellaggregaten der Kontrolle (Abbildung 15 II und III D). Detaillierte Aufnahmen durch die gesamten

Zellaggregate (Z-Stapel) sind im Anhang A.9 zu finden. Wie bereits bekannt, war *em-muc1* nicht in EdU<sup>+</sup> Zellen exprimiert.



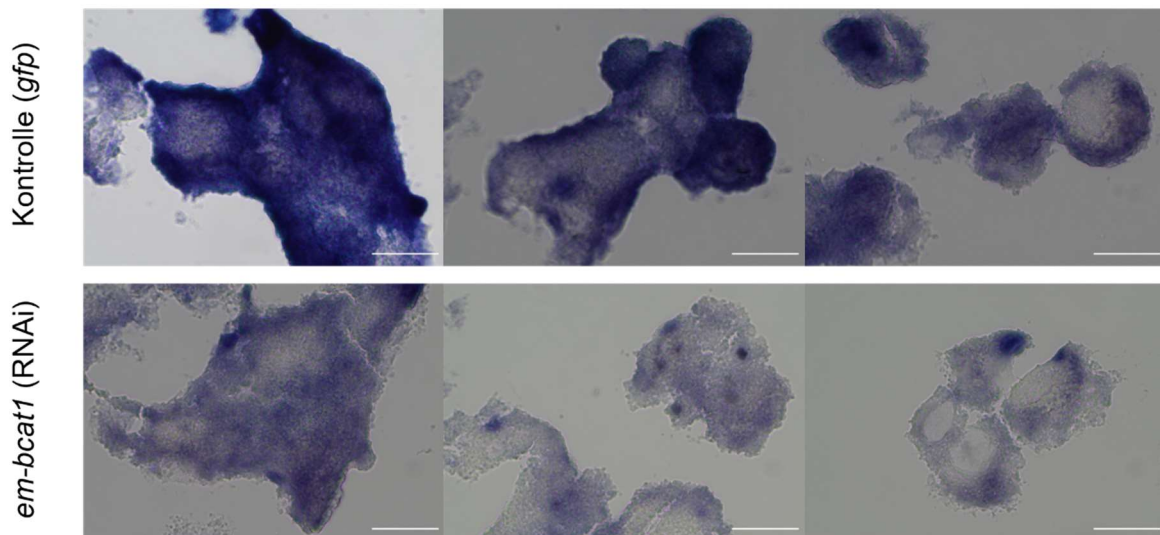


**Abbildung 15: WMISH zu *em-muc1* in *E. multilocularis* Primärzellen nach RNAi.**

An Tag 7 nach Elektroporation (RNAi) wurden die Primärzellen 5 Stunden mit 50  $\mu\text{M}$  EdU kultiviert und fixiert. WMISH und EdU-Nachweis wurden in Primärzellen nach *em-bcat1*-Knockdown und entsprechender Kontrolle (*gfp*) durchgeführt. In der Kontrolle war ein Primärzellaggregat mit einem randständigen Vesikel vorhanden (1), nach *em-bcat1* RNAi konnte kein Vesikel nachgewiesen werden. **A** Zellkernfärbung in blau (DAPI), **B** EdU-positive Zellen in rot (Alexa 555), **C** Merge von DAPI- und EdU-positiven Zellen und RNA-Sonden-Signal. **D** RNA-Sonden-Signal in grün (FITC), **E** Detail (Ausschnitt ca. 260x260 px) aus D. Es wurden keine doppelt-positiven Zellen (EdU<sup>+</sup> und RNA-Sonde) detektiert. Aufnahmen sind je Maximumintensitätsprojektionen eines konfokalen Z-Stapels. Die Messbalken repräsentieren 50  $\mu\text{m}$ .

Als weitere Tegumentmarker waren *em-alp1* und *em-alp2* aus vorhergehenden Experimenten bekannt (Koziol et al. 2014). Darunter war die Genexpression von *em-alp1* laut Transkriptomdaten Daten durch *em-bcat1* Knockdown in Primärzellen nicht signifikant verändert, während *em-alp2* signifikant verringert exprimiert war (Tabelle 3). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, erfolgte ein enzymatischer Nachweis des Genproduktes an Dünnschnitten von Primärzellaggregaten nach RNAi. Die Intensität, der aus der alkalische Phosphatase-Aktivität resultierenden Farbreaktion wurde lichtmikroskopisch beurteilt (Abbildung 16). Es zeigte sich generell eine deutlich geringere Farbtintensität in Primärzellaggregaten nach RNAi (*em-bcat1*) im Vergleich zur Kontrolle (*gfp*). Zudem fiel auf, dass die Färbung in der Kontrolle flächig bis zum äußeren Rand von Kavitäten auftrat, während diese in den Primärzellaggregaten nach *em-bcat1* Knockdown punktuell nachzuweisen war. Die geringere Färbung weist insgesamt auf eine geringere Aktivität alkalischer Phosphatase(n) hin.

Zusammenfassend zeigten die in diesem Abschnitt durchgeführten Analysen, dass zwei mit dem Tegument des *E. multilocularis* Metazestoden assoziierte Marker (*em-muc1* und *em-alp2*) in Primärzellkulturen nach *em-bcat1* (RNAi) stark reduziert vorlagen.



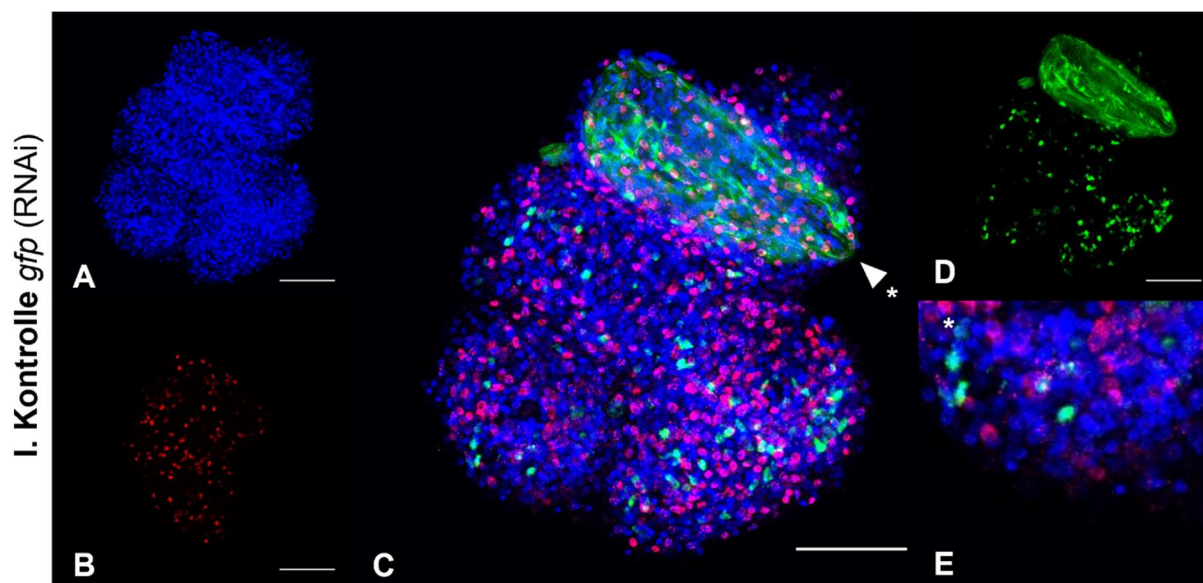
**Abbildung 16: Alkalische Phosphatase Histochemie in *E. multilocularis* Primärzellen nach RNAi.**

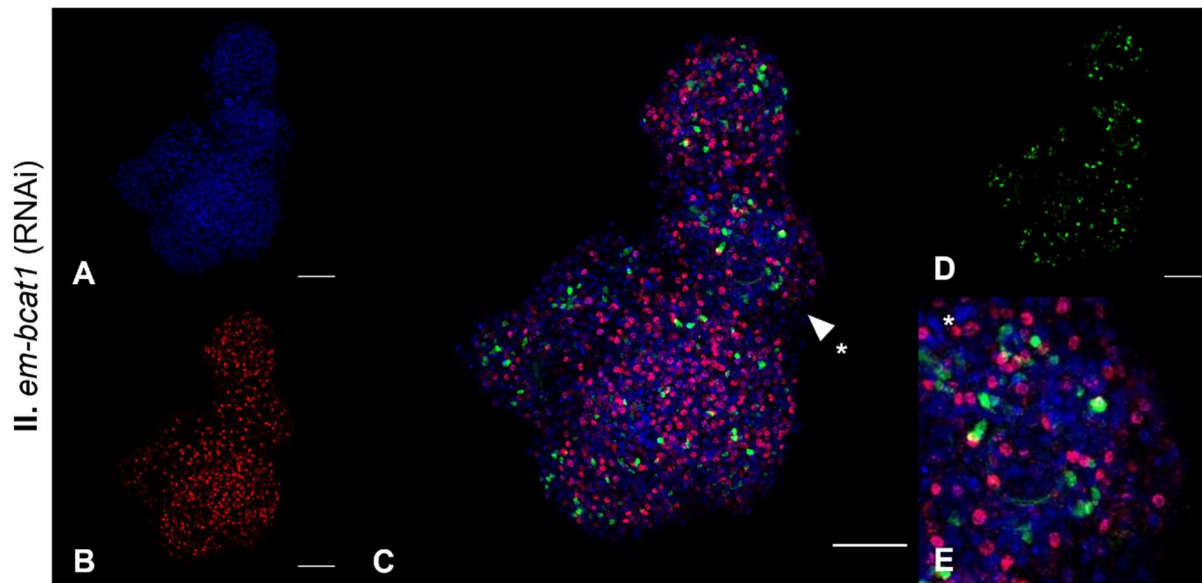
Dünnschnitte von Primärzellaggregaten an Tag 7 nach *em-bcat1* Knockdown (RNAi) und korrespondierender Kontrolle (*gfp*), wurden auf alkalische Phosphatase Aktivität überprüft. Messbalken repräsentieren 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.7.2 Die Posteriormarker *em-wnt1* und *em-wnt11b* werden in Primärzellkulturen nach *em-bcat1* RNAi verringert exprimiert

Ergebnisse der Transkriptomanalysen zeigten eine verringerte Expression Metazestoden-spezifischer Gene in Zellaggregaten nach *em-bcat1* (RNAi). Beide Gene waren durch vorhergehende Arbeiten im Labor der Arbeitsgruppe als spezifische, posterior-exprimierte Gene identifiziert worden. Hierbei war *em-wnt1* spezifisch am posterioren Pol von Protoskolizes und Brutkapseln exprimiert. Daneben war *em-wnt11b* während der Brutkapselentwicklung nur posterior innerhalb der Germinalschicht exprimiert und in aktivierten Protoskolizes nicht nachweisbar. Damit konnte *em-wnt11b* anhand seines Genexpressionsprofils als Metazestoden-spezifisches Gen angesehen werden (Koziol et al. 2016a), was sich mit dem Genexpressionsmuster der Transkriptomdaten deckte. Die Transkriptomdaten gaben an, dass die Genexpression von *em-wnt1* um 24% und *em-wnt11b* um 71% nach *em-bcat1* Knockdown, im Vergleich zur Kontrolle, verringert waren (Tabelle 4; Anhang A.3). Die Expressionsprofile der beiden Gene wurden in Primärzellen nach RNAi (*gfp*-bzw. *em-bcat1*) via WMISH überprüft.

Die Genexpression von *em-wnt1* war in der Kontrolle sowohl in Zellen über das gesamte Aggregat verteilt exprimiert und in Zellen, die um Kavitäten lokalisiert waren (Abbildung 17 I. D). In Primärzellen nach *em-bcat1* (RNAi) war das detektierte Signal sowohl in Zellen, die über das Zellaggregat verteilt waren, als auch in Zellen, die um Kavitäten lokalisiert waren, in ähnlicher Intensität zur Kontrolle nachzuweisen. Nach *em-bcat1* Knockdown konnte hingegen keine kavitätsassoziierte Genexpression nachgewiesen werden (Abbildung 17 II. D). In der Kontrolle waren in einem der fünf Zellaggregate zwei *EdU*<sup>+</sup> Zellen, welche *em-wnt1* exprimierten. Nach *em-bcat1* RNAi konnte keine Co-Lokalisation detektiert werden. Signale von *EdU*<sup>+</sup> Zellen und *em-wnt1* die sich im ‚merge‘ von Primärzellen nach *em-bcat1* RNAi vermeintlich überlagern, konnten bei näherer Betrachtung mehreren Ebenen zugeordnet werden und stellen somit keine Co-Lokalisation dar (Abbildung 17 II. E). Für detaillierte Aufnahmen durch die gesamten Zellaggregate (Z-Stapel) siehe Anhang A.10.



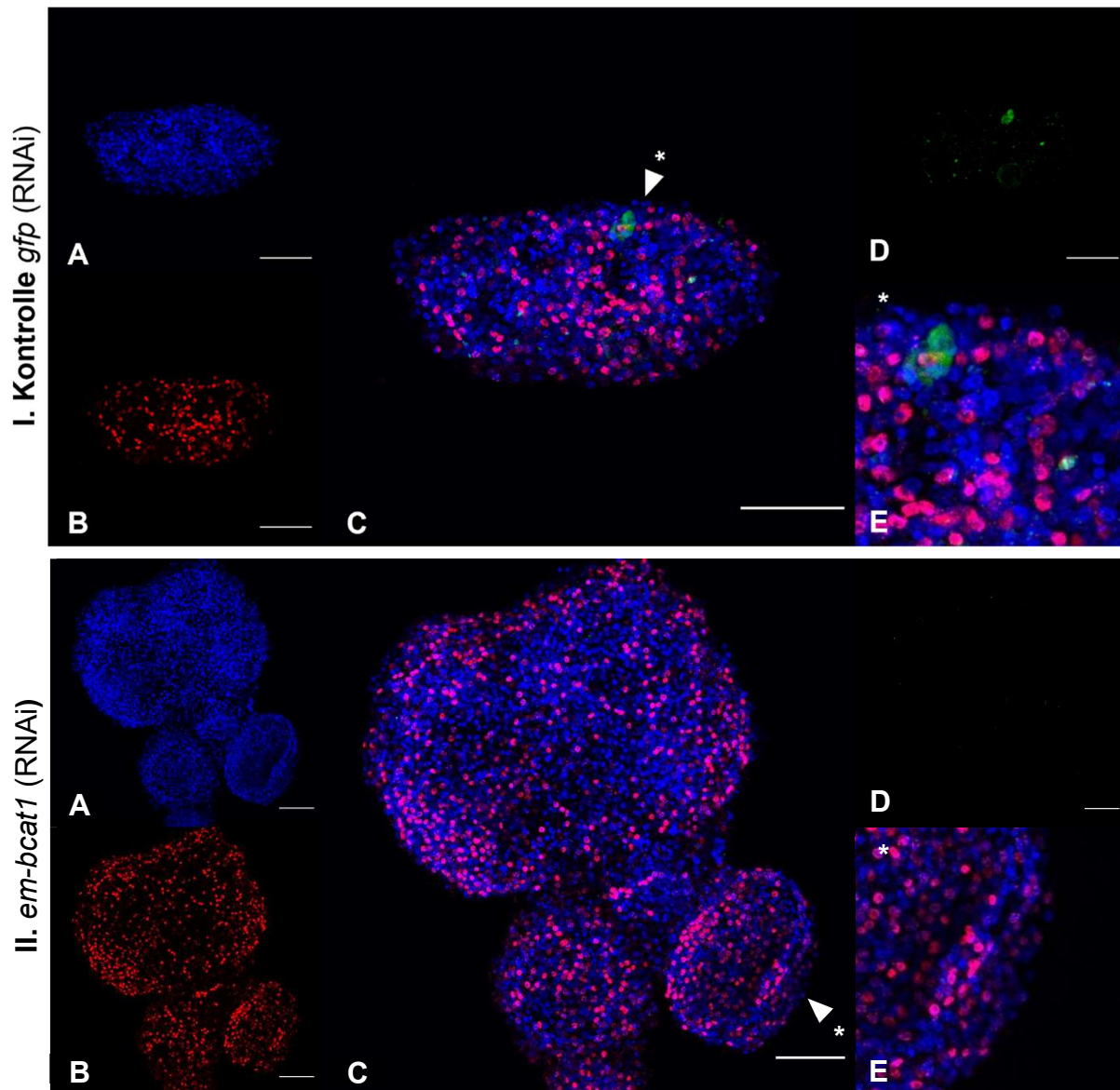


**Abbildung 17: WMISH zu *em-wnt1* in *E. multilocularis* Primärzellen nach RNAi.**

An Tag 7 nach Elektroporation (RNAi) wurden die Primärzellen 5 Stunden mit 50 µM EdU kultiviert und fixiert. WMISH und EdU-Nachweis wurden in Primärzellen nach *em-bcat1* Knockdown und entsprechender Kontrolle (*gfp*) durchgeführt. **A** Zellkernfärbung in blau (DAPI), **B** EdU-positive Zellen in rot (Alexa 555), **C** Merge von DAPI- und EdU-positiven Zellen und RNA-Sonden-Signal. **D** RNA-Sonden-Signal in grün (FITC), **E** Detail (Ausschnitt ca. 260x260 px) aus D. In einem der Primärzellaggregate der Kontrolle wurden zwei doppelt-positive Zellen (EdU<sup>+</sup> und RNA-Sonde) detektiert, keine in PC-Aggregaten nach *em-bcat1* Knockdown. Aufnahmen sind je Maximumintensitätsprojektionen eines konfokalen Z-Stapels. Die Messbalken repräsentieren 50 µm.

Die Genexpression des Metazestoden-spezifischen Gens *em-wnt11b* wurde ebenfalls über WMISH analysiert. Die Genexpression war in der Kontrolle (*gfp*), sowohl in Zellen über das Zellaggregat verteilt als auch in Zellen, die Kavitäten umgeben und an der Oberfläche von Kavitäten zu detektieren (Abbildung 18 I. D). Dabei war auffällig, dass die Intensität der Genexpression von *em-wnt11b* abhängig vom untersuchten Zellaggregat war (Anhang A.11). In Zellaggregaten nach *em-bcat1* RNAi war dagegen nur eine geringe Genexpression in einzelnen Zellen über das Aggregat verteilt oder kein Signal nachzuweisen (Abbildung 18 II. D). Es konnte keine Genexpression von *em-wnt11b* in EdU<sup>+</sup> Zellen, nachgewiesen werden. Detaillierte Aufnahmen (Z-Stapel) sind Anhang A.12 zu entnehmen.

Mit diesem Ergebnis konnte der Rückgang der Genexpression eines weiteren Metazestoden-spezifischen Gens nach *em-bcat1* Knockdown nachgewiesen werden (neben *em-alp2*, *em-muc1*).



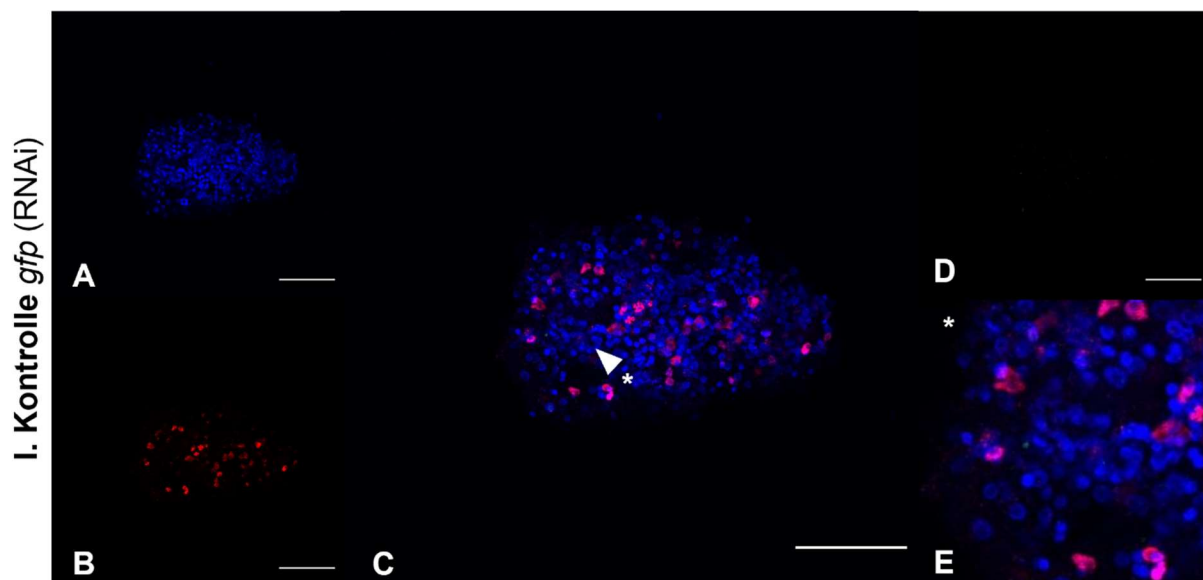
**Abbildung 18: WMISH zu *em-wnt11b* in *E. multilocularis* Primärzellen nach RNAi.**

An Tag 7 nach Elektroporation (RNAi) wurden die Primärzellen 5 Stunden mit 50  $\mu$ M EdU kultiviert und fixiert. WMISH und EdU-Nachweis wurden in Primärzellen nach *em-bcat1*-Knockdown und entsprechender Kontrolle (*gfp*) durchgeführt. **A** Zellkernfärbung in blau (DAPI), **B** EdU-positive Zellen in rot (Alexa 555), **C** Merge von DAPI- und EdU-positiven Zellen und RNA-Sonden-Signal **D** RNA-Sonden-Signal in grün (FITC), **E** Detail (Ausschnitt ca. 260x260 px) aus D. Es wurden keine doppelt-positiven Zellen (EdU<sup>+</sup> und RNA-Sonde) detektiert. Aufnahmen sind je Maximumintensitätsprojektionen eines konfokalen Z-Stapels. Die Messbalken repräsentieren 50  $\mu$ m.

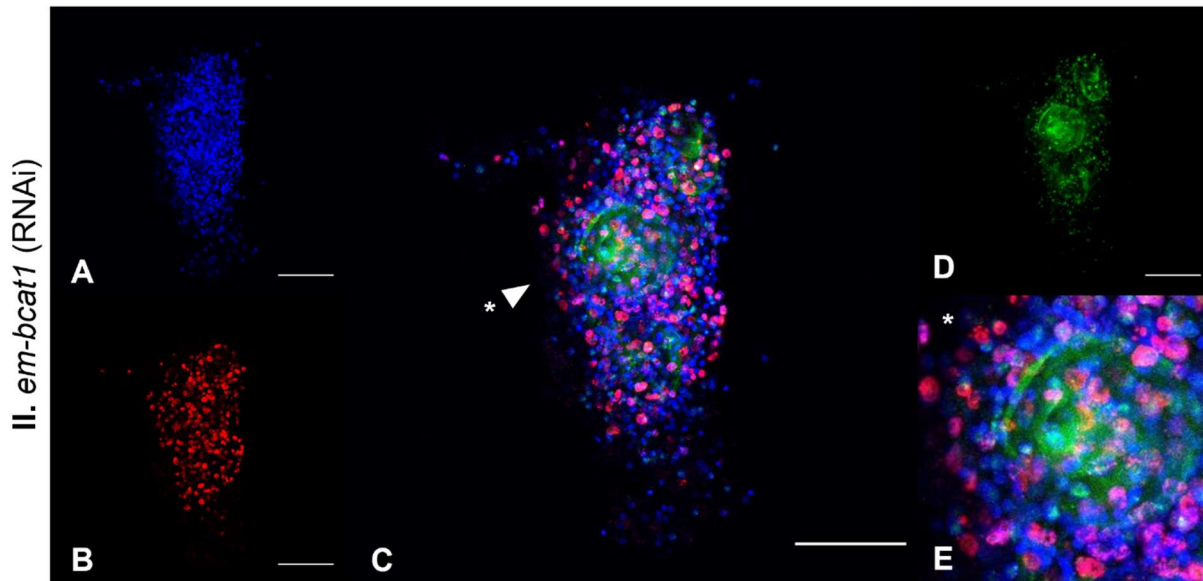
### 3.2.7.3 Der Anteriomarker *em-sfrp* wird in Primärzellen nach *em-bcat1* RNAi stark erhöht exprimiert

Durch vorhergehende WMISH Analysen war *em-sfrp* als Teil des Wnt-Signalweges als Anteriomarker in *E. multilocularis* bekannt (Koziol et al. 2016a). Dieses wird im Metazestodengewebe erst mit Entwicklung von Brutkapseln exprimiert. Dabei erfolgt die Genexpression nur in wenigen, anterior lokalisierten Zellen und markiert von frühen Brutkapselstadien bis hin zum evaginierten Protoskolex spezifisch den anterioren Pol (Koziol et al. 2016a). Laut Transkriptomdaten stieg die Genexpression in Primärzellen nach *em-bcat1* RNAi von *em-sfrp* um 296% im Vergleich zur Genexpression in der Kontrolle und zeigte damit eine stark erhöhte Expression des Anteriomarkers (Tabelle 4; Anhang A.3).

Die WMISH Analyse von *em-sfrp* zeigte in der Kontrolle (*gfp*) nur Genexpression in einzelnen Zellen über die Zellaggregate verteilt (Abbildung 19 I. D). Nach RNAi war die Genexpression von *em-sfrp* stark erhöht und neben Zellen über das Aggregat verteilt insbesondere in Zellen um Kavitäten nachzuweisen (Abbildung 19 II. D). In EdU<sup>+</sup> Zellen konnte keine Expression von *em-sfrp* detektiert werden. Detaillierte Aufnahmen (Z-Stapel) sind Anhang A.13 zu entnehmen.







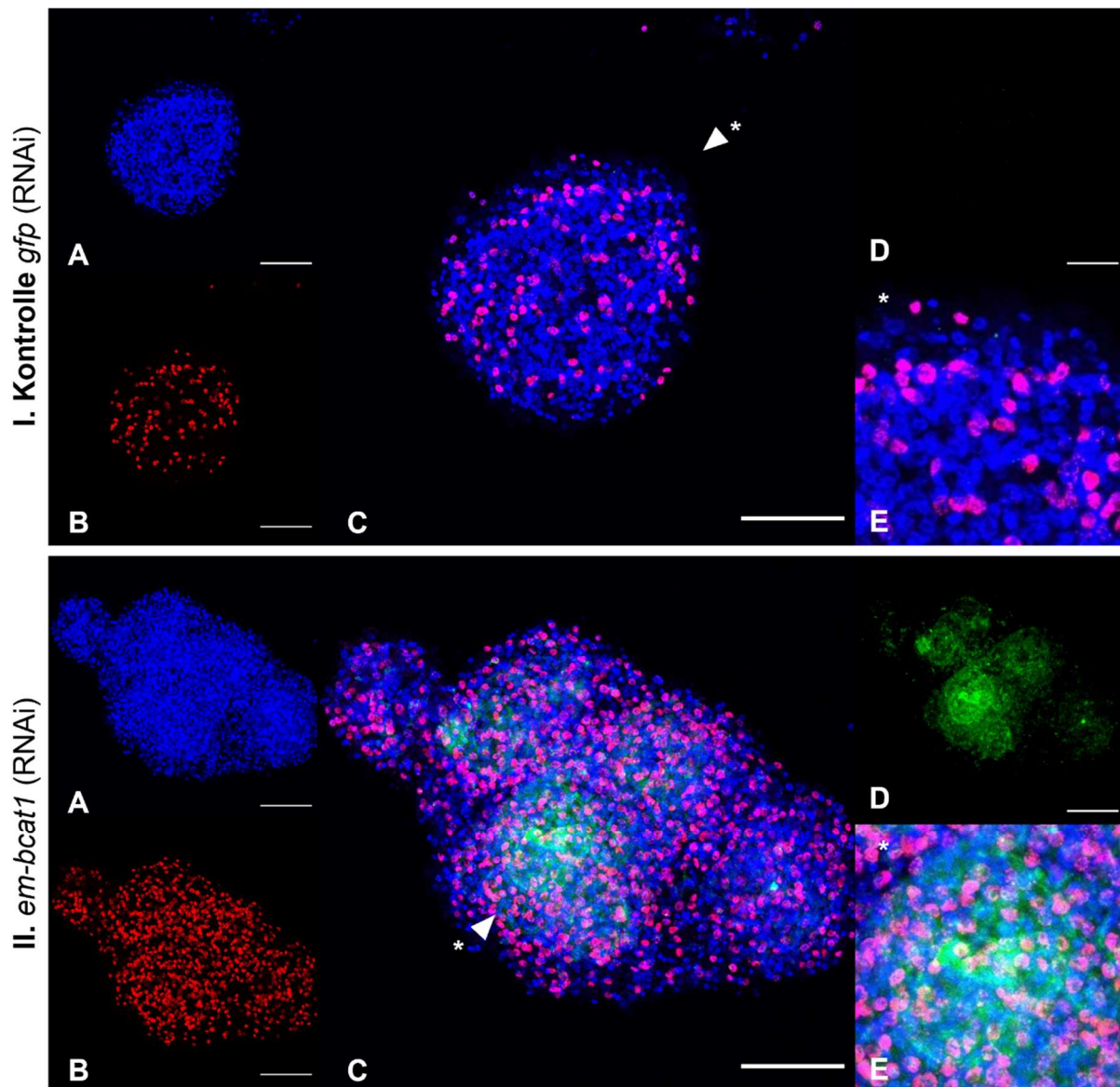
**Abbildung 19: WMISH zu *em-sfrp* in *E. multilocularis* Primärzellen nach RNAi.**

An Tag 7 nach Elektroporation (RNAi) wurden die Primärzellen 5 Stunden mit 50 µM EdU kultiviert und fixiert. WMISH und EdU-Nachweis wurden in Primärzellen nach *em-bcat1* Knockdown und entsprechender Kontrolle (*gfp*) durchgeführt. **A** Zellkernfärbung in blau (DAPI), **B** EdU-positive Zellen in rot (Alexa 555), **C** Merge von DAPI- und EdU-positiven Zellen und RNA-Sonden-Signal **D** RNA-Sonden-Signal in grün (FITC), **E** Detail (Ausschnitt ca. 260x260 px) aus D. Es wurden keine doppelt-positiven Zellen (EdU<sup>+</sup> und RNA-Sonde) detektiert. Aufnahmen sind je Maximumintensitätsprojektionen eines konfokalen Z-Stapels. Die Messbalken repräsentieren 50 µm.

#### 3.2.7.4 *Em-ndk*, ein neu identifizierter Anteriomarker in *E. multilocularis*, wird in Primärzellen nach *em-bcat1* RNAi stark erhöht exprimiert.

Neben *sfrp* als Teil des Wnt-Signalwegs ist auch *nou-darake* (*ndk*), ein FGF-Rezeptor-ähnliches Protein, in Planarien als Anteriomarker bekannt. Im Gegensatz zum FGF-Rezeptor fehlt ihm eine funktionelle Proteinkinasedomäne, weshalb es auch FGFR-ähnliches Protein genannt wird (Bertrand et al. 2009; Cebrià et al. 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte *em-ndk* als Homolog zu *ndk* in Planarien und spezifischer Anteriomarker in *E. multilocularis* identifiziert werden (siehe 3.3.5; Abbildung 35). Laut Transkriptomdaten lag für *em-ndk* ein Genexpressionsteigerung von 366% nach *em-bcat1* RNAi in Primärzellen vor (Tabelle 3). WMISH zu *em-ndk* zeigte in Zellaggregaten der Kontrolle eine geringe Expression in einzelnen Zellen über das Zellaggregat verteilt (Abbildung 20 I. D). In Primärzellaggregaten nach *em-bcat1* RNAi war die Genexpression sowohl in Zellen über das Aggregat verteilt nachzuweisen und insbesondere kavitätsassoziiert (Abbildung 20 II. D).

Detailaufnahmen (Z-Stapel) sind Anhang A.14 zu entnehmen. *Em-ndk* wurde nicht in EdU<sup>+</sup> Zellen exprimiert. Die erhöhte Genexpression nach *em-bcat1* RNAi bestätigte die Daten aus Transkriptomdaten. Darüber hinaus war die kavitätsassoziierte Genexpression von anterioren Markern in primären Zellen nach *em-bcat1* RNAi auffällig.



**Abbildung 20: WMISH zu *em-ndk* in *E. multilocularis* Primärzellen nach RNAi.**

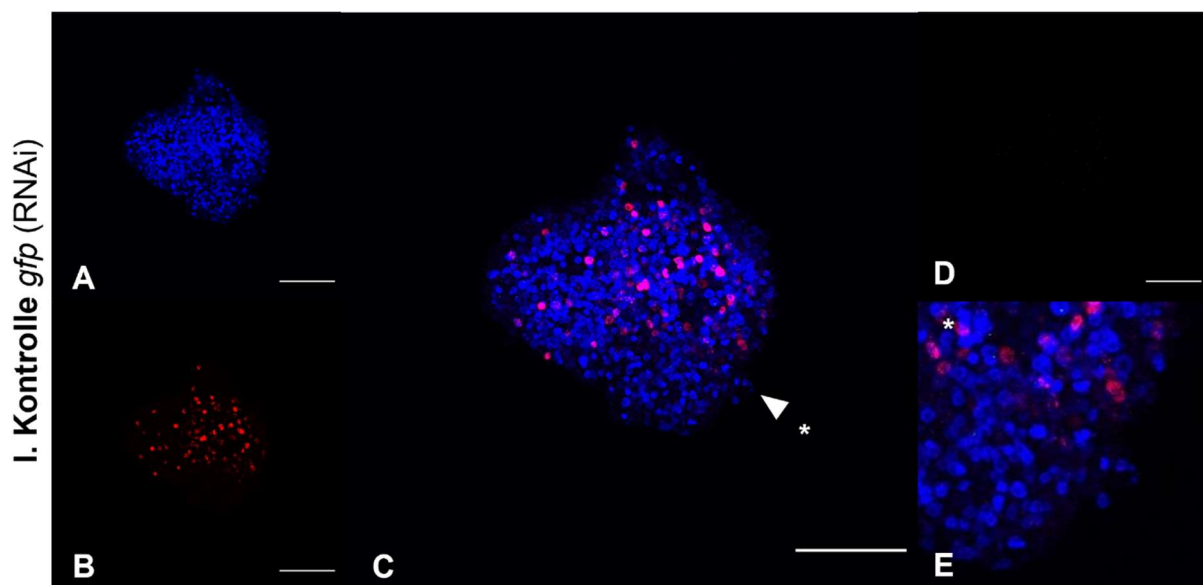
An Tag 7 nach Elektroporation (RNAi) wurden die Primärzellen 5 Stunden mit 50  $\mu$ M EdU kultiviert und fixiert. WMISH und EdU-Nachweis wurden in Primärzellen nach *em-bcat1* Knockdown und entsprechender Kontrolle (*gfp*) durchgeführt. **A** Zellkernfärbung in blau (DAPI), **B** EdU-positive Zellen in rot (Alexa 555), **C** Merge von DAPI- und EdU-positiven Zellen und RNA-Sonden-Signal **D** RNA-Sonden-Signal in grün (FITC), **E** Detail (Ausschnitt ca. 260x260 px) aus D. Es wurden keine doppelt-positiven Zellen (EdU<sup>+</sup> und RNA-Sonde) detektiert. Aufnahmen sind je Maximumintensitätsprojektionen eines konfokalen Z-Stapels. Die Messbalken repräsentieren 50  $\mu$ m.

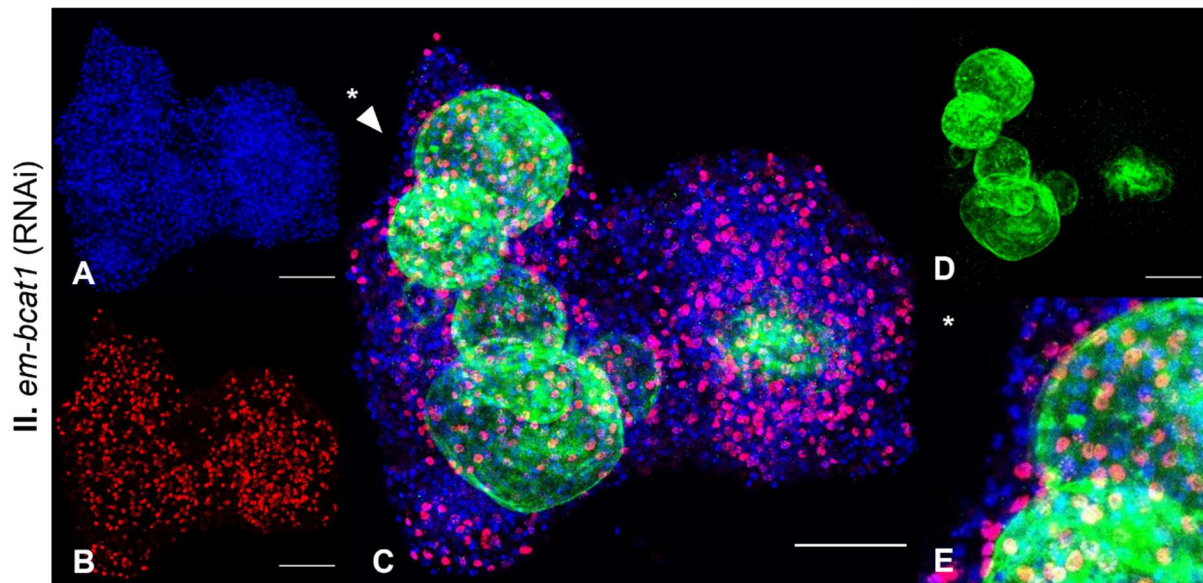
### 3.2.7.5 Das Protoskolex-spezifische Neuropeptid *em-npp36* wird in Primärzellen nach *em-bcat1* RNAi hoch exprimiert

Das Neuropeptid *em-npp36* war durch vorhergehende Arbeiten als Protoskolex spezifisch exprimiertes Gen identifiziert worden. Dabei wird es nur im anterioren Bereich des aktivierten Protoskolex exprimiert (Koziol et al. 2016b). Die Daten der Transkriptomdaten gaben für *em-npp36* eine Genexpressionssteigerung von 1823% nach *em-bcat1* Knockdown an (Tabelle 3).

Die WMISH Analyse zeigte, dass *em-npp36* in Primärzellen der Kontrolle (*gfp*) in wenigen Zellen über das Zellaggregat verteilt exprimiert wurde (Abbildung 21 I. D). Nach *em-bcat1* Knockdown war die Genexpression in Zellen über die gesamten Aggregate verteilt. Insbesondere im Tegument und in Zellen, welche Kavitäten umgeben, war eine sehr starke Expression von *em-npp36* nachweisbar (Abbildung 21 II. D). In EdU<sup>+</sup> Zellen, konnte keine Genexpression von *em-npp36* detektiert werden.

Die stark erhöhte Genexpression nach *em-bcat1* RNAi bestätigten die Daten der Transkriptomdaten. Auffällig war, dass die Genexpression von *em-npp36*, wie auch die Anteriommarker *em-sfrp* und *em-ndk* insbesondere kavitätsassoziiert auftrat.





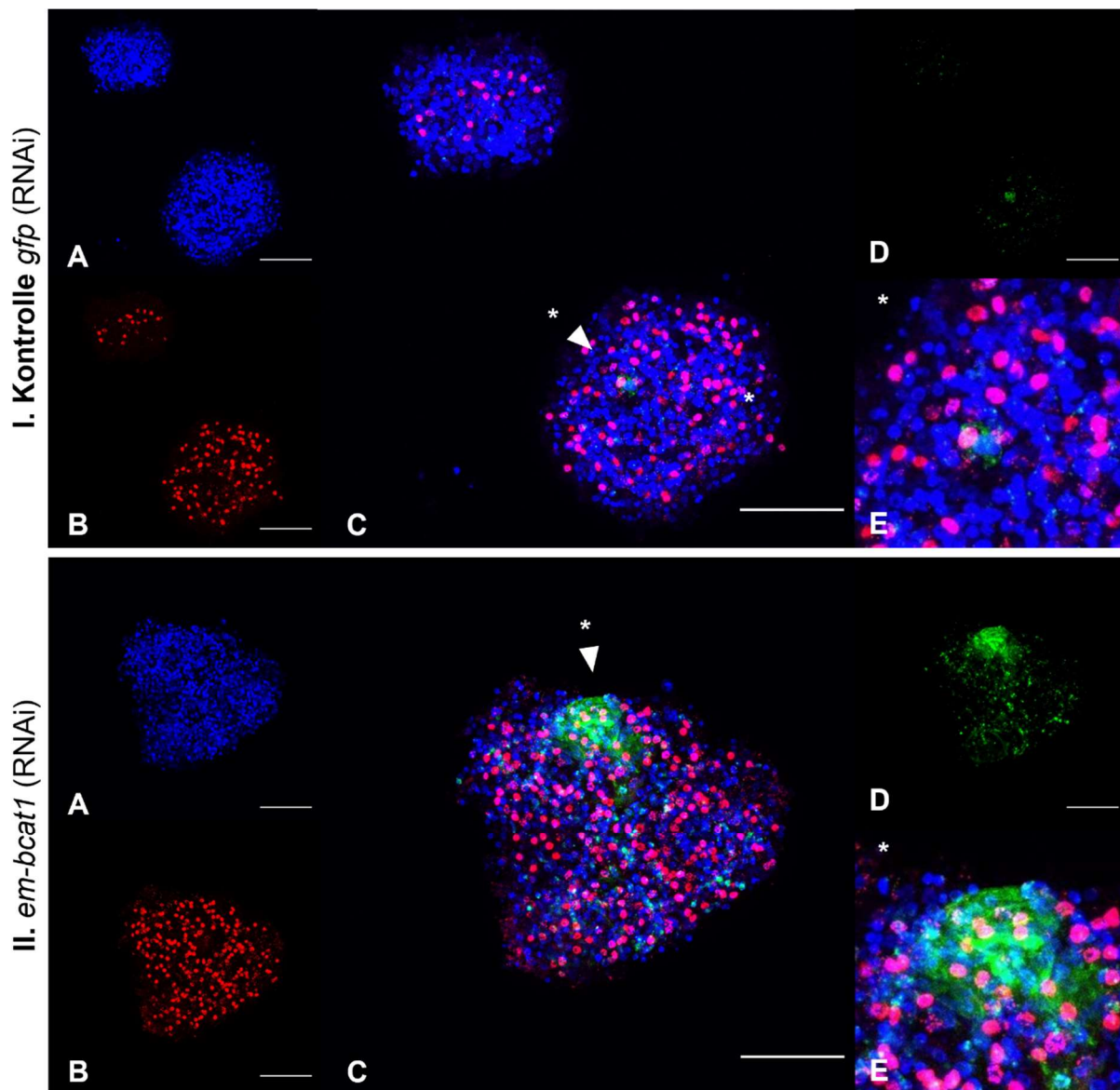
**Abbildung 21: WMISH zu *em-npp36* in *E. multilocularis* Primärzellen nach RNAi.**

An Tag 7 nach Elektroporation (RNAi) wurden die Primärzellen 5 Stunden mit 50  $\mu$ M EdU kultiviert und fixiert. WMISH und EdU-Nachweis wurden in Primärzellen nach *em-bcat1* Knockdown und entsprechender Kontrolle (*gfp*) durchgeführt. **A** Zellkernfärbung in blau (DAPI), **B** EdU-positive Zellen in rot (Alexa 555), **C** Merge von DAPI- und EdU-positiven Zellen und RNA-Sonden-Signal **D** RNA-Sonden-Signal in grün (FITC), **E** Detail (Ausschnitt ca. 260x260 px) aus D. Es wurden keine doppelt-positiven Zellen (EdU<sup>+</sup> und RNA-Sonde) detektiert. Aufnahmen sind je Maximumintensitätsprojektionen eines konfokalen Z-Stapels. Die Messbalken repräsentieren 50  $\mu$ m.

### 3.2.7.6 Der Wnt-Rezeptor *em-fz10* wird in Primärzellen nach *em-bcat1* RNAi stark erhöht exprimiert

Als weiteres Protoskolex-spezifisch exprimiertes Gen fiel der Wnt-Rezeptor *em-fz10* mit einer erhöhten Genexpression von 892% in Primärzellen nach *em-bcat1* RNAi auf. Die Identifikation von *em-fz10* war bereits in vorgehenden Arbeiten durch phylogenetische Analysen erfolgt (Koziol et al. 2016a). Anhand des Expressionsprofils laut Transkriptomdaten konnte *em-fz10* als Protoskolex-spezifisches Gen identifiziert werden. Im Metazestoden war *em-fz10* gering exprimiert (TPM=1,6), mit Brutkapselbildung erhöht (TPM=15,42) und im nicht aktivierten und aktivierten Protoskolex jeweils stark exprimiert (TPM=145,45; TPM= 116,38) (Anhang A.3). WMISH Analysen im Protoskolex und Metazestoden wurden hierzu nicht durchgeführt. Anhand des Expressionsprofils wurde *em-fz10* in dieser Arbeit als Protoskolex assoziierter Marker angesehen und dessen Genexpression in RNAi behandelten Primärzellen via WMISH untersucht.

In Primärzellaggregaten der Kontrolle (*gfp*) konnten nur vereinzelte *em-fz10* positive Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 22 I. D). Nach *em-bcat1* RNAi war die Genexpression dagegen deutlich verstärkt in Zellen über das gesamte Aggregat verteilt. Zudem war im Vergleich zur Kontrolle auch eine Expression im Tegment und in Zellen, welche Kavitäten umgeben, nachzuweisen (Abbildung 22 II. D). In EdU<sup>+</sup> Zellen konnte keine Genexpression von *em-fz10* detektiert werden.



**Abbildung 22: WMISH zu *em-fz10* in *E. multilocularis* Primärzellen nach RNAi.**

An Tag 7 nach Elektroporation (RNAi) wurden die Primärzellen 5 Stunden mit 50 µM EdU kultiviert und fixiert. WMISH und EdU-Nachweis wurden in Primärzellen nach *em-bcat1* Knockdown und entsprechender Kontrolle (*gfp*) durchgeführt. **A** Zellkernfärbung in blau (DAPI), **B** EdU-positive Zellen in rot (Alexa 555), **C** Merge von DAPI- und EdU-positiven Zellen und RNA-Sonden-Signal **D** RNA-Sonden-Signal in grün (FITC), **E** Detail (Ausschnitt ca. 260x260 px) aus D. Es wurden keine doppelt-positiven Zellen (EdU<sup>+</sup> und RNA-Sonde) detektiert. Aufnahmen sind je Maximumintensitätsprojektionen eines konfokalen Z-Stapels. Die Messbalken repräsentieren 50 µm.

### 3.2.7.7 Der TGF- $\beta$ -Antagonist *em-fst* wird in Primärzellkulturen nach *em-bcat1* RNAi verstärkt exprimiert

Als letzter Anterior-assoziiertes Marker wurde die Genexpression von *follistatin* (*fst*) analysiert. *Fst* verhält sich als Antagonist zu Proteinen der TGF- $\beta$ -Familie, wie Activin und BMPs (Hedger et al. 2011). Die Expression ist u. a. für die Regeneration des anterioren Pols in *S. mediterranea* notwendig, wobei *fst* die Genexpression von *sfrp* und *ndk* direkt beeinflusst (Gaviño et al. 2013; Roberts-Galbraith und Newmark 2013). Da die Transkriptomdaten für *em-fst* eine um 254% erhöhte Expression nach *em-bcat1* Knockdown anzeigten, war das Gen für diese Arbeit interessant. Vorgehende WMISH Analysen zeigten, dass *em-fst*, in der Germinalschicht des Metazestoden exprimiert wurde. Im aktivierten, evaginierten Protoskolex erstreckte sich die Genexpression insbesondere über den anterioren Bereich und Saugnäpfe des Skolex. Zudem wurde *em-fst* von einzelnen Zellen am posterioren Pol exprimiert (Anhang A.18).

#### ***Em-fst*, ein *follistatin* Homolog in *E. multilocularis***

Die Genexpression in Metazestode und Protoskolex war bereits anhand von WMISH im Labor analysiert worden. Die Identifizierung als Homolog zu *fst* in Planarien war jedoch noch nicht publiziert worden.

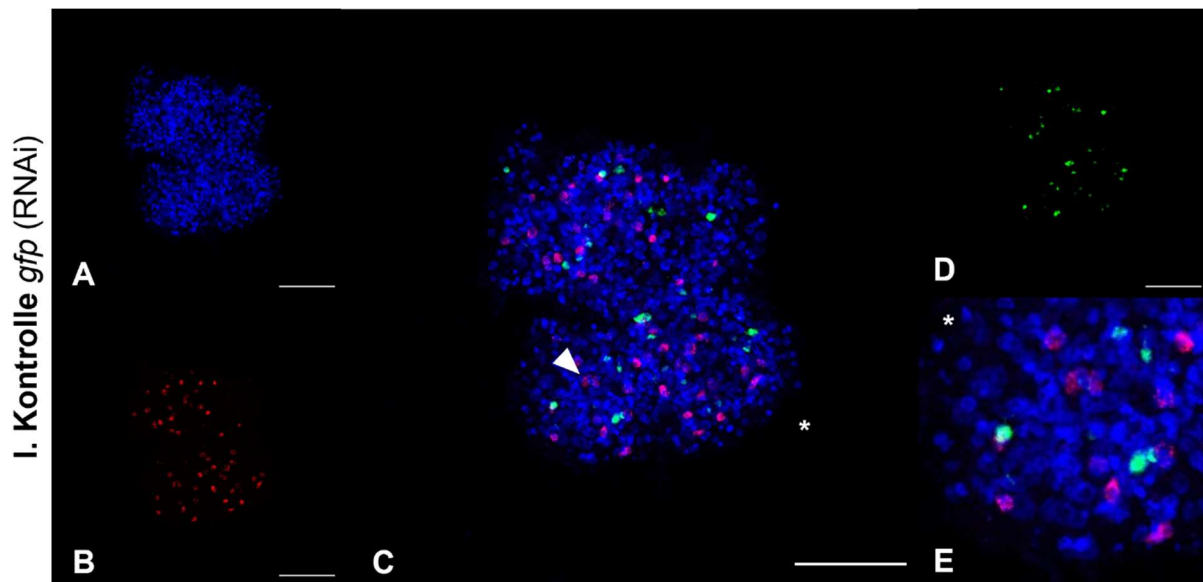
Die BLASTP-Analyse (WormBase ParaSite) der Proteinsequenzen zu FST in *S. mediterranea* (Uniprot ID: I1ZI69) bzw. *S. mansoni* (Uniprot ID: L0I710) gegen das vorhergesagte Proteom von *E. multilocularis* ergab jeweils als direktes Homolog das Genprodukt von EmuJ\_000278400 mit einem E-Value von  $5,1 \times 10^{-23}$  bzw.  $3,3 \times 10^{-28}$ . Die reziproke BLAST-Analyse gegen das vorhergesagte Proteom von *S. mansoni* und *S. mediterranea* bestätigte für EmuJ\_000278400 die hohe Homologie zu FST in beiden Organismen (E-Value *S. mansoni*  $3,6 \times 10^{-28}$  bzw. *S. mediterranea*  $3,1 \times 10^{-22}$ ). Zudem wurde eine Proteindomänenanalyse durchgeführt. Follistatin verfügt typischerweise über eine N-terminale, EGF-ähnliche-Domäne, drei Follistatin Domänen (FstD) und KAZAL-ähnliche Domänen. (Keutmann et al. 2004). Sowohl FST in *S. mansoni* als auch das Homolog in *E. multilocularis*, wiesen laut Vorhersage von SMART zwei FstD und KAZAL Domänen auf. Alignment der Proteinsequenzen zu den FST Homologen in *S. mansoni*, *S. mediterranea* und *E. multilocularis* zeigten diese hohe Homologie zueinander (Abbildung 23) und bestätigten das Genprodukt zu EmuJ\_000278400 als Fst Homolog.

L0I7I0_SCHMA	-----MEESISQLECCCKRG	14
A0A068XT73_ECHMU	---MVPLLIQVFLQ-----ALLVFTVSDAGSCFRIRLPNGRCHSELLQRNYITRSECCRLG	51
I12I69_SCHMD	MKMFITLSSLSSVVCNLAASSTIGSLKIGACFLEKSTRG-CSEF--IGYMNRNKCCCHYN	57
	:.:::***:.	
L0I7I0_SCHMA	GFYLNQRQITQQEYLTLDHLLFESGTPNCVQACNEELP-STCKGYVCPPEGHYCRMINNEPKC	73
A0A068XT73_ECHMU	GFYVSGHLTEPQFVRDLLLLRRRTGIANCHYSCQRGFHNEISCARVNCPPDGRFCEVQNHEAVC	111
I12I69_SCHMD	GFFVREPNAQQLFLA-AFLKHHIIPNCESSCSKDF----CADKICPVGFEFCIMRDEDSIC	112
	**::: : : : * . ** :*. : * ** * * : : : *	
L0I7I0_SCHMA	KRLQCNADYLTGPLCTTNLRRFHNQCHLQARCKSPKESLEVIPCPDEGLRCSDSLIL	133
A0A068XT73_ECHMU	ESSICIVEDFESGPVCTTDFRQFRNRCSFLKERCRNLDTLVEMECPPADHVCPYRQNT	171
I12I69_SCHMD	SSKICSEEQKSSGPFVCTATGRRYKKNKCELHLESCWINSQQNI-IPC-AKFGCE----	164
	. * : : : * : * : : * : * . . : *	
L0I7I0_SCHMA	SEKNLNLSLFKTLAEEYEERKGVPSLPSSSSLPSSSTSTTKSSLSDTDNQEYTDNEDDNV	193
A0A068XT73_ECHMU	SH-----L---E-----	175
I12I69_SCHMD	-R-----L-----	166
	.	*
L0I7I0_SCHMA	IIMNRRSTDLKTYIDKMNDESIFDEKSPYSNDELSKELICNANEYCLLRQFDGRPSCEY	253
A0A068XT73_ECHMU	-----DHDYAYPVRICPPNKVCIVRQYSGRACED	205
I12I69_SCHMD	-----NCHKRNKKCILT-LNGQSKCV-	186
	*: *::: .*: .*	
L0I7I0_SCHMA	WN-----EQSWQTLNKCPESTFNEPICSTDNQTFFYNCDLKLTLGLKNQLEVRI	301
A0A068XT73_ECHMU	PNWLGRKHIESAFDRVAVSNLSCANSPYGSPICGTDNNTYNNCHLRKASIQKLEIRI	265
I12I69_SCHMD	-----NKMLCI-GQLYDPICGVNDVNTYSSRCHLEESSIRQAKEIQI	226
	. . * . .****.** *: . *. . : : : : * : : *	
L0I7I0_SCHMA	AYKGEGRSKVTCSDIQCPRPDMRCSPHHLTGQPICMCAKLPLDCNASFRNGQETLTSST	361
A0A068XT73_ECHMU	AYLGPKRKNATCDQIRCSQSPHMTCPVHVRIQGFVCLDCTDLPPNCNPRVFRINPAEIAE	325
I12I69_SCHMD	AYSGVCRADANCMNVECEQESDMTCITHHRNGSPVCIKCPTSMRQCENGIYKIVELLCLST	286
	** * * * . . * : : * . * * * . * . : : * . : : *	
L0I7I0_SCHMA	SSSSSSSSSSSTGVLGKRKTQIFGDPVWKTVPVQT-----YGNPVVCGS-----N	405
A0A068XT73_ECHMU	MT-----LFEMFKEAKQNFQDPRWHGDVFTXWLASGMNKKVKVVPQCLLPTRLQLY	376
I12I69_SCHMD	-----NYETKNTCYKDFL--SQNNVFIENVLYSGQ-----CLLNAKWPR-	323
	: : * : *	
L0I7I0_SCHMA	GKTYRNICFLHVVNCLSDKFVGLKKPEFCSEIIPSKHDDWRRHFGK-----YSNL	455
A0A068XT73_ECHMU	RQTLRRPCLNWILSSRVSELSIVR-----PQEQLKRYFILKKERTSEVKSITTI	426
I12I69_SCHMD	-----	323
L0I7I0_SCHMA	----F-----	456
A0A068XT73_ECHMU	ITTFVILTSLASPHCCCLSCALMHATQDP	454
I12I69_SCHMD	-----	323

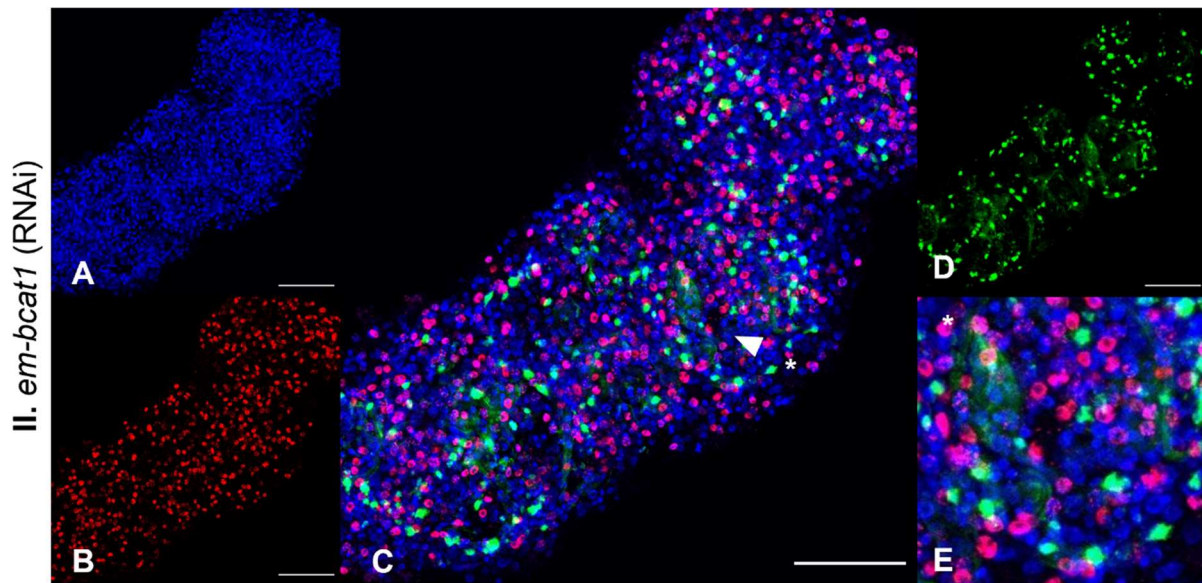
**Abbildung 23: Alignment von FST in *S. mansoni*, *E. multilocularis* und *S. mediterranea*.** Vergleich der Proteinsequenzen von FST in *S. mansoni* (SCHMA), *E. multilocularis* (ECHMU) und *S. mediterranea* (SCHMD) anhand von Clustal Omega Alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Vorhergesagte Proteindomänen wurden von SMART übertragen und zeigten eine hohe Homologie unter den FST Homologen auf. Follistatin-Domänen in orange, KAZAL Domänen in violett.

**WMISH zu *em-fst* in Primärzellen nach RNAi**

Die Genexpression von *em-fst*, war in Primärzellen der Kontrolle (*gfp*) in einzelnen Zellen innerhalb des Zellaggregats nachweisbar (Abbildung 24 I. D). Nach *em-bcat1* RNAi war in den analysierten Zellaggregaten eine erhöhte Anzahl von *em-fst*+ Zellen zu erkennen. Die Expression war dabei sowohl in Zellen über das gesamte Aggregat verteilt als auch um Kavitäten zu detektieren (Abbildung 24 II.D). Diese kavitätsassoziierte Genexpression war nur in Zellaggregaten nach *em-bcat1* RNAi nachweisbar. Es wurden nur jeweils zwei Zellaggregate fotografiert. Für ein aussagekräftiges Ergebnis ist eine Wiederholung der WMISH Analysen und Beurteilung einer höheren Anzahl von Primärzellaggregaten nötig.







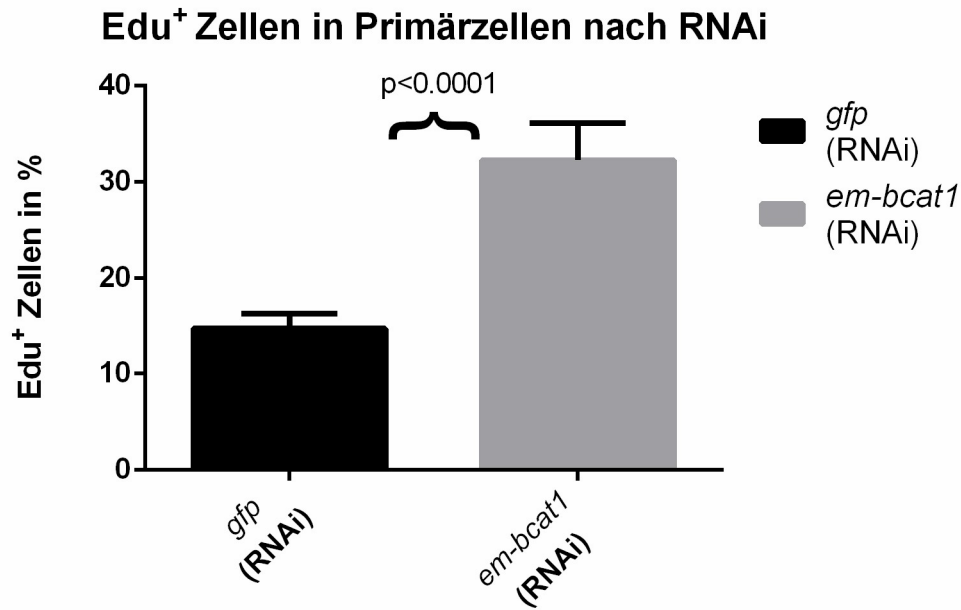
**Abbildung 24: WMSIH zu *em-fst* in *E. multilocularis* Primärzellen nach RNAi.**

An Tag 7 nach Elektroporation (RNAi) wurden die Primärzellen 5 Stunden mit 50  $\mu$ M EdU kultiviert und fixiert. WMISH und EdU-Nachweis wurden in Primärzellen nach *em-bcat1* Knockdown und entsprechender Kontrolle (*gfp*) durchgeführt. **A** Zellkernfärbung in blau (DAPI), **B** EdU-positive Zellen in rot (Alexa 555), **C** Merge von DAPI- und EdU-positiven Zellen und RNA-Sonden-Signal **D** RNA-Sonden-Signal in grün (FITC), **E** Detail (Ausschnitt ca. 260x260 px) aus D. Es wurden keine doppelt-positiven Zellen (EdU<sup>+</sup> und RNA-Sonde) detektiert. Aufnahmen sind je Maximumintensitätsprojektionen eines konfokalen Z-Stapels. Die Messbalken repräsentieren 50  $\mu$ m.

### 3.2.8 Der Knockdown von *em-bcat1* resultiert in erhöhter Proliferation der germinativen Zellen

Die germinativen Zellen sind in *E. multilocularis* die einzigen mitotisch aktiven Zellen und können mittels EdU-Einbau nachgewiesen werden (Koziol et al. 2014). Bereits bei Beurteilung der WMISH Analysen (3.2) fiel eine vermehrte Anzahl an EdU<sup>+</sup> Zellen nach *em-bcat1* Knockdown auf. Dieser visuelle Eindruck wurde durch Auszählen der Zellen genauer beurteilt. Da die Zellaggregate stets unterschiedlich groß waren, wurden die EdU<sup>+</sup> Zellen ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl, repräsentiert durch die Anzahl an DAPI-positiven Zellen, gesetzt (Abbildung 25; Tabelle 5).

Die Anzahl an EdU<sup>+</sup> Zellen betrug in Primärzellaggregaten der Kontrolle (*gfp*) 14,79% der Gesamtzellzahl. Nach *em-bcat1* Knockdown einsprachen mit 32,28% mehr als doppelt so viele Zellen proliferierenden germinativen Zellen (Abbildung 25). Der visuelle Eindruck konnte somit statistisch bestätigt werden.



**Abbildung 25: Anzahl an proliferierenden Zellen in *E. multilocularis* Primärzellen nach RNAi.**

In Primärzellaggregaten nach RNAi (*em-bcat1*) stellten 32,28% der Gesamtzellzahl Edu<sup>+</sup> Zellen dar. Dies entsprach mehr als doppelt so vielen proliferierenden (germinativen-) Zellen im Vergleich zur RNAi Kontrolle (*gfp*) mit 14,79% Edu<sup>+</sup> Zellen. Analyse über GraphPad Prism, Mann-Whitney-Test, p-Wert <0,0001.

**Tabelle 4: Ermittelte Werte von Gesamtzellzahl (DAPI) und EdU<sup>+</sup> Zellen in *E. multilocularis* Primärzellaggregaten nach *gfp*- und *em-bcat1* RNAi.**

Je biologischem Replikat (bRp) wurde die Gesamtzellzahl (DAPI) und die EdU<sup>+</sup> Zellen von drei Zellaggregaten manuell ausgezählt. Die Anzahl der EdU<sup>+</sup> Zellen verdoppelte sich nach *em-bcat1* Knockdown von 15% auf 32% der Gesamtzellzahl.

RNAi Probe	Zellen	Anzahl Zellen (n)	% EdU <sup>+</sup> Zellen	MW % EdU <sup>+</sup> Zellen	MW % EdU <sup>+</sup> Zellen gesamt
<i>gfp</i> bRp 1	DAPI	659			14,49
	EdU	77	11,68		
	DAPI	308			
	EdU	48	15,58		
	DAPI	488			
	EdU	79	16,19		
<i>gfp</i> bRp 2	DAPI	268			14,79
	EdU	45	16,79		
	DAPI	1028			
	EdU	153	14,88		
	DAPI	335			
	EdU	53	15,82		
<i>gfp</i> bRp 3	DAPI	428			14,05
	EdU	59	13,79		
	DAPI	606			
	EdU	86	14,19		
	DAPI	783			
	EdU	111	14,18		
<i>em-bcat1</i> bRp 1	DAPI	1847			30,16
	EdU	587	31,78		
	DAPI	429			
	EdU	129	30,07		
	DAPI	311			
	EdU	89	28,62		
<i>em-bcat1</i> bRp 2	DAPI	300			32,28
	EdU	100	33,33		
	DAPI	778			
	EdU	242	31,11		
	DAPI	1012			
	EdU	263	25,99		
<i>em-bcat1</i> bRp 3	DAPI	682			36,55
	EdU	257	37,68		
	DAPI	245			
	EdU	91	37,14		
	DAPI	718			
	EdU	250	34,82		

### 3.3 Charakterisierung der medio-lateral Achse in *E. multilocularis*

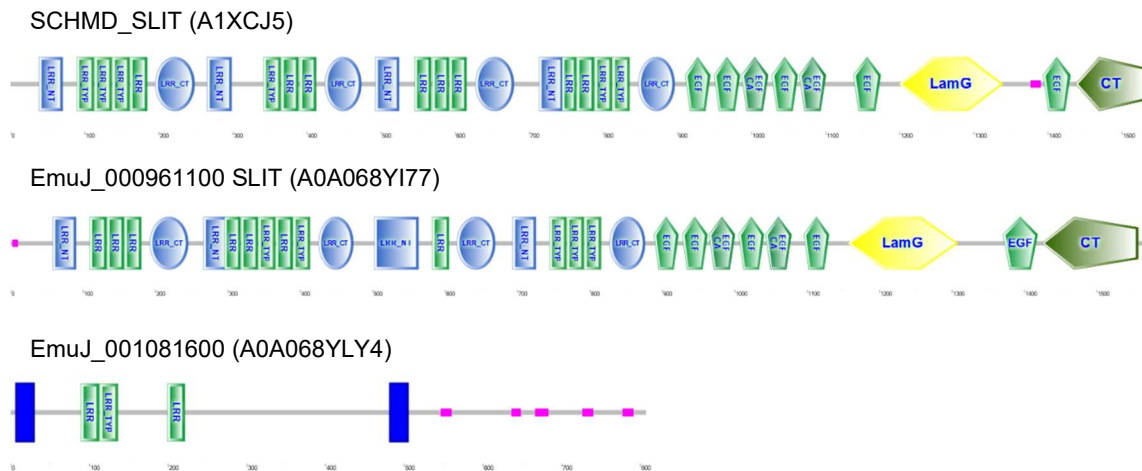
#### 3.3.1 *Em-slit* ist Teil der ML-Achse in *E. multilocularis*

Bisher war bezüglich der Körperachsen in *E. multilocularis* nur der Wnt-Signalweg für die Determinierung der AP-Achse bekannt. Zu den verbleibenden Körperachsen, wie der DV- und ML-Achse war bisher nur zu *em-wnt5* eine laterale Genexpression im Protoskolex beschrieben (Koziol et al. 2016a). Im Rahmen dieser Arbeit wurde Augenmerk auf Gene gelegt, welche die ML-Achse beeinflussen könnten. Von *S. mediterranea* war bekannt, dass *wnt5* und *slit2* an der Ausbildung der ML-Achse beteiligt sind (Cebrià et al. 2007; Gurley et al. 2010; Reddien 2011). *Slit2* ist organismenübergreifend entlang der Mittellinie exprimiert und verhindert durch Interaktion mit Robo-Rezeptoren die Passage von Axonen über die Mittellinie hinaus (Blockus und Chédotal 2016).

#### *Em-slit* ist ein Homolog zu *slit* in *S. mediterranea*

Die Suche nach SLIT Homologen in *E. multilocularis* wurde anhand der Proteinsequenz des *S. mediterranea* SLIT1, annotiert als A1XCJ5, mittels BLASTP Analyse (WormBase ParaSite) durchgeführt. Diese ergab mit einem E-Value von  $1,8 \times 10^{-73}$  die höchste Homologie zum Protein des Gens mit der Zugangsnummer EmuJ\_000961100, annotiert als *slit2*. Die reziproke BLASTP Analyse anhand der Proteinsequenz zu EmuJ\_000961100 (A0A068YI77) bestätigte die hohe Homologie zu SLIT in *S. mediterranea*. Die manuelle Suche nach „*slit*“ im vorhergesagten Transkriptom von *E. multilocularis* zeigte noch ein weiteres Gen annotiert unter EmuJ\_001081600 als „*slit1*“ auf. Die zugehörige reziproke BLAST Analyse via WormBase ParaSite und EXPASY ergab keine SLIT Homologe, sondern weitestgehend nicht charakterisierte Proteine. Zum Genprodukt von EmuJ\_001081600 konnten anhand von Proteindomänenanalysen via SMART und PROSITE ebenfalls keine Homologien zu SLIT identifiziert werden und stellte sich somit als Fehlannotation heraus (Daten nicht gezeigt). Die vorhergesagten Proteindomänen über SMART zeigte für das Genprodukt zu EmuJ\_000961100, ähnliche Domänen wie zu SLIT in *S. mediterranea*. So besitzt das Genprodukt zu EmuJ\_000961100, wie SLIT in *S. mediterranea*, vier Leucin-reiche Repeats (LRRs), sieben EGF-ähnliche Domänen, eine Laminin G Domäne sowie eine Cystein-reichen-,C-terminal cystein knot-like (CTCK)-Domäne (CT) am C-terminus. Die Laminin G Domäne ist eingebettet zwischen der sechsten und siebten EGF-Domäne (Cebrià et

al. 2007) (Abbildung 27). Aufgrund seiner hohen Homologie zu SLIT in *S. mediterranea* konnte das Genprodukt zu EmuJ\_000961100 als einziges SLIT Homolog in *E. multilocularis* identifiziert werden.



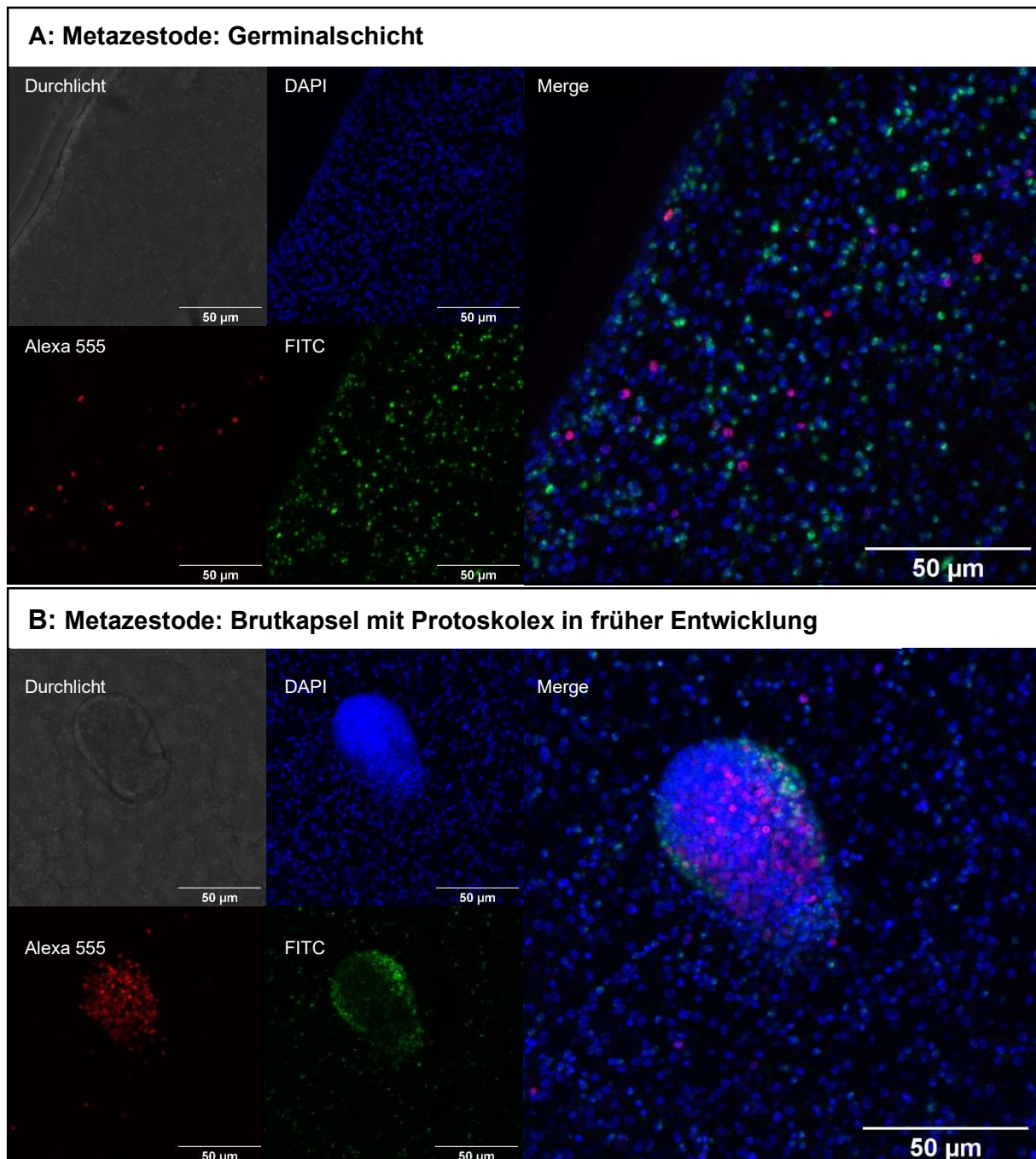
**Abbildung 26: Proteindomänenanalyse der Slit Homologe in *S. mediterranea* und *E. multilocularis*.**

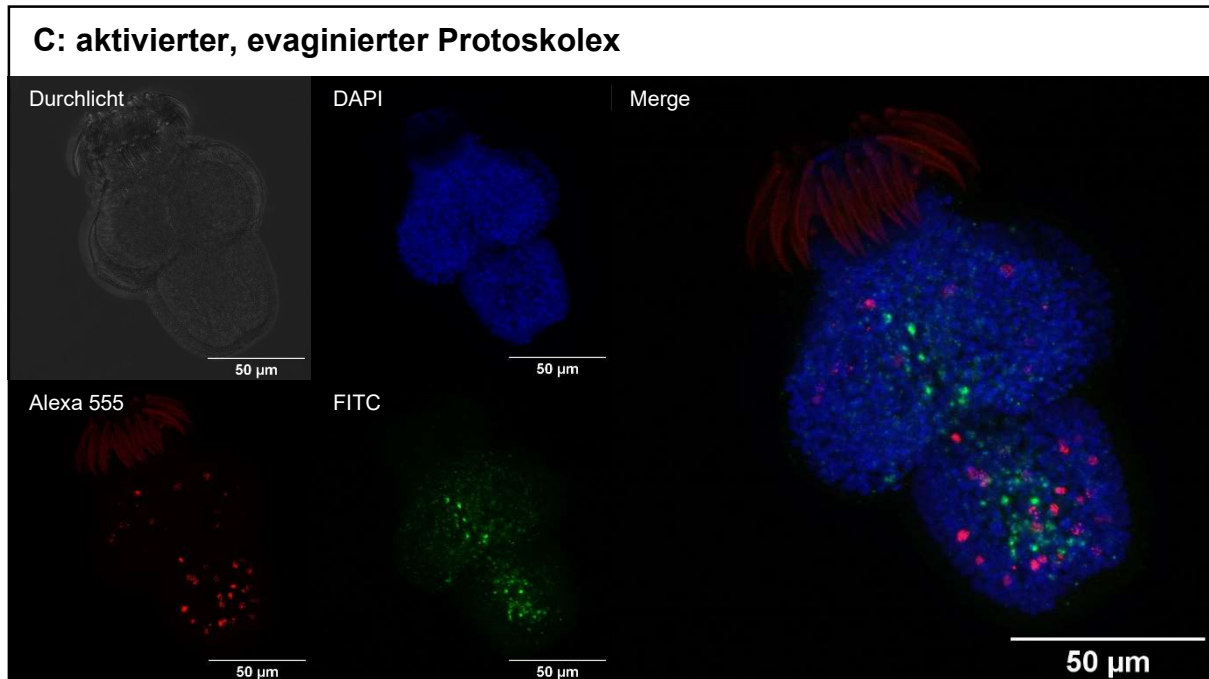
Vorhersagen von Proteindomänen mittels SMART für SLIT in *S. mediterranea* (SCHMD) und *E. multilocularis* sowie zum Genprodukt des in den Transkriptomdaten als „*slit1*“ annotierten Gens, EmuJ\_001081600. Entsprechende Uni-Prot Zugangsnummern in Klammern. SLIT verfügt charakteristisch über vier LRP-Domänen, sieben EGF-ähnlichen-Domänen, einer Laminin G Domäne (LamG) und einer Cystein-reichen-Domäne (CT). Das als „*slit1*“ annotierte Gen, EmuJ\_0018081600, erwies sich als Fehlannotation.

### WMISH zu *em-slit* in Metazestode und Protoskolex

Die WMISH zu *em-slit* zeigte eine homogene Genexpression über die Germinalschicht im Metazestoden verteilt (Abbildung 27 A). Die Expression war mit Fortschritt der Entwicklung der Brutkapsel an zwei gegenüberliegenden Seiten des sich entwickelnden Protoskolex nachzuweisen (Abbildung 27 B). Im aktivierten, evaginierten Protoskolex, verlief die Genexpression von *em-slit* in einem Streifen vom Skolex über den Bereich zwischen zwei Saugnäpfen bis hin zum posterioren Bereich, möglicherweise die Mittellinie repräsentierend (Abbildung 27 C). Durch 3D Projektion konnte die Genexpression genauer dargestellt werden und zeigte sich in einem einseitig, lateral gelegenen Streifen des Protoskolex (Anhang A.20). Durch Verstärkung des FITC-Signals der Sonde in Fiji, war auch eine Expression an der gegenüberliegenden Seite zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise konnte das Signal aufgrund der begrenzten Tiefenschärfe nicht ausreichend detektiert werden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse war die Expression von *em-slit* in lateralen, sich gegenüberliegenden Zellen nur für Brutkapseln nachgewiesen. Für den aktivierten, evaginierten Protoskolex ist das Expressionsmuster hingegen nur einseitig

festzustellen. In EdU<sup>+</sup> Zellen konnte keine Genexpression von *em-slit* detektiert werden (Abbildung 27).





**Abbildung 27: WMISH zu *em-slit* im *E. multilocularis* Metazestode und Protoskolex.**

Genexpression von *em-slit* innerhalb der Germinalschicht des Metazestoden (A), Brutkapseln in früher Entwicklung S1 (B) sowie aktiviertem, evaginiertem Protoskolex (C). Es war keine Genexpression in EdU-positiven Zellen detektierbar. Genexpression in grün (FITC); EdU-positiv-positive Zellen in rot (Alexa 555); Zellkerne in blau (DAPI). *Merge* entspricht Overlay der Kanäle grün, rot und blau. Die Beurteilung der Stadien in der Protoskolex Entwicklung (S1-S7) wurden von Leducq und Gabrion (1992) übernommen.

### 3.3.2 Roundabout Homologe in *E. multilocularis*

Da die Mittellinie in Metazoa über den Slit-Robo Signalweg definiert wird, wurden neben SLIT auch Homologe zum zugehörigen Rezeptor Roundabout (ROBO) in *E. multilocularis* analysiert (Blockus und Chédotal 2016). ROBO scheint in Planarien eine zentrale Rolle, u. a. im Aufbau des Zentralen Nervensystems zu spielen. So ist nach RNAi von *roboA* in *S. mediterranea* die Regeneration des ZNS und der anterioren Region beeinträchtigt (Cebrià und Newmark 2007).

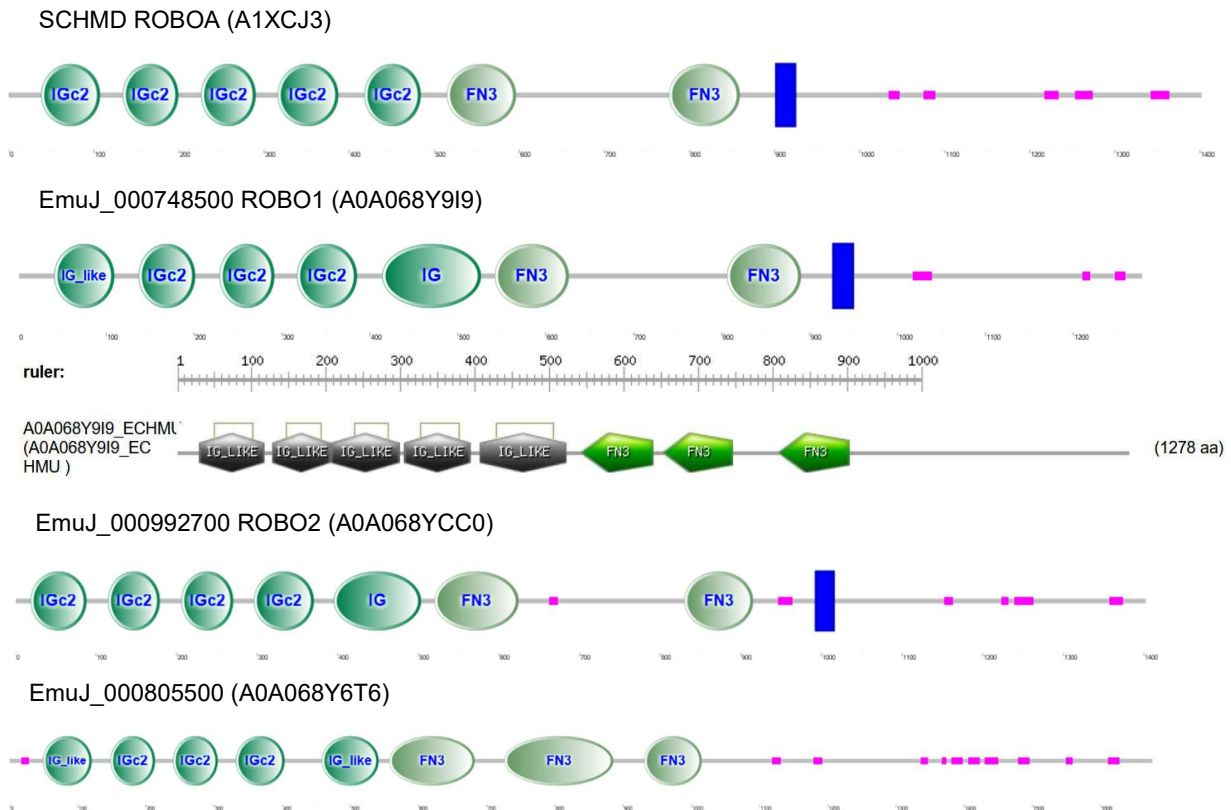
#### ***Em-robo1* ist ein Homolog zu *roboA* in *S. mediterranea***

Die BLASTP Analyse (WormBase ParaSite) der Proteinsequenz von ROBOA in *S. mediterranea* (A1XCJ3) ergab drei als „roundabout2“ annotierte Gene in *E. multilocularis* (EmuJ\_000992700: E-Value  $6,0 \times 10^{-53}$ ; EmuJ\_000805500: E-Value  $6,0 \times 10^{-36}$  und EmuJ\_000748500: E-Value  $6,1 \times 10^{-10}$ ). Die BLASTP Analyse der Proteinsequenz von ROBOB in *S. mediterranea* (A1XCJ4) zeigte eine hohe Homologie zu zwei der potentiellen ROBOA Homologe in *E. multilocularis* (EmuJ\_000805500: E-Value  $1,6 \times 10^{-12}$  und EmuJ\_000992700: E-Value  $1,4 \times 10^{-8}$ ) und keine signifikante Homologie zu EmuJ\_000748500 mit einem E-Value von 0,048.

Die weitere Analyse erfolgte anhand von Proteindomänenanalysen. Die für ROBO charakteristische Proteinstruktur verfügt über fünf Immunglobulin(IG)-ähnliche Domänen, drei Fibronectin (FN)-Domänen und einer Transmembrandomäne (Dickson und Gilestro 2006). Die vorhergesagten Proteindomänen wurden über PROSITE und SMART analysiert und waren nicht für alle Homologe einheitlich. Deshalb wurden die Ergebnisse der beiden Tools verglichen und entsprechend vereint (Abbildung 28). Für ROBOA in *S. mediterranea* wurden fünf IG-Domänen, zwei FN-Domänen und eine Transmembrandomäne vorhergesagt. Die Analyse über SMART ergab für EmuJ\_000748500 zwei FN-Domänen, über PROSITE drei FN-Domänen. Zudem zeigte die Analyse via SMART Transmembrandomänen für EmuJ\_000748500 und EmuJ\_000992700, während PROSITE keine Transmembrandomäne vorhersagte (Abbildung 28). So ergab sich für die drei in *E. multilocularis* annotierten ROBO fünf IG-ähnliche-Domänen, drei FN-Domänen (EmuJ\_000748500 und EmuJ\_000805500), bzw. zwei FN-Domänen (EmuJ\_000992700) und eine Transmembrandomäne (EmuJ\_000748500 und EmuJ\_000992700) (Abbildung 28).

Zusammenfassend wies das Genprodukt zu EmuJ\_000748500 anhand dieser Analysen keine signifikante Homologie zu ROBOB auf, hingegen eine hohe Homologie zu ROBOA in *S. mediterranea*. Zudem konnten anhand der Proteindomänenanalysen alle Charakteristika für ROBO aufgezeigt werden. Somit wurde das Genprodukt zu EmuJ\_000748500 als ROBO in *E. multilocularis* identifiziert und das zugehörige Gen entsprechend *em- robo1* benannt. Als weiteres potentiell Homolog zu ROBOA konnte EmuJ\_000992700 nicht ausgeschlossen werden und wurde als *em- robo2* aufgenommen. Das dritte vorhergesagte ROBO, EmuJ\_000805500, wurde aufgrund der BLASTP Analysen und hohen Homologie zu ROBOB in *S. mediterranea* sowie abweichender Proteindomänen zu ROBOA in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.



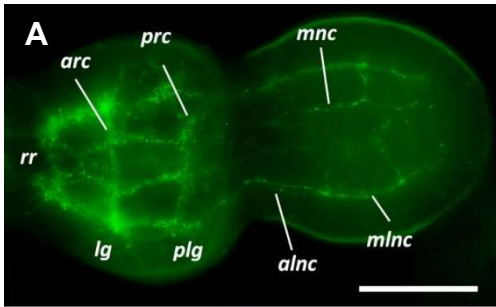


**Abbildung 28: Proteindomänenanalyse von ROBO-Homologen in *S. mediterranea* und *E. multilocularis*.**

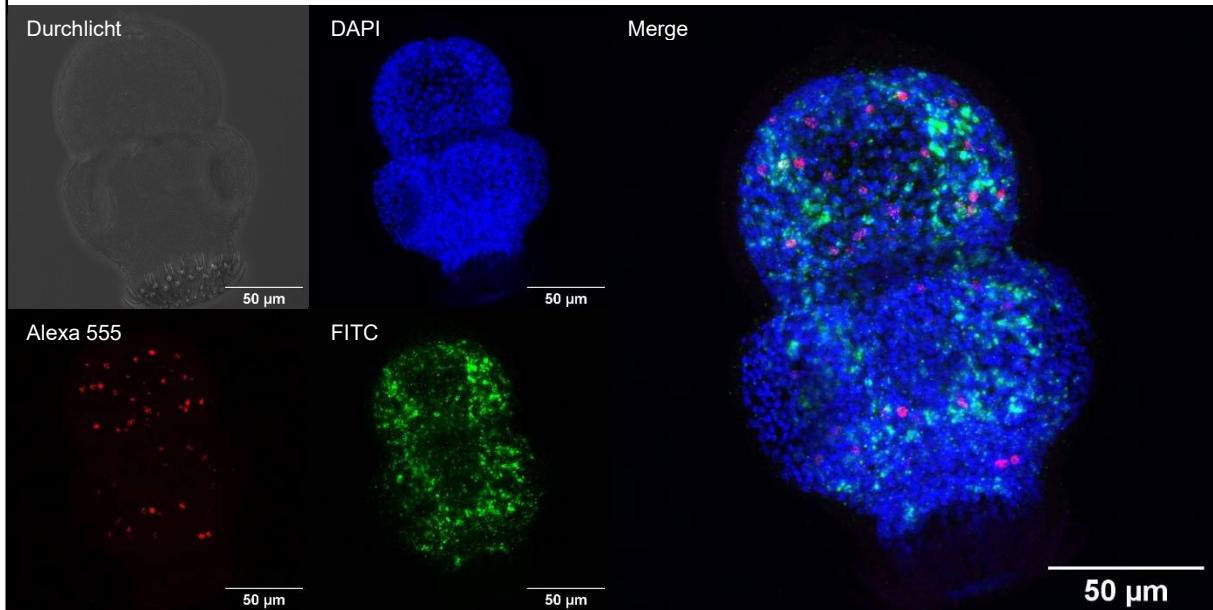
Vorhersagen von Proteindomänen über SMART und PROSITE für ROBO Homologe in *E. multilocularis* (EmuJ\_000748500, EmuJ\_000992700 und EmuJ\_000805500) im Vergleich mit ROBOA in *S. mediterranea* (SCHMD). Entsprechende Uni-Prot Zugangsnummern in Klammern. FN: Fibronectin Domänen, IG: Immunglobulin-(ähnliche) Domänen, blauer Balken repräsentiert je eine Transmembrandomäne, aa: Aminosäure.

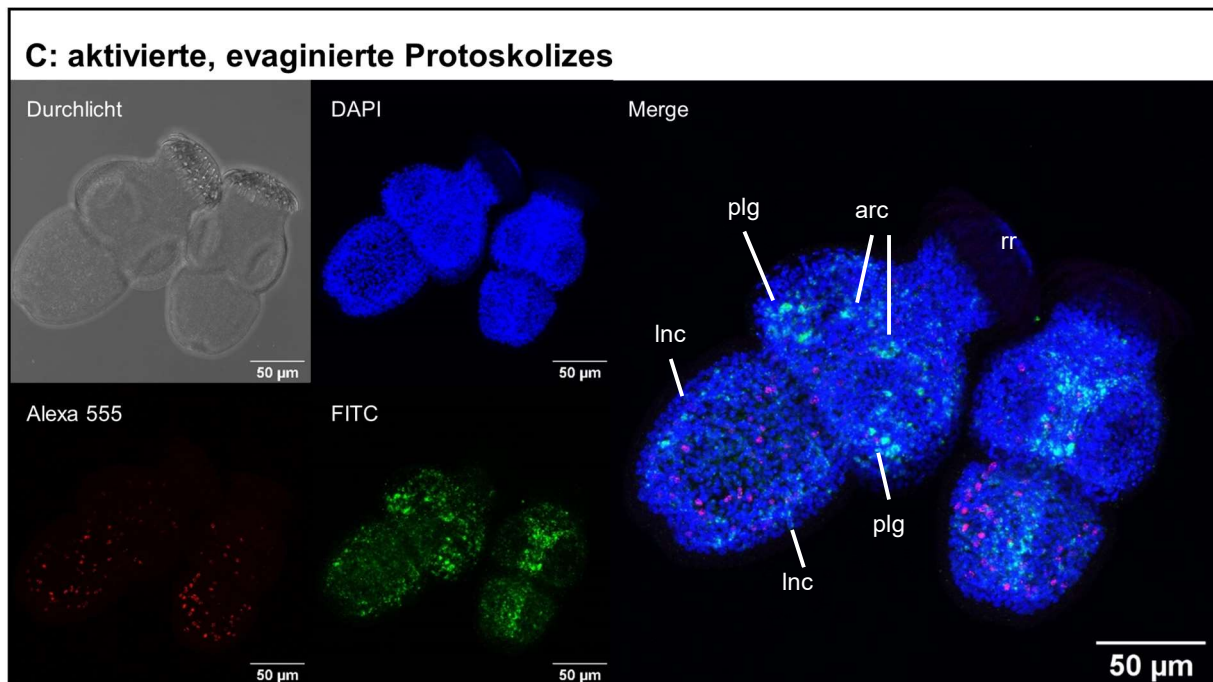
### WMISH zu *em- robo1* im Protoskolex

Die WMISH zu *em- robo1* ergab ein auffälliges Expressionsmuster, welches den Analysen zum ZNS in *E. multilocularis* glich (Koziol et al. 2013) (Abbildung 29A). Entsprechend wurde die Genexpression *em- robo1*, im Rostellumring (rr), den lateralen Ganglien (lg), in der anterioren Ring-Kommissur (arc), den posterioren lateralen Ganglien (plg) und in lateralen Nervensträngen (lnc) im posterioren Teil des Protoskolex nachgewiesen (Vgl. Abbildung 29 A und C). Die Genexpression von *em- robo1* zeigte sich planar und stellte sich in einer mittig liegenden Ebene des Protoskolex dar, was insbesondere über die 3D Projektion deutlich wurde (Abbildung 29 C und Anhang A.21). In EdU<sup>+</sup> Zellen konnte keine Genexpression von *em- robo1* nachgewiesen werden (Abbildung 29).



**B: aktivierter, evaginierter Protoskolex**



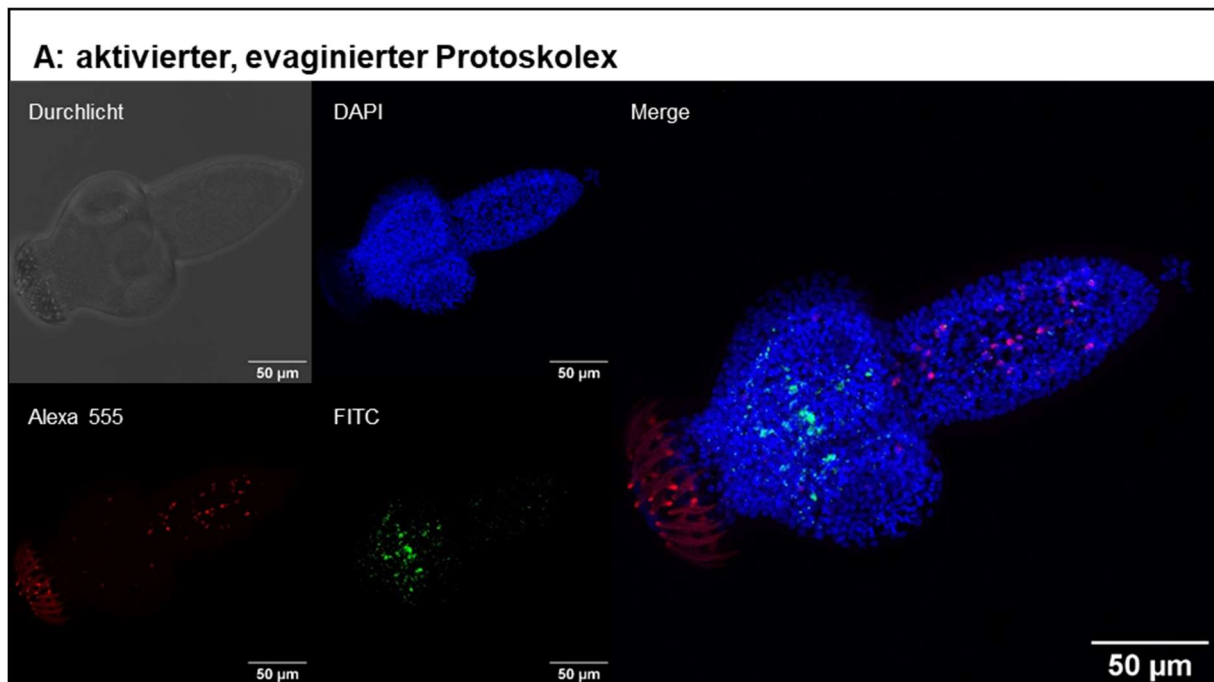


**Abbildung 29: WMISH zu *em-rob1* im *E. multilocularis* Protoskolex.**

WMISH zu *em-rob1* in aktivierten, evaginierten Protoskolizes. Das Expressionsmuster (**B,C**) ist vergleichbar mit FMRFa-Immunreaktivitäts-Versuchen (**A**), wodurch das zentrale Nervensystem abgebildet werden konnte (Abbildung **A** aus Koziol et al. (2013), Messbalken 50 µm. Rostellumring (rr), laterale Ganglien (lg), anteriore Ring-Kommisur (arc), posteriore lateralee Ganglien (plg), laterale Nervenstränge (Inc). Es konnte keine Genexpression in EdU-positiven Zellen nachgewiesen werden (Alexa 555). Genexpression in grün (FITC); EdU-positiv Zellen in rot (Alexa 555); Zellkerne in blau (DAPI). *Merge* entspricht Overlay der Kanäle grün, rot und blau.

### WMISH zu *em-rob2* im Protoskolex

Die Genexpression von *em-rob2* stellte sich vorwiegend in der anterioren Region dar, teilweise mit übereinstimmenden Mustern von *em-rob1* (Abbildung 30). Da die sense Sonde ein starkes unspezifisches Signal hervorbrachte, wurde die Farbbalance des grünen Kanals entsprechend auf ein Minimum von 80 in sense und antisense Bildern eingestellt. Die Änderung der Signalstärke hatte zur Folge, dass das Signal im posterioren Bereich nahezu verschwand und somit die Genexpression nur noch im Skolex nachweisbar war. Um zur Genexpression von *em-rob1* nähere Aussagen treffen zu können, sind weitere Analysen mit einer neuen, spezifischeren RNA-Sonde nötig. In EdU<sup>+</sup> Zellen konnte keine Genexpression von *em-rob1* detektiert werden.



**Abbildung 30: WMISH zu *em-robo2* im *E. multilocularis* Protoskolex.**

WMISH zu *em-robo2* im aktivierten, evaginierten Protoskolex (**A**). Es konnte keine Genexpression in EdU-positiven Zellen nachgewiesen werden (Alexa 555). Genexpression in grün (FITC); EdU-positive Zellen in rot (Alexa 555); Zellkerne in blau (DAPI). *Merge* entspricht Overlay der Kanäle grün, rot und blau.

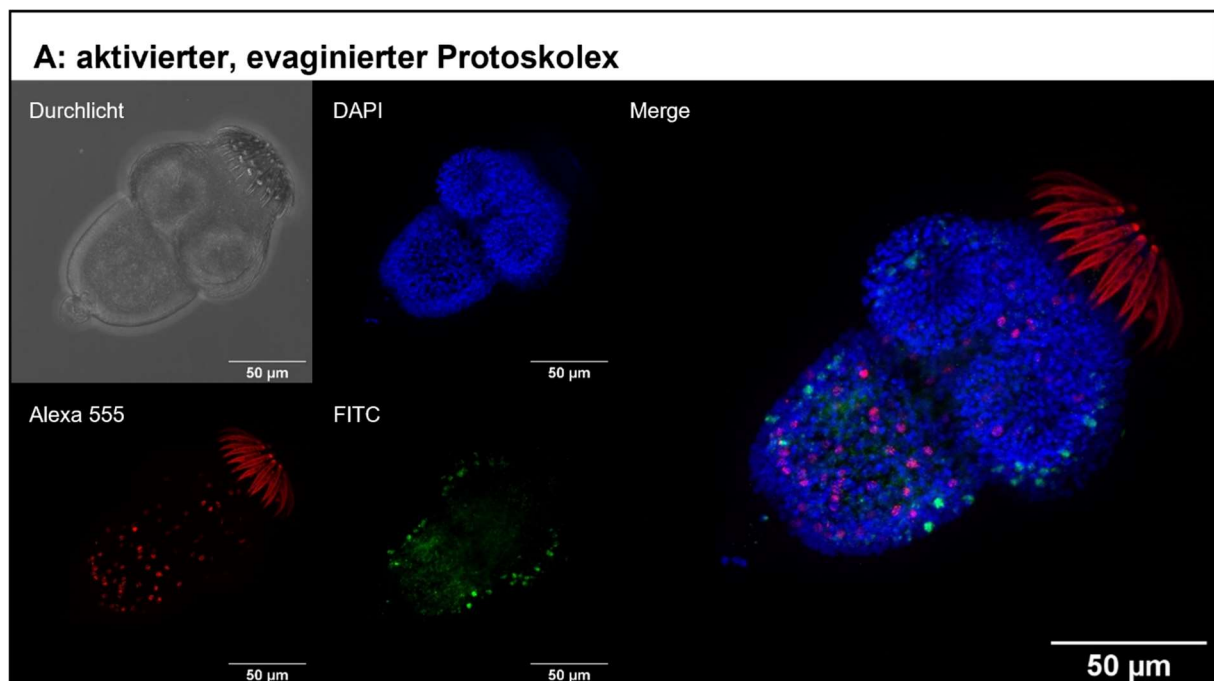
### 3.3.3 *Em-wnt5* wird im Protoskolex lateral exprimiert

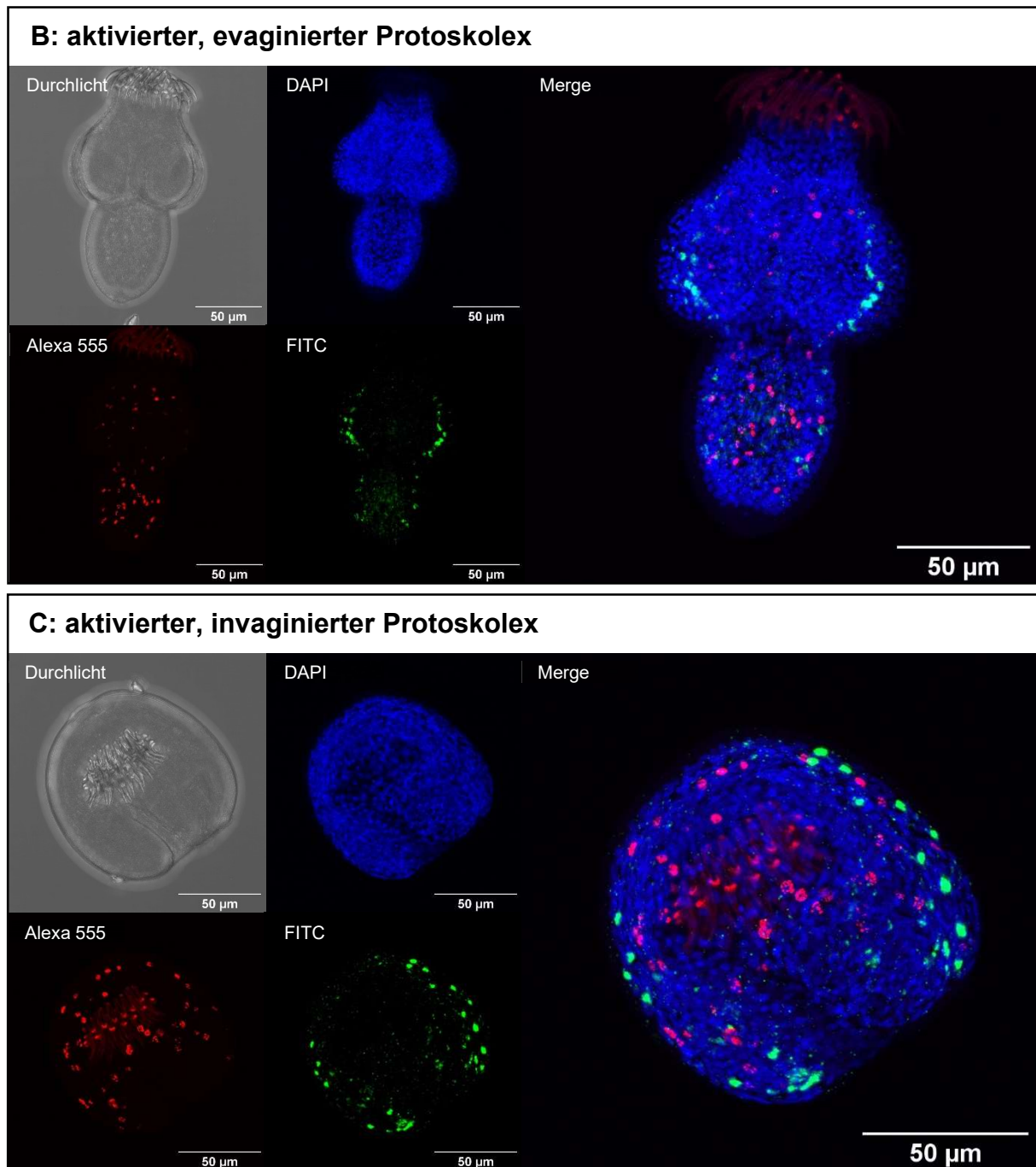
Neben *slit* und *robo* spielt auch *wnt5* eine wichtige Rolle in der Ausbildung der ML-Achse. So definiert *wnt5*, als Teil des nicht kanonischen Wnt-Signalweges, gemeinsam mit *slit2* die ML-Achse in Planarien (Adell et al. 2010; Gurley et al. 2010). Die Organisation von medialem- und lateralem Gewebe erfolgt in *S. mediterranea* durch das wechselseitige Zusammenspiel von *slit* und *wnt5*. *slit* wird von Zellen entlang der Mittellinie exprimiert, während *wnt5* lateral, an der Grenze von dorsaler und ventraler Körperachse, exprimiert wird. So wird eine unkontrollierte Verteilung von medialen oder lateralen Zellen verhindert (Gurley et al. 2010; Reddien 2018). Vorgehende Arbeiten im Labor zeigten bereits, dass *em-wnt5* in *E. multilocularis* ebenfalls lateral exprimiert wird (Koziol et al. 2016a). Durch weitere WMISH und Darstellung durch 3D Projektionen wurde die Genexpression von *em-wnt5* genauer untersucht.

#### **WMISH zu *em-wnt5* im Protoskolex**

Für die Analyse der Genexpression durch WMISH wurde eine neue RNA-Sonde hergestellt. *Em-wnt5* wurde lateral exprimiert, wobei die Genexpression prominent an zwei Seiten des Protoskolex in sich gegenüberliegenden Zellen nachzuweisen war.

Zudem war *em-wnt5* weniger stark über den gesamten Körper lateral exprimiert. Dies wurde insbesondere durch die 3D Projektion der Z-Stapel Aufnahmen deutlich (Anhang A.21). Die Expression verlief dabei vom Skolex bis hin über den posterioren Teil des Protoskolex und war dort in einer Zelle am posterioren Pol nachweisbar (Abbildung 31, Anhang A.21). Dabei war die Expression nicht auf den Bereich zwischen den Saugnapfpaaren begrenzt, sondern fand auch an den Saugnäpfen selbst statt. Da das Signal der Sonde schwach war, wurde die Intensität des Signals der FITC markierten RNA-Sonde für in Bilde in 3D Darstellung nachjustiert, sodass die Genexpression auch am Skolex deutlich erkennbar war (Anhang A.21; „max175“). Es konnte keine Genexpression von *em-wnt5* in EdU<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden.





**Abbildung 31: WMISH zu *em-wnt5* im aktivierten, evaginierten und invaginierten *E. multilocularis* Protoskolex.**

WMISH zu *em-wnt5* im aktivierten, evaginierten (A, B) und invaginierten Protoskolex (C). Es konnte keine Genexpression in EdU-positiven Zellen nachgewiesen werden (Alexa 555). Genexpression in grün (FITC); EdU-positiv Zellen in rot (Alexa 555); Zellkerne in blau (DAPI). *Merge* entspricht Overlay der Kanäle grün, rot und blau.

### 3.3.4 ***Em-ror2* wird im *E. multilocularis* Protoskolex lateral exprimiert**

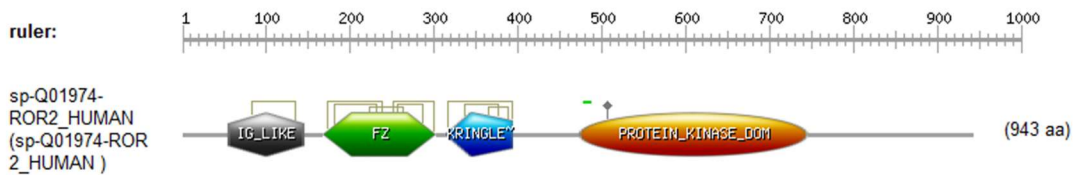
Als Rezeptor und möglicher Interaktionspartner von Wnt5 ist Ror2 in der Literatur beschrieben (Ripp et al. 2018; Green et al. 2008; Liu et al. 2008). Ror-Rezeptoren sind Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und agieren als Alternative- und Co-Rezeptoren mit Wnt-Liganden (Stricker et al. 2017). Ob zu Ror2 in *E. multilocularis* ein Homolog vorhanden ist und welche Genexpressionsmuster dieses aufweist, wurde untersucht.

#### ***Em-ror2*, ein *ror2* Homolog in *E. multilocularis***

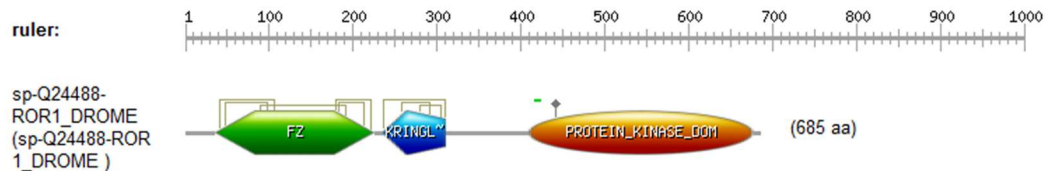
Die BLASTP Analyse (WormBase ParaSite) der Proteinsequenz des humanen ROR2 (Q01974) gegen das *E. multilocularis* Proteom ergab mit einem E-Value von  $1,0 \times 10^{-34}$  das Genprodukt zu EmuJ\_000461400. Neben diesem, waren die Gene EmuJ\_000904100, EmuJ\_000641500 und EmuJ\_000969600 aufgeführt. Die BLASTP Analyse von ROR in *D. melanogaster* (Q24488) (Wilson et al. 1993) bestätigte die bereits genannten Gene EmuJ\_000962900 und EmuJ\_000981300 als potentielle ROR Homolog in *E. multilocularis*. Die reziproke BLAST Analyse bestätigte hingegen nur für das Genprodukt zu EmuJ\_000461400 als ROR.

ROR verfügt charakteristisch über eine Immunoglobulin (IG) Domäne, eine Cysteinreiche Frizzled-Domäne (FZ), eine Kringle (KR) Domäne und eine Tyrosinkinase-Domäne (Wilson et al. 1993; Green et al. 2008). Für das humane ROR2 wurden alle für ROR2 charakteristischen Domänen vorhergesagt (Abbildung 32). ROR2 in *D. melanogaster* hingegen verfügt über keine IG-ähnliche Domäne. Das Genprodukt zu EmuJ\_000461400 weist bis auf eine KR-Domäne, alle für ROR2 charakteristischen Domänen auf (Abbildung 32). Die Vorhersage der Proteindomänen erfolgte dabei mittels PROSITE, da nur über dieses Tool FZ-Domänen aufgezeigt wurden. Anhand der BLAST Analyse und der Ergebnisse der Proteindomänenanalyse, ergab sich das Genprodukt von EmuJ\_000461400, annotiert unter A0A068XY82, als ROR2 Homolog in *E. multilocularis*.

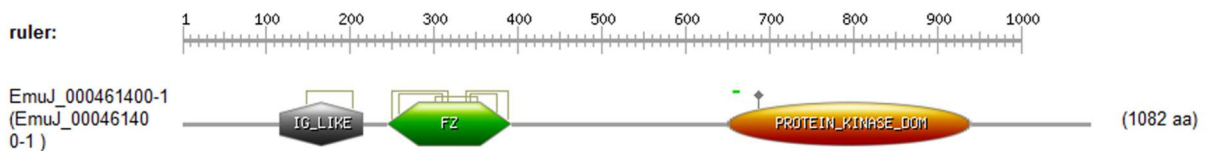
## ROR2\_HUMAN (Q01974)



## ROR2\_DROME (Q24488)



## EmuJ\_000461400 ROR2 (A0A068XY82)



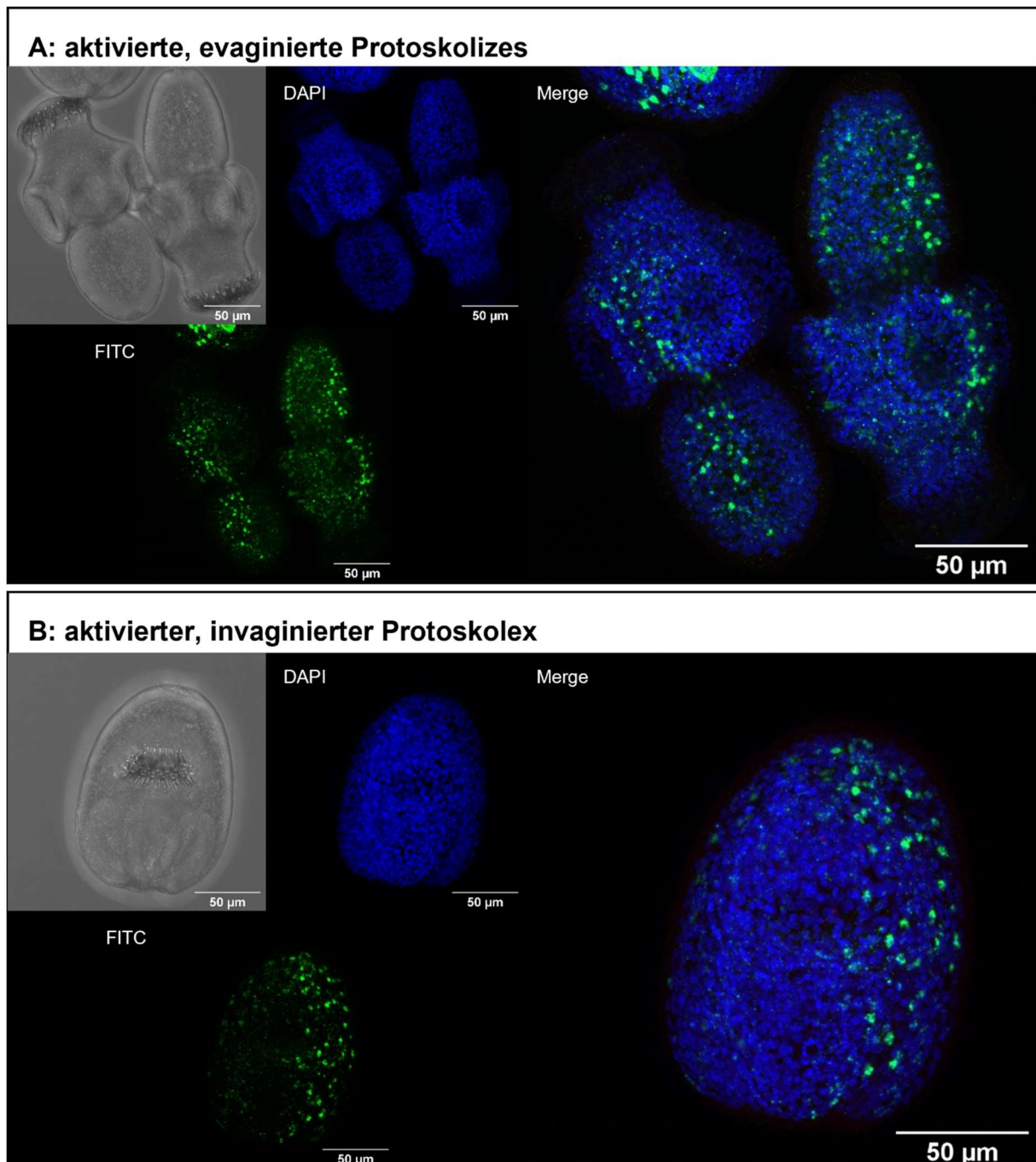
**Abbildung 32: Proteindomänenanalyse der ROR2 Homologe in *H. sapiens*, *D. melanogaster* und *E. multilocularis*.**

Vorhersagen von Proteindomänen mittels PROSITE für ROBO Homologe in *H. sapiens* (HUMAN), *D. melanogaster* (DROME) und *E. multilocularis* im Vergleich. Entsprechende UniProt Zugangsnummern in Klammern. IG: Immunglobulin-(ähnliche) Domänen, FZ: Frizzled Domäne, Kringle Domäne, Proteinkinase-Domäne, aa: Aminosäure.

**WMISH zu *em-ror2* im Protoskolex**

Die Genexpression von *em-ror2* zeigte sich im aktivierten Protoskolex lateral an zwei Seitensträngen zwischen und an den Saugnäpfen verlaufend (Abbildung 33 A). Auch im aktivierten, invaginierten Protoskolex stellte sich die Genexpression lateral, zwischen den Saugnäpfen verlaufend, dar (Abbildung 33 B). Durch 3D Projektion konnte die Expression von *em-ror2* in einer mittig durch den Protoskolex verlaufenden Ebene lokalisiert werden (Anhang A.22). In EdU<sup>+</sup> Zellen konnte keine Genexpression von *em-ror2* nachgewiesen werden (Abbildung 33).





**Abbildung 33: WMISH zu *em-ror2* im aktivierten, invaginierten und evaginierten *E. multilocularis* Protoskolex.**

WMISH zu *em-ror2* in aktivierten, invaginierten (A) und evaginierten (B) *E. multilocularis* Protoskolizes. Genexpression in grün (FITC); Zellkerne in blau (DAPI). Merge entspricht Overlay der Kanäle grün und blau (A) bzw. grün, blau und rot (B).

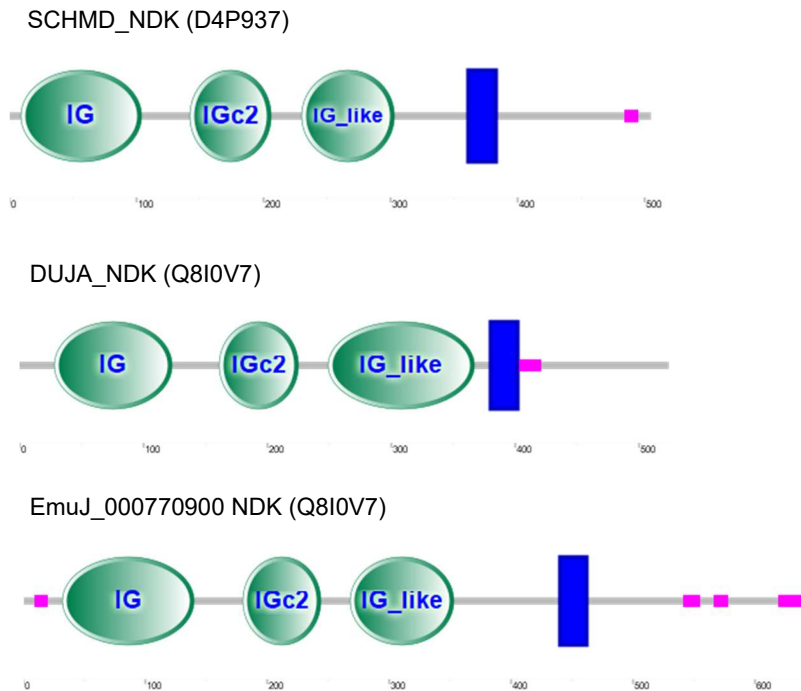
### 3.3.5 *Nou-darake* ist ein neu identifizierter Anteriomarker in *E. multilocularis*

Als Anteriomarker war *sfrp*, als Teil des Wnt-Signalwegs bereits in *E. multilocularis* bekannt. Weitere Anteriomarker waren bisher nicht untersucht worden. In Planarien überschneiden sich die Expressionsbereiche mehrerer Komponenten des Wnt-

Signalwegs und von Genen der FGFR-Familie der anterioren Region (Scimone et al. 2014). *nou-darake*, ein FGF-Rezeptor ähnliches Protein war in Planarien als Anteriomarker bekannt (Cebrià et al. 2002; Scimone et al. 2014). Im Gegensatz zum FGF-Rezeptor fehlt eine funktionelle Proteinkinase Domäne, weshalb der Name FGFR-like Protein auch für NDK gebräuchlich ist (Bertrand et al. 2009; Cebrià et al. 2002). Neben *ndk* sind *nou-darake-like (ndl)* Gene bekannt, wovon der Großteil ebenfalls am anterioren Pol in *S. mediterranea* exprimiert werden (Scimone et al. 2014).

### ***Em-ndk*, ein *nou-darake* Homolog in *E. multilocularis***

Die BLASTP Analyse (WormBase ParaSite) zu *ndk* in *S. mediterranea* (Uniprot ID: D4P937) bzw. *D. japonica* (Q8I0V7) gegen das vorhergesagte Proteom von *E. multilocularis* ergab mit einem E-Value von  $8.5 \times 10^{-33}$  bzw.  $1,5 \times 10^{-26}$  die höchste Homologie zum Genprodukt von EmuJ\_000770900 (Uniprot ID: Q8I0V7). Proteindomänenanalysen via SMART ergaben für das Protein zu EmuJ\_000770900 die für NDK charakteristischen drei Immunglobulin (IG)-ähnlichen Domänen und eine Transmembrandomäne (Bertrand et al. 2009). Die reziproke BLAST Analyse bestätigte das vorhergesagte Protein zu EmuJ\_000770900 als NDK. Anhand dieser Vorhersagen der Proteindomänen und BLAST Ergebnisse erwies sich das Gen EmuJ\_000770900 als Homolog zu *ndk* in *S. mediterranea*.

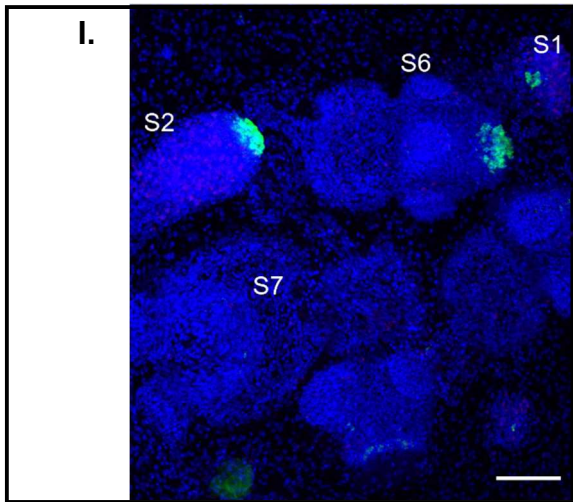


**Abbildung 34: Proteindomänenanalyse von NDK in *S. mediterranea*, *D. japonica* und *E. multilocularis*.**

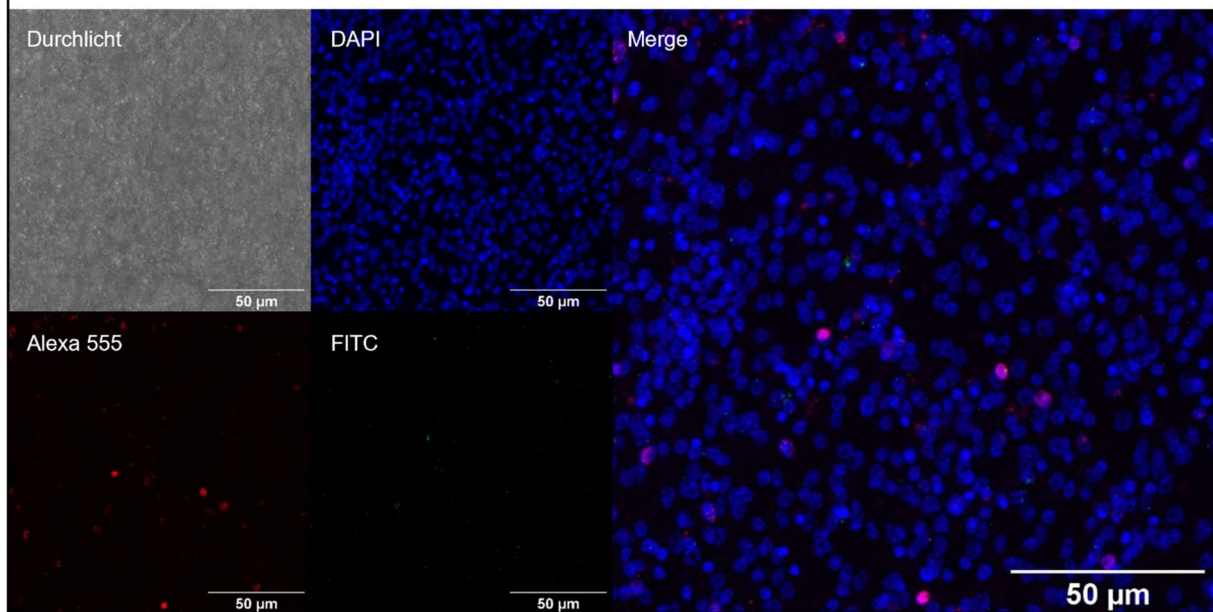
Vorhersagen von Proteindomänen über SMART für NDK Homologe in *S. mediterranea* (SCHMD), *D. japonica* (DUJA) und *E. multilocularis*. Entsprechende Uni-Prot Zugangsnummern in Klammern. IG: Immunglobulin-(ähnliche) Domänen, blauer Balken repräsentiert je eine Transmembrandomäne.

### WMISH zu *em-ndk* im Metazestode und Protoskolex

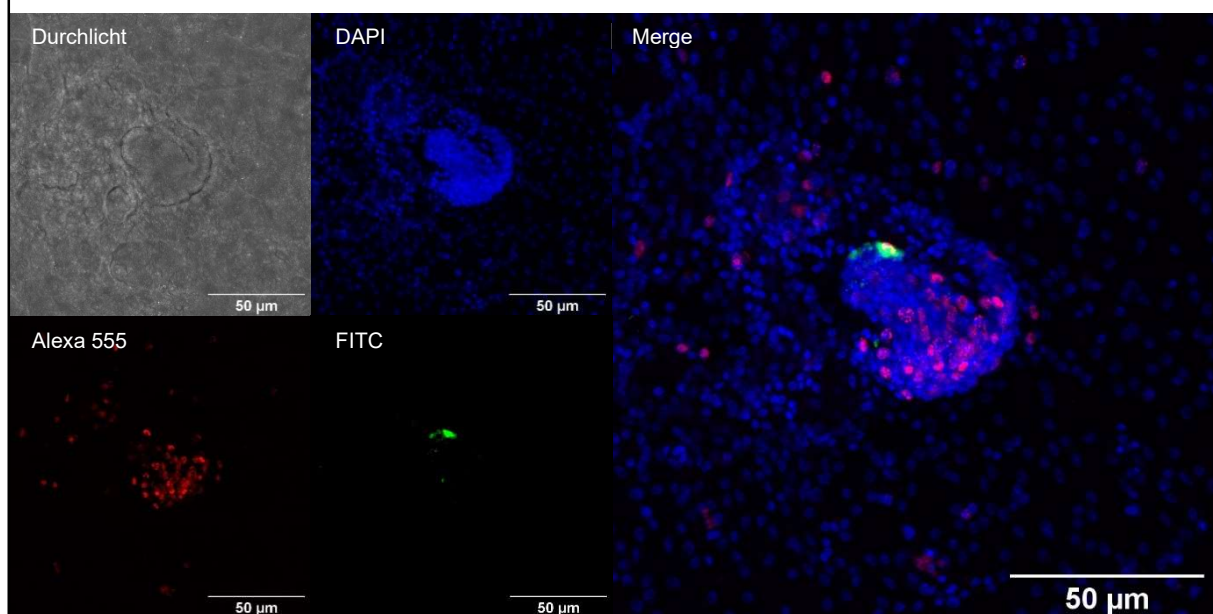
Die Genexpression von *em-ndk* konnte in der Germinalschicht des Metazestoden in geringem Maß in wenigen Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 35A). Mit Brutkapselbildung war *em-ndk*, über alle Stadien der Protoskolex Entwicklung hinweg (S1-S7; anhand von Leducq und Gabrion (1992)), spezifisch in Zellen am anterioren Pol exprimiert (Abbildung 35 B, C). Im aktivierten Protoskolex war *em-ndk* ebenfalls spezifisch am anterioren Pol, in Zellen unterhalb des Rostellums lokalisiert, exprimiert (Abbildung 35D). Es konnte keine Expression von *em-ndk* in EdU<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden. Durch diese Ergebnisse konnte *em-ndk* als spezifischer Anteriomarker in *E. multilocularis* nachgewiesen werden (Abbildung 35).

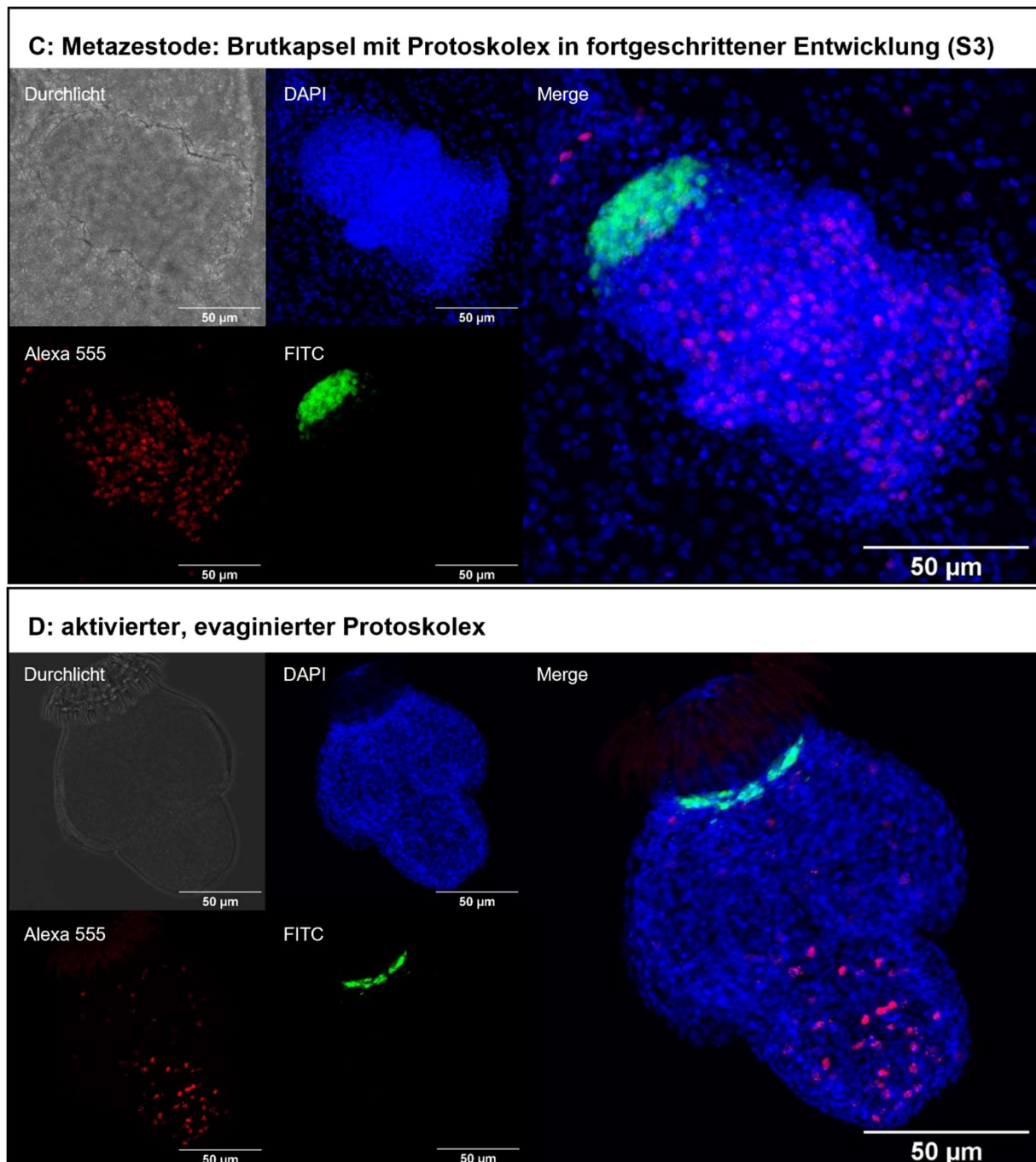


**A: Metazestode: Germinalschicht**



**B: Metazestode: Brutkapsel mit Protoskolex in früher Entwicklung (S2)**



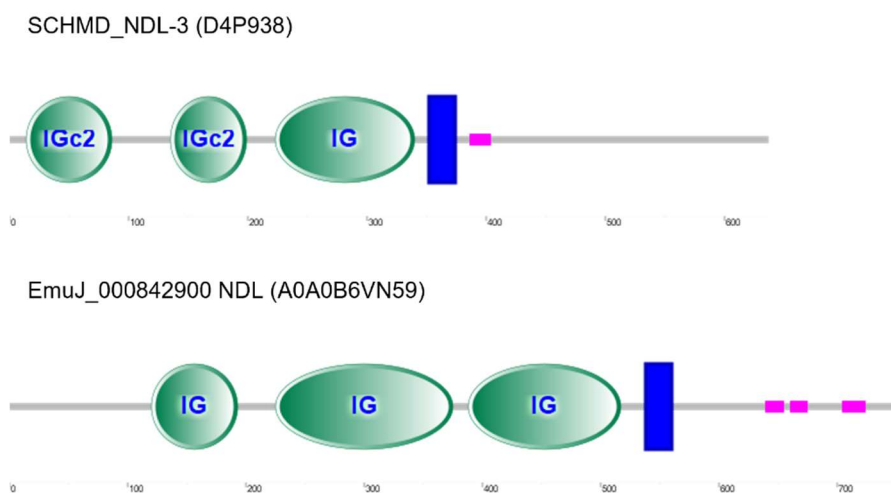


**Abbildung 35: WMISH zu *em-ndk* im *E. multilocularis* Metazestode und Protoskolex.**

I. Genexpression von *em-ndk* im Metazestode über alle Stadien der Protoskolex Entwicklung hinweg (S1-S7). Messbalken repräsentiert 50 µm. **A** Genexpression von *em-ndk* in der Germinalschicht des Metazestode, Protoskolex in Entwicklung (**B**, **C**) und aktiviertem, evaginiertem Protoskolex (**D**). Keine Genexpression in EdU-positiven Zellen. Genexpression in grün (FITC); EdU-positive Zellen in rot (Alexa 555); Zellkerne in blau (DAPI). *Merge* entspricht Overlay der Kanäle grün, rot und blau.

### ***Em-ndl* ist ein Homolog zu *ndl-3* in *S. mediterranea***

Die BLASTP Analyse (WormBase ParaSite) der Proteinsequenz zu NDL-3 in *S. mediterranea* (D4P939) gegen die Vorhersage des *E. multilocularis* Proteom ergab die höchste Homologie für das Genprodukt zu EmuJ\_000842900. Die reziproke BLAST Analyse ergab FGFR-like Homolog. Die Proteindomänenanalyse ergab drei Immunglobulin (IG)-ähnliche Domänen und eine Transmembrandomäne (Abbildung 36). Entsprechend wurde das Gen mit der Zugangsnummer EmuJ\_000842900, annotiert unter A0A0B6VN59, als mögliches *ndl* Homolog in *E. multilocularis* identifiziert.

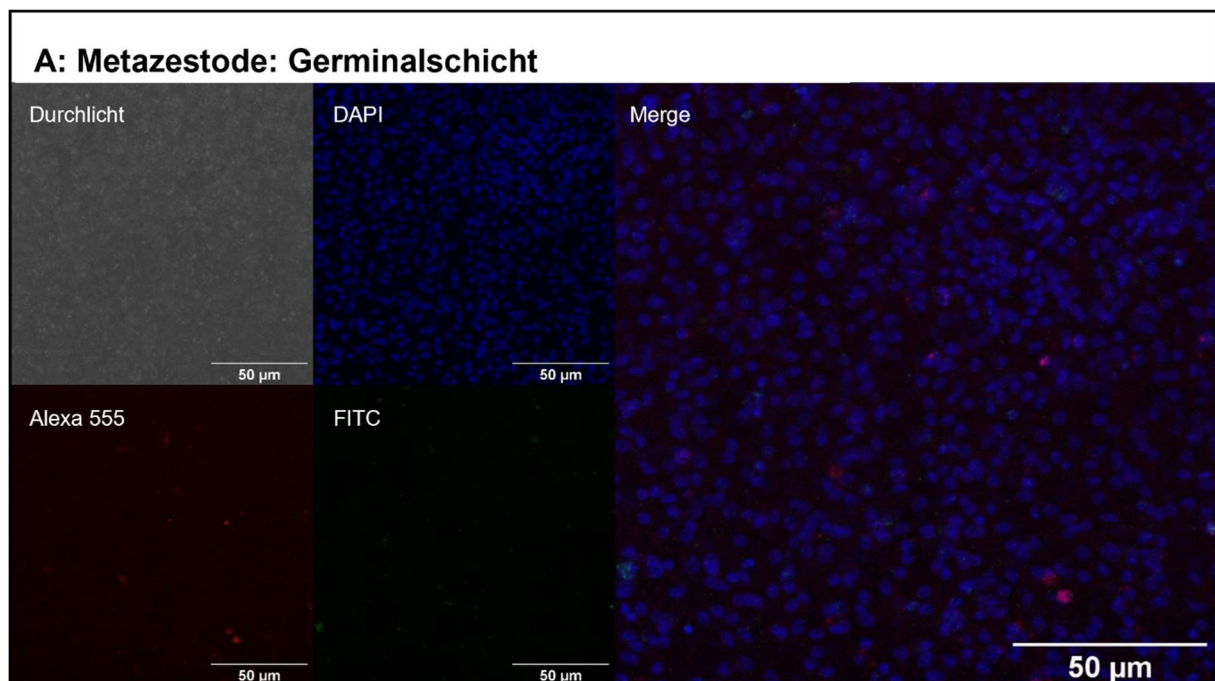


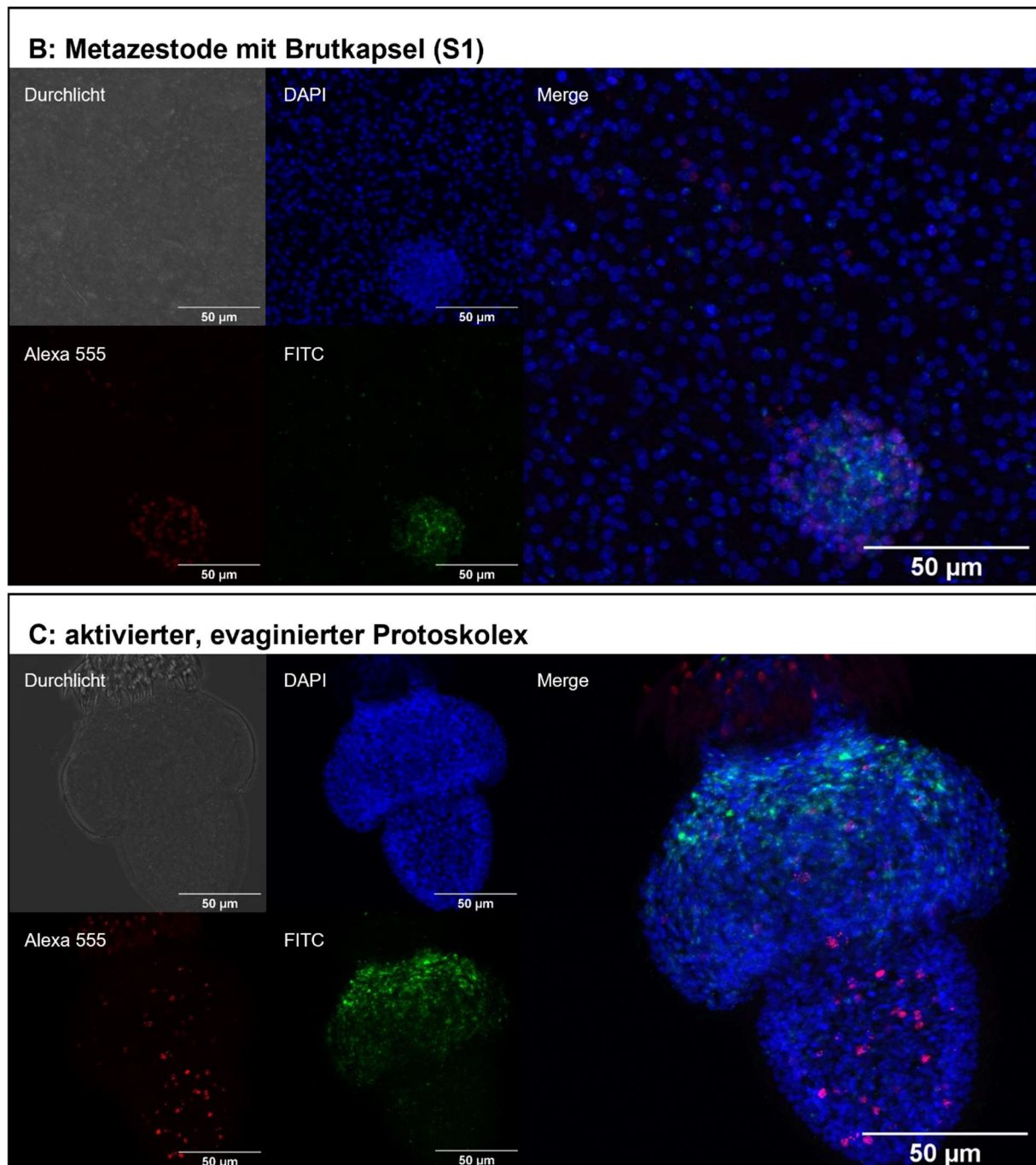
**Abbildung 36: Proteindomänenanalyse von NDL-3 in *S. mediterranea* und NDL in *E. multilocularis*.**

Vorhersagen von Proteindomänen über SMART für NDL-3 in *S. mediterranea* (SCHMD) und *E. multilocularis*. Entsprechende Uni-Prot Zugangsnummern in Klammern. IG: Immunglobulin-(ähnliche) Domänen, blauer Balken repräsentiert je eine Transmembrandomäne.

**WMISH zu *em-ndl* im Metazestode und Protoskolex**

Innerhalb der Germinalschicht des Metazestoden wurde *em-ndl* erst mit der Bildung von Brutkapseln exprimiert (Abbildung 37 A, B). Die untersuchten Metazestoden-Vesikel verfügten nur über einzelne Brutkapseln, weshalb keine Aussage über die Genexpression von *em-ndl* über die Stadien S2-S7 der Protoskolex Entwicklung getroffen werden konnte. Im aktivierten, evaginierten Protoskolex war *em-ndl* breit über den anterioren Bereich exprimiert. Die Genexpression erstreckte sich dabei vom anterioren Pol bis zu den Saugnäpfen (Abbildung 37 C). In EdU<sup>+</sup> Zellen konnte keine Genexpression von *em-ndl* nachgewiesen werden (Abbildung 37).





**Abbildung 37: WMISH zu *em-ndl* im *E. multilocularis* Metazestode und Protoskolex.**

Genexpression von *em-ndk* im Metazestode (A), Brutkapsel (B) und aktiviertem, evaginierten Protoskolex (C). Keine Genexpression in EdU-positiven Zellen. Genexpression in grün (FITC); EdU-positive Zellen in rot (Alexa 555); Zellkerne in blau (DAPI). *Merge* entspricht Overlay der Kanäle grün, rot und blau.

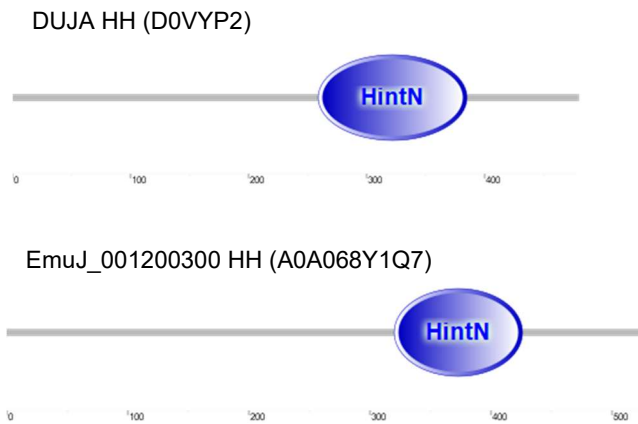


### 3.3.6 ***Em-hh*, wird im Protoskolex im Bereich der Mittellinie exprimiert**

Der Hedgehog-Signalweg ist bekannt essentiell für die korrekte Ausbildung der AP-Achse zu sein (Yazawa et al. 2009; Rink et al. 2009). Der Knockdown (RNAi) von *hh* resultiert in Planarien in der Bildung eines Kopfes am posterioren Ende oder zum Verlust der posterioren Identität (Yazawa et al. 2009). Der Hh-Signalweg reguliert als vorgeschalteter Regulator des Wnt-Signalweges die Transkription von *wnt* Genen (Yazawa et al. 2009). Zudem wird *hh* lateral zur Mittellinie in Planarien, entlang der cephalischen Ganglien exprimiert und wird deshalb eine wichtige Rolle bei Ausbildung der ML-Achse und des ZNS zugeschrieben (Rink et al. 2009; Yazawa et al. 2009; Wang et al. 2016b).

#### ***Em-hh*, ein hedgehog Homolog in *E. multilocularis***

Neben ersten WMISH Vorversuchen im Labor im Metazestode, war *em-hh* bisher nicht weiter charakterisiert worden (K. Brehm, persönliche Mitteilung). Die BLASTP Analyse (WormBase ParaSite) der Proteinsequenz zu HH in *D. japonica* (D0VYP2) (Yazawa et al. 2009) gegen das vorhergesagte *E. multilocularis* Proteom ergab mit einem E-Value von  $2,7 \times 10^{-14}$  das Genprodukt zu EmuJ\_001200300 (Uniprot ID: Q8I0V7). Die reziproke BLAST Analyse bestätigte die hohe Homologie zu HH Homologen. Zudem erfolgte die Vorhersage von Proteindomänen mittels SMART. HH Proteine verfügen charakteristisch über eine aminoternale Domäne mit Signalaktivität sowie eine Carboxy-terminale Domäne mit autokatalytischer Aktivität. Diese autokatalytische Domäne weist eine hohe Homologie zu Inteinen auf, welche sich durch Endonuklease-Aktivität selbst aus einem Protein ausschneiden können, und wird deshalb Hint (Hedgehog/Intein) genannt (Bürglin 2008). Beim Vergleich des Genproduktes von EmuJ\_001200300 zu HH in *D. japonica* (Yazawa et al. 2009), fiel diese Hint-Domäne als gemeinsame Charakteristik auf. Anhand der Homologie in den Proteindomänen und Ergebnisse der BLAST Analysen, konnte das Gen EmuJ\_000770900 als Homolog zu *hh* in *D. japonica* identifiziert werden.

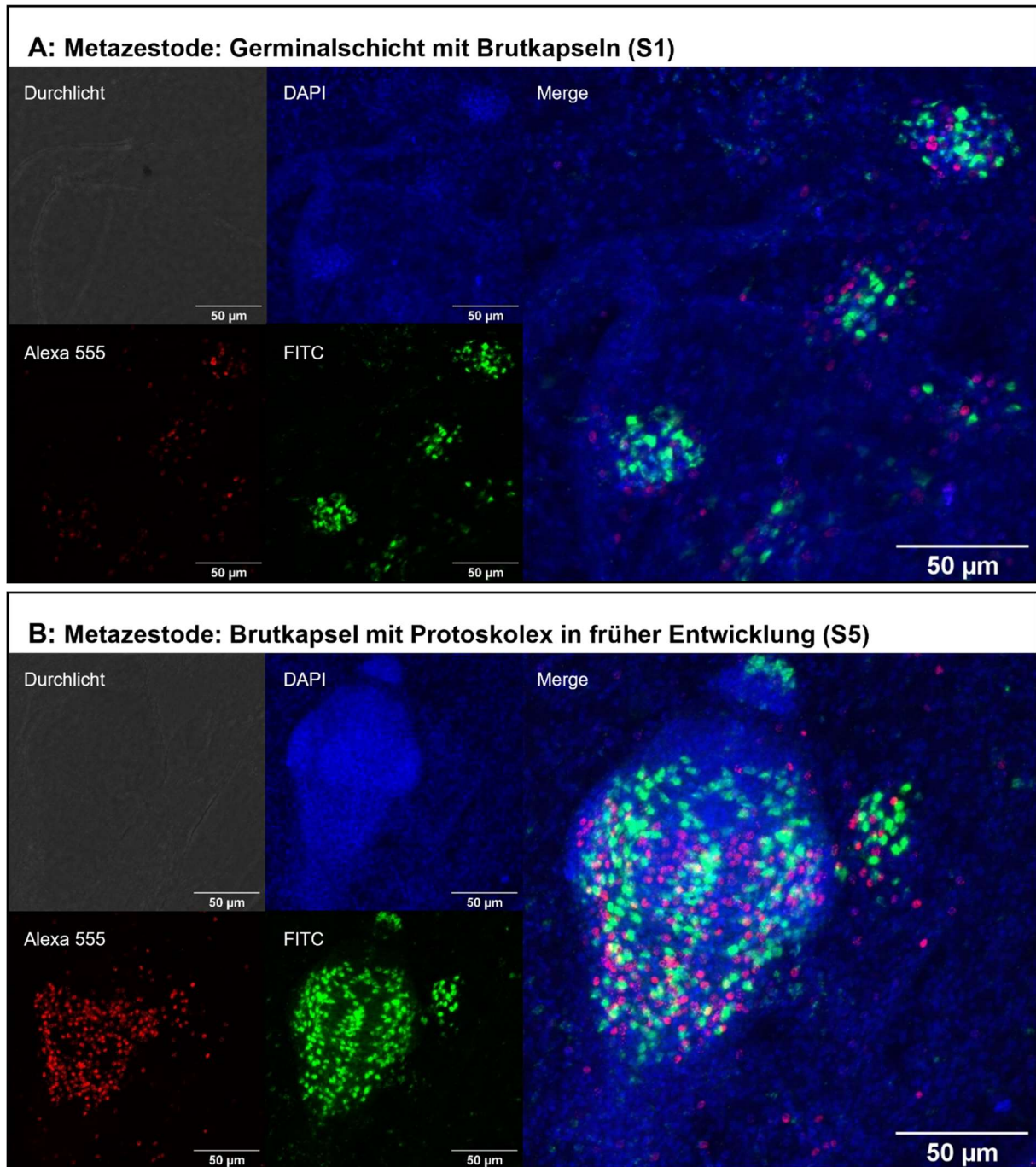


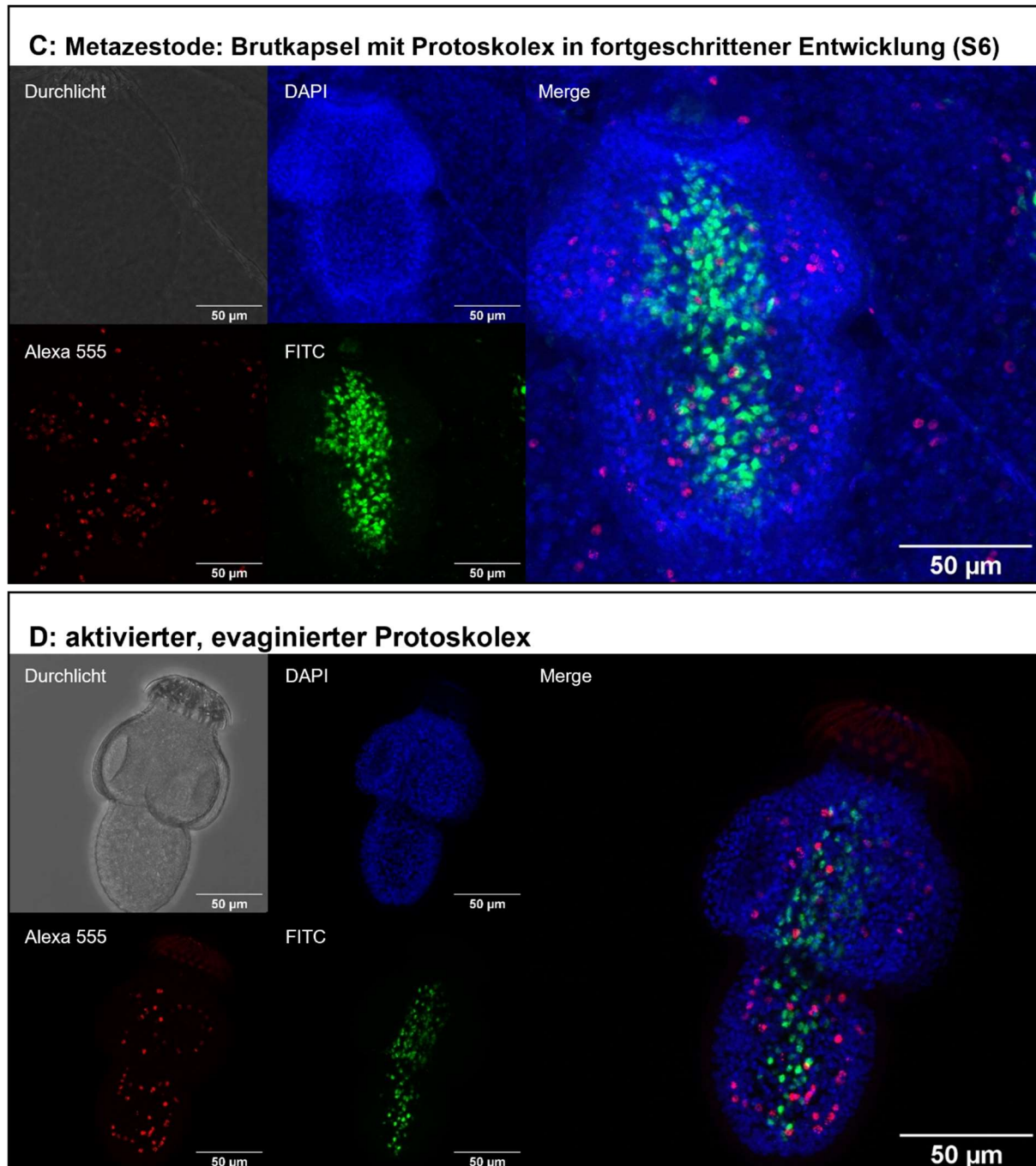
**Abbildung 38: Proteindomänenanalyse der HH Homologe in *D. japonica* und *E. multilocularis*.**

Die Vorhersage der Proteindomänen mittels SMART zeigte für das HH Homolog in *D. japonica* (DUJA) und das Genprodukt zu EmuJ\_001200300 in *E. multilocularis* die für HH charakteristische Hint (Hedgehog/Intein) Domäne auf.

### **WMISH zu *em-hh* im Metazestode und Protoskolex**

Eine Genexpression von *em-hh* wurde innerhalb der Germinalschicht erst mit der Bildung von Brutkapseln detektiert (Abbildung 39A). Im weiteren Verlauf der Protoskolex Entwicklung wurde *em-hh* bereits im frühen Protoskolex exprimiert und verlief im Stadium S5 in lateralen Streifen zwischen den Saugnäpfen über den gesamten Protoskolex (Abbildung 39 A, B). Im fortgeschritten entwickelten Protoskolex (S5) war *em-hh* entlang der Mittellinie exprimiert (Abbildung 39 C). Durch 3D Projektion der Aufnahmen wurde deutlich, dass die Genexpression in einer mittig durch den Protoskolex verlaufender Ebene vorlag (Anhang A.23). Es konnte keine Expression von *em-hh* in EdU<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 39).





**Abbildung 39: WMISH zu *em-hh* im *E. multilocularis* Metazestode und Protoskolex.** WMISH zu *em-hh* im Metazestode in den Entwicklungsstadien S1-S6 des Protoskolex (**A**, **B**, **C**) und im aktivierten, evaginierten (**D**) Protoskolex. Keine Genexpression in EdU-positiven Zellen. Genexpression in grün (FITC); EdU-positive Zellen in rot (Alexa 555); Zellkerne in blau (DAPI). *Merge* entspricht Overlay der Kanäle grün, rot und blau.

### 3.4 *In-vitro* Kultivierung von *E. multilocularis* Protoskolizes

Aus dieser Arbeit ging hervor, dass in *E. multilocularis* Homologe zu Schlüsselfaktoren von Signalwegen, welche in Vertebraten und Invertebraten zur Ausbildung und Erhaltung der ML-Achse beitragen, vorhanden sind. Bezüglich der DV-Achse waren ebenfalls Analysen unternommen worden, welche jedoch nicht ausreichend Informationen liefern konnten, da eine Genexpression über WMISH zu *em-admp* und *em-bmp2*, nicht ausreichend verifiziert werden konnte oder nicht nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Dies warf die Frage auf, ob die DV-Achse möglicherweise im Protoskolex erst mit Bildung von Proglottiden und Organstrukturen ausgebildet. Um dies untersuchen zu können sind mehrgliedrige Würmer bzw. adulte Tiere nötig. Da adulte Tiere ein hohes Infektionsrisiko und das Arbeiten unter S3 Bedingungen nötig ist, wäre die Möglichkeit unter gegebener Laboreinrichtung (S2) adult-ähnliche Würmer, welche *in-vitro* die Geschlechtsreife nicht erreichen, kultivieren zu können eine Lösung.

Durch Zufall konnte ich, in einer unter Standardbedingungen geführten Metazestoden-Kultur, Würmer mit Proglottiden entdecken. Bei der Kultivierung von Metazestoden-Vesikeln des Isolats DDD16 in herkömmlicher Co-Kultur mit RH<sup>-</sup> fiel bei der mikroskopischen Kontrolle nach drei Monaten auf, dass sich neben der Entwicklung von Metazestoden-Vesikeln, sich Protoskolizes zu großen, mehrgliedrigen, adult-ähnlichen Würmern entwickelt hatten. Um die Kultivierung solcher adult-ähnlichen Würmer zu reproduzieren, wurden auf die Entdeckung hin unterschiedliche Kultivierungsbedingungen getestet. Diese, sowie Beobachtungen, die im Rahmen dieser Experimente entstanden sind, sind im Folgenden aufgeführt.

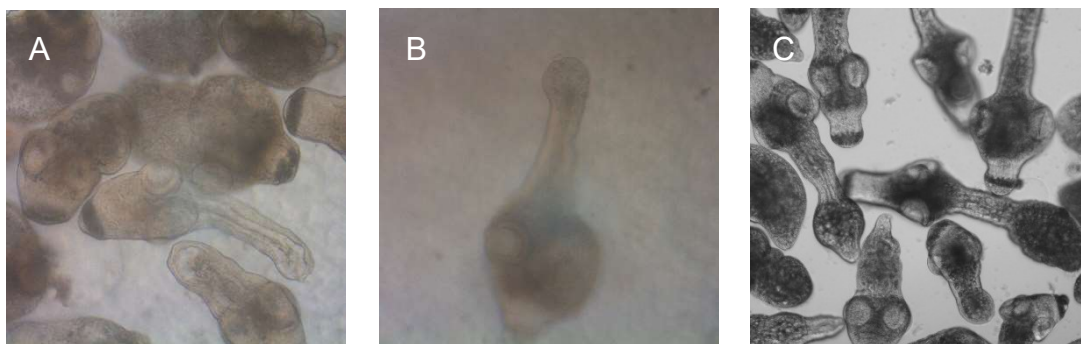
#### 3.4.1 Kultivierung von adult-ähnlichen Würmern *in-vitro*

##### 3.4.1.1 Entwicklung von mehrgliedrigen Würmern in FBS reichem Medium

Um die optimalen Kultivierungsbedingungen für adult-ähnliche Würmer herauszufinden, wurden Protoskolizes u. a. in Medium von Caco-2 Zellen geführt, um herauszufinden, ob diese Darmkarzinomzellen, die dem Colon entstammen, möglicherweise Faktoren sezernieren, die dem Protoskolex suggerieren sich im Endwirt zu befinden und die Differenzierung zum adulten Wurm beeinflussen könnten. Das Medium der Caco-2 Zellen unterschied sich von dem der RH<sup>-</sup> Zellen im Gehalt an FBS von 20% statt 10%. Die Würmer entwickelten in konditioniertem Caco-2 Medium

schneller Proglottide im Vergleich zu RH<sup>-</sup> Zellen (Daten nicht gezeigt). Eine vergleichbare Entwicklung war in der zugehörigen Kontrolle, dem Kulturmedium mit 20% FBS, zu sehen, sodass die Entwicklung abhängig von der FBS Konzentration war. Die Kultivierung in Co-Kultur mit Caco-2 Zellen zeigte keinen Vorteil im Vergleich zu RH<sup>-</sup> Zellen. In weiteren Versuchen wurden die Protoskolizes für 4 Wochen in Standardmedium mit 20% FBS in Co-Kultur mit Hepatozyten kultiviert. Hierfür war die Aktivierung der Protoskolizes nach Isolierung mit Pepsin und Natriumtaurocholat nicht nötig, da sowohl aktivierte als auch nicht aktivierte Protoskolizes in optisch vergleichbarer Anzahl evaginierten und sich entwickelten (nicht quantifiziert). Die Kultivierung in Medium mit 20% FBS zeigte sich für die ersten Wochen von Vorteil, da mehr Protoskolizes evaginierten, das Wachstum schneller voranschritt und die Protoskolizes motiler waren im Vergleich zu Medium mit 10% FBS (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die Protoskolizes analog zur Kultivierung von Metazestoden-Vesikeln in Co-Kultur mit Hepatozyten (RH<sup>-</sup>) kultiviert (10% FBS). Unter diesen Bedingungen konnten mehrgliedrige, adult-ähnliche Würmer bis zu 19 Monate kultiviert werden.

Die Entwicklung von exkretorischen Kanälen war nach 2-3 Wochen sichtbar. Die Entwicklung des ersten Proglottids konnte nach 3 Wochen beobachtet werden, in der Regel dauerte es bis zu 2 Monate, bis dieses vollständig ausgebildet war (Abbildung 40). Die Protoskolizes entwickelten sich innerhalb von ca. 3-6 Monaten zu dreigliedrigen Wurmern. Dabei bestand die Kultur stets aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien, auch aus redifferenzierten Protoskolizes (Microzysten). Die Zeitangabe bezieht sich auf das am weitestend fortgeschrittene Stadium, das in der Kultur festgestellt werden konnte.

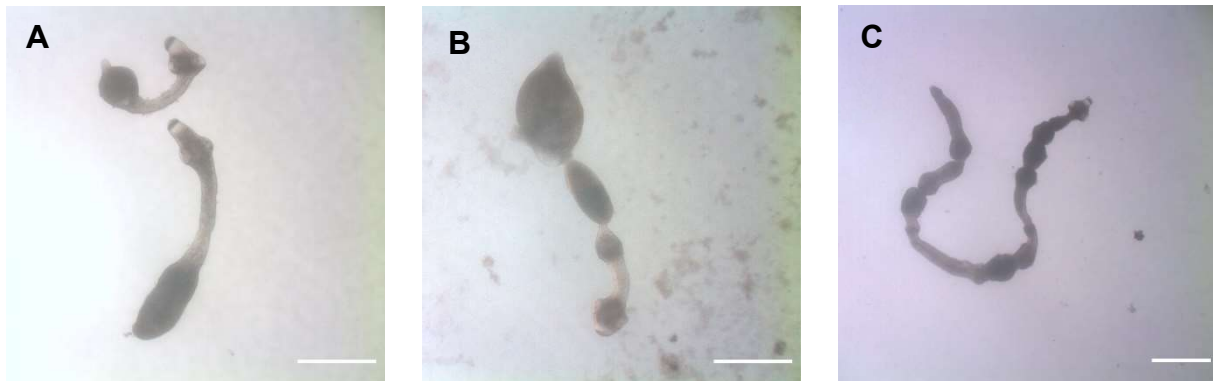


**Abbildung 40: Entwicklung von adult-ähnlichen Wurmern *in-vitro*.**

**A** Protoskolix mit ausgebildetem exkretorischem System (2 Wochen alt). **B** 3-4 Wochen alter Protoskolix mit Ansatz der Bildung eines Proglottids **C** Protoskolix mit einem ausgebildeten Proglottid (8 Wochen). Die Entwicklungsstadien wurden angelehnt an die Beschreibung von Smyth et. al. (1967) für *E. granulosus* beurteilt. Kein Maßstab vorhanden.

Mit weiterer Entwicklung wurden eine Vielzahl an weiteren Proglottiden gebildet (Abbildung 41). Hierbei konnte ein Maximum von 14 Proglottiden festgestellt werden. Es gab keine Hinweise auf Onkosphärenbildung.

Die Würmer waren sehr motil und zeigten hohe Kontraktionszyklen der Proglottiden (Anhang A.24). Auf pH-Änderungen in den sauren Bereich, reagierten die Würmer empfindlich und führte zum Ende der Langzeitkultur (19 Monate).

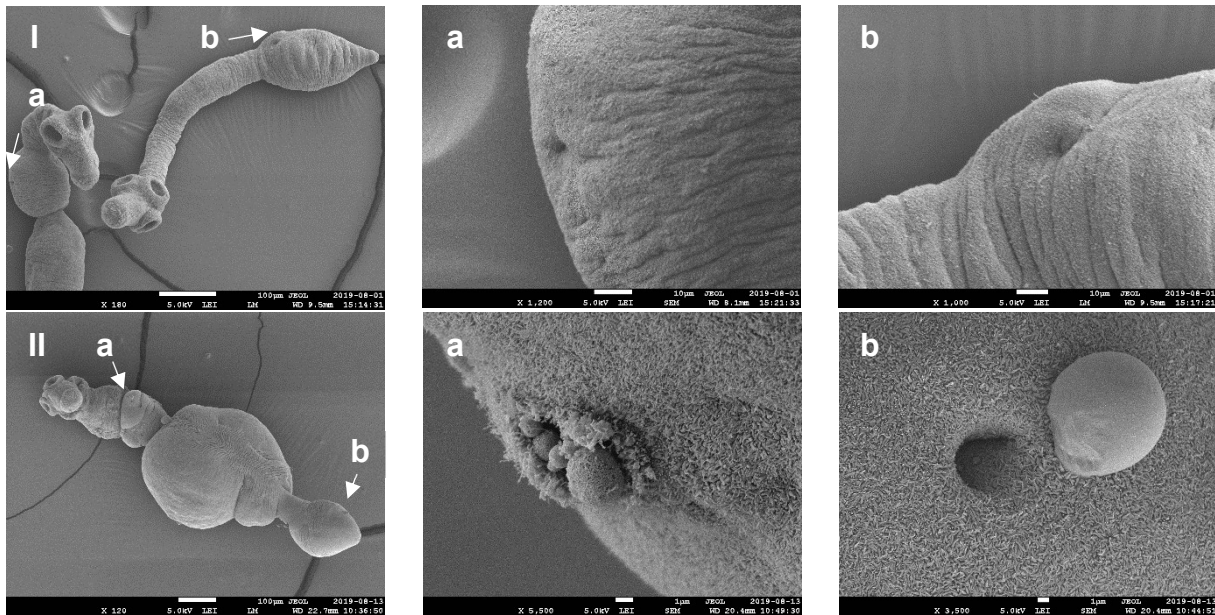


**Abbildung 41: Mehrgliedrige *in-vitro* kultivierte Würmer.**

Die Entwicklung der adult-ähnlichen Würmer beispielhaft gezeigt von links nach rechts. Zwei Monate alte adult-ähnliche Würmer mit Proglottiden (**A**). **B** ca. vier Monate alter adult-ähnlicher. Im weiteren Verlauf der *in-vitro* Kultivierung wurden weitere, vielzählige Proglottiden gebildet (**C**). Messbalken entspricht 100 µm

### 3.4.1.2 Morphologische Charakterisierung von adult-ähnlichen Wümmern

Mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden die adult-ähnlichen Würmer auf adulte Merkmale, wie Porenöffnungen, untersucht. Für die Aufnahmen wurden 3-4 Monate alte Würmer verwendet. Einzelne Würmer wiesen am ersten und dritten Proglottid Einstülpungen auf, teils vermutlich mit sret (Abbildung 42).



**Abbildung 42: REM von adult-ähnlichen Würmern.**

I. REM Aufnahmen von zwei adult-ähnlichen Würmern mit Einstülpungen im ersten (I.a) und dritten Proglottis (I.b). II. Adult-ähnlicher Wurm mit drei Proglottiden, während der Muskelkontraktion fixiert. Im ersten (II.a) und dritten Proglottis (II.b) zeigen sich (Poren-) Öffnungen mit Sretropfen. Maßstab I.:100 µm, I.a:10 µm, I.b:10 µm, II.:100 µm, II.a:1 µm, II.b: 1 µm

### 3.4.2 Redifferenzierung zu Metazestoden-Vesikeln

Die Redifferenzierung von *Echinococcus* Protoskolizes zu Microzysten ist bekannt. Die Redifferenzierung erfolgt in unterschiedlichen Stadien. Zunächst erfolgt eine Vesikularisierung indem sich der Skolex oder das posteriore Ende vesikularisieren. Hier sind zunächst die Saugnäpfe noch deutlich zu erkennen, welche mit der Zeit verschwinden, bis sich der Vesikel vollständig zum Metazestoden-Vesikel mit Laminatschicht ausgebildet hat (Möginger 2016; Camicia et al. 2013).

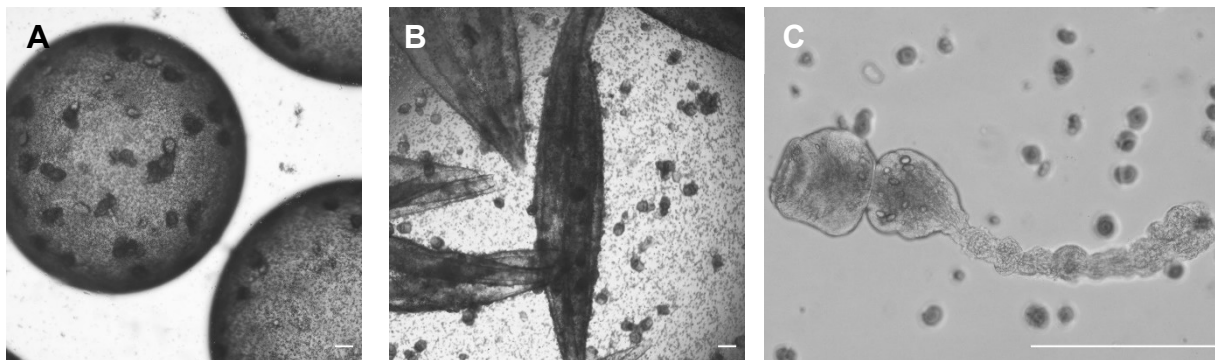
#### 3.4.2.1 Redifferenzierung von Protoskolizes wird in FBS freiem Medium verstärkt

Im Rahmen der Kultivierungsversuche von adult-ähnlichen Würmern, wurden Protoskolizes, neben cMEM von Caco-2 Zellen, wie oben bereits erwähnt, in konditioniertem Medium von primären Darmorganoiden und entsprechenden Kontrollmedien kultiviert. Die Kultivierung in konditioniertem Medium von primären Darmorganoiden (Tissue Engineering Uni Würzburg, Christina Fey) resultierte in vollständiger Redifferenzierung zu Microzysten innerhalb von 10 Tagen (Daten nicht gezeigt). Durch eingehende weitere Versuche stellte sich heraus, dass die Redifferenzierung nicht auf einzelne supplementierte Wachstumsfaktoren im Medium rückzuführen war, sondern auf das Fehlen von FBS (Daten nicht gezeigt).



### 3.4.2.2 Microzysten entwickeln vollständig ausgebildete Protoskolizes

Microzysten, redifferenzierte Protoskolizes, wurde aus Interesse weiter beobachtet. Die Redifferenzierung war durch Kultivierung von Protoskolizes für 4 Wochen in Standardmedium ohne FBS erfolgt und anschließend über einen Zeitraum von zwei Monaten unter Standardbedingungen (Co-Kultur mit RH<sup>-</sup>) kultiviert. Es resultierte eine vollständige Redifferenzierung der Microzysten zu Metazestoden-Vesikeln mit Brutkapseln, welche sich morphologisch nicht zur herkömmlichen *in-vitro* Kultur unterschieden (Abbildung 43). Um zu untersuchen, ob sich innerhalb der Brutkapseln vollständige Protoskolizes entwickelt hatten, wurden einige Metazestoden-Vesikel durch Aufziehen in einer 1 ml Pipettenspitze zerstört und durch weiteres auf- und abpipettieren Protoskolizes aus dem Metazestodengewebe gelöst. Es zeigte sich eine hohe Zahl an invaginierten und evaginierten Protoskolizes, welche motil waren und lichtmikroskopisch anhand deren Morphologie als vollständig entwickelt beurteilt werden konnten (Abbildung 43). Diese Entwicklung konnte wiederholt für das Isolat DDD16 gezeigt werden und zudem für die Isolate MB17 und TM19. Die isolierten Protoskolizes wurden testweise für zwei Monate in Standard Co-Kultur kultiviert und zeigten Ansätze von Proglottidenbildung, vergleichbar zu aus *M. unguiculatus* isolierten Protoskolizes (Daten nicht gezeigt; vergleichbar mit Abbildung 40).



**Abbildung 43: Metazestoden-Vesikel aus redifferenzierten Protoskolizes mit vollständig ausgebildeten Protoskolizes.**

Metazestoden-Vesikel mit Brutkapseln aus redifferenzierten Protoskolizes (ca. 4 Monate alt) (**A**). **B** Durch Ruptur der Vesikel isolierte Protoskolizes sind sowohl invaginiert, als auch evaginiert (**C**) und motil. Messbalken repräsentiert 100  $\mu$ m.

### 3.4.2.3 Redifferenzierung von adult-ähnlichen Würmern

Bei der Kultivierung von adult-ähnlichen Würmern fiel auf, dass die pH-Änderung in den sauren Bereich (erkennbar durch Gelbfärbung des Mediums) entweder zum direkten Tod oder zur Redifferenzierung der Würmer führte, ähnlich der Entwicklung von Protoskolizes zu Microzysten. Es war zu beobachten, dass sich Skolex und/oder Proglottid vesikularisierten (Anhang A.24). Einzelne Exemplare wurden in 6-Well Platten überführt und deren Entwicklung beobachtet. Diese entwickelten sich zu ovalen ‚Vesikeln‘ und bildeten Brutkapseln (Abbildung 44).



**Abbildung 44: Redifferenzierte adult-ähnliche Würmer mit Brutkapseln und vollständig entwickelten Protoskolizes.**

Mehrgliedrige, adult-ähnliche Würmer zeigten die Fähigkeit zu redifferenzieren (**A**) und Brutkapseln zu entwickeln (**B**). **C** Isolierte Protoskolizes aus **B** an Tag 20. Messbalken repräsentiert 100  $\mu\text{m}$ . Für **C** kein Maßstab vorhanden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Der Wnt-Signalweg ist essentiell für die Entwicklung der Primärzellkultur

#### 4.1.1 RNAi resultiert in signifikantem Knockdown von *em-bcat1* in *E. multilocularis* Primärzellen

In dieser Arbeit wurde mit dem Knockdown von *em-bcat1* erstmals ein statistisch verifizierter Phänotyp in *E. multilocularis* Primärzellen nachgewiesen. Eine signifikante Verringerung der Transkripte des Zielgens *em-bcat1* konnte für den Einsatz von 2,22  $\mu\text{M}$  siRNA an Tag 3, 7 und 14 nach RNAi nachgewiesen werden. Die Vermutung, dass durch den Einsatz der doppelten siRNA-Konzentration ein verstärkter Knockdown folgen könnte, zeigte sich somit nicht. Vielmehr konnte bei Einsatz der Konzentration von 4,44  $\mu\text{M}$  kein statistisch signifikanter Knockdown der *em-bcat1* Genexpression in Primärzellkulturen an Tag 7 nach Elektroporation nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist möglicherweise auf Varianzen, denen Primärzellkulturen stets unterliegen, zurückzuführen. Mit einem entsprechenden Antikörper gegen EM-BCAT1 könnte der Knockdown künftig auch auf Proteinlevel überprüft werden. Da bei Einsatz von 2,22  $\mu\text{M}$  siRNA zu allen gemessenen Zeitpunkten (Tag 3, 7, 14) eine signifikant geringere Genexpression der Transkripte zum Zielgen *em-bcat1* vorlag, wurde diese Konzentration für weitere RNAi Experimente ausgewählt. Zudem konnte so die Vergleichbarkeit zu den vorliegenden Transkriptomanalysen, welche auf RNAi Experimente mit 2,22  $\mu\text{M}$  siRNA beruhten, gewährleistet werden. Außerdem sollte für RNAi Experimente stets die niedrigste effektive Dosis der siRNA verwendet werden, um Off-Target Effekt weitestgehend vermeiden zu können (Fyrberg und Lotfi 2010). Anhand von qPCR Analysen konnte an Tag 7 nach RNAi ein Knockdown der Genexpression von *em-bcat1* um 55% festgestellt werden, während die Transkriptomdaten einen Knockdown von 65% (FC: 0,35) an Tag 7 zeigten. Dieser Unterschied erklärt sich zum einen durch die unterschiedlichen Nachweismethoden der Transkripte und die Verwendung unterschiedlicher *E. multilocularis* Isolate. Die Transkriptomdaten lagen RNAi Experimenten an Primärzellen des Isolates „Ingrid“ zugrunde (Herz 2019), während in dieser Arbeit Primärzellen des Isolates „GH09“ verwendet wurden. So konnte anhand dieser Arbeit ein gezielter Knockdown von *em-bcat1* für ein zweites Isolat von *E. multilocularis* nachgewiesen werden. Das in dieser Arbeit angewandte RNAi Protokoll erwies sich damit als statistisch verifizierbar,

reproduzierbar und auf unterschiedliche *E. multilocularis* Isolate anwendbar. Es kann auch in Zukunft dazu beitragen, die Vorgänge der Entwicklung von Primärzellen aufzuklären.

#### 4.1.2 In Primärzellkulturen nach RNAi werden weniger Metazestoden-Vesikel gebildet

In dieser Arbeit wurde neben dem Genotyp außerdem der ‚red-dot‘-Phänotyp nach *em-bcat1* Knockdown verifiziert. Auffällig war, dass Primärzellkulturen nach *em-bcat1* RNAi weniger als die Hälfte an Metazestoden-Vesikeln entwickeln im Vergleich zur Kontrolle. Dabei wurde in der Größe der Metazestoden-Vesikel kein Unterschied festgestellt. Dass in Primärzellkulturen des biologischen Replikats (bRp 2) sowohl in der Kontrolle als auch nach RNAi jeweils deutlich weniger Vesikel gebildet wurden im Vergleich zu den anderen bRp lag im Varianzbereich der Entwicklung der Primärzellkultur und auch hier bildete sich eine signifikant geringere Anzahl von Vesikeln nach *em-bcat1* RNAi ab. Ähnlich wie bei den verwandten, freilebenden Planarien (Petersen und Reddien 2008), führt demnach auch bei *E. multilocularis* ein Knockdown des zentralen Wnt-Regulators  $\beta$ -Catenin zu einer generellen Anteriorisierung des Gewebes, welche der posteriorisierten Entwicklung zu Metazestoden-Vesikeln entgegenwirkt.

#### 4.1.3 Die *E. multilocularis* Primärzellkultur entwickelt sich nicht unidirektional zum Metazestoden

In dieser Arbeit wurden anhand von Transkriptomdaten Gene identifiziert, die mit germinativen Zellen in Verbindung stehen. Anhand dessen, wurden *em-plk*, *em-aurka* und Densovirus-Gene, welche in vorherigen Arbeiten als spezifisch für germinative Zellen identifiziert wurden, als GZA bestätigt (Schubert et al. 2014; Cheng et al. 2019; Herz und Brehm 2019). Dagegen stand der Posteriormarker *em-post2b* in *E. multilocularis* bisher nicht im Zusammenhang mit germinativen Zellen. *em-post2b* wird in der Germinalschicht des Metazestoden exprimiert und im posterioren Bereich während der Protoskolex Entwicklung und definiert neben *wnt* den Metazestoden als posteriores Gewebe (Koziol et al. 2009; Koziol et al. 2016a). Die Expression von *post2b* in *S. mediterranea* konnte in Neoblasten, den Stammzellen von Planarien, nachgewiesen werden (Currie et al. 2016). Möglich, dass *em-post2b* in *E. multilocularis* von germinativen Zellen exprimiert wird und die posteriore Identität in damit maßgeblich von *em-post2b* bestimmt wird. Um die Daten der

Transkriptomanalyse zu überprüfen, können WMISH Analysen folgen, wobei die Lokalisation der Genexpression von *em-post2b* in Kombination mit WMIF (Whole-mount-Immunfluoreszenz), mittels eines spezifischen Antikörpers gegen das spezifisch in germinativen Zellen exprimierte EM-TUB2 in Primärzellaggregaten, analysiert werden könnte. Außerdem konnten unter den GZA zwei bisher unbekannte Mucine (*em-muc2* und *em-muc3*) identifiziert werden. Diese Mucine könnten, wie EM-MUC1, Bestandteil der Laminatschicht in *E. multilocularis* sein (Tsai et al. 2013; Koziol et al. 2014). Wie die Metazestoden-Tegumentmarker, *em-muc1* und *em-alp2*, werden auch *em-muc2* und *em-muc3* nach Verlust des Teguments in PC1 im Vergleich zum Metazestode (MCnoBC) deutlich geringer exprimiert. Die Isolierung der Primärzellen aus Metazestoden-Vesikel führt zum Verlust des Teguments, wodurch sich die geringe Expression in PC1 erklärt (Herz 2019). Im Verlauf der Entwicklung der Primärzellkultur steigt die Expression von *em-muc1* und *em-alp2*, als auch von *em-muc2* und *em-muc3*. Die Genexpression von *em-muc2* und *em-muc3* korreliert somit auch mit Fortschreiten der Entwicklung von Vesikeln und könnte damit, wie *em-muc1*, im direkten Zusammenhang mit dem Tegument von Metazestoden-Vesikeln stehen. Zudem war auffällig, dass *em-muc2* und *em-muc3* im Metazestode, aber kaum im Protoskolex exprimiert werden (A.3). Es handelt sich dabei somit um potenzielle Tegumentmarker des Metazestoden, welche in germinativen Zellen exprimiert werden oder auf andere Weise mit germinativen Zellen in Verbindung stehen. In verwandten Parasiten, wie *S. mansoni*, geht die Ausbildung und Erneuerung des Teguments von Neoblasten aus, wobei die Ausbildung dieser Oberfläche essentiell für die parasitäre Lebensweise ist, um sich vor dem Immunsystem des Wirts zu schützen (Collins et al. 2016; Wendt et al. 2018). Denkbar wäre, dass auch in *E. multilocularis* die isolierten germinativen Zellen zunächst für die Ausbildung der fehlenden Oberfläche, das Tegument, verantwortlich sind, was sich in Kavitäten und Ausbildung von Vesikeln zeigt. Ob die beiden neu identifizierten Mucine (spezifisch) in germinativen Zellen exprimiert werden oder, wie *em-muc1*, in Tegumentzellen könnte durch künftige WMISH Analysen untersucht werden. Durch Kombination mit WMIF könnte bei Co-Lokalisation der Genexpression von *em-muc2* bzw. *em-muc3* und EM-TUB2 die Genexpression in germinativen Zellen nachgewiesen werden.

Außerdem wurden Gene identifiziert, die spezifisch im Metazestoden exprimiert werden (MZS). Anhand der gesetzten Kriterien konnten 27 MZS in Primärzellkulturen identifiziert werden. Im Vergleich zur Gesamtanzahl an Genen, welche in der

Primärzellkultur exprimiert werden (8704) erscheint die Anzahl an MZS gering. Dieser Eindruck entsteht, da ein sehr großer Anteil an Genen sowohl im Metazestoden als auch im Protoskolex exprimiert wird und somit nur wenige Gene spezifisch im Metazestoden exprimiert werden. Unter den identifizierten MZS war der bereits bekannte Posteriormarker *em-wnt11b*. Dessen Genexpression war in vorhergehenden WMISH Analysen in der Germinalschicht des Metazestoden nachgewiesen worden (Koziol et al. 2016a). Entsprechend kann *em-wnt11b* auch als Metazestoden-Marker bezeichnet werden und charakterisiert gemeinsam mit *em-wnt1* *em-wnt11a* den Metazestoden als posteriorisiertes Gewebe (Koziol et al. 2016a). Die Genexpression von *em-wnt11b* stieg mit Entwicklung der Primärzellkultur und war im PC2 und PC3 Entwicklungsstadium höher als im Metazestode (MCnoBC) und korreliert mit der Ausbildung und Entwicklung von Metazestoden-Vesikeln in der Primärzellkultur.

In dieser Arbeit konnten außerdem in den Transkriptomdaten der Primärzellkultur Gene identifiziert werden, die spezifisch im Protoskolex Larvenstadium exprimiert werden (PSS). Darunter waren zwei Anteriormarker, der Wnt-Antagonist *em-sfrp* und *em-ndk*, ein in dieser Arbeit neu identifizierter Anteriormarker (Koziol et al. 2016a). Dieser ist ein Homolog zu *ndk* in Planarien und wird in der Germinalschicht des Metazestoden erst mit Brutkapselbildung exprimiert und markiert über alle Stadien der Protoskolex Entwicklung hinweg und im aktivierten Protoskolex spezifisch den anterioren Pol. Die Genexpression der Anteriormarker *em-sfrp* und *em-ndk* nahm mit zunehmender Entwicklung der Primärzellkultur zu, korrelierte somit auch mit der Entwicklung von Metazestoden-Vesikeln. Da der Metazestode posteriorisiertes Gewebe darstellt, in dem Posteriormarker, wie *em-wnt1*, *em-wnt11a* und *em-wnt11b* beständig exprimiert werden, Anteriormarker hingegen erst mit Brutkapsel-Entwicklung, würde man eine Expression von Anteriormarkern bei Bildung und Entwicklung von Metazestoden-Vesikeln in der Primärzellkultur zunächst nicht erwarten. Erste Analysen von Herz (2019) zeigten bereits die zunehmende Genexpression von Posteriormarkern, wie *em-wnt1*, *em-wnt11b* und Anteriormarkern, wie *sfrp*, in den fortgeschrittenen Primärzellstadien (PC2 und PC3). Diese hohe Genexpression wurde mit der fehlenden Organisation in Primärzellkulturen begründet und mit initialen Genexpressionsmustern von *wnt1* und *sfrp* in Planarien nach Verwundung verglichen (Herz 2019). Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigten für den Anteriormarker *em-ndk* eine vergleichbar markante Genexpression wie für *em-sfrp* in der späten Primärzellkultur und zeigte damit auf, dass die Primärzellkultur sich nicht

unidirektional zum Metazestoden entwickelt. Zudem gibt die hohe Genexpression der Posteriomarker *em-wnt1*, *em-wnt11b* und *em-post2b* oder auch *em-bcat1* auf eine wichtige Rolle in Bezug auf die posteriore Identität von Primärzellkulturen und/oder Metazestoden-Vesikeln hin.

Der hohe Anteil an GZA bestätigt vorhergehende Analysen von Herz (2019), in denen eine Vielzahl an Genen der DNA-Replikation und Zelldifferenzierung in der Primärzellkultur mit germinativen Zellen in Verbindung gebracht wurden. Da laut Koziol et al. (2014) germinative Zellen die einzigen proliferierenden Zellen in *E. multilocularis* sind und das Entwicklungsstadium PC1 bis zu 80% germinative Zellen enthält, erklärt den in dieser Arbeit analysierten hohen Anteil an GZA in der Primärzellkultur. Dass ein Großteil dieser GZA auch in den Larvenstadien Protoskolex und Metazestode exprimiert wird, war zu erwarten, da angenommen wird, dass alle differenzierten Zellen aus den germinativen Zellen von *E. multilocularis* hervorgehen.

Der Begriff GZA wurde gewählt, um zu verdeutlichen, dass die identifizierten Gene nicht zwingend spezifisch für germinative Zellen sind. Die Identifikation der GZA beruhte darauf, welche Gene nach Depletion von germinativen Zellen (HU bzw. Bi2536) um mind. 50% verringert exprimiert waren und einem  $\text{TPM} \geq 1$  in Primärzellkulturen aller drei Entwicklungsstadien (PC1, PC2, PC3) entsprachen. Unter die GZA fallen entsprechend sowohl Gene welche spezifisch in germinativen Zellen exprimiert werden sowie Downstream-Targets dieser germinativen Zellen-spezifischen Gene, welche aufgrund fehlender Signaltransduktion vermindert exprimiert werden. Zudem sind in *E. multilocularis*, wie in Planarien, Subpopulationen an germinativen Zellen vorhanden sowie ‚progeny‘, postmitotische germinativen Zellen, welche sich in ihrer Genexpression von germinativen Zellen unterscheiden (Koziol et al. 2014; Brehm 2010a; Collins et al. 2016). Entsprechend ist zu erwarten, dass sich unter den GZA auch Gene befinden, die nur zu bestimmten Phasen des Zellzyklus exprimiert werden bzw. in Subpopulationen. Es ist außerdem möglich, dass anhand der gewählten Kriterien nicht alle Gene erfasst wurden, die prinzipiell mit germinativen Zellen assoziiert sind. Da die Analyse jedoch auch einige bereits bekannte Marker für germinative Zellen in *E. multilocularis* hervorbrachte, erwiesen sich die gewählten Kriterien dennoch als eine sehr effektive Methode zur Identifikation von Genen, welche mit germinativen Zellen in Verbindung stehen. Der gleiche Sachverhalt gilt für die gewählten Kriterien von MZS und PSS.

#### 4.1.4 Proliferation von germinativen Zellen und Expression von GZA sind abhängig vom Wnt-Signalweg

Nach *em-bcat1* Knockdown veränderte sich das Genexpressionsmuster hin zu erhöhter Expression von GZA, Anterior- und Protoskolex- spezifischen Genen bei gleichzeitig geringerer Expression an Metazestoden- und Posteriomarkern. Diese veränderte Genexpression steht im Zusammenhang mit einer signifikant verringerten Anzahl an Metazestoden-Vesikeln in Primärzellkulturen nach RNAi (*em-bcat*). Nach Knockdown von *em-bcat1* (RNAi) war der Großteil der identifizierten GZA erhöht exprimiert, darunter auch die Gene *em-plk*, *em-aurka* und Densovirus-Gene. Die starke Expression dieser Marker für germinative Zellen lässt sich durch den hohen Anteil an EdU<sup>+</sup> Zellen, entsprechend der Überproliferation an germinativen Zellen nach *em-bcat1* Knockdown, erklären. Die EdU<sup>+</sup> Zellen stellen nicht die Gesamtzellzahl an germinativen Zellen dar, da durch die EdU Detektion nur jene germinativen Zellen nachgewiesen werden, welche sich im fünf Stunden Fenster des EdU Pulse in der S-Phase der Mitose befanden (Koziol et al. 2014). Aussagekräftig war dieses Ergebnis dennoch, da die Anzahl der proliferierenden germinativen Zellen sich nach *em-bcat1* Knockdown im Vergleich zur Kontrolle mehr als verdoppelte. Die Gesamtzellzahl kann durch Nachweis der germinativen Zellen mittels eines Antikörpers gegen das in germinativen Zellen spezifisch exprimierte  $\beta$ -Tubulin, EM-TUB2 oder WMISH zu *ta-TRIM* (Terminal repeat Retrotransposon in Miniature) erfolgen (Schubert et al. 2014; Koziol et al. 2015). Diese Ergebnisse zeigten, dass der Wnt-Signalweg einen Einfluss auf die Genexpression und die Proliferation in germinativen Zellen hat. Der Wnt-Signalweg wird stets mit der Proliferation und Erhaltung der Stammzellidentität in Verbindung gebracht (Nusse 2008). In den zu *E. multilocularis* nah verwandten Planarien ist der Wnt-Signalweg jedoch bisher nicht mit der Erhaltung der Stammzellen/Neoblasten in Verbindung gebracht worden, sondern ist insbesondere für die Entwicklung und Erhaltung der AP-Achse bekannt (Rink 2013). Denkbar wäre, dass die Proliferation der germinativen Zellen in *E. multilocularis* nicht unter direkter Kontrolle des Wnt-Signalwegs steht, sondern die Proliferation mit der veränderten Polarität und vermehrten Expression von Anteriomarkern in Verbindung steht. Die Initiierung und Entwicklung von Brutkapseln im Metazestoden und damit verbundene anteriore Entwicklung geht sehr wahrscheinlich von germinativen Zellen aus (Leducq und Gabrion 1992; Brehm und Spiliotis 2008). Bei Brutkapselbildung, und entsprechender Expression von Anteriomarkern, konnte in der Germinalschicht eine



auffällige Häufung an proliferierenden germinativen Zellen beobachtet werden (Koziol et al. 2014)(und diese Arbeit Anhang A.25). Diese Beobachtung stützt bisherige Erkenntnisse, dass germinative Zellen als einzige proliferierende Zellen für die Entwicklung von *E. multilocularis* verantwortlich sind und entsprechend auch durch Initiierung der Anterior- und Protoskolex Entwicklung. Interessant ist zudem, dass nach bisherigen Erkenntnissen aus Vertebraten der Verlust von APC oder Akkumulation von  $\beta$ -Catenin zu einem Übermaß an Stammzellen resultiert (Bienz und Clevers 2000; Nusse 2008). In *E. multilocularis* zeigte hingegen ein Knockdown von *em-bcat1* eine Verdopplung der Anzahl an proliferierenden germinativen Zellen und entspricht dem gegenteiligen Effekt wie in Vertebraten. Die Überproliferation der germinativen Zellen könnte auch auf der veränderten (Zell-) Polarität beruhen und auf eine Deregulation der asymmetrischen Teilung hinweisen. In *D. melanogaster* Neuroblasten führt der Verlust von Zellpolarität zu Defekten in der asymmetrischen Teilung und resultiert in einer hohen Anzahl an Neuroblast-ähnlichen Zellen und zur Bildung von Gehirntumoren (Causinus und Gonzalez 2005; Wodarz und Näthke 2007). Die veränderte Polarität nach *em-bcat1* RNAi in *E. multilocularis* Primärzellen könnte damit auch der Grund für die hohe Anzahl an proliferierenden germinativen Zellen nach *em-bcat1* RNAi sein. Künftig könnte untersucht werden, welche Entwicklung eine posterior-dominierte Genexpression, den Metazestoden repräsentierende Genexpression, auf germinative Zellen hat. In der Primärzellkultur sind Posteriormarker weitaus höher exprimiert als Anteriormarker (Herz 2019) und könnte entsprechend als posteriorisiert angesehen werden. Eine verstärkte Posteriorisierung der Primärzellkultur könnte durch RNAi von *apc* oder Doppel-RNAi der Anteriormarker *em-sfrp* und *em-ndk* erfolgen. Interessant wäre hier, wie sich die posterior-dominierte Genexpression auf die Proliferation und Differenzierung der germinativen Zellen auswirkt. Außerdem würde, entsprechend der bisherigen Hypothese, eine vermehrte Bildung und ein gefördertes Wachstum von Metazestoden-Vesikeln zu erwarten sein. Diese RNAi Experimente können, neben dem Einfluss auf die germinativen Zellen, zudem weitere Hinweise auf den Crosstalk und die Regulation der Signalwege geben, die an der Ausbildung der Körperachsen in *E. multilocularis* beteiligt sind.

Neue Hinweise zur Regulation von asymmetrischer Teilung und Zellpolarität leisteten Vorexperimente im Rahmen dieser Arbeit. Dabei wurde die Genexpression eines Homologs zu Pou5f1 (Oct-4) in *E. multilocularis*, ebenfalls ein GZA untersucht. Oct-4 ist ein Transkriptionsfaktor und gemeinsam mit Sox2 und Nanog wichtig für die

Pluripotenz in embryonalen Stammzellen (Zhang et al. 2013). Stammzellidentität und Entwicklungsprozesse/Differenzierung werden in embryonalen Stammzellen über den kanonischen Wnt-Signalweg reguliert (Li et al. 2012). Dieses Paradoxon kann durch unterschiedliche genregulatorische Netzwerke erklärt werden, abhängig von Oct-4 (Zhang et al. 2013; Simandi et al. 2016). Dabei kann  $\beta$ -Catenin in *Xenopus* Embryos und embryonalen Stammzellen sowohl durch Oct-4 stabilisiert werden, wodurch Stammzellidentität aufrechterhalten wird, als auch destabilisiert werden und entsprechend die Differenzierung fördert (Abu-Remaileh et al. 2010). Erste WMISH zu *em-pou5f1* im Metazestoden zeigten eine Co-Lokalisation der Genexpression in EdU<sup>+</sup> Zellen. Zudem zeigte sich ein interessantes Genexpressionsmuster in Brutkapseln, wobei *em-pou5f1* zunächst an einem Pol exprimiert wurde und sich mit fortschreitender Entwicklung in zwei lateralen Streifen, möglicherweise lateralen Ganglien des Protoskolex in Entwicklung zeigt. Diese Beobachtungen können künftig durch weitere WMISH Analysen bestätigt und die Genexpression von *em-pou5f1* in germinativen Zellen durch kombinierte WMISH und WMIF gegen EM-TUB2 näher untersucht werden. In *Medaka* (Reisfisch), wurde die Expression von *pou5f1* in der Schwanzknospe (tail bud) und im ZNS nachgewiesen (Sun et al. 2020). Zudem steht Pou5f1 in *D. rerio* im Zusammenhang mit Ausbildung der DV Achse durch indirekte Aktivierung von BMP-Genen (Belting et al. 2011). Oct-4 zeigte sich in murinen embryonalen Stammzellen und HepG2 Zellen als potentiell Zielgen des Wnt-Signalwegs (Li et al. 2012). Der *em-bcat1* Knockdown hatte laut Transkriptomdaten keine signifikanten Auswirkungen auf die *em-pou5f1* Expression. Ob *em-pou5f1* in *E. multilocularis* durch Interaktion mit BMP- und Wnt-Signalweg einen Einfluss auf das Zellschicksal von germinativen Zellen hat und damit auch auf die Entwicklung der Körperachsen, kann in künftigen Projekten näher analysiert werden.

Unter den wenigen GZA, die nach *em-bcat1* Knockdown verringert exprimiert waren, war der Posteriormarker *em-post2b*. Dieser Transkriptionsfaktor *post2*, steht neben der Entwicklung der AP-Achse auch im Zusammenhang mit asexuellem Wachstum und Segmentierung von Planarien. Ein Knockdown von *post2b* resultiert in einer fehlenden Segmentierung in *S. mediterranea* (Arnold et al. 2021). Es ist daher möglich, dass *em-post2b* auch beim asexuellen Wachstum des Metazestoden eine wichtige Rolle einnimmt und die verringerte Bildung von Metazestoden-Vesikeln in Primärzellkulturen nach *em-bcat1* RNAi ein Resultat der verringerten Expression von *em-post2b* ist. Zudem ist der Zusammenhang zwischen dem verringerten Wnt-Signaling durch

*em-bcat1* RNAi und einer verringerten Expression von *post2b* interessant. Posteriore Hox-Gene stehen unter Kontrolle des Wnt-Signalwegs (Toofan und Wheadon 2016). Auch das posteriore Hox-Gen und Ortholog zu *post2* in *S. mediterranea*, *Smed-AbdbA*, gilt als mögliches Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs (Iglesias et al. 2008; Koziol et al. 2009). Die verringerte Genexpression von *em-post2b* nach *em-bcat1* Knockdown könnten ein Hinweis darauf sein, dass *em-post2b* ein Zielgen des Wnt-Signalwegs in *E. multilocularis* ist. Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass *em-post2b*, *em-wnt1* und *em-wnt11b* stets homogen in der Germinalschicht des Metazestoden exprimiert sind und damit den Metazestoden als posteriores Gewebe definieren (Koziol et al. 2016a). Da alle drei dieser Posteriormarker nach *em-bcat1* Knockdown vermindert exprimiert sind, könnte der damit verbundene Verlust der posterioren Identität mit der verringerten Anzahl an Metazestoden-Vesikeln in Primärzellen nach RNAi stehen. Aus dieser Arbeit geht *post2b* als potentielles, in germinativen Zellen exprimiertes Gen und potentielles Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs in *E. multilocularis* hervor. Diese Hypothese kann künftig durch Nachweis der Genexpression in germinativen Zellen (WMISH zu *em-post2b* und WMIF zu *em-tub2*) bestätigt werden und zudem durch Nachweis einer erhöhten Genexpression von *em-post2b* in Primärzellkulturen. Ein erhöhtes Wnt-Signaling, kann aus Erkenntnissen in malignen Tumoren, bspw. durch Knockdown (RNAi) von *apc* provoziert werden (Morin et al. 1997; Rubinfeld et al. 1997; Schlosshauer et al. 2000) und könnte auch in *E. multilocularis* zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin führen.

Unter den identifizierten GZA ist ein für künftige Arbeiten interessantes Gen, annotiert als Tetraspanin, EmuJ\_000355000, das anhand des Genexpressionsmusters fast ausschließlich in der Primärzellkultur exprimiert wird (MZ und PS TPM>1,5) und nach *em-bcat1* Knockdown um 853% höher exprimiert wird als der Kontrolle. Tetraspanine sind integrale Membranproteine, die ubiquitär oder Zelltyp-spezifisch exprimiert werden und Signalübertragungen regulieren (Termini und Gillette 2017). In *S. mediterranea* konnte ein Neoplasten-spezifisches Tetraspanin identifiziert werden und in *Schistosoma* sind Tegument-spezifische Tetraspanine bekannt (Tran et al. 2006; Zeng et al. 2018). Erste Analysen zeigten keine Homologie zu den genannten Tetraspaninen in *S. mediterranea* und *S. mansoni* (Daten nicht gezeigt). Durch WMISH Analysen kann überprüft werden, ob dieses Tetraspanin in germinativen Zellen exprimiert wird und einen Bezug zur Bildung der ‚ersten Oberfläche‘, dem

Tegument von Kavitäten/Vesikeln aufweist oder welche andere Rolle dieses Tetraspanin in der Entwicklung der Primärzellkultur besitzt.

#### 4.1.5 **Der Knockdown von *em-bcat1* führt zu einer Anteriommarkerdominierten Entwicklung und resultiert in verringerter Bildung von Metazestoden-Vesikeln in Primärzellkulturen nach RNAi.**

In spätem Stadium von Primärzellkulturen (PC3) sind Posteriormarker (u. a. *em-wnt1*, *em-wnt11b*, *em-post2b*) sehr hoch exprimiert, teils weitaus höher als in den Larvenstadien Metazestode und Protoskolex. Auch Anteriommarker, wie *em-sfrp* sind in Primärzellkulturen hoch exprimiert (Herz 2019). Zusammengenommen mit den Erkenntnissen von Koziol et al. (2016a), dass der Metazestode posteriorisiertes Gewebe darstellt, wird angenommen, dass sich aus Kavitäten in der Primärzellkultur bei Überwiegen der Expression von Posteriormarkern Metazestoden-Vesikel gebildet werden. In dieser Arbeit zeigten sich nach *em-bcat1* Knockdown eine stark verminderte Genexpression von Posteriormarkern (*em-wnt1*, *em-wnt11b*, *em-post2b*) bei gleichzeitig gesteigerter Genexpression von Anteriommarkern (*em-sfrp*, *em-ndk*) und verringerter Anzahl an Metazestoden-Vesikeln in der *E. multilocularis* Primärzellkultur. Der Posteriormarker *em-wnt1* war laut Transkriptomdaten in Primärzellen nach RNAi (*em-bcat1*) verringert exprimiert, wenn auch nicht signifikant. Die WMISH zeigte, dass diese verringerte Genexpression sich nur um den Bereich von Kavitäten zeigte, während *em-wnt1* in Zellen über das Zellaggregat verteilt auch nach *em-bcat1* Knockdown exprimiert wird. Außerdem fiel auf, dass *em-wnt1* in zwei EdU<sup>+</sup> Zellen in Primärzellaggregaten der Kontrolle detektiert wurden. Eine Genexpression von *em-wnt1* in germinativen Zellen widerspricht vorangegangenen Ergebnissen von Koziol et al. (2016a), wobei die Genexpression von *em-wnt1* in Muskelzellen nicht aber EdU<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden konnte. In dieser Arbeit konnte in keinem der weiteren untersuchten Zellaggregate eine Co-Lokalisation von *em-wnt1* nachgewiesen werden. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Schlussfolgerungen. Möglich wäre, dass es sich bei der detektierten Co-Lokalisation um eine Überlagerung mit Muskelzellen handelte oder das Signal von einer benachbarten Muskelzelle stammt. Dies ist anhand der Z-Stapel nicht eindeutig zu entnehmen. Als unwahrscheinlich wird betrachtet, dass es sich bei den detektierten Zellen um *em-wnt1*<sup>+</sup> proliferierende Muskelzellen handeln könnte, da germinativen Zellen als einzig proliferierende Zellen in *E. multilocularis* gelten (Koziol et al. 2014).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass *em-wnt1* im Gegensatz zum Metazestoden, worauf die Erkenntnisse von Koziol et al. (2014) beruhen, in der Primärzellkultur in Sub-Populationen oder postmitotischen germinativen Zellen exprimiert wird. Gemeinsam mit den bisherigen Erkenntnissen wird davon ausgegangen, dass es sich bei den beiden Co-Lokalisationen von *em-wnt1* und EdU nicht um eine Expression von *em-wnt1* in germinativen Zellen handelt. Eine WMISH zu *em-wnt1* in Kombination mit WMIF gegen das spezifisch in germinativen Zellen exprimierte EM-TUB2 oder mittels Doppel-WMISH zu *em-wnt1* und *ta-TRIM* ermöglicht die in dieser Arbeit beobachtete Co-Lokalisation zu überprüfen.

Neben *em-wnt1* war *em-wnt11b* in der Kontrolle ebenfalls in Kavitäten exprimiert, nach *em-bcat1* Knockdown aber weder in Kavitäten noch Zellen nachweisbar. Dabei war die Genexpression von *em-wnt11b* in Primärzellaggregaten in Kavitäten, Kavitäten und Zellen oder nur in Zellen über das Aggregat verteilt exprimiert. Diese Variabilität wird auf das Microenvironment von Primärzellkulturen zurückgeführt, wobei Zellen je nach Lage im Zellaggregat unterschiedliche oder unterschiedlich starke externe Signale erfahren und sich die Primärzellaggregate entsprechend in ihrer Entwicklung unterscheiden können (Wurtzel et al. 2017), im weiteren näher diskutiert (4.1.7). Die Ergebnisse zur Genexpression von *em-wnt1* und *em-wnt11b* ließen darauf schließen, dass die mit diesen Posteriomarkern verbundene posteriore Identität in Primärzellen, insbesondere im Bereich von Kavitäten in Primärzellkulturen nach RNAi (*em-bcat1*) verringert vorhanden war, während diese in Zellaggregaten der Kontrolle kavitätsassoziiert exprimiert waren. Anteriomarker (*em-sfrp*, *em-ndk*) und Protoskolexmarker (*em-npp36*, *em-fz10*) zeigten sich dagegen auffällig stark im Bereich von Kavitäten nach *em-bcat1* Knockdown exprimiert. In der Kontrolle hingegen konnte keine Genexpression von Anterior- und Protoskolexmarkern in Kavitäten nachgewiesen werden, näher diskutiert unter (4.1.6). Der Frizzled-Rezeptor *em-fz10* wurde anhand der Transkriptomdaten als Protoskolexmarker identifiziert. WMISH Analysen zu *em-fz10* im Protoskolex und Metazestode stehen noch aus und können nachgeholt werden, um *em-fz10* als Protoskolexmarker zu verifizieren. *em-npp36* war in den Transkriptomanalysen nicht als PSS aufgelistet, da die Genexpression in PC1 unter einem TPM von 1 lag, war aber bereits durch vorhergehende Arbeiten als Protoskolex-spezifisches Neuropeptid bekannt (Koziol et al. 2016b).

Die verringerte Anzahl an Metazestoden-Vesikeln in Primärzellen nach *em-bcat1* RNAi korrelierte laut Transkriptomdaten mit einer verringerten Expression von mindestens zwei *E. multilocularis* Metazestoden-Tegumentmarkern *em-alp2* und *em-muc1*. Der Nachweis einer verminderten Aktivität von alkalischen Phosphatasen in Primärzellen nach *em-bcat1* (RNAi) bestätigten diese Ergebnisse. Die verringerte Enzymaktivität wurde maßgeblich auf die verringerte Genexpression der Tegument-spezifischen alkalischen Phosphatase *em-alp2* zurückgeführt, da *em-alp1*, welche ebenfalls in Tegumentzellen in der Germinalschicht exprimiert ist, laut Transkriptomdaten keine signifikant veränderte Genexpression nach *em-bcat1* Knockdown zeigte (Koziol et al. 2014). Diese Ergebnisse sollen künftig durch qPCR Analysen zur Genexpression von *em-alp2* sowie auf Proteinebene überprüft werden. WMISH zu *em-muc1* zeigte in Kavitäten eine nahezu vergleichbare Genexpression von *em-muc1* in Primärzellen nach *em-bcat1* und der Kontrolle. Hingegen war eine Genexpression von *em-muc1*, wie in einem randständigen Vesikel in der Kontrolle, nach *em-bcat1* RNAi nicht nachweisbar. Dies wurde auf die verringerte Bildung von Metazestoden-Vesikeln nach *em-bcat1* Knockdown zurückgeführt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Vesikel in den Primärzellaggregaten nach RNAi nicht als solche erkannt wurden und fälschlicherweise als Kavitäten angenommen wurden. Es war bei Beurteilung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in dieser Arbeit nicht immer eindeutig, ob es sich bei den in den Primärzellkulturen detektierten vesikelartigen Strukturen um Kavitäten handelte oder um Vesikel. Durch die Fixierung der Primärzellkulturen werden Vesikel meist zerstört und erscheinen dann als zusammengefallener Vesikel, ähnlich einem ‚platten Fußball‘. Allerdings ist es möglich, dass sich insbesondere randständige große Kavitäten vergleichbar abbilden. So könnte es sich bspw. in der Kontrolle der WMISH zu *em-wnt11b* auch um einem zusammengefallenen Vesikel handeln, statt, wie angenommen, einer Kavität. Um hier künftig eine klare Definition zu finden sollte analysiert werden, wie sich Vesikel bzw. Kavitäten nach der Probenaufbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie abbilden. Hierfür können entsprechend einzelne Primärzellaggregate lichtmikroskopisch auf Vesikel und Kavitäten analysiert und nach WMISH Durchführung betrachtet und beurteilt werden.

Für die Genexpression von *em-muc1* sind gemeinsam mit dem Ergebnis der deutlich verringerten Aktivität von alkalischer Phosphatase in Primärzellaggregaten nach RNAi (*em-bcat1*) zwei Schlussfolgerungen möglich. Entweder wird nach *em-bcat1* Knockdown die Expression der Tegumentmarker direkt inhibiert und infolgedessen das

Tegument verändert ausgebildet weshalb sich Vesikel nicht ausbilden können oder die verringerte Genexpression von *em-muc1* und *em-alp2* resultiert aus der verminderten Anzahl an Metazestoden-Vesikeln im ‚red-dot‘-Phänotyp.

#### 4.1.6 Die Genexpression von Anterior- und Posteriormarkern im Bereich von Kavitäten ist mit Muskel- und Nervenzellen assoziiert

Die hohe kavitätsassoziierte Genexpression von Protoskolex- und Anteriormarkern nach RNAi war sehr auffällig. Die Larvenstadien von *E. multilocularis* und Primärzellen zeigen teils eine geringe Autofluoreszenz, weshalb zunächst die Frage aufkam, ob es sich bei diesen kavitätsassoziierten Signalen auch um Autofluoreszenz handeln könnte. Tatsächlich zeigten WMISH zu RNA sense Sonden Hintergrundsignale, welche sich oft über das gesamte Zellaggregat erstreckten und sowohl in Zellen als auch in Kavitäten auftraten. Diese Hintergrundsignale konnten auf unspezifische Bindung der RNA sense Sonden oder Autofluoreszenz zurückgeführt werden und stellten jeweils kein vergleichbar starkes Signal in Kavitäten dar, wie das von Anterior- und Protoskolexmarkern. Zudem waren die WMISH zu antisense RNA Sonden entsprechend den Hintergrundsignalen der sense Sonden berücksichtigt und entsprechend korrigiert, wodurch eine Detektion von Hintergrundsignalen und Autofluoreszenz ausgeschlossen werden konnte. Außerdem sind sowohl in Zellaggregaten der Kontrolle als auch nach *em-bcat1* stets Kavitäten in Primärzellaggregaten vorhanden. In der Kontrolle waren für Anterior- und Protoskolexmarker keine kavitätsassoziierten Signale zu erkennen, von Metazestoden- und Posteriormarkern hingegen schon. Nach *em-bcat1* Knockdown konnte wiederum kein Signal von Posterior- und Metazestodenmarkern (*em-wnt1*, *em-wnt11b*) im Bereich von Kavitäten nachgewiesen werden, aber von Anterior- und Protoskolexmarkern. Die Genexpression ist dabei in einzelnen Zellen lokalisiert oder über das gesamte Tegument der Kavitäten zu erkennen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Zellen im Tegument der Kavitäten die entsprechende Gene exprimieren und das Signal durch Proteine des Teguments gestreut wird, wodurch die Genexpression großflächig erscheint. Die Färbung von Muskel- und Nervenzellen in Primärzellkulturen nach RNAi (*gfp* und *em-bcat1*) zeigte, dass Kavitäten umsäumt oder durchzogen mit Muskel- und Nervenzellen sind und sich durch eine Oberfläche, das Tegument, vom umliegenden Gewebe abgrenzen (Anhang A.26). Die auffällig starke Expression der untersuchten Anterior- und Protoskolexmarker bzw. Posterior-

und Metazestodenmarker im Bereich um die Kavitäten sind somit potentiell Muskel- und Nervenzellen assoziiert. Die Expression von *em-wnt1* und *em-sfrp* konnte bereits in Muskelzellen nachgewiesen werden (Koziol et al. 2016a). Daneben ist *em-npp36* im zentralen Nervensystem exprimiert (Koziol et al. 2016b). Für die weiteren, in dieser Arbeit, untersuchen Gene, *em-fst*, *em-fz10* und *em-ndk* ist bisher nicht bekannt in welchem Zelltyp diese exprimiert werden. Mit Ausnahme von *em-wnt1* konnte keines der genannten Gene in dieser Arbeit in proliferierenden germinativen Zellen nachgewiesen werden. Durch künftige Co-Färbungen von WMISH und Nachweis von Muskel- bzw. Nervenzellen, könnte eruiert werden, in welchem Zelltyp die genannten Gene exprimiert werden. Angelehnt an die Ergebnisse von Koziol et al. (2016a) wird postuliert, dass die weitere Entwicklung von Kavitäten zu Metazestoden-Vesikeln von Posteriormarkern bestimmt wird. Entsprechend würde bei einer höheren Genexpression von Anteriormarkern die Entwicklung einer Kavität zum Metazestoden-Vesikel unterbunden, während Posteriormarker die Entwicklung zum Metazestoden-Vesikel fördern und die Bildung von Vesikeln entsprechend abhängig vom Wnt-Signalweg reguliert wird. Dies ist auch eine mögliche Erklärung dafür, dass nach Knockdown von *em-bcat1* weniger Vesikel vorhanden als in der Kontrolle. Weiter gestützt wird diese These, wie bereits diskutiert, durch die verringerte Expression von *em-post2b* was ebenfalls auf eine verringerte posteriore Identität in Primärzellkulturen nach *em-bcat1* RNAi hinweist.

Unabhängig von den kavitätssoziierten Signalen, waren Anterior- und Protoskolexmarker auch in Zellen über das Zellaggregat verteilt exprimiert, in der Kontrolle hingegen nicht. Diese Beobachtung wurde bisher nicht quantifiziert und könnte durch manuelles Auszählen der Zellen nachgeholt werden.

#### 4.1.7 Die Entwicklung von germinativen Zellen ist abhängig von deren Lage in der Primärzellkultur

Trotz verringerter Expression von Posteriormarkern bilden sich Metazestoden-Vesikel in Primärzellen nach *em-bcat1* Knockdown. Dies kann darauf beruhen, dass unter den Primärzellaggregaten teils große Unterschiede in der Genexpression von Morphogenen, wie *em-wnt11b*, vorliegen. In Primärzellen der Kontrolle (*gfp*) war der Posterior- und Metazestodenmarker *em-wnt11b* je nach untersuchtem Zellaggregat über das gesamte Aggregat oder vermehrt in Kavitäten exprimiert. Denkbar ist, dass germinative Zellen je nach Lage innerhalb der Primärzellaggregate auf Morphogene



angewiesen sind. Je nach Lage der germinativen Zellen, erhalten diese bspw. von Muskelzellen entsprechende Signale über *em-wnt1* und reagieren mit entsprechender Genexpression, die dazu führt, dass germinative Zellen proliferieren oder differenzieren. In Planarien reagieren Neoblasten auf Signale (Position control genes PCG) u. a. von Muskelzellen aus ihrer direkten Umgebung und erzeugen positionsspezifische Transkriptionsprogramme um lokal entsprechende Zelltypen zu bilden (Reddien 2011; Witchley et al. 2013; Wurtzel et al. 2017). Diese positionsspezifischen Signale durch Wnt und BMP4 aus Muskelzellen bewirken die korrekte Ausbildung der DV- und AP-Achse nach Amputation (Robertis 2010; Wurtzel et al. 2017). Eine ähnliche Funktion und Entwicklung ist von germinativen Zellen in *E. multilocularis* denkbar, wodurch je nach Lage der germinativen Zellen im Zellaggregat und Empfang von Signalen, wie Wnt von Muskelzellen, die Proliferation oder Differenzierung der germinativen Zellen induziert wird sowie die Entwicklung zu Metazestoden-Vesikel begünstigt oder inhibiert wird. Die Identifikation von *em-post2b* als GZA und potentiell Zielgen des Wnt-Signalwegs stützt die Hypothese, dass die Genexpression von germinativen Zellen durch Morphogene, wie Wnt-Liganden, reguliert wird und entsprechend die Genexpression hin zu posteriorer Entwicklung regulieren.

Wie sich der *em-bcat1* Knockdown auf die Anzahl an Muskel- und Nervenzellen in der Primärzellkultur auswirkt ist bisher nicht geklärt. Vorgehende Arbeiten gaben Hinweise auf eine stark erhöhte Anzahl an Muskelzellen in Primärzellen nach *em-bcat1* RNAi (K. Brehm, persönliche Mitteilung). Dieser Hinweis bestätigte sich in dieser Arbeit nicht, war allerdings für eine statistisch signifikante Aussage nicht in ausreichenden Replikaten durchgeführt worden und sollte deshalb wiederholt werden (Anhang A.26).

#### 4.1.8 Follistatin gilt als möglicher Initiator der Genexpression von Anteriomarkern

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Follistatin Homolog in *E. multilocularis* identifiziert werden. Die anhand von Transkriptomdaten angezeigte erhöhte Genexpression nach *em-bcat1* Knockdown konnte mittels WMISH in Primärzellaggregaten nicht ausreichend belegt werden, da nicht genug Zellaggregate dokumentiert wurden. *fst* ist vor allem in Hinblick auf die Regulation der Anteriomarker *em-sfrp* und *em-ndk* interessant. Die Expression der beiden Anteriomarker ist in *S. mediterranea* abhängig von *fst* und essentiell für die Regeneration des anterioren Pols. Die Genexpression

von *fst* ist dabei wiederum abhängig von der Expression von *notum* und *foxd*, wobei *notum foxd* vorgeschaltet ist (Roberts-Galbraith und Newmark 2013). Die Abhängigkeit der Genexpression der Anteriomarker *em-sfrp* und *em-ndk* von *em-fst* ist bisher nicht erforscht. Zudem ist interessant, dass *em-fst*, wie *em-notum* in der Germinalschicht des Metazestoden exprimiert ist. Zu *foxd* konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Homolog (EmuJ\_000446500) identifiziert werden. Auch eine RNA-Sonde wurde bereits dafür hergestellt, konnte allerdings nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit getestet werden. Zudem wurde in dieser Arbeit eine siRNA gegen *em-notum* designt. Diese wurde bisher auf Protoskolizes (RNAi) eingesetzt, wobei sich kein Phänotyp zeigte und ebenfalls aufgrund von zeitlichen Gründen nicht weiter analysiert wurde (Daten nicht gezeigt). Um eine *notum* abhängige Genexpression der Anteriomarker in *E. multilocularis* zu überprüfen, könnte eine RNAi zu *em-notum* in Primärzellkulturen durchgeführt werden und anhand von qPCR die Genexpression der, laut Literatur, nachfolgenden Gene *em-foxd*, *em-fst*, *em-sfrp* und *em-ndk* analysiert werden. Diese Analysen könnten Aufschluss über die molekularen Grundlagen zur Reetablierung des anterioren Pols mit der Entwicklung von Protoskolizes im Metazestoden geben.

#### 4.1.9 Die RNAi Methode eignet sich zur Analyse der Entwicklung von Metazestoden-Vesikeln in der Primärzellkultur

Der ‚red-dot‘-Phänotyp sollte künftig durch RNAi Experimente unter Verwendung von weiteren siRNAs gegen *em-bcat1* verifiziert werden. Zudem könnte der Knockdown von Wnt-Liganden erfolgen und mit den Ergebnissen der *em-bcat1* RNAi verglichen werden. Vorversuche zu RNAi Experimenten gegen *em-wnt1*, *em-wnt11a* und *em-wnt11b* wurden in dieser Arbeit bereits durchgeführt. Dabei wurden die Transkripte der Zielgene in unterschiedlichen Kombinationen mittels RNAi downgeknockt. Eine Doppel-RNAi von *em-wnt1* und *em-wnt11a* (je 2,22 µM/ siRNA) ergab einen ähnlichen Phänotyp der Primärzellkultur wie nach *em-bcat1* Knockdown mit ausgeprägten roten Kavitäten (Anhang A.27). Der Knockdown der jeweiligen Wnt-Liganden allein, rief dagegen keinen vergleichbaren Phänotyp hervor. Erste qPCR Analysen zeigten einen signifikanten Knockdown von *em-wnt1* und *em-wnt11a* nach Doppel-RNAi (Daten nicht gezeigt). Dieser Versuch soll künftig wiederholt werden, um den Knockdown von *em-wnt1* und *em-wnt11a* statistisch zu verifizieren und den beobachteten Phänotyp, mit dem in dieser Arbeit analysierten ‚red-dot‘ Phänotyp (*em-bcat1* RNAi) vergleichen zu können. Die Möglichkeit mehrere siRNAs zu kombinieren kann künftig genutzt

werden, um den Einfluss und das Zusammenspiel von Genen auf die Entwicklung von germinativen Zellen und Metazestoden-Vesikeln in *E. multilocularis* Primärzellkulturen untersuchen zu können.

## **4.2 Die ML-Körperachse wird in *E. multilocularis* durch Homologe zu Genen des Slit-Robo- und Hh-Signalweg definiert**

### **4.2.1 Die ML-Achse ist im *E. multilocularis* Metazestoden nicht ausgebildet**

Die Form des Metazestoden als Vesikel weist auf eine Modifikation der Körperachsen bei der *E. multilocularis*-Entwicklung hin. Es ist nicht bekannt, ob der Protoskolex als radial symmetrischer Organismus angesehen werden kann. Die AP-Achse wird in *E. multilocularis* vom Wnt-Signalweg definiert und ist im Metazestoden nicht ausgebildet (Koziol et al. 2016a). Wie sich weitere Körperachsen, wie die ML- und DV-Achse in *E. multilocularis* ausbilden und eine Rolle in der Entwicklung spielen wurde in dieser Arbeit erstmals untersucht. Das identifizierte Homolog zu *slit* in Planarien, *em-slit*, wird homogen in der Germinalschicht des Metazestoden exprimiert. Damit stellt der Metazestode neben posteriorisiertem Gewebe (Koziol et al. 2016a) zumindest teilweise auch medianisiertes Gewebe dar (*em-slit*). Interessant war in dieser Hinsicht zudem, dass die verringerte Bildung von Metazestoden-Vesikeln nach Knockdown von *em-bcat1* in Primärzellen laut Transkriptomdaten mit einer verringerten Genexpression von *em-slit* einherging. Im aktivierten, evaginierten Protoskolex konnte die Genexpression einseitig, vermutlich entlang der Mittellinie nachgewiesen werden, während sich in Brutkapseln die Genexpression an zwei gegenüberliegenden Seiten darstellte. Durch folgende WMISH Analysen zu *em-slit* kann untersucht werden, ob sich die Genexpression im evaginierten Protoskolex an der gegenüberliegenden Seite, die sich bei Verstärkung des Signals zeigte, lediglich aufgrund fehlender Tiefenschärfe nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen in Planarien, bei denen das *slit* Ortholog von dorsalen und ventralen Zellen entlang der Mittellinie exprimiert wird (Cebrià et al. 2007). Ob es sich bei den *em-slit*<sup>+</sup> Zellen, analog zu *smed-slit* exprimierenden Zellen in *S. mediterranea*, um dorsal- und ventral lokalisierte Zellen handelt, erfordert jedoch weitere Analysen. Es sind bisher keine dorsal- und ventral Marker für *E. multilocularis* bekannt. Zu BMP und ADMP, welche in Planarien die DV-Achse determinieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit RNA-Sonden angefertigt. Es

konnte, vermutlich aufgrund von antisense Transkripten (Herz 2019), kein bzw. kein einheitliches Expressionssignal detektiert werden. Mittels WMISH zu *em-slit* in Kombination mit WMISF durch Anfärben der Nervenzellen mittels Antikörper gegen acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin (Kozioł et al. 2013; Kozioł 2014) kann analysiert werden ob *em-slit* von Zellen des Nervensystems exprimiert wird. Sollte sich erweisen, dass *em-slit* im ZNS von *E. multilocularis* exprimiert wird, ist es möglich, dass *em-slit* in *E. multilocularis* die Funktion der Axon-Guidance übernimmt und somit ein essentieller Faktor für die korrekte Ausbildung des Nervensystems ist. Durch die hohe Übereinstimmung von Proteindomänen und des Genexpressionsmusters zu Planarien ist es wahrscheinlich, dass es sich bei *em-slit* um ein Ortholog zu *slit* in Planarien handelt. Es besteht die Möglichkeit, dass sich die Expressionsprofile von *em-slit* mit weiteren untersuchten Körperachsengenen überschneiden.

#### 4.2.2 Mögliche Rolle von Slit in Parasit-Wirt Interaktion

Das Ergebnis der Expression von *em-slit* im Metazestoden wirft außerdem die Frage auf, ob dieses möglicherweise sekretiert wird und so auch zur Wirt-Parasit Interaktion beiträgt. Slit wird neben seiner Rolle in der Entwicklung des Nervensystems auch mit der Initiation der Angiogenese bei zahlreichen Tumorerkrankungen in Zusammenhang gebracht (Wang et al. 2003). Eine Pro-angiogenetische Wirkung von *Echinococcus* Metazestoden wurde bereits beschrieben (Jian-Hai et al. 2017). Um den Bereich von Metazestoden-infiziertem Lebergewebe von Ratten ist eine erhöhte Expression von HIF1-alpha nachgewiesen worden. HIF-1 $\alpha$  wird bei Sauerstoffmangel induziert und ist u. a. als Initiator der VEGF-abhängigen Angiogenese bekannt (Song et al. 2015). Die Inhibierung von VEGF stellte sich als möglicher effektiver Wachstumskiller von Metazestoden im *in-vivo* Modell dar und verdeutlicht die Wichtigkeit der Angiogenese für das Parasitenwachstum (Yuan et al. 2019). Angiogenese und Vaskularisation kann sowohl ausgehend von Faktoren des Wirts, des Parasiten oder durch die Interaktion beider zustande kommen (Dennis et al. 2011). Ein interessanter Aspekt wäre hier zu untersuchen, ob *em-slit* direkt mit Wirtsfaktoren interagiert und inwiefern *em-slit* auf diese Weise zu einer stetigen Nährstoffversorgung des Parasiten durch Förderung der Angiogenese beiträgt. Der Slit-Robo-Signalweg ist in der Tumorbilogie dafür bekannt, an Angiogenese und Metastasierung beteiligt zu sein und hat sich in diesem Zusammenhang als potentiell Drug-Target herausgestellt (Wang et al. 2003; Koohini et al. 2019; Liu und Herlyn 2003; Gara et al. 2015). Erkenntnisse zum Einfluss von Slit-

Robo in AE wären hinsichtlich neuer Therapiemöglichkeiten bedeutsam, da Angiogenese-Hemmer in der Therapie von malignen Tumoren bereits seit einiger Zeit etabliert sind und somit potentiell auch als Off-Label-Use für AE zur Verfügung stünden (Goedegebuure et al. 2018; Janning und Loges 2018; Bhattarai et al. 2018).

#### 4.2.3 **Robo-Rezeptoren sind vermutlich im ZNS von *E. multilocularis* exprimiert**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Robo Homologe in *E. multilocularis* identifiziert, wobei nicht eindeutig war, ob es sich bei beiden um direkte Homologe zu RoboA in *S. mediterranea* handelt, oder nur beim Genprodukt zu *em-robo1*. Das Genexpressionsmuster zu *em-robo1* bildete sich ähnlich zum ZNS des Protoskolex ab. Die Genexpression stellte sich dabei planar, in einer mittig liegenden Ebene des Protoskolex dar. Robo besitzt in Planarien eine zentrale Rolle im Aufbau des ZNS, nachdem RNAi von *roboA* in *S. mediterranea* die Regeneration des ZNS und der Anterior Region beeinträchtigt (Cebrià und Newmark 2007). Anhand dieser Erkenntnisse ist eine Expression von *em-robo1* in Nervenzellen in *E. multilocularis* wahrscheinlich und sollte künftig mittels kombinierter WMISH und WMIF überprüft werden. In diesem Rahmen könnte anhand von 3D Projektionen analysiert werden, ob sich das ZNS in *E. multilocularis* planar oder radial darstellt. Die bisherigen Analysen von Koziol et al. (2013) lassen hierzu keinen eindeutigen Schluss zu.

Bezüglich Crosstalk ist eine *robo1* abhängige Expression von *hh* in Hühner Embryos bekannt, wobei eine Überexpression von *robo1* zu einer geringeren Expression von *hh* führte und umgekehrt (Wang et al. 2013a). Ob in *E. multilocularis* ebenfalls ein solcher Crosstalk zwischen Slit-Robo- und Hedgehog-Signalweg stattfindet, könnte Aufklärung zur Signalabfolge bringen, welche u. a. zur Reetablierung des anterioren Pols und Entwicklung von Protoskolizes im Metazestoden führt. WMISH zu *em-robo2* im Protoskolex konnten nicht beurteilt werden, da die sense Sonde ein hohes Hintergrundsignal zeigte und das Signal entsprechend der antisense Sonde korrigiert werden musste. Für zukünftige Experimente und zum Treffen genauerer Aussagen ist eine neue RNA-Sonde für *em-robo2* notwendig. WMISH zu *em-robo1* im Metazestoden steht noch aus. Von besonderem Interesse ist hier, ob *em-robo1*, wie *em-slit* in der Germinalschicht exprimiert ist und ob *em-robo1*, wie vermutet, bei der Ausbildung des ZNS im Protoskolex mitwirkt.

#### 4.2.4 Hh ist in *E. multilocularis* an der Ausbildung der Körperachsen beteiligt

Das in dieser Arbeit identifizierte *hh* Homolog in *E. multilocularis*, *em-hh*, wird mit Brutkapselbildung erstmals im Metazestoden exprimiert und wurde mit Fortschritt der Entwicklung des Protoskolex lateral an vier Seiten exprimiert. Im vollständig entwickelten Protoskolex und aktivierten Protoskolex hingegen erstreckt sich die Genexpression von *em-hh* in einer mittig durch den Protoskolex liegenden Ebene, was insbesondere über 3D Projektionen deutlich wurde. In *D. japonica* konnte die Expression von *hh* entlang der ventralen Nervenstränge über die AP-Achse nachgewiesen werden (Yazawa et al. 2009). Ob die Genexpression von *em-hh* in *E. multilocularis* ebenso das Nervensystems darstellt, kann durch kombinierte WMISH und WMIF (acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin) Analysen erfolgen. *Hh* ist in der Embryonalentwicklung von *D. rerio* wichtig für eine korrekte Ausbildung der Axon Guidance (Barresi et al. 2005). Zudem übernimmt Hh, wie auch Robo, eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems und ist in *S. mediterranea* an der Ausbildung des ZNS beteiligt (Cebrià und Newmark 2007). In Vertebraten bildet Hh einen Morphogen-Gradient von ventral-zu dorsal (Wang et al. 2016b). Unklar ist, ob die Ebene, in der die Genexpression von *em-hh* im Protoskolex nachgewiesen werden konnte, ebenfalls einen Gradient von ventral zu dorsal darstellt. Hierfür sind zunächst, wie bereits erwähnt, Marker für die DV-Achse in *E. multilocularis* nötig. Hh ist in *D. japonica* essentiell für die Ausbildung des posterioren Pols. Dabei reguliert Hh die posteriore Identität durch die Genexpression von *wnt-1* (Yazawa et al. 2009). Ob eine ähnliche Verbindung von Hh- und Wnt-Signalweg in *E. multilocularis* vorliegt, ist bisher nicht untersucht. Analysen hierzu können dazu beitragen Crosstalk zwischen den Signalwegen die zur Regulierung und Ausbildung der Körperachsen und Initiierung der Entwicklung von Brutkapseln im Metazestoden führt zu verstehen. In diesem Bezug wäre zudem zu klären, ob Hh in *E. multilocularis* die Expression von *slit* wie in *D. rerio* bzw. *wnt1*, wie in *D. japonica*, beeinflusst (Barresi et al. 2005; Yazawa et al. 2009). Hierzu können Inhibitorexperimente mit dem Hh-Inhibitor Cyclopamin und dem Agonist Purmorphamin mit anschließender WMISH Analyse der Expression von *em-slit* und *em-wnt-1* in behandelten Metazestoden-Vesikeln und Protoskolizes folgen. Vorversuche im Rahmen dieser Arbeit führten bei Einsatz von 5  $\mu$ M Cyclopamin auf aktivierten Protoskolizes zu einer besonders raschen Vesikularisierung (Anhang A.28; nicht statistisch verifiziert). Auf Metazestoden zeigte Cyclopamin keine

morphologischen Veränderungen. Diese Versuche sollten zunächst verifiziert werden und könnten Hinweise darauf geben, ob der Wnt- und Slit-Robo-Signalweg durch Hh in *E. multilocularis* reguliert wird. Dazu gewonnene Erkenntnisse können dazu beitragen die Vesikularisierung von Protoskolizes und damit verbundene Posteriorisierung auf molekularer Ebene zu verstehen.

#### 4.2.5 ***Em-ndk* ist ein neu identifizierter Anteriomarker in *E. multilocularis***

Im Hinblick auf die AP-Achse konnte neben dem bisher bekannten Anteriomarker *em-sfrp*, *em-ndk* als Homolog zu *ndk* in Planarien als spezifischer Anteriomarker in *E. multilocularis* identifiziert werden. *Em-ndk* wird mit Brutkapselbildung über alle Stadien der Protoskolex Entwicklung hinweg und auch im aktivierten Protoskolex stets spezifisch in Zellen am anterioren Pol exprimiert. *Em-ndk* stellt damit einen sehr spezifischen Anteriomarker in *E. multilocularis* dar. Auch *em-ndl* kann als Anteriomarker bezeichnet werden, selbst wenn sich die Genexpression im Vergleich zu *em-ndk* über den Skolex bis über die Saugnäpfe erstreckt. Die Genexpression von *em-ndl* ist damit vergleichbar zu *em-sfrp* im *E. multilocularis* Protoskolex (Koziol et al. 2016a). Mit *em-ndk* konnte ein weiterer hochkonservierter Marker und Faktor der AP-Achse in *E. multilocularis* identifiziert werden. Da auch der Anteriomarker *em-ndk*, wie *em-sfrp*, nicht in der Germinalschicht exprimiert war, konnte der Metazestode als posteriorisiertes Gewebe bestätigt werden. Die Homologe zu den genannten Anteriomarkern in *S. mediterranea* werden in Muskelzellen exprimiert und sind spezifisch in der anterioren Region exprimiert (Scimone et al. 2016). Für *em-sfrp* ist die Expression in Muskelzellen in *E. multilocularis* nachgewiesen, für *em-ndk* und *em-ndl* steht dies noch aus.

#### 4.2.6 ***Em-wnt5* ist vermutlich in der Ausbildung der ML-Achse in *E. multilocularis* beteiligt**

Die WMISH Analysen zu *em-wnt5*, mit einer in dieser Arbeit eigens hergestellte Sonde, bestätigten vorhergehende von Koziol et al. (2016a). Durch 3D Projektion konnte die Genexpression genauer bestimmt werden und zeigte, dass *em-wnt5* lateral über den gesamten Protoskolex exprimiert wird, prominent aber an zwei gegenüberliegenden Seiten. Wnt5 wird in den *S. mediterranea* und *G. tigrina* entlang der äußersten Region des ZNS exprimiert (Marsal et al. 2003; Adell et al. 2009; Adell et al. 2010). In weiteren Experimenten kann gezeigt werden, ob *em-wnt5* in *E. multilocularis* ebenfalls im ZNS

exprimiert wird. Zudem konnte in dieser Arbeit die Genexpression von *em-wnt5* in einer Zelle am posterioren Pol nachgewiesen werden. Ob es in dieser Zelle zu einer Überschneidung der Genexpression mit *em-wnt1* oder *em-wnt11a* (Koziol et al. 2016a) kommt, kann anhand von Doppel-WMISH Analysen untersucht werden. Aufgrund der lateralen Lokalisation nimmt *em-wnt5* vermutlich im Protoskolex eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der ML-Achse ein.

#### 4.2.7 ***Em-ror2* als potentieller Rezeptor zu *em-wnt5***

Als potentieller Rezeptor von Wnt5 konnte ein Ror2 Homolog in *E. multilocularis* identifiziert werden. Ob *em-ror*, wie in *Drosophila* innerhalb des Nervensystems exprimiert ist, konnte anhand dieser WMISH Analysen jedoch nicht beurteilt werden (Ripp et al. 2018). Das laterale Genexpressionsmuster von *em-ror2* in *E. multilocularis* weist daraufhin, dass eine Überschneidung der Expression mit dem ZNS möglich ist und kann mittels kombinierter WMISH und WMIF erfolgen. Interessant wäre hierzu, ob sich die Genexpressionsmuster mit denen von *em-wnt5*, *em-slit*, *em-robo1* und *em-hh* überschneiden. Der gleichzeitige Nachweis der Genexpression mehrerer Gene ist mittels mehrfach Färbung, über bspw. RNAscope® ISH, durchführbar und bietet die Möglichkeit maßgeblich zur Aufklärung der Entwicklung der Körperachsen in *E. multilocularis* beitragen (Wang et al. 2012; Kersigo et al. 2018; Gross-Thebing 2020).

#### 4.2.8 **Potentieller Crosstalk zwischen TGF- $\beta$ -, Hedgehog und Wnt-Signalweg**

Bisher ungeklärt ist die Frage, inwiefern die Anteriorisierung im Metazestoden und somit zur Bildung des folgenden Larvenstadiums initiiert wird. In dieser Arbeit konnte diesbezüglich eine neue Hypothese aufgezeigt werden. Eine mögliche Initiierung stellt die Expression von Anteriomarkern über einen Crosstalk zwischen TGF- $\beta$ , Hh- und Wnt-Signalweg dar. In der Literatur ist dazu bisher bekannt, dass in humanen Zelllinien und im murinem *in-vivo* Modell durch TGF- $\beta$ 1 der Hauptregulator des Hh-Signalwegs, *gli2*, erhöht exprimiert wird. Diese erhöhte Expression findet dabei unabhängig von Smo/Ptch Aktivierung statt, stattdessen ist die Expression von *gli2* abhängig von SMAD3 (Dennler et al. 2007). Weiterhin ist beschrieben, dass durch *gli1* und *gli2* die Expression von *shrp1* reguliert wird (He et al. 2006; Carballo et al. 2018). Dabei wird der Wnt-Inhibitor *shrp* durch direkte Interaktion mit *gli* als Zielgen des Hedgehog Signalweges exprimiert. Die identifizierte Gli-Bindungssequenz „GTCCACCCA“ in der



Promotorregion von humanen *sfrp1* ist auch in *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* konserviert (Katoh und Katoh 2006).

In *E. multilocularis* ist TGF- $\beta$  im Bezug auf die Wirt-Parasit-Interaktion und Suppression des Immunsystems des Wirtes bekannt. Dabei steigt die Expression von Wirts-TGF- $\beta$  während der Infektion stetig und steht im Zusammenhang mit Immuntoleranz und der Entwicklung von Fibrosen (Wang et al. 2013b; Harraga et al. 2003). Denkbar wäre, dass die erhöhte TGF- $\beta$  Konzentration mit Fortschritt der Erkrankung auch auf den Parasiten wirkt und so die oben beschriebene Kaskade über Hh- und Wnt-Signalweg die Anteriorisierung in Gang setzt. Ein Homolog zu *gli2*, EmuJ\_000711000, konnte im Rahmen dieser Arbeit in *E. multilocularis* identifiziert werden. WMISH-Analysen ergaben, dass *em-gli2*, wie *em-hh*, im Metazestoden erst mit Bildung der Brutkapseln exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Erste Analysen nach der Gli-Bindungssequenz in der Promotorregion von *em-sfrp* ergaben ca. 112 nt Aufwärts des Startcodons die Abfolge „TCCACCCA“. Trotz des Fehlens des initialen Guanins in der Gli-Bindungssequenz „GTCCACCCA“ ist es möglich, dass es sich bei der identifizierten Sequenz in der Promotorregion um die *gli2* Bindungsstelle handelt, die sich von der humanen Sequenz durch eine Punktmutation unterscheidet. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte die Interaktion von *em-gli2* und *em-sfrp*-Promotor durch Yeast-One Hybrid oder EMSA Tests analysiert werden. Angelehnt an die Veröffentlichung von Dennler et al. (2007), kann die Induktion von *gli2* durch TGF- $\beta$  mittels Genexpressionsanalysen zu *em-gli* und *em-sfrp* in TGF- $\beta$  behandelten Metazestoden und Primärzellen erfolgen. Sollte sich dies bestätigen, könnten im Weiteren die Gli/SMAD sowie die Gli/SFRP Interaktion über Yeast-Two-Hybrid oder EMSA Versuche folgen.

### **4.3 Erweiterung der *in-vitro* kultivierbaren Larvenstadien um adult-ähnliche Würmer**

#### **4.3.1 Die Entwicklung von Protoskolizes ist abhängig von FBS**

Aufgrund eines Zufallsfundes und nachfolgender Versuche, erweiterten sich die *in-vitro* kultivierbaren Larvenstadien von *E. multilocularis* um die der adult-ähnlichen Würmer. Bisher waren adult-ähnliche („strobilar“) Würmer nur vorwiegend von *E. granulosus* kultiviert worden. Dafür war stets biphasiges Medium nötig (Nosratabadi et al. 2020; Mousavi et al. 2019; Smyth und Davies 1975), lediglich Camicia et al. (2013) berichtet über eine Kultivierung in einphasigem Medium von mehrgliedrigen

*E. granulosus* Würmern. Die Kultivierung von adult-ähnlichen Würmern, wie in dieser Arbeit vorgestellt, verläuft nach 4 Wochen analog zur Kultivierung von Metazestoden-Vesikeln und ist, im Gegensatz zur Kultivierung in biphasigem Medium, einfach umzusetzen. In herkömmlicher Co-Kultur redifferenzieren Protoskolizes in hoher Anzahl zu Microzysten, welche sich zu Metazestoden-Vesikeln ausbilden. Durch die Kultivierung der Protoskolizes für 4 Wochen in Medium mit 20% FBS konnten mehr evaginierte Protoskolizes beobachtet werden und es wurde die Bildung von Proglottiden gefördert. Eine Quantifizierung dieser Daten fand nicht statt, weshalb diese hier nicht im Detail aufgeführt sind. Sie konnten in dieser Arbeit aber unter der Verwendung mehrerer Isolate reproduziert werden. Außerdem wurde die Vermutung, dass primäre Darmorganoide oder Caco-2 Zellen Faktoren sezernieren, welche die Differenzierung von Protoskolizes fördern könnten, nicht bestätigt. Stattdessen zeigte sich die Entwicklung der Protoskolizes abhängig von der Konzentration an FBS im Kultivierungsmedium, wobei ein hoher Anteil der Protoskolizes bei einer Konzentration von 20% FBS sich zum mehrgliedrigen Wurm entwickelte, während bei Verzicht auf FBS eine Vesikularisierung und Entwicklung zum Metazestoden erfolgte (nicht quantifiziert). Dabei entwickeln sich, bei Kultivierung in Medium mit 20% FBS Protoskolizes zu Microzysten, während bei Verzicht auf FBS keine Protoskolizes festgestellt werden konnten, welche Proglottide entwickeln. Welche (Wachstums-) Faktoren aus dem FBS für die Entwicklung zum adult-ähnlichen Wurm führt bzw. für eine Entwicklung zum Metazestoden essentiell sind, wurde nicht untersucht. Erkenntnisse hierzu können auch genutzt werden, um ein optimiertes Kultivierungsmedium für *E. multilocularis* zu entwickeln. Dadurch könnte künftig auf FBS, welches unter ethisch umstrittenen Methoden gewonnen wird, verzichtet werden (van der Valk et al. 2018).

#### 4.3.2 **Aus *in-vitro* kultivierten Metazestoden und Microzysten entwickeln sich vollständig ausgebildete Protoskolizes**

Eine vermehrte Redifferenzierung von Protoskolizes zu Microzysten in Medium ohne FBS war bereits bekannt (Möginger 2016; Camicia et al. 2013). Im Vergleich zur Redifferenzierung von Protoskolizes vom im Labor üblicherweise verwendeten Standardmedium (DMEM+1% Pen/Strep), wurde durch Verwendung von Kultivierungsmedium für Darmorganoide, die Entwicklung zu Microzysten in nahezu allen Protoskolizes beobachtet und erfolgte innerhalb von 21 Tagen vollständig (Daten

nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu, sind bei Kultivierung von Protoskolizes in DMEM+1% Pen/Strep nach 21 Tagen nicht alle Protoskolizes von der Redifferenzierung betroffen und die Vesikularisierung zieht sich über einen längeren Zeitraum. Um eine vollständige Redifferenzierung in kurzer Zeit zu provozieren, eignet sich für künftige Versuche das Medium „Advanced DMEM/F-12+1% Pen/Strep“.

Es konnte gezeigt werden, dass sich aus redifferenzierten Protoskolizes (Microzysten) nach 4-5 Monaten Metazestoden mit Brutkapseln und vollständig ausgebildeten Protoskolizes entwickeln. Damit kann aus einem redifferenzierten Protoskolizes ein Vielfaches an vollständig entwickelten Protoskolizes folgen. Die einzigartige Fähigkeit der Redifferenzierung vom Protoskolizes zur Microzyste wurde bereits beschrieben und stellt einen Vorteil dar, wenn Metazestoden-Vesikel durch Ruptur zerstört werden und somit Metazestoden-Vesikel durch Protoskolizes zu einem Vielfachen ersetzt werden können (Smyth 1968; Gottstein 1992; Dezaki et al. 2016; Wang et al. 2016a). *In-vivo* ist dieser Vorgang jedoch nicht hinreichend untersucht, um eine Aussage über den Stellenwert dieser Entwicklung im Wirt treffen zu können (Dezaki et al. 2016). Die Redifferenzierung steht außerdem in Verbindung mit den Wnt-Signalweg. Die Vesikularisierung geht mit einer Abnahme der Genexpression von *em-sfrp* und gleichzeitig progressiver Zunahme von *em-wnt11a* und *em-wnt11b* (innerhalb 504 h nach Aktivierung) einher und deutet auf einen Posteriorisierungsvorgang hin (Möginger 2016).

Aufgrund der erfolgreichen Isolierung von Protoskolizes aus *in-vitro* kultivierten Metazestoden-Vesikeln und Microzysten, besteht nun die Möglichkeit die Entwicklung von Protoskolizes im Metazestoden zu untersuchen. Langzeit-Inhibitorversuche ermöglichen den Einfluss einzelner (Wachstums-) Faktoren auf die Entwicklung von Protoskolizes zu analysieren. Als besonders geeignet für derartige Versuche erwies sich in dieser Arbeit das Isolat DDD16, da innerhalb weniger Wochen bereits die Brutkapselbildung einsetzte und vollständig entwickelte Protoskolizes aus drei Monate alten Metazestoden isoliert werden konnten.

#### **4.3.3 Aus redifferenzierten adult-ähnlichen Würmer können sich Microzysten mit vollständig entwickelten Protoskolizes bilden**

Bisher war nicht bekannt, dass sich auch mehrgliedrige Würmer zurück zum Metazestoden differenzieren und in der Lage sind Protoskolizes zu bilden. Auch wenn die Form der redifferenzierten adult-ähnlichen Würmer nicht mehr in vollständig

zirkulären Metazestoden-Vesikeln resultierte, sondern oval blieben. Besonders bemerkenswert war, dass sich in diesen ovalen Metazestoden-Vesikeln Brutkapseln mit vollständig entwickelten Protoskolizes bildeten, bei welchen 20 Tage nach Isolierung und Kultivierung in Standardmedium mit RH<sup>-</sup>, Proglottiden-Entwicklung nachgewiesen werden konnte. Dies war bisher nicht untersucht und beobachtet worden und eröffnet einen neuen Einblick in die einzigartige Fähigkeit von *E. multilocularis* sich aus verschiedenen Stadien des Lebenszyklus zum Metazestoden zu entwickeln. Aus den *in-vitro* Versuchen ging diese Vesikularisierung als eine Art Überdauerungsform bei Nährstoffmangel hervor, die in der Bildung von Brutkapseln und vollständig entwickelten Protoskolizes resultierte. Welche Rolle diese Fähigkeit der Metamorphose vom adulten Wurm zum Metazestoden im Endwirt hat ist nicht geklärt. Vermutlich handelt es sich auch hier um eine Posteriorisierung. Außerdem ist davon auszugehen, dass die Entwicklung stets von germinativen Zellen ausgeht. Wenn, wie aufgrund von Nährstoffmangel, die differenzierten Zellen degenerieren wird möglicherweise den germinativen Zellen, ähnlich wie bei der Onkosphäre-Metazestode Transformation, signalisiert die Vesikularisierung und Entwicklung zum Metazestoden zu forcieren. Um diese Hypothese zu prüfen, eignen sich Genexpressionsanalysen.

#### 4.3.4 Adult-ähnliche Entwicklung von Protoskolizes

Die adult-ähnlichen Würmer weisen morphologisch Ähnlichkeit mit adulten Tieren auf. Anhand von REM konnten Poren nachgewiesen werden, welche möglicherweise Geschlechts- und Sekretöffnungen entsprechen. Anhand dieser Arbeit sind diese Poren allerdings nicht hinreichend als solche belegbar, da keine adulten Tiere zum Vergleich vorlagen. Dies könnte in weiteren Arbeiten nachgeholt werden. Außerdem war es nicht möglich, eine genetische Charakterisierung durchzuführen, da die aus adult-ähnlichen Würmer isolierte Konzentration und Qualität an RNA nicht ausreichend war. Durch Nachweis der Expression von adult-spezifischen Genen könnte künftig die beobachtete Entwicklung von Protoskolizes zu mehrgliedrigen Würmern *in-vitro* als tatsächliche adulte Entwicklung nachgewiesen werden. Außerdem konnten in dieser Arbeit mikroskopisch keine Onkosphären in Proglottiden oder dem Zellkulturmedium beobachtet werden. Nicht zuletzt für den Arbeitsschutz ist es nötig herauszufinden, ob die vorliegenden adult-ähnlichen Würmer, wie in der Literatur beschrieben, tatsächlich nicht die Geschlechtsreife *in-vitro* vollziehen (Dezaki et al. 2016; Smyth et al. 1967;

Smyth et al. 1966; Thompson 2017). Die fehlende Geschlechtsreife könnte auch Ursprung der beobachteten Entwicklung der hohen Anzahl an Proglottiden sein. Im adulten Wurm werden nach Heranreifeung der Onkosphären das reife Proglottis abgeschnürt. Es wird davon ausgegangen, dass *in-vitro* die Entwicklung von Onkosphären nicht erfolgt (Thompson 2017) und somit auch die Abschnürung von Proglottis ausbleibt, weshalb die Entwicklung von Würmern mit einer hohen Anzahl an Proglottiden zu beobachten war. Die Ausbildung der Geschlechtsorgane kann über Röntgenmikroskopie oder Dünnschnitte mit anschließender HE-Färbung erfolgen (Heidari et al. 2019; Al-Sabi et al. 2008).

#### 4.3.5 **Adult-ähnliche Würmer zeigen auf Verletzung hin keine Regeneration**

Anhand der neu gewonnenen Erkenntnisse, dass sich auch adult-ähnliche Würmer zum Metazestoden redifferenzieren und Brutkapseln bilden können, kam die Frage auf, ob sich einzelne Segmente zum Metazestoden entwickeln können. Hierfür wurde ein Vorversuch durchgeführt, bei dem zwei- bis mehrgliedrige Würmer mittels Skalpell in zwei Hälften getrennt wurden. Die Schnittstelle variierte dabei und wurde nach dem Skolex, dem ersten, zweiten oder dritten Proglottis vollzogen. An der Stelle der Verletzung kam es zur Ausbildung eines oder mehrerer kleiner Vesikel, teils um das gesamte Körpersegment. Auffällig war, dass die beiden getrennten Körperhälften auch noch zwei Wochen nach der Teilung Kontraktionen zeigten (Anhang A.29). Zudem konnte eine leichte Vesikularisierung von einzelnen Skolizes und Proglottiden beobachtet werden. Im Zeitraum von zwei Monaten konnte in keinem der Exemplare eine vollständige Regeneration oder Redifferenzierung zum Metazestoden beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse beruhen auf den Ergebnissen eines einmaligen Versuchsdurchlaufs mit 20 Tieren und ist somit nicht statistisch verifiziert. Die gewonnenen Erkenntnisse aus diesem Versuch deuten darauf hin, dass eine vollständige Regeneration oder Redifferenzierung zum Metazestoden von verwundeten Tieren nicht möglich ist. Die Idee, dass sich nicht nur adult-ähnliche Würmer, sondern auch einzelnen Segmente/verletzte Würmer vollständig zum Metazestoden redifferenzieren können, konnte damit nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es sich bei germinative Zellen in *E. multilocularis* um totipotente Stammzellen handelt und sich von den pluripotenten Neoblasten in Planarien u. a. durch das Fehlen von *vasa* und *piwi* Orthologen unterscheiden (Koziol

et al. 2014). Bemerkenswert war dennoch, dass Skolex und Proglottide teils leichte Vesikularisierung zeigten und außerdem über einen sehr langen Zeitraum motil blieben. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass die germinativen Zellen in *E. multilocularis* nicht die Eigenschaften von Neoblasten, wie in Planarien, besitzen. Für die Entwicklung von neuen Therapiemöglichkeiten bei AE stellt die Regeneration von adult-ähnlichen Würmern keine Relevanz dar, weshalb die Wiederholung dieses Versuchs aus rein entwicklungsbiologischer Hinsicht von Interesse wäre.

## 4.4 Fazit

### 4.4.1 Fazit und Ausblick Wnt-Signalweg

Die Primärzellkultur in *E. multilocularis* entwickelt sich nicht unidirektional zum Metazestoden. Anhand von Transkriptomdaten konnten nicht nur Posterior- und Metazestodenmarker identifiziert werden, was dem Ursprung der Primärzellen und deren Entwicklung zum Metazestoden widerspiegelt, sondern auch Anteriommarker und Protoskolex spezifische Gene, welche sonst nur spezifisch am anterioren Pol exprimiert werden. Nach *em-bcat1* Knockdown wurden insbesondere Anterior- und Protoskolexmarker sowie Marker für germinative Zellen überexprimiert, bei gleichzeitig verringerter Expression von Posterior- und Metazestodenmarkern. Diese anterior-dominierte Genexpression resultierte in einer verringerten Bildung von Metazestoden-Vesikeln durch germinative Zellen. Der Wnt-Signalweg zeigt sich damit, neben der korrekten Ausbildung der AP-Achse in *E. multilocularis*, als essentiell für die posteriore Identität und Bildung von Metazestoden aus germinativen Zellen. Die germinativen Zellen zeigten sich abhängig auf in Muskelzellen exprimierte Faktoren, wie *wnt1* und *em-sfrp* und entwickeln sich vermutlich, ähnlich wie Neoblasten in verwandten Planarien, abhängig von ihrer Lokalisation. Nicht nur aus entwicklungsbiologischer Sicht, sondern auch bezüglich neuer Therapieansätze, sind die Ergebnisse dieser Arbeit von Belang. Eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und damit verbundene Überexpression von Zielgenen des Wnt-Signalwegs steht in einer Vielzahl von malignen Tumoren im Zusammenhang mit Tumorentwicklung, -progression und -metastasierung (Herbst und Kolligs 2007; Jung und Park 2020; Koni et al. 2020) und zeigt damit Parallelen zum tumorartigen Wachstum des *E. multilocularis* Metazestoden. Der Wnt-Signalweg dient als Ziel für die Behandlung von Krebserkrankungen (Herbst und Kolligs 2007; Chen et al. 2009). Sollte der Wnt-Signalweg sich in weiteren *in-vitro* und *in-vivo* Versuchen als essentiell für das

Wachstum des Metazestoden herausstellen, so kann dieser in der Behandlung von AE einen neuen Therapieansatz darstellen.

#### 4.4.2 **Fazit und Ausblick zu Körperachsen in *E. multilocularis***

Die Ergebnisse dieser Arbeit gaben, neben dem Wnt-Signalweg, weiter Aufschluss über die Organisation der Körperachsen in *E. multilocularis*. So konnte der Slit-Robo-Signalweg und nicht-kanonische Wnt-Signalweg mit der Ausbildung der ML-Achse in *E. multilocularis* in Verbindung gebracht werden und ein Slit Homolog und zwei Robo Homologe identifiziert werden. Damit zeigte sich, dass die Ausbildung der Körperachsen hochkonserviert ist und in *E. multilocularis* wohl ebenso verläuft, wie in ihren gut untersuchten Verwandten, den Planarien. Durch homogene Expression von *em-slit* in der Germinalschicht stellt der Metazestode nicht nur posteriorisiertes, sondern auch medianisiertes Gewebe dar. Erst mit der Entwicklung des nächsten Larvenstadiums, den Protoskolizes, werden die Körperachsen organisiert exprimiert. Dies zeigte sich, indem weitere Homologe zu hochkonservierten Schlüsselfaktoren in der Ausbildung der ML- und AP-Achse, wie *em-hh* und der neu identifizierte Anteriomarker *em-ndk* erst mit der Entwicklung von Brutkapseln exprimiert wurden und im aktivierten Protoskolex beständig exprimiert waren. Die Ausbildung der Körperachsen ist dabei nicht nur in entwicklungsbiologischer Hinsicht interessant. Neben dem Wnt-Signalweg sind auch der Slit-Robo- und Hh-Signalweg in humanen Tumoren ursächlich für das unkontrollierte Wachstum sowie essentiell für die Nährstoffversorgung durch Vaskularisierung und Angiogenese. Diese Signalwege sind auch im *E. multilocularis* Metazestoden modifiziert. Wirkstoffe aus der Tumorbilogie könnten deshalb auf lange Sicht vielversprechende Therapeutika bei AE darstellen.

#### 4.4.3 **Fazit und Ausblick zu *in-vitro* kultivierten adult-ähnliche Würmer**

Die *in-vitro* kultivierten adult-ähnlichen Würmer ermöglichen Untersuchungen zur Entwicklung und Erhaltung von Körperachsen in *E. multilocularis*. Insbesondere kann überprüft werden, ob die DV-Achse erst mit Bildung von Proglottiden und Organstrukturen gebildet wird. Neben einer Kultivierungsmethode von adult-ähnlichen Würmern wurde auch eine optimierte Methode gefunden, um die Entwicklung von Microzysten aus Protoskolizes zu provozieren. Die Redifferenzierung vom Protoskolex zum Metazestoden kann mittels RNA-Sonden zu Genen der ML- und AP-Achse verfolgt werden, um zu verstehen, wie die *Echinococcus*-spezifische Modifikation der Körperachsen und Posteriorisierung vom Protoskolex reguliert wird.

---

## Literaturverzeichnis

- Abu-Remaileh, M.; Gerson, A.; Farago, M.; Nathan, G.; Alkalay, I.; Zins Rousso, S. et al. (2010): Oct-3/4 regulates stem cell identity and cell fate decisions by modulating Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. In: *The EMBO Journal* 29 (19), S. 3236–3248. DOI: 10.1038/emboj.2010.200.
- Adell, T.; Cebrià, F.; Saló, E. (2010): Gradients in planarian regeneration and homeostasis. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (1), a000505. DOI: 10.1101/cshperspect.a000505.
- Adell, T.; Martín-Durán, J. M.; Saló, E.; Cebrià, F. (2015): Platyhelminthes. In: Andreas Wanninger (Hg.): *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 2. Lophotrochozoa (Spiralia)*. 1st ed. 2015. Wien: Springer, S. 21–40.
- Adell, T.; Saló, E.; Boutros, M.; Bartscherer, K. (2009): Smed-Evi/Wntless is required for beta-catenin-dependent and -independent processes during planarian regeneration. In: *Development (Cambridge, England)* 136 (6), S. 905–910. DOI: 10.1242/dev.033761.
- Almuedo-Castillo, M.; Sureda-Gómez, M.; Adell, T. (2012): Wnt signaling in planarians: new answers to old questions. In: *The International journal of developmental biology* 56 (1-3), S. 53–65. DOI: 10.1387/ijdb.113451ma.
- Al-Sabi, M. Nafi Solaiman; Kapel, C. M. O.; Webster, P.; Deplazes, P. (2008): Reduced egg production of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected and re-infected red foxes (*Vulpes vulpes*). In: *Veterinary parasitology* 155 (1-2), S. 59–66. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.04.010.
- Ammann, R. W.; Eckert, J. (1996): CESTODES. In: *Gastroenterology Clinics of North America* 25 (3), S. 655–689. DOI: 10.1016/S0889-8553(05)70268-5.
- Ancarola, M. Eugenia; Lichtenstein, G.; Herbig, J.; Holroyd, N.; Mariconti, M.; Brunetti, E. et al. (2020): Extracellular non-coding RNA signatures of the metacestode stage of *Echinococcus multilocularis*. In: *PLoS neglected tropical diseases* 14 (11), e0008890. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008890.
- Angers, S.; Moon, R. T. (2009): Proximal events in Wnt signal transduction. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (7), S. 468–477. DOI: 10.1038/nrm2717.



- Arnold, C. P.; Lozano, A. M.; Mann, F. G.; Lange, J. J.; Seidel, C.; Alvarado, A. S. (2021): Hox genes regulate asexual reproductive behavior and tissue segmentation in adult animals.
- Artimo, P.; Jonnalagedda, M.; Arnold, K.; Baratin, D.; Csardi, G.; Castro, E. de et al. (2012): ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. In: *Nucleic acids research* 40 (Web Server issue), W597-603. DOI: 10.1093/nar/gks400.
- Barresi, M. J. F.; Hutson, L. D.; Chien, C.-B.; Karlstrom, R. O. (2005): Hedgehog regulated Slit expression determines commissure and glial cell position in the zebrafish forebrain. In: *Development (Cambridge, England)* 132 (16), S. 3643–3656. DOI: 10.1242/dev.01929.
- Belting, H.-G.; Wendik, B.; Lunde, K.; Leichsenring, M.; Mössner, R.; Driever, W.; Onichtchouk, D. (2011): Pou5f1 contributes to dorsoventral patterning by positive regulation of vox and modulation of fgf8a expression. In: *Developmental Biology* 356 (2), S. 323–336. DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.05.660.
- Bertrand, S.; Somorjai, I.; Garcia-Fernandez, J.; Lamonerie, T.; Escriva, H. (2009): FGFR1 is a neglected putative actor of the FGF signalling pathway present in all major metazoan phyla. In: *BMC Evol Biol* 9, S. 226. DOI: 10.1186/1471-2148-9-226.
- Bhattacharai, P.; Hameed, S.; Dai, Z. (2018): Recent advances in anti-angiogenic nanomedicines for cancer therapy. In: *Nanoscale* 10 (12), S. 5393–5423. DOI: 10.1039/C7NR09612G.
- Bienz, M.; Clevers, H. (2000): Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling. In: *Cell* 103 (2), S. 311–320. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00122-7.
- Blockus, H.; Chédotal, A. (2016): Slit-Robo signaling. In: *Development (Cambridge, England)* 143 (17), S. 3037–3044. DOI: 10.1242/dev.132829.
- Brehm, K. (2010a): *Echinococcus multilocularis* as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction. In: *Parasitology* 137 (3), S. 537–555. DOI: 10.1017/S0031182009991727.
- Brehm, K. (2010b): The role of evolutionarily conserved signalling systems in *Echinococcus multilocularis* development and host-parasite interaction. In:

- Medical microbiology and immunology* 199 (3), S. 247–259. DOI: 10.1007/s00430-010-0154-1.
- Brehm, K.; Koziol, U. (2014): On the importance of targeting parasite stem cells in anti-echinococcosis drug development. In: *Parasite (Paris, France)* 21, S. 72. DOI: 10.1051/parasite/2014070.
- Brehm, K.; Kronthaler, K.; Jura, H.; Frosch, M. (2000): Cloning and characterization of  $\beta$ -tubulin genes from *Echinococcus multilocularis*☆. In: *Molecular and biochemical parasitology* 107 (2), S. 297–302. DOI: 10.1016/S0166-6851(00)00178-X.
- Brehm, K.; Spiliotis, M. (2008): Recent advances in the in vitro cultivation and genetic manipulation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes and germinal cells. In: *Experimental parasitology* 119 (4), S. 506–515. DOI: 10.1016/j.exppara.2008.03.007.
- Brehm, K.; Wolf, M.; Beland, H.; Kroner, A.; Frosch, M. (2003): Analysis of differential gene expression in *Echinococcus multilocularis* larval stages by means of spliced leader differential display. In: *International journal for parasitology* 33 (11), S. 1145–1159. DOI: 10.1016/S0020-7519(03)00169-3.
- Brose, K.; Tessier-Lavigne, M. (2000): Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. In: *Current opinion in neurobiology* 10 (1), S. 95–102. DOI: 10.1016/s0959-4388(99)00066-5.
- Brunetti, E.; Kern, P.; Vuitton, D. Angèle (2010): Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. In: *Acta Tropica* 114 (1), S. 1–16. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.11.001.
- Burda, H.; Hilken, G.; Zrzavý, J. (2008): Systematische Zoologie. 1. Aufl. Stuttgart (Hohenheim): Ulmer (utb.de-Bachelor-Bibliothek, 3119). Online verfügbar unter <http://www.utb-studi-e-book.de/9783838531199>.
- Bürglin, T. R. (2008): Evolution of hedgehog and hedgehog-related genes, their origin from Hog proteins in ancestral eukaryotes and discovery of a novel Hint motif. In: *BMC genomics* 9, S. 127. DOI: 10.1186/1471-2164-9-127.
- Camicia, F.; Herz, M.; Prada, L. C.; Kamenetzky, L.; Simonetta, S. H.; Cucher, M. A. et al. (2013): The nervous and prenervous roles of serotonin in *Echinococcus*

- spp.* In: *International journal for parasitology* 43 (8), S. 647–659. DOI: 10.1016/j.ijpara.2013.03.006.
- Carballo, G. Basile; Honorato, J. Ribeiro; Lopes, G. Pinto Farias de; Spohr, T. Cristina Leite de Sampaio E. (2018): A highlight on Sonic hedgehog pathway. In: *Cell communication and signaling : CCS* 16 (1), S. 11. DOI: 10.1186/s12964-018-0220-7.
- Castro, E. de; Sigrist, C. J. A.; Gattiker, A.; Bulliard, V.; Langendijk-Genevaux, P. S.; Gasteiger, E. et al. (2006): ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. In: *Nucleic acids research* 34 (Web Server issue), W362-5. DOI: 10.1093/nar/gkl124.
- Caussinus, E.; Gonzalez, C. (2005): Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. In: *Nature Genetics* 37 (10), S. 1125–1129. DOI: 10.1038/ng1632.
- Cebrià, F.; Guo, T.; Jopek, J.; Newmark, P. A. (2007): Regeneration and maintenance of the planarian midline is regulated by a slit orthologue. In: *Developmental Biology* 307 (2), S. 394–406. DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.05.006.
- Cebrià, F.; Kobayashi, C.; Umesono, Y.; Nakazawa, M.; Mineta, K.; Ikeo, K. et al. (2002): FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians. In: *Nature* 419 (6907), S. 620–624. DOI: 10.1038/nature01042.
- Cebrià, F.; Newmark, P. A. (2007): Morphogenesis defects are associated with abnormal nervous system regeneration following *roboA* RNAi in planarians. In: *Development (Cambridge, England)* 134 (5), S. 833–837. DOI: 10.1242/dev.02794.
- Chai, G.; Ma, C.; Bao, K.; Zheng, L.; Wang, X.; Sun, Z. et al. (2010): Complete functional segregation of planarian beta-catenin-1 and -2 in mediating Wnt signaling and cell adhesion. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (31), S. 24120–24130. DOI: 10.1074/jbc.M110.113662.
- Chautan, M.; Pontier, D.; Artois, M. (2000): Role of rabies in recent demographic changes in Red Fox (*Vulpes vulpes*) populations in Europe. In: *Mammalia* 64 (4), S. 391–410. DOI: 10.1515/mamm.2000.64.4.391.

- Chen, B.; Dodge, M. E.; Tang, W.; Lu, J.; Ma, Z.; Fan, C.-W. et al. (2009): Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. In: *Nature chemical biology* 5 (2), S. 100–107. DOI: 10.1038/nchembio.137.
- Chen, J. K. (2016): I only have eye for ewe: the discovery of cyclopamine and development of Hedgehog pathway-targeting drugs. In: *Natural product reports* 33 (5), S. 595–601. DOI: 10.1039/c5np00153f.
- Cheng, Z.; Liu, F.; Tian, H.; Xu, Z.; Chai, X.; Luo, D.; Wang, Y. (2019): Impairing the maintenance of germinative cells in *Echinococcus multilocularis* by targeting Aurora kinase. In: *PLoS neglected tropical diseases* 13 (5), e0007425. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007425.
- Collins, J. J. (2017): Platyhelminthes. In: *Current biology : CB* 27 (7), R252-R256. DOI: 10.1016/j.cub.2017.02.016.
- Collins, J. J.; Wendt, G. R.; Iyer, H.; Newmark, P. A. (2016): Stem cell progeny contribute to the schistosome host-parasite interface. In: *eLife* 5. DOI: 10.7554/eLife.12473.
- Conraths, F. J.; Deplazes, P. (2015): *Echinococcus multilocularis*: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. In: *Veterinary parasitology* 213 (3-4), S. 149–161. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.07.027.
- Conraths, F. J.; Maksimov, P. (2020): Epidemiologie von *Echinococcus multilocularis*-Infektionen: Eine Übersicht zum derzeitigen Kenntnisstand und zur Situation in Deutschland. In: *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* (133). DOI: 10.2376/0005-9366-2020-5.
- Conraths, F. J.; Probst, C.; Possenti, A.; Boufana, B.; Saulle, R.; La Torre, G. et al. (2017): Potential risk factors associated with human alveolar echinococcosis: Systematic review and meta-analysis. In: *PLoS neglected tropical diseases* 11 (7), e0005801. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005801.
- Cox, W. G.; Singer, V. L. (1999): A high-resolution, fluorescence-based method for localization of endogenous alkaline phosphatase activity. In: *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 47 (11), S. 1443–1456. DOI: 10.1177/002215549904701110.

- Currie, K. W.; Brown, D. D. R.; Zhu, S.; Xu, C.; Voisin, V.; Bader, G. D.; Pearson, B. J. (2016): HOX gene complement and expression in the planarian *Schmidtea mediterranea*. In: *EvoDevo* 7 (1), S. 7. DOI: 10.1186/s13227-016-0044-8.
- Davidson, R. K.; Lavikainen, A.; Konyaev, S.; Schurer, J.; Miller, A. L.; Oksanen, A. et al. (2016): Echinococcus across the north: Current knowledge, future challenges. In: *Food and Waterborne Parasitology* 4, S. 39–53. DOI: 10.1016/j.fawpar.2016.08.001.
- Dennis, R. D.; Schubert, U.; Bauer, C. (2011): Angiogenesis and parasitic helminth-associated neovascularization. In: *Parasitology* 138 (4), S. 426–439. DOI: 10.1017/S0031182010001642.
- Dennler, S.; André, J.; Alexaki, I.; Li, A.; Magnaldo, T.; Dijke, P. et al. (2007): Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor-beta. Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo. In: *Cancer Research* 67 (14), S. 6981–6986. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0491.
- Denzin, N.; Schliephake, A.; Fröhlich, A.; Ziller, M.; Conraths, F. J. (2014): On the move? *Echinococcus multilocularis* in red foxes of Saxony-Anhalt (Germany). In: *Transboundary and emerging diseases* 61 (3), S. 239–246. DOI: 10.1111/tbed.12026.
- Deplazes, P.; Heggin, D.; Gloor, S.; Romig, T. (2004): Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*. In: *Trends in parasitology* 20 (2), S. 77–84. DOI: 10.1016/j.pt.2003.11.011.
- Deplazes, P.; Rinaldi, L.; Alvarez Rojas, C. A.; Torgerson, P. R.; Harandi, M. F.; Romig, T. et al. (2017): Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. In: R.C.A. Thompson, P. Deplazes und A. J. Lymbery (Hg.): *Advances in Parasitology : and Echinococcosis, Part A*, Bd. 95: Academic Press, S. 315–493. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065308X1630104X>.
- Dezaki, E. Saedi; Yaghoubi, M. Mehdi; Spiliotis, M.; Boubaker, G.; Taheri, E.; Almani, P. Ghaseminejad et al. (2016): Comparison of ex vivo harvested and in vitro cultured materials from *Echinococcus granulosus* by measuring expression levels of five genes putatively involved in the development and maturation of

- adult worms. In: *Parasitology research* 115 (11), S. 4405–4416. DOI: 10.1007/s00436-016-5228-6.
- Díaz, A.; Casaravilla, C.; Irigoín, F.; Lin, G.; Previato, J. O.; Ferreira, F. (2011): Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. In: *Trends in parasitology* 27 (5), S. 204–213. DOI: 10.1016/j.pt.2010.12.012.
- Dickson, B. J.; Gilestro, G. F. (2006): Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. In: *Annual review of cell and developmental biology* 22, S. 651–675. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.090704.151234.
- Ding, C.; Li, Y.; Xing, C.; Zhang, H.; Wang, S.; Dai, M. (2020): Research Progress on Slit/Robo Pathway in Pancreatic Cancer: Emerging and Promising. In: *Journal of oncology* 2020, S. 2845906. DOI: 10.1155/2020/2845906.
- Duffy, D. J. (2011): Modulation of Wnt signaling: A route to speciation? In: *Communicative & integrative biology* 4 (1), S. 59–61. DOI: 10.4161/cib.4.1.13712.
- Dyachenko, V.; Pantchev, N.; Gawlowska, S.; Vrhovec, M. Globokar; Bauer, C. (2008): *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. In: *Veterinary parasitology* 157 (3-4), S. 244–253. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.07.030.
- Eckert, J. (Hg.) (2001): WHO/OIE manual on Echinococcosis in humans and animals. A zoonosis of global concern. Paris: World Organisation for Animal Health.
- Eckert, J.; Deplazes, P. (2004): Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. In: *Clinical Microbiology Reviews* 17 (1), S. 107–135. DOI: 10.1128/CMR.17.1.107-135.2004.
- Eckert, J.; Friedhoff Karl Th; Zahner, H.; Deplazes, P. (2008): Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. 2., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Enke.
- Edgar, R. C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. In: *Nucleic acids research* 32 (5), S. 1792–1797. DOI: 10.1093/nar/gkh340.
- Eisenmann, D. M. (2005): Wnt signaling. Online verfügbar unter [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_wntsignaling/wntsignaling.pdf](http://www.wormbook.org/chapters/www_wntsignaling/wntsignaling.pdf), zuletzt aktualisiert am 26.09.2017, zuletzt geprüft am 20.10.2020.

- Epping, K. (2011): Molekulare Analyse der hormonellen Wirt-Parasit Kreuzinteraktion über TGF- $\beta$  Zytokine bei der Alveolären Echinokokkose. Dissertation. Universität Würzburg, Würzburg. Institut für Hygiene und Mikrobiologie. Online verfügbar unter [https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4-wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/5152/file/Dissertation\\_Kerstin\\_Epping.pdf](https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4-wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/5152/file/Dissertation_Kerstin_Epping.pdf), zuletzt geprüft am 19.07.21.
- Epping, K.; Brehm, K. (2011): *Echinococcus multilocularis*: molecular characterization of EmSmadE, a novel BR-Smad involved in TGF- $\beta$  and BMP signaling. In: *Experimental parasitology* 129 (2), S. 85–94. DOI: 10.1016/j.exppara.2011.07.013.
- Espínola, S. Martin; Ferreira, H. Bunselmeyer; Zaha, A. (2014): Validation of suitable reference genes for expression normalization in *Echinococcus spp.* larval stages. In: *PloS one* 9 (7), e102228. DOI: 10.1371/journal.pone.0102228.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 391 (6669), S. 806–811. DOI: 10.1038/35888.
- Freeman, R. S. (1973): Ontogeny of Cestodes and its Bearing on their Phylogeny and Systematics. In: *Advances in Parasitology* Volume 11, Bd. 11: Elsevier (Advances in Parasitology), S. 481–557.
- Fyrberg, A.; Lotfi, K. (2010): Optimization and evaluation of electroporation delivery of siRNA in the human leukemic CEM cell line. In: *Cytotechnology* 62 (6), S. 497–507. DOI: 10.1007/s10616-010-9309-6.
- Gara, R. K.; Kumari, S.; Ganju, A.; Yallapu, M. M.; Jaggi, M.; Chauhan, S. C. (2015): Slit/Robo pathway: a promising therapeutic target for cancer. In: *Drug discovery today* 20 (1), S. 156–164. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.09.008.
- Gaviño, M. A.; Reddien, P. W. (2011): A Bmp/Admp regulatory circuit controls maintenance and regeneration of dorsal-ventral polarity in planarians. In: *Current biology : CB* 21 (4), S. 294–299. DOI: 10.1016/j.cub.2011.01.017.
- Gaviño, M. A.; Wenemoser, D.; Wang, I. E.; Reddien, P. W. (2013): Tissue absence initiates regeneration through follistatin-mediated inhibition of activin signaling. In: *eLife* 2, e00247. DOI: 10.7554/eLife.00247.

- Gentile, L.; Cebrià, F.; Bartscherer, K. (2011): The planarian flatworm. An in vivo model for stem cell biology and nervous system regeneration. In: *Disease models & mechanisms* 4 (1), S. 12–19. DOI: 10.1242/dmm.006692.
- Goedegebuure, R. S. A.; Klerk, L. K. de; Bass, A. J.; Derks, S.; Thijssen, V. L. J. L. (2018): Combining Radiotherapy With Anti-angiogenic Therapy and Immunotherapy; A Therapeutic Triad for Cancer? In: *Frontiers in Immunology* 9, S. 3107. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03107.
- Gottstein, B. (1992): Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. In: *Clinical Microbiology Reviews* 5 (3), S. 248–261. DOI: 10.1128/CMR.5.3.248.
- Gottstein, B. (2010): *Echinococcus spp.* and echinococcosis. In: *Acta Vet Scand* 52 (S1). DOI: 10.1186/1751-0147-52-S1-S5.
- Gottstein, B.; Hemphill, A. (1997): Immunopathology of echinococcosis. In: *Chemical immunology* 66, S. 177–208. DOI: 10.1159/000058670.
- Green, J. L.; Kuntz, S. G.; Sternberg, P. W. (2008): Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. In: *Trends in Cell Biology* 18 (11), S. 536–544. DOI: 10.1016/j.tcb.2008.08.006.
- Gross-Thebing, T. (2020): RNAscope™ Multiplex Detection in Zebrafish. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2148, S. 195–202. DOI: 10.1007/978-1-0716-0623-0\_12.
- Gurley, K. A.; Elliott, S. A.; Simakov, O.; Schmidt, H. A.; Holstein, T. W.; Sánchez Alvarado, A. (2010): Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. In: *Developmental Biology* 347 (1), S. 24–39. DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.08.007.
- Gurley, K. A.; Rink, J. C.; Sánchez Alvarado, A. (2008): Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. In: *Science (New York, N.Y.)* 319 (5861), S. 323–327. DOI: 10.1126/science.1150029.
- Hall, T. A. (1999): BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic Acids Symposium Series* (41), S. 95–98.
- Harraga, S.; Godot, V.; Bresson-Hadni, S.; Manton, G.; Vuitton, D. Angèle (2003): Profile of cytokine production within the periparasitic granuloma in human



- alveolar echinococcosis. In: *Acta Tropica* 85 (2), S. 231–236. DOI: 10.1016/S0001-706X(02)00218-8.
- He, J.; Sheng, T.; Stelter, A. A.; Li, C.; Zhang, X.; Sinha, M. et al. (2006): Suppressing Wnt signaling by the hedgehog pathway through sFRP-1. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (47), S. 35598–35602. DOI: 10.1074/jbc.C600200200.
- Hedger, M. P.; Winnall, W. R.; Phillips, D. J.; Kretser, D. M. de (2011): Chapter Thirteen - The Regulation and Functions of Activin and Follistatin in Inflammation and Immunity. In: Gerald Litwack (Hg.): *Vitamins & Hormones : Activins and Inhibins*, Bd. 85: Academic Press, S. 255–297. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123859617000135>.
- Heidari, Z.; Sharbatkhori, M.; Mobedi, I.; Mirhendi, S. Hossein; Nikmanesh, B.; Sharifdini, M. et al. (2019): *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus granulosus* in canines in North-Khorasan Province, northeastern Iran, identified using morphology and genetic characterization of mitochondrial DNA. In: *Parasites Vectors* 12 (1), S. 606. DOI: 10.1186/s13071-019-3859-z.
- Hemer, S.; Konrad, C.; Spiliotis, M.; Koziol, U.; Schaack, D.; Förster, S. et al. (2014): Host insulin stimulates *Echinococcus multilocularis* insulin signalling pathways and larval development. In: *BMC biology* 12, S. 5. DOI: 10.1186/1741-7007-12-5.
- Hemphill, A.; Gottstein, B. (1995): Immunology and morphology studies on the proliferation of in vitro cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes. In: *Parasitology research* 81 (7), S. 605–614. DOI: 10.1007/BF00932028.
- Herbst, A.; Kolligs, F. Thomas (2007): Wnt signaling as a therapeutic target for cancer. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 361, S. 63–91. DOI: 10.1385/1-59745-208-4:63.
- Herz, M. (2019): Genome wide expression profiling of *Echinococcus multilocularis*. Dissertation. Universität Würzburg, Würzburg. Institut für Hygiene und Mikrobiologie.
- Herz, M.; Brehm, K. (2019): Evidence for densovirus integrations into tapeworm genomes. In: *Parasites Vectors* 12 (1), S. 560. DOI: 10.1186/s13071-019-3820-1.

- Herz, M.; Brehm, K. (2021): Serotonin stimulates *Echinococcus multilocularis* larval development. In: *Parasites Vectors* 14 (1), S. 14. DOI: 10.1186/s13071-020-04533-0.
- Holstein, T. W. (2012): The evolution of the Wnt pathway. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (7), a007922. DOI: 10.1101/cshperspect.a007922.
- Hopman, A. H.; Ramaekers, F. C.; Speel, E. J. (1998): Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and fluorochrome-labeled tyramides and their application for In situ hybridization using CARD amplification. In: *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 46 (6), S. 771–777. DOI: 10.1177/002215549804600611.
- Houston, S.; Belga, S.; Butterschoen, K.; Cooper, R.; Girgis, S.; Gottstein, B. et al. (2021): Epidemiological and Clinical Characteristics of Alveolar Echinococcosis: An Emerging Infectious Disease in Alberta, Canada. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene*. DOI: 10.4269/ajtmh.20-1577.
- Howe, K. L.; Bolt, B. J.; Shafie, M.; Kersey, P.; Berriman, M. (2017): WormBase ParaSite - a comprehensive resource for helminth genomics. In: *Molecular and biochemical parasitology* 215, S. 2–10. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2016.11.005.
- Huang, H.; He, X. (2008): Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. In: *Current opinion in cell biology* 20 (2), S. 119–125. DOI: 10.1016/j.ceb.2008.01.009.
- Iglesias, M.; Gomez-Skarmeta, J. Luis; Saló, E.; Adell, T. (2008): Silencing of Smed-betacatenin1 generates radial-like hypercephalized planarians. In: *Development (Cambridge, England)* 135 (7), S. 1215–1221. DOI: 10.1242/dev.020289.
- Ingham, P. W.; Nakano, Y.; Seger, C. (2011): Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. In: *Nature reviews. Genetics* 12 (6), S. 393–406. DOI: 10.1038/nrg2984.
- Janning, M.; Loges, S. (2018): Anti-Angiogenics: Their Value in Lung Cancer Therapy. In: *Oncology research and treatment* 41 (4), S. 172–180. DOI: 10.1159/000488119.

- Jian-Hai, Y.; Yu-Juan, S.; Ai-Ping, Y.; Jian-Ping, C. (2017): In vitro pro - angiogenic activity of *Echinococcus granulosus* hydatid cysts from experimentally infected mice. In: *Zhongguo xue xi chong bing fang zhi za zhi = Chinese journal of schistosomiasis control* 29 (3), S. 320–323. DOI: 10.16250/j.32.1374.2017052.
- Jinek, M.; Doudna, J. A. (2009): A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. In: *Nature* 457 (7228), S. 405–412. DOI: 10.1038/nature07755.
- Jung, Y.-S.; Park, J.-I. (2020): Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond  $\beta$ -catenin and the destruction complex. In: *Experimental & molecular medicine* 52 (2), S. 183–191. DOI: 10.1038/s12276-020-0380-6.
- Jura, H.; Bader, A.; Hartmann, M.; Maschek, H.; Frosch, M. (1996): Hepatic tissue culture model for study of host-parasite interactions in alveolar echinococcosis. In: *Infection and immunity* 64 (9), S. 3484–3490. DOI: 10.1128/iai.64.9.3484-3490.1996.
- Kapel, C. M. O.; Torgerson, P. R.; Thompson, R. C. A.; Deplazes, P. (2006): Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. In: *International journal for parasitology* 36 (1), S. 79–86. DOI: 10.1016/j.ijpara.2005.08.012.
- Katoh, Y.; Katoh, M. (2006): WNT antagonist, SFRP1, is Hedgehog signaling target. In: *Int J Mol Med*. DOI: 10.3892/ijmm.17.1.171.
- Kern, P. (2010): Clinical features and treatment of alveolar echinococcosis. In: *Current opinion in infectious diseases* 23 (5), S. 505–512. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32833d7516.
- Kern, P.; Wen, H.; Sato, N.; Vuitton, D. A.; Gruener, B.; Shao, Y. et al. (2006): WHO classification of alveolar echinococcosis: principles and application. In: *Parasitology international* 55 Suppl, S283-7. DOI: 10.1016/j.parint.2005.11.041.
- Kersigo, J.; Pan, N.; Lederman, J. D.; Chatterjee, S.; Abel, T.; Pavlinkova, G. et al. (2018): A RNAscope whole mount approach that can be combined with immunofluorescence to quantify differential distribution of mRNA. In: *Cell and tissue research* 374 (2), S. 251–262. DOI: 10.1007/s00441-018-2864-4.

- Keutmann, H. T.; Schneyer, A. L.; Sidis, Y. (2004): The role of follistatin domains in follistatin biological action. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 18 (1), S. 228–240. DOI: 10.1210/me.2003-0112.
- Knapp, J.; Combes, B.; Umhang, G.; Aknouche, S.; Millon, L. (2016): Could the domestic cat play a significant role in the transmission of *Echinococcus multilocularis*? A study based on qPCR analysis of cat feces in a rural area in France. In: *Parasite (Paris, France)* 23, S. 42. DOI: 10.1051/parasite/2016052.
- Koni, M.; Pinnarò, V.; Brizzi, M. Felice (2020): The Wnt Signalling Pathway: A Tailored Target in Cancer. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (20). DOI: 10.3390/ijms21207697.
- König, A.; Romig, T.; Thoma, D.; Kellermann, K. (2005): Drastic increase in the prevalence of *Echinococcus multilocularis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Bavaria, Germany. In: *Eur J Wildl Res* 51 (4), S. 277–282. DOI: 10.1007/s10344-005-0100-5.
- Koohini, Z.; Koohini, Z.; Teimourian, S. (2019): Slit/Robo Signaling Pathway in Cancer; a New Stand Point for Cancer Treatment. In: *Pathology oncology research : POR* 25 (4), S. 1285–1293. DOI: 10.1007/s12253-018-00568-y.
- Kozin, V. V.; Borisenko, I. E.; Kostyuchenko, R. P. (2019): Establishment of the Axial Polarity and Cell Fate in Metazoa via Canonical Wnt Signaling: New Insights from Sponges and Annelids. In: *Biol Bull Russ Acad Sci* 46 (1), S. 14–25. DOI: 10.1134/S1062359019010035.
- Koziol, U. (2014): Molecular and developmental characterization of the *Echinococcus multilocularis* stem cell system. Dissertation. Universität Würzburg, Würzburg. Institut für Hygiene und Mikrobiologie. Online verfügbar unter [https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4-wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/10504/file/Uriel\\_Koziol\\_Dissertation.pdf](https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4-wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/10504/file/Uriel_Koziol_Dissertation.pdf), zuletzt geprüft am 25.11.2020.
- Koziol, U.; Brehm, K. (2015): Recent advances in *Echinococcus* genomics and stem cell research. In: *Veterinary parasitology* 213 (3-4), S. 92–102. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.07.031.

- Koziol, U.; Jarero, F.; Olson, P. D.; Brehm, K. (2016a): Comparative analysis of Wnt expression identifies a highly conserved developmental transition in flatworms. In: *BMC biology* 14, S. 10. DOI: 10.1186/s12915-016-0233-x.
- Koziol, U.; Koziol, M.; Preza, M.; Costábile, A.; Brehm, K.; Castillo, E. (2016b): De novo discovery of neuropeptides in the genomes of parasitic flatworms using a novel comparative approach. In: *International journal for parasitology* 46 (11), S. 709–721. DOI: 10.1016/j.ijpara.2016.05.007.
- Koziol, U.; Krohne, G.; Brehm, K. (2013): Anatomy and development of the larval nervous system in *Echinococcus multilocularis*. In: *Frontiers in zoology* 10 (1), S. 24. DOI: 10.1186/1742-9994-10-24.
- Koziol, U.; Lalanne, A. I.; Castillo, E. (2009): Hox genes in the parasitic plathyhelminthes *Mesocostoides corti*, *Echinococcus multilocularis*, and *Schistosoma mansoni*: evidence for a reduced Hox complement. In: *Biochemical genetics* 47 (1-2), S. 100–116. DOI: 10.1007/s10528-008-9210-6.
- Koziol, U.; Radio, S.; Smircich, P.; Zarowiecki, M.; Fernández, C.; Brehm, K. (2015): A Novel Terminal-Repeat Retrotransposon in Miniature (TRIM) Is Massively Expressed in *Echinococcus multilocularis* Stem Cells. In: *Genome biology and evolution* 7 (8), S. 2136–2153. DOI: 10.1093/gbe/evv126.
- Koziol, U.; Rauschendorfer, T.; Zanon Rodríguez, L.; Krohne, G.; Brehm, K. (2014): The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. In: *EvoDevo* 5 (1), S. 10. DOI: 10.1186/2041-9139-5-10.
- Kratzer, W.; Schmidberger, J.; Hillenbrand, A.; Henne-Bruns, D.; Gräter, T.; Barth, T. F. E.; Grüner, B. (2019): Alveoläre Echinokokkose: Eine Herausforderung für Diagnostik, Therapie und Klinisches Management. DOI: 10.25646/6307.
- Krawagna, U. (2012): So, und jetzt ... [Blogartikel]. Online verfügbar unter <http://madamulma.blogspot.de/2012/11/so-und-jetzt.html>, zuletzt geprüft am 30.07.21.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Nnyaz, C.; Tamura, K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. In: *Molecular biology and evolution* 35 (6), S. 1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

- Ladurner, P.; Rieger, R.; Baguñà, J. (2000): Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine platyhelminth *macrostomum* sp.: a bromodeoxyuridine analysis. In: *Developmental Biology* 226 (2), S. 231–241. DOI: 10.1006/dbio.2000.9867.
- Lass, A.; Szostakowska, B.; Myjak, P.; Korzeniewski, K. (2016): Fresh fruits, vegetables and mushrooms as transmission vehicles for *Echinococcus multilocularis* in highly endemic areas of Poland: reply to concerns. In: *Parasitology research* 115 (9), S. 3637–3642. DOI: 10.1007/s00436-016-5149-4.
- Leducq, R.; Gabrion, C. (1992): Developmental changes of *Echinococcus multilocularis* metacestodes revealed by tegumental ultrastructure and lectin-binding sites. In: *Parasitology* 104 Pt 1, S. 129–141. DOI: 10.1017/s003118200006087x.
- Letunic, I.; Bork, P. (2018): 20 years of the SMART protein domain annotation resource. In: *Nucleic acids research* 46 (D1), D493-D496. DOI: 10.1093/nar/gkx922.
- Li, J.; Li, J.; Chen, B. (2012): Oct4 was a novel target of Wnt signaling pathway. In: *Mol Cell Biochem* 362 (1-2), S. 233–240. DOI: 10.1007/s11010-011-1148-z.
- Littlewood, D. T. J. (2006): The evolution of parasitism in flatworms. In: Aaron G. Maule und Nikki J. Marks (Hg.): *Parasitic flatworms. Molecular biology, biochemistry, immunology and physiology*. Wallingford, UK, Cambridge, MA: CABI, S. 1–36.
- Liu, Y.; Rubin, B.; Bodine, P. V.N.; Billiard, J. (2008): Wnt5a induces homodimerization and activation of Ror2 receptor tyrosine kinase. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 105 (2), S. 497–502. DOI: 10.1002/jcb.21848.
- Liu, Z.-J.; Herlyn, M. (2003): Slit-Robo. In: *Cancer Cell* 4 (1), S. 1–2. DOI: 10.1016/S1535-6108(03)00166-1.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

- Lobo, D.; Beane, W. S.; Levin, M. (2012): Modeling planarian regeneration: a primer for reverse-engineering the worm. In: *PLoS Comput Biol* 8 (4), e1002481. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002481.
- Logan, C. Y.; Nusse, R. (2004): The Wnt signaling pathway in development and disease. In: *Annual review of cell and developmental biology* 20, S. 781–810. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.
- Lucius, R.; Loos-Frank, B.; Lane, R. P. (2018a): Parasitische Würmer (Helminthen) und Myxozoa. In: Richard Lucius, Brigitte Loos-Frank und Richard P. Lane (Hg.): *Biologie von Parasiten*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 249–412.
- Lucius, Richard; Loos-Frank, Brigitte; Lane, Richard P. (Hg.) (2018b): *Biologie von Parasiten*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Lundström-Stadelmann, B.; Rufener, R.; Ritler, D.; Zurbriggen, R.; Hemphill, A. (2019): The importance of being parasiticidal... an update on drug development for the treatment of alveolar echinococcosis. In: *Food and Waterborne Parasitology* 15, e00040. DOI: 10.1016/j.fawpar.2019.e00040.
- Madeira, F.; Park, Y. Mi; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N. et al. (2019): The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. In: *Nucleic acids research* 47 (W1), W636-W641. DOI: 10.1093/nar/gkz268.
- Marcinkutė, A.; Šarkūnas, M.; Moks, E.; Saarma, U.; Jokelainen, P.; Bagrade, G. et al. (2015): *Echinococcus* infections in the Baltic region. In: *Veterinary parasitology* 213 (3-4), S. 121–131. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.07.032.
- Marsal, M.; Pineda, D.; Saló, E. (2003): Gtwnt-5 a member of the wnt family expressed in a subpopulation of the nervous system of the planarian *Girardia tigrina*. In: *Gene Expression Patterns* 3 (4), S. 489–495. DOI: 10.1016/S1567-133X(03)00058-9.
- Martín-Durán, J. María; Egger, B. (2012): Developmental diversity in free-living flatworms. In: *EvoDevo* 3 (1), S. 7. DOI: 10.1186/2041-9139-3-7.
- Massagué, J.; Gomis, R. R. (2006): The logic of TGFbeta signaling. In: *FEBS Letters* 580 (12), S. 2811–2820. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.04.033.

- Mehlhorn, H.; Eckert, J.; Thompson, R. C. (1983): Proliferation and metastases formation of larval *Echinococcus multilocularis*. II. Ultrastructural investigations. In: *Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin, Germany)* 69 (6), S. 749–763. DOI: 10.1007/BF00927424.
- Mikels, A.; Minami, Y.; Nusse, R. (2009): Ror2 Receptor Requires Tyrosine Kinase Activity to Mediate Wnt5A Signaling. In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (44), S. 30167–30176. DOI: 10.1074/jbc.M109.041715.
- Mikels, A. J.; Nusse, R. (2006a): Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits  $\beta$ -Catenin–TCF Signaling Depending on Receptor Context. In: *PLoS Biology* 4 (4), e115. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040115.
- Mikels, A. J.; Nusse, R. (2006b): Wnts as ligands: processing, secretion and reception. In: *Oncogene* 25 (57), S. 7461–7468. DOI: 10.1038/sj.onc.1210053.
- Mizukami, C.; Spiliotis, M.; Gottstein, B.; Yagi, K.; Katakura, K.; Oku, Y. (2010): Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscoleces using RNA interference. In: *Parasitology international* 59 (4), S. 647–652. DOI: 10.1016/j.parint.2010.08.010.
- Möginger, T. (2016): Molekulare Untersuchungen zur Entwicklungsbiologie von *Echinococcus multilocularis* Protoskolizes. Bachelorarbeit. Universität Würzburg. Institut für Hygiene und Mikrobiologie.
- Molina, M. Dolores; Neto, A.; Maeso, I.; Gómez-Skarmeta, J. Luis; Saló, E.; Cebrià, F. (2011): Noggin and noggin-like genes control dorsoventral axis regeneration in planarians. In: *Current biology : CB* 21 (4), S. 300–305. DOI: 10.1016/j.cub.2011.01.016.
- Molina, M. Dolores; Saló, E.; Cebrià, F. (2007): The BMP pathway is essential for re-specification and maintenance of the dorsoventral axis in regenerating and intact planarians. In: *Developmental Biology* 311 (1), S. 79–94. DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.08.019.
- Montagne, J.; Preza, M.; Castillo, E.; Brehm, K.; Koziol, U. (2019): Divergent Axin and GSK-3 paralogs in the beta-catenin destruction complexes of tapeworms. In: *Development Genes and Evolution* 229 (4), S. 89–102. DOI: 10.1007/s00427-019-00632-w.



- Morin, P. J.; Sparks, A. B.; Korinek, V.; Barker, N.; Clevers, H.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. (1997): Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. In: *Science (New York, N.Y.)* 275 (5307), S. 1787–1790. DOI: 10.1126/science.275.5307.1787.
- Mousavi, S. Mohammad; Afgar, A.; Mohammadi, M. Ali; Mortezaei, S.; Sadeghi, B.; Harandi, M. Fasihi (2019): Calmodulin-specific small interfering RNA induces consistent expression suppression and morphological changes in *Echinococcus granulosus*. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 3894. DOI: 10.1038/s41598-019-40656-w.
- Moustakas, A.; Heldin, C.-H. (2009): The regulation of TGFbeta signal transduction. In: *Development* 136 (22), S. 3699–3714. DOI: 10.1242/dev.030338.
- Nakao, M.; Yanagida, T.; Okamoto, M.; Knapp, J.; Nkouawa, A.; Sako, Y.; Ito, A. (2010): State-of-the-art *Echinococcus* and *Taenia*: phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. In: *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 10 (4), S. 444–452. DOI: 10.1016/j.meegid.2010.01.011.
- Nosratabadi, S. Jafar; Hayati Roodbari, N.; Afgar, A.; Modarressi, M. Hossein; Farsinejad, A.; Fasihi Harandi, M. (2020): In vitro effects of glutathione on Transforming Growth Factor beta and Epidermal Growth Factor Receptor genes expression in the protoscoleces and strobilated worms of *Echinococcus granulosus*. In: *Gene Reports* 20, S. 100786. DOI: 10.1016/j.genrep.2020.100786.
- Nusse, R. (2008): Wnt signaling and stem cell control. In: *Cell research* 18 (5), S. 523–527. DOI: 10.1038/cr.2008.47.
- Nüsslein-Volhard, C.; Wieschaus, E. (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. In: *Nature* 287 (5785), S. 795–801. DOI: 10.1038/287795a0.
- Olson, P. D.; Zarowiecki, M.; Kiss, F.; Brehm, K. (2012): Cestode genomics - progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology. In: *Parasite Immunology* 34 (2-3), S. 130–150. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2011.01319.x.

- Palmer, S. R.; Soulsby, L.; Torgerson, P.; Brown, D. W. (2011): Oxford textbook of zoonoses. Biology, clinical practice, and public health control. 2. ed. Oxford: Oxford Univ. Press (Oxford textbooks in public health, 1).
- Parker, T. W.; Neufeld, K. L. (2020): APC controls Wnt-induced  $\beta$ -catenin destruction complex recruitment in human colonocytes. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 2957. DOI: 10.1038/s41598-020-59899-z.
- Petersen, C. P.; Reddien, P. W. (2008): Smed-betacatenin-1 is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration. In: *Science* 319 (5861), S. 327–330. DOI: 10.1126/science.1149943.
- Petersen, C. P.; Reddien, P. W. (2009): Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. In: *Cell* 139 (6), S. 1056–1068. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.035.
- Petersen, C. P.; Reddien, P. W. (2011): Polarized notum activation at wounds inhibits Wnt function to promote planarian head regeneration. In: *Science (New York, N.Y.)* 332 (6031), S. 852–855. DOI: 10.1126/science.1202143.
- Raz, E. (2000): The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. In: *Genome Biol* 1 (3), REVIEWS1017. DOI: 10.1186/gb-2000-1-3-reviews1017.
- Reddien, P. W. (2011): Constitutive gene expression and the specification of tissue identity in adult planarian biology. In: *Trends in genetics : TIG* 27 (7), S. 277–285. DOI: 10.1016/j.tig.2011.04.004.
- Reddien, P. W. (2018): The Cellular and Molecular Basis for Planarian Regeneration. In: *Cell* 175 (2), S. 327–345. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.021.
- Reddien, P. W.; Bermange, A. L.; Kicza, A. M.; Sánchez Alvarado, A. (2007): BMP signaling regulates the dorsal planarian midline and is needed for asymmetric regeneration. In: *Development (Cambridge, England)* 134 (22), S. 4043–4051. DOI: 10.1242/dev.007138.
- Reuber, M. D. (1961): A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat. In: *Journal of the National Cancer Institute* 26, S. 891–899.
- Reynolds, A.; Leake, D.; Boese, Q.; Scaringe, S.; Marshall, W. S.; Khvorova, A. (2004): Rational siRNA design for RNA interference. In: *Nature biotechnology* 22 (3), S. 326–330. DOI: 10.1038/nbt936.

- Rink, J. C. (2013): Stem cell systems and regeneration in planaria. In: *Development Genes and Evolution* 223 (1-2), S. 67–84. DOI: 10.1007/s00427-012-0426-4.
- Rink, J. C.; Gurley, K. A.; Elliott, S. A.; Sánchez Alvarado, A. (2009): Planarian Hh signaling regulates regeneration polarity and links Hh pathway evolution to cilia. In: *Science (New York, N.Y.)* 326 (5958), S. 1406–1410. DOI: 10.1126/science.1178712.
- Ripp, C.; Loth, J.; Petrova, I.; Linnemannstöns, K.; Uleplic, M.; Fradkin, L. et al. (2018): *Drosophila* Ror is a nervous system-specific co-receptor for Wnt ligands. In: *Biology open* 7 (11). DOI: 10.1242/bio.033001.
- Robertis, E. M. de (2010): Wnt signaling in axial patterning and regeneration: lessons from planaria. In: *Science Signaling* 3 (127), pe21. DOI: 10.1126/scisignal.3127pe21.
- Robert-Koch-Institut: SurvStat@RKI 2.0. Online verfügbar unter <https://survstat.rki.de/>, zuletzt geprüft am 02.07.2021.
- Roberts-Galbraith, R. H.; Newmark, P. A. (2013): Follistatin antagonizes activin signaling and acts with notum to direct planarian head regeneration. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (4), S. 1363–1368. DOI: 10.1073/pnas.1214053110.
- Robinson, J. T.; Thorvaldsdóttir, H.; Winckler, W.; Guttman, M.; Lander, E. S.; Getz, G.; Mesirov, J. P. (2011): Integrative genomics viewer. In: *Nature biotechnology* 29 (1), S. 24–26. DOI: 10.1038/nbt.1754.
- Robinson, M. W.; McFerran, N.; Trudgett, A.; Hoey, L.; Fairweather, I. (2004): A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. In: *Journal of molecular graphics & modelling* 23 (3), S. 275–284. DOI: 10.1016/j.jmgm.2004.08.001.
- Rubinfeld, B.; Albert, I.; Porfiri, E.; Munemitsu, S.; Polakis, P. (1997): Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. In: *Cancer Research* 57 (20), S. 4624–4630.
- Schlosshauer, P. W.; Brown, S. A.; Eisinger, K.; Yan, Q.; Guglielminetti, E. R.; Parsons, R. et al. (2000): APC truncation and increased  $\beta$ -catenin levels in a human

- breast cancer cell line. In: *Carcinogenesis* 21 (7), S. 1453–1456. DOI: 10.1093/carcin/21.7.1453.
- Schubert, A.; Koziol, U.; Cailliau, K.; Vanderstraete, M.; Dissous, C.; Brehm, K. (2014): Targeting *Echinococcus multilocularis* stem cells by inhibition of the Polo-like kinase EmPlk1. In: *PLoS neglected tropical diseases* 8 (6), e2870. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002870.
- Schwarz, S.; Sutor, A.; Staubach, C.; Mattis, R.; Tackmann, K.; Conraths, F. Josef (2011): Estimated prevalence of *Echinococcus multilocularis* in raccoon dogs *Nyctereutes procyonoides* in northern Brandenburg, Germany. In: *Current Zoology* 57 (5), S. 655–661. DOI: 10.1093/czoolo/57.5.655.
- Scimone, M. Lucila; Cote, L. E.; Rogers, T.; Reddien, P. W. (2016): Two FGFR-Wnt circuits organize the planarian anteroposterior axis. In: *eLife* 5. DOI: 10.7554/eLife.12845.
- Scimone, M. Lucila; Lapan, S. W.; Reddien, P. W. (2014): A forkhead transcription factor is wound-induced at the planarian midline and required for anterior pole regeneration. In: *PLoS Genetics* 10 (1), e1003999. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003999.
- Sharma, M.; Pandey, A.; Pandey, G. K. (2014):  $\beta$ -catenin in plants and animals: common players but different pathways. In: *Frontiers in plant science* 5, S. 143. DOI: 10.3389/fpls.2014.00143.
- Shimomura, O. (2005): The discovery of aequorin and green fluorescent protein. In: *Journal of microscopy* 217 (Pt 1), S. 1–15. DOI: 10.1111/j.0022-2720.2005.01441.x.
- Simandi, Z.; Horvath, A.; Wright, L. C.; Cuaranta-Monroy, I.; Luca, I. de; Karolyi, K. et al. (2016): OCT4 Acts as an Integrator of Pluripotency and Signal-Induced Differentiation. In: *Molecular Cell* 63 (4), S. 647–661. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.06.039.
- Smyth, J. D. (1968): In vitro studies and host-specificity in *Echinococcus*. In: *Bulletin of the World Health Organization* 39 (1), S. 5–12.
- Smyth, J. D.; Davies, Z. (1974): In vitro culture of the strobilar stage of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): A review of basic problems and results. In:

- International journal for parasitology* 4 (6), S. 631–644. DOI: 10.1016/0020-7519(74)90028-9.
- Smyth, J. D.; Davies, Z. (1975): In vitro suppression of segmentation in *Echinococcus multilocularis* with morphological transformation of protoscoleces into monozoic adults. In: *Parasitology* 71 (1), S. 125–135. DOI: 10.1017/s003118200005321x.
- Smyth, J. D.; Howkins, A. B.; Barton, M. (1966): Factors controlling the differentiation of the hydatid organism, *Echinococcus granulosus*, into cystic or strobilar stages in vitro. In: *Nature* 211 (5056), S. 1374–1377. DOI: 10.1038/2111374a0.
- Smyth, J. D.; Miller, H. J.; Howkins, A. B. (1967): Further analysis of the factors controlling strobilization, differentiation, and maturation of *Echinococcus granulosus* in vitro. In: *Experimental parasitology* 21 (1), S. 31–41. DOI: 10.1016/0014-4894(67)90064-1.
- Song, T.; Li, H.; Yang, L.; Lei, Y.; Yao, L.; Wen, H. (2015): Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in the Infiltrative Belt Surrounding Hepatic Alveolar Echinococcosis in Rats. In: *The Journal of Parasitology* 101 (3), S. 369–373. DOI: 10.1645/14-685.1.
- Spiliotis, M.; Brehm, K. (2009): Axenic in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles and the generation of primary cell cultures. In: Steffen Rupp und Kai Sohn (Hg.): *Host-Pathogen Interactions. Methods and Protocols*, Bd. 470. Totowa, NJ: Humana Press (SpringerLink Bücher, 470), S. 245–262.
- Spiliotis, M.; Lechner, S.; Tappe, D.; Scheller, C.; Krohne, G.; Brehm, K. (2008): Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacestode vesicles. In: *International journal for parasitology* 38 (8-9), S. 1025–1039. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.11.002.
- Spiliotis, M.; Mizukami, C.; Oku, Y.; Kiss, F.; Brehm, K.; Gottstein, B. (2010): *Echinococcus multilocularis* primary cells: improved isolation, small-scale cultivation and RNA interference. In: *Molecular and biochemical parasitology* 174 (1), S. 83–87. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2010.07.001.
- Spiliotis, M.; Tappe, D.; Sesterhenn, L.; Brehm, K. (2004): Long-term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions. In: *Parasitology research* 92 (5), S. 430–432. DOI: 10.1007/s00436-003-1046-8.

- Staubach, C.; Hoffmann, L.; Schmid, V. J.; Ziller, M.; Tackmann, K.; Conraths, F. J. (2011): Bayesian space-time analysis of *Echinococcus multilocularis*-infections in foxes. In: *Veterinary parasitology* 179 (1-3), S. 77–83. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.01.065.
- Stricker, S.; Rauschenberger, V.; Schambony, A. (2017): ROR-Family Receptor Tyrosine Kinases. In: *Current topics in developmental biology* 123, S. 105–142. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2016.09.003.
- Sun, B.; Gui, L.; Liu, R.; Hong, Y.; Li, M. (2020): Medaka oct4 is essential for gastrulation, central nervous system development and angiogenesis. In: *Gene* 733, S. 144270. DOI: 10.1016/j.gene.2019.144270.
- Sureda-Gómez, M.; Pascual-Carreras, E.; Adell, T. (2015): Posterior Wnts Have Distinct Roles in Specification and Patterning of the Planarian Posterior Region. In: *International Journal of Molecular Sciences* 16 (11), S. 26543–26554. DOI: 10.3390/ijms161125970.
- Swarup, S.; Verheyen, E. M. (2012): Wnt/Wingless signaling in *Drosophila*. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (6). DOI: 10.1101/cshperspect.a007930.
- Syed, V. (2016): TGF- $\beta$  Signaling in Cancer. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 117 (6), S. 1279–1287. DOI: 10.1002/jcb.25496.
- Taipale, J.; Beachy, P. A. (2001): The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. In: *Nature* 411 (6835), S. 349–354. DOI: 10.1038/35077219.
- Tappe, D.; Brehm, K.; Frosch, M.; Blankenburg, A.; Schrod, A.; Kaup, F.-J.; Mätz-Rensing, K. (2007): *Echinococcus multilocularis* infection of several Old World monkey species in a breeding enclosure. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 77 (3), S. 504–506.
- Tappe, D.; Frosch, M. (2007): Rudolf Virchow and the Recognition of Alveolar Echinococcosis, 1850s. In: *Emerging Infectious Diseases* 13 (5), S. 732–735. DOI: 10.3201/eid1305.070216.
- Termini, C. M.; Gillette, J. M. (2017): Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 5, S. 34. DOI: 10.3389/fcell.2017.00034.

- The UniProt Consortium (2019): UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. In: *Nucleic acids research* 47 (D1), D506-D515. DOI: 10.1093/nar/gky1049.
- Thompson, R. C. A. (2017): Biology and Systematics of *Echinococcus*. In: *Advances in parasitology* 95, S. 65–109. DOI: 10.1016/bs.apar.2016.07.001.
- Thompson, R. C. A.; Kapel, C. M. O.; Hobbs, R. P.; Deplazes, P. (2006): Comparative development of *Echinococcus multilocularis* in its definitive hosts. In: *Parasitology* 132 (Pt 5), S. 709–716. DOI: 10.1017/S0031182005009625.
- Toofan, P.; Wheadon, H. (2016): Role of the bone morphogenic protein pathway in developmental haemopoiesis and leukaemogenesis. In: *Biochemical Society transactions* 44 (5), S. 1455–1463. DOI: 10.1042/BST20160104.
- Topol, L.; Jiang, X.; Choi, H.; Garrett-Beal, L.; Carolan, P. J.; Yang, Y. (2003): Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent  $\beta$ -catenin degradation. In: *Journal of Cell Biology* 162 (5), S. 899–908. DOI: 10.1083/jcb.200303158.
- Torgerson, P. R.; Schweiger, A.; Deplazes, P.; Pohar, M.; Reichen, J.; Ammann, R. W. et al. (2008): Alveolar echinococcosis: from a deadly disease to a well-controlled infection. Relative survival and economic analysis in Switzerland over the last 35 years. In: *Journal of hepatology* 49 (1), S. 72–77. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.03.023.
- Tran, M. H.; Pearson, M. S.; Bethony, J. M.; Smyth, D. J.; Jones, M. K.; Duke, M. et al. (2006): Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. In: *Nature medicine* 12 (7), S. 835–840. DOI: 10.1038/nm1430.
- Tsai, I. J.; Zarowiecki, M.; Holroyd, N.; Garcarrubio, A.; Sánchez-Flores, A.; Brooks, K. L. et al. (2013): The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. In: *Nature* 496 (7443), S. 57–63. DOI: 10.1038/nature12031.
- Ui-Tei, K.; Naito, Y.; Takahashi, F.; Haraguchi, T.; Ohki-Hamazaki, H.; Juni, A. et al. (2004): Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. In: *Nucleic acids research* 32 (3), S. 936–948. DOI: 10.1093/nar/gkh247.

- Umhang, G.; Forin-Wiart, M.-A.; Hormaz, V.; Caillot, C.; Boucher, J.-M.; Poulle, M.-L.; Franck, B. (2015): *Echinococcus multilocularis* detection in the intestines and feces of free-ranging domestic cats (*Felis s. catus*) and European wildcats (*Felis s. silvestris*) from northeastern France. In: *Veterinary parasitology* 214 (1-2), S. 75–79. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.06.006.
- van Amerongen, R.; Nusse, R. (2009): Towards an integrated view of Wnt signaling in development. In: *Development* 136 (19), S. 3205–3214. DOI: 10.1242/dev.033910.
- van der Valk, J.; Bieback, K.; Buta, C.; Cochrane, B.; Dirks, W. G.; Fu, J. et al. (2018): Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. In: *ALTEX* 35 (1), S. 99–118. DOI: 10.14573/altex.1705101.
- Varjosalo, M.; Taipale, J. (2008): Hedgehog. Functions and mechanisms. In: *Genes & Development* 22 (18), S. 2454–2472. DOI: 10.1101/gad.1693608.
- Veit, P.; Bilger, B.; Schad, V.; Schäfer, J.; Frank, W.; Lucius, R. (1995): Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. In: *Parasitology* 110 (Pt 1), S. 79–86. DOI: 10.1017/s0031182000081075.
- Virchow, R. (1855): Die multiloculäre, ulcerirende Echinokokkengeschwulst der Leber. In: *Verhandlungen der Physikalisch-Medizinischen Gesellschaft zu Würzburg* 1855, S. 84–95. Online verfügbar unter <http://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/opus4/frontdoor/index/index/docId/13560>, zuletzt geprüft am 29.06.2021.
- Wang, B.; Xiao, Y.; Ding, B.-B.; Zhang, N.; Yuan, X.; Gui, L. et al. (2003): Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. In: *Cancer Cell* 4 (1), S. 19–29. DOI: 10.1016/s1535-6108(03)00164-8.
- Wang, F.; Flanagan, J.; Su, N.; Wang, L.-C.; Bui, S.; Nielson, A. et al. (2012): RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 14 (1), S. 22–29. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2011.08.002.
- Wang, G.; Li, Y.; Wang, X.; Han, Z.; Chuai, M.; Wang, L. et al. (2013a): Slit/Robo1 signaling regulates neural tube development by balancing neuroepithelial cell



- proliferation and differentiation. In: *Experimental cell research* 319 (8), S. 1083–1093. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.02.011.
- Wang, H.; Li, J.; Guo, B.; Zhao, L.; Zhang, Z.; McManus, D. P. et al. (2016a): In vitro culture of *Echinococcus multilocularis* producing protoscoleces and mouse infection with the cultured vesicles. In: *Parasites Vectors* 9 (1), S. 411. DOI: 10.1186/s13071-016-1687-y.
- Wang, I. E.; Lapan, S. W.; Scimone, M. Lucila; Clandinin, T. R.; Reddien, P. W. (2016b): Hedgehog signaling regulates gene expression in planarian glia. In: *eLife* 5. DOI: 10.7554/eLife.16996.
- Wang, J.; Zhang, C.; Wei, X.; Blagosklonov, O.; Lv, G.; Lu, X. et al. (2013b): TGF- $\beta$  and TGF- $\beta$ /Smad signaling in the interactions between *Echinococcus multilocularis* and its hosts. In: *PloS one* 8 (2), e55379. DOI: 10.1371/journal.pone.0055379.
- Wendt, G. R.; Collins, J. Nr; Pei, J.; Pearson, M. S.; Bennett, H. M.; Loukas, A. et al. (2018): Flatworm-specific transcriptional regulators promote the specification of tegumental progenitors in *Schistosoma mansoni*. In: *eLife* 7. DOI: 10.7554/eLife.33221.
- Wilson, C.; Goberdhan, D. C.; Steller, H. (1993): Dror, a potential neurotrophic receptor gene, encodes a *Drosophila* homolog of the vertebrate Ror family of Trk-related receptor tyrosine kinases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (15), S. 7109–7113. DOI: 10.1073/pnas.90.15.7109.
- Witchley, J. N.; Mayer, M.; Wagner, D. E.; Owen, J. H.; Reddien, P. W. (2013): Muscle cells provide instructions for planarian regeneration. In: *Cell reports* 4 (4), S. 633–641. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.07.022.
- Wodarz, A.; Näthke, I. (2007): Cell polarity in development and cancer. In: *Nature Cell Biology* 9 (9), S. 1016–1024. DOI: 10.1038/ncb433.
- Wurtzel, O.; Oderberg, I. M.; Reddien, P. W. (2017): Planarian Epidermal Stem Cells Respond to Positional Cues to Promote Cell-Type Diversity. In: *Developmental Cell* 40 (5), 491-504.e5. DOI: 10.1016/j.devcel.2017.02.008.
- Yazawa, S.; Umesono, Y.; Hayashi, T.; Tarui, H.; Agata, K. (2009): Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt

- signaling. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (52), S. 22329–22334. DOI: 10.1073/pnas.0907464106.
- Yuan, M.; Song, X.; Lv, W.; Xin, Q.; Wang, L.; Gao, Q. et al. (2019): Effect of anacardic acid against echinococcosis through inhibition of VEGF-induced angiogenesis. In: *Veterinary research* 50 (1), S. 3. DOI: 10.1186/s13567-019-0621-7.
- Yuasa-Kawada, J.; Kinoshita-Kawada, M.; Wu, G.; Rao, Y.; Wu, J. Y. (2009): Midline crossing and Slit responsiveness of commissural axons require USP33. In: *Nature Neuroscience* 12 (9), S. 1087–1089. DOI: 10.1038/nn.2382.
- Zavala-Góngora, R.; Derrer, B.; Gelmedin, V.; Knaus, P.; Brehm, K. (2008): Molecular characterisation of a second structurally unusual AR-Smad without an MH1 domain and a Smad4 orthologue from *Echinococcus multilocularis*. In: *International journal for parasitology* 38 (2), S. 161–176. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.07.008.
- an Zeng; Li, H.; Guo, L.; Gao, X.; McKinney, S.; Wang, Y. et al. (2018): Prospectively Isolated Tetraspanin+ Neoblasts Are Adult Pluripotent Stem Cells Underlying Planaria Regeneration. In: *Cell* 173 (7), 1593-1608.e20. DOI: 10.1016/j.cell.2018.05.006.
- Zhang, X.; Peterson, K. A.; Liu, X. Shirley; McMahon, A. P.; Ohba, S. (2013): Gene regulatory networks mediating canonical Wnt signal-directed control of pluripotency and differentiation in embryo stem cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31 (12), S. 2667–2679. DOI: 10.1002/stem.1371.
- Zimmerman, L. B.; Jesús-Escobar, J. M. de; Harland, R. M. (1996): The Spemann Organizer Signal noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4. In: *Cell* 86 (4), S. 599–606. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80133-6.

## Anhang

### Anhangsverzeichnis

A.1	Anhang A.1: (.xls Datei; CD). Primerliste mit Annotationsnummern .....	180
A.2	Anhang A.2: (.doc Datei; CD) cDNA Sequenzen der in der Arbeit behandelten Gene als FASTA. ....	180
A.3	Anhang A.3: (.xls Datei; CD) Transkriptomdaten von <i>em-bcat1</i> (RNAi) behandelten Primärzellen im Vergleich zur korrespondierenden Kontrolle .....	180
A.4	Anhang A.4: Standardkurven zu verwendeten Primern in der qPCR.....	180
A.5	Anhang A.5: Schmelzkurven der Standardreihenmessung von <i>em-bcat1</i> und <i>em-elp</i> mittels qPCR.....	181
A.6	Anhang A.6: Beispiel zur Vesikelzählung.....	182
A.7	Anhang A.7: (.xls Datei; CD). Zusammensetzung der Primärzellkultur auf Transkriptomebene.....	182
A.8	Anhang A.8: Zwei GZA sind neu identifizierte Mucine. ....	182
A.9	Anhang A.9: (.avi Datei; CD). WMISH zu <i>em-muc-1</i> in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle ( <i>gfp</i> ) und nach <i>em-bcat-1</i> Knockdown (RNAi). ....	183
A.10	Anhang A.10: (.avi Datei; CD). WMISH zu <i>em-wnt-1</i> in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle ( <i>gfp</i> ) und nach <i>em-bcat-1</i> Knockdown (RNAi). ....	183
A.11	Anhang A.11: Genexpression (WMISH) von <i>em-wnt11b</i> variiert in Primärzellen und zeigt sich abhängig von Zellaggregat .....	184
A.12	Anhang A.12: (.avi Datei; CD). WMISH zu <i>em-wnt-11b</i> in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle ( <i>gfp</i> ) und nach <i>em-bcat-1</i> Knockdown (RNAi). ....	185
A.13	Anhang A.13: (.avi Datei; CD). WMISH zu <i>em-sfrp</i> in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle ( <i>gfp</i> ) und nach <i>em-bcat-1</i> Knockdown (RNAi). ....	185
A.14	Anhang A.14: (.avi Datei; CD). WMISH zu <i>em-ndk</i> in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle ( <i>gfp</i> ) und nach <i>em-bcat-1</i> Knockdown (RNAi). ....	185
A.15	Anhang A.15: WMISH: sense-Sonde exemplarisch für <i>em-npp36</i> .....	186

---

A.16	Anhang A.16: (.avi Datei; CD). WMISH zu <i>em-npp36</i> in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle ( <i>gfp</i> ) und nach <i>em-bcat-1</i> Knockdown (RNAi). .....	186
A.17	Anhang A.17: (.avi Datei; CD). WMISH zu <i>em-fz10</i> in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle ( <i>gfp</i> ) und nach <i>em-bcat-1</i> Knockdown (RNAi). .....	186
A.18	Anhang A.18: WMISH zu <i>em-fst</i> im Metazestode und Protoskolex .....	186
A.19	Anhang A.19: (.avi Datei;CD). WMISH zu <i>em-fst</i> in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle ( <i>gfp</i> ) und nach <i>em-bcat-1</i> Knockdown (RNAi). .....	187
A.20	Anhang A.20: (Video und ‚Snapshots‘; CD) Nachweis der Genexpression von <i>em-slit</i> im Protoskolex durch WMISH.....	188
A.21	Anhang A.21: (Video und ‚Snapshots‘; CD) Nachweis der Genexpression von <i>em-wnt5</i> im Protoskolex durch WMISH. ....	188
A.22	Anhang A.22: (Video und ‚Snapshots‘; CD) Nachweis der Genexpression von <i>em-ror2</i> im Protoskolex durch WMISH.....	188
A.23	Anhang A.23: (Video und ‚Snapshots‘; CD) Nachweis der Genexpression von <i>em-hh</i> im Protoskolex durch WMISH.....	188
A.24	Anhang A.24: (Videos von mehrgliedrigen Protoskolizes (CD)).....	188
A.25	Anhang A.25: Erhöhte Proliferation von germinativen Zellen bei Brutkapselbildung. ....	189
A.26	Anhang A.26 (.avi; CD): Färbung von Nerven- und Muskelzellen in Primärzellaggregaten .....	189
A.27	Anhang A.27: Vorversuche zu Doppel-RNAi von Wnt-Liganden in <i>E. multilocularis</i> Primärzellkulturen. ....	190
A.28	Anhang A.28: Vorversuch: Inhibitor Cyclopamin auf aktivierten Protoskolizes .....	191
A.29	Anhang A.29: (.mp4 und .tif Dateien; CD) Adult-ähnliche Würmer nach Amputation. ....	191

---

**A.1 Anhang A.1: (.xls Datei; CD). Primerliste mit Annotationsnummern**

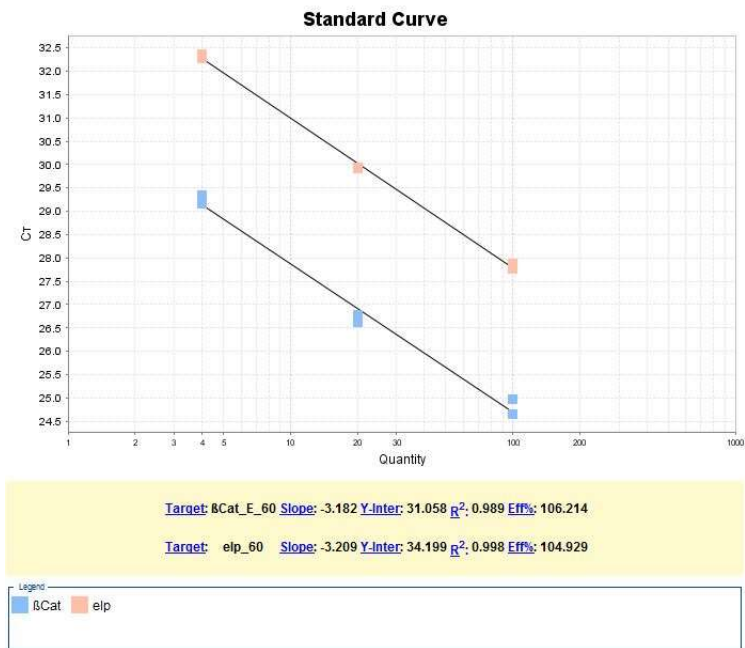
Liste der Gene, die über WMISH in dieser Arbeit untersucht wurden. Hinterlegt mit entsprechender Annotationsnummer und Primer zur Herstellung der RNA-Sonden. Einzig für die RNA-Sonde für Frizzled 10, EmuJ\_000085700, sind keine Primer angegeben, da die Sequenz eines Klons bei der Herstellung der RNA-Sonde für Frizzled 4 EmuJ\_000636500, zufällig mit der von *em-frizzled-10* identisch waren (Koziol et al. 2016a).

**A.2 Anhang A.2: (.doc Datei; CD) cDNA Sequenzen der in der Arbeit behandelten Gene als FASTA.****A.3 Anhang A.3: (.xls Datei; CD) Transkriptomdaten von *em-bcat1* (RNAi) behandelten Primärzellen im Vergleich zur korrespondierenden Kontrolle**

Transkriptomdaten aus bereits vor dieser Arbeit vorliegenden RNA-Seq Analysen zu Primärzellen nach RNAi (*em-bcat1*) *E. multilocularis* (Isolat Ingrid) (M. Herz und K. Brehm, nicht publiziert). Die Genexpression ist angegeben in TPM und beschreibt die Anzahl der DNA-Fragmente pro Kilobase an Transkripten, gemappt auf eine Millionen Reads. Die Änderung der Genexpression wurde im Vergleich zur Kontroll-Primärzellkultur unter binärem Logarithmus ins Verhältnis gesetzt und wurden als Log2-Fold Change (LFC) angegeben oder auch als Fold-Change (FC). Die Angabe LFC beschreibt die differenzielle Genexpression in Primärzellen nach *em-bcat1* Knockdown im Vergleich zur korrespondierenden Kontrolle. Aufgeführt sind zudem die in dieser Arbeit behandelten Gene.

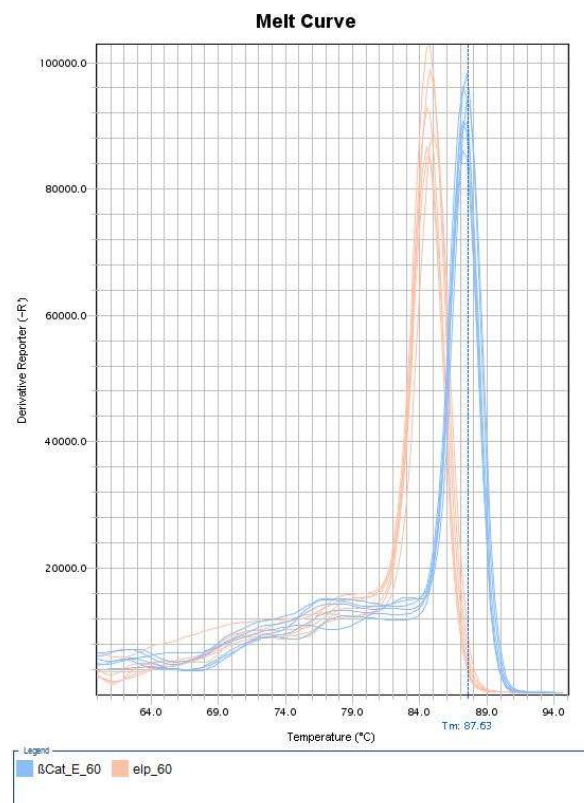
**A.4 Anhang A.4: Standardkurven zu verwendeten Primern in der qPCR.**

Zur Ermittlung der Primereffizienz wurden Verdünnungsreihen mit den Primerpaaren für *em-bcat1* und *em-elp*, welches als Housekeeping-Gen zur Referenz hinzugezogen wurde, mit einer Annealingtemperatur von 60°C gemessen. Die Effizienzen lagen mit 106% bzw. 105% im optimalen Rahmen.



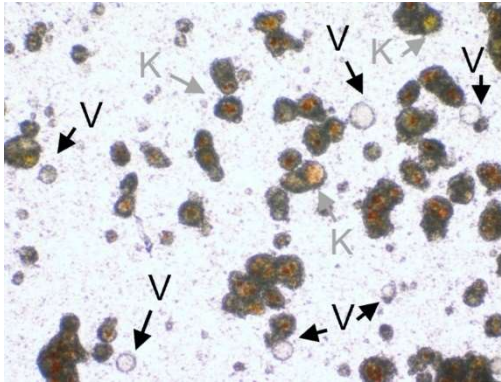
### A.5 Anhang A.5: Schmelzkurven der Standardreihenmessung von *em-bcat1* und *em-elp* mittels qPCR.

Die Schmelzkurven zu dem PCR-Produkten der Primerpaare von *em-bcat1* bzw. *em-elp*. ergaben je einen deutlichen einzelnen Peak und stellte somit die spezifische Amplifikation von je einem DNA-Fragment als PCR-Produkt dar. Ein spezifische Nachweis der Gene durch das jeweilige Primerpaar gegeben.



### A.6 Anhang A.6: Beispiel zur Vesikelzählung.

Vesikel (V) wurden als solche gezählt, wenn sich diese entweder am Rand der Primärzellaggregate bereits deutlich abzeichneten oder frei vorlagen. Kavitäten (K) wurden nicht gezählt. Das gezeigte Beispielbild repräsentiert *em-bcat1* behandelte Primärzellkultur an Tag 7 nach Elektroporation.



### A.7 Anhang A.7: (.xls Datei; CD). Zusammensetzung der Primärzellkultur auf Transkriptomebene.

Anhand von Transkriptomdaten wurden Gene analysiert, die in Primärzellkulturen (PC) exprimiert werden. Es wurden Gene identifiziert, die mit germinativen Zellen assoziiert (GZA) sind sowie Metazestodenspezifische (MZS) und Protoskolexspezifische Gene (PSS). Die Daten zeigen, wie viele dieser GZS, MZS und PSS in Entwicklungsstadien der Primärzellkultur exprimiert sind ( $TPM \geq 1$ ). Zudem wurde anhand dieser Daten analysiert wie viele dieser Gene in Primärzellkulturen nach RNAi (*em-bcat1*) um mind. 50% veränderte Genexpression aufweisen ( $FC \geq 1,5$ ;  $FC \leq 0,5$ ;  $p \leq 0,05$ ). Ergebnisse sind gezeigt in Abbildung 13 und Abbildung 14.

### A.8 Anhang A.8: Zwei GZA sind neu identifizierte Mucine.

Die BLAST-Analyse (<https://www.uniprot.org/blast/>) der Proteinsequenz zum Gen EmuJ\_000938200 ergab Homologie zu den humanen Mucinen Mucin-2 (Annotationsnummer: Q02817; E-Value:  $6,9 \times 10^{-124}$ ) und Mucin-5A (Annotationsnummer P98088; E-Value:  $2,7 \times 10^{-122}$ ). Die BLASTP-Analyse (WormBase ParaSite) der Proteinsequenz dieser beiden humanen Mucine gegen das Proteom von *E. multilocularis* ergab keine Übereinstimmungen. Die BLASTP-Analyse des humanen Mucin-1 (Annotationsnummer: P15941) gegen das Proteom ergab Homologie zu u. a.

den Genen EmuJ\_001105600 (E-Value:  $5,5 \times 10^{-109}$ ), und EmuJ\_000938200 (E-Value:  $6,0 \times 10^{-17}$ ). Auch die reziproke BLAST-Analyse bestätigte die hohe Homologie zum humanen Mucin-1. Beide Gene sind mit germinativen Zellen assoziiert und in Primärzellkulturen nach RNAi (*em-bcat1*) um mind. 50% verringert exprimiert.

**A.9 Anhang A.9: (.avi Datei; CD). WMISH zu *em-muc-1* in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle (*gfp*) und nach *em-bcat-1* Knockdown (RNAi).**

Z-Stapel: 2  $\mu$ m Abstand. DAPI positive Zellen in blau, FITC gelabelte RNA Sonde in grün, EdU<sup>+</sup> Zellen in rot.

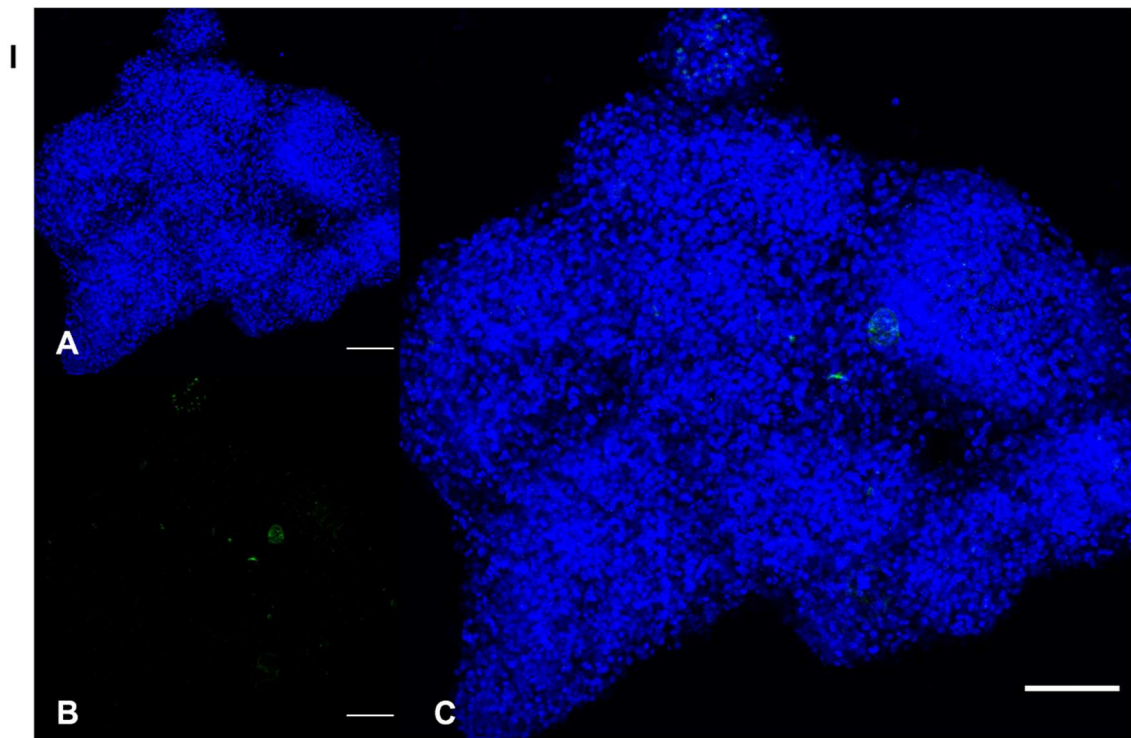
**A.10 Anhang A.10: (.avi Datei; CD). WMISH zu *em-wnt-1* in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle (*gfp*) und nach *em-bcat-1* Knockdown (RNAi).**

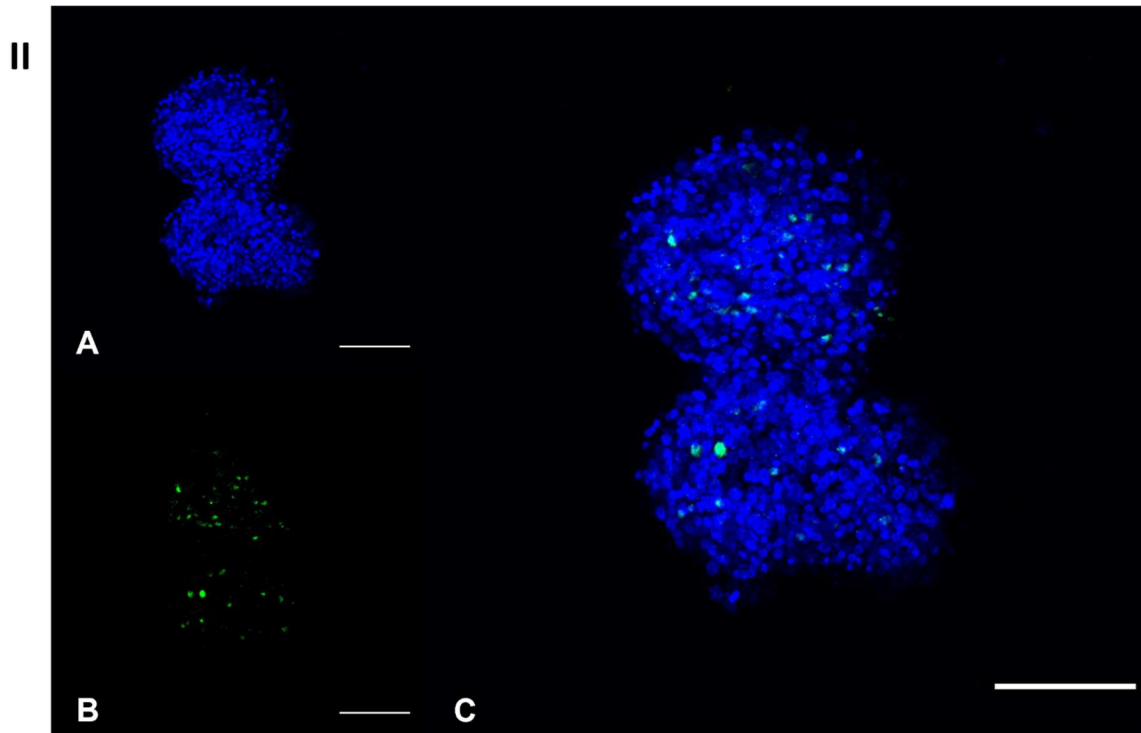
Z-Stapel: 2  $\mu$ m Abstand. DAPI positive Zellen in blau, FITC gelabelte RNA Sonde in grün, EdU<sup>+</sup> Zellen in rot.



### A.11 Anhang A.11: Genexpression (WMISH) von *em-wnt11b* variiert in Primärzellen und zeigt sich abhängig von Zellaggregat

Die Genexpression von *em-wnt11b* war abhängig vom untersuchten Primärzellaggregat. Zur Veranschaulichung dieser Variation sind zwei zusätzliche Zellaggregate der Kontrolle (*gfp*) gezeigt. **A** Kernfärbung in blau (DAPI) **B** FITC-markierte RNA-Sonde in grün **C** *Merge* von FITC und DAPI. Messbalken repräsentieren 50  $\mu\text{m}$ .





**A.12 Anhang A.12: (.avi Datei; CD). WMISH zu *em-wnt-11b* in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle (*gfp*) und nach *em-bcat-1* Knockdown (RNAi).**

Z-Stapel: 2 µm Abstand. DAPI positive Zellen in blau, FITC gelabelte RNA Sonde in grün, EdU<sup>+</sup> Zellen in rot.

**A.13 Anhang A.13: (.avi Datei; CD). WMISH zu *em-sfrp* in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle (*gfp*) und nach *em-bcat-1* Knockdown (RNAi).**

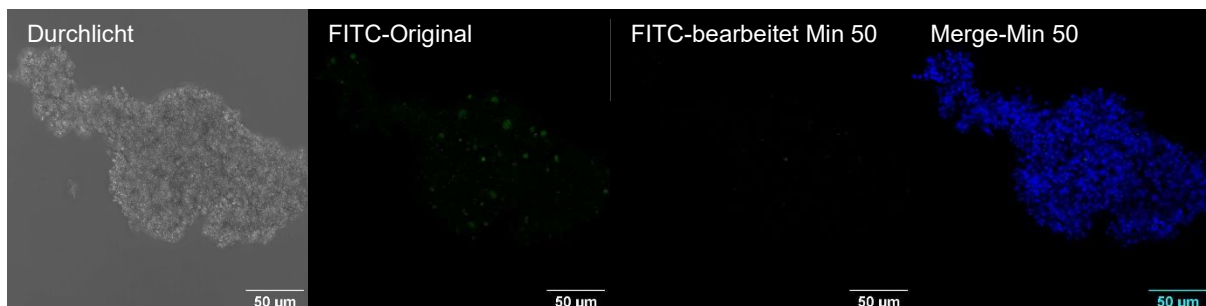
Z-Stapel: 2 µm Abstand. DAPI positive Zellen in blau, FITC gelabelte RNA Sonde in grün, EdU<sup>+</sup> Zellen in rot.

**A.14 Anhang A.14: (.avi Datei; CD). WMISH zu *em-ndk* in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle (*gfp*) und nach *em-bcat-1* Knockdown (RNAi).**

Z-Stapel: 2 µm Abstand. DAPI positive Zellen in blau, FITC gelabelte RNA Sonde in grün, EdU<sup>+</sup> Zellen in rot.

### A.15 Anhang A.15: WMISH: sense-Sonde exemplarisch für *em-npp36*.

Die Sonde zeigte leichtes Hintergrundsignal. Dies wurde durch Korrektur der Farbbalance in Fiji in Fotos von sense und antisense Sonden ausgeglichen. Das Minimum des grünen Kanals, entsprechend des FITC-Signals der Sonde, wurde dafür von 0 auf 50 korrigiert. Die Detektion von Signalen der sense-Sonde kann insbesondere bei Genen vorkommen, die auch als antisense-Transkripte vorliegen (K. Brehm, persönliche Mitteilung). Nach Überprüfung lagen laut Transkriptomdaten und Analyse über die Software IGV, keine antisense-Transkripte für *em-npp36* vor und das Signal konnte auf unspezifische Bindung zurückgeführt werden.



### A.16 Anhang A.16: (.avi Datei; CD). WMISH zu *em-npp36* in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle (*gfp*) und nach *em-bcat-1* Knockdown (RNAi).

Z-Stapel: 2 µm Abstand. DAPI positive Zellen in blau, FITC gelabelte RNA Sonde in grün, EdU<sup>+</sup> Zellen in rot.

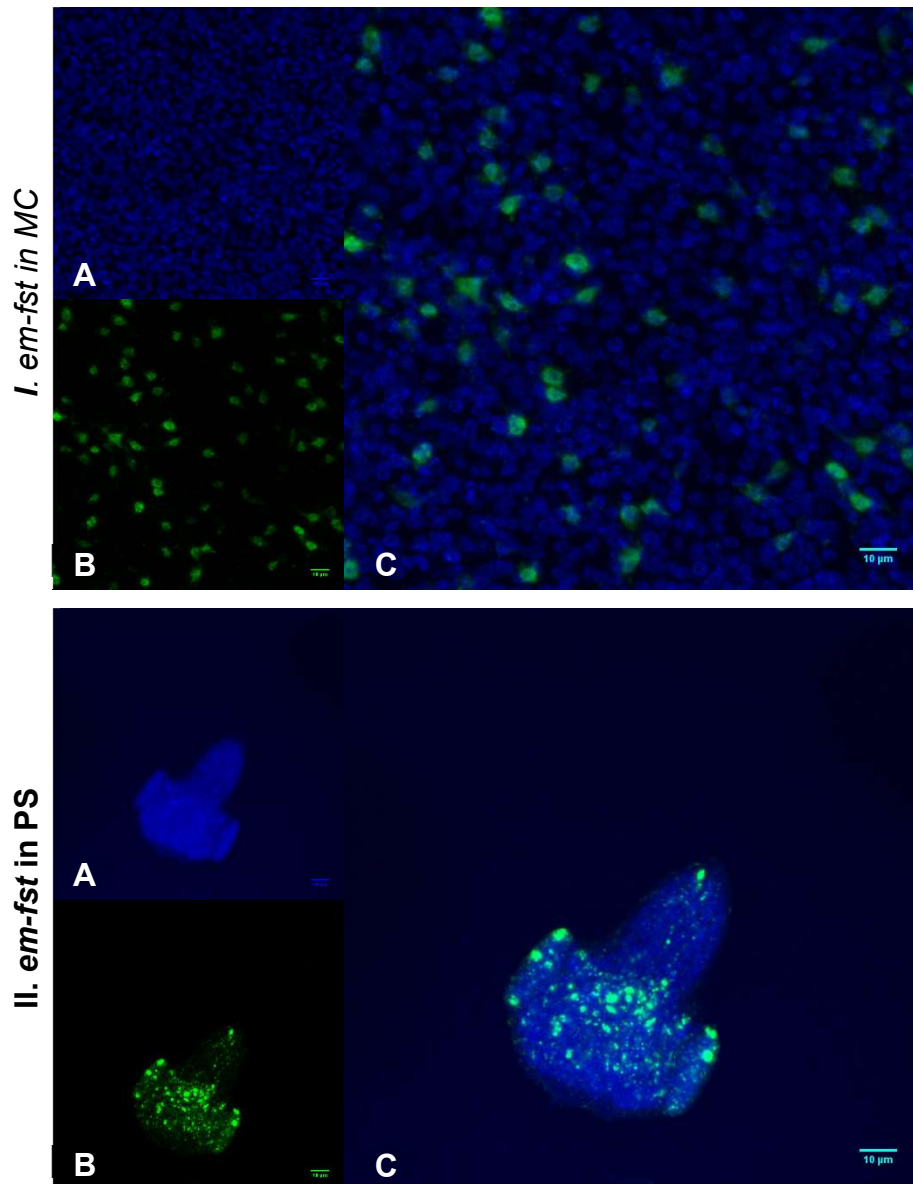
### A.17 Anhang A.17: (.avi Datei; CD). WMISH zu *em-fz10* in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle (*gfp*) und nach *em-bcat-1* Knockdown (RNAi).

Z-Stapel: 2 µm Abstand. DAPI positive Zellen in blau, FITC gelabelte RNA Sonde in grün, EdU<sup>+</sup> Zellen in rot.

### A.18 Anhang A.18: WMISH zu *em-fst* im Metazestode und Protoskolex

Die Genexpression von *em-fst* im *E. multilocularis* Metazestode und Protoskolex (Monika Bergmann). Die Genexpression war sowohl in der Germinalschicht des

Metazestoden nachzuweisen als auch im aktivierten, evaginierten Protoskolex. Im Protoskolex war die Genexpression insbesondere im anterioren Bereich des Skolex nachzuweisen. MC: Metazestode; PS: Protoskolex; Genexpression in grün (FITC), Zellkerne in blau (DAPI). *Merge*: Overlay der Kanäle grün und blau.



**A.19 Anhang A.19: (.avi Datei;CD). WMISH zu *em-fst* in Primärzellen nach RNAi. Aufnahmen von Z-Stapeln von Zellaggregaten der Kontrolle (*gfp*) und nach *em-bcat-1* Knockdown (RNAi).**

Z-Stapel: 2 µm Abstand. DAPI positive Zellen in blau, FITC gelabelte RNA Sonde in grün, EdU<sup>+</sup> Zellen in rot.

**A.20 Anhang A.20: (Video und ‚Snapshots‘; CD) Nachweis der Genexpression von *em-slit* im Protoskolex durch WMISH.**

WMISH zu *em-slit* in 3D Projektion dargestellt. Maßstab nicht vorhanden.

**A.21 Anhang A.21: (Video und ‚Snapshots‘; CD) Nachweis der Genexpression von *em-wnt5* im Protoskolex durch WMISH.**

WMISH zu *em-wnt5* in 3D Projektion dargestellt. Zur besseren Darstellung wurde das FITC Signal im Snapshot „wnt5\_snap\_1\_max175.jpg“ durch Adjustieren der Farbbalance auf ein Maximum von 175 verstärkt. Maßstab nicht vorhanden.

**A.22 Anhang A.22: (Video und ‚Snapshots‘; CD) Nachweis der Genexpression von *em-ror2* im Protoskolex durch WMISH.**

WMISH zu *em-ror2* in 3D Projektion dargestellt. Maßstab nicht vorhanden.

**A.23 Anhang A.23: (Video und ‚Snapshots‘; CD) Nachweis der Genexpression von *em-hh* im Protoskolex durch WMISH.**

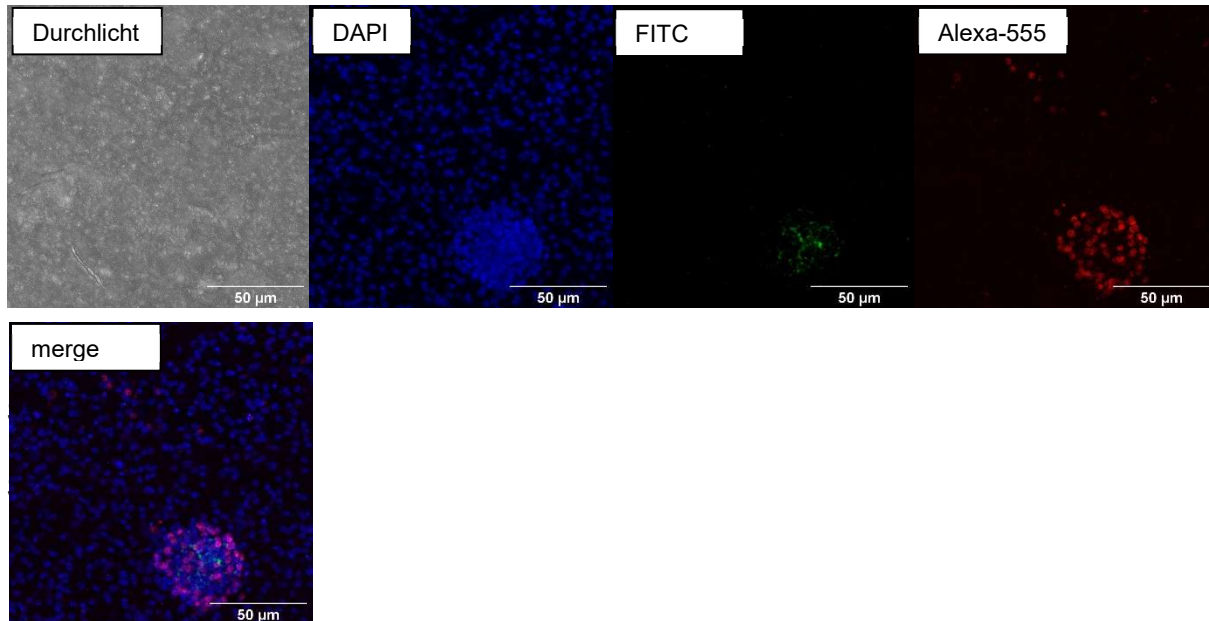
WMISH zu *em-hh* in 3D Projektion dargestellt. Maßstab nicht vorhanden.

**A.24 Anhang A.24: (Videos von mehrgliedrigen Protoskolizes (CD)).**

Die mehrgliedrigen Protoskolizes war stets sehr motil (siehe Videos). Auch redifferenzierte, mehrgliedrige Protoskolizes zeigten bis zu Ausbildung der Laminatschicht Muskelkontraktionen.

### A.25 Anhang A.25: Erhöhte Proliferation von germinativen Zellen bei Brutkapselbildung.

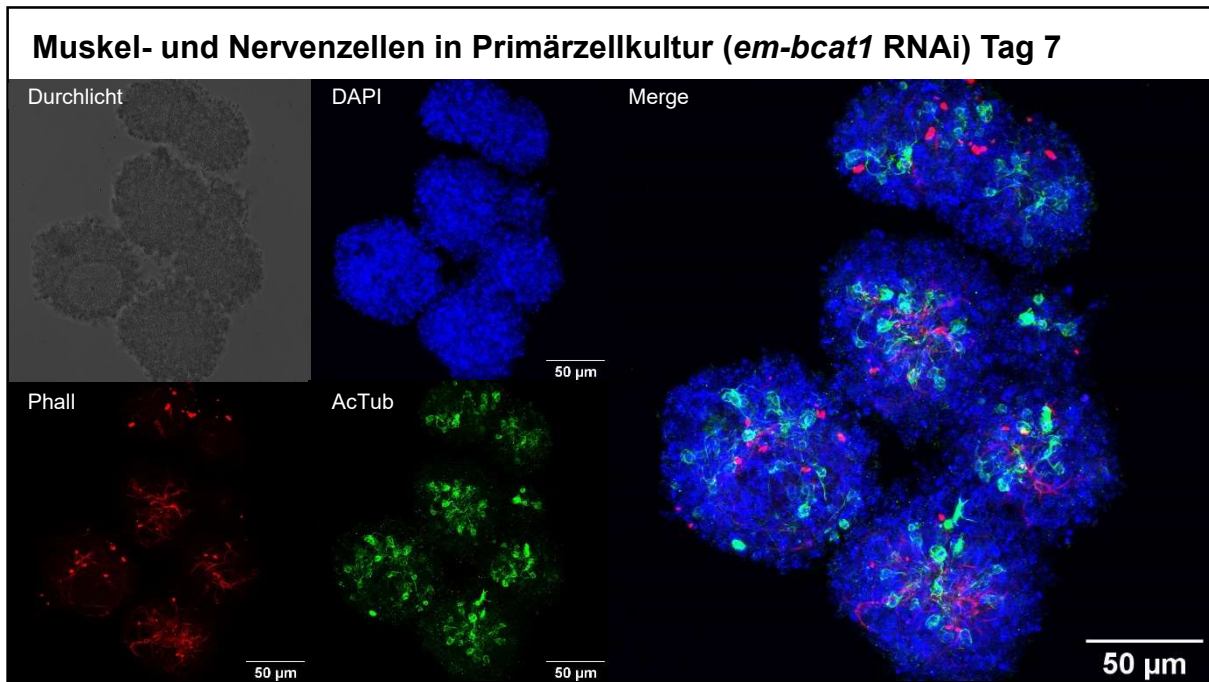
Im Zusammenhang mit der Brutkapselbildung war stets eine erhöhte Proliferation von germinativen Zellen zu detektieren. Hier am Beispiel von WMISH Aufnahmen zu *em-ndk* im Metazestode mit Brutkapseln (Isolat DDD16).



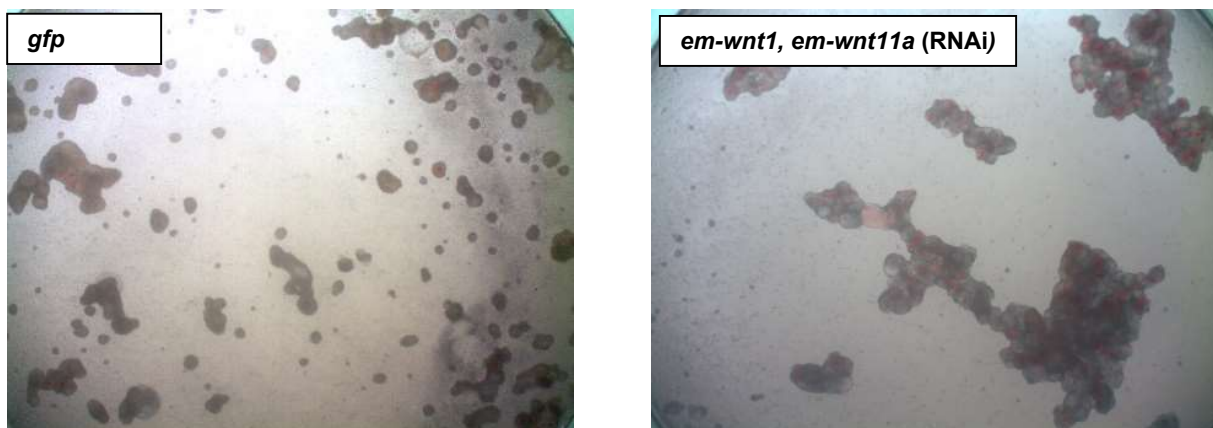
### A.26 Anhang A.26 (.avi; CD): Färbung von Nerven- und Muskelzellen in Primärzellaggregaten

Die Färbung von Muskel- und Nervenzellen in Primärzellaggregaten an Tag 7 nach RNAi (*em-bcat1*) wurden nach bereits beschriebenen Protokoll durchgeführt (Koziol et al. 2013). Nervenzellen wurden anhand eines Antikörpers gegen acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin (Ac-Tub) markiert und einem sekundären FITC-gekoppelten Antikörper nachgewiesen werden. Muskelzellen wurden mittels TRITC-markiertem Phalloidin angefärbt. Die Färbung zeigte, dass Muskel- und Nervenzellen rund um Kavitäten lokalisiert sind.

**CD:** Detaillierte Aufnahmen der Färbung von Muskel- und Nervenzellen (AcTub) in Primärzellen nach RNAi (*em-bcat1*) und der Kontrolle (*gfp*) an Tag 7 nach RNAi. Die Bilder repräsentieren Zellaggregate aus einem RNAi Experiment mit nachgewiesenem *em-bcat1* Knockdown (bRp 3). Z-Stapel: 2  $\mu$ m Abstand. DAPI<sup>+</sup> in blau, AcTub<sup>+</sup> in grün, Phall<sup>+</sup> in rot.



**A.27 Anhang A.27: Vorversuche zu Doppel-RNAi von Wnt-Liganden in *E. multilocularis* Primärzellkulturen.**



Doppel-RNAi durch Knockdown von *em-wnt1* und *em-wnt11a* zeigte einen ‚red-dot‘-ähnlichen Phänotyp in Primärzellen des Isolats GH09 (Tag13). Kein Maßstab vorhanden.

Verwendete siRNAs:

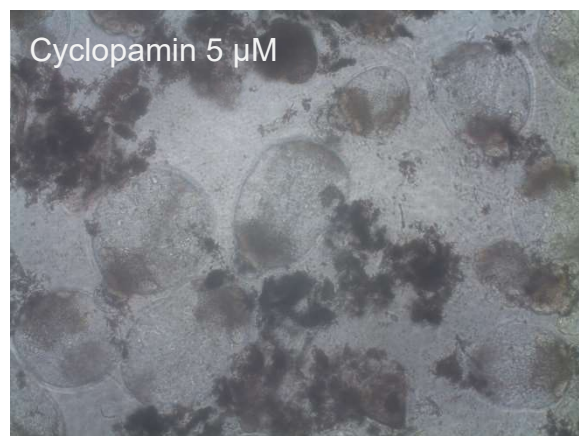
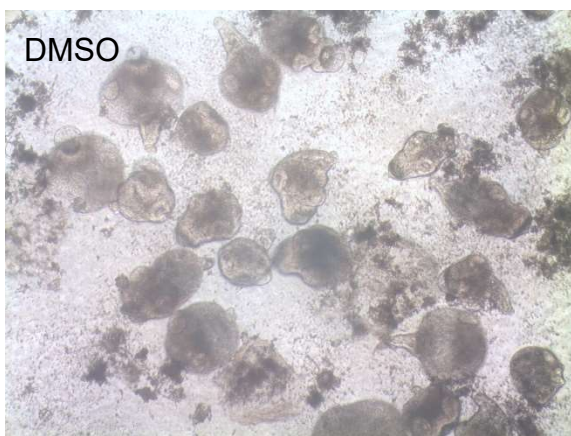
siwnt1\_EmuJ\_000349900 CAUCGGACAGCUGUCGGUUAUUA (mit Überhang)

siwnt11a\_EmuJ\_000907500 CGGACUUUGUCGAUGAGUAUGUU (mit Überhang)

siwnt11b\_EmuJ\_000104000 GAACGAGGAAGAUCGUCAAUCUU (mit Überhang)

### A.28 Anhang A.28: Vorversuch: Inhibitor Cyclopamin auf aktivierten Protoskolizes

Aktivierte Protoskolizes nach 21 Tagen in Standardmedium+5  $\mu$ M Cyclopamin bzw. DMSO Kontrolle (1:1000). Kein Maßstab vorhanden (gleiche Vergrößerung; 10x). Nicht statistisch verifiziert.



### A.29 Anhang A.29: (.mp4 und .tif Dateien; CD) Adult-ähnliche Würmer nach Amputation.

Die abgetrennten Kopf- und Proglottid-Segmente wurden in 6-Well Platten in Standardmedium kultiviert und nach 13 und 15 Tagen fotografiert.