

**Molekulare Analyse  
der hormonellen Wirt-Parasit Kreuzinteraktion  
über TGF- $\beta$  Zytokine  
bei der Alveolären Echinokokkose**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Kerstin Epping**

geboren in

Koblenz

Würzburg 2011

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. Klaus Brehm

Gutachter: Prof. Dr. Joachim Morschhäuser

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

## Erklärungen

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, die vorliegende Dissertation „Molekulare Analyse der hormonellen Wirt-Parasit Kreuzinteraktion über TGF- $\beta$  Zytokine bei der Alveolären Echinokokkose“ eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und ausschließlich die angegebenen Quellen und Materialien genutzt zu haben.

Diese Arbeit ist bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungskommission mit dem Ziel der Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt worden.

Der akademische Grad Diplom-Biologin (univ.) wurde 2006 an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg von mir erworben. Weitere akademische Grade wurden nicht erworben und es wurde auch kein Versuch dazu unternommen.

Würzburg, den 26.05.2011

Kerstin Epping

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Prof. Dr. Klaus Brehm für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren sowie für all die interessanten und motivierenden Gespräche. Ich habe viel gelernt.

Prof. Dr. Joachim Morschhäuser für die Bereitschaft, diese Arbeit als Zweitgutachter zu beurteilen.

Den Mitgliedern der Echinokokken - Arbeitsgruppe: Sabine Lorenz, Sarah Hemer, Dirk Radloff, Monika Bergmann, Justin Nono, Ferenc Kiss und den „Ehemaligen“ Verena Gelmedin und Markus Spiliotis (in wahlloser Reihenfolge). Vielen Dank für die gute Arbeitsatmosphäre.

Allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg gilt mein herzlicher Dank für Kaffee und gute Laune sowie insbesondere für schnelle technische Hilfe, tierpflegerische Assistenz und großen Kooperationswillen bei allen Belangen des Laboralltags.

Meiner Familie, die mich jederzeit und in allen Bereichen meines Lebens unterstützt.

Meinem Freund Jochen, der mir als langjähriger Partner hilft, die richtige Balance zwischen Arbeit und Freizeit zu finden.



# Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VI</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>3. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3.1. DER FUCHSBANDWURM <i>ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS</i></b>	<b>3</b>
3.1.1. Phylogenie, Lebenszyklus und Epidemiologie	3
3.1.2. Intestinaler Befall - Diagnose, Therapie, Prophylaxe	8
3.1.3. Die Alveoläre Echinokokkose - Verlauf, Diagnose und Therapie	9
<b>3.2. <i>E. MULTILOCULARIS</i> UND DIE MOLEKULARBIOLOGIE</b>	<b>11</b>
3.2.1. Erste molekularbiologische Untersuchungen	11
3.2.2. In vitro Kultivierung von <i>E. multilocularis</i>	12
3.2.3. Wirt - Parasit Interaktionen über konservierte Signalsysteme	13
3.2.4. Sequenzierungsprojekte und genetische Manipulation	14
<b>3.3. TGF-<math>\beta</math> / BMP SIGNALING - DAS MODELL UND DIE SITUATION IN <i>E. MULTILOCULARIS</i></b>	<b>16</b>
3.3.1. Übersicht TGF- $\beta$ / BMP Signaling	16
3.3.2. TGF- $\beta$ / BMP Zytokine und Antagonisten	18
3.3.3. TGF- $\beta$ / BMP Rezeptoren	21
3.3.4. TGF- $\beta$ / BMP Smads	25
<b>3.4. ZIELE DIESER ARBEIT</b>	<b>29</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
<b>4.5. EMBMP1D - EINE VIERTE ISOFORM VON EMBMP1</b>	<b>31</b>
4.5.1. <i>Embmp1d</i> - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz	31
<b>4.6. EMBMP2 - EIN ZWEITES BMP HOMOLOG AUS <i>E. MULTILOCULARIS</i></b>	<b>32</b>
4.6.1. <i>Embmp2</i> - cDNAs und abgeleitete Aminosäuresequenzen	32
4.6.2. <i>Embmp2</i> - Genorganisation	37
4.6.3. <i>Embmp2</i> - Expressionsprofil	38
4.6.4. EmBMP2 - Homologie	39
4.6.5. EmBMP2 - Strukturelle Charakterisierung	40
<b>4.7. EMACT - EIN ACTIVIN A HOMOLOG AUS <i>E. MULTILOCULARIS</i></b>	<b>43</b>
4.7.1. <i>Emact</i> - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz	43
4.7.2. <i>Emact</i> - Genorganisation	45
4.7.3. <i>Emact</i> - Expressionsprofil	46
4.7.4. EmAct - Homologie	47
4.7.5. EmAct - Strukturelle Charakterisierung	48
<b>4.8. EMNLG1 - EIN NOGGIN-LIKE HOMOLOG AUS <i>E. MULTILOCULARIS</i></b>	<b>50</b>
4.8.1. <i>Emnlg1</i> - cDNAs und abgeleitete Aminosäuresequenz	51
4.8.2. <i>Emnlg1</i> - Genorganisation	52

4.8.3.	<i>Emnlg1</i> - Expressionsprofil	53
4.8.4.	EmNlg1 - Homologie	54
<b>4.9.</b>	<b>EMNLG2 - EIN ZWEITES NOGGIN-LIKE HOMOLOG AUS <i>E. MULTILOCULARIS</i></b>	<b>55</b>
4.9.1.	<i>Emnlg2</i> - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz	55
4.9.2.	<i>Emnlg2</i> - Genorganisation	56
4.9.3.	<i>Emnlg2</i> - Expressionsprofil	57
4.9.4.	EmNlg2 - Homologie	58
<b>4.10.</b>	<b>EMSMAD E - EIN VIERTER R-SMAD AUS <i>E. MULTILOCULARIS</i></b>	<b>59</b>
4.10.1.	<i>EmsmadE</i> - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz	59
4.10.2.	<i>EmsmadE</i> - Genorganisation	61
4.10.3.	<i>EmsmadE</i> - Expressionsprofil	62
4.10.4.	EmSmadE - Homologie	63
4.10.5.	EmSmadE - Strukturelle Charakterisierung	64
4.10.6.	EmSmadE - Funktionelle Charakterisierung	66
4.10.7.	EmSmadE - Interaktionsstudien	68
<b>4.11.</b>	<b>EMSMAD F - EIN I-SMAD HOMOLOG AUS <i>E. MULTILOCULARIS</i></b>	<b>72</b>
4.11.1.	<i>EmsmadF</i> - cDNAs und abgeleitete Aminosäuresequenzen	72
4.11.2.	<i>EmsmadF</i> - Genorganisation	75
4.11.3.	<i>EmsmadF</i> - Expressionsprofil	76
4.11.4.	EmSmadF - Homologie	77
4.11.5.	EmSmadF - Strukturelle Charakterisierung	78
<b>4.12.</b>	<b>EMSMAD A - UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT</b>	<b>79</b>
4.12.1.	EmSmadA - Mutationen in der MH2 Domäne (V <sub>139</sub> T, N <sub>218</sub> Y und E <sub>243</sub> A)	80
<b>4.13.</b>	<b>EMRSK3 - KONSTITUTIVE AKTIVIERUNG</b>	<b>82</b>
4.13.1.	EmRSK3 - QD Mutation (Q <sub>280</sub> D)	83
4.13.2.	EmRSK3 - Mutationen im LPLL-Motiv (V <sub>269</sub> L und F <sub>271</sub> L)	84
<b>4.14.</b>	<b>EMRSK3 ISOFORM B - UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONALITÄT</b>	<b>86</b>
<b>4.15.</b>	<b>EMRSK3 / EMRSK4 / EMSMAD B - AKTIVIERUNG DURCH HUMANES TGF-<math>\beta</math>1</b>	<b>87</b>
<b>4.16.</b>	<b>EMRSK3 / EMRSK4 / EMSMAD B - AKTIVIERUNG DURCH METAZESTODEN ZYTOKIN</b>	<b>88</b>
<b>4.17.</b>	<b>ANTI-EMRSK3 - EIN SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER FÜR EMRSK3</b>	<b>89</b>
4.17.1.	Anti-EmRSK3 - Aufreinigung	89
4.17.2.	Anti-EmRSK3 - Nachweis von EmRSK3 in Metazestoden	91
<b>4.18.</b>	<b>IMMUNLOKALISATION DER ECHINOKOKKEN BMP / TGF-<math>\beta</math> REZEPTOREN</b>	<b>92</b>
4.18.1.	EmRSK1	92
4.18.2.	EmRSK2	93
4.18.3.	EmRSK3	93
4.18.4.	EmRSK4	94
<b>4.19.</b>	<b>HUMANES BMP2 UND TGF-<math>\beta</math>1 - AUSWIRKUNGEN AUF <i>E. MULTILOCULARIS</i></b>	<b>95</b>
4.19.1.	Humanes BMP2 und TGF- $\beta$ 1 - Genexpression in Metazestoden	95
4.19.2.	Humanes BMP2 und TGF- $\beta$ 1 - Differenzierung von Metazestoden	97

4.19.3. Humanes BMP2 und TGF- $\beta$ 1 - Regeneration von Primärzellen	99
<b>4.20. SB431542 - EIN INHIBITOR DER BMP / TGF-<math>\beta</math> TYP I REZEPTOR FAMILIE</b>	<b>100</b>
4.20.1. SB431542 - Inhibierung der Echinokokken Rezeptoren	101
4.20.2. SB431542 - Schädigung von Metazestoden	102
4.20.3. SB431542 - Genexpression in Metazestoden	104
4.20.4. SB431542 - Differenzierung von Metazestoden	106
4.20.5. SB431542 - Regeneration von Primärzellen	107
4.20.6. SB431542 - Protoskolizes	109
<b>4.21. DORSOMORPHIN - EIN INHIBITOR DER BMP TYP I REZEPTOR FAMILIE</b>	<b>111</b>
4.21.1. Dorsomorphin - Inhibierung der Echinokokken Rezeptoren	111
4.21.2. Dorsomorphin - Schädigung von Metazestoden	113
4.21.3. Dorsomorphin - Differenzierung von Metazestoden	115
4.21.4. Dorsomorphin - Regeneration von Primärzellen	116
4.21.5. Dorsomorphin - Protoskolizes	117
<b>4.22. LY364947 - EIN INHIBITOR DES TGF-<math>\beta</math> TYP I REZEPTORS ALK-5</b>	<b>120</b>
4.22.1. LY364947 - Inhibierung der Echinokokken Rezeptoren	120
4.22.2. LY364947 - Schädigung von Metazestoden	122
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>124</b>
5.1. TGF- $\beta$ / BMP SIGNALING - ALLGEMEIN	124
5.2. MECHANISMEN DER TGF- $\beta$ / BMP SIGNALTRANSDUKTION IN <i>E. MULTILOULARIS</i>	126
5.3. SENSIERUNG EXTERNER TGF- $\beta$ / BMP ZYTOKINE DURCH <i>E. MULTILOULARIS</i>	133
5.4. TGF- $\beta$ / BMP SIGNALING - EFFEKTE AUF <i>E. MULTILOULARIS</i>	136
5.4.1. Effekte auf <i>E. multilocularis</i> Metazestoden	136
5.4.2. Effekte auf <i>E. multilocularis</i> Primärzellen	145
5.4.3. Effekte auf <i>E. multilocularis</i> Protoskolizes	147
5.5. TGF- $\beta$ / BMP SIGNALING - UNTERSCHIEDE ZWISCHEN EINZELNEN ISOLATEN	148
5.6. TGF- $\beta$ / BMP ZYTOKINE UND ANTAGONISTEN AUS <i>E. MULTILOULARIS</i>	149
<b>6. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>156</b>
1.1. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL	156
6.7. ENZYME, KITS UND CHEMIKALIEN	157
6.8. ZYTOKINE	158
6.9. VEKTOREN	159
6.10. OLIGONUKLEOTIDE	160
6.11. ARBEITEN MIT RNA	162
6.11.1. Isolierung von Gesamt - RNA	162
6.11.2. Bestimmung der RNA-Konzentration	163
6.11.3. Herstellung von cDNA	163
6.12. ARBEITEN MIT DNA	163
6.12.1. Isolierung chromosomaler DNA	163
6.12.2. Bestimmung der DNA-Konzentration	164



6.12.3. Agarosegelelektrophorese	164
6.12.4. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	165
6.12.5. PCR zur Überprüfung von cDNA	165
6.12.6. Semi - quantitative PCR	165
6.12.7. Amplifikation von DNA zur Klonierung	166
6.12.8. Enzymatischer DNA Verdau	169
6.12.9. Klonierung	170
6.12.10. Kolonie-PCR	170
6.12.11. Plasmid Präparation	171
6.12.12. DNA Sequenzierung	171
6.12.13. Spezifische Mutagenese per PCR	171
6.12.14. Spliced-Leader Differential Display	173
<b>6.13. ARBEIT MIT PROTEINEN</b>	<b>174</b>
6.13.1. Protein-Konzentrationsbestimmung	174
6.13.2. SDS-PAGE	174
6.13.3. Coomassie Färbung	175
6.13.4. Western Blot	175
6.13.5. Immobilisierung von Proteinen an Affinitätssäulen	177
6.13.6. Aufreinigung des Antikörpers anti-RSK3	177
6.13.7. Immunpräzipitation	178
<b>6.14. ARBEITEN MIT <i>ESCHERICHIA COLI</i></b>	<b>179</b>
6.14.1. Verwendete Bakterienstämme	179
6.14.2. Medien und Zusätze	179
6.14.3. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	179
6.14.4. Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	180
6.14.5. Gefrierstocks von <i>E. coli</i>	180
6.14.6. Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	180
<b>6.15. ARBEITEN MIT <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i></b>	<b>181</b>
6.15.1. Verwendete Hefestämme	181
6.15.2. Medien und Zusätze	181
6.15.3. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	181
6.15.4. Verifizierung der Proteinexpression	182
6.15.5. Yeast-Two Hybrid	182
<b>6.16. ARBEITEN MIT EUKARYOTISCHEN ZELLINIEN</b>	<b>183</b>
6.16.1. Verwendete eukaryotischer Zelllinien	183
6.16.2. Bestimmung der Zellzahl	183
6.16.3. Kultivierung	184
6.16.4. Gefrierstocks eukaryotischer Zellen	184
6.16.5. Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen	184

---

<b>6.17. ARBEITEN MIT <i>ECHINOCOCCUS MULTILOCCULARIS</i></b>	<b>186</b>
6.17.1. Verwendete Isolate	186
6.17.2. Kulturmedien	186
6.17.3. <i>In vivo</i> Kultivierung	186
6.17.4. Isolierung und Aktivierung von Protoskolizes	187
6.17.5. <i>In vitro</i> Kultivierung von Metazestoden	188
6.17.6. <i>In vitro</i> Kultivierung von Primärzellen	189
6.17.7. Zytokinstudien	191
6.17.8. Inhibitorstudien	192
6.17.9. Alkalische Phosphatase - Assay	193
6.17.10. Karnovsky - Fixierung	194
6.17.11. Gewebeschnitte	195
6.17.12. Immunhistochemie	195
<b>6.18. BIOINFORMATISCHE ANALYSEN</b>	<b>196</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>198</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Systematik parasitischer Metazoen. ....	4
Abb. 2: Lebenszyklus von <i>E. multilocularis</i> .....	5
Abb. 3: Mechanismus von cis- und <i>in trans</i> - Spleißen. ....	12
Abb. 4: Smad Signaling in <i>Homo sapiens</i> nach Moustakas et al. ....	17
Abb. 5: Struktur eines repräsentativen TGF- $\beta$ Zytokins, TGF- $\beta$ 3. ....	19
Abb. 6: Struktur eines Noggin - BMP7 Komplexes. ....	21
Abb. 7: Nomenklatur der humanen TGF- $\beta$ / BMP Typ I Rezeptoren. ....	23
Abb. 8: Subgruppierungen der TGF- $\beta$ / BMP Typ I Rezeptoren. ....	23
Abb. 9: Struktur von Ligand - Rezeptor Komplexen. ....	24
Abb. 10: Strukturelle Charakteristika verschiedener Smads. ....	26
Abb. 11: <i>Embmp1d</i> cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz. ....	32
Abb. 12: <i>Embmp2a</i> - ORF und abgeleitete Aminosäuresequenz. ....	34
Abb. 13: <i>Embmp2b</i> - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz. ....	36
Abb. 14: <i>Embmp2c</i> - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz. ....	37
Abb. 15: <i>Embmp2a</i> , <i>embmp2b</i> und <i>embmp2c</i> - Genorganisation. ....	38
Abb. 16: <i>Embmp2</i> - Expressionsprofil in verschiedenen Larvenstadien. ....	39
Abb. 17: EmBMP2 - Alignment des C-Terminus homologer Proteinen. ....	40
Abb. 18: EmBMP2a, b und c - Domänenstruktur. ....	40
Abb. 19: EmBMP2a Propeptid - konservierte Aminosäuren am N-Terminus. ....	41
Abb. 20: EmBMP2a Propeptid - konservierte Aminosäuren am C-Terminus. ....	42
Abb. 21: <i>Emact</i> - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz. ....	45
Abb. 22: <i>Emact</i> - Genorganisation. ....	46
Abb. 23: <i>Emact</i> - Expressionsprofil in verschiedenen Larvenstadien. ....	47
Abb. 24: EmAct - Alignment des C-Terminus homologer Proteine. ....	48
Abb. 25: EmAct - Domänenstruktur. ....	48
Abb. 26: EmAct Propeptid - konservierte Aminosäuren am N-Terminus. ....	49
Abb. 27: EmAct Propeptid - konservierte Aminosäuren am C-Terminus. ....	49
Abb. 28: <i>Emnlg1</i> - ORF und abgeleitete Aminosäuresequenz. ....	52
Abb. 29: <i>Emnlg1</i> - 3' UTR der cDNA. ....	52
Abb. 30: <i>Emnlg1</i> - Genorganisation. ....	53
Abb. 31: <i>Emnlg1</i> - Expressionsprofil in verschiedenen Larvenstadien. ....	53
Abb. 32: EmNlg1 - Alignment des C-Terminus von homologen Proteinen. ....	54
Abb. 33: <i>Emnlg2</i> - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz. ....	56
Abb. 34: <i>Emnlg2</i> - Expressionsprofil in verschiedenen Larvenstadien. ....	57
Abb. 35: EmNlg2 - Alignment des C-Terminus der Noggin Domänen homologer Proteine. ....	59
Abb. 36: <i>EmsmadE</i> - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz. ....	61
Abb. 37: <i>EmsmadE</i> - Genorganisation. ....	62
Abb. 38: <i>EmsmadE</i> - Expressionsprofil in verschiedenen Larvenstadien. ....	62
Abb. 39: EmSmadE - Alignment der MH1 Domänen von BR-Smads. ....	63

Abb. 40: EmSmadE - Alignment der MH2 Domänen von R-Smads. ....	64
Abb. 41: EmSmadE - Domänenstruktur. ....	64
Abb. 42: EmSmadE - Phosphorylierung durch humane Rezeptoren. ....	67
Abb. 43: EmSmadE - Phosphorylierung durch aktivierte Echinokokken-Rezeptoren. ....	68
Abb. 44: EmSmadE - Homodimerbildung im Yeast-Two Hybrid. ....	70
Abb. 45: EmSmadE - Interaktion mit anderen Echinokokken Smads. ....	71
Abb. 46: EmSmadE - Interaktionen mit EmSkip, EmAlien und EmNHR1. ....	72
Abb. 47: <i>EmsmadFa</i> - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz. ....	74
Abb. 48: <i>EmsmadFb</i> - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz. ....	75
Abb. 49: <i>EmsmadF</i> - chromosomaler Locus und Spleißvarianten. ....	75
Abb. 50: <i>EmsmadFa</i> und <i>emsmadFb</i> - Organisation von Exons und Introns. ....	76
Abb. 51: <i>EmsmadF</i> - Expressionsprofil in verschiedenen Larvenstadien. ....	77
Abb. 52: EmSmadF - Alignment der MH2 Domänen von I-Smads. ....	78
Abb. 53: EmSmadFa und EmSmadFb - Domänenstruktur. ....	78
Abb. 54: EmSmadA - Alignment der MH2 Domänen von Echinokokken Smads. ....	79
Abb. 55: EmSmadA Mutanten - Phosphorylierung durch humane Rezeptoren. ....	81
Abb. 56: EmRSK3 - GS Domäne. ....	83
Abb. 57: EmRSK3 Q <sub>280</sub> D - Phosphorylierung von EmSmadA und EmSmadB. ....	84
Abb. 58: EmRSK3, mutiert im LPLL-Motiv - Phosphorylierung von EmSmadB und EmSmadA. ....	85
Abb. 59: EmRSK3b - ein inaktiver BMP / TGF- $\beta$ Rezeptor. ....	86
Abb. 60: EmRSK3 - Aktivierung durch humanes TGF- $\beta$ 1. ....	87
Abb. 61: Zytokin aus Metazestoden - Aktivierung des Echinokokken BMP / TGF- $\beta$ Signalwegs. ...	89
Abb. 62: Anti-EmRSK3 - Aufreinigung. ....	90
Abb. 63: Anti-EmRSK3 - Nachweis von EmRSK3 in Metazestoden. ....	91
Abb. 64: EmRSK1 - Immunlokalisation. ....	92
Abb. 65: EmRSK2 - Immunlokalisation. ....	93
Abb. 66: EmRSK3 - Immunlokalisation. ....	94
Abb. 67: EmRSK4 - Immunlokalisation. ....	95
Abb. 68: Humanes BMP2 - Expressionsmuster von Genen des BMP / TGF- $\beta$ Signalweges. ....	96
Abb. 69: Humanes BMP2 und TGF- $\beta$ 1 - Expressionsmuster transgespleißter mRNAs. ....	97
Abb. 70: BMP2 und TGF- $\beta$ 1 - Auswirkungen auf die Differenzierung von Metazestoden. ....	98
Abb. 71: Humanes BMP2 und TGF- $\beta$ 1 - Regeneration von Primärzellen. ....	100
Abb. 72: SB431542 - Inhibierung von EmRSK1, EmRSK2, EmRSK3. ....	102
Abb. 73: SB431542 - Schädigung von Metazestoden. ....	104
Abb. 74: SB431542 - Expressionsmuster von Genen des BMP / TGF- $\beta$ Signalweges. ....	106
Abb. 75: SB431542 - Auswirkungen auf die Differenzierung von Metazestoden. ....	107
Abb. 76: SB431542 - Regeneration von Primärzellen. ....	108
Abb. 77: SB431542 - morphologische Änderungen von <i>in vitro</i> kultivierten Protoskolizes. ....	110
Abb. 78: Dorsomorphin - Inhibierung von EmRSK1 und EmRSK3. ....	112
Abb. 79: Dorsomorphin - Schädigung von Metazestoden. ....	114
Abb. 80: Dorsomorphin - Auswirkungen auf die Differenzierung von Metazestoden. ....	115

Abb. 81: Dorsomorphin - Regeneration von Primärzellen. ....	117
Abb. 82: Dorsomorphin - morphologische Änderungen von <i>in vitro</i> kultivierten Protoskolizes. .	119
Abb. 83: LY364947 - Inhibierung von EmRSK1, EmRSK2, EmRSK3.....	121
Abb. 84: LY364947 - Schädigung von Metazestoden. ....	123

## 1. Zusammenfassung

*Echinococcus multilocularis* besitzt als Lebergewebe - infiltrierender Parasit und Erreger der Alveolären Echinokokkose evolutionär konservierte Faktoren des TGF- $\beta$  / BMP Signalsystems, die im Konzept der hormonellen Wirt - Parasit Kreuzkommunikation nicht nur hinsichtlich des Wirts - Einflusses auf die Entwicklung des Parasiten sondern auch umgekehrt in Bezug auf Immunantwort und Physiologie des Wirts eine mögliche regulierende Funktion besitzen. Die vorliegende Arbeit befasst sich primär mit den Auswirkungen von TGF- $\beta$  / BMP Signaling auf den Fuchsbandwurm *E. multilocularis*. Dazu wurde zunächst durch Immunlokalisation das Vorliegen aller Echinokokken TGF- $\beta$  / BMP Rezeptoren während einer natürlich aufgetretenen Alveolären Echinokokkose überprüft, sowie die funktionelle Interaktion von EmRSK3 und EmRSK4 mit humanem TGF- $\beta$ 1 *in vitro* nachgewiesen. Mit Hilfe von humanen Zytokinen (BMP2 und TGF- $\beta$ 1) und Rezeptor - spezifischen Inhibitoren (SB431542, Dorsomorphin und LY364947) wurde die Rolle von TGF- $\beta$  / BMP Signaling in Bezug auf Vitalität, Wachstum, Differenzierung und Regeneration von *E. multilocularis* in verschiedenen Stadien untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss von humanem BMP2 und von SB431542 auf die Genexpression in *E. multilocularis* analysiert. Die Möglichkeit einer intra - Spezies Kommunikation durch Echinokokken Faktoren des TGF- $\beta$  / BMP Signaling wurde ebenfalls adressiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Echinokokken TGF- $\beta$  / BMP Rezeptoren *in vitro* durch sekretierte Faktoren aus Metazestoden aktiviert werden können. Auf Basis von Genomsequenzierungsdaten wurden zudem weitere Komponenten des TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis*, wie die bisher unbekanntenen TGF- $\beta$  / BMP Homologe EmBMP2 und EmAct, die Noggin-like Homologe EmNlg1 und 2, ein I-Smad (EmSmadF) sowie ein zweiter BR-Smad (EmSmadE) identifiziert, strukturell charakterisiert und die jeweilige Genexpression in verschiedenen Stadien überprüft. EmSmadE wurde zudem in weiterführenden Studien funktionell charakterisiert. Fragestellungen bezüglich der Spezifität, Funktionalität und Möglichkeit der konstitutiven Aktivierung von TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* wurden auf Basis von EmSmadA, EmRSK3 und EmRSK3b in weiteren molekularbiologischen Studien untersucht und dienen dem tieferen Verständnis von TGF- $\beta$  / BMP Signaling. In der vorliegenden Arbeit konnten damit alle grundlegenden Faktoren von TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* identifiziert werden und es wurden erstmals die eindeutige Sensierung von Wirts TGF- $\beta$  / BMP Zytokinen durch Metazestoden sowie die Möglichkeit einer intra - Spezies Kommunikation über Echinokokken TGF- $\beta$  / BMP Faktoren belegt. Zusätzlich deuten die neu identifizierten potenziell sekretierten TGF- $\beta$  / BMP Faktoren auf eine mögliche Beeinflussung von Physiologie und Immunantwort des Wirts durch Echinokokken TGF- $\beta$  / BMP Zytokine hin.

## 2. Summary

Being the causative agent of alveolar echinococcosis with infiltrative growth in liver tissue, *Echinococcus multilocularis* possesses evolutionary conserved TGF- $\beta$  / BMP signaling factors, which might have - according to the concept of 'hormonal host-parasite cross-communication' - a fundamental function in developmental processes of the parasite which are under influence of the host, and vice versa a regulatory role in immune response and host physiology. The present work addresses primarily the impact of TGF- $\beta$  / BMP signaling on the fox tapeworm. For this purpose, the presence of all four TGF- $\beta$  / BMP receptors of *E. multilocularis* had been initially checked by immune localization in naturally infected liver tissue and the functional interaction of EmRSK3, EmRSK4 and human TGF- $\beta$ 1 was demonstrated *in vitro*. The role of TGF- $\beta$  / BMP signaling concerning vitality, growth, differentiation and regeneration was examined in several stages of *E. multilocularis* development, using human cytokines (BMP2 and TGF- $\beta$ 1) and specific inhibitors of TGF- $\beta$  / BMP receptors (SB431542, Dorsomorphin and LY364947). The influences of human BMP2 and of the small molecule compound SB431542 on the gene expression profile of metacestodes were analyzed as well. A second subproject dealt with the possibility of intra-species communication via TGF- $\beta$  / BMP signaling in *E. multilocularis*. Thus, it was demonstrated that TGF- $\beta$  / BMP receptors of the fox tapeworm are activated by secreted factors of metacestode vesicles. Based on the data of a genome sequencing project, several so far unknown factors of TGF- $\beta$  / BMP signaling in *E. multilocularis* were identified, structurally characterized and expression levels were tested in all larval stages. This included two TGF- $\beta$  / BMP homologues (EmBMP2 and EmAct), two Noggin-like factors (EmNlg1 and 2), one I-Smad homologue (EmSmadF) and a second BR-Smad (EmSmadE). Additional functional studies were performed for EmSmadE. Questions about specificity, functionality and the possibility of constitutive activation, which leverage the knowledge of TGF- $\beta$  / BMP signaling in general, were addressed in further molecular biological studies with EmSmadA, EmRSK3 and EmRSK3b. Taken together, all basic factors of TGF- $\beta$  / BMP signaling in *E. multilocularis* could be identified in the present study and sensing of host TGF- $\beta$  / BMP cytokines by metacestodes as well as the possibility of intra-species communication via TGF- $\beta$  / BMP signaling could be shown for the first time. In addition, based on the possibly secreted TGF- $\beta$  / BMP factors which have been identified in the present work, there is evidence that TGF- $\beta$  / BMP cytokines of *E. multilocularis* might influence immune response and physiology of the host during an infection.

### 3. Einleitung

Da TGF-B / BMP Signaling in *E. multilocularis* von mir bereits in meiner Diplomarbeit in Bezug auf den Echinokokken Rezeptor EmRSK3 bearbeitet wurde, sind die Inhalte der folgenden Kapitel der Einleitung den entsprechenden Abschnitten in meiner Diplomarbeit sehr ähnlich<sup>1</sup>. Ich bitte dies zur Kenntnis zu nehmen, da in den folgenden Abschnitten nur noch in Ausnahmefällen auf diese eigene, vorangegangene Arbeit hingewiesen wird.

#### 3.1. Der Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis*

*Echinococcus multilocularis* ist ein Endoparasit und Auslöser der Alveolären Echinokokkose (AE), einer seltenen aber schwerwiegenden Erkrankung des Menschen, die primär die Leber betrifft. Da die Auswahl an adäquaten Therapiemöglichkeiten immer noch sehr begrenzt ist, ist die Identifikation neuer Strategien zur Bekämpfung von AE dringend erforderlich. Dieser Herausforderung wurde in den letzten Jahren mit der Entwicklung verschiedener *in vitro* Zellkulturtechniken für *E. multilocularis* und mit einem umfassenden Genom- und Transkriptomsequenzierungsprojekt begegnet, was entscheidend zur Etablierung des Fuchsbandwurms als Modellorganismus zur Untersuchung von Cestoden - Larvenstadien und den damit verbundenen Wirt - Parasit Interaktionen beigetragen hat. Die Erforschung hormoneller Signalsysteme, die der Wissenschaft dank einem wachsenden Methodenrepertoire immer besser zugänglich sind, scheinen zudem ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Identifikation neuer antiparasitischer Wirkstoffe zu sein. *E. multilocularis* ist außerdem durch seine hohe Regenerationsfähigkeit, die auf pluripotente Stammzellen zurückzuführen ist, generell und zusätzlich in Anbetracht der Rolle von Signalsystemen in grundlegenden Entwicklungsprozessen hoch interessant für die Stammzellforschung.

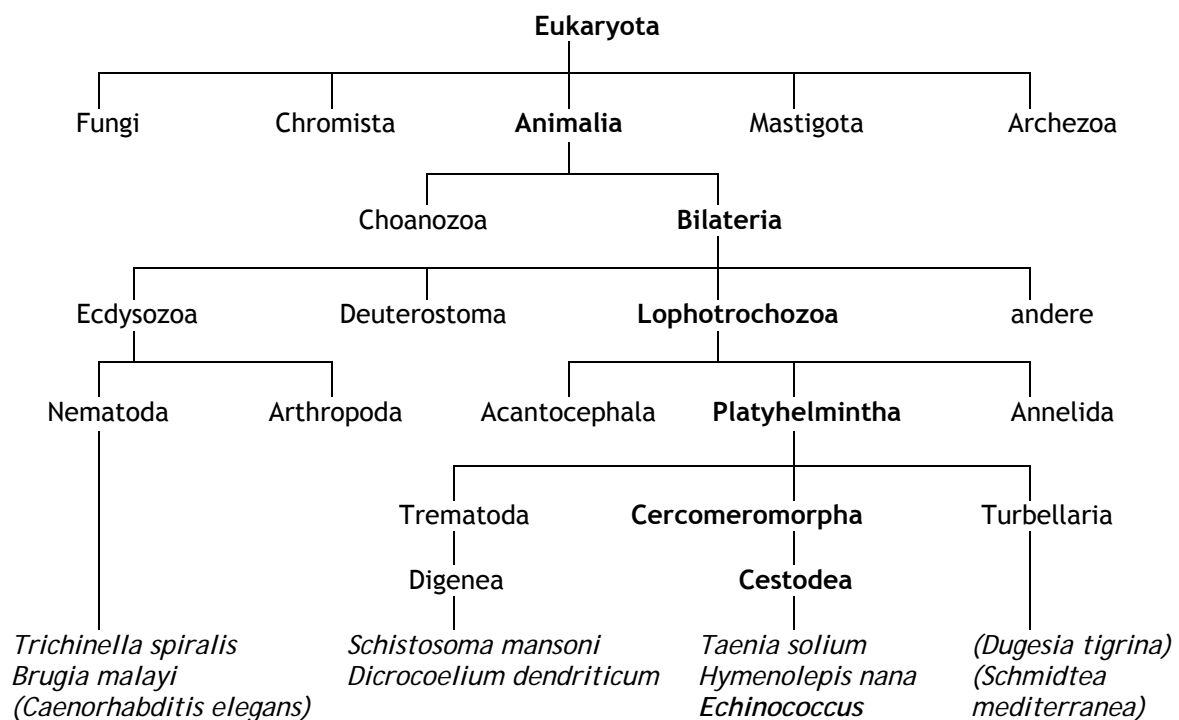
##### 3.1.1. Phylogenie, Lebenszyklus und Epidemiologie

###### Phylogenie

Als eukaryotischer Vielzeller reiht sich *E. multilocularis* phylogenetisch in die Gruppe der Bilateria ein, die sich wiederum in mehrere Untergruppierungen aufgliedert, unter anderem auch in Ecdysozoa und Lophotrochozoa (vgl. Abb. 1). Die Gruppierung Ecdysozoa beinhaltet neben anderen den Tierstamm der Nematoda (Fadenwürmer), während in der Gruppe der Lophotrochozoa die Platyhelminthes (Plattwürmer) zu finden sind<sup>2</sup>. Die parasitär lebenden Wurmartarten dieser beiden Stämme werden auch als Helminthen bezeichnet. Als wichtige Vertreter der Nematoda können die humanpathogenen Arten *Trichinella spiralis* (Erreger der Trichinellose) und *Brugia*



*malayi* (Erreger der Elefantiasis) sowie der apathogene Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* angesehen werden. Die Platyhelmintha unterteilen sich wiederum in freilebende Turbellaria (Strudelwürmer) und parasitische Plattwürmer, wie die Trematoda und die Cestoda. Als Vertreter der Turbellaria ist *Dugesia tigrina* für die Forschung von besonderer Bedeutung, da dieser Organismus durch zahllose Stammzellen in seinem Bindegewebe über eine einzigartige Regenerationsfähigkeit verfügt. Zu den Trematoda zählen die humanpathogenen Arten *Schistosoma mansoni* (Erreger der Bilharziose) und *Dicrocoelium dendriticum* (Erreger der Dicrocoeliose), während *Taenia solium* (Erreger der Zystizerkose), *Hymenolepis nana* und die Gattung *Echinococcus* bei den Cestodea eingruppiert werden. Neben *E. multilocularis* finden sich in dieser Gattung auch die Arten *E. vogeli*, *E. oligarthrus*, *E. shiquicus*, *E. felidis*, *E. granulosus*, *E. equinus*, *E. orteppi* und *E. canadensis* wieder, wobei der Status der letztgenannten Art noch umstritten ist<sup>3</sup>. Dabei ist *E. granulosus* der am weitesten verbreitete humanpathogene Parasit der Gattung *Echinococcus*, während die von *E. multilocularis* ausgelöste Alveoläre Echinokokkose als eine der schwersten und gefährlichsten Zoonosen gilt<sup>4-5</sup>.



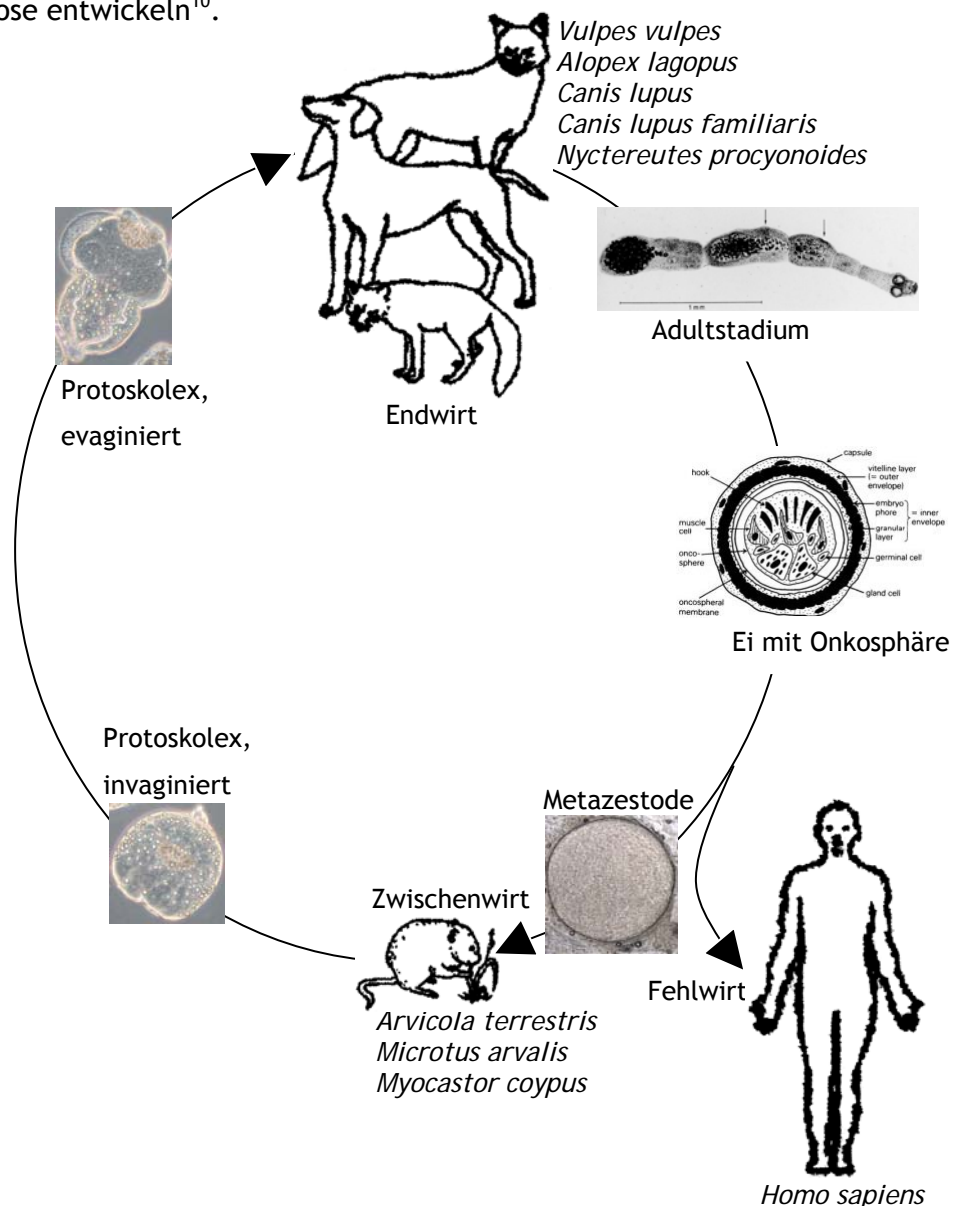
**Abb. 1: Systematik parasitischer Metazoen.**

Gezeigt sind Taxa verschiedener Parasiten von human- oder veterinärmedizinischer Bedeutung (Ausnahmen: *C. elegans*, *D. tigrina* und *S. mediterranea*)<sup>6</sup>. Die Phylogenie der Gattung *Echinococcus* ist durch fette Buchstaben hervorgehoben.

### Lebenszyklus

*E. multilocularis* durchläuft einen diheteroxenen Lebenszyklus mit verschiedenen Zwischen- und Endwirten (vgl. Abb. 2). In Europa sind unter den Endwirten vor allem der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*), Polarfuchs (*Alopex lagopus*), Wolf (*Canis lupus*) und

Marderhund (*Nyctereutes procyonoides*) hervorzuheben, allerdings können auch domestizierte Hunde und Katzen durch den Fuchsbandwurm infiziert werden und stellen durch ihren sehr nahen Kontakt zum Menschen ein nicht zu unterschätzendes Infektionsrisiko dar<sup>7-8</sup>. Als Zwischenwirte fungieren verschiedene Kleinsäuger, hauptsächlich die Schermaus (*Arvicola terrestris*) und die Feldmaus (*Microtus arvalis*)<sup>7</sup>. Die Biberratte (*Myocastor coypus*) ist dabei als bereits etablierter Neozoon in Europa ebenfalls nennenswert<sup>8-9</sup>. Neben ihrer Rolle als Endwirt können sich domestizierte Hunde, ebenso wie auch verschiedene Affengattungen (u.a. *Macaca* und *Lemur*) und der Mensch, als Fehlwirt mit den Eiern von *E. multilocularis* infizieren und eine Alveoläre Echinokokkose entwickeln<sup>10</sup>.



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

Dargestellt ist der diheteroxene Lebenslauf von *E. multilocularis*<sup>11</sup>. Zwischen- und Endwirte, die in Europa bei der Verbreitung von *E. multilocularis* besonders hervorzuheben sind, sind angegeben. Als Fehlwirt wurde ausschließlich der Mensch dargestellt, wobei auch andere Säuger als Fehlwirt durch *E. multilocularis* infiziert werden können. Das Adultstadium (Aufnahme: Institut für Parasitologie, Zürich<sup>12</sup>), ein Ei mit Onkosphäre<sup>13</sup>, das Metazestodenstadium sowie invaginierte und evaginierte Protoskolizes sind dargestellt und beschriftet.

Der zwitterige adulte Fuchsbandwurm hat eine Länge von 1,2 bis 4,5 mm und besteht aus durchschnittlich 5 Segmenten<sup>5</sup>. Er gliedert sich in den Scolex mit vier Saugnäpfen und einem doppelten Hakenkranz sowie den nachfolgenden Proglottiden, in denen die Eier in einem sackförmigen Uterus heranreifen. Das Adultstadium besiedelt das Jejunum und proximale Ileum des Endwirts, kann sich bei starkem Befall aber auch auf den gesamten Dünndarm ausbreiten, wobei die Präpatenz durchschnittlich 4 bis 5 Wochen andauert während die Patenzzeit 6 Monate bis 1 Jahr beträgt<sup>12,14</sup>. Der Zwischenwirt infiziert sich durch die Aufnahme von *E. multilocularis* Eiern, die in der endständigen Proglottide des adulten Wurms zusammen mit den Fäzes des Endwirts ausgeschieden werden. Die in den Eiern enthaltene vollkommen ausdifferenzierte vielzellige Onkosphäre ist in eine Membran eingebettet und von einer dicken Embryophore umgeben. Dadurch kann dieses Larvenstadium des Fuchsbandwurms für bis zu 1 Jahr in einer geeigneten, feuchten Umgebung mit relativ niedrigen Temperaturen infektiös bleiben<sup>15</sup>. Nach der Aufnahme der infektiösen Eier kommt es durch verschiedene Faktoren des Verdauungsprozesses zur Freisetzung und Aktivierung der Onkosphäre, so dass die Mucosa des Dünndarms penetriert wird und der Parasit über die Leberpfortader (Vena portae hepatis) in die Leber des Zwischenwirts einwandert<sup>16</sup>. Hier findet die Weiterentwicklung der Onkosphäre zum asexuellen Metazestodenstadium statt<sup>5,17</sup>. Metazestoden sind flüssigkeitsgefüllte Vesikel, die durch eine azelluläre Schicht (Laminatschicht) nach außen und durch eine zelluläre Schicht (Germinalschicht) nach innen begrenzt sind. Die Germinalschicht besteht aus verschiedenen Zelltypen wie Muskelzellen, Bindegewebszellen, Glykogen-Speicherzellen und undifferenzierten Primärzellen. Der Übergang zwischen diesen beiden Schichten besteht aus dem Tegument, dem äußersten Teil der Germinalschicht, mit vielen in die Laminatschicht hineinragenden Ausstülpungen, die die resorbierende Oberfläche des Parasiten signifikant vergrößern. Die Laminatschicht ist eine stark glykosylierte Struktur und besteht hauptsächlich aus hochmolekularen Glykanen<sup>18</sup>. Die Ausbildung der Laminatschicht und die damit einhergehende Sekretierung verschiedener Echinokokken Faktoren werden mit dem Schutz des Parasiten vor dem Immunsystem des Wirts in Verbindung gebracht<sup>19-20</sup>. Weitere in dieser Schicht identifizierte Proteine sind unter anderem das Em2 Antigen<sup>21</sup> und EmAP (Alkalische Phosphatase), die Anwendung in der Diagnose bzw. bei Vitalitätsassay in der Forschung finden<sup>22</sup>. Das Metazestodengewebe proliferiert einerseits durch Größenwachstum und andererseits durch asexuelle exogene Sprossung, was zur charakteristischen metastasierenden Infiltration des infizierten Organs durch *E. multilocularis* führt<sup>5,23</sup>. Dabei können die Läsionen der Leber im Menschen Durchmesser von bis zu 20 cm erreichen. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zur Infektion weiterer Organe des Abdominal- und Retroperitonealraums sowie der Lunge,

des Gehirns oder der Knochen<sup>5</sup>. Ausgehend von der Germinalschicht entwickelt sich nach 40 - 60 Tagen (abhängig von der Prädisposition des Wirtstieres) in sogenannten Brutkapseln innerhalb der Metazestoden das nächste Larvenstadium des Fuchsbandwurms, der Protoskolex. Bei infizierten Menschen sind Protoskolizes nur selten zu finden<sup>5,20</sup>. Inaktive Protoskolizes zeigen eingestülpt die charakteristischen Kopfanlagen des adulten Wurms. Nach dem Verzehr eines infizierten Zwischenwirts, der Metazestoden mit Protoskolizes trägt, wird das Metazestodengewebe durch den Endwirt verdaut. Die enthaltenen inaktiven Protoskolizes werden durch verschiedene Faktoren des Verdauungssystems aktiviert, evaginieren und reifen im Verdauungstrakt des Endwirts zum Adultstadium heran. Damit schließt sich der Lebenszyklus von *E. multilocularis*.

### Epidemiologie

*E. multilocularis* ist in der gesamten nördlichen Hemisphäre verbreitet. Er ist in Teilen Nordamerikas und Zentraleuropas genauso zu finden wie in großen Gebieten Nord- und Zentr Eurasiens, z. Bsp. in Russland, Kasachstan und China, sowie in Japan<sup>5,24-25</sup>. Verschiedene Siedlungen der nordamerikanischen Tundra und in China, wo Hunde regelmäßig infizierte Zwischenwirte jagen, gelten dabei als hochendemische Gebiete und auch in Sichuan (China) erreicht die Verbreitung adulter *E. multilocularis* Werte von bis zu 60%<sup>26-28</sup>.

Nach neuen Erkenntnissen ist der Fuchsbandwurm in Europa in nahezu jedem Land zu finden, mit Ausnahme von Großbritannien, Fennoskandinavien, Finnland und dem Mittelmeerraum. So wurde *E. multilocularis* zusätzlich zu den bereits bekannten Staaten mit endemischen Gebieten (Deutschland, Frankreich, Österreich und Schweiz) bereits in den Baltischen Staaten, Norwegen (Svalbard - Archipel), Dänemark, den Niederlanden, Belgien, Luxemburg, Liechtenstein, Norditalien, Slowenien, Ungarn, Bulgarien, Rumänien, der Slowakei, Tschechien und Polen nachgewiesen<sup>5,8,29-30</sup>. In Europa werden die nördliche Voralpenregion, das deutsche, französische und schweizerische Juragebirge, das Gebiet zwischen Südbelgien und Mitteldeutschland sowie die Tatra als hochendemic angesehen<sup>29</sup>. Dabei konnte in den letzten Jahren eine gestiegene Prävalenz bei Füchsen in verschiedenen Gebieten Deutschlands (Südsachsen, Bayern, Baden-Württemberg), Ostfrankreichs, der nördlichen Slowakei und Südpolens festgestellt werden, die mit wachsenden Fuchspopulationen einhergeht<sup>8</sup>. Die Verbreitung des Fuchsbandwurms wird mit dem Vorhandensein von Grasland (Viehweiden und Auen), dem bevorzugten Lebensgebiet der Zwischenwirte, in Verbindung gebracht<sup>31-32</sup>. In endemischen Gebieten sind durchschnittlich 9 - 39% der Nager infiziert, wohingegen die Prävalenz von *E. multilocularis* in Füchsen bei 35 - 65% liegt<sup>33-34</sup>.

In vielen europäischen Städten konnten sich zusätzlich stabile urbane Fuchspopulationen etablieren, die aufgrund des unerschöpflichen Nahrungsangebotes eine hohe Populationsdichte aufweisen. Die Prävalenz von *E. multilocularis* in Füchsen unterscheidet sich dabei von Stadt zu Stadt und kann Werte von über 40% erreichen (z. Bsp. 43% in Genf, 44% in Zürich), die aber im Durchschnitt niedriger sind als in den umliegenden Gebieten<sup>8,35</sup>. Bei diesen urbanen Fuchspopulationen stellt vor allem die räumliche Nähe zu Menschen ein beträchtliches Infektionsrisiko dar.

### **3.1.2. Intestinaler Befall - Diagnose, Therapie, Prophylaxe**

#### Diagnose

Der Nachweis eines intestinalen Befalls mit *E. multilocularis* erfolgt bei Hunden und Füchsen weitestgehend durch die Detektion von Coproantigenen in den Fäzes oder nach einer Nekropsie des Dünndarms, mit anschließender Verifizierung der Ergebnisse durch PCR (z. Bsp. auf mitochondriale 12S rRNA)<sup>36</sup>. Zur Vereinfachung epidemiologischer Studien wurde zudem kürzlich eine Real-time multiplex-nested PCR entwickelt, die den Nachweis von *E. multilocularis* aus Fäzes erlaubt und mit der gleichzeitig die Wirtspezies spezifisch festgestellt werden kann (z. Bsp. zur Unterscheidung der Infektionsrate von Hunden und urbanen Füchsen)<sup>37</sup>.

#### Therapie

Infizierte Hunde oder Katzen stellen für den Menschen ein erhebliches Infektionsrisiko dar und sollten umgehend unter tierärztlicher Aufsicht und unter Einhaltung der entsprechenden Sicherheitsmaßnahmen behandelt werden. Praziquantel wird dabei als Standard - Antihelminthikum gegen den intestinalen Befall mit *E. multilocularis* eingesetzt, wird aber aus Sicherheitsgründen zweimal an aufeinanderfolgenden Tagen eingesetzt<sup>12,38</sup>.

#### Prophylaxe

Hunde oder Katzen, die Kleinsäuger verzehren, sollten alle 4 Wochen mit Praziquantel oder Epsiprantel behandelt werden<sup>12</sup>. Im sylvatischen Lebenszyklus ist die Kontrolle bzw. Prophylaxe bei *E. multilocularis* sehr schwierig. So scheidet die komplette Elimination der wilden Fuchs- und Hundepopulation in endemischen Gebieten aus ethischen und ökologischen Gründen aus, wurde allerdings bereits mit Erfolg zur Ausrottung des Parasiten auf Rebun (Japan) durchgeführt<sup>39</sup>. Es gab bereits erfolgreiche Versuche, die Verbreitung von *E. multilocularis* durch eine Therapie von Füchsen mit Hilfe entsprechender Köder zu vermindern, wobei dieser Ansatz aber sehr kostenintensiv ist<sup>24,40</sup>. Zur Unterbrechung des urbanen Lebenszyklus scheint diese Vorgehensweise allerdings sehr vielversprechend<sup>38,41</sup>. Auch zeigen Impfstudien an

Zwischenwirten, wie z. Bsp. rekombinantes E14t (Protein 14-3-3 aus *E. multilocularis*) mit Werten von 97% Protektion gegen eine Erstinfektion mit Eiern des Fuchsbandwurms, einen sehr guten Schutz gegen *E. multilocularis*<sup>42</sup>. Allerdings scheidet auch dieser Ansatz zur flächendeckenden Behandlung von infizierten Zwischenwirten aus Kostengründen aus.

### 3.1.3. Die Alveoläre Echinokokkose - Verlauf, Diagnose und Therapie

Die Alveoläre Echinokokkose (AE) ist eine potentiell tödliche Erkrankung, die durch das Metazestodenstadium von *E. multilocularis* ausgelöst wird. In Zentraleuropa wird die AE als seltene Erkrankung eingestuft, wobei in der Schweiz die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen von 0,12 - 0,15/100 000 Einwohner im Zeitraum 1956 - 1992 auf Durchschnittswerte von 0,1/100 000 Einwohner im Zeitraum 1993 - 2000 und auf 0,26/100 000 Einwohner im Zeitraum 2001 - 2005 angestiegen ist, was auf eine Zunahme der Fuchspopulation in der Schweiz zurückgeführt wird<sup>43</sup>.

#### Verlauf

Menschen infizieren sich mit *E. multilocularis* durch die versehentliche orale Aufnahme der Eier des Fuchsbandwurms, die durch einen infizierten Endwirt freigesetzt werden. Metazestoden entwickeln sich bei einer Infektion in 99% der Fälle primär in der Leber und expandieren im fortgeschrittenen Stadium in andere Organe und Gewebe<sup>5,13</sup>. Charakteristisch für die Alveoläre Echinokokkose ist eine asymptomatische Inkubationszeit von 5 - 15 Jahren mit einem darauffolgenden chronisch - progressiven Verlauf. In dieser progressiven Phase können Symptome wie abdominaler Schmerz und Gelbsucht sowie allgemeine Beschwerden wie Müdigkeit, Gewichtsverlust, anormale Laborbefunde und manchmal Fieber auftreten<sup>4,13</sup>. Im weiteren Verlauf kommt es beim Erkrankten zu einer schweren Dysfunktion der Leber, die oft auch in Verbindung mit portaler Hypertonie auftritt<sup>4</sup>. Durch die hohe Raumforderung und das infiltrative Wachstum in das umliegende Gewebe kommt es im Laufe der Infektion zu einem Funktionsverlust der betroffenen Organe<sup>5</sup>. Hepatische Läsionen sind oft fibrös und können in späten Stadien nekrotisch werden. Oft sind Kalzifizierungszonen um das Parasitengewebe vorhanden. Superinfektionen der Läsionen mit Bakterien sind ebenfalls möglich<sup>4,44</sup>. Falsch oder unbehandelt sterben innerhalb von 10 Jahren nach der Diagnose 94% der Erkrankten<sup>13</sup>. Allerdings wird angenommen, dass nur 0,1% der Personen, die mit Eiern von *E. multilocularis* in Berührung kommen, eine AE entwickeln<sup>33,44</sup>. Auch wurde bereits von Spontanheilungen berichtet, die zu kalzifizierten Läsionen führen<sup>44-45</sup>. Risikofaktoren für eine Infektion sind der Besitz von jagenden oder freilaufenden Hunden, Landwirtschaft sowie die Arbeit in einem landwirtschaftlichen Betrieb<sup>46</sup>.

## Diagnose

Die Diagnostik der humanen AE beruht auf klinischen und epidemiologischen Daten, bildgebenden Verfahren und der Morphologie von Läsionen sowie auf histopathologischen Daten, RT-PCR und der Serologie. Die primäre Diagnostik bedient sich dabei Ultraschall - Untersuchungen, die auch bei Massen-Screenings durchgeführt werden<sup>28,47</sup>. Computertomografie wird dagegen zur Spezifizierung kalzifizierter Läsionen hinsichtlich Anzahl, Größe und Lokalisation eingesetzt, während Magnetresonanztomografie bei unklaren Fällen ohne Kalzifizierung und zur Untersuchung benachbarter Strukturen zum Einsatz kommt<sup>47-48</sup>. Mit Hilfe der PAS - Reaktion (Periodic acid - Schiff reaction) kann die Laminatschicht von *E. multilocularis* Metazestoden nachgewiesen werden<sup>47</sup>. Die Identifikation des Fuchsbandwurms durch RT-PCR nach einer Leberbiopsie wurde ebenfalls beschrieben<sup>47,49</sup>. Immundiagnostische Tests werden zur Bestätigung der Befunde eingesetzt. Eine hohe Sensitivität (90 - 100%) bei gleichzeitiger hoher Spezifität (95 - 100%) erlaubt dabei der Einsatz von aufgereinigten oder rekombinant produzierten *E. multilocularis* Antigenen, wie Em2, Em2+, Em10 und Em18<sup>13,47</sup>. Die Kombination aus Positronen-Emissions-Tomografie und Computertomografie (PET-CT) wird zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität und der Streuung des Parasitengewebes eingesetzt. Zusätzlich kann diese Technik Aufschluss über die Effizienz einer Chemotherapie geben<sup>48</sup>.

## Therapie

Bis heute ist die gründliche operative Entfernung des infizierten Gewebes in einem frühen Stadium die Basis zur Heilung einer AE<sup>47,50</sup>. Dabei muss die Möglichkeit der Resektion des betroffenen Gewebes sorgfältig durch präoperative Techniken geklärt werden<sup>4</sup>. In späteren Stadien der AE kann aufgrund der Ausbreitung der Infektion auf lebensnotwendige Gebiete eine solche Resektion nur in 20 - 40% der Fälle durchgeführt werden<sup>51</sup>. Teilresektionen und Lebertransplantationen haben sich als Alternative dagegen nicht bewährt<sup>51-53</sup>. Bei einer erfolgreichen operativen Entfernung des infizierten Gewebes wird eine daran anschließende mindestens zweijährige Chemotherapie mit Benzimidazolen (BMZ) empfohlen, bei inoperablen Fällen ist eine jahre- bis lebenslange Medikation notwendig<sup>4,47</sup>. Durch diese Behandlung ist die Rate der Überlebenden im Zeitraum von 10 Jahren nach Diagnose einer AE auf 80 - 83% gestiegen und ein Wiederaufflammen der Krankheit bei operierten Patienten konnte so verhindert werden<sup>54-55</sup>. Trotzdem werden regelmäßige Kontrollen in einem Zeitraum von mindestens 10 Jahren nach der Resektion empfohlen<sup>47</sup>.

Die gängigsten parasitostatischen Chemotherapeutika aus der Gruppe der BMZ sind Albendazol (ABZ) und Mebendazol (MBZ), die beide an Tubulin binden und damit den

Aufbau der Mikrotubuli von *E. multilocularis* inhibieren<sup>56</sup>. Schwierigkeiten mit ABZ und MBZ ergeben sich durch individuelle Variationen in der Pharmakokinetik der Patienten, was eine regelmäßige Überwachung der ABZ-Sulphoxid und MBZ Plasmaspiegel notwendig macht um die Patienten optimal einstellen zu können und toxischen Reaktionen vorzubeugen<sup>45</sup>. Bei Unverträglichkeiten gegen BMZ wurde bei einigen Patienten bereits auf Amphotericin B zurückgegriffen, wodurch die Membranstruktur von *E. multilocularis* destabilisiert wird<sup>57-58</sup>. Das Breitspektrum - Antiparasitikum Nitazoxanide konnte nach vielversprechenden Versuchen im Mausmodell in darauffolgenden Pilotstudien bisher nicht überzeugen<sup>59-60</sup>. Die Liste potentieller neuer Wirkstoffe mit nachgewiesener *in vivo* Aktivität gegen *E. multilocularis* umfasst neben Doxorubicin (in Verbindung mit einem kolloidalen Carrier), Mytomicin C, Piperazin und Quinolon - Derivaten auch Alkylaminoether, Propargylalkohole, Flubendazol sowie Isoprinosin und dessen Derivate<sup>61-63</sup>. Nichtsdestotrotz konnten bisher keine Wirkstoffe mit parasitozider Wirkung identifiziert werden, was die Etablierung neuer Techniken zum Screening potentieller Wirkstoffkandidaten gegen *E. multilocularis* nötig macht<sup>56</sup>.

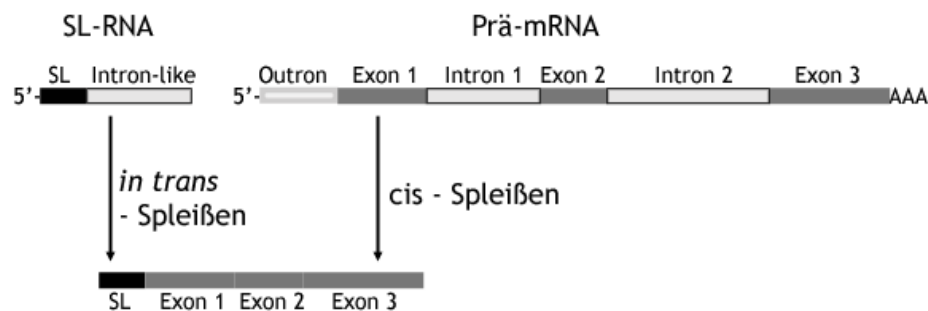
### 3.2.E. *multilocularis* und die Molekularbiologie

#### 3.2.1. Erste molekularbiologische Untersuchungen

Bereits 1855 beschrieb Rudolf Virchow mit detaillierten histopathologischen und makroskopischen Untersuchungen den klinischen Verlauf der Alveolären Echinokokkose und identifizierte das Larvenstadium von *E. multilocularis* als Erreger dieser schweren Parasitose des Menschen<sup>64</sup>. Die Biochemie und Genetik des Fuchsbandwurms war allerdings bis in die neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts wenig erforscht. Frühe Arbeiten befassten sich mit der Zusammensetzung der Hydatidenflüssigkeit (1971<sup>65</sup>) und der Identifikation und Isolierung von Antigenen wie Em2 (1989<sup>66</sup>), Em10 (1991<sup>67</sup>), Em13 (1993<sup>68</sup>) und Em16 (1995<sup>69</sup>), die in der Serodiagnostik der AE eingesetzt werden konnten. Em10 (auch EmEIp) wurde in funktionellen Studien als Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) - Homolog identifiziert und konnte dem ersten charakterisierten chromosomalen Locus von *E. multilocularis* zugeordnet werden<sup>70-71</sup>. Eine weitere wichtige molekularbiologische Arbeit stellt der Nachweis von *in trans* - gespleißten mRNAs in *E. multilocularis* dar<sup>72</sup>. Dabei werden, im Unterschied zum konventionellen Spleißen innerhalb einer mRNA, Transkripte verschiedener mRNAs fusioniert. So kommt es typischerweise zur Fusion eines sogenannten Spliced -Leaders, eines kurzen Exons einer nicht polyadenylierten nukleären RNA (SL-RNA), mit dem 5' gelegenen Intron einer Prä - mRNA (vgl. Abb. 3). Dieser Prozess wurde ursprünglich bei *Trypanosoma brucei* entdeckt, wo alle Transkripte die gleiche Sequenz am 5' Ende der mRNAs aufwiesen<sup>73</sup>. Bei *E. multilocularis* beschränkt sich der Anteil der *in trans* gespleißten Transkripte



dagegen auf 30%<sup>72</sup>. In der Gruppe der Cestodea wurde dieser Mechanismus in späteren Studien auch bei *E. granulosus* und *Taenia solium* nachgewiesen<sup>74-75</sup>. Die Funktion von *in trans* - Spleißen ist bis heute nicht abschließend geklärt, wobei dieser Mechanismus durch seine Beschränkung auf niedrigere Eukaryoten eine vielversprechenden Möglichkeit zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bietet<sup>76-77</sup>. Zusätzlich lässt sich der Mechanismus des *in trans* - Spleißens für molekularbiologische Arbeiten ausnutzen, wie der Durchführung von Spliced - Leader Differential Displays oder der Erstellung von hochwertigen Spliced - Leader cDNA Bibliotheken<sup>74,78</sup>.



**Abb. 3: Mechanismus von cis- und *in trans* - Spleißen.**

Beim *in trans* - Spleißen wird der Spliced - Leader (SL) einer SL-RNA mit dem 5'-terminalen Exon einer Prä-mRNA fusioniert. Dabei werden der 3' Bereich der SL-RNA (Intron-like) sowie das Outron der Prä-mRNA (5'-terminales Intron ohne 5' Spleißstelle) entfernt. Alle anderen Introns der Prä - mRNA werden durch cis - Spleißen prozessiert.

### 3.2.2. *In vitro* Kultivierung von *E. multilocularis*

Bereits seit 1995 sind *in vitro* Kulturtechniken für das Metazestodenstadium von *E. multilocularis* bekannt, allerdings konnten in diesen Kultursystemen nur geringe Mengen an Metazestoden produziert werden und die Möglichkeiten der Erforschung dieses wichtigen Larvenstadiums waren beschränkt<sup>21,79-80</sup>. In den letzten Jahren wurde die Produktion großer Mengen Metazestoden durch die Entwicklung einer large-scale Flüssigkultur möglich, die auf der Ko-Kultivierung von homogenisiertem Metazestodenmaterial und Reuber H35 Hepatomazellen basiert<sup>80-81</sup>. Dabei haben die Fütterzellen (Reuber H35 Hepatomazellen) eine wichtige Funktion bei der Entfernung von Komponenten, die auf Metazestoden toxisch wirken wie z. Bsp. Sauerstoffradikale. Eine Weiterentwicklung dieses Kultivierungssystems stellt die axenische Kultivierung von *E. multilocularis* Metazestoden dar. Dabei werden Metazestoden aus der large-scale Flüssigkultur über einen Zeitraum von einer Woche in definiertem konditioniertem Medium an reduzierende und anaerobe Bedingungen adaptiert, wobei verbliebene Fütterzellen entfernt werden. Konditioniertes Medium auf Basis von Reuber H35 Hepatomazellen bietet in diesem System die optimalen Bedingungen für die Entwicklung der Metazestoden und heben den Einfluss sekretierter Wirtsfaktoren auf die Vitalität, das Wachstum, die Differenzierung und Proliferation der Metazestoden hervor. Zudem wurde mit diesem System eine Möglichkeit geschaffen, die Auswirkungen verschiedener

definierter Wirtsfaktoren oder Inhibitoren auf *E. multilocularis* ohne störende indirekte Effekte durch Fütterzellen zu studieren<sup>81-82</sup>. Allerdings sind mit den bis hierher aufgeführten *in vitro* Kultivierungssystemen nur Untersuchungen bereits etablierter Metazestoden möglich, wohingegen die Entwicklungen beim Übergang von Onkosphäre zum Metazestodenstadium sowie bei der Etablierung von *E. multilocularis* in weiter entfernten Organen während der Alveolären Echinokokkose nicht erfasst werden können. Nach derzeitigem Kenntnisstand spielen bei diesen Vorgängen pluripotente Stammzellen (Neoblasten) aus *E. multilocularis* eine entscheidende Rolle<sup>80-81,83</sup>. Studien an diesem Zelltyp bzw. bezüglich der frühen Entwicklungen bei der Metazestodenbildung können mit Hilfe einer von Spiliotis *et al.* entwickelten Technik zur wirtszellfreien Kultivierung von *E. multilocularis* Stammzellen durchgeführt werden<sup>80-81</sup>. Diese Methode basiert auf axenischen Metazestoden, deren Zellen vereinzelt und anschließend als Primärzellkultur entweder in einem trans-well System räumlich getrennt von Reuber H35 Hepatomazellen als Ko-Kultur oder im axenischen System frei von Fütterzellen kultiviert werden. Dabei können die Primärzellen für einen begrenzten Zeitraum (z. Bsp. im Rahmen von Regenerationsversuchen) auch problemlos von der Ko-Kultur in die wirtszellfreie Kultivierung überführt werden. Die Entwicklung der Stammzellen bis hin zu frei schwimmenden Metazestoden dauert dabei in Abhängigkeit von Isolat und Kultivierungssystem durchschnittlich 2 - 8 Wochen. Mittlerweile wurde auch ein Protokoll zur Primärzellkultivierung veröffentlicht, das auf Metazestoden aus der Ko-Kultivierung basiert und Vorteile beim experimentellen Gen-Knockdown durch RNA-Interferenz bietet (siehe auch 3.2.4)<sup>84</sup>.

Einfacher ist dagegen die Kultivierung von *E. multilocularis* Protoskolizes, die direkt aus *in vivo* herangezogenem Parasitenmaterial isoliert werden und über mehrere Wochen *in vitro* kultiviert werden können. Auf diese Weise kann man die Auswirkungen verschiedener definierter Wirtsfaktoren oder Inhibitoren auch an diesem Stadium von *E. multilocularis* untersuchen.

### 3.2.3. Wirt - Parasit Interaktionen über konservierte Signalsysteme

Vor allem durch die in Kapitel 3.2.2 aufgeführten Möglichkeiten der einfachen *in vitro* Kultivierung wurde *E. multilocularis* zu einem Modellorganismus für experimentelle Studien im Zusammenhang mit der larvalen Entwicklung von Cestoden und den damit verbundenen Wirt - Parasit Interaktionen. Als Basis solcher Interaktionen zwischen multizellulären Organismen spielen evolutionär hoch konservierte Zell - Zell Signalsysteme, die unter anderem das Signaling durch Proteohormone und Zytokine umfassen, eine entscheidende Rolle. Die Komponenten dieser Signalsysteme unterschiedlicher Gruppen der Animalia sind dabei nicht nur strukturell miteinander

verwandt, sondern *in vitro* auch untereinander ersetzbar<sup>85-88</sup>. So konnten auch bei *E. multilocularis* bereits verschiedene solcher Signalsysteme identifiziert werden, die mit humanen Zytokinen interagieren wie z. Bsp. Komponenten von Insulin und Insulin-like Growth Factor (IGF) Signaling<sup>89-90</sup>, Epidermal Growth Factor (EGF) Signaling<sup>88,91-93</sup> und Faktoren des zweigeteilten Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) / Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling<sup>90,94-97</sup>. Zudem konnten *in vitro* deutliche Auswirkungen von humanem Insulin auf die Entwicklung von *E. multilocularis* gezeigt werden<sup>98</sup>. Diese Untersuchungen haben gemeinsam mit ähnlichen Studien in anderen Helminthen die These der hormoneller Wirt - Parasit Kreuz - Kommunikation unterstützt, die auf der Möglichkeit einer wechselseitigen Interaktion von Hormonen und Signalsystemen von Wirt und Parasit während entsprechender Infektionen basiert<sup>99</sup>. Auf Grundlage dieser These lassen sich die ortsgebundene Entwicklung von *E. multilocularis* sowie die Abhängigkeit von Fütterzellen in der *in vitro* Kultivierung (vgl. 3.2.2) ebenso erklären wie Modulationen des humanen Immunsystems und der Physiologie<sup>87,100-104</sup>. So liegen humane BMPs als Regulatoren der extrazellulären Matrix - Produktion, bei der Regeneration und Eisen Homöostase regulär in der Leber vor<sup>105-108</sup>. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  und verwandte Zytokine wie Activin und Inhibin in der unmittelbaren Umgebung aktiver *E. multilocularis* Zellen durch den Wirt sekretiert werden<sup>109</sup>. Auch EGF wird während der Regeneration von Hepatozyten sekretiert und die höchsten Insulinkonzentrationen werden beim Menschen im Übergangsbereich von Leberpfortader zum Leberparenchym gemessen<sup>110-111</sup>. All diese Zytokine können damit während einer Alveolären Echinokokkose in direkten Kontakt mit Parasitengewebe von *E. multilocularis* kommen und die Entwicklung des Parasiten über die oben genannten Signalsysteme beeinflussen.

Auf der anderen Seite konnten bereits ein BMP sowie ein Insulin Homolog in *E. multilocularis* identifiziert werden, EmBMP1 bzw. Emlns, die mit Rezeptoren des humanen zellulären Signaling - Apparates interagieren könnten und damit einen Einfluss vom Parasiten auf den Wirt ermöglichen<sup>90,95</sup>.

### 3.2.4. Sequenzierungsprojekte und genetische Manipulation

#### *E. multilocularis* - Sequenzierungsprojekte

Bereits 2002 wurde von Fernandez et al. für *E. multilocularis* und *E. granulosus* ein Expressed Sequence Tag (EST) - Sequenzierungsprojekt von sowohl *in trans*- als auch *cis*-gespleißten Transkripten durchgeführt, was die molekulare Erforschung dieser Parasiten bereits erheblich erleichterte<sup>74</sup>.

Im Rahmen der Etablierung von *E. multilocularis* als Modellorganismus für die Gruppe der Cestoda wurde 2004 in einer Kooperation der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus

Brehm (Universität Würzburg) und der Parasite Sequencing Unit des Wellcome Trust Sanger Instituts (Hinxton, Cambridge, GB) ein Genomsequenzierungsprojekt initiiert. Nach der Bestimmung der Genomgröße durch Durchflusszytometrie wurde eine erste Runde Kapillarsequenzierung durchgeführt, die zu einer 4-fach Coverage des Genoms führte. Anschließend wurde diese Coverage in zusätzlichen Sequenzierungen mit Hilfe neuester Hochdurchsatz - Sequenzieretechniken (Roche/454 und Illumina/Solexa) auf das ca. 140-fache erhöht und die Sequenzdaten sind derzeit in Form von 1841 Contigs und 597 Supercontigs unter [www.sanger.ac.uk/Projects/Echinococcus](http://www.sanger.ac.uk/Projects/Echinococcus) öffentlich zugänglich<sup>90</sup>. Die Publikation des vollständig annotierten Genoms von *E. multilocularis* wird nach Angaben des Wellcome Trust Sanger Instituts in Kürze erwartet. Dieses Projekt dient in Bezug auf *E. multilocularis* als Basis zur Untersuchung weiterführender entwicklungsrelevanter und immunbiologischer Fragestellungen sowie als Grundlage des Drug Design<sup>90</sup>. Weiterhin ist laut Wellcome Trust Sanger Institut mit Hilfe komparativer Genomik die Assemblierung und Annotation von Genom - Sequenzdaten verwandter Organismen wie *E. granulosus* und *Hymenolepis microstoma* anhand des Referenzgenoms von *E. multilocularis* geplant.

Ein weiteres laufendes Sequenzierungsprojekt befasst sich mit dem Transkriptom verschiedener *E. multilocularis* Larvenstadien. So liegen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Brehm (Universität Würzburg) bereits erste Transkriptomdaten junger und ausgereifter Metazestoden (mit und ohne Brutkapseln) sowie aktivierter und nicht - aktivierter Protoskolizes vor. Zudem wird die Ausweitung dieses Projekts auf Onkosphären und adulte Würmer bereits diskutiert<sup>90</sup>. Damit könnte die Expression entwicklungsbiologisch interessanter stadienspezifischer Gene in allen Stadien des Lebenszyklus von *E. multilocularis* untersucht werden.

#### *E. multilocularis* - Genetische Manipulation

Um die Informationen des Genomsequenzierungsprojekts von *E. multilocularis* effizient und vollständig nutzen zu können, ist es notwendig, robuste und verlässliche Methoden zur gezielten genetischen Manipulation zu entwickeln<sup>90</sup>. Erste Erfolge konnten 2008 von Spiliotis et al. durch die transiente Transfektion von *E. multilocularis* Primärzellen mit Hilfe von Lipofectin und *Listeria monocytogenes* berichtet werden<sup>112</sup>. Erst kürzlich wurden erste Protokolle zur genetischen Manipulation von *E. multilocularis* Primärzellen und Protoskolizes mit Hilfe von RNAi veröffentlicht, die allerdings erst nach Abschluss des praktischen Teils der vorliegenden Arbeit bekannt wurden, so dass diese Methodik hier nicht angewandt wurde<sup>84,113</sup>. Dieses Verfahren lässt allerdings, in Verbindung mit dem bereits etablierten *in vitro* Kultursystem, die Entwicklung vollkommen transgener *E. multilocularis* Stämme in greifbare Nähe rücken und markiert damit einen Meilenstein in der molekularbiologischen Erforschung von *E. multilocularis*.

### 3.3. TGF- $\beta$ / BMP Signaling - das Modell und die Situation in *E. multilocularis*

Als hochkonserviertes System interzellulärer Kommunikation bei Metazoen wurden die Funktionen von TGF- $\beta$  / BMP Signaling im Rahmen der Evolution anatomisch komplexer Organismen, der Anpassung an neue Lebensräume und der Entwicklung eines aktiven Immunsystems immer vielseitiger und TGF- $\beta$  / BMP Signaling gilt mittlerweile als eines der fundamentalen Signaltransduktionssysteme multizellulärer Organismen<sup>114</sup>. Dabei werden ihm wichtige Funktionen bei der Entwicklung, Organogenese, Kontrolle von Stammzellen sowie bei der Immunantwort und bei Krebs zugesprochen<sup>115-118</sup>. Auf zellulärer Ebene reguliert TGF- $\beta$  / BMP Signaling im entwicklungsbiologischen Zusammenhang und Zelltyp - spezifisch das Wachstum, die Differenzierung, die Adhäsion, die Migration und den Zelltod einzelner Zellen<sup>119</sup>. Störungen in diesem Signalsystem assoziieren Experten mit einer Vielzahl von Krankheiten, die von Autoimmunerkrankungen über Kardiovaskuläre Störungen bis Krebs reichen<sup>120-121</sup>. In *E. multilocularis* deuteten erste vorläufige Daten auf einen Zusammenhang zwischen BMP Signaling und der Differenzierung von Metazestoden zu Protoskolizes hin<sup>98</sup>.

#### 3.3.1. Übersicht TGF- $\beta$ / BMP Signaling

Die Signaltransduktion über TGF- $\beta$  / BMP Signaling erfolgt durch Bindung eines Liganden (Zytokin) an seine zugehörigen Oberflächenrezeptoren (TGF- $\beta$  / BMP Rezeptor Typ I und Typ II), wobei jeweils zwei Typ I und Typ II Rezeptoren zusammen mit einem Liganden-Homodimer einen hetero-tetrameren Komplex ausbilden, der die Phosphorylierung und damit Aktivierung des Typ I Rezeptors durch den Typ II Rezeptor ermöglicht<sup>115</sup>. Der aktivierte Typ I Rezeptor wiederum rekrutiert, phosphoryliert und aktiviert intrazelluläre Signaltransduktoren, receptor-regulated Smads (R-Smads), die wiederum nach einer Komplexbildung mit einem common-mediator Smad (Co-Smad) in den Nukleus der Zelle wandern und dort mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren die Genaktivität regulieren<sup>117</sup>. Ebenso kann die Signalweiterleitung auch über Non-Smad Signaling erfolgen, allerdings wird auf diese Möglichkeit im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht weiter eingegangen<sup>122</sup>.

Das Signaling durch TGF- $\beta$  / Activin und BMP Zytokine gilt im Menschen als sehr spezifisch aufgetrennt in den TGF- $\beta$  Signalweg und BMP Signalweg, durch die jeweils nur bestimmte R-Smads aktiviert werden. So werden Smad2 und Smad3 wegen ihrer Aktivierung durch TGF- $\beta$ s und Activine der Gruppe der AR-Smads (auch Typ A R-Smads) zugeordnet, während Smad1, Smad5 und Smad8 aufgrund ihrer Aktivierung durch BMPs die Gruppe der BR-Smads (auch Typ B R-Smads) bilden<sup>123</sup>. Mittlerweile sind allerdings verschiedene Studien veröffentlicht worden, die unter verschiedenen Bedingungen auf

eine Vermischung dieser beiden Signalwege hinweisen<sup>124-128</sup>. Aber auch unter Einbezug dieser neuen Erkenntnisse bleiben die oben beschriebenen Hauptwege der TGF- $\beta$  und BMP Signalweiterleitung weiterhin allgemein anerkannt<sup>129</sup>.

TGF- $\beta$  / BMP Signaling wird über verschiedene extrazelluläre Antagonisten, wie z. Bsp. Follistatin (bindet an Activin) und Noggin (bindet an BMP) sowie intrazelluläre Mechanismen, wie z. Bsp. inhibitory Smads (I-Smads), transkriptionelle Kontrolle, Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der Signaltransduktionskomponenten und Ubiquitylierung, reguliert<sup>119,130</sup>.

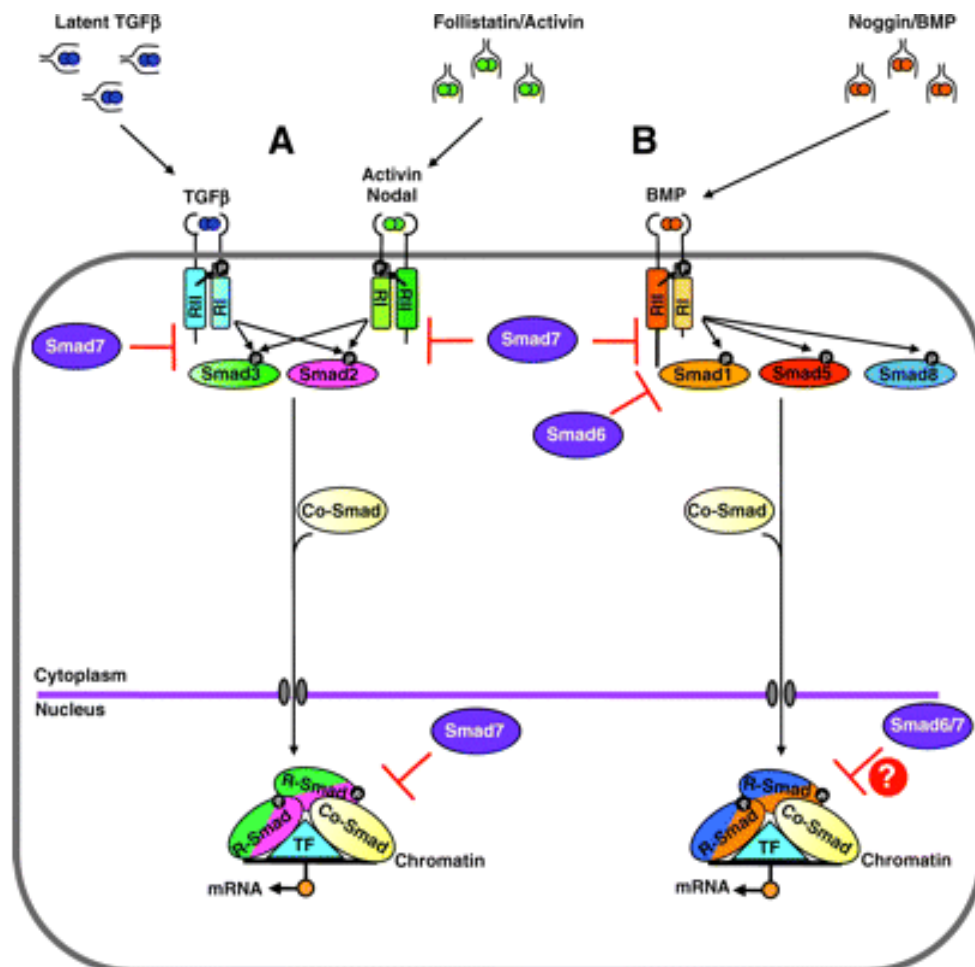


Abb. 4: Smad Signaling in *Homo sapiens* nach Moustakas et al.<sup>119</sup>

Gezeigt sind A: der TGF- $\beta$  und Activin / Nodal Signalweg sowie B: der BMP Signalweg inklusive der zugehörigen Smads (R-Smads: Smad1, 5, 8 bzw. Smad2, 3 sowie Co-Smad) und Mechanismen der Inhibition durch I-Smads (Smad6/7). Latente TGF- $\beta$  Komplexe und die extrazelluläre Antagonisten Follistatin (bindet an Activin) und Noggin (bindet an BMP) sind ebenso dargestellt wie die Typ I (RI) sowie Typ II (RII) Rezeptoren der einzelnen Signalwege. Die nukleären Smad Komplexe zur spezifischen Genregulation sind für jeden Signalweg gezeigt. Diese Komplexe bestehen zumeist aus zwei identischen oder verschiedenen R-Smads und einem Co-Smad. Zusätzlich zu den hier gezeigten Hauptsignalwegen ist die Aktivierung von BMP R-Smads durch TGF- $\beta$  ebenfalls bekannt. BMP (bone morphogenetic protein), TGF $\beta$  (transforming growth factor B), TF (transcription factor)<sup>119</sup>.

### 3.3.2. TGF- $\beta$ / BMP Zytokine und Antagonisten

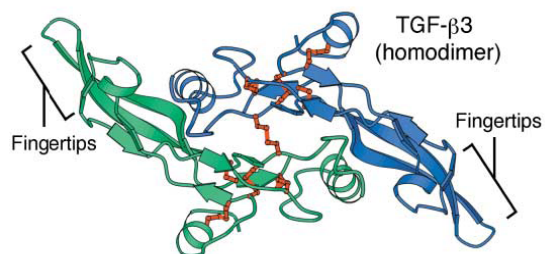
#### TGF- $\beta$ / BMP Zytokine

Die Familie der humanen TGF- $\beta$  Superfamilie umfasst 33 Zytokine, die neben TGF- $\beta$  Faktoren auch BMPs und growth and differentiation factors (GDFs), Activine / Inhibine und weitere verschiedene Faktoren wie z. Bsp. Nodal beinhaltet<sup>119,131</sup>. Activine und Inhibine unterscheiden sich dabei in der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten. So sind Activine Homo- oder Heterodimere verwandter Inhibin  $\beta$ -Untereinheiten, während die heterodimeren Inhibine selbst aus jeweils einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammengesetzt sind<sup>132</sup>. Charakteristisch für alle Proteine der TGF- $\beta$  Superfamilie ist eine spezifische dreidimensionale Faltung, der cysteine knot, und eine konservierte Anzahl und Abfolge von Cysteinresten im aktiven Peptid<sup>133</sup>. Dabei zeigen die drei TGF- $\beta$  Isoformen sowie die damit verwandten Activine typischerweise neun konservierte Cysteine zur Ausbildung von Disulfidbrücken, wobei acht davon die vier intramolekularen Bindungen eingehen und eins zur Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke (zur Homodimerisierung) verwendet wird (Abb. 5). Inhibin  $\alpha$ -Untereinheiten, BMPs und GDFs haben nur sieben konservierte Cysteine im aktiven Peptid, von denen sechs intramolekulare und eins intermolekulare Disulfidbrücken (zur Homodimerisierung) ausbilden. Wenige Ausnahmen wie z. Bsp. GDF-9 und BMP15A enthalten nur sechs Cysteine, die ausschließlich intramolekulare Bindungen eingehen.

Die Faktoren der TGF- $\beta$  Superfamilie umfassen eine Vielzahl von Funktionen. So beeinflussen BMPs und GDFs vor allem die frühe Embryonalentwicklung (Dorsoventralachse, Gewebedifferenzierung), Organogenese, Gastrulation und Gametogenese sowie die Knochen- und Knorpelbildung<sup>129,134</sup>. BMP7 wird zusätzlich als unterstützender Faktor mit Regenerationsprozessen in der Leber in Verbindung gebracht<sup>108</sup>. Activine und Inhibine spielen eine Rolle bei Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose, Metabolismus und Homöostase, Immunantwort, Wundheilung und endokrinen Funktionen bzw. Krebs<sup>135-138</sup>. TGF- $\beta$  Faktoren werden wiederum unter anderem mit Hämatopoese, Vaskulogenese und Angiogenese, der Regeneration von Gewebe sowie der Produktion und Sekretion von Proteinen der extrazellulären Matrix in Verbindung gebracht und vor allem TGF- $\beta$ 1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Funktion des Immunsystems, wo es vor allem immunsuppressive und anti-inflammatorische Aktivitäten zeigt<sup>131,139-140</sup>.

Die Zytokine der TGF- $\beta$  Familie werden als Präproteine mit einer längeren N-terminalen Prodomäne (auch Propeptid) und einem kürzeren C-terminalen aktiven Peptid synthetisiert<sup>140</sup>. Intermolekulare Disulfidbrücken zwischen konservierten Cysteinresten in der Prodomäne und im aktiven Peptid sowie hydrophobe Wechselwirkungen stabilisieren dabei die Dimerisierung dieser Präproteine im small

latent complex (SLC)<sup>119,141-142</sup>. Der SLC erlaubt im Laufe der Sekretierung wiederum die Spaltung des Präproteins durch spezifische Furin-like Proteasen (Faktoren der subtilisin-like proprotein convertase (SPC) family) in aktives Peptid und Propeptid<sup>143-144</sup>. Dabei bleibt das aktive Peptid aber durch die nicht kovalenten Bindungen mit dem Propeptid, dem latency-associated peptide (LAP), assoziiert, wobei dieses LAP dem aktiven Peptid während der Exozytose als Gerüst und Chaperone dient<sup>119,145-146</sup>. Zusätzlich interagiert das LAP mit latent TGF- $\beta$  binding proteins (LTBPs) und bildet auf diese Weise den sogenannten large latent complex (LLC), der schließlich von der Zelle sekretiert wird<sup>147-148</sup>. Extrazellulär trägt das LAP zur Latenz des assoziierten aktiven Peptids bei, indem es die Bindungsstelle des aktiven Peptids an die entsprechenden Rezeptoren blockiert<sup>149-150</sup>. Die Affinität von aktivem Peptid zum LAP ist allerdings nur bei TGF- $\beta$  1, - $\beta$  2, - $\beta$  3, Myostatin (GDF-8) und GDF-11 hoch genug, um dem aktiven Peptid Latenz zu verleihen, während bei allen anderen Faktoren der TGF- $\beta$  Superfamilie die Affinität zum Rezeptor höher als zum Propeptid ist<sup>150-155</sup>. Insbesondere in Bezug auf TGF- $\beta$  Zytokine, für die bisher kein zusätzlicher sekretierter Antagonist identifiziert werden konnte, ist das LAP der wichtigste Faktor bei der extrazellulären Regulation von TGF- $\beta$  Signaling<sup>141</sup>. Bei den anderen Faktoren der TGF- $\beta$  Superfamilie hat das Propeptid generell Einfluss auf die Stabilität und Prozessierung sowie Degradation des Liganden, womit die Verfügbarkeit des Zytokins reguliert wird<sup>156-158</sup>. Zusätzlich interagieren die LTBPs bzw. Propeptide des LLC mit extrazellulären Proteinen wie Fibrillin 1 und Fibronectin und ermöglichen damit die Anlagerung des aktiven Peptids an die extrazelluläre Matrix<sup>119,159-162</sup>. Die Freisetzung des aktiven Peptids aus TGF- $\beta$  LLCs erfolgt in einem komplexen Mechanismus durch verschiedene Aktivatoren wie Thrombospondin-1 und Integrine<sup>163-166</sup>, Proteasen wie Elastase oder Plasmin<sup>167-168</sup> und BMP-like matrix metalloproteases wie MMP2<sup>169</sup>, so dass die Interaktion zwischen aktivem Peptid und Rezeptor schließlich ermöglicht wird.



**Abb. 5: Struktur eines repräsentativen TGF- $\beta$  Zytokins, TGF- $\beta$  3.**

Dargestellt ist ein TGF- $\beta$  3 Homodimer. Die monomeren Formen sind in grün bzw. blau dargestellt, während intra- und intermolekulare Disulfidbrücken in rot gezeigt sind.

Außer beim Menschen sind Zytokine der TGF- $\beta$  Superfamilie auch bei verschiedenen anderen Metazoen bekannt. So finden sich bei *Drosophila melanogaster* sieben Zytokine der TGF- $\beta$  Superfamilie, die sowohl BMP Homologe (z. Bsp. DmDpp) als auch Activin Homologe (z. Bsp. DmDawdle) und TGF- $\beta$  Homologe (z. Bsp. DmMyoglianin) umfassen<sup>119,131</sup>. In *Caenorhabditis elegans* regulieren CeDBL-1 als BMP Homolog und



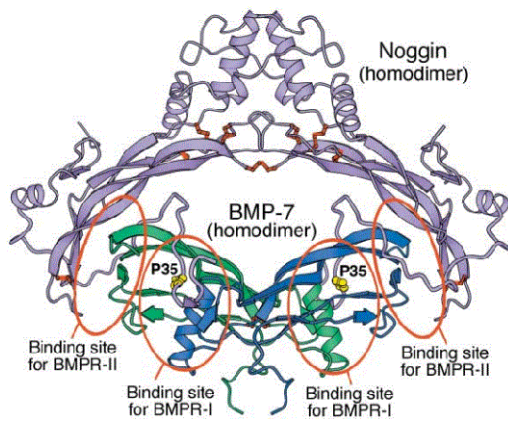
CeDAF-7 als TGF- $\beta$  Homolog die Körperlänge und die Entwicklung des Dauer - Stadiums, während die Funktionen der drei weiteren identifizierten Liganden, CeTIG-2, CeTIG-3 und CeUNC-129 bisher unbekannt sind<sup>119,170</sup>. Bei *Schistosoma mansoni* konnten bereits ein BMP Homolog (SmBMP), mit potentiellen Funktionen in Verbindung mit den Protonephridien männlicher adulter Würmer, und auch ein Activin A Homolog (SmInAct), dass unter anderem eine wichtige Rolle bei der Embryogenese spielt, identifiziert und charakterisiert werden<sup>171-172</sup>. Im Genom von *Brugia malayi* konnten ebenfalls jeweils ein BMP und ein TGF- $\beta$  Homolog identifiziert werden, BmTgh-1 und BmTgh-2<sup>173-174</sup>. In *E. multilocularis* wurde 2005 mit drei Isoformen das erste BMP Homolog bekannt, EmBMP1<sup>95</sup>.

Mit wenigen Ausnahmen werden die Zytokine der TGF- $\beta$  Familie im extrazellulären Raum durch Bindung von spezifischen Antagonisten inaktiviert. So werden Activine durch Follistatin inhibiert und auch für BMPs sind verschiedene Antagonisten wie Chordin und Noggin bekannt (siehe nächster Abschnitt)<sup>175-179</sup>.

### BMP Antagonisten

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, umfassen die BMP Antagonisten verschiedene sekretierte inhibitorische Proteine wie Noggin, Gremlin, Cerberus, Twisted gastrulation, Chordin und Crossveinless, wobei hier nur auf Noggin näher eingegangen wird<sup>180</sup>.

Humanes Noggin setzt sich aus einer N-terminalen Region mit vielen sauren Aminosäuren und einer Cystein - reichen C-terminalen Domäne (neun Cysteine) zusammen<sup>181</sup>. Es wird nach der Abspaltung des Signalpeptids als glykosyliertes Homodimer sekretiert, dessen Untereinheiten kovalent miteinander verbunden sind<sup>181</sup>. Dabei interagiert die N-terminale Region (clip segment) direkt mit BMP, während der C-Terminus den typischen 12-membered cysteine knot (10-membered ring) ausbildet, der essentiell für die Funktion und Stabilität des Proteins ist<sup>181-182</sup>. Mit Hilfe dieser Faltung, die BMP wie eine Klammer umfasst, werden Epitope von BMP blockiert, die zur Interaktion dieses Liganden mit den entsprechenden Rezeptoren notwendig sind (Abb. 6)<sup>180-181</sup>. Mit Hilfe eines zentralen basischen Bereichs kann Noggin zusätzlich mit Heparin interagieren und wird an der Zelloberfläche angelagert<sup>183</sup>.



**Abb. 6: Struktur eines Noggin - BMP7 Komplexes.**

Dargestellt ist die Struktur eines Proteinkomplexes bestehend aus einem Noggin Homodimer (lila) und einem BMP7 Homodimer (blau / grün), wobei die N-terminalen Bereiche von Noggin mit den Rezeptor - Bindungsstellen von BMP7 interagieren (rot eingekreist). Dabei blockiert Pro<sub>35</sub> von Noggin (gelb) die hydrophobe Tasche von BMP7, die für die Interaktion mit Phe<sub>85</sub> des BMP Typ I Rezeptors notwendig ist<sup>181,184</sup>.

Als spezifischer BMP Antagonist werden Fehlfunktionen von Noggin auch mit humanen Erkrankungen wie Multiples Synostoses Syndrom und Brachydaktylie in Verbindung gebracht<sup>185-187</sup>. Eine mögliche Funktion von Noggin im Rahmen von Krebserkrankungen und der Angiogenese wird derzeit kontrovers diskutiert<sup>180</sup>. Außerdem hat Noggin zusammen mit Chordin durch den Aufbau eines Antagonisten - BMP Konzentrationsgradienten während der frühen Gastrulation entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Dorsoventralachse sowie die Skelettbildung<sup>176,188-190</sup>.

Außer in Vertebraten wurden Noggin Homologe auch in verschiedenen Invertebraten gefunden, wie *D. melanogaster* (DmTrk), *S. mansoni* (SmNoggin) und als Noggin-like sowie Noggin Gene auch in *Schmidtea mediterranea* (*smed-nlg1-8* bzw. *smed-nog1* und *smed-nog2*)<sup>191-193</sup>. Die Bezeichnung als Noggin-like wurde dabei auf eine 50-60 Aminosäuren große Insertion in der Mitte der C-terminalen Noggin Domäne zurückgeführt, die bereits vorher bei den entsprechenden Genen in *Dugesia japonica* identifiziert wurde<sup>194</sup>.

### 3.3.3. TGF- $\beta$ / BMP Rezeptoren

Die Rezeptoren des TGF- $\beta$  / BMP Signaling lassen sich in Typ I und Typ II Rezeptoren einteilen, wobei zur Signalweiterleitung eine Kombination beider Rezeptortypen in einem Heterotetramer und die Interaktion mit dem entsprechenden homodimeren Ligand notwendig sind<sup>115</sup>. Die Rezeptoren sind aus ca. 500 Aminosäuren aufgebaut und in extrazellulärer N-terminaler Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären C-terminale Serin / Threonin Kinase Domäne organisiert<sup>184,195</sup>. Beim humanen BMP Typ I Rezeptor Alk-3 zeigt die extrazelluläre Domäne genau wie bei den Activin Typ IIA und IIB (ACVR2A und ACVR2B) Rezeptoren und dem TGF- $\beta$  Typ II Rezeptor (TGFBR2) eine charakteristische Abfolge von Cysteinen, die zum typischen three-finger toxin fold führen, wobei jeder Finger durch ein Paar antiparalleler  $\beta$ -strands gebildet wird<sup>196-199</sup>. Typ I Rezeptoren enthalten zusätzlich direkt N-terminal der Kinase Domäne eine 30 Aminosäuren umfassende Glycin und Serin reiche Domäne

(GS Domäne) mit der charakteristischen Aminosäureabfolge SGSGSG (GS Box)<sup>115,195</sup>. Im Komplex mit einem Liganden phosphoryliert der konstitutiv aktive Typ II Rezeptor Serin- und Threoninreste innerhalb der GS Domäne, woraufhin der aktivierte Typ I Rezeptor das Signal durch die Phosphorylierung von R-Smads weiterleitet<sup>195,200</sup>. Direkt C-terminal der GS Domäne findet man mit dem Leucin - Prolin Motiv (LPLL-Motiv) oft eine Bindungsstelle für FKBP12. Dieses regulatorische intrazelluläre Immunophilin verhindert durch die Fixierung des Rezeptors in einer inaktiven Konformation die spontane Liganden - unabhängige Interaktion und Aktivierung von Typ I Rezeptoren durch Typ II Rezeptoren, was vermutlich aufgrund der intrinsischen Affinität der Rezeptoren zueinander zustande kommen kann<sup>201</sup>. Dabei interagiert FKBP12 im Komplex mit Alk-5 direkt mit den Aminosäuren L<sub>195</sub> und L<sub>196</sub>, während L<sub>193</sub> und P<sub>194</sub> essentiell für die Bindung und Funktion (Prolin - Rotamase Aktivität) von FKBP12 sind<sup>201-204</sup>. Bei Liganden - induzierten Interaktionen von Typ I und Typ II Rezeptoren dissoziiert FKBP12 vom Typ I Rezeptor, so dass eine Aktivierung des Typ I Rezeptors stattfinden kann<sup>201,205</sup>. Eine weitere wichtige regulatorische Aminosäure der GS Domäne führt in Folge einer gerichteten Mutation bei vielen Typ I Rezeptoren zu einer konstitutiven Aktivierung, was in der Erforschung dieses Signalsystems gerne ausgenutzt wird. Beim humanen Typ I Rezeptor Alk-5 ist diese Aminosäure Thr<sub>204</sub>, die aufgrund einer Mutation zu Aspartat (T<sub>204</sub>D) zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors<sup>206</sup>. Auch bei Alk-3 und dem *S. mansoni* TGF-β / BMP Typ I Rezeptor (SmRK1) führt eine Mutation an der entsprechenden Stelle (Alk-3: Q<sub>233</sub>D, SmRK1: Q<sub>303</sub>D) zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors<sup>207-208</sup>. Diese Mutationen sind jedoch nicht phosphomimetisch, da die entsprechenden Aminosäuren (Q und T) bei normaler Aktivierung nicht phosphoryliert werden. Es handelt sich folglich nicht um echt konstitutiv aktive Rezeptoren. Die Spezifität der Signalweiterleitung wird durch die Aminosäuren in Loop 45 innerhalb der C-terminalen Kinasedomäne der Typ I Rezeptoren festgelegt, die mit den Resten aus Loop 3 eines entsprechend geeigneten R-Smads interagieren (siehe nächster Abschnitt und Abb. 8)<sup>209-210</sup>.

### Nomenklatur

Die humanen TGF-β / BMP Typ I Rezeptoren tragen meist mehrere unterschiedliche Bezeichnungen, die sich auf die jeweiligen Liganden beziehen (Abb. 7). In der vorliegenden Arbeit werden allerdings die neutralen Bezeichnungen als Alk (activin-like kinase receptor) verwendet.

In *H. sapiens* findet man die TGF-β / BMP Typ I Rezeptoren Alk-1 bis Alk-7, die wiederum in die Subgruppen Alk-1, Alk-2 und Alk-5 eingeteilt werden. Diese Einteilung basiert zum Einen auf den interagierenden Liganden und zum Anderen auf charakteristischen Aminosäuren im Loop 45 (vgl. Abb. 7 und Abb. 8)<sup>209-210</sup>. So

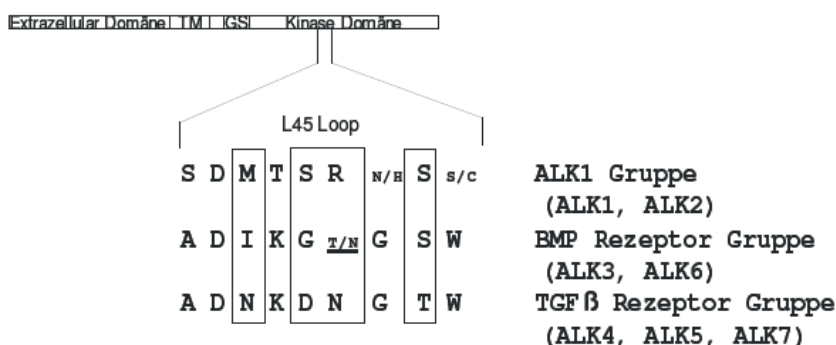
interagieren die Rezeptoren der Alk-1 Gruppe sowohl mit Zytokinen der BMP Familie als auch mit Liganden der TGF- $\beta$  / Activin Familie. Die anderen beiden Rezeptorgruppen zeigen ein engeres Ligandenspektrum. So binden Rezeptoren der Alk-2 Gruppe vorwiegend Liganden der BMP Familie und Rezeptoren der Alk-5 Gruppe interagieren vor allem mit Faktoren der TGF- $\beta$  / Activin Familie.

Rezeptorgruppe	neutraler Name	alternativer Name	wichtige Liganden
Alk-1 Gruppe	Alk-1	-	TGF- $\beta$ , Activin A
	Alk-2	ACTR IA	TGF- $\beta$ , Activin A, AMH, BMP6/7
Alk-2 Gruppe	Alk-3	BMPR IA	BMP2/4, BMP6/7
	Alk-6	BMPR IB	BMP2/4, GDF5/6, GDF9b, AMH, BMP6/7
Alk-5 Gruppe	Alk-4	ACTR IB	Activin A, GDF1, Nodal, GDF11
	Alk-5	TGFBR I	TGF- $\beta$
	Alk-7	-	Nodal

**Abb. 7: Nomenklatur der humanen TGF- $\beta$  / BMP Typ I Rezeptoren.**

Die Einteilung in Gruppen erfolgt nach Sequenzhomologien. Als alternative Namen sind charakterisierende Bezeichnungen übernommen worden. AMH: anti-müllerian hormone

Die charakteristischen Aminosäuren im Loop 45 der Typ I Rezeptoren legen zusätzlich den primären Weg der Signalweiterleitung über AR- oder BR-Smads fest und sind damit entscheidend für die Spezifität der Zellantwort (Abb. 8)<sup>184,210</sup>.



**Abb. 8: Subgruppierungen der TGF- $\beta$  / BMP Typ I Rezeptoren.**

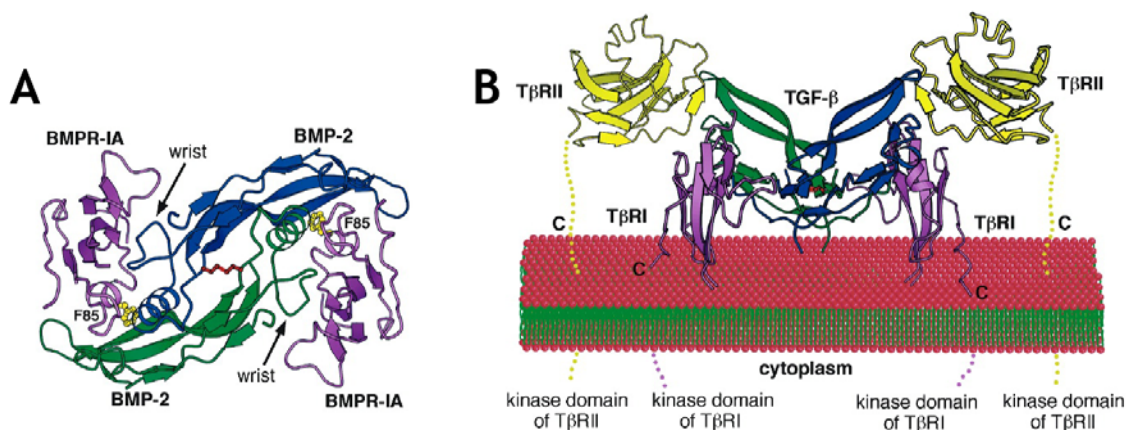
TGF- $\beta$  / BMP Typ I Rezeptoren werden unter anderem aufgrund charakteristischer Aminosäuren im Loop 45 der Kinasedomäne und daraus folgenden spezifischen Interaktionen mit den entsprechenden R-Smads in bestimmte Subgruppen eingeteilt<sup>209-210</sup>.

Einfacher ist dagegen die Nomenklatur der TGF- $\beta$  / BMP Typ II Rezeptoren. Hier richtet sich die Bezeichnung ausschließlich nach den entsprechenden bindenden Liganden. So unterscheidet man zwischen BMP Typ II Rezeptor (BMPR2 oder BRII), Activin Typ IIA und Activin Typ IIB (ACVR2A und ACVR2B), TGF- $\beta$  Typ II Rezeptor (TGFBR2) und dem anti-müllerian hormone Typ II Rezeptor (AMHR2).

### Mechanismen der Ligandenbindung

Die zwei verschiedenen Mechanismen der Interaktion von Zytokinen der TGF- $\beta$  Superfamilie mit den entsprechenden Rezeptoren werden durch Faktoren der BMP

Familie auf der einen Seite und durch TGF- $\beta$ s und Activine auf der anderen Seite repräsentiert. So zeigen BMP2 und BMP4 eine hohe Affinität zu den Ligandenbindungsdomäne der BMP Typ I Rezeptoren und eine geringe Affinität zu Typ II Rezeptoren<sup>184</sup>. Bei BMP2 konnte gezeigt werden, dass bei der Interaktion zwischen Ligand und dem Typ I Rezeptor Alk-3 eine durch die Dimerisierung gebildete hydrophobe Tasche der BMP2 Untereinheiten mit der aromatischen Seitenkette von Phe<sub>85</sub> der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors interagiert (knob-and-pocket binding; vgl. Abb. 6 und Abb. 9)<sup>198</sup>. Diese strukturellen Charakteristika von Liganden und Rezeptoren sind hoch konserviert und deuten auf eine essentielle Funktion bei der Interaktion von Zytokinen der TGF- $\beta$  Superfamilie und den entsprechenden Typ I Rezeptoren hin<sup>184</sup>. Im Unterschied dazu zeigen TGF- $\beta$ s und Activine eine hohe Affinität zu den Ligandenbindungsdomänen der Typ II Rezeptoren und binden nicht an isolierte Typ I Rezeptoren<sup>200</sup>. Hier erfolgt zunächst eine starke Bindung zwischen extrazellulärer Domäne des Typ II Rezeptors und den fingertips des homodimeren Liganden (Abb. 5), die durch eine Konformationsänderung des Liganden anschließend eine Interaktion mit Typ I Rezeptoren und die Formation eines heterotetrameren Rezeptorkomplexes erlaubt (Abb. 9)<sup>184</sup>.



**Abb. 9: Struktur von Ligand - Rezeptor Komplexen.**

Gezeigt sind die Strukturen von heteromeren Komplexen bestehend aus Liganden der TGF- $\beta$  Superfamilie und TGF- $\beta$  bzw. BMP Rezeptoren<sup>184</sup>. A: Extrazelluläre Ligandenbindungsdomänen von BMP Typ I Rezeptoren Alk-3 (BMPR-IA) im Komplex mit einem BMP2 Homodimer (BMP-2)<sup>184,198</sup>. Die für diese Interaktion essentiellen hochkonservierten Aminosäurereste der Typ I Rezeptoren sind gelb markiert (Phe<sub>85</sub> bei Alk-3). B: Extrazelluläre Ligandenbindungsdomänen von TGF- $\beta$  Typ I Rezeptoren Alk-5 (T $\beta$ RI) und TGF- $\beta$  Typ II Rezeptoren (T $\beta$ RII) im Modell - Komplex mit einem TGF- $\beta$  Homodimer nach Shi et al<sup>184</sup>. Extra- und intrazelluläre Bereiche der Rezeptoren, die C-terminal der Ligandenbindungsdomäne liegen, sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Der konservierte Mechanismus der Interaktionen zwischen Faktoren der TGF- $\beta$  Superfamilie und Typ I Rezeptoren spiegelt sich nicht in den Bindungen zwischen Liganden und Typ II Rezeptor wieder. So unterscheiden sich die Ligandenbindungsepitope der Activin Typ II Rezeptoren (ACVR2A und ACVR2B) stark von denjenigen des TGF- $\beta$  Typ II Rezeptors (TGFB2), wie durch Kristallstrukturanalysen im

Komplex mit BMP7 und Activin A gezeigt werden konnte<sup>197,211</sup>. Zusätzlich lassen Sequenzanalysen von anti-muellerian hormone (AMH), einem weiteren Faktor der TGF- $\beta$  Superfamilie, und dem zugehörigen anti-muellerian hormone Typ II Rezeptor (AMHR2) ein drittes Ligandenbindungsepitop vermuten<sup>197</sup>.

#### TGF- $\beta$ / BMP Rezeptoren in *E. multilocularis*

In *E. multilocularis* sind bereits drei Typ I Rezeptoren, EmTR1, 2 und 4 (bzw. EmRSK1, EmRSK2 und EmRSK3), und ein Typ II Rezeptor, EmTR2 (EmRSK4), identifiziert worden<sup>90,95-96,212</sup>. Die Bezeichnung TR1-4 steht dabei für TGF- $\beta$  / BMP Typ I Rezeptor 1-4 und RSK1-4 steht für receptor serine / threonine kinase 1-4, wobei im weiteren Verlauf dieser Arbeit die zweitgenannte Bezeichnungsform verwendet wird. Sequenzanalysen deuten darauf hin, dass im Genom keine weiteren TGF- $\beta$  / BMP Rezeptoren codiert sind. EmRSK1 und EmRSK3 werden aufgrund der konservierten Aminosäuren im Loop 45 der Alk-1 Rezeptorgruppe zugeordnet, EmRSK2 dagegen der Alk-5 Gruppe<sup>1,96,212</sup>. *Emrsk3* wird alternativ gespleißt, was zu den drei Isoformen EmRSK3, EmRSK3a und EmRSK3b führt<sup>1</sup>. Bei der Spleißform *emrsk3a* kommt es dabei aufgrund einer Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen Stoppcodon, wodurch diese Isoform ausschließlich aus der Ligandenbindungsdomäne besteht und als potentiell sekretiertes Protein somit eine regulatorische Funktion erfüllen könnte. Bei *emrsk3b* wird dagegen ein hochkonservierter Bereich der Kinasedomäne heraus gespleißt. Die Funktionalität von EmRSK3b wird in der vorliegenden Arbeit analysiert (vgl. 4.14). EmRSK3 ist als längste Isoform eindeutig funktionell, wobei die Aktivität von EmRSK3, wie bei EmRSK1, abhängig vom Vorliegen eines Liganden (humanes BMP2) ist<sup>1,96</sup>. Bei EmRSK2 deuten die Daten auf eine konstitutive Aktivität hin<sup>212</sup>. Funktionelle Studien zeigten weiterhin, dass EmRSK3 zumindest bei heterologer Expression in HEK 293T Zellen sowohl mit einem Echinokokken AR-Smad (EmSmadA) als auch einem BR-Smad (EmSmadB) interagieren kann (vgl. 3.3.4), wohingegen EmRSK1 ausschließlich mit dem BR-Smad EmSmadB und EmRSK2 mit den beiden AR-Smads EmSmadA und EmSmadC interagiert<sup>1,96,212</sup>. In der vorliegenden Arbeit wird zusätzlich die Möglichkeit einer Interaktion von EmRSK3 mit Faktoren der TGF- $\beta$  Familie (humanem TGF- $\beta$ 1) untersucht. Als einzig vorliegender Typ II Rezeptor im Genom und aufgrund von Studien, die zeigen, dass dieser Rezeptor mit allen drei Typ I Rezeptoren aus *E. multilocularis* funktionell interagiert, wird EmRSK4 keinem einzelnen Liganden zugeordnet<sup>1,212</sup>.

#### **3.3.4. TGF- $\beta$ / BMP Smads**

Der erste intrazelluläre Vermittler des TGF- $\beta$  Signaling, MAD (mothers against decapentaplegic), wurde erstmals 1995 in *Drosophila melanogaster* identifiziert<sup>213</sup>. Schnell fanden sich auch orthologe Faktoren in Würmern und Vertebraten, die Smad

genannt wurden (zusammengesetzt aus small body size und mothers against decapentaplegic)<sup>214</sup>. In *H. sapiens* sind acht verschiedene Smads identifiziert worden, die entsprechend ihrer Struktur und Funktion in drei Gruppen klassifiziert werden: R-Smad (receptor-regulated Smads), Co-Smad (common-mediator Smad) und I-Smad (inhibitory Smad)<sup>184</sup>.

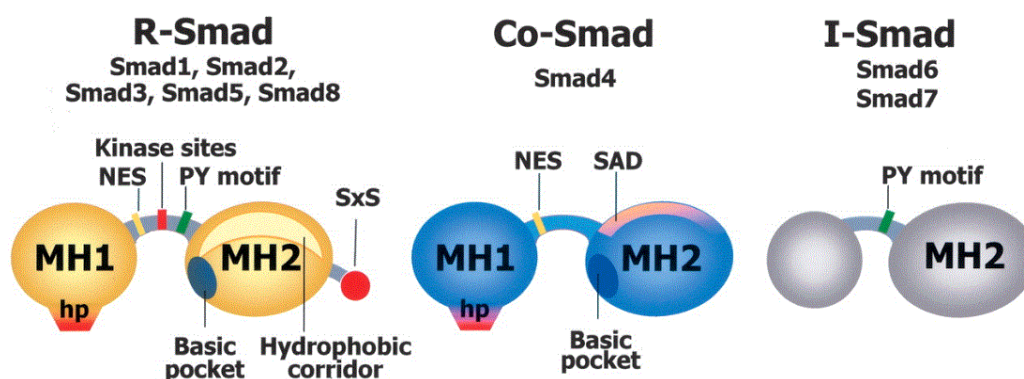


Abb. 10: Strukturelle Charakteristika verschiedener Smads.

Gezeigt sind die sieben humanen Smads mit ihren jeweiligen strukturellen Charakteristika, gruppiert in ihrer jeweiligen Klasse als R-Smad, Co-Smad oder I-Smad. Die zwei konservierten globulären Domänen (MH1 und MH2 Domäne) sind durch einen variablen Linker miteinander verbunden. Bei I-Smads fehlt die MH1 Domäne. Die Lage der verschiedenen Phosphorylierungsstellen, das PY Motiv zur Interaktion mit Smurf1 und die Position eines nukleären Exportsignal (NES) sind innerhalb der Linker Region dargestellt. Das basic pocket innerhalb der MH2 Domäne der R-Smads ist dargestellt. Diese Struktur ist bei R-Smads zusätzlich zu Loop 3 (nicht gezeigt) zur Interaktion mit aktivierten TGF- $\beta$  / BMP Typ I Rezeptoren notwendig. Beim Co-Smad interagiert dieser basische Bereich mit dem phosphorylierten C-Terminus (SxS) der R-Smads zur Ausbildung von heteromeren Komplexen. Der hydrophobe Korridor (hydrophobic corridor) der R-Smads interagiert dagegen mit verschiedenen anderen Faktoren wie dem zytoplasmatischen Ankerprotein SARA (smad anchor for receptor activation). Beim Co-Smad findet man am Übergang von Linker Region zur MH2 Domäne die smad4 activation domain (SAD), die eine Funktion bei Interaktionen mit transkriptionellen Aktivatoren und Repressoren hat. Abbildung verändert nach Massagué et al., 2005<sup>215</sup>.

### R-Smads

R-Smads lassen sich auf Basis konservierter Aminosäuren im Loop 3, die bei der Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren (Loop 45) eine Rolle spielen und damit zur Spezifität des Signalwegs beitragen, weiter unterteilen in AR-Smads (auch Typ A R-Smads) und BR-Smads (auch Typ B R-Smads)<sup>216-217</sup>. In *H. sapiens* werden Smad2 und Smad3 den AR-Smads zugeordnet, während Smad1, 5 und 8 zu den BR-Smads gezählt werden (vgl. 3.3.1)<sup>123</sup>. R-Smads enthalten zwei konservierte Domänen, die N-terminale MAD-homology 1 (MH1) Domäne und die C-terminale MAD-homology 2 (MH2) Domäne, die durch eine Linker Region voneinander getrennt sind (vgl. Abb. 10). Der oben erwähnte Loop 3 befindet sich innerhalb der MH2 Domäne, die auch die Ausbildung von homo- und heterooligomeren Komplexen steuert<sup>119</sup>. Am C-Terminus von R-Smads findet man ein charakteristisches SSXS Motiv, das bei einer Aktivierung durch Typ I Rezeptoren phosphoryliert wird<sup>215,218</sup>. MH1 Domäne und MH2 Domäne, die sich im inaktiven Zustand gegenseitig blockieren, dissoziieren nach der Aktivierung eines R-Smads<sup>184</sup>. Dadurch wird



das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) der MH2 Domäne zugänglich für den heterodimeren Importin  $\alpha$  / Importin  $\beta$  Komplex, wodurch die Translokation in den Nukleus ermöglicht wird, und die Phosphorylierung des N-terminalen SXS Motivs erhöht gleichzeitig die Affinität des R-Smads zum Co-Smad<sup>219-220</sup>. Die Translokation der aktivierten R-Smads in den Nukleus erfolgt in einem heteromeren Komplex, bestehend aus ein bis zwei R-Smads und einem Co-Smad<sup>119,221-223</sup>. Im Nukleus interagiert die MH1 Domäne mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und meist auch direkt mit der DNA, wodurch die Genexpressionslevel der Zielgene reguliert werden<sup>221,224-227</sup>. Zum Rücktransport der Smads vom Nukleus in das Zytoplasma sind nukleäre Exportsignale (NES 1 bzw. NES 2) notwendig, die bei R-Smads zum Einen innerhalb der MH2 Domäne (NES 1) und zum Anderen am Übergang von MH1 Domäne und Linker Region (NES 2) zu finden sind<sup>220,228-229</sup>. Innerhalb der Linker Region befinden sich weitere Phosphorylierungsstellen, die eine Kreuzkommunikation mit dem mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalweg sowie die Phosphorylierung durch glycogen synthase kinase 3 (GSK3) erlauben<sup>129</sup>. Eine kombinierte Phosphorylierung durch MAPKs und GSK3 führt zur Polyubiquitylierung der R-Smads durch Smurf1 (WW and HECT domain E3 ligase Smad ubiquitination regulatory factor) und leitet damit nach mehreren Runden Zytoplasma - Nukleus Translokation die Degradation der R-Smads ein<sup>129,230-231</sup>.

In *E. multilocularis* konnten auf Basis struktureller und funktioneller Untersuchungen bereits zwei AR-Smads (EmSmadA und EmSmadC) und ein BR-Smad (EmSmadB) identifiziert werden<sup>94,97</sup>. Dabei zeigen EmSmadA und EmSmadC durch das Fehlen einer MH1 Domäne biochemische Besonderheiten, die zumindest die Homo- und Heterobildung dieser Smads nicht beeinflussen. Des Weiteren scheint die Separation des Signaling in den TGF- $\beta$  Signalweg und den BMP Signalweg bei *E. multilocularis* weniger strikt getrennt zu sein als im humanen Modell vorgeschlagen wird. So konnte gezeigt werden, dass EmSmadA sowohl durch den humanen TGF- $\beta$  Typ I Rezeptor Alk-5 als auch durch den humanen BMP Typ I Rezeptor Alk-3 aktiviert werden kann<sup>94</sup>. Im Kombination mit Echinokokken Typ I Rezeptoren verhält es sich ähnlich. So kann EmSmadA durch EmRSK2 (Alk-5 Rezeptorgruppe) einerseits und EmRSK3 (Alk-1 Rezeptorgruppe) andererseits phosphoryliert werden. EmSmadC wird dagegen entsprechend seiner Einordnung als AR-Smad nur durch Typ I Rezeptoren der Alk-5 Gruppe (humanen Alk-5 oder EmRSK2) aktiviert, während EmSmadB als BR-Smad durch humanen Alk-3 oder die Echinokokken Typ I Rezeptoren der Alk-1 Gruppe, EmRSK1 und EmRSK3, phosphoryliert werden kann<sup>1,94,97,212</sup>. Des Weiteren konnte bereits eine Interaktion zwischen EmSmadC und EmSKIP, einem Faktor der SNW/SKIP Familie transkriptioneller Co-Regulatoren, nachgewiesen werden<sup>97,232</sup>.



### Co-Smads

Co-Smads sind ganz ähnlich wie R-Smads aus einer MH1 Domäne und einer MH2 Domäne aufgebaut, die durch eine Linker Region miteinander verbunden sind (vgl. Abb. 10). Im Unterschied zu R-Smads fehlt allerdings das C-terminale SSXS-Motiv und dementsprechend werden Co-Smads nicht durch Rezeptoren phosphoryliert. Außerdem findet man am Übergang von Linker Region und MH2 Domäne eine Smad4 activation domain (SAD), die eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit transkriptionellen Aktivatoren und Repressoren hat. Daneben enthält die Linker Region ein nukleäres Export Signal (NES). Die Funktion der MH1 Domäne entspricht als DNA bindendes Modul der bereits bekannten Rolle von MH1 Domänen bei R-Smads und auch die MH2 Domäne eines Co-Smad entspricht als hochkonservierte Region der bereits erwähnten Funktion als vielseitiger Partner bei Protein - Protein Interaktionen<sup>215</sup>. Co-Smads bilden mit phosphorylierten R-Smads in Abhängigkeit vom Zielgen und anderen benötigten Faktoren heterodimere (ein R-Smad, ein Co-Smads) oder heterotrimere (zwei R-Smads, ein Co-Smad) Komplexe, die in den Nukleus transloziert werden. Dort erweitert sich dieser Komplex um Transkriptionsfaktoren, die essentiell zur Funktion dieses transkriptionellen Komplexes beitragen, und interagiert innerhalb von Smad - responsiven Promotorregionen mit bis zu vier Smad-binding elements (SBEs) mit der Konsensussequenz 5'-GTCT-3'<sup>215,224,233-234</sup>. Einige der Smad - responsiven Promoter enthalten allerdings keine konservierten SBEs, wie z. Bsp. das TGF- $\beta$  inhibitory element (TIE) vom *c-Myc* Promoter in *H. sapiens*, wo das zweite Nukleotid der Konsensussequenz variiert<sup>235-236</sup>. Zusätzlich wurden bei *D. melanogaster* und *H. sapiens* bereits Interaktionen mit GC-reichen Promotorregionen beobachtet, die keinerlei Ähnlichkeit mit SBEs aufweisen. Dadurch umfassen die Smad - responsiven Promotorregionen eine große Vielfalt und machen die Identifikation TGF- $\beta$  / BMP regulierter Gene zu einer Herausforderung<sup>237-239</sup>.

In *E. multilocularis* wurde mit EmSmadD bereits ein einzelner Co-Smad identifiziert, der heteromere Komplexe mit EmSmadA, EmSmadB und EmSmadC eingeht<sup>97</sup>. Auch bei *H. sapiens* findet sich nur ein einziger Co-Smad, Smad4, der sowohl mit AR- als auch mit BR-Smads interagiert<sup>221</sup>.

### I-Smads

Inhibitory Smads, wie die humanen I-Smads Smad6 und Smad7, konkurrieren mit R-Smads und Co-Smads um Protein - Protein Interaktionen und inhibieren dadurch die Signalweiterleitung über TGF- $\beta$  / BMP Signalwege<sup>215,231</sup>. I-Smads enthalten keine MH1 Domäne und auch kein SSXS Motiv am C-Terminus, wohingegen die MH2 Domäne die gleichen strukturellen Charakteristika aufweist wie bei R-Smads und Co-Smads (vgl. Abb. 10). Innerhalb der Linker Region findet man ein PY-Motiv zur Interaktion mit

Smurfs. Der humane I-Smad Smad6 konkurriert zum Einen mit Smad4 um Interaktionen mit aktiviertem Smad1, so dass sich inaktive Smad6 / Smad1 Komplexe formen, und inhibiert zum Anderen vor allem BMP Typ I Rezeptoren<sup>240-241</sup>. Der zweite humane I-Smad, Smad7, bindet dagegen an aktivierte TGF- $\beta$  und BMP Rezeptoren und verhindert dadurch einerseits die Phosphorylierung von R-Smads, andererseits vermittelt dieser I-Smad als Interaktionspartner von Smurfs und anderen regulierenden Faktoren die Dephosphorylierung und Ubiquitylierung von TGF- $\beta$  Typ I Rezeptoren<sup>242-250</sup>. Die Expression von Smad6 und Smad7 wird über negative feedback loops reguliert und bei Smad7 wurde auch bereits ein Einfluss von TGF- $\beta$  auf die Lokalisation dieses I-Smad in Nukleus bzw. Zytoplasma festgestellt<sup>239,242,251-254</sup>. In *H. sapiens* wird die Expression von Smad7 auch durch verschiedene Signale, wie Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und interleukin-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) reguliert<sup>255-256</sup>. In *E. multilocularis* wurde bisher kein I-Smad identifiziert. Die vorliegende Arbeit nimmt sich dieser Thematik allerdings an.

### 3.4.Ziele dieser Arbeit

Als multizellulärer Organismus ist *E. multilocularis* hinsichtlich der Zell-Zell Kommunikation auf Signalsysteme angewiesen, die bereits in einem frühen Stadium der Evolution von Metazoen entwickelt wurden und daher sowohl im Fuchsbandwurm als auch in den höher entwickelten Säugetierwirten konserviert sind. Bei einer Infektion mit *E. multilocularis* und der daraus resultierenden Alveolären Echinokokkose ist das Parasitengewebe durch sein Tumor - ähnliches Wachstum in unmittelbarer Nähe zu den entsprechenden konservierten Signalmolekülen des Wirts zu finden. In diesem Umfeld ist das Konzept der hormonellen Wirt - Parasit Kreuzkommunikation über Rezeptoren von *E. multilocularis* und extrazelluläre Signalmoleküle des Wirts in den letzten Jahren bereits in mehreren Studien auf Basis verschiedener Signalwege des Fuchsbandwurms untersucht worden. So konnten bereits Interaktionen von humanem Insulin und den entsprechenden Echinokokken Rezeptoren nachgewiesen werden, und auch deutliche Auswirkungen von humanem Insulin auf die Entwicklung von *E. multilocularis* wurden bereits *in vitro* gezeigt<sup>89,98</sup>. Humane Faktoren der TGF- $\beta$  Superfamilie liegen im Rahmen der Immunantwort, Regeneration, Eisen Homöostase und Produktion extrazellulärer Matrix ebenfalls in der Leber vor und *in vitro* konnten bereits Interaktionen zwischen humanem BMP2 und den Echinokokken Typ I Rezeptoren EmRSK1 und EmRSK3 sowie dem Echinokokken Typ II Rezeptor EmRSK4 gezeigt werden<sup>1,96,212</sup>. Außerdem konnten mit EmSmadA, EmSmadB und EmSmadC bereits drei R-Smads und mit EmSmadD ein Co-Smad in *E. multilocularis* identifiziert werden, die zusätzlich zum BMP - Homolog EmBMP1 essentielle Komponenten für TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* darstellen<sup>94-95,97</sup>.

Die vorliegende Arbeit befasst sich in einem ersten Teilprojekt mit der Identifizierung und Charakterisierung von bisher unbekanntem Faktoren des TGF- $\beta$  / BMP Signaling im Fuchsbandwurm, die zum Verständnis der Rolle dieses Signalsystems in *E. multilocularis* entscheidend sind. Dabei werden intra- sowie potenziell extrazelluläre TGF- $\beta$  / BMP Faktoren analysiert.

Allgemeine biochemische Analysen betreffen die Spezifität, Funktionalität und die Möglichkeit der konstitutiven Aktivierung von TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* auf Basis von EmSmadA, EmRSK3 und EmRSK3b. Diese kleineren Teilprojekte dienen dem tieferen Verständnis von TGF- $\beta$  / BMP Signaling und sind auf die entsprechenden Signalsysteme in anderen Organismen übertragbar.

Im größten Teilprojekt der vorliegenden Arbeit wird die Möglichkeit eines Einflusses humaner Zytokine der TGF- $\beta$  Superfamilie auf die Entwicklung des Parasiten während einer Infektion mit *E. multilocularis* untersucht. Als Vertreter der BMP bzw. TGF- $\beta$  Subfamilie werden die Auswirkungen von BMP2 und zum Teil von TGF- $\beta$ 1 auf Vitalität, Wachstum, Differenzierung und Regeneration von *E. multilocularis* mit Hilfe neuester Techniken der Echinokokken *in vitro* Kultivierung in Metazestoden und Primärzellen untersucht, wobei auch Studien hinsichtlich veränderter Genexpression unter Einfluss von humanen Zytokinen hinzugezogen werden. Hierbei werden auch grundlegende Mechanismen der Stammzellendifferenzierung adressiert. Die Rolle von TGF- $\beta$  / BMP Signaling wird hinsichtlich der oben genannten Kriterien außerdem durch die Inhibition dieses Signalsystems mit Hilfe von Rezeptor - spezifische Inhibitoren untersucht, wobei in diese Studien auch Protoskolizes mit eingeschlossen werden.

Ein weiteres Teilprojekt befasst sich mit der Möglichkeit einer intra - Spezies Regulation von Entwicklungsvorgängen durch TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis*. Diese These wird mit Hilfe einer Studie auf Basis transfizierter HEK293T Zellen untersucht, wobei die Aktivierung von Echinokokken Rezeptoren durch sekretierte Metazestoden Proteine indirekt durch die Phosphorylierung von Echinokokken R-Smads gemessen wird. Die im ersten Teilprojekt dieser Arbeit vorgenommene Identifikation von bisher unbekanntem, potentiell sekretierten TGF- $\beta$  / BMP Homologen trägt zur Aufklärung dieser Fragestellung ebenfalls bei.

In Bezug auf nachfolgende Forschung dient die vorliegende Arbeit mit der Identifikation von potentiell sekretierten TGF- $\beta$  / BMP Faktoren als Grundlage zur Untersuchung der Auswirkungen von Echinokokken Zytokinen auf die Physiologie und Immunantwort des Wirts.

## 4. Ergebnisse

### 4.5. EmBMP1d - eine vierte Isoform von EmBMP1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das von Ricardo Zavala-Gòngora bereits beschriebene Gen *embmp* weitergehend untersucht<sup>95</sup>. Aufgrund eines neu identifizierten zweiten BMP Homologen in *E. multilocularis*, EmBMP2 (vgl. 4.6), wurde das bereits bekannte BMP Homolog, EmBMP, in EmBMP1 umbenannt. Nachdem von Ricardo Zavala-Gòngora bereits drei Spleißvarianten der *embmp1* mRNA charakterisiert werden konnten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine vierte solche Variante identifiziert, *embmp1d*.

#### 4.5.1. *Embmp1d* - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz

Zur Amplifikation und anschließenden Klonierung aller *embmp1* Spleißvarianten wurden entsprechende PCRs auf die in der Arbeitsgruppe bereits vorliegende cDNA-Bibliothek durchgeführt, wobei die Oligonukleotide BMP dw4 und BMP up0 eingesetzt wurden (vgl. 6.12.7 und 6.9). Auf diese Weise konnte eine vierte mRNA - Variante von *embmp1* identifiziert werden, *embmp1d*. Dabei wurden beim Spleißprozess in *E. multilocularis* das erste und dritte der insgesamt drei Introns des chromosomalen Locus entfernt, wohingegen das zweite Intron mit durchgehendem Leseraster nicht gespleißt wurde. Das Entfernen von Intron 1 hatte ein Stoppcodon zur Folge und damit die Verschiebung des Start-Methionins des codierten Proteins.

Das EmBMP1d Proprotein umfasst folglich 325 Aminosäuren (975 bp) und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 36,9 kDa (ExpASy, SIB). EmBMP1d enthält wie die Variante EmBMP1c kein putatives Signalpeptid (CBS SignalP 3.0 Server, DTU), allerdings konnte mit der Aminosäure Asn an Position 68 eine potentielle N-Glykosylierungsstelle identifiziert werden (CBS NetNGlyc 1.0 Server, DTU). Der C-terminale Bereich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von EmBMP1d enthält mit den für BMPs typischen sieben konservierten Cysteinen eine TGF- $\beta$  Domäne (NCBI CDD; pfam00019: AS 223-325). Zusätzlich wurde mit den Aminosäuren Arg-Lys-Lys-Arg (Position 188-191) eine putative Spleißstelle für Proteasen der subtilisin-like proprotein convertase (SPC) - Familie zur Abspaltung des Propeptids vom C-terminalen aktiven Peptid identifiziert<sup>257</sup>.

```

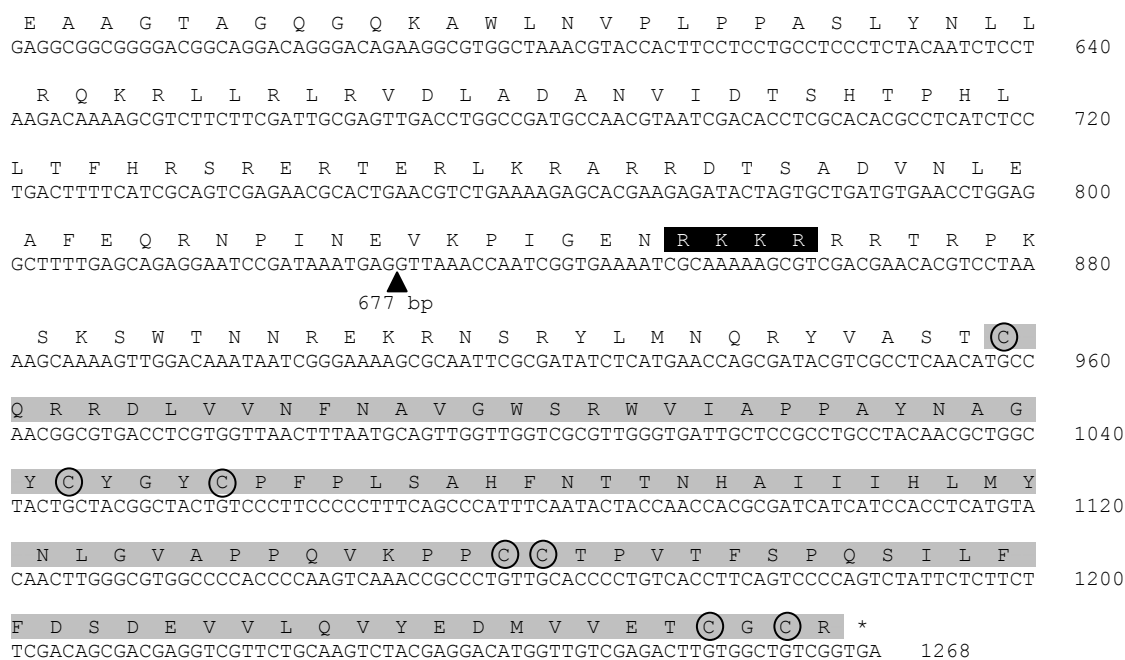
CGCTGGGTCGAGGGGACATTTGAACCGAGACAGTGGCCAGACCACGGTCCAACAACCTGCCGCATAACTTTTCTTCTCCA 80
CTCTCCGTTTTACCAGCAAAGCACCCGAGCCTTCTGGCCCATGGGAGATAGCAGAGGGTCCGGAAGAACATTAACACGAC 160
TTGTAGTGATTGGTCTTCTACTGCAGGCGGCTCAGACTGCGGCCACGGTGGGCGAGCAGTGCCTTGTGGAATAAACGAAATT 240

                                     M N F G Q T D G G H
TTTGTGAGTAAGAACCACCTCAGCCTCAGAGAAAGACACAGTAGAGAATGGATGAATTTCCGGCAAACCTGACGGTGGACAC 320
      ▲
      70 bp
G P S L G V I T T I R H H R T T G A N D R Q S Q W Q K
GGTCCCAGTCTAGGAGTTATTACAACCTATACGTATCACCGAACCACAGGGGCAAACGATAGGCAATCACAGTGGCAGAA 400

R Q S L D F R L A R F S V G E Q L I A C S L R L P I
ACGTCAGAGCCTCGATTTCCGCCTTGCACGATTTTCAGTCCGTGAGCAGTTGATAGCGTGCAGTTTGC GGCTGCCAATTA 480

R H C I N A S T P V S V K V I G A G E T P R G E V Y V
GACATTCGATAAACGCATCCACCCCGGTCTCAGTGAAGGTGATTGGTGCAGGGGAGACCCCAAGGGGCGAAGTCTATGTA 560

```



**Abb. 11: *Embmp1d* cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz.**

Gezeigt sind die Nukleotidsequenz der *embmp1d* cDNA bis zum Stoppcodon (unten) sowie die zugehörige abgeleitete Aminosäuresequenz (oben). Ein Stern markiert das Stoppcodon TGA. Dreiecke zeigen die Position und Länge der durch Spleißen entfernten Introns 1 und 3. Die Nukleotide von Intron 2, das nicht gespleißt wurde, sind durch weiße Buchstaben auf dunkelgrauem Hintergrund gekennzeichnet. Die identifizierte TGF- $\beta$  Domäne (pfam00019) ist grau hinterlegt und die sieben konservierten Cysteine sind schwarz eingekreist. Die putative Spleißstelle für Proteasen der subtilisin-like proprotein convertase (SPC) - Familie ist durch weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund gekennzeichnet. Eine potentielle N-Glykosylierungsstelle ist durch eine schwarze Umrandung gekennzeichnet.

#### 4.6. EmBMP2 - ein zweites BMP Homolog aus *E. multilocularis*

Mit Hilfe der vorläufigen Sequenzen der Sanger Helminth Genom Initiative wurde ein bisher unbekanntes BMP Homolog in *E. multilocularis* identifiziert. Für diese Analysen wurde EmBMP1 als Template in einem TBLASTN-Alignment (WinBlast) herangezogen und auf Contig 2799 (bp 66142-50178) eine putatives zweites BMP-kodierendes Gen identifiziert, *embmp2* (vgl. 6.18)<sup>95</sup>.

##### 4.6.1. *Embmp2* - cDNAs und abgeleitete Aminosäuresequenzen

Durch bioinformatische Analysen der Genom- und Transkriptomdaten von *E. multilocularis* konnte ein vollständiger putativer ORF von *embmp2* identifiziert werden, der laut NCBI CDD Analysen neben einer konservierten Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02510) am C-Terminus eine komplette Domäne der TGF- $\beta$  Propeptid Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02928) am N-Terminus umfasst.

Zur Verifizierung der vorhergesagten Sequenz und zur Charakterisierung der mRNA wurden zunächst das 5' Ende sowie das 3' Ende der zugehörigen cDNA durch RACEs auf die in der Arbeitsgruppe bereits vorliegende cDNA-Bibliothek amplifiziert (vgl. 6.9). Dabei wurden in den entsprechenden PCRs die Kombinationen der Oligonukleotide

pJG4-5 dw und EmbMPB up1 sowie EmbMPB dw2 und pJG4-5 up verwendet. Durch diese Methode wurden alternative Spleißvarianten des putativen vollständigen ORF von *embmp2* identifiziert, die durch unterschiedliches Spleißen von Exon 2 (vgl. 4.6.2) zu verschiedenen mRNA Varianten führten. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass mindestens drei Spleißvarianten von *embmp2* in *E. multilocularis* vorliegen können. Das längste Transkript umfasst demnach den vorhergesagten vollständigen ORF von *embmp2* und wird daher *embmp2a* benannt. Beim zweiten Transkript wurde dagegen das erste Intron von *embmp2a* nicht entfernt und das 5' Ende der mRNA dieser Variante, *embmp2b*, wurde innerhalb dieses Introns identifiziert. Dadurch verschiebt sich die Position des Start-Methionins und das codierte Protein ist wesentlich kürzer. Das 5' Ende der dritten mRNA Variante von *embmp2* ist identisch mit *embmp2b*, allerdings wurde hier zusätzlich beim Übergang von Intron 2 zu Exon 3 alternativ gespleißt. Dadurch kommt es im Vergleich mit *embmp2a* zu einer zweifachen Leserasterverschiebung und folglich zu einem weiteren Transkript, *embmp2c*.

Die 3' UTR von *embmp2b* und *embmp2c* konnte nur zum Teil amplifiziert werden. Bei beiden Varianten wurde kein Spliced Leader am 5' Ende der cDNA identifiziert. Durch die Sequenzierung mehrerer plasmidhaltiger Kolonien wurden die aufgeführten Sequenzen von *embmp2b* und *embmp2c* verifiziert.

Auch bei *D. melanogaster* konnten bereits fünf alternative *dpp* mRNAs nachgewiesen werden, die für unterschiedliche Proteine kodieren (NCBI Reference Sequences: NM\_057963.4, NM\_164485.1, NM\_164486.1, NM\_164487.1 und NM\_164488.1). In *H. sapiens* findet man z.B. mit *bmp4* ein Gen mit drei alternativ gespleißten mRNAs, die allerdings alle für das gleiche Protein kodieren (NCBI Reference Sequences: NM\_001202.3, NM\_130850.2 und NM\_130851.2).

#### Embmp2a - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz

Der ORF von *embmp2a* codiert mit 1428 bp ein putatives EmbMP2a Präproprotein mit 476 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 54,7 kDa (ExPASy, SIB). 5' oder 3' UTRs der cDNA konnten ebenso wie ein konserviertes Signalpeptid nicht identifiziert werden (CBS SignalP 3.0 Servers, DTU). Mit Asn<sub>123</sub> und Asn<sub>374</sub> sind bei EmbMP2a allerdings zwei N-Glykosylierungsstellen vorhanden (CBS NetNGlyc 1.0 Server, DTU). Der Bereich zwischen Arg<sub>71</sub> und Tyr<sub>274</sub> konnte mit Hilfe von NCBI CDD und EMBL SMART als vollständige konservierte Domäne der TGF- $\beta$  Propeptid Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02928) identifiziert werden, ebenso wie der Bereich zwischen C<sub>361</sub> und Cys<sub>475</sub> als konservierte Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02510) charakterisiert werden konnte. Die Aminosäuresequenz Arg-Pro-Pro-Arg an Position 355 - 358 wurde als putative Spleißstelle für Proteasen der subtilisin-like proprotein

convertase (SPC) - Familie zur Abspaltung des Propeptids vom C-terminalen aktiven Peptid identifiziert<sup>257</sup>.

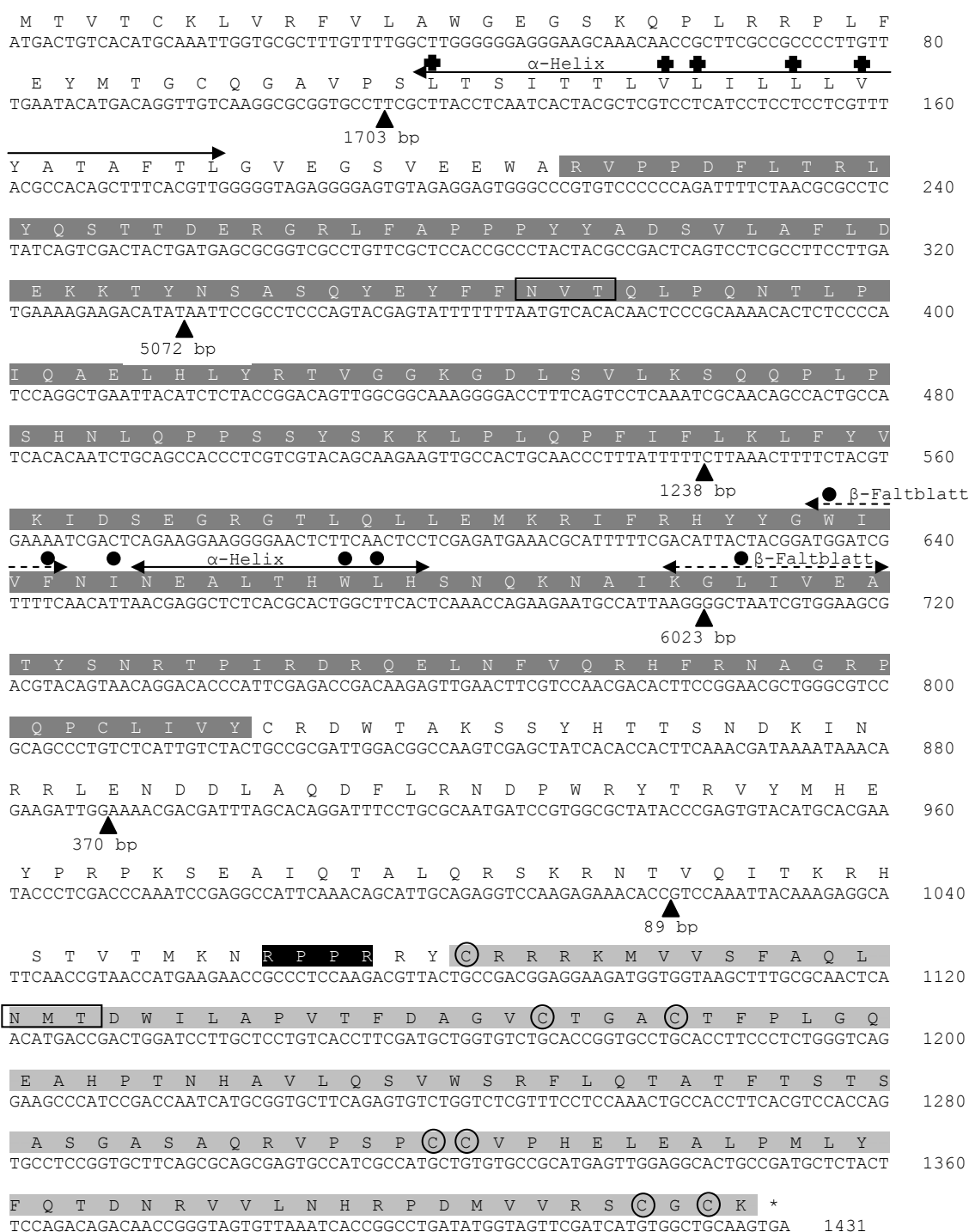


Abb. 12: *Embmp2a* - ORF und abgeleitete Aminosäuresequenz.

Gezeigt sind die Nukleotidsequenz vom *embmp2a* ORF (unten) sowie die zugehörige abgeleitete Aminosäuresequenz (oben). Ein Stern markiert das Stoppcodon TGA. Dreiecke zeigen die Positionen und Länge der Introns. Mit weißen Buchstaben auf dunkelgrauem Hintergrund sind die zur Domäne der TGF- $\beta$  Propeptid Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02928) zugehörigen Aminosäuren markiert. Die identifizierte Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02510) ist hellgrau hinterlegt und die sieben konservierten Cysteine sind schwarz eingekreist. Die putative Spleißstelle für Proteasen der subtilisin-like proprotein convertase (SPC) - Familie ist durch weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund gekennzeichnet. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind durch eine schwarze Umrandung gekennzeichnet. Hydrophobe Aminosäuren mit einer potentiellen Funktion bei der Formation des SLC-Komplexes sind durch

Kreuze gekennzeichnet. Dagegen sind konservierte Aminosäuren mit einer potentiellen Funktion bei der LAP-Dimerisierung durch schwarze Punkte markiert. Die identifizierten konservierten Sekundärstrukturen im Bereich des Propeptids sind durch Pfeile gekennzeichnet ( $\alpha$ -Helix: durchgezogene Linie;  $\beta$ -Faltblatt: gestrichelte Linie).

### Embmp2b - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz

Die mRNA von *embmp2b* umfasst eine 5' UTR von 627 bp, einen kodierenden Bereich von 825 bp und eine 3' UTR von mindestens 42 bp. Das codierte Präproprotein EmbBMP2b umfasst 275 Aminosäuren und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 32,1 kDa (ExPASy, SIB). Ein putatives Signalpeptid konnte bei EmbBMP2b nicht identifiziert werden, wohingegen mit Asn<sub>173</sub> eine N-Glykosylierungsstelle vorhanden ist (CBS SignalP 3.0 Server bzw. CBS NetNGlyc 1.0 Server, DTU). Zwischen Aminosäure Met<sub>1</sub> und Tyr<sub>73</sub> konnte mit Hilfe von NCBI CDD und EMBL SMART eine konservierte Domäne der TGF- $\beta$  Propeptid Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02928) und im C-terminalen Bereich zwischen den Aminosäuren Cys<sub>160</sub> und Lys<sub>274</sub> eine konservierte Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02510) identifiziert werden. Die Domäne der TGF- $\beta$  Propeptid Superfamilie ist im N-terminalen Bereich nicht vollständig. Des Weiteren wurden die Aminosäuren 154 - 157 mit der Sequenz Arg-Pro-Pro-Arg als putative Spleißstelle für Proteasen der subtilisin-like proprotein convertase (SPC) - Familie zur Abspaltung des Propeptids vom C-terminalen aktiven Peptid identifiziert<sup>257</sup>.

```

CCGTTTTAGAGCATCAGGACGTGTGTGGAAGAGCAAGCGAGCCAGAGACCAGACCTAGGCCGACCGAGACCACGGCCAA      80
TGCAGAATATCCCCCTCTGCAAACCTGGCGGATGATAAATCTTTTCGGGTTTCAATTCAGTCGCTTACCTCAATCACTACGC    160
TCGTCCTCATCCTCCTCCTCGTTTACGCCACAGCTTTCACGTTGGGGGTAGAGGGGAGTGTAGAGGAGTGGGCCCGTGTC    240
CCCCCAGATTTTCTAACGCGCCTCTATCAGTCGACTACTGATGAGCGCGGTCGCCTGTTCGCTCCACCGCCCTACTACGC    320
CGACTCAGTCCTCGCCTTCTTGATGAAAAGAAGACATATAATTCGCGCTCCAGTACGAGTATTTTTTTAATGTACAC      400
                                     ▲
                                     5072 bp

AACTCCCGCAAAACACTCTCCCATCCAGGCTGAATTACATCTCTACCGGACAGTTGGCGCAAAGGGGACCTTTCAGTC      480
CTCAAATCGCAACAGCCACTGCCATCACACAATCTGCAGCCACCCCTCGTCGTACAGCAAGAAGTTGCCACTGCAACCCTT    560

                                     M K R I
TATTTTTCTTAAACTTTTCTACGTGAAAATCGACTCAGAAGGAAGGGAACTCTTCAACTCCTCGAGATGAAACGCATTT    640
                                     ▲
                                     1238 bp

F R H Y Y G W I V F N I N E A L T H W L H S N Q K N A
TTCGACATTACTACGGATGGATCGTTTTCAACATTAACGAGGCTCTCACGCACTGGCTTCACTCAAACAGAAGAATGCC    720

I K G L I V E A T Y S N R T P I R D R Q E L N F V Q R
ATTAAGGGGCTAATCGTGGAGCGACTACAGTAACAGGACACCCATTCGAGACCACAAGAGTTGAACTTCGTCCAACG    800
                                     ▲
                                     6023 bp

H F R N A G R P Q P C L I V Y C R D W T A K S S Y H
ACACTCCGGAACGCTGGGCGTCCGACGCCCTGTCTATTGTCTACTGCCGCGATTGGACGGCCAAGTCGAGCTATCACA    880

T T S N D K I N R R L E N D D L A Q D F L R N D P W R
CCACTTCAAACGATAAAAATAAACAGAAGATTGGAAAACGACGATTTAGCACAGGATTTCTGCGCAATGATCCGTGGCGC    960
                                     ▲
                                     370 bp

Y T R V Y M H E Y P R P K S E A I Q T A L Q R S K R N
TATACCCGAGTGTACATGCAGAAATACCCTCGACCCAAATCCGAGGCCATTCAAACAGCATTGCAGAGGTCCAAGAGAAA    1040

T V Q I T K R H S T V T M K N R P P R R Y (C) R R R K
CACCGTCCAAATTCAAAGAGGCATTC AACCGTAACCATGAAGAACC GCCCTCCAAGACGTTACTGCCGACGGAGGAAGA    1120
                                     ▲
                                     89 bp

M V V S F A Q L N M T D W I L A P V T F D A G V (C) T G
TGGTGGTAAGCTTTGCGCAACTCAACATGACCGACTGGATCCTTGCTCCTGTACCTTCGATGCTGGTGTCTGCACCGGT    1200

A (C) T F P L G Q E A H P T N H A V L Q S V W S R F L Q
GCCTGCACCTTCCCTCTGGGTCAGGAAGCCCATCCGACCAATCATGCGGTGCTTCAGAGTGTCTGGTCTCGTTTCTCCA    1280

```



T A T F T S T S A S G A S A Q R V P S P **C** **C** V P H E  
 AACTGCCACCTTCACGTCCACCAGTGCCTCCGGTGTTCAGCGCAGCGAGTGCCATCGCCATGCTGTGTGCCGCATGAGT 1360

L E A L P M L Y F Q T D N R V V L N H R P D M V V R S  
 TGGAGGCACTGCCGATGCTCTACTTCCAGACAGACAACCGGGTAGTGTAAATCACCGGCCTGATATGGTAGTTCGATCA 1440

**C** **G** **C** K \*  
 TGTGGCTGCAAGTGAGGGGGCTCAAACCACCTCCCACATACCCCCATCACTGAT 1494

### Abb. 13: *Embmp2b* - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz.

Gezeigt sind die Nukleotidsequenz der *embmp2b* cDNA (unten) sowie die zugehörige abgeleitete Aminosäuresequenz (oben). Ein Stern markiert das Stoppcodon TGA. Dreiecke zeigen die Position und Länge der Introns. Mit weißen Buchstaben auf dunkelgrauem Hintergrund sind die zur Domäne der TGF- $\beta$  Propeptid Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02928) zugehörigen Aminosäuren markiert. Die identifizierte Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02510) ist hellgrau hinterlegt und die sieben konservierten Cysteine sind schwarz eingekreist. Die putative Spleißstelle für Proteasen der subtilisin-like proprotein convertase (SPC) - Familie ist durch weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund gekennzeichnet. Die potentielle N-Glykosylierungsstelle ist durch eine schwarze Umrandung gekennzeichnet.

### *Embmp2c* - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz

Die dritte Spleißvariante, *embmp2c*, umfasst eine 5' UTR von 280 bp, einen kodierenden Bereich von 1104 bp und eine 3' UTR von mindestens 42 bp. Das codierte Präproprotein EmBMP2c ist aus 368 Aminosäuren aufgebaut und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 42,5 kDa (ExpASy, SIB). Wie schon bei EmBMP2b wurde auch bei EmBMP2c kein konserviertes Signalpeptid identifiziert, wohingegen mit Asn<sub>266</sub> die bereits identifizierte putative N-Glykosylierungsstelle vorhanden ist. Die Sequenz von EmBMP2b ist in EmBMP2c ab Met<sub>94</sub> vollständig enthalten, so dass die im vorherigen Abschnitt beschriebenen konservierten Domänen der TGF- $\beta$  Propeptid Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02928; AS 66-166) sowie der TGF- $\beta$  Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02510; AS 253-367) ebenso wie die putative Spleißstelle für Proteasen der subtilisin-like proprotein convertase (SPC) - Familie (R-P-P-R; AS 247-250) auch in EmBMP2c zu finden sind. Zwar ist die Domäne der TGF- $\beta$  Propeptid Superfamilie bei EmBMP2c im N-terminalen Bereich länger als bei EmBMP2b, aber auch hier ist sie laut NCBI CDD Analyse nicht vollständig.

CCGTTTTAGAGCATCAGGACGTGTGTGGAAGAGCAAGCGAGCCAGAGACCAGACCTAGGCCGACCGAGACCACCGGCCAA 80  
 TGCAGAATATCCCTCTGCAAACCTGGCGGATGATAAATCTTTTCGGGTTTCAATTTCAGTCGCCTACCTCAATCACTACGC 160  
 TCGTCTCATCTCTCTCTCGTTTACGCCACAGCTTTCACGTTGGGGGTAGAGGGAGTGTAGAGGAGTGGGCCCGTGC 240

M S A V A C S L H R P T T  
 CCCCCAGATTTTCTAACGCGCCTCTATCAGTCGACTACTGATGAGCGCGGTGCGCTGTTGCTCCACCGCCTACTACGC 320

P T Q S S P S L M K R R H I A E L H L Y R T V G G K G  
 CGACTCAGTCCTCGCCTTCCTTGATGAAAAGAAGACATATAGCTGAATTACATCTCTACCGGACAGTTGGCGGCAAAGGG 400

5140 bp

D L S V L K S Q Q P L P S H N L Q P P S S Y S K K **L** **P**  
 GACCTTTCAGTCCTCAAATCGCAACAGCCACTGCCATCACACAATCTGCAGCCACCCTCGTCGTACAGCAAGAAGTTGCC 480

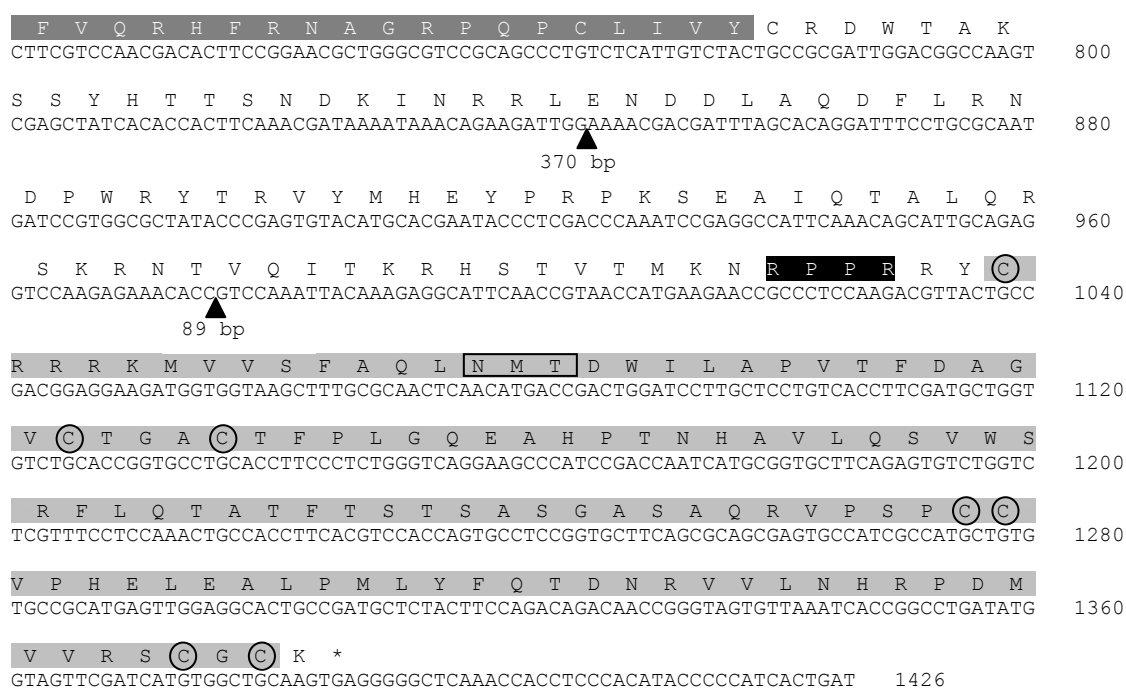
L Q P F I F L K L F Y V K I D S E G R G T L Q L L E  
 ACTGCAACCCCTTTATTTTCTTAAACTTTTCTACGTGAAAATCGACTCAGAAGGAAGGGGAAGTCTTCAACTCCTCGAGA 560

1238 bp

M K R I F R H Y Y G W I V F N I N E A L T H W L H S N  
 TGAAACGCATTTTTCGACATTACTACGGATGGATCGTTTTCAACATTAACGAGGCTCTCACGCACTGGCTTCACTCAAAC 640

Q K N A I K G L I V E A T Y S N R T P I R D R Q E L N  
 CAGAAGAATGCCATTAAGGGCTAATCGTGAAGCGACGTACAGTAACAGGACACCATTTCGAGACCGACAAGAGTTGAA 720

6023 bp



**Abb. 14: *Embmp2c* - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz.**

Gezeigt sind die Nukleotidsequenz der *embmp2c* cDNA (unten) sowie die zugehörige abgeleitete Aminosäuresequenz (oben). Ein Stern markiert das Stoppcodon TGA. Dreiecke zeigen die Position und Länge der Introns. Mit weißen Buchstaben auf dunkelgrauem Hintergrund sind die zur Domäne der TGF- $\beta$  - Propeptid Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02928) zugehörigen Aminosäuren markiert. Die identifizierte Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02510) ist grau hinterlegt und die sieben konservierten Cysteine sind schwarz eingekreist. Die putative Spleißstelle für Proteasen der subtilisin-like proprotein convertase (SPC) - Familie ist durch weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund gekennzeichnet. Die potentielle N-Glykosylierungsstelle ist durch eine schwarze Umrandung gekennzeichnet.

#### 4.6.2. *Embmp2* - Genorganisation

Der chromosomale Locus von *embmp2* umfasst sechs Introns, wobei das erste und zweite Intron alternativ gespleißt werden können und es somit zu drei mRNA Varianten kommt. Bei Spleißvariante a (*embmp2a*) wird das erste Intron mit einer Größe von 1703 bp gespleißt, bei *embmp2b* und *embmp2c* dagegen nicht. Das zweite Intron wird dagegen bei Spleißvariante a (*embmp2a*) genau wie bei Spleißvariante b (*embmp2b*) mit einer Größe von 5072 bp gespleißt, bei Spleißvariante c (*embmp2c*) dagegen mit 5140 bp. Der alternativ gespleißte Exon-Intron Übergang liegt dabei am 3' Spleiß-Akzeptor. Weitere vier Introns sind bei allen *embmp2* Spleißvarianten konserviert und umfassen 1238 bp, 6023 bp, 370 bp und 89 bp. Die Intron-Exon Übergänge entsprechen der GT/AG Regel<sup>258</sup>.

Ein genauer Vergleich der Genorganisation mit homologen Genen anderer Organismen ist nicht möglich, da sich die Introns im wenig konservierten 5' Bereich des Gens befinden. Im hoch konservierten 3' Bereich, der die Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (vgl. 4.6.1) codiert, findet sich hingegen kein Intron. Zusätzlich ist die Genorganisation auch in anderen Organismen sehr heterogen und lässt keinen Rückschluss auf den

phylogenetischen Ursprung von *embmp2* zu. So weisen *bmp2* und *bmp10* aus *H. sapiens* (NCBI Reference Sequences: NM\_001200.2 bzw. NM\_014482.1) sowie alle Varianten von *dpp* aus *D. melanogaster* (vgl. 4.6.1) im konservierten 3' Bereich kein Intron auf. Dagegen findet man in diesem Bereich bei *bmp3* aus *H. sapiens* (NCBI Reference Sequence: NM\_001201.2) ein Intron, bei *bmp7* und *bmp5* aus *H. sapiens* (NCBI Reference Sequences: NM\_001719.2 bzw. NM\_021073.2) dagegen gleich drei Introns.

Exon Nr.	Länge Exon [bp]	5' Spleiß-Donor	3' Spleiß-Akzeptor	Länge Intron [bp]	unterbrochene AS
<i>embmp2a</i>					
1	114	GTG CCT gta tgt	att cag TCG CCT	1703	-
2	223	TAT A gtg agc	ttt cag AT TCC	5072	N <sub>113</sub>
3	206	ATT TTT gta cgt	ttg cag CTT AAA	1238	-
4	160	AAG G gta agt	ttt tag GG CTA	6023	G <sub>34</sub>
5	186	TTG G gta att	ccg cag AA AAC	370	E <sub>96</sub>
6	131	AAC ACC gtg agt	aca tag GTC CAA	89	-
7	409				
<i>embmp2b</i>					
1		nicht gespleißt			
2	361	TAT A gtg agc	ttt cag AT TCC	5072	-
3	206	ATT TTT gta cgt	ttg cag CTT AAA	1238	-
4	160	AAG G gta agt	ttt tag GG CTA	6023	G <sub>34</sub>
5	186	TTG G gta att	ccg cag AA AAC	370	E <sub>96</sub>
6	131	AAC ACC gtg agt	aca tag GTC CAA	89	-
7	409				
<i>embmp2c</i>					
1		nicht gespleißt			
2	361	TAT A gtg agc	atc cag GCT GAA	5140	-
3	138	ATT TTT gta cgt	ttg cag CTT AAA	1238	-
4	160	AAG G gta agt	ttt tag GG CTA	6023	G <sub>127</sub>
5	186	TTG G gta att	ccg cag AA AAC	370	E <sub>189</sub>
6	131			89	-
7	409				

**Abb. 15: *Embmp2a*, *embmp2b* und *embmp2c* - Genorganisation.**

Dargestellt sind die Anzahl und Länge der Exons von *embmp2a*, *embmp2b* und *embmp2c* sowie die Stellen im Gen, an denen die Introns die mRNA unterbrechen. Zusätzlich sind sowohl die Länge der Introns und evtl. unterbrochene Aminosäurecodons des Leserasters dargestellt. Die Sequenzen der Exons sind in Großbuchstaben und die der Introns in Kleinbuchstaben gezeigt.

#### 4.6.3. *Embmp2* - Expressionsprofil

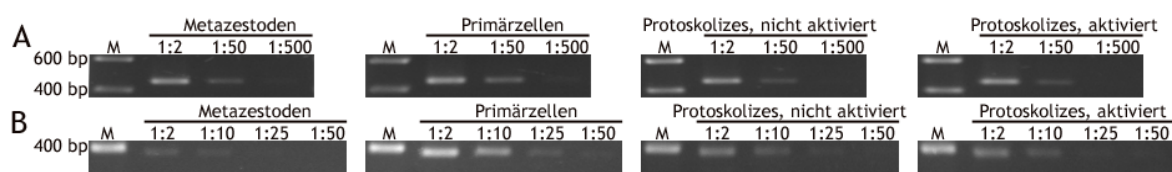
Zur Untersuchung des Expressionsprofils von *embmp2* wurde zunächst die RNA aus Metazestoden mit Brutkapseln, 14 Tage alten ko-kultivierten Primärzellen, aktivierten und nicht aktivierten Protoskolizes gewonnen und cDNA hergestellt (vgl. 6.11). Die cDNA wurde auf Basis des konstitutiv exprimierten Gens *emelp* (451 bp) normalisiert und anschließend eine semi - quantitative PCR für *embmp2* durchgeführt (vgl. 6.12.6)<sup>71</sup>. Aufgrund schwankender Qualität der cDNA im 5' Bereich konnte in diesem Experiment keine Unterscheidung zwischen *embmp2a*, *embmp2b* und *embmp2c* getroffen werden.

Wie in Abb. 16 gezeigt, konnte in allen untersuchten Larvenstadien ein DNA Fragment in der erwarteten Größe (385 bp) amplifiziert werden. Dabei konnte *embmp2* in

Primärzellen bis zu einer cDNA Verdünnung von 1:50 nachgewiesen werden, in Protoskolizes dagegen nur bis zu einer cDNA Verdünnung von 1:25. Bei Metazestoden wurde die Nachweisgrenze für *embmp2* mit dieser Methode bereits bei einer cDNA Verdünnung von 1:10 erreicht.

Auf Basis der vorläufigen Transkriptomdaten wäre die stärkste Expression für alle drei Spleißformen bei aktivierten Protoskolizes zu vermuten gewesen, allerdings unterscheiden sich die Expressionsstärken zwischen Primärzellen, aktivierten und nicht aktivierten Protoskolizes anhand dieser Daten maximal um den Faktor 1,7 (Daten nicht gezeigt). Solch geringe Unterschiede lassen sich mit einer semi - quantitativen PCR nicht eindeutig feststellen. Zusätzlich sollte hier beachtet werden, dass die Transkriptomdaten auf anderen Isolaten basieren (Isolate H95, J31, Java; vgl. 6.18) als in der durchgeführten semi - quantitativen PCR (Isolat G8065).

Übereinstimmend wird *embmp2* allerdings nach beiden Analysemethoden, und folglich auch in verschiedenen Isolaten, zum Einen in Metazestoden am geringsten exprimiert, zum Anderen aber auch in allen anderen Stadien, die während einer Infektion von Zwischen- oder Endwirt auftreten können.



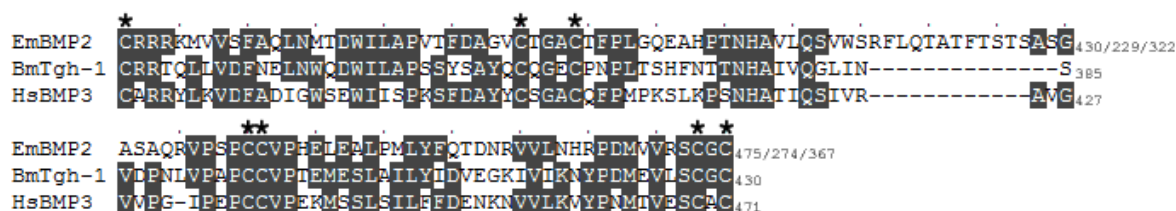
**Abb. 16: *Embmp2* - Expressionsprofil in verschiedenen Larvenstadien.**

Die Expression von *embmp2* wurde mit normalisierter cDNA von Metazestoden (mit Brutkapseln), Primärzellen (14 Tage, Ko-Kultur), nicht aktivierten Protoskolizes und aktivierten Protoskolizes in einer semi - quantitativen PCR getestet (Isolat G8065). Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 2% Agarosegel, gepuffert mit TAE, mit anschließender Färbung der DNA mit Ethidiumbromid. Als Größenmarker (M) wurde der SmartLadder von Eurogentec verwendet. Die Markerbanden sind entsprechend ihrer Größe markiert. A: Gezeigt ist das Expressionsmuster des konstitutiv exprimierten *emelp* (451 bp) in den oben genannten Stadien (von links nach rechts), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:50 und 1:500<sup>71</sup>. B: Gezeigt ist das Expressionsmuster von *embmp2* (385 bp) in den oben genannten Stadien (von links nach rechts), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:10, 1:25 und 1:50.

#### 4.6.4.EmBMP2 - Homologie

Die Homologie zwischen dem C-terminalen EmBMP2 active peptide und vergleichbaren Peptiden anderer Organismen wurde mit Hilfe einer NCBI BLASTP Analyse untersucht. Hierbei zeigte sich mit einem *E*-value von  $8 \times 10^{-20}$  (39% identity) die höchste Homologie zum TGF- $\beta$  like domain containing protein aus *Brugia malayi* (BmTgh-1<sup>173</sup>; NCBI Reference Sequence: XP\_001901880.1), dicht gefolgt von SmBMP aus *S. mansoni* (GenBank: ACG60602.1) mit einem *E*-value von  $2 \times 10^{-19}$  (37% identity). Die höchste Homologie zu humanen BMPs konnte mit einem *E*-value von  $1 \times 10^{-18}$  (38% identity) zu BMP3 festgestellt werden (NCBI Reference Sequence: NP\_001192.1).

Abb. 17 gibt in einem Alignment mit den entsprechenden Domänen der oben genannten Proteine aus *B. malayi* und *H. sapiens* einen Überblick über die konservierten Aminosäuren in diesem Bereich. Besonders deutlich sind die typischen sieben konservierten Cysteine in diesem Bereich zu erkennen.

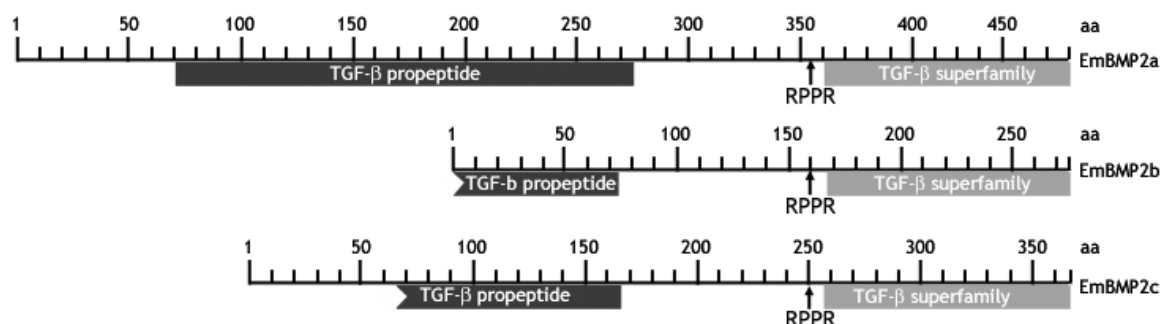


**Abb. 17: EmBMP2 - Alignment des C-Terminus homologer Proteinen.**

Vergleichend sind die Aminosäuresequenzen der hochkonservierten C-terminalen Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (Cluster ID: cI02928) von BMP Homologen Proteinen verschiedener Organismen dargestellt. Neben EmBMP2 sind die entsprechenden Sequenzen eines TGF- $\beta$  like domain containing protein aus *Brugia malayi* (BmTGF-beta like; NCBI Reference Sequence: XP\_001901880.1) und von BMP3 aus *H. sapiens* (HsBMP3; NCBI Reference Sequence: NP\_001192.1) dargestellt. Die Positionen der Aminosäuren sind jeweils rechts der Sequenz angezeigt. Aminosäuren, die in mindestens 2 Sequenzen konserviert sind, sind grau hinterlegt. Die Positionen der sieben konservierten Cysteine innerhalb der Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie sind durch Sterne markiert.

#### 4.6.5. EmBMP2 - Strukturelle Charakterisierung

Zur Übersicht sind in Abb. 18 die Domänenstrukturen von EmBMP2a, b und c in einer schematischen Darstellung abgebildet.



**Abb. 18: EmBMP2a, b und c - Domänenstruktur.**

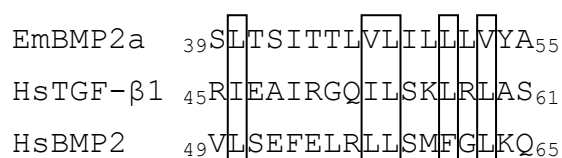
Gezeigt sind die Domänenstrukturen von EmBMP2a, EmBMP2b und EmBMP2c, wobei die Anzahl der enthaltenen Aminosäuren als Skala (oben) angezeigt wird. Die Position der konservierten Domäne der TGF- $\beta$  Propeptid Superfamilie (NCBI Cluster ID: cI02928) ist durch einen dunkelgrauen Balken und die konservierte Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (NCBI Cluster ID: cI02510) durch einen hellgrauen Balken gekennzeichnet. Die Position des charakteristischen Sequenzmotivs zur Abspaltung des Propeptids durch Proteasen der SPC-Familie ist ebenfalls markiert (RPPR).

#### Domäne der TGF- $\beta$ Propeptid Superfamilie

Bei humanem TGF- $\beta$ 1 konnte gezeigt werden, dass zwei Regionen des Propeptids die Ausbildung und Stabilität des large latent complex (LLC) beeinflussen<sup>141</sup>. So werden hydrophobe Aminosäuren einer  $\alpha$ -Helix am N-Terminus des TGF- $\beta$ 1 Propeptids mit der Bindung vom active peptide und dessen Dimerisierung in Zusammenhang gebracht, was zu einer Blockade von Typ II Rezeptor Bindungsstellen führt und damit die Latenz von

TGF- $\beta$ 1 verlängert. Das Propeptid der TGF- $\beta$  Superfamilie wird aufgrund dieser Interaktionen mit dem active peptide auch als latency associated protein (LAP) bezeichnet. Positiv geladene Aminosäuren in dieser Region sowie C<sub>33</sub> werden dagegen mit der Bindung von latent TGF- $\beta$  binding proteins (LTBPs) assoziiert. Bei BMP7 zeigten vorläufige Experimente, dass diese Region eine Rolle bei der Interaktion mit Fibrillin, einem LTBP ähnlichen extrazellulären Matrixprotein, spielt. Des Weiteren konnten am C-Terminus des TGF- $\beta$ 1 Propeptids in einer auffälligen  $\beta$ -Faltblatt -  $\alpha$ -Helix -  $\beta$ -Faltblatt Struktur hydrophobe Aminosäuren identifiziert werden, die eine essentielle Funktion bei der Dimerisierung des Proproteins haben. Zwei weitere Cysteine (C<sub>223</sub> und C<sub>225</sub>) tragen bei humanem TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 und - $\beta$ 3 durch kovalente Bindungen zwischen den Propeptiden zur Stabilität des LLC bei<sup>142</sup>.

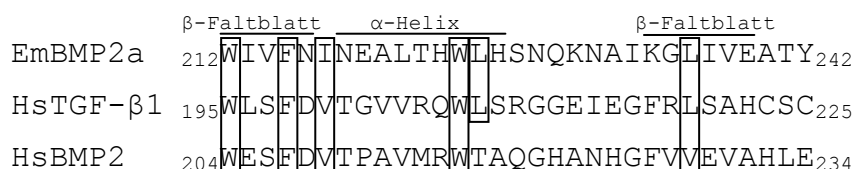
Bei EmBMP2a konnte mit Hilfe von QuickPhyre (Imperial College London) am N-Terminus zwischen den Aminosäuren L<sub>40</sub> und L<sub>60</sub> eine  $\alpha$ -Helix identifiziert werden, die auffallend viele hydrophobe Aminosäuren beinhaltet. Ein Vergleich der Aminosäuren mit humanem TGF- $\beta$ 1 und BMP2 zeigt die konservierten hydrophoben Aminosäuren Leu<sub>40</sub>, Val<sub>47</sub>, Leu<sub>48</sub>, Leu<sub>51</sub> und Val<sub>53</sub> bei EmBMP2a, die vermutlich eine Funktion bei der Interaktion zwischen Propeptid und active peptide haben (Abb. 19). Positiv geladene Aminosäuren, die bei humanem TGF- $\beta$ 1 mit LTBPs interagieren, konnten in EmBMP2a ähnlich wie bei humanem BMP2 nicht identifiziert werden.



**Abb. 19: EmBMP2a Propeptid - konservierte Aminosäuren am N-Terminus.**

Dargestellt ist ein Aminosäurevergleich einer  $\alpha$ -Helix am N-Terminus der Propeptide von EmBMP2a, humanem TGF- $\beta$ 1 (HsTGF- $\beta$ 1; NCBI Reference Sequence: NP\_000651.3) und humanem BMP2 (HsBMP2; NCBI Reference Sequence: NP\_001191.1). Konservierte hydrophobe Aminosäuren mit einer potentiellen Funktion bei der Interaktion von Propeptid und active peptide sind durch einen schwarzen Rahmen gekennzeichnet.

Auch im C-terminalen Bereich des EmBMP2a Propeptids konnte eine zu TGF- $\beta$ 1 homologe Sekundärstruktur identifiziert werden, die mit kurzen Abständen aufeinanderfolgend eine  $\beta$ -Faltblatt -  $\alpha$ -Helix -  $\beta$ -Faltblatt Abfolge aufweist. Bei humanem TGF- $\beta$ 1 zeigten Mutationen in dieser Region, dass sowohl Trp<sub>198</sub> und Trp<sub>207</sub> als auch Phe<sub>198</sub>, Asp<sub>199</sub>, Val<sub>200</sub>, Leu<sub>208</sub>, Phe<sub>217</sub> und Leu<sub>219</sub> Funktionen bei der Dimerisierung des Propeptids hatten, wobei die sechs letztgenannten Aminosäuren essentiell dafür waren<sup>141</sup>. Bei EmBMP2a finden sich mit Trp<sub>212</sub>, Phe<sub>215</sub>, Ile<sub>217</sub>, Trp<sub>224</sub>, Leu<sub>225</sub> und Leu<sub>236</sub> zu humanem TGF- $\beta$ 1 homologe konservierte hydrophobe Aminosäuren mit einer potentiellen Funktion bei der Dimerisierung vom EmBMP2a Propeptid (Abb. 20).



**Abb. 20: EmBMP2a Propeptid - konservierte Aminosäuren am C-Terminus.**

Dargestellt ist ein Aminosäurevergleich eines C-terminalen Abschnitts der Propeptide von EmBMP2a, humanem TGF-β1 (HsTGF-β1; NCBI Reference Sequence: NP\_000651.3) und humanem BMP2 (HsBMP2; NCBI Reference Sequence: NP\_001191.1). Die konservierte Sekundärstruktur aller drei Proteine ist markiert. Konservierte hydrophobe Aminosäuren mit einer potentiellen Funktion bei der Dimerisierung der Propeptide sind durch einen schwarzen Rahmen gekennzeichnet.

Zusammenfassend weist diese strukturelle Charakterisierung darauf hin, dass das EmBMP2a Propeptid mit dem active peptide interagieren und damit zur richtigen Faltung von EmBMP2a beitragen kann. Des Weiteren ist durch die identifizierten konservierten Aminosäuren die Dimerisierung von LAP und active peptide möglich, so dass ein small latent complex (SLC) ausgebildet werden kann. Das Fehlen von positiv geladenen Aminosäuren innerhalb der charakterisierten α-Helix am N-Terminus des Propeptids macht eine Interaktion mit LTBP1 unwahrscheinlich. Allerdings können Interaktionen mit anderen Proteinen nicht ausgeschlossen werden, wie das Beispiel von humanem BMP7 zeigt. Die Affinität des Propeptids zum active peptide ist ähnlich humanem BMP im Vergleich zu humanem TGF-β1 vermutlich schwächer ausgeprägt und auch die stabilisierenden Cysteine der LAP-Dimerisierung am C-Terminus des humanen TGF-β1 Propeptids fehlen bei EmBMP2.

Bei EmBMP2b und EmBMP2c dagegen ist das Propeptid im Vergleich zu homologen Domänen anderer Organismen nur im C-terminalen Bereich konserviert und damit auch nur die in dieser Region liegenden konservierten hydrophoben Aminosäuren, die eine potentielle Funktion bei der Dimerisierung des Propeptids haben.

#### RXXR - Motiv

Proteine der TGF-β Superfamilie werden im Verlauf ihrer Prozessierung durch Furin-like Proteasen der SPC - Familie gespalten, wobei die Konsensussequenz der Spaltstelle (R-X-K/R-R oder R-X-X-R) in verschiedenen Organismen hoch konserviert ist<sup>257</sup>. In allen EmBMP2 Isoformen ist N-terminal der identifizierten Domäne der TGF-β Superfamilie mit R-P-P-R solch eine konservierte Aminosäuresequenz vorhanden. Demnach ist die Möglichkeit der Prozessierung des Proproteins durch Faktoren der SPC - Familie gegeben und folglich auch die Spaltung von Propeptid und active peptide.

#### Domäne der TGF-β Superfamilie

Zytokine der TGF-β Superfamilie sind nur als Hetero- oder Homodimer aktiv, wobei die Peptide durch eine einzige Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden werden. Die restlichen Cysteine dieser Domäne sind essentiell zur Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken und damit zur funktionellen Faltung des active peptide<sup>259</sup>. Dabei werden

bei Proteinen der TGF- $\beta$  Familie und bei Activinen vier solcher kovalenten intramolekularen Bindungen aufgebaut, bei allen anderen Proteinen der TGF- $\beta$  Superfamilie (u.a. BMP Faktoren) dagegen drei<sup>260</sup>.

In allen EmBMP2 Isoformen sind in der identifizierten Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie sieben Cysteine in einer konservierten Abfolge enthalten. Folglich ist die Ausbildung von drei intra- und einer intermolekularen Disulfidbrücke möglich, womit das active peptide eine funktionelle Faltung erreichen kann. Auch die aufgrund der Homologie bereits vorgenommene Zuteilung aller drei EmBMP2 Isoformen in die Gruppe der BMPs wird durch diese strukturelle Charakterisierung verifiziert.

#### **4.7.EmAct - ein Activin A Homolog aus *E. multilocularis***

Mit Hilfe der vorläufigen Sequenzen der Sanger Helminth Genom Initiative wurde ein bisher unbekanntes Activin Homolog in *E. multilocularis* identifiziert. Für diese Analysen wurde die Aminosäuresequenz eines TGF- $\beta$  Homologen aus dem Genom von *Schistosoma mansoni*, TGF-beta family (NCBI Reference Sequence: XP\_002577586.1), als Template in einem TBLASTN-Alignment (WinBlast) herangezogen und auf Contig 2808 (bp 23726-28616) eine putatives Activin aus *E. multilocularis* identifiziert, EmAct (vgl. 6.18).

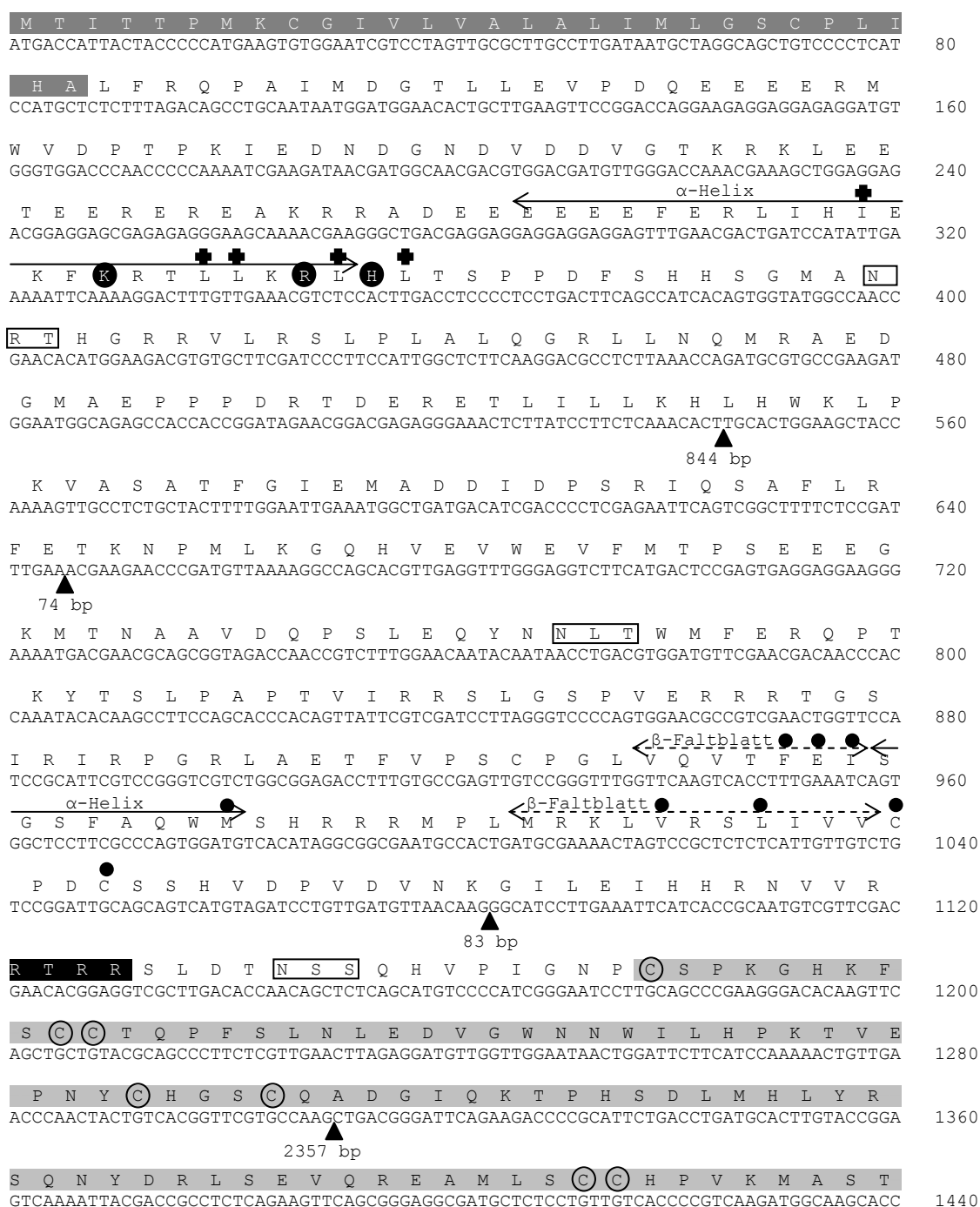
##### **4.7.1.Emact - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz**

Nachdem durch bioinformatische Analysen der konservierte 3' Bereich vom *emact* ORF identifiziert werden konnte (siehe 4.7), wurden zur Amplifikation des gesamten ORF 5' RACEs auf die in der Arbeitsgruppe bereits vorliegende cDNA - Bibliothek durchgeführt (vgl. 6.9). In den entsprechenden PCRs wurden die Oligonukleotide pJG4-5 dw und EmTGFbeta up1 verwendet, zur anschließenden Amplifikation des ORF dagegen EmINHL dw und EmTGFbeta up1 (vgl. 6.10 und 6.12.7). Der amplifizierte ORF von *emact* wurde mit dem PCR Cloning Kit von Qiagen in den Vektor pDrive zwischenkloniert (vgl. 6.12.9). Die Sequenz von *emact* wurde durch die Sequenzierung mehrerer plasmidhaltiger Kolonien verifiziert.

Auf Basis der cDNA 5' RACEs konnte keine 5' UTR und auch keine Spliced-Leader Sequenz identifiziert werden. Die codierende Sequenz umfasst 1521 bp und codiert 507 Aminosäuren des Präproteins EmAct (siehe Abb. 21). Mit Hilfe des CBS SignalP 3.0 Servers (DTU) konnten die Aminosäuren 1-29 als putatives Signalpeptid identifiziert werden, mit der wahrscheinlichsten Spaltstelle zwischen Ala<sub>29</sub> und Leu<sub>30</sub>. Nach der Abspaltung dieses Signalpeptids umfasst das EmAct Proprotein 478 Aminosäuren und erreicht ein theoretisches Molekulargewicht von 55 kDa (ExpASy, SIB). Alle weiteren Angaben zu den Positionen von Aminosäuren beziehen sich allerdings auf das



Präproprotein von EmAct. Mit Hilfe des NetNGlyc 1.0 Servers (DTU) konnten mit den Aminosäuren Asn<sub>133</sub>, Asn<sub>257</sub> und Asn<sub>382</sub> drei potentielle N-Glykosylierungsstellen identifiziert werden. Die Sekundärstruktur des Propeptids wurde mit Hilfe von QuickPhyre vom Imperial College London untersucht (siehe auch 4.7.5). Des Weiteren wurde der C-terminale Bereich zwischen den Aminosäuren Cys<sub>393</sub> und Cys<sub>506</sub> als Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie identifiziert (NCBI CDD; Cluster ID: cl02510 bzw. EMBL SMART), wobei die Aminosäuren 374 - 377 mit der Sequenz Arg-Thr-Arg-Arg eine putative Spaltstelle für Proteasen der subtilisin-like proprotein convertase (SPC) - Familie zur Abspaltung des Propeptids vom C-terminalen aktiven Peptid darstellen<sup>257</sup>.



S V L Y V D P D N E L H M D T L H N I I V L E C G C S  
 AGTGTGCTCTACGTGGATCCCGACAATGAGTTGCACATGGACACCCTTCACAACATCATTGTCCTAGAGTGCGGTTGTAG 1520

\*

TTGAGGCGTTATC 1533

#### Abb. 21: *Emact* - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz.

Gezeigt sind die Nukleotidsequenz der *emact* cDNA (unten) sowie die zugehörige abgeleitete Aminosäuresequenz (oben). Ein Stern markiert das Stoppcodon TGA. Dreiecke zeigen die Position und Länge der Introns. Aminosäuren des identifizierten Signalpeptids sind weiß auf dunkelgrauem Hintergrund dargestellt. Die identifizierte Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02510) ist grau hinterlegt und die neun konservierten Cysteine sind schwarz eingekreist. Die putative Spleißstelle für Proteasen der subtilisin-like proprotein convertase (SPC) - Familie ist durch weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund gekennzeichnet. Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind durch eine schwarze Umrandung gekennzeichnet. Hydrophobe Aminosäuren mit einer potentiellen Funktion bei der Formation des SLC-Komplexes sind durch Kreuze gekennzeichnet. Dagegen sind konservierte Aminosäuren mit einer potentiellen Funktion bei der LAP-Dimerisierung durch schwarze Punkte markiert. Positiv geladene Aminosäuren mit einer potentiellen Funktion bei der Komplexbildung mit LTBP sind als weiße Buchstaben vor kreisförmigem schwarzem Hintergrund dargestellt. Die identifizierten konservierten Sekundärstrukturen im Bereich des Propeptids sind durch Pfeile markiert ( $\alpha$ -Helix: durchgezogene Linie;  $\beta$ -Faltblatt: gestrichelte Linie).

#### 4.7.2. *Emact* - Genorganisation

Der chromosomale Locus von *emact* ist in fünf Exons organisiert, die 544 bp, 101 bp, 438 bp, 226 bp und 212 bp umfassen. Die Intron-Exon Übergänge entsprechen der GT/AG Regel<sup>258</sup>. Die vier Introns haben eine Größe von 844 bp, 74 bp, 83 bp und 2357 bp, wobei sich das letzte Intron im konservierten 3' Bereich der kodierenden Sequenz von *emact* befindet. Das homologe Gen *inhba* aus *H. sapiens* (NCBI Reference Sequence: NM\_002192.2) ist dagegen in drei Exons organisiert, wobei die Introns im nicht konservierten 5' Bereich zu finden sind. Da *emact* wie alle Vertreter der TGF- $\beta$  Superfamilie im 5' Bereich nur gering konserviert ist, kann ein genauer Vergleich der Genorganisation mit diesen homologen Genen anderer Organismen in diesem Bereich nicht durchgeführt werden. Der konservierte 3' Bereich, der die Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie codiert, ist im Unterschied zu homologen Genen anderer Organismen bei *emact* in zwei Exons organisiert (Exon 4 und 5). So befindet sich sowohl bei *hsinhba* als auch bei *tgf-beta family* aus *S. mansoni* (*sminact*; NCBI Reference Sequence: XM\_002577540.1) in dieser Region kein Intron.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist ein enges verwandtschaftliches Verhältnis zwischen *emact* und *hsinhba* bzw. *sminact* unwahrscheinlich.

Exon Nr.	Länge Exon [bp]	5' Spleiß-Donor	3' Spleiß-Akzeptor	Länge Intron [bp]	unterbrochene AS
1	544	CAC T gta aga	ttt cag TG CAC	844	L <sub>182</sub>
2	101	TTT GAA gtg agt	cga tag ACG AAG	74	-
3	438	AAC AAG gta cgt	ttt cag GGC ATC	83	-
4	226	CAA G gtg agt	ttt cag CT GAC	2357	A <sub>437</sub>
5	212				

**Abb. 22: *Emact* - Genorganisation.**

Dargestellt sind die Anzahl und Länge der Exons von *emact* sowie die Sequenzen der 5' Spleiß - Donoren und 3' Spleiß-Akzeptoren. Zusätzlich sind sowohl die Länge der Introns als auch unterbrochene Aminosäurecodons des Leserasters dargestellt. Die Sequenz an den Spleißstellen ist für die Exons in Großbuchstaben und für die Introns in Kleinbuchstaben gezeigt.

#### 4.7.3. *Emact* - Expressionsprofil

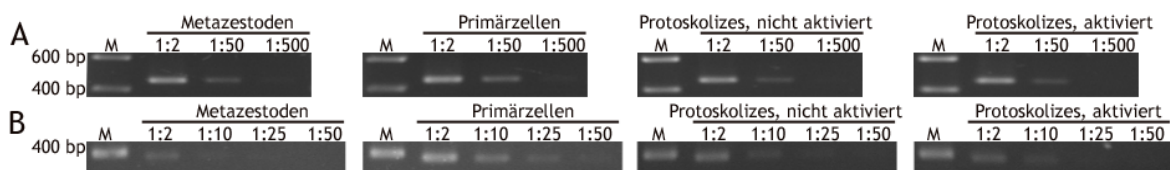
Um das Expressionsprofil von *emact* in verschiedenen Larvenstadien vergleichend untersuchen zu können, wurde zunächst cDNA aus Metazestoden mit Brutkapseln, Primärzellen (14 Tage in Ko-Kultur), aktivierten Protoskolizes und nicht aktivierten Protoskolizes hergestellt (Isolat G8065; vgl. 6.17.1 und 6.11). Anschließend wurde die cDNA auf Basis des konstitutiv exprimierten Gens *emelp* (451 bp) normalisiert und eine semi - quantitative PCR für *emact* durchgeführt (vgl. 6.12.6)<sup>71</sup>. Dabei konnte in allen untersuchten Stadien ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe (384 bp) amplifiziert werden.

Wie in Abb. 23 gezeigt, konnte das spezifische Fragment von *emact* in Primärzellen bis zu einer 1:25 Verdünnung der cDNA nachgewiesen werden. In aktivierten und nicht aktivierten Protoskolizes wurde die Nachweisgrenze bereits bei einer 1:10 Verdünnung der cDNA erreicht und in Metazestoden schon bei einer 1:2 Verdünnung der cDNA. Diese Ergebnisse deuten auf eine stadienspezifische Expression von *emact* im Isolat G8065 hin, wobei die Expression in Primärzellen am stärksten und in Metazestoden am schwächsten ist.

Die Analyse der vorläufigen Transkriptomdaten zeigte ein anderes Bild. Nach diesen Daten wird *emact* in aktivierten Protoskolizes 6,7-fach stärker als in Metazestoden exprimiert und 4-fach stärker als in Primärzellen (Daten nicht gezeigt). In nicht aktivierten Protoskolizes wird *emact* dagegen überhaupt nicht exprimiert (Daten nicht gezeigt). Bei diesen Analysen darf allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass die Transkriptomdaten auf den Isolaten H95, J31 und Java basieren während bei der semi - quantitativen PCR das Isolat G8065 verwendet wurde. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Analysen auf die Verwendung verschiedener Isolate zurückzuführen ist.

Trotz aller Unterschiede in der Analyse der Genexpression von *emact* stimmen die Ergebnisse in einem wesentlichen Punkt überein: *emact* wird in allen Stadien von

*E. multilocularis* exprimiert, die in direkten Kontakt mit Zellen des Zwischen-, Fehl- oder Endwirts kommen (Metazestoden, Primärzellen, aktivierte Protoskolizes).



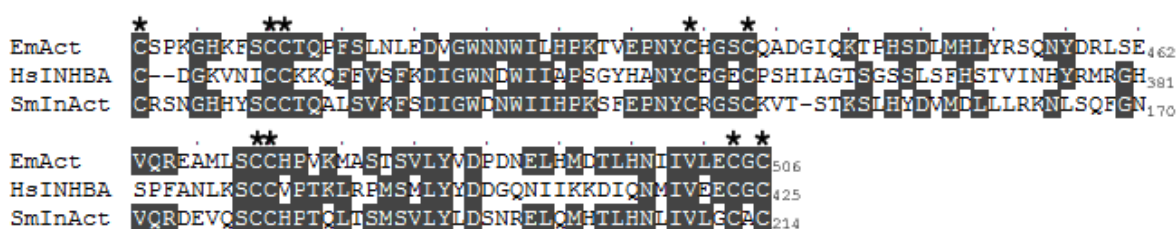
**Abb. 23: *Emact* - Expressionsprofil in verschiedenen Larvenstadien.**

Die Expression von *emact* wurde mit normalisierter cDNA von Metazestoden (mit Brutkapseln), Primärzellen (14 Tage, Ko-Kultur), nicht aktivierten Protoskolizes und aktivierten Protoskolizes in einer semi - quantitativen PCR getestet. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 2% Agarosegel, gepuffert mit TAE, mit anschließender Färbung der DNA mit Ethidiumbromid. Als Größenmarker (M) wurde der SmartLadder von Eurogentec verwendet. Die Markerbanden sind entsprechend ihrer Größe markiert. A: Gezeigt ist das Expressionsmuster des konstitutiv exprimierten *emelp* (451 bp) in den oben genannten Stadien (von links nach rechts), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:50 und 1:500<sup>71</sup>. B: Gezeigt ist das Expressionsmuster von *emact* (384 bp) in den oben genannten Stadien (von links nach rechts), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:10, 1:25 und 1:50.

#### 4.7.4. EmAct - Homologie

Die Homologie zwischen dem EmAct Präproprotein und vergleichbaren Proteinen anderer Organismen wurde mittels einer NCBI BLASTP Analyse untersucht (vgl. 6.18). Dabei fand sich mit einem *E*-value von  $1 \times 10^{-40}$  die höchste Homologie zu TGF-beta family aus *S. mansoni* (SmlnAct<sup>172</sup>; NCBI Reference Sequence: XP\_002577586.1). Dagegen zeigte ein Vergleich mit humanen Activin A (Inhibin-B A (INHBA); NCBI Reference Sequence: NP\_002183.1) mit einem *E*-value von  $2 \times 10^{-13}$  eine deutlich geringere Homologie. Die Homologie zu Tgh-2 aus *B. malayi* (GenBank: AAD19903.1) lag mit einem *E*-value von  $3 \times 10^{-12}$  in einem ähnlichen Bereich. Ein vergleichbares Bild zeigte sich bei einer NCBI BLAST Analyse des EmAct active peptide. Auch hier wurde mit einem *E*-value von  $9 \times 10^{-31}$  (51% identity) die höchste Homologie zu SmlnAct aus *S. mansoni* festgestellt, wohingegen Activin A aus *H. sapiens* mit einem *E*-value von  $2 \times 10^{-12}$  (33% identity) vergleichbare Homologiewerte zu EmAct zeigte wie BmTgh-2 aus *B. malayi* mit einem *E*-value von  $3 \times 10^{-12}$  (25% identity).

Die C-terminale Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilien (NCBI Cluster ID: cl02510) wurde für ein Alignment von EmAct und homologen Proteinen anderer Organismen herangezogen (Abb. 24). Dabei sind deutlich die konservierten neun Cysteine in diesem Bereich zu erkennen.

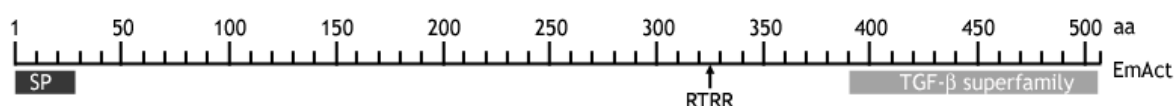


**Abb. 24: EmAct - Alignment des C-Terminus homologer Proteine.**

Vergleichend sind die Aminosäuresequenzen der hochkonservierten C-terminalen Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02510) von homologen Proteinen verschiedener Organismen dargestellt. Neben EmAct sind die entsprechenden Sequenzen von Activin A aus *H. sapiens* (HsINHBA; NCBI Reference Sequence: NP\_002183.1) und von Act aus *S. mansoni* (SmInAct; NCBI Reference Sequence: XP\_002577586.1<sup>172</sup>) dargestellt. Die Positionen der Aminosäuren sind jeweils rechts der Sequenz angezeigt. Aminosäuren, die in mindestens 2 Sequenzen konserviert sind, sind grau hinterlegt. Die Positionen der neun konservierten Cysteine innerhalb dieser Domäne sind durch Sterne markiert.

#### 4.7.5. EmAct - Strukturelle Charakterisierung

Zur Übersicht ist in Abb. 25 die Domänenstruktur von EmAct in einer schematischen Darstellung abgebildet.



**Abb. 25: EmAct - Domänenstruktur.**

Gezeigt ist die Domänenstruktur von EmAct, wobei die Anzahl der Aminosäuren als Skala (oben) angezeigt wird. Die Position des Signalpeptids (SP) ist durch einen dunkelgrauen Balken und die konservierte Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02510) durch einen hellgrauen Balken gekennzeichnet. Die Position des Sequenzmotivs zur Abspaltung des Propeptids durch Proteasen der SPC-Familie ist ebenfalls markiert (RTRR).

#### Signalpeptid

Am N-Terminus des EmAct Präproteins wurde im Bereich der ersten dreißig Aminosäuren ein Signalpeptid identifiziert. Entsprechend liegt die wahrscheinlichste Spaltstelle zwischen Ala<sub>29</sub> und Leu<sub>30</sub> (vgl. 4.7.1). Damit ist die Sekretierung von EmAct durch bereits bekannte Mechanismen wahrscheinlich.

#### Propeptid

Im Bereich des EmAct Propeptids konnte durch bioinformatische Analysen keine konservierte Domäne der TGF- $\beta$  Propeptid Superfamilie identifiziert werden, wie bei EmBMP2a (vgl. 4.6.5). Allerdings finden sich auch im EmAct Proprotein konservierte Strukturen, die nach Walton *et al.* zur Ausbildung des LLC essentiell sind<sup>141</sup>. So konnten mit Ile<sub>106</sub>, Leu<sub>113</sub>, Leu<sub>114</sub>, Leu<sub>117</sub> und Leu<sub>119</sub> hoch konservierte hydrophobe Aminosäuren in einer  $\alpha$ -Helix am N-Terminus des EmAct Propeptids identifiziert werden, die in humanen Proteinen der TGF- $\beta$  Superfamilie eine Funktion bei der Ausbildung des SLC haben und zur funktionellen Faltung des gebundenen active peptide wichtig sind (Abb. 26). Weiterhin werden durch diese Interaktion von Propeptid und active peptide bei humanem TGF- $\beta$ 1 die Typ II Rezeptor Bindungsstellen blockiert und damit die Latenz

von TGF- $\beta$ 1 verlängert. Bei humanem TGF- $\beta$ 1 konnten innerhalb dieser  $\alpha$ -Helix des Propeptids zusätzlich vier positiv geladene Aminosäuren charakterisiert werden, die mit LTBP interagieren (Arg<sub>45</sub>, Arg<sub>50</sub>, Lys<sub>56</sub>, Arg<sub>58</sub>)<sup>141</sup>. Bei EmAct sind mit Lys<sub>110</sub> und Arg<sub>116</sub> zwei dieser Aminosäuren hoch konserviert und berücksichtigt man His<sub>105</sub> und His<sub>118</sub>, die bei physiologischen pH-Werten potentiell positiv geladen sind, steigt die Zahl der vermutlich an Interaktionen mit einem LTBP beteiligten Aminosäuren auf drei (Abb. 26). Damit wären Interaktionen zwischen dem EmAct Proprotein und dem EmAct active peptide sowie zwischen dem EmAct Proprotein und einem LTBP möglich.

```

EmAct      105 H I E K F K R T L L K R L H L T 120
HsTGF- $\beta$ 1  45 R I E A I R G Q I L S K L R L A S 61

```

**Abb. 26: EmAct Propeptid - konservierte Aminosäuren am N-Terminus.**

Gezeigt ist ein Aminosäurevergleich einer  $\alpha$ -Helix am N-Terminus der Propeptide von EmAct und humanem TGF- $\beta$ 1 (HsTGF- $\beta$ 1; NCBI Reference Sequence: NP\_000651.3). Konservierte hydrophobe Aminosäuren mit einer potentiellen Funktion bei der Interaktion von Propeptid und active peptide sind durch einen schwarzen Rahmen gekennzeichnet. Aminosäuren, die bei physiologischen pH-Werten positiv geladen sind und auch bei EmAct eine potentielle Funktion bei einer Interaktion mit LTBP haben, sind dagegen weiß auf grauem Hintergrund dargestellt.

Am C-Terminus des EmAct Propeptids befindet sich, wie bei humanem TGF- $\beta$ 1, eine auffällige  $\beta$ -Faltblatt -  $\alpha$ -Helix -  $\beta$ -Faltblatt Abfolge, direkt gefolgt von zwei Cysteinen. Innerhalb dieser Region konnten beim humanem TGF- $\beta$ 1 Propeptid die Aminosäuren Phe<sub>198</sub>, Asp<sub>199</sub>, Val<sub>200</sub>, Leu<sub>208</sub>, Phe<sub>217</sub> und Leu<sub>219</sub> sowie Cys<sub>223</sub> und Cys<sub>225</sub> als essentiell zur Dimerisierung des LAP identifiziert werden, wobei durch die beiden Cysteine intermolekulare Disulfidbrücken aufgebaut werden, die innerhalb der TGF- $\beta$  Superfamilie einzigartig für TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 und - $\beta$ 3 sind<sup>141-142</sup>. Bei EmAct konnte mit Phe<sub>317</sub>, Glu<sub>318</sub>, Ile<sub>319</sub>, Met<sub>327</sub>, Val<sub>340</sub> und Leu<sub>343</sub> eine vergleichbare Abfolge hydrophober bzw. negativ geladener Aminosäuren identifiziert werden, denen mit Cys<sub>347</sub> und Cys<sub>350</sub> zwei Reste zum Aufbau einer kovalenten intramolekularen Bindung folgen. Es wird vermutet, dass durch diese Bindung die Affinität zwischen active peptide und LAP gegenüber dem TGF- $\beta$  Rezeptorkomplex erhöht und damit die Latenz des LLC verlängert wird.

```

                 $\beta$ -Faltblatt   $\alpha$ -Helix                 $\beta$ -Faltblatt
EmAct      310 P G L V Q V T F E I S G S F A Q W M S H R R R M P L M R K L V R S L I V V C P D C 350
HsTGF- $\beta$ 1  193 P - - E W L S F D V T G V V R Q W L S R - - - - G G E I E G F R - L S A H C S - C 225

```

**Abb. 27: EmAct Propeptid - konservierte Aminosäuren am C-Terminus.**

Gezeigt ist ein Aminosäurevergleich eines C-terminalen Abschnitts der Propeptide von EmAct und humanem TGF- $\beta$ 1 (HsTGF- $\beta$ 1; NCBI Reference Sequence: NP\_000651.3). Die konservierte Sekundärstruktur beider Proteine ist markiert. Konservierte hydrophobe Aminosäuren mit einer potentiellen Funktion bei der Dimerisierung der Propeptide sind durch einen schwarzen Rahmen gekennzeichnet. Cysteine, die vermutlich eine kovalente intramolekulare Bindung zwischen zwei Propeptiden aufbauen, sind dagegen in Weiß auf schwarzem Hintergrund dargestellt.

Zusammenfassend deuten die im Propeptid von EmAct identifizierten konservierten Aminosäuren auf die Möglichkeit zur Ausbildung eines large latent complex (LLC) hin, das aus einem active peptide Dimer, einem LAP Dimer und LTBP besteht. Die Cysteine

am C-Terminus des EmAct Propeptids deuten zusätzlich auf die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen zwei dimerisierten LAPs hin, was wiederum eine hohe Stabilität des LLC zur Folge hat und damit die Latenz des active peptide verlängert.

#### RTRR-Motiv

N-terminal der identifizierten Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02510) konnte bei EmAct mit der Aminosäureabfolge R-T-R-R eine konservierte Spaltstelle für Proteasen der SPC - Familie identifiziert werden (vgl. 4.6.5)<sup>257</sup>. Demnach ist bei EmAct eine Möglichkeit zur Prozessierung des Proproteins durch Faktoren der SPC - Familie gegeben. Die Spaltung des Proproteins in LAP und active peptide ist demnach wahrscheinlich.

#### Domäne der TGF- $\beta$ Superfamilie

Die bereits bei EmBMP2 beschriebene Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl02510) konnte auch bei EmAct identifiziert werden (vgl. 4.6.5)<sup>259-260</sup>.

Im Unterschied zu EmBMP2 sind im EmAct active peptide neun Cysteine in einer konservierten Abfolge enthalten. Demnach können bei EmAct vier intra- und eine intermolekulare Disulfidbrücke ausgebildet werden, um eine funktionelle Faltung und die Dimerisierung des EmAct active peptide zu erreichen. Innerhalb der humanen TGF- $\beta$  Superfamilie ist diese Anzahl an Disulfidbrücken typisch für die TGF- $\beta$  Familie und Activine. Die Eingruppierung von EmAct als Inhibin Homolog, welche aufgrund der Homologie zu humanem Activin A (Inhibin beta A) bereits vorgenommen wurde, konnte somit durch diese neun charakteristischen Cysteine im C-terminalen Bereich von EmAct verifiziert werden (vgl. 4.7.4).

#### **4.8.EmNlg1 - ein Noggin-like Homolog aus *E. multilocularis***

Mit Hilfe der vorläufigen Sequenzen der Sanger Helminth Genom Initiative wurde ein bisher unbekanntes Noggin Homolog in *Echinococcus multilocularis* identifiziert. Für diese Analysen wurde die Aminosäuresequenz des humanen Noggin Precursor Proteins (NCBI Reference Sequence: NP\_005441.1) als Template in einem TBLASTN-Alignment (Version 2.2.13) herangezogen und auf Contig 2918 (bp 39541-45891) ein putatives homologes Protein aus *E. multilocularis* identifiziert (vgl. 6.18). Wie in Abb. 32 gezeigt, wurde in der konservierten Noggin-Domäne eine über 60 Aminosäuren lange Insertion identifiziert. Vergleichbare Insertionen wurden bereits bei Noggin-like Proteinen von *Dugesia japonicum* (GenBank: BAC05684.1) und *Schmidtea mediterranea* (*smed-nlg1* bis *smed-nlg8*) gefunden<sup>193-194</sup>. Dementsprechend wurde das neue Noggin-like Gen aus *E. multilocularis* *emnlg1* genannt.

#### 4.8.1. *Emnlg1* - cDNAs und abgeleitete Aminosäuresequenz

Zur Identifikation der mRNA und des ORF von *emnlg1* wurden das 5' Ende sowie das 3' Ende der zugehörigen cDNA durch RACEs auf die in der Arbeitsgruppe bereits vorliegende cDNA-Bibliothek amplifiziert (vgl. 6.9). Die Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass der komplette ORF von *emnlg1* amplifiziert wurde (pJG4-5 dw x NogginA up1 bzw. NogginA dw1 x pJG4-5 up; vgl. 6.10 und 6.12.7). Zusätzlich wurde der ORF mit den Oligonukleotiden EmnogA dw1.0 und EmnogA up0.1 aus Metazestoden cDNA amplifiziert und in pDrive kloniert. Durch die Sequenzierung mehrerer plasmidhaltiger Kolonien wurde die Sequenz des ORF von *emnlg1* verifiziert.

Ein nicht kodierender Bereich vor dem Startcodon konnte, ebenso wie ein Spliced-Leader am 5'-Ende der cDNA, nicht identifiziert werden. Die codierende Sequenz von *emnlg1* umfasst 1077 bp und codiert 359 Aminosäuren des Proteins EmNlg1 (vgl. Abb. 28). Mit Hilfe des SignalP 3.0 Servers vom Center for Biological Sequence Analysis der Technical University of Denmark (CBS SignalP 3.0 Server, DTU) konnten die Aminosäuren 1-16 als Signalpeptid identifiziert werden, mit der wahrscheinlichsten Spaltstelle zwischen Gly<sub>16</sub> und Lys<sub>17</sub>. Nach der Abspaltung dieses Signalpeptids hat EmNlg1 eine Länge von 343 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 39,1 kDa (ExpAsy, SIB). Alle folgenden Angaben zu Positionen von Aminosäuren beziehen sich auf die nicht modifizierte Form von EmNlg1. Durch das Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) vom EMBL Heidelberg konnte in der abgeleiteten Aminosäuresequenz eine Noggin Domäne (AS 92-359; pfam05806) identifiziert werden. Die neun konservierten Cysteine innerhalb dieser Domäne sind notwendig zur Formung des typischen 12-membered cysteine knot (10-membered ring)<sup>181</sup>. Zusätzlich konnten mit Hilfe des NetNGlyc 1.0 Servers vom Centre for Biological Sequence Analysis der Technical University of Denmark (CBS NetNGlyc 1.0 Server, DTU) zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen identifiziert werden (Asn<sub>158</sub> und Asn<sub>180</sub>). Details zu den durchgeführten bioinformatischen Analysen finden sich in Kapitel 6.18.

```

M I F F F V L S C S I S L G F G K P S A H P G L S I V
ATGATTTTCTTCTTTGTCTATCTTGCTCGATTTTCATTAGGCTTTGGAAAACCCCTGCCCCATCCAGGTTTGTGCGATAGT 80

T T S V G G A G P H L I P K N A D Y S R K V S V S V
GACGACAAGTGTGGTGGAGCAGGACCTCATCTTATACCCAAAAATGCCGATTACTCCCGAAAAGTCAGCGTCAGTGTGCG 160

G S V L N Q Q E A A A A A A S S T T D H P R G T V G T
GTTCTGTCTTGAATCAGCAGGAAGCTGCCGCTGCAGCAGCCAGTTCACCACTGACCATCCTCGCGGAACAGTTGGCACT 240

R S V S V Y D D P T A L R L H T S V L N A Y P S R F D
CGCTCGGTTTCCGCTACGATGATCCAACAGCTCTACGACTTCACACTTCGGTGTGAATGCCTACCCATCTCGATTTGA 320

I S N F H G E K I N S A A I L Y L Q P D L S Q G T V
CATCAGCAACTTCCATGGGGAGAAGATCAACAGCGCAGCTATTTTGTATCTCCAGCCTGATCTTAGTCAGGGGACCCTGTC 400

A K L R V I L G A D Y D H A W M S V E P R P P G N E T
CCAACCTGCGGGTGTATTTTGGGTGCCGACTATGACCATGCTTGGATGTGCGGTAGAACCCGACCACCTGGAACCGAGACG 480

T G Y P P S E S R Q R L L R Q V E A F N F S I F D E V
ACGGGCTACCCACCATCAGAGTCCAGGCAACGCCTCTACGGCAGGTGGAAGCTTTCATTTTCAGTATTTTTTGACGAAGT 560

```



S G A E H Q E V A L S A K E S A M L R K W L V Q R V CTCTGGTGC GGAGCATCAGGAGGTCGCGTTGAGTGCGAAAAGAGTCAGCTATGCTCAGGAAGTGGTTGGTTCAGCGTGTGG	640
D (C) P V Q Y V W R D N G N R Y W P R W I R H A V (C) K E ACTGTCCAGTGCAATATGTATGGCGCGACAATGGTAATCGATACTGGCCTAGGTGGATTGACATGCAGTATGCAAGGAG	720
A V V (C) S W P P G M Q (C) R P S G T K T L T L L R W Y (C) GCTGTGTCTGCTCCTGGCCCCCTGGGATGCAATGCAGACCCAGTGAACCAAAACCCTGACGCTACTTAGATGGTATTG	800
5011 bp	
T K Q T P E E V Q K R A R R N Y L R R A R S L Y N Q TACAAAACAGACTCCGGAGGAGGTTCAAAAACGTGCACGACGCAATTACCTTCGACGTGCAAGGTCACCTCTACAATCAAG	880
G G A T Y S T H Y K R G P R R A E G V R R R F T R E E GAGGTGCGACTTACTCGACCCACTACAAGAGGGGGCTCGAAGGGCCGAAGGAGTGCGCAGGCGGTTACGCGGTGAGGAG	960
R R T K R V K R L V R Q L S R S F R E Y Y (C) E W H R D CGAAGGACGAAGCGAGTGAAGCGATTGGTTAGACAGCTAAGTCGCAGTTTTTCGAGAGTACTACTGCGAATGGCATCGGGA	1040
T Y T L Q P E (C) S (C) M (C) * CACCTACACGCTACAACCGAGTGCAGCTGCATGTGTTGA	1080

**Abb. 28: *Emnl1* - ORF und abgeleitete Aminosäuresequenz.**

Gezeigt sind die Nukleotidsequenz der *emnl1* cDNA (unten) sowie die zugehörige abgeleitete Aminosäuresequenz (oben). Ein Stern markiert das Stoppcodon TGA. Dreiecke zeigen die Position und Länge des chromosomalen Introns. Aminosäuren des identifizierten Signalpeptids sind weiß auf dunkelgrauem Hintergrund dargestellt. Die identifizierte Noggin Domäne (pfam05806) ist grau hinterlegt und die neun konservierten Cysteine sind schwarz eingekreist. Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind durch eine schwarze Umrandung gekennzeichnet.

Es wurden zwei Spleißvarianten der *emnl1* cDNA identifiziert, die sich im Bereich der 3' UTR unterscheiden: bei Spleißvariante 1 umfasst dieser Bereich 260 bp, bei Spleißvariante 2 dagegen 216 bp (vgl. Abb. 29).

<b>A</b>	
ACAGTTTAAATTGTGTTCCCTCCCTCCGCCCTTATGGCTCAGATACTTTCATTGCAAACCATTTTCCTTTTCGATTACCAGA	80
CGCAGTTGACTACAACCTCCCCCAAACTACTTAGGGGTATACCTGTAACATATCTTCCACCTTTCCCTTTTACATCGC	160
ATTTCACTGAACTGTTGCTTGCCTTTTGTGAATACAACCTACTACTTTCAAAAATTCATAAGTAGCTACCATAAATAT	240
ATTTCAAAAAGTGTATGA	260
<b>B</b>	
ACAGTTTAAATTGTGTTCCCTCCCTCCGCCCTTATGGCTCAGATACTTTCATTGCAAACCATCTTCCCTTTTCGATTACCAGA	80
CGCAGTTGACTACAACCTCCCCACAACCTACTTAGGGGTATACCTGTAACATATCTTCCACCTTTCCCTTTTACATCGC	160
ATTTCACTGAACTGTTGCTTGCCTTTTGTGAATACAACCTACTACTTTCAAAAAGAGA	220

**Abb. 29: *Emnl1* - 3' UTR der cDNA.**

Gezeigt sind die zwei Spleißvarianten der 3' UTR der *emnl1* cDNA (ohne polyA - Bereich). Der sich unterscheidende Bereich der Sequenz ist grau hinterlegt. A: Spleißvariante a; B: Spleißvariante b.

#### 4.8.2. *Emnl1* - Genorganisation

Der chromosomale Locus von *emnl1* umfasst ein Intron mit der Länge von 5011 bp. Die Intron-Exon Übergänge entsprechen der GT/AG Regel<sup>258</sup>. Im Vergleich zu homologen Genen anderer Organismen ist dies sehr ungewöhnlich, da der kodierende Bereich in der Regel in einem einzigen Exon organisiert ist. Dies findet man z.B. bei *smnoggin* aus *S. mansoni* (NCBI Reference Sequence: XM\_002578770.1), bei *dmtrk* aus *Drosophila melanogaster* (NCBI Reference Sequence: NM\_057419.2) oder bei *hsnog* aus *H. sapiens* (NCBI Reference Sequence: NM\_005450.4). Für Noggin-like Proteine aus *D. japonica* und *S. mediterranea* konnten diesbezüglich leider keine ausreichenden Informationen in den einschlägigen Datenbanken gefunden werden.

Dieses vorläufige Ergebnis lässt darauf schließen, dass es keinen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung von *emnlg1* und Noggin kodierenden Genen in den Gruppen der Trematoda oder Deuterostoma gibt.

Exon Nr.	Länge Exon [bp]	5' Spleiß-Donor	3' Spleiß-Akzeptor	Länge Intron [bp]	unterbrochene AS
1	795	AGA TGG gtg agt	ttg cag TAT TGT	5011	-
2	282				

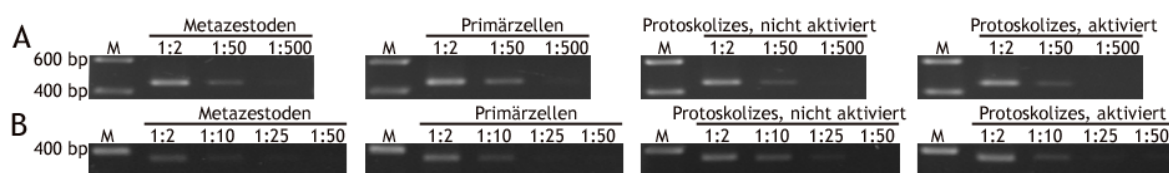
#### Abb. 30: *Emnlg1* - Genorganisation.

Dargestellt sind die Anzahl und Länge der Exons sowie die Stellen im Gen, an denen die Introns die mRNA unterbrechen. Weiterhin sind sowohl die Länge der Introns als auch unterbrochene Aminosäurecodons des Leserasters dargestellt. Die Sequenzen der Exons sind in Großbuchstaben und die der Introns in Kleinbuchstaben gezeigt.

#### 4.8.3. *Emnlg1* - Expressionsprofil

Um die Expression von *emnlg1* in verschiedenen Stadien von *E. multilocularis* zu untersuchen wurde zunächst cDNA aus Metazestoden ohne Brutkapseln, Primärzellen (14 Tage in Ko-Kultur), aktivierten Protoskolizes und nicht aktivierten Protoskolizes hergestellt (Isolat G8065; vgl. 6.17.1 und 6.11). Die cDNA wurde auf Basis des konstitutiv exprimierten Gens *emelp* (451 bp) normalisiert und anschließend eine semi - quantitative PCR für *emnlg1* durchgeführt (vgl. 6.12.6)<sup>71</sup>. In allen Stadien konnten klare Banden der erwarteten Größe (362 bp) amplifiziert werden.

Wie in Abb. 31 zu erkennen ist, konnte das untersuchte Fragment von *emnlg1* in allen verwendeten Stadien bis zu einer 1:25 Verdünnung der cDNA nachgewiesen werden. Die Expressionsstärke von *emnlg1* ist somit bei Isolat G0865 unabhängig vom *E. multilocularis* Larvenstadium.



#### Abb. 31: *Emnlg1* - Expressionsprofil in verschiedenen Larvenstadien.

Die Expression von *emnlg1* wurde mit normalisierter cDNA von Metazestoden (ohne Brutkapseln), Primärzellen (14 Tage, Ko-Kultur), nicht aktivierten Protoskolizes und aktivierten Protoskolizes in einer semi - quantitativen PCR getestet. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 2% Agarosegel, gepuffert mit TAE, mit anschließender Färbung der DNA mit Ethidiumbromid. Als Größenmarker (M) wurde der SmartLadder von Eurogentec verwendet. Die Markerbanden sind entsprechend ihrer Größe markiert. A: Gezeigt ist das Expressionsmuster des konstitutiv exprimierten *emelp* (451 bp) in den oben genannten Stadien (von links nach rechts), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:50 und 1:500<sup>71</sup>. B: Gezeigt ist das Expressionsmuster von *emnlg1* (362 bp) in den oben genannten Stadien (von links nach rechts), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:10, 1:25 und 1:50.

Eine Analyse der vorläufigen Transkriptomdaten zeigt dagegen, dass *emnlg1* in nicht aktivierten Protoskolizes nicht exprimiert wird, in Primärzellen dagegen am stärksten (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich ist die Expression in Primärzellen gegenüber Metazestoden um das 3,2-fache erhöht, gegenüber aktivierten Protoskolizes um das 2,5-

fache. Diese geringen Unterschiede können in einer semi - quantitativen PCR nicht erfasst werden, wobei zur Erstellung der Transkriptomsequenzen auch andere Isolate (H95, J31 und Java) verwendet wurden als in der semi - quantitativen PCR (Isolat G8065). Auch darin könnte eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse zu finden sein.

Übereinstimmend konnte allerdings durch beide Methoden festgestellt werden, dass *emnlg1* in allen Stadien von *E. multilocularis* exprimiert wird, die in direktem Kontakt mit Zellen des Zwischen-, Fehl- oder Endwirts kommen (Metazestoden, Primärzellen, aktivierte Protoskolizes).

#### 4.8.4.EmNlg1 - Homologie

Die Homologie zwischen dem ausgereiften EmNlg1 und Noggin-like sowie Noggin Proteinen anderer Organismen wurde mit Hilfe eines NCBI BLASTP untersucht (vgl. 6.18). Die höchsten Homologien finden sich zu den Noggin-like Proteinen Smed-Nlg7 (GenBank: ACO06232.1; *E*-value:  $2 \times 10^{-28}$ ) und Smed-Nlg8 (GenBank: ACO06233.1; *E*-value:  $3 \times 10^{-28}$ ) aus *S. mediterranea*. Die Homologie zum humanen Noggin Precursor (NCBI Reference Sequence: NP\_005441.1) liegt bei einem *E*-value von  $5 \times 10^{-12}$ . Dabei ist die Homologie im Bereich der typischen neun Cysteinreste in der C-terminalen Noggin Domäne am stärksten ausgeprägt. Daher wurde dieser Abschnitt für ein Alignment von EmNlg1 und homologen Proteinen anderer Organismen verwendet (Abb. 32). Auch die in Kapitel 4.8 aufgeführten Sequenzunterschiede zwischen Noggin-like und Noggin Proteinen sind in dieser Region zu finden. Die Einstufung von EmNlg1 als Noggin-like Protein wird in Abb. 32 deutlich.

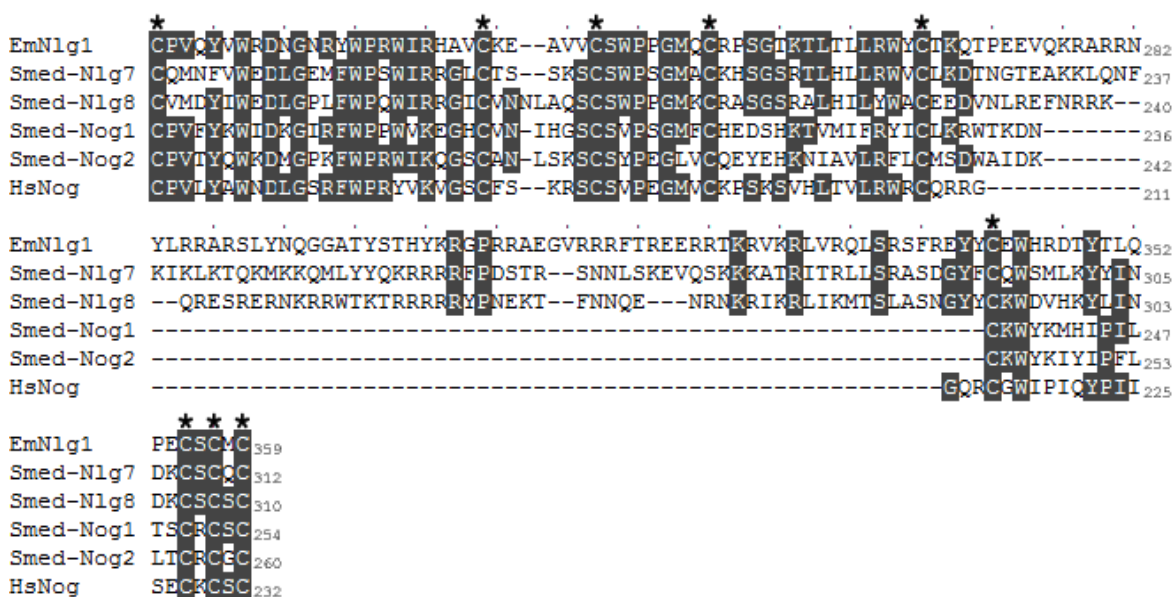


Abb. 32: EmNlg1 - Alignment des C-Terminus von homologen Proteinen.

Vergleichend sind die Sequenzen des hochkonservierten C-terminalen Abschnitts der Noggin Domänen von Noggin und Noggin-like Proteinen verschiedener Organismen dargestellt. Neben der entsprechenden Aminosäuresequenz von EmNlg1 aus *E. multilocularis* sind die jeweils homologen

Bereiche der Noggin-like Proteine Smed-Nlg7 (GenBank: ACO06232.1) und Smed-Nlg8 (GenBank: ACO06233.1) sowie die homologen Bereiche der Noggin Proteine Smed-Nog1 (GenBank: ABV04323.1), Smed-Nog2 (GenBank: ACO06226.1) aus *S. mediterranea* und HsNog aus *H. sapiens* (NCBI Reference Sequence: NP\_005441.1) dargestellt. Die Positionen der Aminosäuren sind jeweils rechts der Sequenz angezeigt. Aminosäuren, die in mindestens 3 Sequenzen konserviert sind, sind grau hinterlegt. Die Positionen konservierter Cysteine innerhalb der Noggin Domäne sind durch Sterne markiert.

#### 4.9.EmNlg2 - ein zweites Noggin-like Homolog aus *E. multilocularis*

Mit Hilfe der vorläufigen Sequenzen der Sanger Helminth Genom Initiative wurde ein bisher unbekanntes zweites Noggin Homolog in *Echinococcus multilocularis* identifiziert. Für diese Analysen wurde die Aminosäuresequenz des humanen Noggin Precursor Proteins (NCBI Reference Sequence: NP\_005441.1) als Template in einem TBLASTN-Alignment herangezogen und auf Contig 1704 (bp 26338-24744) eine putatives zweites homologes Protein aus *E. multilocularis* identifiziert (vgl. 6.18). Wie bei *emnlg1* konnte auch hier die typische Insertion von Noggin-like Proteinen nachgewiesen werden (vgl. 4.8 und 4.9.4). Dementsprechend wurde dieses neu identifizierte Gen *emnlg2* benannt.

##### 4.9.1.Emnlg2 - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz

Die mRNA von *emnlg2* wurde mit Hilfe von 5' und 3' RACEs auf die in der Arbeitsgruppe bereits vorliegende cDNA-Bibliothek identifiziert (vgl. 6.9). In dieser PCR wurden die Oligonukleotide pJG4-5 dw und NogginB up1 sowie NogginB dw1 und pJG4-5 up verwendet, wobei durch das erstgenannte Oligonukleotidpaar der gesamte ORF amplifiziert und anschließend kloniert wurde. Durch die Sequenzierung mehrerer plasmidhaltiger Kolonien wurde die Sequenz der mRNA von *emnlg2* verifiziert.

Die mRNA von *emnlg2* umfasst eine 5' UTR von 33 bp, einen codierenden Bereich mit durchgängigem Leseraster von 1233 bp und eine 3' UTR von 330 bp (ohne polyA - Bereich). Am 5' Ende der mRNA konnte kein Spliced-Leader identifiziert werden. *Emnlg2* codiert für 411 Aminosäuren des EmNlg2 Precursor Proteins. Die Aminosäuren 1-31 konnten mit Hilfe des CBS SignalP 3.0 Servers der Technical University of Denmark (DTU) als Signalpeptid identifiziert werden, mit der wahrscheinlichsten Spaltstelle zwischen Ala<sub>31</sub> und Asn<sub>32</sub>. Nach der Abspaltung dieses Signalpeptids hat das ausgereifte Protein EmNlg2 eine Länge von 380 Aminosäuren, mit einem theoretischen Molekulargewicht von 42,9 kDa (ExpASy, SIB). Die im Folgenden gemachten Angaben zu den Positionen von Aminosäuren beziehen sich auf den EmNlg2 Precursor. Mit Hilfe von SMART vom EMBL Heidelberg konnte in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von EmNlg2 eine Noggin-Domäne (AS 111-410; pfam05806) mit den neun konservierten Cysteinen identifiziert werden, die zur Ausbildung des typischen 12-membered cysteine knot (10-membered ring) notwendig sind<sup>181</sup>. Des Weiteren konnten mit Asp<sub>34</sub> und Asp<sub>208</sub> zwei

potentielle N-Glykosylierungsstellen identifiziert werden (CBS NetNGlyc 1.0 Server, DTU). Details zu den durchgeführten bioinformatischen Analysen finden sich in Kapitel 6.18.

ATTACTGTCAACGTCGCCACCACCTTCACTATTATGTCTATGCATACTGGTGAAACAGGTCAGGATTCTTTCGGTCTCT	80
<b>L L L L Y P L I S L T V V S A</b> N F <b>N L S</b> N D H S S G	160
CCTGCTTCTCCTCTACCCTTATCTCCCTTACAGTTGTCTCCGCGAACTTAACTCTCCAATGATCATCAAGTGGTC	160
L A A L Y Y Q R R P H S G P I L T S A S S P S P T S S	240
TCGCAGCACTATACTACCAAGGAGACCACATTCTGGACCTATTTAACATCCGCCTCCTCTCCCTCACCCTTCCCTCG	240
S S S T L M S K S G E T V V S G G M G L S L S N R N H	320
TCTTCTCCACGCTGATGTCAAATCAGGTGAGACAGTTGTTCTGGAGGCATGGGATTATCTCTATCCAATCGGAACCA	320
I S L G H L T K K E P P I <b>S S R T S D L D V D S S P</b>	400
CATATCTCTAGGTCACTCTGACTAAAAGGAGCCCCCTATATCCTCCCGGACATCAGATTTAGATGTGGATTCTGCTCCAT	400
<b>S R S M R V M G Q P I N P N I V S H L H P D V S P R K</b>	480
CACGATCGATGCGAGTTATGGGACAACCCATTAATCCTAACATCGTCAGTCATCTGCATCCTGACGTATCTCCTCGCAA	480
<b>I H R L W R L L G G K E D K Y W T S E E P P R V L R Q</b>	560
ATTCACAGACTATGGCGTCTCTAGGTGGAAAGGAGGATAAATATGGACATCTGAGGAACCACCTCGCGTACTGCGTCA	560
<b>R G V S G M L S D T G T H P L G A N S V D G N L I R</b>	640
ACGGGGAGTTTCTGGAATGCTCTCAGATACTGGAACCCATCCTCTGGGTGCAAACCCGTTGATGGTAATCTTATTCGCA	640
<b>K A N A L N M T</b> F R D Q T G A Q F L L P E T Q I Q I F	720
AAGCCAATGCATTAACATGACCTTTCGAGATCAGACGGGGCACAGTTTTGCTTCCAGAAACCCAAATTCAGATATTT	720
<b>R N W L I E Q A T</b> (C) E M D F I W K D L G S L Y W P R W	800
CGCAATTGGTTGATGAGCAGGCCACTTGCGAAATGGACTTTATCTGGAAGGACCTGGGATCACTCTACTGGCCTCGATG	800
<b>I R M G V</b> (C) L A R L G S S (C) S W P P G M K (C) Q P S G	880
GATTGCGATGGGCGTTTGTCTAGCTCGTCTGGTTCTTCGTGCTCCTGGCCACCAGGAATGAAATGCCAACCTTCGGGGT	880
<b>S R V L R L L N W N</b> (C) E D A A Q A E S A D G S M L S R	960
CTCGAGTTCTACGCCTTTTGAATTGGAATTGCAGGATGCAGCTCAAGCTGAGTCAGCGGATGGATCCATGTTGAGCAGG	960
<b>K T R S L H Q P T I N L R Y H L Q E P G S R R Q M R Q</b>	1040
AAAACCTCGGTCTCTCCATCAGCCGACAATAAATTTACGATACCACCTTCAAGAACCTGGATCCAGACGCCAGATGCGACA	1040
<b>I Y T Q Q T S P M W R Y Y R M G R R K G R R D A S M</b>	1120
GATATATACCAACAACATCTCCAATGTGGAGGTACTATCGTATGGGCAAGAAAGGGGCGTCGCGACGCTCCATGC	1120
<b>P M D P A Q Q E E Q R A R R A R R L I E K L S V T A S</b>	1200
CCATGGATCCGGCACAACAAGGAACAACGGGCCAGAAGCAAGACGGTTGATCGAGAAGCTAAGTGTACGGCCAGC	1200
<b>G Y R</b> (C) S W Q V Q K Y L I S D K (C) T (C) S (C) A *	1280
GGTTATCGATGCTCTTGGCAAGTTCAAAGTACCTAATCAGTGACAAGTGTACCTGTTCTCTGTGCATAGAGTGCAGAGA	1280
CACCCACACAAGCACACAAAAAGAAACAACCGAGCACCTGTAACATGAGCATTTGTTTCCCTCCTTCCACCTATCCCTA	1360
TCAGTCAACCAACATTCAATCAATCAATCACTCGGTTTCTGACACCAACCTGACAACAACAAGATTATCATATTCTCC	1440
AATTTTATTGTTTTAAATAAACAACCTGCACATACTAACCATCATGCACACGAATCATCCATTTACATCAGTTTAGTTTCG	1520
TTTCTTTATTGGCCCAATTATTGCTGCAATGAATCTCATGCCACCTGAAAAAGTCCACAAAAGAGCACCGTTTTA	1595

**Abb. 33: *Emnlg2* - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz.**

Gezeigt sind die Nukleotidsequenz der *emnlg2* cDNA (unten) sowie die zugehörige abgeleitete Aminosäuresequenz (oben). Ein Stern markiert das Stoppcodon TAG. Aminosäuren des identifizierten Signalpeptids sind weiß auf dunkelgrauem Hintergrund dargestellt. Die identifizierte Noggin Domäne (pfam05806) ist hellgrau hinterlegt und die neun konservierten Cysteine sind schwarz eingekreist. Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind durch eine schwarze Umrandung gekennzeichnet.

**4.9.2. *Emnlg2* - Genorganisation**

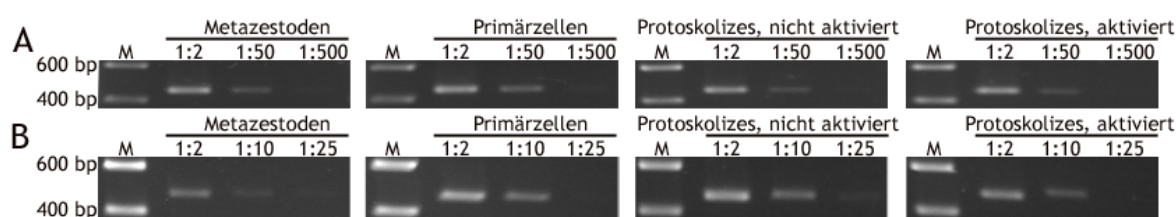
Der chromosomale Locus von *emnlg2* ist in einem einzigen Exon organisiert, wie auch bei *smnoggin* aus *S. mansoni* (NCBI Reference Sequence: XM\_002578770.1), bei *dmtrk*

aus *Drosophila melanogaster* (NCBI Reference Sequence: NM\_057419.2) oder bei *hsnog* aus *H. sapiens* (NCBI Reference Sequence: NM\_005450.4). Für Noggin-like Proteine aus *D. japonica* und *S. mediterranea* konnten diesbezüglich leider keine Informationen in den einschlägigen Datenbanken gefunden werden.

Diese Konservierung der Genorganisation in einem einzigen Exon deutet auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung von *emnlg2* und Noggin kodierenden Genen anderer Organismen hin.

#### 4.9.3. *Emnlg2* - Expressionsprofil

Die Expression von *emnlg2* wurde in verschiedenen Stadien von *E. multilocularis* untersucht. Dazu wurde zunächst cDNA aus Metazestoden mit Brutkapseln, Primärzellen (14 Tage in Ko-Kultur), aktivierten Protoskolizes und nicht aktivierten Protoskolizes hergestellt (Isolat G8065; vgl. 6.17.1 und 6.11). Die cDNA wurde auf Basis des konstitutiv exprimierten Gens *emelp* (451 bp) normalisiert und anschließend eine semi - quantitative PCR für *emnlg1* durchgeführt (vgl. 6.12.6)<sup>71</sup>. Dabei konnten in allen Stadien klare Banden der erwarteten Größe (456 bp) amplifiziert werden. Das untersuchte Fragment konnte, wie in Abb. 34 gezeigt, bei nicht aktivierten Protoskolizes bis zu einer 1:25 Verdünnung der cDNA nachgewiesen werden, wohingegen bei allen andern Stadien der Nachweis nur bis zu einer 1:10 Verdünnung der cDNA erfolgreich war. Diese Ergebnisse deuten im Vergleich der untersuchten *E. multilocularis* Larvenstadien im Isolat G8065 auf eine verstärkte Expression von *emnlg2* in nicht aktivierten Protoskolizes hin.



**Abb. 34: *Emnlg2* - Expressionsprofil in verschiedenen Larvenstadien.**

Die Expression von *emnlg2* wurde mit normalisierter cDNA von Metazestoden (mit Brutkapseln), Primärzellen (14 Tage, Ko-Kultur), nicht aktivierten Protoskolizes und aktivierten Protoskolizes in einer semi - quantitativen PCR getestet. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 2% Agarosegel, gepuffert mit TAE, mit anschließender Färbung der DNA mit Ethidiumbromid. Als Größenmarker (M) wurde der SmartLadder von Eurogentec verwendet. Die Markerbanden sind entsprechend ihrer Größe markiert. A: Gezeigt ist das Expressionsmuster des konstitutiv exprimierten *emelp* (451 bp) in den oben genannten Stadien (von links nach rechts), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:50 und 1:500<sup>71</sup>. B: Gezeigt ist das Expressionsmuster von *emnlg2* (456 bp) in den oben genannten Stadien (von links nach rechts), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:10 und 1:25.

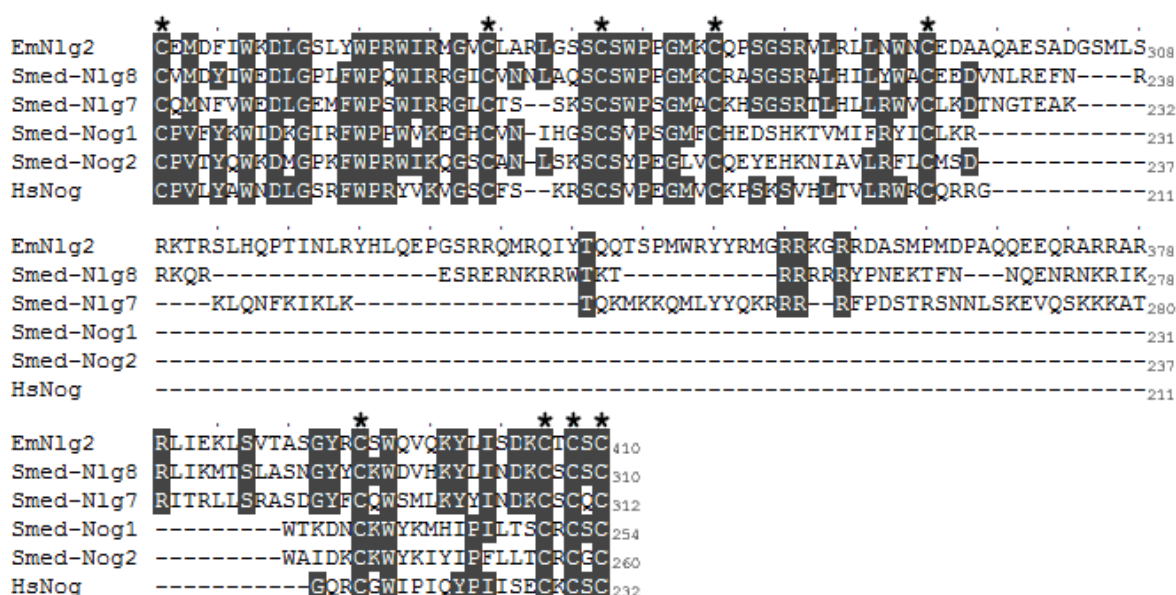
Eine Analyse der vorläufigen Transkriptomdaten von *E. multilocularis* zeigte ebenfalls, dass die Expression von *emnlg2* in nicht aktivierten Protoskolizes am stärksten ist. Der Unterschied der stärksten Expression zu aktivierten Protoskolizes beträgt nach diesen

vorläufigen Daten das 1,3-fache, zu Metazestoden das 8,2-fache und zu Primärzellen das 10,2-fache (Daten nicht gezeigt). Solch starke Unterschiede sollten auch in einer semi - quantitativen PCR sichtbar sein, wobei darauf hingewiesen werden sollte, dass die Transkriptomdaten auf anderen Isolate basieren (H95, J31, Java) als die durchgeführte semi - quantitative PCR (Isolat G8065) und dass diese Unterschiede in den Genexpressionsanalysen folglich auch auf die Verwendung verschiedener Isolate zurückgeführt werden können.

Beide Analysen zeigten übereinstimmend, dass *emNlg2* in allen Stadien exprimiert wird, die während einer Infektion von Zwischen- oder Endwirt auftreten.

#### 4.9.4.EmNlg2 - Homologie

Mittels einer NCBI BLASTP Analyse konnte die Homologie zwischen dem ausgereiften EmNlg2 und Noggin-like Proteinen sowie Noggin Proteinen anderer Organismen untersucht werden. Dabei zeigte sich mit einem *E*-value von  $3 \times 10^{-68}$  die höchste Homologie zu SmNoggin aus *S. mansoni* (NCBI Reference Sequence: XP\_002570128.1), gefolgt von Smed-Nlg8 (GenBank: ACO06233.1; *E*-value:  $6 \times 10^{-53}$ ) und Smed-Nlg7 (GenBank: ACO06232.1; *E*-value:  $1 \times 10^{-36}$ ) aus *S. mediterranea*. Die Homologie zum humanen Noggin Precursor (NCBI Reference Sequence: NP\_005441.1) lag bei einem *E*-value von  $3 \times 10^{-8}$ . Da, wie bei EmNlg1 auch, die Homologie im Bereich der typischen neun Cysteinreste in der C-terminalen Noggin Domäne am stärksten ausgeprägt ist, wurde dieser Abschnitt für ein Alignment von EmNlg2 und homologen Proteinen anderer Organismen verwendet (vgl. Abb. 35). Auch die in Kapitel 4.8 aufgeführten Sequenzunterschiede zwischen Noggin-like und Noggin Proteinen sind in dieser Region zu finden. Abb. 35 verdeutlicht daher ebenfalls die Einstufung von EmNlg2 als Noggin-like Protein.



**Abb. 35: EmNlg2 - Alignment des C-Terminus der Noggin Domänen homologer Proteine.**

Vergleichend sind die Sequenzen des hochkonservierten C-terminalen Abschnitts der Noggin Domänen von Noggin und Noggin-like Proteinen verschiedener Organismen dargestellt. Neben der entsprechenden Aminosäuresequenz von EmNlg2 aus *E. multilocularis* sind die jeweils homologen Bereiche der Noggin-like Proteine Smed-Nlg8 (GenBank: ACO06233.1) und Smed-Nlg7 (GenBank: ACO06232.1) sowie die homologen Bereiche der Noggin Proteine Smed-Nog1 (GenBank: ABV04323.1), Smed-Nog2 (GenBank: ACO06226.1) aus *S. mediterranea* und HsNog aus *H. sapiens* (NCBI Reference Sequence: NP\_005441.1) dargestellt. Die Positionen der Aminosäuren sind jeweils rechts der Sequenz angezeigt. Aminosäuren, die in mindestens 3 Sequenzen konserviert sind, sind grau hinterlegt. Die Positionen konservierter Cysteine innerhalb der Noggin Domäne sind durch Sterne markiert.

#### 4.10. EmSmadE - ein vierter R-Smad aus *E. multilocularis*

Mit Hilfe der vorläufigen Sequenzen der Sanger Helminth Genom Initiative wurde ein bisher unbekannter R-Smad in *Echinococcus multilocularis* identifiziert. Für diese Analysen wurde die Aminosäuresequenz von EmSmadB (NCBI Reference Sequence: NP\_005896.1) als Template in einem TBLASTN-Alignment herangezogen und auf Contig 2717 (bp 403765-405382) ein viertes R-Smad Homolog in *E. multilocularis* identifiziert, EmSmadE (vgl. 6.18)<sup>94</sup>.

##### 4.10.1. EmSmadE - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz

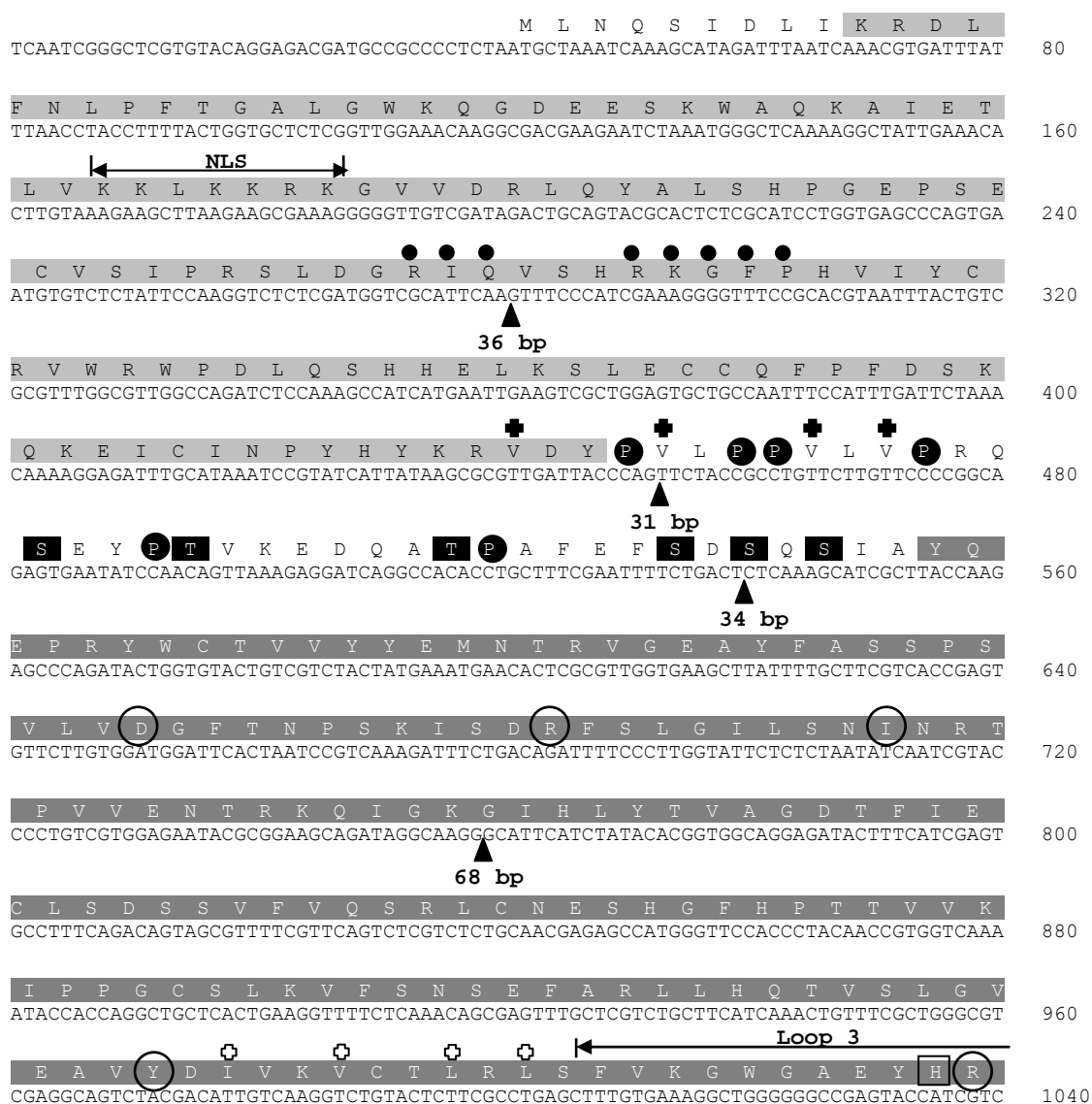
Die Position des Startcodons wurde durch PCR auf cDNA mit den Kombinationen der Oligonukleotide EmSmadE dw1 x SE up3 bzw. EmSmadE dw2 x SE up3 ermittelt (Sequenzen siehe 6.10), wobei sich zeigte, dass nur mit der zweiten Kombination eine Amplifikation möglich war. Zusätzlich wurde das 5'-Ende der zugrundeliegenden mRNA mit den Oligonukleotiden pJG4-5 dw und SE up3 per PCR aus der in der Arbeitsgruppe bereits vorliegende cDNA - Bibliothek amplifiziert und die Position des Startcodons verifiziert. Ebenso wurde mit den Oligonukleotiden SE dw5 und pJG4-5 up eine 3' RACE durchgeführt. Das offene Leseraster wurde im Anschluss mit den Oligonukleotiden SE-ORF 5' x SE-ORF 3' per PCR amplifiziert und mit dem PCR Cloning Kit von Qiagen in



den Vektor pDrive zwischenkloniert (vgl. 6.12.7). Die Sequenz der mRNA von *emsmadE* wurde durch die Sequenzierung mehrerer Klone verifiziert.

Die Sequenz der cDNA von *emsmadE* umfasst ohne polyA - Bereich 1449 bp, der ORF endet an der Nukleotidposition 1116 mit einem TAA Stoppcodon. Die 3' UTR umfasst 291 bp, das Startcodon befindet sich 41 bp entfernt vom 5'-Ende der cDNA. Es wurde kein Spliced-Leader am 5'-Ende der cDNA identifiziert. Der ORF codiert für 372 Aminosäuren des Proteins EmSmadE. Das theoretische Molekulargewicht beträgt 42,4 kDa (ExpASY, SIB; vgl. 6.18).

Mit Hilfe der NCBI CDD wurde die konservierte Domänenstruktur von EmSmadE identifiziert: die MH1 Domäne umfasst AS 10-136 (pfam03165), die MH2 Domäne AS 172-348 (pfam03166)<sup>261</sup>. Die Aminosäuren von 137 bis 171 werden als Linker - Region bezeichnet. In Abb. 36 sind die konservierten Aminosäuren markiert. Die Linker - Region enthält weder eine Smurf-binding site (P-P-X-Y), noch eine konservierte MAPK consensus site (P-X-S-P) oder andere konservierte proline-directed kinase site (SP)<sup>262</sup>. Details zu den bioinformatischen Analysen finden sich in Kapitel 6.18.



Q D V T S T P C W V E I H L R G P L F W L D R V L R Q	
AAGATGTCACCTTCGACGCCCTGTTGGGTTGAGATTACACCTCCGAGGTCCTACTGTTTTGGCTTGATCGAGTTCTGCGTCAA	1120
M G P S P N P V S S V S *	
ATGGGTCCCTCGCCAAACCCCGTCTCTTCTGTCTCCTAATTTGTGGCAATGCATAAAATTTCTGTGATAAGCATTAAAC	1200
CTTTCACCTCTGCAAATATGCAATTCCTTTGGTTCTATTGGACCGACCATGGCGCCTGTAATCATGCATTCCCGGTATG	1280
TTTAATTCCTCCTTTAAATTTGATTTTGCCCGAATGATTATGCCCGAATGCAATTGGTTTTTCTGTTTTCTTTCTAT	1360
CTTCAATTGTATGCACGCATGTAGCCTTTACCTTATGTGTATTCTGTTTATTGTTGCCTATTAACACTAATGTAGTGTG	1440
AAATACTCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1467

**Abb. 36: *EmsmadE* - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz.**

Dargestellt sind die Nukleotidsequenz der *emsmadE* cDNA (unten) sowie die zugehörige Aminosäuresequenz (oben). Die EmSmadE MH1 Domäne ist hellgrau und die MH2 Domäne ist bei weißen Buchstaben dunkelgrau hinterlegt. In der MH1 Domäne ist das nuclear localization signal (NLS) durch einen Pfeil markiert und beschriftet, während die konservierten Aminosäurereste der DNA-Bindungsstelle durch schwarze Punkte gekennzeichnet sind. Die konservierten Aminosäuren vom nukleären Exportsignal 2 (NES 2) sind durch schwarz gefüllte Kreuze markiert. Proline innerhalb der Linker - Region sind bei weißen Buchstaben durch einen kreisförmigen schwarzen Hintergrund gekennzeichnet, während Ser bzw. Thr, die zusätzliche potentielle Phosphorylierungsstellen darstellen, durch einen rechteckigen schwarzen Hintergrund erkennbar sind. In der MH2 Domäne ist der Loop 3 durch einen Pfeil markiert und beschriftet, während die Aminosäuren des Loop 3, durch die die Spezifität des Signalweges festgelegt wird, durch weiße Buchstaben in schwarzen Boxen gekennzeichnet sind. Konservierte Aminosäurereste, die eine Trimerbildung ermöglichen, sind eingekreist. Konservierte Aminosäuren vom nukleären Exportsignal 1 (NES 1) sind durch schwarz umrandete Kreuze markiert. Das C-terminale SSVS Motiv ist unterstrichen. Ein Stern markiert das Stoppcodon. Dreiecke zeigen die Position und Länge von chromosomalen Introns.

#### 4.10.2. *EmsmadE* - Genorganisation

Der chromosomale Locus von *emsmadE* umfasst vier Introns mit Längen von 36 bp, 31 bp, 34 bp und 68 bp. Die Intron-Exon Übergänge entsprechen ausschließlich der GT/AG Regel<sup>258</sup>.

Die Genstruktur von *emsmadE* ist mit vier Introns weniger komplex als diejenige der Säuger Smads, bei denen normalerweise sechs Introns zu finden sind<sup>263</sup>. Die Position von Intron 1 entspricht derjenigen vom humanen *smad4* (Gene ID: 4089), Intron 2 und 4 liegen dagegen deckungsgleich mit Introns vom humanen *smad5* (Gene ID: 4090). Intron 3 von *emsmadE* befindet sich in der wenig konservierten Linker Region und kann daher nicht eindeutig mit Introns homologer Gene aus *H. sapiens* verglichen werden. Auch im Vergleich mit *smsmad1B* sind diese konservierten Exon - Intron Grenzen zu erkennen<sup>264</sup>. So sind die Introns 1, 2 und 4 von *emsmadE* ebenfalls in *smsmad1B* zu finden. Innerhalb der Linker Region ist bei *smsmad1B* vergleichbar zu *emsmadE* Intron 3 ein weiteres Intron zu finden. Typische Introns, die bei den codierenden Genen von AR-Smads wie z. Bsp. humanem *smad2* (Gene ID: 4087) und *smad3* (Gene ID: 4088) gefunden werden können, sind im genomischen Locus von *emsmadE* nicht vertreten.

Diese Konservierung von Spleißstellen deutet zu Einen auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung von *emsmadE* und homologen Genen anderer Organismen

hin. Zum Anderen bestätigt die Lage der Introns von *emsmadE* die Zugehörigkeit zu den BR-Smads.

Exon Nr.	Länge Exon [bp]	5' Spleiß-Donor	3' Spleiß-Akzeptor	Länge Intron [bp]	unterbrochene AS
1	280	ATT CAA gta gtc	cct tag GTT TCC	36	-
2	172	CCA G gtc ttt	ttg tag TT CTA	31	V <sub>138</sub>
3	87	GAC T gta att	tta tag CT CAA	34	S <sub>167</sub>
4	219	AAG G gta agc	tta aag GC ATT	68	G <sub>240</sub>
5	709				

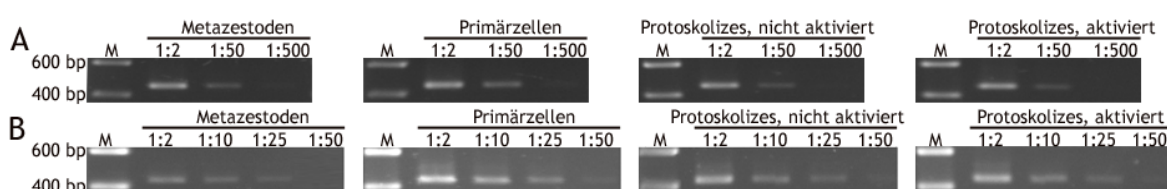
**Abb. 37: *EmsmadE* - Genorganisation.**

Dargestellt sind die Anzahl und Länge der Exons sowie die Stellen im Gen, an denen die Introns die mRNA unterbrechen. Zusätzlich sind sowohl die Länge der Introns und unterbrochene Aminosäurecodons des Leserasters dargestellt. Die Sequenz an den Spleißstellen ist für Nukleotide von Exons in Großbuchstaben und für Introns in Kleinbuchstaben gezeigt.

**4.10.3. *EmsmadE* - Expressionsprofil**

Die Expression von *emsmadE* wurde in verschiedenen Stadien von *E. multilocularis* untersucht. Dazu wurde zunächst cDNA aus Metazestoden ohne Brutkapseln, Primärzellen (7 Tage in Ko-Kultur), aktivierten Protoskolizes und nicht aktivierten Protoskolizes hergestellt (Isolat G8065; vgl. 6.17.1 und 6.11). Die cDNA wurde auf Basis des konstitutiv exprimierten Gens *emelp* (451 bp) normalisiert und anschließend eine semi - quantitative PCR für *emsmadE* durchgeführt (436 bp, vgl. 6.12.6)<sup>71</sup>.

In allen Stadien konnten klare Banden der erwarteten Größe (436 bp) bis zu einer cDNA - Verdünnung von 1:25 amplifiziert werden. Somit findet sich in *E. multilocularis* Isolat G8065 keine Stadien-spezifische Expression von *emsmadE*.



**Abb. 38: *EmsmadE* - Expressionsprofil in verschiedenen Larvenstadien.**

Die Expression von *emsmadE* wurde mit normalisierter cDNA von Metazestoden (ohne Brutkapseln), Primärzellen (7 Tage, Ko-Kultur), nicht aktivierten Protoskolizes und aktivierten Protoskolizes in einer semi - quantitativen PCR getestet. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 2% Agarosegel, gepuffert mit TAE, mit anschließender Färbung der DNA mit Ethidiumbromid. Als Größenmarker (M) wurde der SmartLadder von Eurogentec verwendet. Die Markerbanden sind entsprechend ihrer Größe markiert. A: Gezeigt ist das Expressionsmuster des konstitutiv exprimierten *emelp* (451 bp) in den oben genannten Stadien (von links nach rechts), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:50 und 1:500<sup>71</sup>. B: Gezeigt ist das Expressionsmuster von *emsmadE* (436 bp) in den oben genannten Stadien (von links nach rechts), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:10, 1:25 und 1:50.

Analysen der vorläufigen Transkriptomdaten zeigten ebenfalls die Expression von *emsmadE* in allen getesteten Stadien, wobei ein maximaler Unterschied von 2-fach stärkerer Expression in Primärzellen im Vergleich zu Metazestoden festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Diese Unterschiede zwischen den Analysemethoden

können auf die Verwendung verschiedener Isolate zurückgeführt werden (G8065 bei der semi - quantitativen PCR; H95, J31 und Java bei der Erstellung der Transkriptomdaten). Übereinstimmend zeigen alle Analysen die Genexpression von *emsmadE* in allen Larvenstadien, die im Rahmen einer Infektion im Zwischen- oder Fehlwirt auftreten.

#### 4.10.4. EmSmadE - Homologie

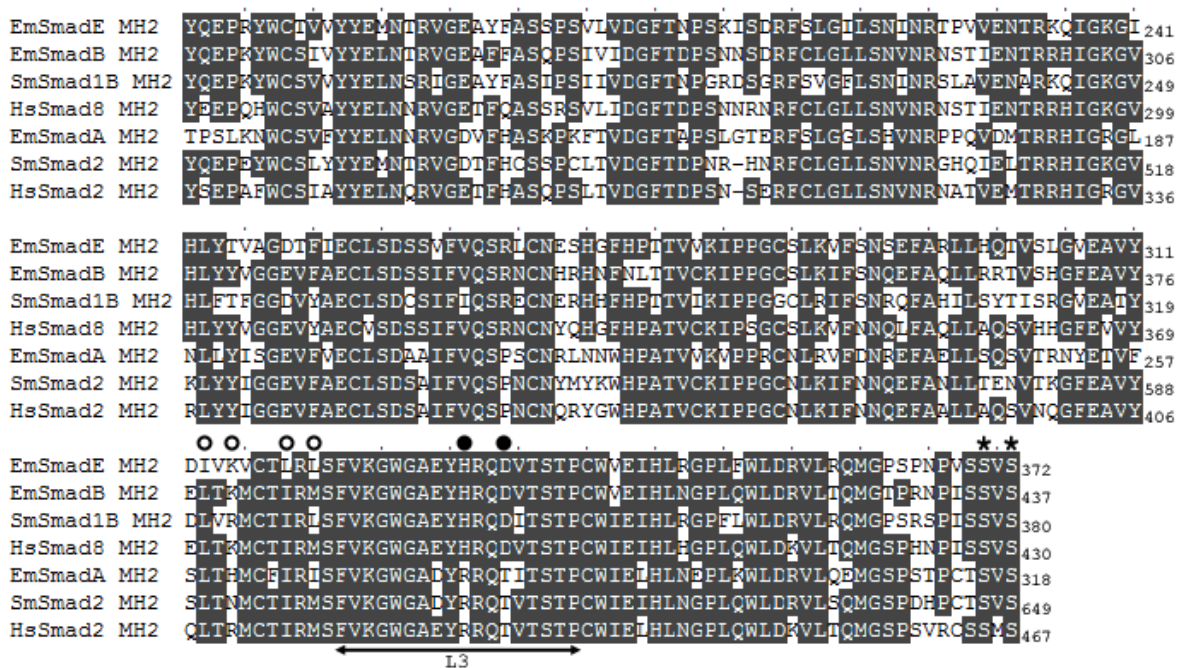
Zur Untersuchung der Homologie zwischen EmSmadE und Smads anderer Organismen wurde die Aminosäuresequenz des ORF von EmSmadE als Template in einem NCBI BLASTP verwendet (vgl. 6.18).

Die höchste Homologie findet sich mit einem *E*-value von  $3 \times 10^{-161}$  zu Smad1B aus *S. mansoni* (GenBank: AAV80239.1), wobei die Homologie im Bereich der MH1 Domäne (84% identisch) und der MH2 Domäne (71% identisch) am höchsten, im Bereich der Linker-Region dagegen niedriger ist (54% identisch). Die Homologie zu EmSmadB (GenBank: CAD68074.1), einem weiteren in *Echinococcus multilocularis* exprimierten BR-Smad, ist mit einem *E*-value von  $7 \times 10^{-148}$  deutlich niedriger, wobei ein Vergleich der einzelnen Domänen nur in Bezug auf die MH1 Domäne mit 77% identischen Aminosäuren niedrigere Werte anzeigt (MH2 Domäne: 73% identisch; Linker Region: 67% identisch). Im Vergleich mit humanen Smads finden sich mit einem *E*-value von  $6 \times 10^{-135}$  die höchste Homologie zum BR-Smad Smad8 (NCBI Reference Sequence: NP\_005896.1; MH1 Domäne: 80% identisch; MH2 Domäne: 67% identisch; Linker Region: 93% identisch).

		← NLS →	
EmSmadE MH1	LPFTGALGWKQGDEE	SKWAQKAIETLVKKLKKRKGVDRLQYALSHPGEPSECVSIPRSLDGRIQVSHRK	85
EmSmadB MH1	PAVKRLLGWKQGDEE	EKWAEKAVDSLVRKLLKKGALSLERALSHPGEPSECVTIPRSLDGRLQVSHRK	86
SmSmad1B MH1	PVLCGSLGWKQGDEE	EKWAQKAIETLVKKLKKRKGVLRLQYALHPNEPSECVTIPRSLDGRIQVSHRK	86
HsSmad8 MH1	PAVKRLLGWKQGDEE	EKWAEKAVDSLVRKLLKKGALDELERALSHPGEPSECVTIPRSLDGRLQVSHRK	85
EmSmadE MH1	GFPFHYCRVWRWPD	LQSHHELKPLECCFPFESKQKEVCINPYHYKRV	136
EmSmadB MH1	GLPHVIYCRVWRWPD	LQSHHELKPLDLCRFPFESKKEVVCINPYHYKRVES	137
SmSmad1B MH1	GFPFHYCRVWRWPD	LQSHHELKPLEVENCLEFPFSSKEVVCINPYHYKRV	137
HsSmad8 MH1	GLPHVIYCRVWRWPD	LQSHHELKPLECCFPFESKQKEVVCINPYHYKRVET	136

**Abb. 39: EmSmadE - Alignment der MH1 Domänen von BR-Smads.**

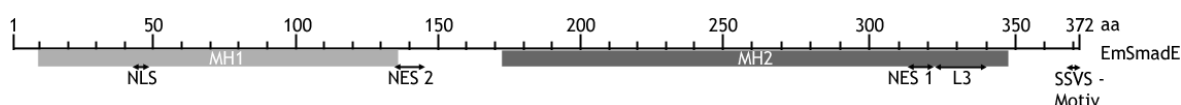
Vergleichend sind die Sequenzen der MH1 Domänen von Smads verschiedener Organismen dargestellt: Neben der Aminosäuresequenz von EmSmadE finden sich die Sequenzen von SmadB aus *E. multilocularis* (EmSmadB; GenBank: CAD68074.1)<sup>94</sup>, Smad1B aus *S. mansoni* (SmSmad1B; GenBank: AAV80239.1) sowie Smad8 aus *H. sapiens* (HsSmad8; NCBI Reference Sequence: NP\_005896.1). Die Positionen der Aminosäuren sind jeweils rechts der Sequenz angezeigt. Die Positionen der Aminosäuren sind jeweils rechts der Sequenz angezeigt. Aminosäuren, die in mindestens 3 Sequenzen konserviert sind, sind grau hinterlegt. Der Bereich vom NLS ist markiert.



**Abb. 40: EmSmadE - Alignment der MH2 Domänen von R-Smads.**  
 Vergleichend sind die Sequenzen der MH2 Domäne von Smads verschiedener Organismen dargestellt: Neben der Aminosäuresequenz von EmSmadE finden sich die Sequenzen von SmadA (GenBank: CAD68073.1) und SmadB (EmSmadB; GenBank: CAD68074.1) aus *E. multilocularis*, Smad1B (SmSmad1B; GenBank: AAV80239.1) und Smad2 (SmSmad2; GenBank: AAG35266.1) aus *S. mansoni* sowie Smad8 (HsSmad8; NCBI Reference Sequence: NP\_005896.1) und Smad2 (HsSmad2; GenBank: AAC39657.1) aus *H. sapiens*. Die Positionen der Aminosäuren sind jeweils rechts der Sequenz angezeigt. Aminosäuren, die in mindestens 4 Sequenzen konserviert sind, sind grau hinterlegt. Der Bereich vom Loop 3 (L3) ist markiert. Die Serinreste im C-terminalen SSVS Motivs, die durch den Typ I Rezeptor phosphoryliert werden können, sind durch Sterne gekennzeichnet. Die hydrophoben Aminosäuren vom NES 1 sind durch schwarz konturierte Kreise gekennzeichnet, während konservierte Aminosäuren von Loop 3, durch die die Spezifität des Signalweges festgelegt wird, mit schwarzen Kreisen markiert sind.

#### 4.10.5.EmSmadE - Strukturelle Charakterisierung

Zur Übersicht ist in Abb. 41 die Domänenstruktur von EmSmadE in einer schematischen Darstellung abgebildet.



**Abb. 41: EmSmadE - Domänenstruktur.**  
 Gezeigt ist die Domänenstruktur von EmSmadE, wobei die Anzahl der Aminosäuren als Skala (oben) angezeigt wird. Die MH1 Domäne (pfam03165) ist als hellgrauer Balken und die MH2 Domäne als dunkelgrauer Balken (pfam03166) unterhalb dieser Skala dargestellt. Die Positionen von NES 1 und NES 2 sowie vom Loop 3 (L3) und dem SSVS - Motiv sind markiert.

#### Die Phosphorylierungsstelle

Das SSVS - Motiv am C-terminalen Ende von EmSmadE dient als Phosphorylierungsstelle für BMP- und TGFβ- Rezeptoren. Diese Phosphorylierungsstelle findet sich nicht bei Co- oder I-Smads, sondern ausschließlich bei R-Smads.

EmSmadE enthält eine solche Phosphorylierungsstelle und kann daher in die Subfamilie der R-Smads eingruppiert werden (siehe Abb. 36 und Abb. 40). Eine Interaktion mit BMP-

und/oder TGF $\beta$  - Rezeptoren ist daher wahrscheinlich und die Möglichkeit der Aktivierung von EmSmadE gegeben.

### Der Loop 3

Als entscheidend für die spezifische Interaktion zwischen BMP- und TGF $\beta$ - Typ I Rezeptoren und R-Smads wurden bei den Säuger Smads zwei Aminosäurereste im Bereich des Loop 3 der MH2 Domäne identifiziert. Die zur Untergruppe der BR-Smads zählenden Proteine enthalten an dieser Stelle die konservierte Region YHRQDV, mit His und Asp als entscheidende Reste<sup>265</sup>.

EmSmadE weist im Loop 3 der MH2 Domäne die kanonische Aminosäureabfolge YHRQDV auf (siehe Abb. 36 und Abb. 40) und wird daher den BR-Smads zugeordnet. Eine Interaktion mit BMP-Rezeptoren ist daher wahrscheinlich.

### Das nukleäre Lokalisationssignal

Der Transport von Proteinen vom Zytoplasma in den Nukleus erfolgt ab einer Größe von 45 - 55 kDa über einen aktiven Prozess, der erst durch ein nukleäres Lokalisationssignals (NLS) im zytoplasmatischen Protein ermöglicht wird. Eins der beiden bisher bekannten NLS's besteht aus einer Abfolge von basischen Aminosäuren (z.B. bei humanem Smad3: Lys<sub>40</sub>-Lys-Leu-Lys-Lys<sub>44</sub>). Dieses NLS wird von einem heterodimeren Rezeptorkomplex aus Importin  $\alpha$  und  $\beta$  erkannt, wobei die NLS-binding site bei Importin  $\alpha$  zu finden ist. Durch Importin  $\beta$  wird dagegen der Importin-Substrat Komplex an die zytoplasmatische Seite nukleärer Poren angelagert und anschließend die Translokation in den Nukleus ermöglicht<sup>219-220,228,266</sup>.

Bei EmSmadE ist dieses NLS in der MH1-Domäne mit der Aminosäuresequenz Lys<sub>43</sub>-Lys-Leu-Lys-Lys-Arg-Lys<sub>49</sub> hoch konserviert (siehe Abb. 36 und Abb. 39). Die Möglichkeit der Translokation in den Nukleus über bekannte Mechanismen ist daher gegeben. Eine Signalweiterleitung über EmSmadE bis in den Nukleus ist daher möglich.

### Das nukleäre Exportsignal

Das nukleäre Exportsignal 1 (NES 1) ist ein kurzes Leucin-reiches Motiv innerhalb der MH2-Domäne, das zur Translokation großer Proteine aus dem Nukleus ins Zytoplasma der Zelle notwendig ist<sup>220</sup>. Die Konsensus Sequenz zeigt eine charakteristische Aminosäureabfolge (Leu-X-X-Leu-X-X-Leu-X-Leu; X = beliebige Aminosäure), wobei Variationen bekannt sind<sup>267</sup>. NES 1 ist mit der Aminosäuresequenz Ile<sub>313</sub>-Val-Lys-Val-Cys-Thr-Leu-Arg-Leu<sub>321</sub> in der MH2 Domäne von EmSmadE enthalten, es zeigen sich allerdings Abweichungen von der Konsensus Sequenz (siehe Abb. 36 und Abb. 40).

Ein zweites nukleäres Exportsignal (NES 2) wurde 2003 von Xiao et al. in Verbindung mit Smad1 beschrieben<sup>229</sup>. Die Konsensus Sequenz findet sich am Übergang von MH1 Domäne und Linker Region (Val-Glu-Thr/Ser-Pro-Val-Leu-Pro-Pro-Val-Leu-Val) und ist

ausschließlich in R-Smads zu finden, nicht in Co- oder I-Smads. NES 2 ist bei EmSmadE mit der Aminosäuresequenz Val<sub>134</sub>-Asp-Tyr-Pro-Val-Leu-Pro-Pro-Val-Leu-Val<sub>144</sub> hoch konserviert (siehe Abb. 36).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Translokation von EmSmadE vom Nukleus ins Zytoplasma über bekannte Mechanismen möglich ist.

#### 4.10.6. EmSmadE - Funktionelle Charakterisierung

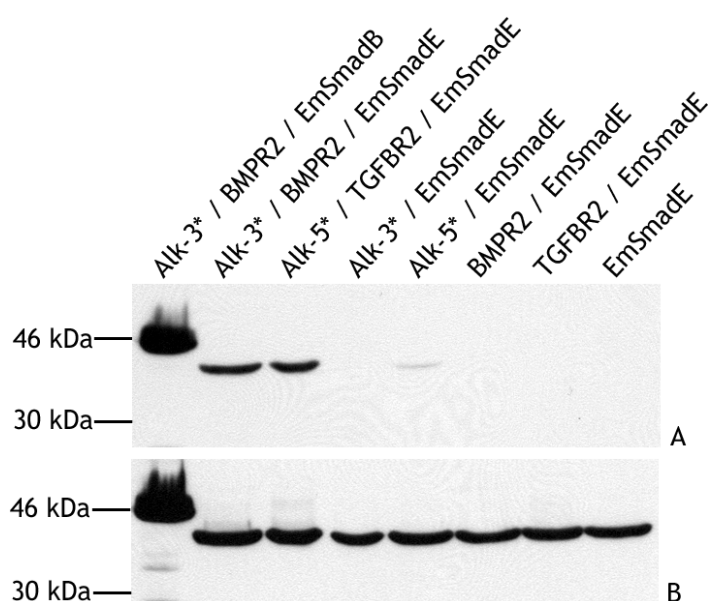
Zur funktionellen Charakterisierung wurde EmSmadE zusammen mit verschiedenen BMP und TGF- $\beta$  Rezeptoren heterolog in HEK 293T Zellen exprimiert. Dabei diente die gleichzeitige Expression mit humanen Rezeptoren der Untersuchung der Funktionalität von EmSmadE als R-Smad. Die Expression zusammen mit Rezeptoren des BMP / TGF- $\beta$  Signalwegs aus *E. multilocularis* wurde dagegen durchgeführt, um die korrespondierenden Rezeptorpaare zur Signalweiterleitung im Parasiten zu bestimmen.

##### Funktionalität von EmSmadE als R-Smad

Zur Untersuchung der Funktionalität wurde EmSmadE gemeinsam mit konstitutiv aktiven humanen Rezeptoren des BMP und TGF- $\beta$  Signalwegs in HEK 293T Zellen exprimiert (vgl. 6.16.5). Die Aktivierung von EmSmadB und EmSmadE wurde durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers an die phosphorylierten Smads nachgewiesen (anti-Phospho-Smad1 (Ser463/465) / Smad5 (Ser463/465) / Smad8 (Ser426/428) von Cell Signaling; vgl. 6.13.2 und 6.13.4). Die Expression der Smads wurde zusätzlich durch die Bindung eines Antikörpers kontrolliert, der gegen den fusionierten cMyc-Tag gerichtet war (anti-cMyc von NEB; vgl. 6.13.4).

Wie in Abb. 42 gezeigt, wurde EmSmadE sowohl durch die Kombination von Typ II und konstitutiv aktiven Typ I Rezeptoren des humanen BMP Signalweges (BRI ka und BRII) als auch des humanen TGF- $\beta$  Signalweges (TRI ka und TRII) phosphoryliert. Eine Phosphorylierung durch einen Rezeptor alleine konnte nur beim konstitutiv aktiven TGF- $\beta$  Typ I Rezeptor, TRI ka, beobachtet werden.

Damit konnte die Eingruppierung von EmSmadE in die Subfamilie der R-Smads, die in Kapitel 4.10.5 bereits durch das Vorhandensein einer C-terminalen Phosphorylierungsstelle (SSVS-Motiv) vorweggenommen wurde, durch die hier gezeigte funktionelle Charakterisierung verifiziert werden.



**Abb. 42: EmSmadE - Phosphorylierung durch humane Rezeptoren.**

EmSmadE, EmSmadB, die humanen TGF- $\beta$  (TGFBR2) und BMP Typ II Rezeptoren (BMPR2), sowie die humanen konstitutiv aktiven TGF- $\beta$  (Alk-5\*) und BMP Typ I Rezeptoren (Alk-3\*) wurden in HEK 293T Zellen in den gezeigten Kombinationen exprimiert. Die Kombination mit EmSmadB diente als Positivkontrolle<sup>94</sup>. Die Proteine wurden in einem 10%-igen Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Phosphorylierte Smads wurden mit anti-Phospho-Smad1 (Ser463/465) / Smad5 (Ser463/465) / Smad8 (Ser426/428) von Cell Signaling nachgewiesen (A). Die gleichmäßige Expression der Smads wurde durch anti-cMyc von NEB überprüft (B).

#### Signalweiterleitung über Echinokokken BMP / TGF- $\beta$ Rezeptoren und EmSmadE

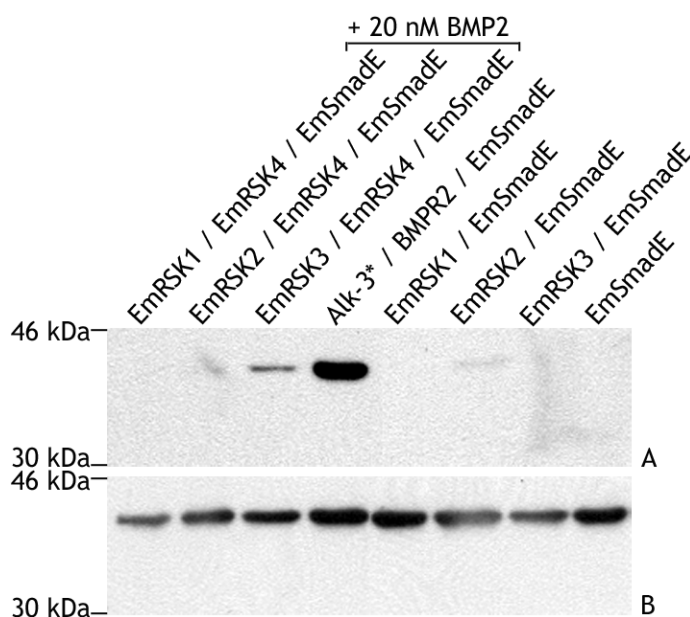
Die Signalweiterleitung über EmSmadE wurde durch die heterologe Expression von EmSmadE zusammen mit den bereits bekannten Rezeptoren des BMP / TGF- $\beta$  Signalsystems aus *E. multilocularis* in HEK 293T Zellen untersucht. Da keine konstitutiv aktiven Rezeptoren exprimiert werden konnten, wurde die Signalweiterleitung über den Typ II Rezeptor EmRSK4 und die Typ I Rezeptoren EmRSK1 und EmRSK3 durch die Zugabe von humanem BMP2 stimuliert (vgl. 6.16.5). Bei dem konstitutiv aktiven Typ I Rezeptor EmRSK2 war die externe Stimulation der Signalweiterleitung nicht notwendig, wurde zur Absicherung der gleichen Vorgehensweise bei allen Rezeptorpaaren aber trotzdem durchgeführt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Zugabe von humanem BMP2 keine Auswirkungen auf die Aktivität von EmRSK2 hat<sup>212</sup>. Der Nachweis einer Phosphorylierung von Smads erfolgte wie oben beschrieben.

Wie in Abb. 43 gezeigt, wurde EmSmadE bei Stimulation der Signalwege mit humanem BMP2 weder durch das Rezeptorpaar EmRSK1 / EmRSK4 noch durch EmRSK2 / EmRSK4 aktiviert. Eine Phosphorylierung von EmSmadE erfolgte bei Anwesenheit von humanem BMP2 ausschließlich durch das Rezeptorpaar EmRSK3 / EmRSK4.

Damit konnte die Funktionalität von EmSmadE als R-Smad auch mit einer Kombination von BMP / TGF- $\beta$  Rezeptoren aus *E. multilocularis*, EmRSK3 und EmRSK4, gezeigt werden. Des Weiteren ist eine Signalweiterleitung im Parasiten über EmSmadE während



der Alveolären Echinokokkose möglich, wobei die Aktivierung von EmSmadE ausschließlich bei einer gleichzeitigen Expression von EmRSK3 und EmRSK4 und der Interaktion dieser Rezeptoren mit humanem BMP2 erfolgen kann.



**Abb. 43: EmSmadE - Phosphorylierung durch aktivierte Echinokokken-Rezeptoren.**

EmSmadE, EmSmadB, die Typ I BMP / TGF- $\beta$  Rezeptoren EmRSK1, EmRSK2 und EmRSK3 sowie der Typ II BMP / TGF- $\beta$  Rezeptor RSK4 aus *E. multilocularis* wurden in HEK 293T Zellen in den gezeigten Kombinationen exprimiert. Zur Aktivierung der Signalweiterleitung wurden die Rezeptoren mit 20 nM humanem BMP2 stimuliert. Die Kombination von humanem BMP Typ II Rezeptor (BMPR2), humanem konstitutiv aktivem BMP Typ I Rezeptor (Alk-3\*) und EmSmadB diente als Positivkontrolle<sup>94</sup>. Die Proteine wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Phosphorylierte Smads wurden mit anti-Phospho-Smad1 (Ser463/465) / Smad5 (Ser463/465) / Smad8 (Ser426/428) von Cell Signaling nachgewiesen (A). Die gleichmäßige Expression der Smads wurde durch anti-cMyc von NEB überprüft (B).

#### 4.10.7.EmSmadE - Interaktionsstudien

Interaktionen zwischen R-Smads und verschiedenen anderen Proteinen sind essentiell für die Signalweiterleitung über BMP / TGF- $\beta$  Signaling innerhalb der Zelle. Dabei interagieren aktivierte R-Smads mit einem Co-Smad und bilden einen Komplex, der in den Zellkern transloziert wird. Dort interagieren die Proteine aus diesem Komplex abhängig vom Zelltyp mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren), um die Expression spezifischer Gene zu regulieren<sup>119</sup>. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass R-Smads in monomeren und verschiedenen oligomeren Zuständen vorliegen können<sup>268</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurden Yeast-Two Hybrid Assays durchgeführt, um einerseits die Fähigkeit zur homomeren und heteromeren Komplexbildung von EmSmadE mit anderen R-Smads bzw. dem Co-Smad aus *E. multilocularis* zu untersuchen und andererseits mögliche Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren zu überprüfen. Details zur Durchführung der Yeast-Two Hybrid Assays sind in Kapitel 6.15 beschrieben.

### Herstellung der Vektoren für Yeast-Two Hybrid Assays

Für Yeast-Two Hybrid Assays wurden im Lauf dieser Arbeit zehn verschiedene Vektoren mit *emsmadE* hergestellt. Zunächst wurden MH1 Domäne (EmSmadE MH1) und MH2 Domäne (EmSmadE MH2) einzeln sowie beide Domänen gemeinsam (EmSmadE) in die Plasmide pGADT7 und pGBKT7 ligiert. Details zur Amplifikation, Klonierung und Expression finden sich in den Kapiteln 6.12.7 und 6.15. Auf Basis dieser Vektoren wurden bei EmSmadE MH2 und EmSmadE zusätzlich mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit spezifische Codons im SSVS - Motiv verändert, so dass bei den rekombinant exprimierten Proteinen ein gezielter Austausch der Aminosäuren Ser<sub>370</sub> und Ser<sub>372</sub> durch Glu erfolgte (S<sub>370</sub>E S<sub>372</sub>E; vgl. 6.12.13). Diese neuen Konstrukte wurden EmSmadE\* und EmSmadE MH2\* benannt. Alle hergestellten Vektoren wurden sequenziert, um Fehler im Leseraster auszuschließen (vgl. 6.12.12).

Die Proteinexpression der bereits vorliegenden pGADT7- und pGBKT7- Vektorkonstrukte von nicht aktiviertem EmSmadA (EmSmadA) und aktiviertem EmSmadA (EmSmadA\*<sup>94</sup>), nicht aktiviertem EmSmadB (EmSmadB) und aktiviertem EmSmadB (EmSmadB\*<sup>94</sup>), nicht aktiviertem EmSmadC (EmSmadC) und aktiviertem EmSmadC (EmSmadC\*<sup>97</sup>), EmSmadD<sup>97</sup> sowie EmSkip<sup>232</sup>, EmAlien (Günthel, D.; unveröffentlicht) und EmNHR1<sup>269</sup> wurde in *S. cerevisiae* AH109 überprüft und nach positivem Ergebnis in den Yeast-Two Hybrid Assays verwendet. EmSmadB wurde weder als Fusionsprotein mit der Gal4 DNA - Aktivierungsdomäne (AD) noch mit der DNA - Bindungsstelle (BD) exprimiert und konnte daher in den hier durchgeführten Yeast-Two Hybrid Assays nicht untersucht werden. EmSmadA\*, EmSmadD und EmSkip wurden ebenfalls als AD - Fusionsprotein nicht exprimiert. Daher wurden für diese drei Faktoren nur die BD - Fusionsproteine in den Assays verwendet.

Zusätzlich wurden unspezifische Interaktionen dieser AD- und BD-Fusionsproteine mit der Gal4 DNA - Aktivierungsdomäne (codiert auf pGADT7) oder der DNA - Bindungsdomäne (codiert auf pGBKT7) getestet. Dabei zeigten EmSmadC und EmSmadC\* als BD-Fusionsprotein eine starke unspezifische Interaktion mit der Gal4 DNA - Aktivierungsdomäne, so dass diese beiden Konstrukte in den hier durchgeführten Yeast-Two Hybrid Assays nicht verwendet wurden (vgl. 6.9)<sup>97</sup>. Die BD-Fusionsproteine EmSmadE, EmSmadE\*, EmSmadE MH2 und EmSmadE MH2\* zeigten ebenfalls eine Interaktion mit der Gal4 DNA - Aktivierungsdomäne, die allerdings schwächer war als bei EmSmadC und EmSmadC\*. Daher konnten die Interaktionen der BD-Fusionsproteine EmSmadE, EmSmadE\*, EmSmadE MH2 und EmSmadE MH2\* mit den verschiedenen getesteten AD-Fusionsproteinen durch die Zugabe des Inhibitors 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) verifiziert werden und wurden in die Auswertung einbezogen.

### Homodimerbildung von EmSmadE

Die Homodimerbildung von EmSmadE wurde sowohl für die einzelnen Domänen als auch für die full length Proteine in aktivierter Form und als Wildtyp untersucht (vgl. Abb. 44). Dabei konnte die Interaktion zwischen EmSmadE AD- und BD-Fusionsproteinen ebenso beobachtet werden wie die Interaktion zwischen EmSmadE\* AD- und BD - Fusionsproteinen. Die Kombination von EmSmadE\* und EmSmadE zeigte ebenfalls eine Interaktion, wohingegen keine Interaktion zwischen zwei EmSmadE MH1 AD- und BD-Fusionsproteinen festgestellt werden konnte. EmSmadE MH2 interagiert ausschließlich mit EmSmadE\*, wobei die entgegengesetzte Aktivierung (EmSmadE MH2\* x EmSmadE) ebenfalls eine Interaktion zur Folge hatte. Waren jeweils beide Proteine aktiviert oder nicht aktiviert (EmSmadE\* x EmSmadE MH2\* bzw. EmSmadE x EmSmadE MH2), so konnte keine Interaktion festgestellt werden.

Damit konnte gezeigt werden, dass EmSmadE zur Homodimerbildung fähig ist, wobei diese Interaktion sowohl bei der aktivierten Form wie auch beim Wildtyp des full length Proteins beobachtet werden konnte. Die MH1 Domänen interagierten entsprechend ihrer Funktion als DNA bindende Region erwartungsgemäß nicht miteinander. Interessant ist allerdings, dass keine Homodimerbildung zwischen zwei EmSmadE MH2 Domänen bzw. zwischen MH1 und MH2 Domäne festgestellt wurde, während eine Interaktion zwischen MH2 Domäne und full length Proteinen beobachtet wurde, sobald genau einer der beiden Interaktionspartner aktiviert war. Folglich scheint die Linker Region bei diesen Interaktionen eine regulierende Funktion zu haben.

	EmSmadE MH1	EmSmadE MH2	EmSmadE MH2*	EmSmadE	EmSmadE *
EmSmadE MH1	-	-	-	-	-
EmSmadE MH2		-	-	-	+
EmSmadE MH2*			-	+	-
EmSmadE				+	+
EmSmadE *					+

#### **Abb. 44: EmSmadE - Homodimerbildung im Yeast-Two Hybrid.**

Die EmSmadE MH1 Domäne, die MH2 Domäne und beide Domänen wurden mit der DNA - Bindungsdomäne (pGBKT7) sowie mit der Gal4 DNA - Aktivierungsdomäne (pGADT7) des Gal4 Transkriptionsfaktors fusioniert. Sterne markieren die aktivierte Form von EmSmadE, bei der zwei Aminosäuren im C-terminalen SSVS-Motiv ausgetauscht wurden (S<sub>370</sub>E S<sub>372</sub>E). Doppelt-transformierte *S. cerevisiae* AH109 wurden auf SD Drop-Out Platten unterschiedlicher Stringenz ausplattiert und nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C auf Wachstum untersucht. Die Yeast-Two Hybrid Assays wurden jeweils dreimal in Triplets durchgeführt. Die gezeigten Ergebnisse sind Durchschnittswerte dieser Experimente. Kein Wachstum (keine Interaktion: -) und Wachstum bei mittlerer Stringenz (Interaktion: +) sind gezeigt. Wachstum bei hoher Stringenz (starke Interaktion: ++) wurde nicht beobachtet.

### Interaktion von EmSmadE mit Echinokokken Smads

Interaktionen zwischen EmSmadE bzw. EmSmadE\*) und den bereits bekannten anderen Smad-Faktoren aus *E. multilocularis* wurden nach der Verifizierung der Proteinexpression in *S. cerevisiae* ebenfalls im Yeast-Two Hybrid Assay untersucht (vgl. Abb. 45).

EmSmadE interagiert dabei eindeutig mit den aktivierten Formen vom AR-Smad EmSmadA (EmSmadA\*) und vom BR-Smad EmSmadB (EmSmadB\*) sowie mit dem Co-Smad EmSmadD. Dagegen wurde keine Interaktion mit EmSmadA sowie nicht aktivierter und aktivierter Form vom zweiten AR-Smad EmSmadC (EmSmadC bzw. EmSmadC \*) festgestellt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die im vorhergehenden Abschnitt angesprochene mögliche „Rekrutierung“ von EmSmadE auch durch EmSmadA\* und EmSmadB\* erfolgen kann. Die Interaktion von EmSmadE und EmSmadD verstärken diese These.

EmSmadE\* interagiert dagegen mit EmSmadA in keiner der beiden Formen (EmSmadA bzw. EmSmadA \*), sondern nur mit EmSmadB\* und dem Co-Smad EmSmadD. Eine Interaktion mit nicht aktiviertem oder aktiviertem EmSmadC (EmSmadC bzw. EmSmadC \*) konnte nicht festgestellt werden. Eine „Rekrutierung“ inaktiver Smads durch EmSmadE\* scheint daher ausgeschlossen. Die Heterodimerbildung mit EmSmadB\* und mit keinem anderen aktivierten R-Smad spricht für eine deutliche Fokussierung auf den BMP Signalweg in *E. multilocularis*.

Damit konnte gezeigt werden, dass EmSmadE mit R-Smads sowie mit dem Co-Smad aus *E. multilocularis* Heterodimere bilden kann. Dabei sprechen die Ergebnisse einerseits für die Möglichkeit einer „Rekrutierung“ von inaktiven EmSmadE Proteinen durch aktivierte Formen anderen R-Smads, andererseits für die Fokussierung von aktiviertem EmSmadE auf die Signalweiterleitung über den BMP Signalweg.

	EmSmadE	EmSmadE *
EmSmadA	-	-
EmSmadA*	+	-
EmSmadB*	+	+
EmSmadC	-	-
EmSmadC*	-	-
EmSmadD	+	+

#### **Abb. 45: EmSmadE - Interaktion mit anderen Echinokokken Smads.**

Die MH1- und MH2-Domäne von EmSmadE (SE) wurden mit der DNA-Bindungsdomäne (pGBKT7) sowie mit der Gal4 DNA - Aktivierungsdomäne (pGADT7) des Gal4 Transkriptionsfaktors fusioniert. Sterne markieren die aktivierte Form von EmSmadE (SE\*), bei der zwei Aminosäuren im C-terminalen SSVS-Motiv ausgetauscht wurden (S<sub>370</sub>E S<sub>372</sub>E). Es wurde die Interaktion mit den entsprechenden Fusionsproteinen von EmSmadA (SA) und aktiviertem EmSmadA (SA\*)<sup>94</sup>, aktiviertem EmSmadB (SB\*)<sup>94</sup>, EmSmadC (SC) und aktiviertem EmSmadC (SC\*)<sup>97</sup> sowie EmSmadD (SD)<sup>97</sup> untersucht. Doppelt-transformierte *S. cerevisiae* AH109 wurden auf SD Drop-Out Platten unterschiedlicher Stringenz ausplattiert und nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C auf Wachstum untersucht. Die Yeast-Two Hybrid Assays wurden jeweils dreimal in Triplets durchgeführt. Die

gezeigten Ergebnisse sind Durchschnittswerte dieser Experimente. Kein Wachstum (keine Interaktion: -) und Wachstum bei mittlerer Stringenz (Interaktion: +) sind gezeigt. Wachstum bei hoher Stringenz (starke Interaktion: ++) konnte nicht beobachtet werden.

#### Interaktion von EmSmadE mit EmSkip, EmAlien und EmNHR1

Mögliche Interaktionen zwischen EmSmadE bzw. EmSmadE\* und den Transkriptionsfaktoren EmSkip und EmAlien sowie dem Nukleären Hormonrezeptor EmNHR1 wurden im Yeast-Two Hybrid Assay untersucht.

Wie in Abb. 46 gezeigt, konnten keine Interaktionen zwischen EmSmadE bzw. EmSmadE\* und EmSkip, EmAlien oder EmNHR1 festgestellt werden.

	EmSmadE	EmSmadE*
EmSkip	-	-
EmAlien	-	-
EmNHR1	-	-

#### **Abb. 46: EmSmadE - Interaktionen mit EmSkip, EmAlien und EmNHR1.**

MH1- und MH2-Domäne von EmSmadE (SE) wurden mit der DNA-Bindungsdomäne (pGBKT7) sowie mit der Gal4 DNA - Aktivierungsdomäne (pGADT7) des Gal4 Transkriptionsfaktors fusioniert. Sterne markieren die aktivierte Form von EmSmadE (SE\*), bei der zwei Aminosäuren im C-terminalen SSVS-Motiv ausgetauscht wurden (S<sub>370</sub>E S<sub>372</sub>E). Es wurde die Interaktion mit den entsprechenden Fusionsproteinen von EmSkip<sup>232</sup>, EmAlien (Günthel, D.; unveröffentlicht) und EmNHR1 (Lorenz, S.; unveröffentlicht) untersucht. Doppelt-transformierte *S. cerevisiae* AH109 wurden auf SD Drop-Out Platten unterschiedlicher Stringenz ausplattiert und nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C auf Wachstum untersucht. Die Yeast-Two Hybrid Assays wurden jeweils dreimal in Triplets durchgeführt. Die gezeigten Ergebnisse sind Durchschnittswerte dieser Experimente. Kein Wachstum bzw. keine Interaktion ist durch ein Minuszeichen (-) gekennzeichnet. Wachstum bei mittlerer Stringenz (Interaktion: +) und Wachstum bei hoher Stringenz (starke Interaktion: ++) konnten nicht beobachtet werden.

#### **4.11. EmSmadF - ein I-Smad Homolog aus *E. multilocularis***

Mit Hilfe der vorläufigen Sequenzen der Sanger Helminth Genom Initiative wurde ein bisher unbekannter I-Smad in *Echinococcus multilocularis* identifiziert.

Für diese Analysen wurde die Aminosäuresequenz der humanen Smad6 Isoform 2 (mothers against decapentaplegic homolog 6 isoform 2; NCBI Reference Sequence: NP\_001136333.1) als Template in einem TBLASTN-Alignment herangezogen und auf Contig 4678 (bp 296494-291898) ein I-Smad Homolog in *E. multilocularis* identifiziert, EmSmadF (vgl. 6.18). Weitere Analysen ergaben, dass EmSmadF der einzige I-Smad im gesamten Genom von *E. multilocularis* ist.

##### **4.11.1. *EmsmadF* - cDNAs und abgeleitete Aminosäuresequenzen**

Zur Identifikation der mRNA von *emsmadF* wurden das 5' Ende sowie das 3' Ende der zugehörigen cDNA durch RACEs mit den Oligonukleotiden pJG4-5 dw und SF up1 bzw. SF dw1 und pJG4-5 up auf die in der Arbeitsgruppe bereits vorliegende cDNA-Bibliothek amplifiziert (vgl. 6.10 und 6.12.7). Dabei wurden zwei 5' UTRs mit verschiedenen Startcodons identifiziert, die zu zwei verschiedenen mRNA - Spleißvarianten von

*emsmadF* führten, *emsmadFa* und *emsmadFb*. Die Expression beider ORFs wurde durch die Amplifikation per PCR verifiziert (SF dw0 x SF up1 bzw. SF dw1 x SF up1). Zusätzlich wurden die ORFs beider Varianten mit den oben genannten Oligonukleotiden amplifiziert und mit dem PCR Cloning Kit von Qiagen in den Vektor pDrive zwischenkloniert (vgl. 6.12.7). Die Sequenzen von *emsmadFa* und *emsmadFb* wurden durch die Sequenzierung mehrerer Klone verifiziert.

Die Expression verschiedener mRNA-Spleißvarianten bei inhibitorischen Smads konnte in *H. sapiens* bereits mit zwei Varianten für *smad 6* und mit vier Varianten für *smad 7* gezeigt werden. Die auf diesen mRNAs codierten Proteine variieren jeweils am N-terminalen Ende, so dass zum Einen zwei Isoformen vom humanen Smad 6 (NCBI Reference Sequences: NP\_005576 und NP\_001136333) und zum Anderen vier Isoformen vom humanen Smad 7 (NCBI Reference Sequences: NP\_005895, NP\_001177750, NP\_001177751 und NP\_001177752) bekannt sind. Auch in *D. melanogaster* liegen drei verschiedene mRNA Varianten des inhibitorischen Smad Faktors daughters against dpp (Dad) vor (NCBI Reference Sequences: NM\_057912, NM\_169740 und NM\_001014629), allerdings gibt es keine Unterschiede in der Sequenz des jeweils codierten Proteins.

#### *EmsmadFa* - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz

Die mRNA von *emsmadFa* umfasst einen 190 bp großen nicht translatierten Bereich am 5' Ende, den ORF mit 840 bp sowie eine 108 bp große nicht translatierte Region zwischen Stoppcodon und polyA - Bereich. Es wurde kein Spliced-Leader am 5' Ende der cDNA identifiziert. *EmsmadFa* codiert für 279 Aminosäuren des Proteins EmSmadFa. Mit Hilfe der Conserved Domains Database (CDD) des NCBI konnte der Bereich zwischen Lys<sub>48</sub> und Asn<sub>266</sub> als konservierte Domäne der MH2 Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl00056) identifiziert werden. Das theoretische Molekulargewicht wurde mit ExpASY vom Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) errechnet und beträgt 31,3 kDa (vgl. 6.18.).

```

TCGCCTTCACCGTCCTATCAGCTGCCAACAGTGTTTTATTTGCCAATCTTGCGAATGGTGGACAGTAAACAAATAGGGAG      80
ACGATTCGGTGTCAACAAGGATTCATATCCAATTGAGTCCCTGGTCGATGGGACCGAGGCTGCCACCTGTGTATACAGAAT      160
                M R V P L S A D G V R E T K A P P
GGAGCGATTGGCTACTAGAAATATCATATGAATGCGGGTCCCGTTGTGCGGGATGGCGTTCAGAGAAACGAAGGCACCTCC      240

N M L T V P R A P H L T E R Q K D A F T N Q G D S G
AAATATGCTAACTGTGCCAGAGCGCCGCATTTGACTGAAAGGCAAAGGACGCATTTACAAATCAGGGCGACTCCGGAT      320
▲
3459 bp
C V L E E C C K K P W S H V S Y W E C N R H I G H K W
GCGTTTTGGAGGAGTGTGCAAGAAGCCTTGGTTCGCACGTCTCCTACTGGGAATGTAATCGTCACATCGGTCACAAGTGG      400

L P V I T S A L V V L N E E H Y S V S A A T A E N T S
CTGCCAGTCACTACCTCCGCTTTGGTTGTCTCAACGAGGAGCACTATTCGGTCTCCGCTGCCACCGCAGAAAATACCTC      480

T H A V W S Q Q G R L C L D R L V R H F T S P R A F
CACTCATGCCGTTTGGTCAACAACAGGGCCGCTTTGTCTGGACCGTCTAGTCCGCCATTTACCTCGCCGCGAGCCTTCA      560
★
S E E S H P S R K I Y H P S I L H S S S P T K Q R R R
GTGAAGAATCGCACCCAGTCGAAAAATATACCATCCGTCCATCTCCATTCCTCCTCACCAACAAGCAACGACGGCGT      640
★
L S H E G I S L L L L P K G Q I L L T N K T L T T P I
CTCTCCCATGAGGGAATAAGCCTTCTGCTACTGCCAAAAGGGCAAATCCTCCTGACAAAACAAAACACTCACACACCCAT      720

```

F V A S P C F V Q P G D L I A G D W P V Y R V A P A ATTTGTCGCCTCGCCATGTTTTGTGCAACCGGGTGATTTAATTGCCGGTGACTGGCCAGTCTATCGTGTGCACCGGCT	800
C S L V V F D T R I Y E D R L T E A G K Y T P W P G K GTTCCCTGGTGGTTTTTCGACACGCGGATCTACGAGGACCGACTGACAGAGCGGGCAAGTACACGCCCTGGCCGGGCAAA	880
S L F G P V L H I S L G K G W G P A Y R R T D F T H C TCGCTGTTCCGACCAGTGTACACATCAGCTTAGGTAAGGCTGGGGTCTGCTTACCGACGCACTGACTTCACTCACTG	960
P A R L E I W L N L S T I K S H T S S G L Q * CCCTGCAAGGCTCGAAATTTGGCTAAATTTATCCACCATCAAATCGCACACATCCAGTGGTTTGCATGATAGGGAGACC	1040
CCACTCTGAATATGAATGTCTCGGTCAAACCTTGCCAACAGCGGCTGTGAATCGCATTTAACCAATTATTTTTTTAAT	1120
AAAACAATCTAGCAACAA	1138

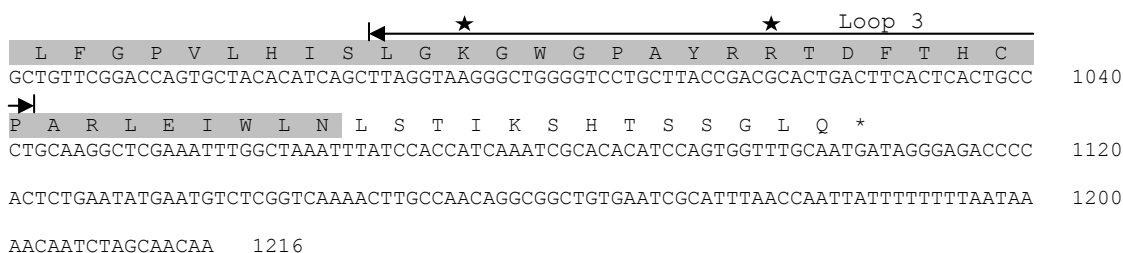
**Abb. 47: *EmsmadFa* - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz.**

Gezeigt sind die Nukleotidsequenz der *emsmadFa* cDNA (unten) sowie die zugehörige Aminosäuresequenz (oben). Ein Dreieck zeigt die Position und Länge des chromosomalen Introns. Die identifizierte Domäne der MH2 Superfamilie ist grau hinterlegt und der Loop 3 markiert. Die Positionen konservierter basischer Aminosäuren im MH2 basic groove sind durch Sterne angezeigt.

*EmsmadFb* - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz

Die mRNA von *emsmadFb* umfasst am 5' Ende einen nicht translatierten Bereich von 316 bp, den kodierenden Bereich von 792 bp sowie eine 108 bp große nicht translatierte Region zwischen Stoppcodon und polyA - Bereich, wobei sich die 3' Enden der mRNAs von *emsmadFa* und *emsmadFb* entsprechen. Die mRNA von *emsmadFb* wurde ebenfalls nicht mit dem Spliced-Leader aus *E. multilocularis* fusioniert. *EmsmadFb* codiert für 263 Aminosäuren des Proteins EmSmadFb. Mit Hilfe der Conserved Domains Database (CDD) des NCBI konnte der Bereich zwischen Lys<sub>32</sub> und Asn<sub>250</sub> als konservierte Domäne der MH2 Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl00056) identifiziert werden. Das theoretische Molekulargewicht wurde mit ExPASy vom Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) errechnet und beträgt 29,6 kDa (vgl. 6.18.).

GGCAGGCAGGCGTACACAAGAGCGCCCTGCTTTTGGCGCGCCTTGCCCTTCAGACGCCAGGCTAGGCCAGGCCATGCTAG GCCTCTCCTCTCGGCGTCTGCATCGTCGCCGAGCCGTTTCGAGGGTTATGCGGAGTCACCATCACTATGTGTGTCAGGT	80
GCCTCTTGCCCATTTGGCTCCGACTGAGAGCCAATAGAATGTACGTAATCAGCTCACTTTGGCCCCATTTGCTATAAATA M	240
TGAATCGGACGGAGATCGCACGCAAGTATCACCTTGAACAGATATCCCGCTTACGATACGACGAACCACGCAATCCATGG 90 bp 4266 bp	320
D M L T V P R A P H L T E R Q K D A F T N Q G D S G C ATATGCTAACTGTGCCAGAGCGCCGATTTGACTGAAAGGCAAAAGGACGCATTTACAAATCAGGGCGACTCCGGATGC	400
V L E E C C K K P W S H V S Y W E C N R H I G H K W L GTTTTGGAGGAGTGTGCAAGAAGCCTTGGTTCGCACGTCTCTACTGGGAATGTAATCGTCACATCGGTCACAAGTGGCT	480
P V I T S A L V V L N E E H Y S V S A A T A E N T S GCCAGTCATCACCTCCGCTTTGGTGTCTCAACGAGGAGCACTATTCGCTCCTCCGCTGCCACCGCAGAAAATACCTCCA	560
T H A V W S Q Q G R L C L D R L V R H F T S P R A F S CTCATGCCGTTTGGTACACAACAGGGCCGCTTTGTCTGGACCGTCTAGTCCGCCATTTACCTCGCCGCGAGCCTTCACT	640
E E S H P S R K I Y H P S I L H S S S P T K Q R R R L GAAGAATCGACCCAGTCGAAAAATATACCATCCGTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT	720
S H E G I S L L L L P K G Q I L L T N K T L T T P I CTCCCATGAGGGAATAAGCCTTCTGCTACTGCCAAAAGGGCAATCCTCCTGACAAAACAAAACACTCACCACACCCATAT	800
F V A S P C F V Q P G D L I A G D W P V Y R V A P A C TTGTCGCCTCGCCATGTTTTGTGCAACCGGGTGATTTAATTGCCGGTGACTGGCCAGTCTATCGTGTGCACCGGCTGT	880
S L V V F D T R I Y E D R L T E A G K Y T P W P G K S TCCCTGGTGGTTTTTCGACACGCGGATCTACGAGGACCGACTGACAGAGCGGGCAAGTACACGCCCTGGCCGGGCAATC	960

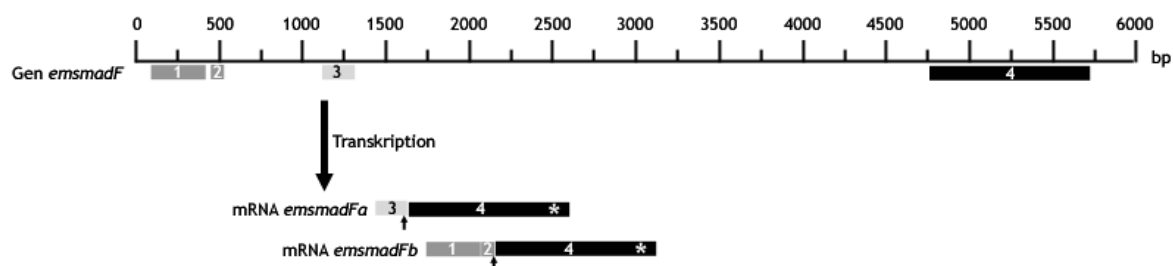


**Abb. 48: *EmsmadFb* - cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz.**

Gezeigt sind die Nukleotidsequenz der *emsmadFb* cDNA (unten) sowie die zugehörige abgeleitete Aminosäuresequenz (oben). Dreiecke zeigen die Position und Länge von chromosomalen Introns. Die identifizierte Domäne der MH2 Superfamilie ist grau hinterlegt und der Loop 3 markiert. Die Positionen konservierter basischer Aminosäuren im MH2 basic groove sind durch Sterne angezeigt.

#### 4.11.2. *EmsmadF* - Genorganisation

Der chromosomale Locus von *emsmadF* ist in insgesamt vier Exons organisiert, wobei der Startpunkt der Transkription bei den beiden Spleißvarianten *emsmadFa* und *emsmadFb* an verschiedenen Stellen liegt und damit die Zahl der Exons je nach Spleißvariante variiert.



**Abb. 49: *EmsmadF* - chromosomaler Locus und Spleißvarianten.**

Gezeigt ist die Genorganisation von *emsmadF* (Gen *emsmadF*) als Abfolge der Exons (1-4) in Relation zur Länge des chromosomalen Locus, der durch eine Skala dargestellt ist (bp; oben). Die mRNA-Spleißvarianten *emsmadFa* und *emsmadFb* sind ebenfalls dargestellt (unten). Die Start- und Stoppcodons der codierten Proteine sind jeweils mit einem Pfeil bzw. einem Stern markiert.

So umfasst *emsmadFa* zwei Exons, wobei das Intron mit einer Größe von 3459 bp im kodierenden Bereich liegt (Abb. 49 und Abb. 50). Die Exons haben eine Größe von 242 bp (Exon 1) und 896 bp (Exon 2).

*EmsmadFb* ist dagegen in drei Exons organisiert, wobei die Sequenzen des jeweils 3' gelegenen Exons von *emsmadFa* und *emsmadFb* deckungsgleich sind (Abb. 49 und Abb. 50). Bei *emsmadFb* liegt zwischen Exon 1 (281 bp) und Exon 2 (39 bp) ein nur 90 bp großes Intron, wohingegen das Intron zwischen den Exons 2 und 3 4266 bp umfasst. Das zweite Intron liegt im kodierenden Bereich des Gens *emsmadFb*.

Die alternativ gespleißten Exon-Intron Übergänge liegen dabei am 3' Spleiß-Akzeptor vom einzigen Intron der Spleißvariante *emsmadFa* bzw. vom zweiten Intron der Spleißvariante *emsmadFb*.



Aufgrund der Tatsache, dass *EmSmadF* in den Bereichen, in denen die Intron - Exon Übergänge zu finden sind, sehr wenig konserviert ist, lässt sich auf Basis dieser Daten keine eindeutige Aussage über einen potenziellen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung von *EmSmadF* und homologen Genen anderer Organismen machen.

Exon Nr.	Länge Exon [bp]	5' Spleiß-Donor	3' Spleiß-Akzeptor	Länge Intron [bp]	unterbrochene AS
<i>emsmadFa</i>					
1	242	CT CCA A gtg agc	aaa cag AT ATG C	3459	N <sub>18</sub>
2	896				
<i>emsmadFb</i>					
1	281	GA ACA G gta tca	ttc tag AT ATC C	90	-
2	39	CC ATG G gta agc	aaa cag AT ATG C	4266	D <sub>2</sub>
3	896				

**Abb. 50: *EmsmadFa* und *emsmadFb* - Organisation von Exons und Introns.**

Dargestellt sind die Anzahl und Länge der Exons sowie die Stellen im Gen, an denen die Introns die mRNA unterbrechen. Zusätzlich sind sowohl die Länge der Introns und unterbrochene Aminosäurecodons des Leserasters dargestellt. Die Sequenz an den Spleißstellen ist für Nukleotide von Exons in Großbuchstaben und für die Introns in Kleinbuchstaben gezeigt.

#### 4.11.3. *EmsmadF* - Expressionsprofil

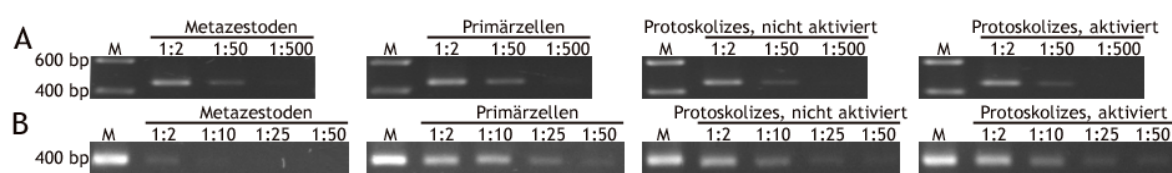
Die Expression von *emsmadF* wurde in verschiedenen Stadien von *E. multilocularis* untersucht. Dazu wurde zunächst cDNA aus Metazestoden ohne Brutkapseln, Primärzellen (14 Tage in Ko-Kultur), aktivierten Protoskolizes und nicht aktivierten Protoskolizes hergestellt (Isolat G8065; vgl. 6.17.1 und 6.11). Die cDNA wurde auf Basis des konstitutiv exprimierten Gens *eme1p* (451 bp) normalisiert und anschließend eine semi - quantitative PCR für *emsmadF* durchgeführt (vgl. 6.12.6)<sup>71</sup>. Aufgrund schwankender Qualität der cDNA im 5' Bereich konnte in diesem Experiment keine Unterscheidung zwischen *emsmadFa* und *emsmadFb* getroffen werden.

In allen Stadien konnten klare Banden der erwarteten Größe (391 bp) amplifiziert werden. Wie in Abb. 51 gezeigt, konnte das untersuchte Fragment von *emsmadF* bereits bei einer 1:10 Verdünnung der cDNA in Metazestoden nicht mehr amplifiziert werden, wohingegen der Nachweis in den anderen Stadien noch bis zu einer 1:50 Verdünnung möglich war. Somit erfolgt die Expression von *emsmadF* im *E. multilocularis* Isolat G8065 stadienspezifisch mit geringerer Expression in Metazestoden im Vergleich zu Primärzellen, aktivierten und nicht aktivierten Protoskolizes.

Auf Basis der vorläufigen Transkriptomdaten wurden ergänzende Analysen zur Expression von *emsmadFa* und *emsmadFb* durchgeführt, die ein abweichendes Bild der Genexpression zeigen (Daten nicht gezeigt). Demnach ist die Expression beider *emsmadF* Spleißformen in nicht aktivierten Protoskolizes am stärksten. Im Vergleich mit Primärzellen wird *emsmadF1* in nicht aktivierten Protoskolizes um das 3,4-fache und im Vergleich mit Metazestoden um das 6,3-fache exprimiert. Bei *emsmadF2* zeigt sich ein

ganz ähnliches Bild. Hierbei unterscheidet sich die Expressionsstärke von nicht aktivierten Protoskolizes und Primärzellen um den Faktor 1,5, im Vergleich von Metazestoden und nicht aktivierten Protoskolizes um das 4,9-fache. Nach den vorläufigen Transkriptomdaten wird weder *emsmadF1* noch *emsmadF2* in aktivierten Protoskolizes exprimiert. Diese stark unterschiedlichen Ergebnisse je nach Analyseverfahren kann auf die Verwendung verschiedener Isolate zurückgeführt werden (G8065 bei der semi - quantitativen PCR; H95, J31 und Java bei der Erstellung der Transkriptomdaten).

Übereinstimmend konnte die Expression von *emsmadF1* und *emsmadF2* bei beiden Methoden in allen Stadien gezeigt werden, die in Zwischen- oder Endwirt vorkommen (Metazestode, Primärzellen, nicht aktivierte Protoskolizes).



**Abb. 51: *EmsmadF* - Expressionsprofil in verschiedenen Larvenstadien.**

Die Expression von *emsmadF* wurde mit normalisierter cDNA von Metazestoden (mit Brutkapseln), Primärzellen (14 Tage, Ko-Kultur), nicht aktivierten Protoskolizes und aktivierten Protoskolizes in einer semi - quantitativen PCR getestet. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 2% Agarosegel, gepuffert mit TAE, mit anschließender Färbung der DNA mit Ethidiumbromid. Als Größenmarker (M) wurde der SmartLadder von Eurogentec verwendet. Die Markerbanden sind entsprechend ihrer Größe markiert. A: Gezeigt ist das Expressionsmuster des konstitutiv exprimierten *emelp* (451 bp) in den oben genannten Stadien (von links nach rechts), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:50 und 1:500<sup>71</sup>. B: Gezeigt ist das Expressionsmuster von *emsmadF* (391 bp) in den oben genannten Stadien (von links nach rechts), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:10, 1:25 und 1:50.

#### 4.11.4.EmSmadF - Homologie

Zur Untersuchung der Homologie zwischen EmSmadFa und EmSmadFb mit den bislang bekannten Smads anderer Organismen wurde die Aminosäuresequenz des jeweiligen ORF als Template in einem NCBI BLASTP verwendet (vgl. 6.18). Es konnten aufgrund der geringen Anzahl konservierter Aminosäuren im N-terminalen Bereich bei beiden Isoformen nur Homologien im Bereich der Domäne der MH2 Superfamilie identifiziert werden, die bei beiden Isoformen gleich ist. Unterschiede zwischen EmSmadFa und EmSmadfb konnten folglich ausschließlich im *E*-value festgestellt werden.

Die höchste Homologie zeigte sich mit einem *E*-value von  $3 \times 10^{-26}$  für EmSmadFa und  $5 \times 10^{-26}$  für EmSmadFb zu einem putativen Smad aus *S. mansoni* (NCBI Reference Sequence: NP\_002569925.1), gefolgt von Smad6 aus *Apis mellifera* mit einem *E*-value von  $1 \times 10^{-5}$  bei beiden EmSmadF Isoformen (NCBI Reference Sequence: NP\_396816.2). Die Homologie zur humanen Smad6 Isoform 2 lag bei beiden EmSmadE Isoformen bei einem *E*-value von  $4 \times 10^{-4}$  (NCBI Reference Sequence: NP\_001136333.1).



Abb. 52: EmSmadF - Alignment der MH2 Domänen von I-Smads.

Vergleichend sind die Sequenzen der MH2 Domäne von I-Smads verschiedener Organismen dargestellt. Neben der Aminosäuresequenz von EmSmadFa bzw. EmSmadFb, die im Bereich der Domäne der MH2 Superfamilie gleich sind (EmSmadF MH2), finden sich die Sequenzen von Smad 6 aus *Apis mellifera* (AmSmad6 MH2; NCBI Reference Sequence: NP\_396816.2) und Smad 6 Isoform 2 aus *H. sapiens* (HsSmad6 MH2; NCBI Reference Sequence: NP\_001136333.1). Die Positionen der Aminosäuren sind jeweils rechts der Sequenz angezeigt. Aminosäuren, die in mindestens 2 Sequenzen konserviert sind, sind grau hinterlegt. Die Positionen konservierter basischer Aminosäuren im MH2 basic groove sind durch Sterne markiert (oberhalb). Der Bereich des Loop 3 (L3) wird angezeigt.

#### 4.11.5. EmSmadF - Strukturelle Charakterisierung

Zur Übersicht ist in Abb. 53 die Domänenstruktur von EmSmadF in einer schematischen Darstellung abgebildet.

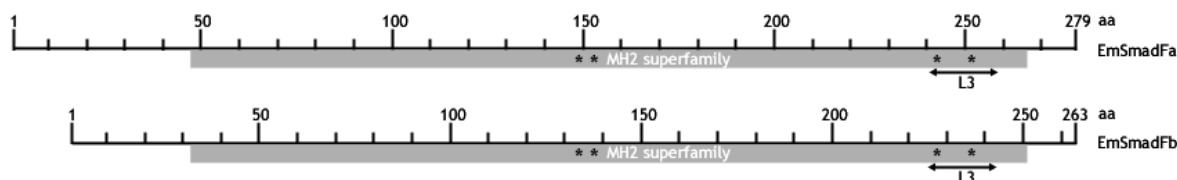


Abb. 53: EmSmadFa und EmSmadFb - Domänenstruktur.

Dargestellt ist die Domänenstruktur von EmSmadFa, wobei die konservierte Domäne der MH2 Superfamilie hier die Aminosäuren 48 - 266 umfasst (oben), sowie die Domänenstruktur von EmSmadFb. Die konservierte Domäne der MH2 Superfamilie umfasst bei EmSmadFb die Aminosäuren 32 - 250. Die Domänenstruktur wurde mit Hilfe der Conserved Domains Database (CDD) des NCBI identifiziert: die Proteine werden anhand der Anzahl ihrer Aminosäuren (aa) als Skala dargestellt, die konservierte Domäne der MH2 Superfamilie (NCBI Cluster ID: cl00056) wird durch einen grauen Balken markiert. Die Positionen konservierter positiv geladener Aminosäuren im MH2 basic groove sind durch Sterne markiert. Der Bereich des Loop 3 (L3) ist jeweils durch einen Pfeil markiert und beschriftet.

#### Der MH2 basic groove

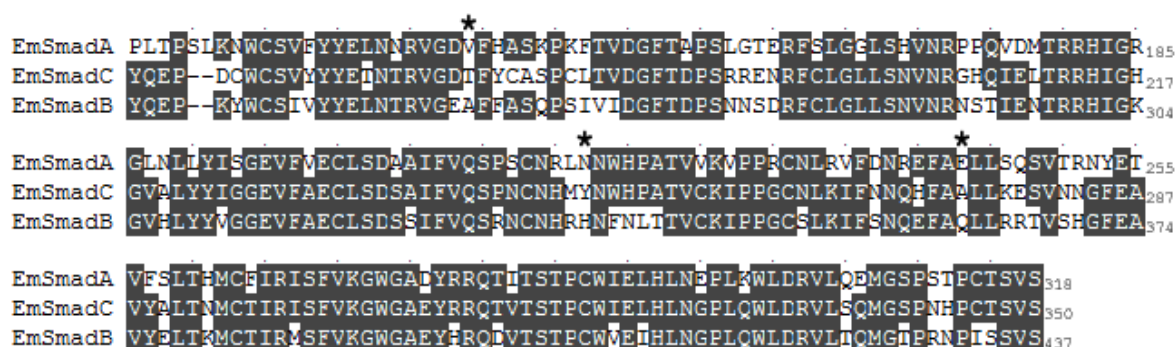
Als MH2 basic groove wird ein basischer Oberflächenbereich bezeichnet, der sowohl beim R-Smad Smad 2 als auch beim I-Smad Smad 7 (beide aus *H. sapiens*) durch konservierte positiv geladene Aminosäuren gebildet wird. Es konnte bei Smad 7 gezeigt werden, dass die Aminosäuren Lys<sub>312</sub>, Lys<sub>316</sub>, Lys<sub>401</sub> und Arg<sub>409</sub> in verschiedenen Kombinationen durch ihre Funktion bei Protein-Protein Interaktionen bei der Inhibierung von Activin/Nodal, BMP und TGF- $\beta$  Signalen eine essentielle Rolle spielen (vgl. 3.3.4)<sup>270</sup>.

Auch in EmSmadFa und EmSmadFb finden sich an diesen Positionen konservierte basische Aminosäuren, die zur Funktionalität dieser Echinokokken I-Smad Isoformen beitragen könnten: Arg<sub>149</sub>, His<sub>153</sub>, Lys<sub>243</sub> und Arg<sub>251</sub> bei EmSmadFa, Arg<sub>133</sub>, His<sub>137</sub>, Lys<sub>227</sub> und Arg<sub>235</sub> bei EmSmadFb.

#### 4.12. EmSmadA - Untersuchungen zur Spezifität

Die funktionelle Analyse von EmSmadA (GenBank: CAD68073.1) zeigte bereits 2003, dass dieser AR-Smad sowohl durch humane Rezeptoren des TGF- $\beta$  Signalsystems als auch durch entsprechende Rezeptoren des BMP Signalweges phosphoryliert werden kann<sup>94</sup>. Dagegen wird EmSmadC (AR-Smad; GenBank: CAJ77649.1) nur durch Rezeptoren des TGF- $\beta$  Signalsystems und EmSmadB (BR-Smad; GenBank: CAD68074.1) ausschließlich von Rezeptoren des BMP Signalweges aktiviert<sup>94,97</sup>. Im humanen Modell sind beide Signalsysteme streng voneinander getrennt, wobei diese starke Spezifität seit kurzem wieder kontrovers in der Fachliteratur diskutiert wird<sup>129</sup>. Durch den Austausch spezifischer Aminosäuren innerhalb der MH2 Domäne von EmSmadA wurde in der vorliegenden Arbeit eine Basis zur Untersuchung der biochemischen Ursache der Spezifität von R-Smads geschaffen.

Dazu wurden zunächst Aminosäuren der MH2 Domäne von EmSmadA identifiziert, die eine größere Ähnlichkeit zur entsprechenden Aminosäure aus EmSmadB aufwiesen als zu derjenigen aus EmSmadC. In Abb. 54 ist ein Vergleich der Aminosäuren der MH2 Domänen der Echinokokken AR-Smads EmSmadA und EmSmadC sowie des BR-Smads EmSmadB gezeigt.



**Abb. 54: EmSmadA - Alignment der MH2 Domänen von Echinokokken Smads.**

Vergleichend sind die Sequenzen der MH2 Domänen der *E. multilocularis* AR-Smads EmSmadA (GenBank: CAD68073.1) und EmSmadC (GenBank: CAJ77649.1) sowie die entsprechende Sequenz des BR-Smads EmSmadB (GenBank: CAD68074.1) dargestellt<sup>94,97</sup>. Die Positionen der Aminosäuren sind jeweils rechts der Sequenz angezeigt. Die in dieser Arbeit mutierten Aminosäuren innerhalb der MH2 Domäne von EmSmadA sind durch Sterne markiert.

So zeigte die EmSmadA - Aminosäure Val<sub>139</sub> als unpolare Aminosäure größere Gemeinsamkeit mit der entsprechenden Aminosäure von EmSmadB (Ala<sub>258</sub>) als mit derjenigen von EmSmadC (Thr<sub>172</sub>). Auch Asn<sub>218</sub> aus EmSmadA wies als polare Aminosäure eine größere Ähnlichkeit zu Tyr<sub>249</sub> aus EmSmadC als zu His<sub>336</sub> aus EmSmadB auf, wurde

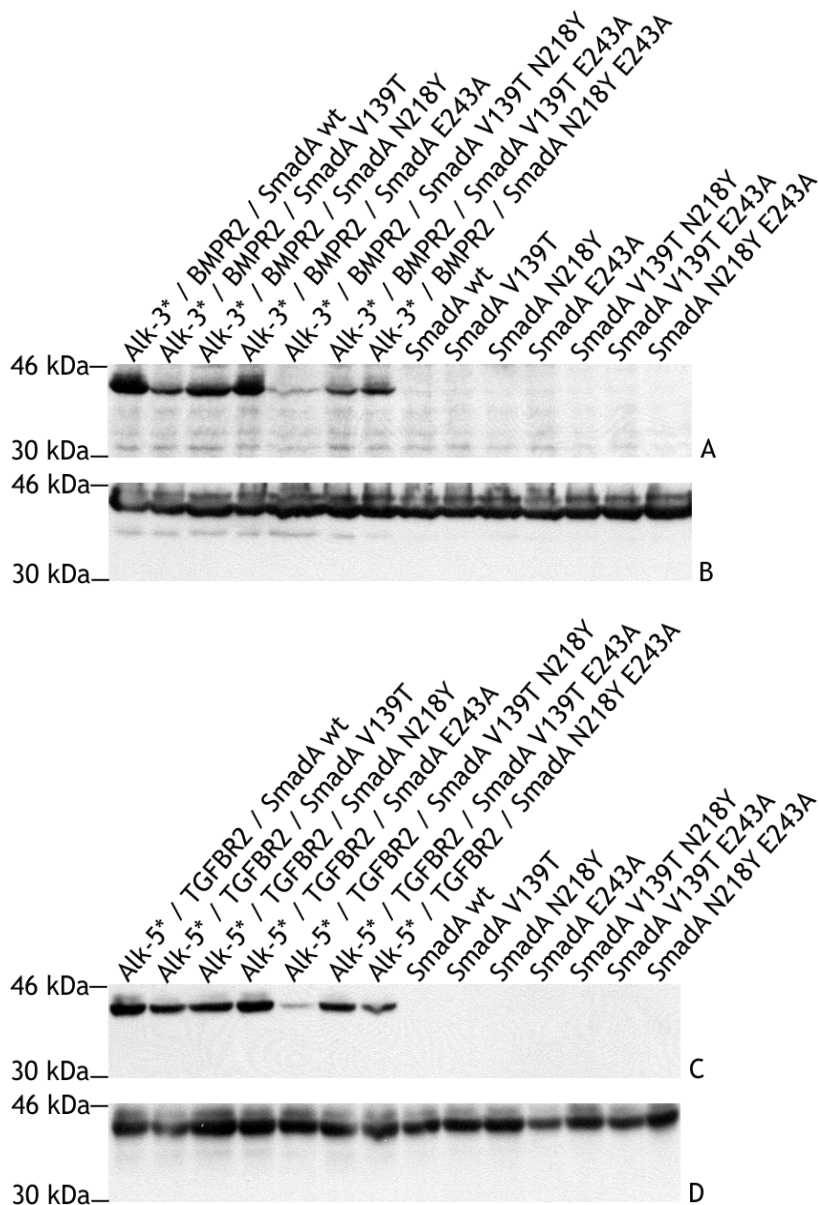
aber dennoch in die Untersuchungen mit einbezogen. Bei Glu<sub>243</sub> aus EmSmadA wurde aufgrund der Größe dieser Aminosäure eine höhere Ähnlichkeit zu Gln<sub>362</sub> aus EmSmadB als zu A<sub>275</sub> aus EmSmadC festgestellt.

#### 4.12.1. EmSmadA - Mutationen in der MH2 Domäne (V<sub>139</sub>T, N<sub>218</sub>Y und E<sub>243</sub>A)

Zur Analyse ihrer Funktion in Bezug auf die spezifische Interaktion zwischen EmSmadA und TGF- $\beta$  bzw. BMP Rezeptoren wurden die Aminosäuren V<sub>139</sub>, N<sub>218</sub> und E<sub>243</sub> durch eine Mutation der kodierenden Sequenz zu Threonin, Tyrosin bzw. Alanin verändert (V<sub>139</sub>T, N<sub>218</sub>Y bzw. E<sub>243</sub>A, vgl. 6.12.13), die damit den entsprechenden Aminosäuren in EmSmadC entsprechen. Die Aktivierung dieser EmSmadA-Mutanten durch humane Rezeptoren wurde mit Hilfe von heterologer Expression in HEK 293T Zellen und anschließender Immundetektion phosphorylierter EmSmadA Proteine überprüft (vgl. 6.16.5, 6.13.2 und 6.13.4).

Wie in Abb. 55 A gezeigt, war die Phosphorylierung von EmSmadA V<sub>139</sub>T durch die humanen BMP Rezeptoren bei gleicher Expressionsstärke (Abb. 55 B) deutlich schwächer als diejenige des EmSmadA Wildtyps (wt) und auch bei EmSmadA N<sub>218</sub>Y ist eine leicht dünnere Bande als beim EmSmadA wt zu erkennen. Die EmSmadA - Mutation E<sub>243</sub>A zeigte dagegen keine Auswirkung auf die Stärke der Phosphorylierung durch das humane BMP Rezeptorpaar. Die Phosphorylierung von EmSmadA V<sub>139</sub>T N<sub>218</sub>Y wurde dagegen nahezu komplett verhindert und die Signalstärke von EmSmadA V<sub>139</sub>T E<sub>243</sub>A und EmSmadA N<sub>218</sub>Y E<sub>243</sub>A waren im Vergleich mit EmSmadA wt deutlich geringer.

Im Vergleich dazu zeigten die Mutationen bei der Aktivierung von EmSmadA durch humane TGF- $\beta$  Rezeptoren bei gleicher Expressionsstärke leicht veränderte Phosphorylierungsmuster (Abb. 55 C und D). Hier waren die Banden von aktiviertem EmSmadA V<sub>139</sub>T und EmSmadA N<sub>218</sub>Y im Vergleich mit EmSmadA wt beide in gleichem Maß leicht abgeschwächt, was auf eine verminderte Phosphorylierung zurückzuführen war. Die Bandenstärke von EmSmadA E<sub>243</sub>A ließ dagegen abermals den Schluss zu, dass E<sub>243</sub> bei der Interaktion mit Typ I Rezeptoren keine Rolle spielt. Bei den doppelt mutierten Proteinen konnte bei EmSmadA V<sub>139</sub>T N<sub>218</sub>Y wieder eine starke Verminderung der Phosphorylierung dieses Smad - Faktors festgestellt werden. Bei EmSmadA N<sub>218</sub>Y E<sub>243</sub>A wurde ebenfalls eine schwächere Phosphorylierung detektiert. EmSmadA V<sub>139</sub>T E<sub>243</sub>A zeigte dagegen mit einer leicht schwächeren Bande nur einen geringfügigen Unterschied bezüglich der Phosphorylierung im Vergleich zum Wildtyp.



**Abb. 55: EmSmadA Mutanten - Phosphorylierung durch humane Rezeptoren.**

Der EmSmadA Wildtyp (SmadA wt)<sup>94</sup>, die Einfachmutanten EmSmadA V<sub>139</sub>T (SmadA V139T), EmSmadA N<sub>218</sub>Y (SmadA N218Y) und EmSmadA E<sub>243</sub>A (SmadA E243A) sowie die Doppelmutanten EmSmadA V<sub>139</sub>T N<sub>218</sub>Y (SmadA V139T N218Y), EmSmadA V<sub>139</sub>T E<sub>243</sub>A (SmadA V139T E243A) und EmSmadA N<sub>218</sub>Y E<sub>243</sub>A (SmadA N218Y E243A) wurden in HEK 293T Zellen in den gezeigten Kombinationen zusammen mit den humanen TGF- $\beta$  Typ II (TGFBR2) und BMP Typ II Rezeptoren (BMPR2) sowie mit den humanen konstitutiv aktiven TGF- $\beta$  Typ I (Alk-5\*) und BMP Typ I Rezeptoren (Alk-3\*) exprimiert. Die Proteine wurden in einem 10%-igen Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran überführt und die Smads wurden mit anti-Phospho-Smad3 (Ser423/425) / Smad1 (Ser463/465) von Cell Signaling (A und C) und anti-cMyc von NEB (B und D) nachgewiesen.

Auf Basis dieser Ergebnisse können mehrere Schlussfolgerungen gezogen werden. Zum Einen hat E<sub>243</sub> von EmSmadA keine Funktion bei der Interaktion mit TGF- $\beta$  / BMP Typ I Rezeptoren. Zweitens hat N<sub>218</sub> bei beiden Signalwegen eine untergeordnete Funktion bei der Interaktion mit den Typ I Rezeptoren, spielt damit aber keine Rolle bei der Spezifität der Interaktion von R-Smad und Typ I Rezeptor. Eine Mutation von V<sub>139</sub> in EmSmadA nach Threonin, dem entsprechenden Rest in EmSmadC, zeigt dagegen

eindeutig, dass diese Aminosäure eine Funktion in Bezug auf die Spezifität von R-Smad und Typ I Rezeptor hat. Hier konnte anhand der Phosphorylierungsmuster eindeutig gezeigt werden, dass die Mutation V<sub>139</sub>T in EmSmadA zu einer deutlichen Störung der Interaktion mit BMP Rezeptoren führt, was sich in einer verminderten Phosphorylierung zeigt. Die Interaktion mit TGF- $\beta$  Rezeptoren wird dagegen durch diesen Aminosäureaustausch nur in sehr geringem Maß beeinträchtigt und sind im Vergleich mit den Beobachtungen bei der Interaktion mit BMP Rezeptoren vernachlässigbar. Damit konnte zum ersten Mal eine Aminosäure identifiziert werden, die durch ihre Interaktion mit Typ I Rezeptoren direkten Einfluss auf die Spezifität der Signalweiterleitung in TGF- $\beta$  / BMP Signaling hat.

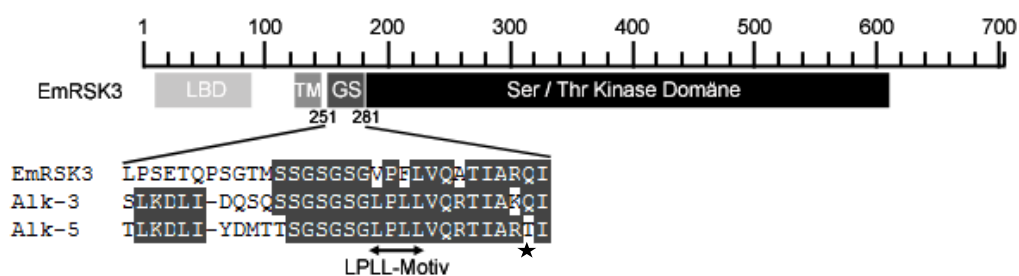
#### 4.13. EmRSK3 - konstitutive Aktivierung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der BMP / TGF- $\beta$  Rezeptor EmRSK3 durch humanes BMP2 aktiviert werden kann und eine Signalweiterleitung über EmSmadA und EmSmadB aus *E. multilocularis* möglich ist. Dabei waren die Zugabe des Zytokins sowie die Anwesenheit eines Typ II Rezeptors zwingend notwendig für eine erfolgreiche Signalweiterleitung<sup>1</sup>. Um weitere Experimente mit diesem Rezeptor zu erleichtern, sollte EmRSK3 konstitutiv aktiviert werden.

Eine konstitutive Aktivierung wurde für humane BMP und TGF- $\beta$  Rezeptoren bereits erfolgreich durchgeführt. Dabei wurde bei BMP Rezeptoren ein im Bereich der GS Domäne liegendes konserviertes Gln durch Asp ersetzt (Q<sub>233</sub>D bei Alk-3), bei TGF- $\beta$  Rezeptoren dagegen ein spezifisches konserviertes Thr durch Asp (T<sub>204</sub>D bei Alk-5)<sup>206</sup>. Auf diese Weise konnten die Rezeptoren unabhängig von Liganden und Typ II Rezeptoren Smads phosphorylieren<sup>206,271</sup>.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch das Leucin - Zipper (LPLL) - Motiv innerhalb der GS Domäne bei der Interaktion von konstitutiv aktivem Alk-3 mit EmSmadB eine Rolle spielt<sup>95</sup>. So konnte die konstitutiv aktive Form von Alk-3, Alk-3 Q<sub>233</sub>D, EmSmadB phosphorylieren, wohingegen eine mutierte Form von Alk-3 Q<sub>233</sub>D mit der Aminosäuresequenz KPLL anstatt LPLL im Leucin - Zipper - Motiv EmSmadB nicht mehr aktivieren konnte.

Bei EmRSK3 ist die konservierte Aminosäure Gln an Position 280 vorhanden, allerdings findet sich im LPLL-Motiv mit der Aminosäuresequenz VPFL (Position 269 - 272) eine starke Abweichung von der Konsensussequenz (Abb. 56).



**Abb. 56: EmRSK3 - GS Domäne.**

Gezeigt ist die Domänenstruktur von EmRSK3 (oben) und in einer Vergrößerung ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der GS Domäne von EmRSK3, Alk-3 und Alk-5 (unten). Der Rezeptor wird in seiner Gesamtgröße anhand einer Skala dargestellt. Die Ligandenbindungsdomäne (LBD), die Transmembrandomäne (TM), die GS Domäne (GS) und die Serin/Threonin Kinase Domäne (Ser/Thr Kinase Domäne) sind als Balken in verschiedenen Grautönen dargestellt. Die Positionen der Aminosäuren am N-Terminus und C-Terminus der GS Domäne sind angegeben (251 und 281). Im Alignment sind das LPLL-Motiv durch einen Pfeil und das konservierte Gln bzw. Thr durch einen Stern markiert.

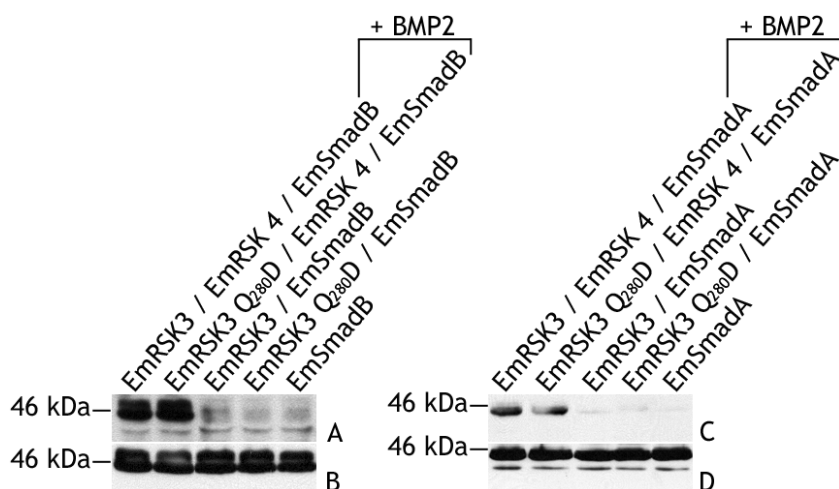
#### 4.13.1. EmRSK3 - QD Mutation (Q<sub>280</sub>D)

Das konservierte Gln<sub>280</sub> bei EmRSK3 wurde wie bereits beschrieben durch Asp ersetzt und damit die Mutante EmRSK3 Q<sub>280</sub>D hergestellt<sup>1</sup>. In der vorangegangenen Arbeit wurde bereits festgestellt, dass EmRSK3 Q<sub>280</sub>D in Kombination mit dem humanen Typ II Rezeptor BMPR2 und EmSmadB nicht konstitutiv aktiv ist. Um die Untersuchungen auch auf AR-Smads auszudehnen und um einen negativen Effekt vom prinzipiell „unpassenden“ humanen BMP Typ II Rezeptor auszuschließen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivität von EmRSK3 Q<sub>280</sub>D in Kombination mit EmSmadA und EmSmadB untersucht. Dementsprechend wurden EmRSK3 Q<sub>280</sub>D und EmSmadA bzw. EmSmadB gemeinsam heterolog in HEK 293T Zellen exprimiert (vgl. 6.16.5). Zur Überprüfung der Funktionalität von mutiertem EmRSK3 wurde dieser Rezeptor zusätzlich zusammen mit dem Echinokokken Typ II Rezeptor EmRSK4 sowie EmSmadA bzw. EmSmadB und unter Zugabe von humanem BMP2 heterolog in HEK 293T Zellen exprimiert. Der Nachweis aktivierter Smads erfolgte im Anschluss durch die Immundetektion der phosphorylierten Formen von EmSmadA und EmSmadB.

Wie in Abb. 57 gezeigt, war das Phosphorylierungsmuster beim EmRSK3 Wildtyp und der Mutante EmRSK3 Q<sub>280</sub>D sowohl bei EmSmadB als auch bei EmSmadA gleich. Die Aktivierung dieser beiden Echinokokken Smads konnte dementsprechend nur bei gleichzeitiger Expression von EmRSK3 bzw. EmRSK3 Q<sub>280</sub>D, des Echinokokken BMP / TGF- $\beta$  Typ II Rezeptors EmRSK4 und bei Vorhandensein von humanem BMP2 erfolgen. Fehlten Typ II Rezeptor oder Zytokin, so war keine Phosphorylierung von EmSmadB oder EmSmadA zu erkennen.

Folglich konnte EmRSK3 durch den Austausch von Gln<sub>280</sub> gegen Asp nicht konstitutiv aktiviert werden.





**Abb. 57: EmRSK3 Q<sub>280</sub>D - Phosphorylierung von EmSmadA und EmSmadB**

Gezeigt sind die Phosphorylierungsmuster von EmSmadA und EmSmadB durch den EmRSK3 Wildtyp (EmRSK3) und die Mutante EmRSK3 Q<sub>280</sub>D bei heterologer Expression in HEK 293T. Die Fähigkeit beider EmRSK3 Formen zur Signalweiterleitung über EmSmadA und EmSmadB wurde sowohl in Kombination mit dem entsprechenden Typ II Rezeptor (EmRSK4) und bei Anwesenheit von humanem BMP2 untersucht als auch ohne einen zweiten Rezeptor und ohne Zytokin. Die Proteine wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Phosphorylierter EmSmadB (A) wurde mit anti-Phospho-Smad1 (Ser463/465) / Smad5 (Ser463/465) / Smad8 (Ser426/428) detektiert, phosphorylierter EmSmadA (C) dagegen mit anti-Phospho-Smad3 (Ser423/425) / Smad1 (Ser463/465). Beide Antikörper wurden von Cell Signaling bezogen. Die gleichmäßige Expression der Smads wurde durch anti-cMyC von NEB (B und D) nachgewiesen.

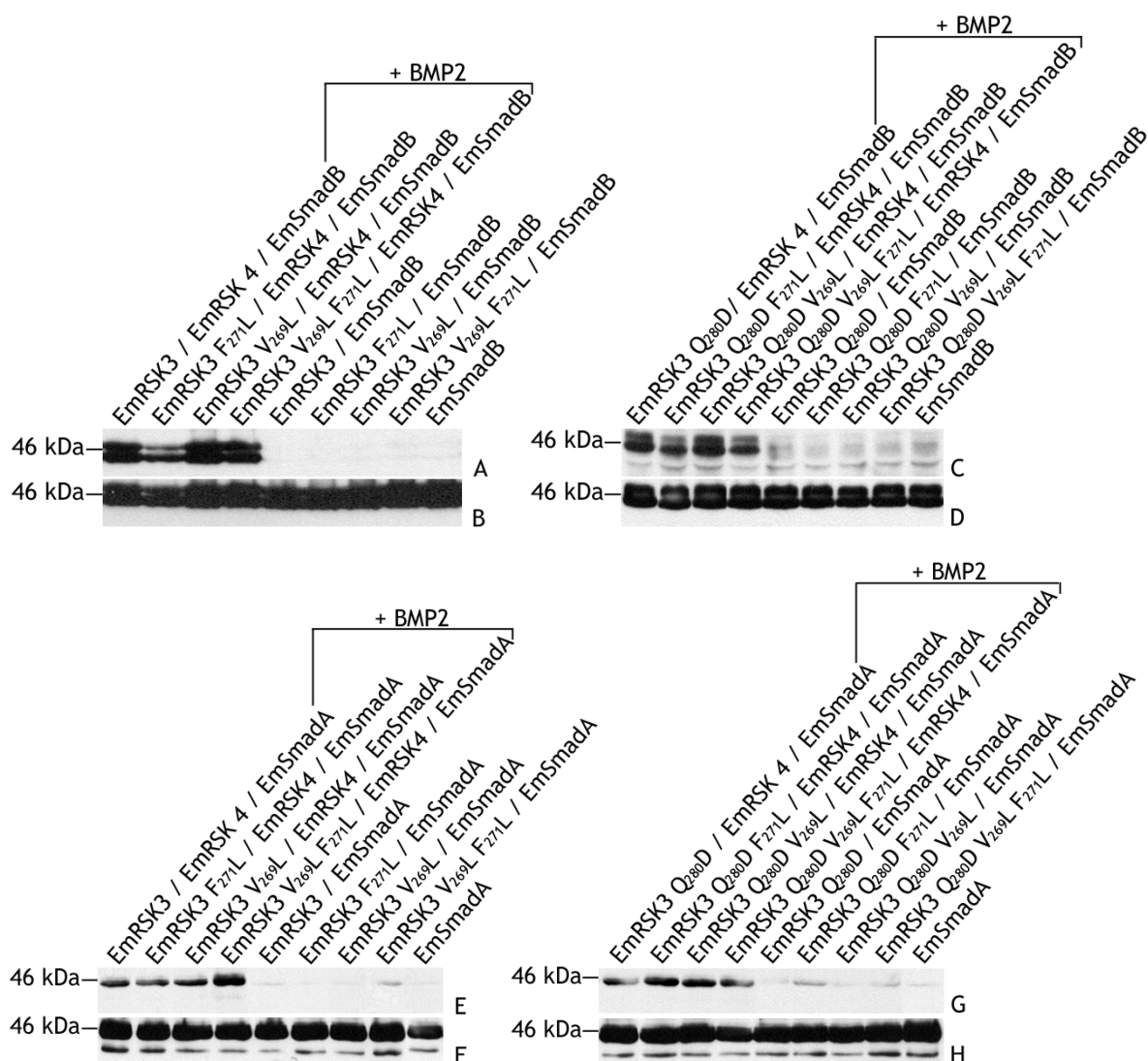
#### 4.13.2. EmRSK3 - Mutationen im LPLL-Motiv (V<sub>269</sub>L und F<sub>271</sub>L)

Die Aminosäuren V<sub>269</sub> und F<sub>271</sub> bei EmRSK3 wurden wie in Kapitel 6.12.13 beschrieben jeweils durch Leu ersetzt. Dadurch entstanden auf Basis des EmRSK3 Wildtyps die Mutanten EmRSK3 V<sub>269</sub>L, EmRSK3 F<sub>271</sub>L und EmRSK3 V<sub>269</sub>L F<sub>271</sub>L und auf Basis von EmRSK3 Q<sub>280</sub>D die Mutanten EmRSK3 Q<sub>280</sub>D V<sub>269</sub>L, EmRSK3 Q<sub>280</sub>D F<sub>271</sub>L und EmRSK3 Q<sub>280</sub>D V<sub>269</sub>L F<sub>271</sub>L. Alle diese mutierten Rezeptoren wurden anschließend zusammen mit EmSmadA bzw. EmSmadB sowie mit oder ohne dem Echinokokken Typ II Rezeptor EmRSK4 heterolog in HEK 293T Zellen exprimiert (vgl. 6.16.5). Phosphorylierte Smads wurden anschließend durch die Immundetektion der Proteine durch phospho-spezifische anti-Smad Antikörper auf Nitrozellulosemembran nachgewiesen (vgl. 6.13.4).

Wie in Abb. 58 A - H gezeigt, konnte auch durch einen spezifischen Aminosäureaustausch im Bereich des LPLL-Motivs kein Unterschied im Phosphorylierungsmuster von EmSmadA oder EmSmadB durch EmRSK3 oder EmRSK3 Q<sub>280</sub>D erzeugt werden. Bei EmRSK3 V<sub>269</sub>L F<sub>271</sub>L konnte man ebenso wie bei EmRSK3 Q<sub>280</sub>D F<sub>271</sub>L in Verbindung mit EmSmadA eine minimale Bande erkennen, die auf eine von Ligand und Typ II Rezeptor unabhängige Phosphorylierung von EmSmadA hindeutet (Abb. 58 E und G). Allerdings ist diese Bande wesentlich schwächer als der Kontrollansatz (mit Ligand und EmRSK4). In Verbindung mit EmSmadB konnte keine Veränderung in Bezug auf die Aktivität der EmRSK3 Mutanten festgestellt werden (Abb. 58 A und C). In Kombination mit EmRSK4

und humanem BMP2 scheint die Mutante EmRSK3 F<sub>271</sub>L EmSmadB sogar in geringerem Ausmaß zu phosphorylieren als der Wildtyp (Abb. 58 A). Allerdings ist auch die Bande im Kontroll - Nachweis von EmSmadB mit anti-cMyc schwächer als bei den anderen Ansätzen, so dass dieser Unterschied auch durch eine geringere Expression von EmSmadB in diesem Ansatz erklärt werden kann (Abb. 58 B).

Somit konnten auch durch Veränderungen im LPLL-Motiv von EmRSK3 keine eindeutig bzw. vollständig konstitutiv aktiven Formen von EmRSK3 hergestellt werden. Die Ergebnisse von EmRSK3 V<sub>269</sub>L F<sub>271</sub>L und EmRSK3 Q<sub>280</sub>D F<sub>271</sub>L in Kombination mit EmSmadA sollten aufgrund der geringen Intensität der Banden in einem unabhängigen System verifiziert werden.



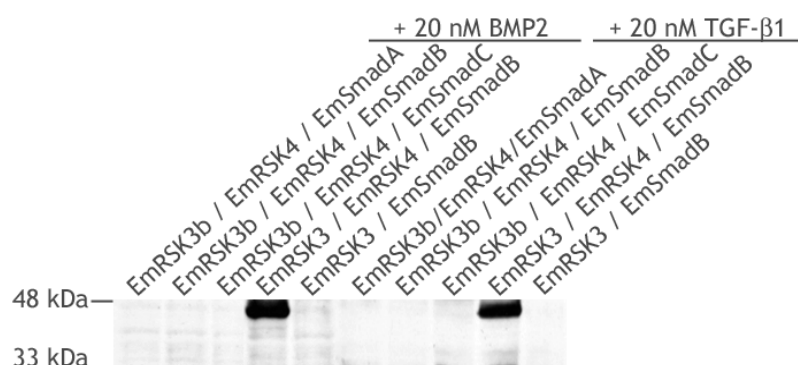
**Abb. 58: EmRSK3, mutiert im LPLL-Motiv - Phosphorylierung von EmSmadB und EmSmadA**  
Gezeigt ist das Phosphorylierungsmuster von EmSmadB (A, B, C und D) und EmSmadA (E, F, G, und H) durch den EmRSK3 Wildtyp (EmRSK3) und EmRSK3 Mutanten (EmRSK3 F<sub>271</sub>L, EmRSK3 V<sub>269</sub>L, EmRSK3 V<sub>269</sub>L F<sub>271</sub>L, EmRSK3 Q<sub>280</sub>D F<sub>271</sub>L, EmRSK3 Q<sub>280</sub>D V<sub>269</sub>L, EmRSK3 Q<sub>280</sub>D V<sub>269</sub>L F<sub>271</sub>L) bei heterologer Expression in HEK 293T. Die Fähigkeit aller EmRSK3 Varianten zur Signalweiterleitung über EmSmadB wurde sowohl in Kombination mit dem entsprechenden Typ II Rezeptor (EmRSK4) und bei Anwesenheit von humanem BMP2 untersucht als auch ohne einen Typ II Rezeptor und ohne Zytokin. Die Proteine wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Aktivierter EmSmadB wurde mit

anti-Phospho-Smad1 (Ser463/465) / Smad5 (Ser463/465) / Smad8 (Ser426/428) von Cell Signaling (A und C) nachgewiesen, aktivierter EmSmadA dagegen mit anti-Phospho-Smad3 (Ser423/425) / Smad1 (Ser463/465) von Cell Signaling (E und G). Zur Kontrolle der Expression wurden EmSmadB und EmSmadA zusätzlich mit anti-cMyc von NEB (B, D, F und H) detektiert.

#### 4.14. EmRSK3 Isoform b - Untersuchungen zur Funktionalität

Neben EmRSK3 konnten bereits zwei weitere Isoformen dieses Echinokokken BMP / TGF- $\beta$  Typ I Rezeptors identifiziert werden, EmRSK3a und EmRSK3b. Dabei kommt es bei EmRSK3a durch alternatives Spleißen zu einem Stoppcodon, was ein potentiell sekretiertes Protein der Ligandenbindungsdomäne von EmRSK3 zu Folge hat. Bei EmRSK3b führt alternatives Spleißen dagegen zu einer Deletion innerhalb eines konservierten Bereichs der Serin / Threonin Kinasedomäne. Auch die Funktionalität der Rezeptorkombination EmRSK3/EmRSK4 mit nachfolgender Phosphorylierung von EmSmadA und EmSmadB durch Stimulation mit humanem BMP2 konnte bereits gezeigt werden<sup>1</sup>. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit die Interaktion von humanem TGF- $\beta$ 1 und EmRSK3 bzw. EmRSK4 mit anschließender Aktivierung von EmSmadB nachgewiesen werden (vgl. Abb. 59). In der vorliegenden Arbeit wurde schließlich die Funktionalität von EmRSK3 Isoform b durch die heterologe Expression zusammen mit dem Typ II Rezeptor EmRSK4 und den Smads EmSmadA, EmSmadB und EmSmadC in HEK 293T untersucht. Zur Aktivierung dieses Signalwegs wurden die transfizierten Zellen mit 20 nM humanem BMP2 bzw. TGF- $\beta$ 1 stimuliert (vgl. 6.16.5).

Wie in Abb. 59 zu sehen, wird ein Signaling via EmRSK3b/EmRSK4 und den Smads EmSmadA, B und C weder durch humanes BMP2 noch durch TGF- $\beta$ 1 ausgelöst. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die deletierten Aminosäuren bei EmRSK3b eine entscheidende Funktion bei der Aktivierung von EmSmadA und EmSmadB haben. Damit scheint EmRSK3b eine inaktive Isoform des Echinokokken Typ I BMP / TGF- $\beta$  Rezeptors EmRSK3 zu sein.



#### Abb. 59: EmRSK3b - ein inaktiver BMP / TGF- $\beta$ Rezeptor

Die dritte Isoform von EmRSK3, EmRSK3b, wurde zusammen mit dem Echinokokken Typ II Rezeptor EmRSK4 und EmSmadA, B, und C heterolog in HEK 293T Zellen exprimiert, wobei EmRSK3b durch die Zugabe von jeweils 20 nM humanem BMP2 und TGF- $\beta$ 1 stimuliert wurde. Die Proteine wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die Phosphorylierung der Smads und damit die Aktivität von

EmRSK3b wurde mit anti-Phospho-Smad3 (Ser423/425) / Smad1 (Ser463/465) von Cell Signaling nachgewiesen.

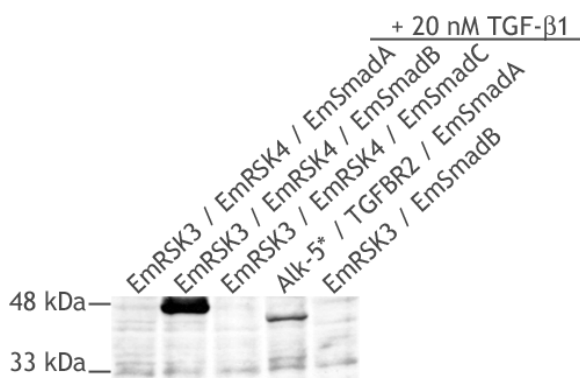
#### 4.15. EmRSK3 / EmRSK4 / EmSmadB - Aktivierung durch humanes TGF- $\beta$ 1

Aufgrund der konservierten Aminosäuresequenz in Loop 45 wurde EmRSK3 in einer vorangegangenen Arbeit der Alk1 - Gruppe homologer humaner Rezeptoren zugeordnet, bei denen die zugehörigen Liganden sowohl TGF- $\beta$  als auch BMP - Zytokine umfassen<sup>272</sup>. Bei EmRSK3 konnte als Ligand bereits humanes BMP2 bestimmt werden, welches das Rezeptorpaar EmRSK3 / EmRSK4 aktivieren kann und eine Signalweiterleitung über EmSmadA sowie EmSmadB auslöst<sup>1</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich untersucht, ob die Kombination EmRSK3 / EmRSK4 auch durch humanes TGF- $\beta$ 1 aktiviert werden kann.

Dazu wurden EmRSK3 und EmRSK4 zunächst gemeinsam mit EmSmadA, EmSmadB und EmSmadC in HEK 293T Zellen heterolog exprimiert und mit 20 nM humanem TGF- $\beta$ 1 stimuliert (vgl. 6.16.5). Eine Signalweiterleitung wurde im Anschluss durch die Immundetektion phosphorylierter Smads nachgewiesen. Als Kontrolle wurde der konstitutiv aktive Typ I Rezeptor HsAlk-5\* zusammen mit dem entsprechenden Typ II Rezeptor HsTGFB2 und EmSmadA verwendet. Das funktionelle Signaling über diese Rezeptor - Smad Kombination konnte bereits gezeigt werden<sup>94</sup>.

Wie in Abb. 60 gezeigt, erfolgte eine Signalweiterleitung über die Rezeptorpaare EmRSK3 / EmRSK4 und EmSmadB auch nach einer Stimulation mit humanem TGF- $\beta$ 1. Dagegen werden nach einer Stimulation von EmRSK3 und EmRSK4 mit humanem TGF- $\beta$ 1 weder EmSmadA noch EmSmadC phosphoryliert.

Damit konnte humanes TGF- $\beta$ 1 als zweiter möglicher Ligand von EmRSK3 identifiziert werden. Die unmittelbare räumliche Nähe von Wirts- und Parasitengewebe in einer infizierten Leber spricht auch *in vivo* für die Möglichkeit einer Interaktion von humanem TGF- $\beta$ 1 und den Echinokokken Rezeptoren EmRSK3 und EmRSK4.



**Abb. 60: EmRSK3 - Aktivierung durch humanes TGF- $\beta$ 1.**

EmRSK3 wurde zusammen mit dem Echinokokken Typ II Rezeptor EmRSK4 und EmSmadA, B, und C heterolog in HEK 293T Zellen exprimiert, wobei das Signaling durch die Zugabe von 20 nM humanem TGF- $\beta$ 1 stimuliert wurde. In Kontrollansätzen wurden der humane konstitutiv aktive TGF- $\beta$  Typ I Rezeptor (Alk-5\*) und der humane TGF- $\beta$  Typ II Rezeptor (TGFB2) zusammen mit

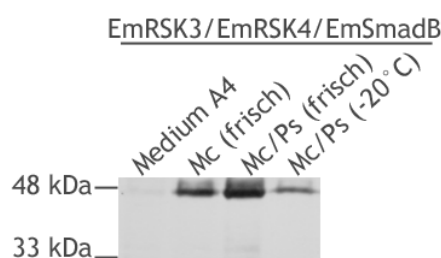
EmSmadA exprimiert sowie EmRSK3 allein mit EmSmadB. Die Proteine wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die Phosphorylierung der Smads wurde mit anti-Phospho-Smad3 (Ser423/425) / Smad1 (Ser463/465) von Cell Signaling nachgewiesen.

#### 4.16. EmRSK3 / EmRSK4 / EmSmadB - Aktivierung durch Metazestoden Zytokin

Die Identifizierung von Homologen der TGF- $\beta$  Superfamilie in *E. multilocularis* warf die Frage auf, ob neben humanen Zytokinen auch EmBMP1, EmBMP2 oder EmAct die BMP / TGF- $\beta$  Rezeptoren des Fuchsbandwurms aktivieren können. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden EmRSK3, EmRSK4 und EmSmadB gemeinsam heterolog in HEK 293T exprimiert und mit dem Kulturüberstand axenisch kultivierter Metazestoden des Isolats J31 stimuliert (vgl. 6.17.5 und 6.16.5). Dabei wurde zwischen dem Kulturüberstand von Metazestoden mit Protoskolizes und Metazestoden ohne Protoskolizes unterschieden sowie zwischen frisch abgenommenem konditioniertem Medium und zwischenzeitlich bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefrorenem konditioniertem Medium. Als Kontrolle diente Kulturmedium A4, in dem die Metazestoden axenisch kultiviert wurden.

Abb. 61 zeigt die Aktivierung von EmSmadB via EmRSK3 und EmRSK4 bei einer Inkubation mit Kulturüberstand von Metazestoden. Im Vergleich dazu fehlt diese Aktivierung beim Kontrollansatz. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass sekretierte Proteine der Metazestoden an EmRSK3 und EmRSK4 binden und damit eine Signalkaskade über EmSmadB auslösen können. Dabei wurde dieser Signalweg sowohl durch sekretierte Proteine von Metazestoden mit Protoskolizes als auch durch sekretierte Proteine von Metazestoden ohne Protoskolizes aktiviert. Vergleicht man diese beiden Ansätze, so scheint die Aktivierung durch sekretierte Proteine von Metazestoden mit Protoskolizes ein wenig stärker ausgeprägt zu sein. Eindeutig abgeschwächt ist dagegen die Aktivierung dieses Signalwegs durch eingefrorenen Kulturüberstand von Metazestoden mit Protoskolizes. Folglich ist davon auszugehen, dass die zur Aktivierung von EmRSK3, EmRSK4 und EmSmadB nötigen sekretierten Proteine aus Metazestoden durch den Prozess des Einfrierens bzw. Auftauens geschädigt werden.

Damit konnte gezeigt werden, dass der Signalweg EmRSK3/EmRSK4/EmSmadB aus *E. multilocularis* durch ein oder mehrere sekretierte Proteine von Metazestoden aktiviert werden kann. Aufgrund der hohen Homologie zu Proteinen der TGF- $\beta$  Superfamilie ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei diesen sekretierten Proteinen um EmBMP1, EmBMP2 oder EmAct handelt.



**Abb. 61: Zytokin aus Metazestoden - Aktivierung des Echinokokken BMP / TGF- $\beta$  Signalwegs.** EmRSK3 wurde zusammen mit EmRSK4 und EmSmadB heterolog in HEK 293T Zellen exprimiert. Das Signaling wurde durch eine 30-minütige Inkubation der transfizierten Zellen mit 1 ml Überstand axenisch kultivierter Metazestoden mit (Mc/Ps) oder ohne Protoskolizes (Mc) stimuliert. Dabei wurde bei den Überständen von Metazestoden mit Protoskolizes zusätzlich zwischen frisch abgenommenem (frisch) und eingefrorenem Medium (7 Tage bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) unterschieden. Im Kontrollansatz wurden die transfizierten Zellen unter den gleichen Bedingungen mit dem zur axenischen Kultivierung verwendeten Medium A4 inkubiert. Die Proteine wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Aktivierter EmSmadB wurde mit anti-Phospho-Smad1 (Ser463/465) / Smad5 (Ser463/465) / Smad8 (Ser426/428) von Cell Signaling nachgewiesen.

#### 4.17. Anti-EmRSK3 - ein spezifischer Antikörper für EmRSK3

Im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit wurde die Ligandenbindungsdomäne von EmRSK3 rekombinant in *E. coli* exprimiert und durch immunoGlobe (Himmelstadt) ein spezifischer Antikörper produziert<sup>1</sup>. In Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde der im Serum der finalen Blutung bereits vorliegende anti-EmRSK3 Antikörper zunächst aufgereinigt, um dann zum Nachweis der Expression von EmRSK3 in *E. multilocularis* verwendet zu werden (vgl. 4.17.1). Dazu wurden sowohl *in vitro* kultivierte Metazestoden herangezogen als auch Gewebeschnitte eines infizierten Rhesusaffen (*Macaca mulatta*; vgl. 4.17.2 und 4.18.3).

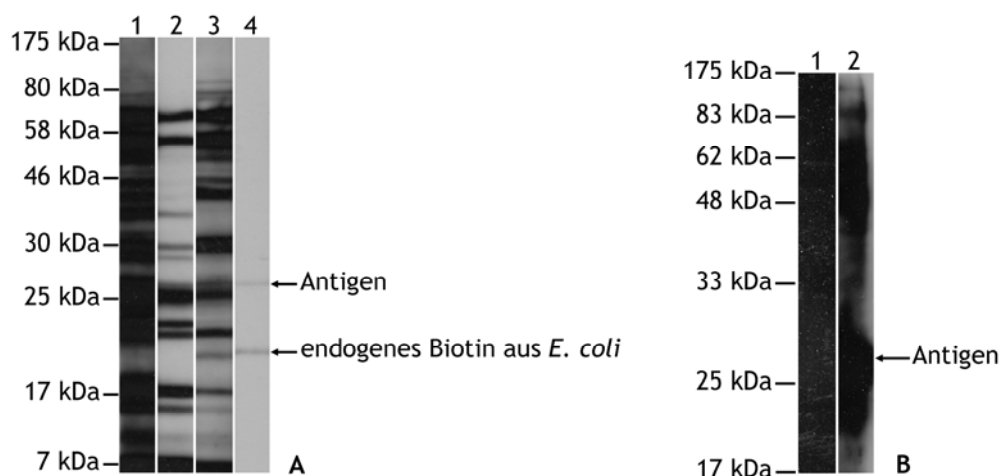
##### 4.17.1. Anti-EmRSK3 - Aufreinigung

Zur Aufreinigung des Antikörpers wurde die Ligandenbindungsdomäne von EmRSK3 als Biotin - Fusionsprotein mit dem PinPoint™ Xa Protein Purification System (Promega) produziert und kovalent an TetraLink™ Tetrameric Avidin Resin (Promega) gebunden (vgl. 6.13.5). Die Aufreinigung von EmRSK3 erfolgte auf Basis dieser immobilisierten Ligandenbindungsdomäne durch eine Affinitätssäule (vgl. 6.13.6).

Der Erfolg der Aufreinigung wurde durch die Detektion der Ligandenbindungsdomäne von EmRSK3 mit Proben aus verschiedenen Zwischenschritten der Aufreinigung kontrolliert (Abb. 62 A). Dazu wurde die in *E. coli* TOP10 rekombinant exprimierte biotinylierte Ligandenbindungsdomäne von EmRSK3 (produziert mit dem PinPoint™ Xa Protein Purification System) zunächst als Bestandteil des Gesamtzelllysats in einem 12%igen Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Durch die Verwendung des Gesamtzelllysats konnte so die Entfernung unspezifischer Antikörper, die sich im Serum der finalen Blutung

befanden, im Verlauf der Aufreinigung nachvollzogen werden. Der Nachweis des biotinylierten Antigens durch den anti-biotin Antikörper diente als Kontrolle. Das biotinylierte Antigen konnte schließlich durch Antikörper im Eluat der Aufreinigung eindeutig nachgewiesen werden, was den Erfolg der Antikörperproduktion zeigt. Nichtsdestotrotz konnte anti-EmRSK3 nicht komplett aufgereinigt werden, was durch die zusätzlichen Banden in Abb. 62 A Spalte 3 belegt wird. Da diese Detektion von *E. coli* Proteinen allerdings keinen Einfluss auf den Nachweis von EmRSK3 aus *E. multilocularis* haben sollte, wurde zugunsten der Quantität des Antikörpers auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.

Die Verbesserung der Qualität von anti-EmRSK3 ist in Abb. 62 B ersichtlich. Hier wurde in einem 12%igen Polyacrylamidgel ein *E. coli* Zellysate aufgetragen, in dem das zur Immunisierung verwendete Antigen enthalten ist. In Spalte 1 wurde der Versuch unternommen, dieses Antigen durch die Antikörper des Serums der finalen Blutung nachzuweisen, was offensichtlich nicht eindeutig gelang. In Spalte 2 dagegen (aufgereinigter anti-EmRSK3 Antikörper) ist die prominente Bande des überexprimierten Antigens mit der erwarteten Größe von 27 kDa im Gesamtzellextrakt eindeutig sichtbar.



**Abb. 62: Anti-EmRSK3 - Aufreinigung.**

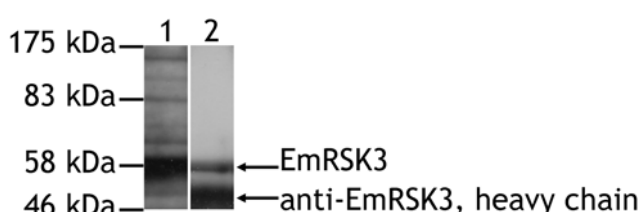
A) Zur Überprüfung der Aufreinigung von EmRSK3 wurde die in *E. coli* TOP10 rekombinant exprimierte biotinylierte Ligandenbindungsdomäne von EmRSK3 (PinPoint™ Xa Protein Purification System) zunächst als Bestandteil des Gesamtzelllysats in einem 12%igen Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Das Antigen wurde zur Überprüfung der Aufreinigung mit 1) dem gesammelten Durchfluss nach dem Beschicken der Affinitätssäule, 2) dem Durchfluss der Affinitätssäule nach einem Waschschrift mit PBS, 3) dem Eluat der Aufreinigung und 4) mit einem anti-Biotin Antikörper von Cell Signaling detektiert. Alle Antikörper bzw. Proben wurden als 1:1000 Verdünnung mit 5%iger Magermilch-TBST Lösung appliziert. B) Gezeigt ist die Detektion der zur Immunisierung verwendeten rekombinant produzierten Ligandenbindungsdomäne von EmRSK3 (pBAD/TOPO®ThioFusion™ Expression Kit<sup>1</sup>) in einem Bakterien - Gesamtzelllysate mit 1) Antikörpern des Serums der finalen Blutung (1:1000) und 2) dem aufgereinigten anti-EmRSK3 Antikörper (1:500). Beide Antikörperproben wurden mit 5%iger Magermilch-TBST Lösung verdünnt.

#### 4.17.2. Anti-EmRSK3 - Nachweis von EmRSK3 in Metazestoden

EmRSK3 wurde durch eine Immunpräzipitation mit dem aufgereinigten anti-EmRSK3 aus lysierten Metazestoden isoliert und auf Nitrozellulosemembran nachgewiesen (vgl. 6.13.7). Die hierbei verwendeten Metazestoden wurden davor axenisch kultiviert, um eine Verunreinigung der Proben mit Reuber Hepatoma Zellen (*Rattus norvegicus*) zu vermeiden.

Durch die Immunpräzipitation mit aufgereinigtem anti-EmRSK3 konnte der Rezeptor EmRSK3 mit einer Größe von knapp 58 kDa eindeutig in Metazestoden nachgewiesen werden (vgl. Abb. 63), wobei das theoretische Molekulargewicht mit 80 kDa (ExpASy, SIB) ein deutlich größeres Protein erwarten ließ. Diese Differenz zwischen theoretischem und tatsächlichem Molekulargewicht von EmRSK3 kann durch Disulfidbrücken erklärt werden, die trotz der vorgenommenen Denaturierung nicht aufgelöst werden konnten. Die Möglichkeit einer Kreuzinteraktion von anti-EmRSK3 mit EmRSK1, der im Bereich der Ligandenbindungsdomäne die höchste Homologie zu EmRSK3 aufweist (*E*-value:  $5 \times 10^{-4}$  nach NCBI BLAST), konnte durch ein weiteres Experiment ausgeschlossen werden. So konnte der mit anti-EmRSK1 immunpräzipitierte Rezeptor EmRSK1 durch anti-EmRSK3 nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die zweite Bande bei ca. 50 kDa ist durch die schwere Kette des anti-EmRSK3 Antikörpers zu erklären, die in der aufgetrennten Proteinprobe zu finden war und durch den verwendeten Zweitantikörper, einem Peroxidase-konjugierten anti-rabbit Antikörper, detektiert wurde.



**Abb. 63: Anti-EmRSK3 - Nachweis von EmRSK3 in Metazestoden.**

Gezeigt ist die Detektion von Proteinen aus *E. multilocularis* durch 1) Antikörper des Serums der finalen Blutung (1:1000) in Metazestodenlysat (axenisch kultiviert; Isolat H95) und 2) eine Immunpräzipitation mit aufgereinigtem anti-EmRSK3 Antikörper (1:500). Beide Antikörper wurden in 5%iger Magermilch-TBST Lösung verdünnt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 12%igen Polyacrylamidgel mit anschließendem Transfer auf Nitrozellulose.

Die Isoform EmRSK3b konnte nicht nachgewiesen werden (78 kDa nach ExpASy, SIB). Damit scheint diese Isoform in den untersuchten Metazestoden nicht exprimiert worden zu sein oder sie wird nur sehr schwach exprimiert und die Menge liegt unter der Nachweisgrenze. Die Isoform EmRSK3a (14 kDa nach ExpASy, SIB) wurde durch das Fehlen der Transmembrandomäne und damit als potentiell sekretiertes Protein nicht in den untersuchten Proben erwartet und wurde auch nicht detektiert.



Damit konnte EmRSK3 mit einer unerwarteten Größe von 58 kDa in Metazestoden von *E. multilocularis* nachgewiesen werden. Die vom Antikörpergemisch des Serums der finalen Blutung detektierten größeren Proteine sind auf unspezifische Bindungen bzw. Kreuzreaktionen von Antikörpern des Kaninchens mit Proteinen aus *E. multilocularis* zurückzuführen.

#### 4.18. Immunlokalisation der Echinokokken BMP / TGF- $\beta$ Rezeptoren

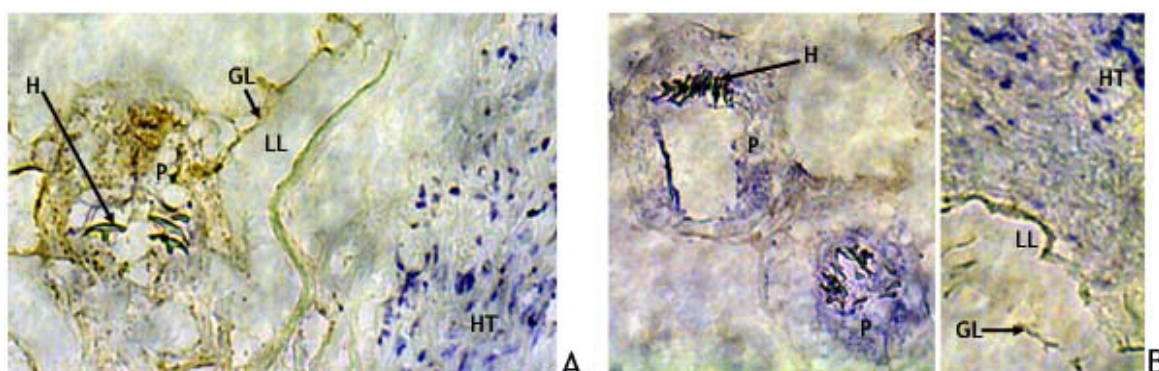
Die präparierte Leber eines mit *E. multilocularis* infizierten Rhesusaffen (*Macacca mulatta*) aus dem Deutschen Primatenzentrum Göttingen, die der Arbeitsgruppe Brehm (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg) im Juli 2009 freundlicherweise zur Forschung am Fuchsbandwurm überlassen wurde (Isolat GH09, vgl. 6.17.1), wurde in dieser Arbeit zur Immunlokalisation der Echinokokken BMP / TGF- $\beta$  Rezeptoren EmRSK1, EmRSK2, EmRSK3 und EmRSK4 verwendet<sup>95-96,212</sup>. Damit konnte die Expression dieser vier Rezeptoren zum ersten Mal bei einer natürlich entstandenen Infektion mit *E. multilocularis* untersucht werden.

##### 4.18.1. EmRSK1

Der bereits vorliegende aufgereinigte Antikörper anti-EmRSK1 wurde wie in Kapitel 6.17.12 beschrieben zum immunhistochemischen Nachweis von EmRSK1 in *E. multilocularis* bei einer Infektion von *M. mulatta* eingesetzt<sup>95,212</sup>.

Wie in Abb. 64 A zu sehen ist, wird EmRSK1 während einer Primärinfektion sowohl im Germinal Layer als auch durch invaginierte Protoskolizes exprimiert. Schwach angefärbte Proteine an der Wirts - zugewandten Seite des Laminated Layer lassen eine Kreuzinteraktion von anti-EmRSK1 mit homologen Rezeptoren des Wirts vermuten.

Die Möglichkeit der Interaktion von EmRSK1 mit Wirts - Zytokinen während einer Infektion mit *E. multilocularis* ist folglich aufgrund der Expression von EmRSK1 in unmittelbarer Nähe zum Gewebe des Wirts sehr wahrscheinlich.



**Abb. 64: EmRSK1 - Immunlokalisation.**

Dargestellt ist der immunhistochemische Nachweis von EmRSK1 in Gefrierschnitten (0,5  $\mu$ m) einer mit *E. multilocularis* infizierten Leber aus *M. mulatta*. Die angeschnittenen Protoskolizes (P), die Haken der Protoskolizes (H) sowie Germinal Layer (GL), Laminated Layer (LL) und Wirtsgewebe

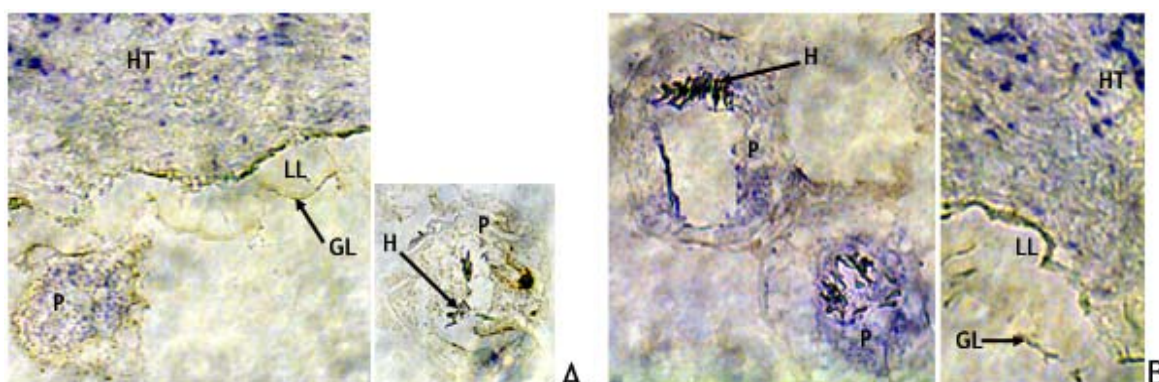
(host tissue, HT) sind markiert. A: Die Schnitte wurden mit dem polyklonalen, aufgereinigten anti-EmRSK1 Antikörper (1:100; immunoGlobe) und dem korrespondierenden HRP-konjugierten Zweitantikörper anti-rabbit (1:50; Dianova) inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt. B: Zur Kontrolle wurden einige Schnitte nur mit Zweitantikörper inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt.

#### 4.18.2.EmRSK2

Ebenso wie der Antikörper anti-EmRSK1 (vgl. 4.18.1) wurde auch der bereits vorliegende aufgereinigte Antikörper anti-EmRSK2 wie in Kapitel 6.17.12 beschrieben zum immunhistochemischen Nachweis von EmRSK2 in *E. multilocularis* bei einer Infektion von *M. mulatta* eingesetzt<sup>95,212</sup>.

EmRSK2 konnte, wie in Abb. 65 A dargestellt, in den verwendeten Gewebeschnitten dieser Primärinfektion ausschließlich in Protoskolizes eindeutig nachgewiesen werden und dort auch nur mit einem minimalen Signal. Die bräunliche Färbung innerhalb des Wirtsgewebes in Abb. 65 deutet auf eine Kreuzinteraktion mit homologen Rezeptoren aus *M. mulatta* hin.

Eine Interaktion mit Zytokinen des Wirtes erscheint aufgrund dieser Ergebnisse unwahrscheinlich, da sich invaginierte Protoskolizes während einer Infektion mit *E. multilocularis* nicht in direktem Kontakt mit Wirtsgewebe befinden.



**Abb. 65: EmRSK2 - Immunlokalisation.**

Dargestellt ist der immunhistochemische Nachweis von EmRSK2 in Gefrierschnitten (0,5  $\mu$ M) einer mit *E. multilocularis* infizierten Leber aus *M. mulatta*. Die angeschnittenen Protoskolizes (P), die Haken der Protoskolizes (H) sowie Germinal Layer (GL), Laminated Layer (LL) und Wirtsgewebe (host tissue, HT) sind markiert. A: Die Schnitte wurden mit dem polyklonalen, aufgereinigten anti-EmRSK2 Antikörper (1:200; immunoGlobe) und dem korrespondierenden HRP-konjugierten Zweitantikörper anti-rabbit (1:50; Dianova) inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt. B: Zur Kontrolle wurden einige Schnitte nur mit Zweitantikörper inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt.

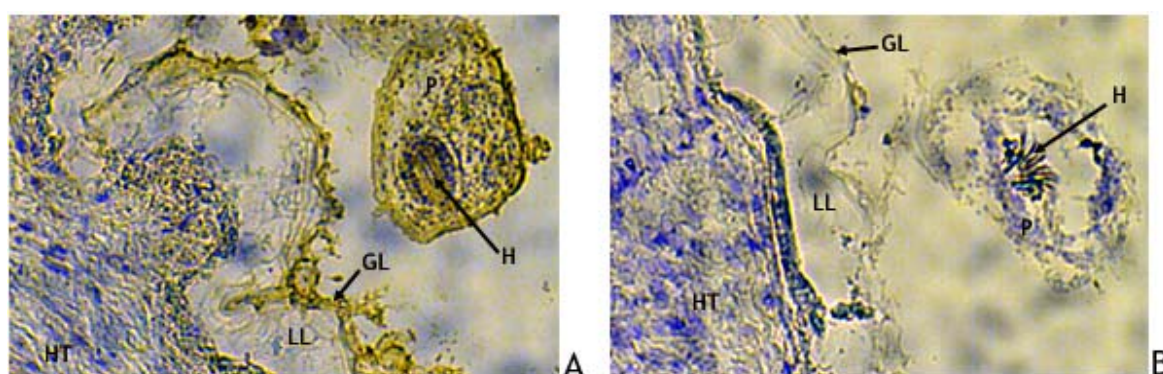
#### 4.18.3.EmRSK3

Der bereits produzierte Antikörper anti-EmRSK3 wurde zunächst aus dem Serum der finalen Blutung des immunisierten Kaninchens aufgereinigt und anschließend auf die spezifische Bindung von EmRSK3 überprüft (vgl. 4.15). Anschließend wurde dieser

Antikörper zum Nachweis von EmRSK3 in *E. multilocularis* bei einer Infektion von *M. mulatta* eingesetzt.

EmRSK3 wird bei einer Infektion von *M. mulatta* mit *E. multilocularis* eindeutig sowohl im Germinal Layer als auch in Protoskolizes exprimiert (Abb. 66). Die Interaktion des aufgereinigten anti-EmRSK3 Antikörpers mit Proteinen innerhalb des Wirtsgewebes kann auf eine Kreuzinteraktion mit homologen Rezeptoren aus *M. mulatta* zurückgeführt werden oder auf die Expression der EmRSK3 Isoform a, einer potentiell sekretierten Variante dieses Rezeptors<sup>1</sup>.

Folglich ist die Möglichkeit der Interaktion von EmRSK3 mit Zytokinen des Wirts während einer Infektion mit *E. multilocularis* aufgrund der Expression dieses Rezeptors in unmittelbarer Nähe zu Wirtsgewebe sehr wahrscheinlich.



**Abb. 66: EmRSK3 - Immunlokalisation.**

Dargestellt ist der immunhistochemische Nachweis von EmRSK3 in Gefrierschnitten (0,5  $\mu$ m) einer mit *E. multilocularis* infizierten Leber aus *M. mulatta*. Die angeschnittenen Protoskolizes (P), die Haken der Protoskolizes (H) sowie Germinal Layer (GL), Laminated Layer (LL) und Wirtsgewebe (host tissue, HT) sind markiert. A: Die Schnitte wurden mit dem polyklonalen, aufgereinigten anti-EmRSK3 Antikörper (1:200; immunoGlobe) und dem korrespondierenden HRP-konjugierten Zweitantikörper anti-rabbit (1:50; Dianova) inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt. B: Zur Kontrolle wurden einige Schnitte nur mit Zweitantikörper inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt.

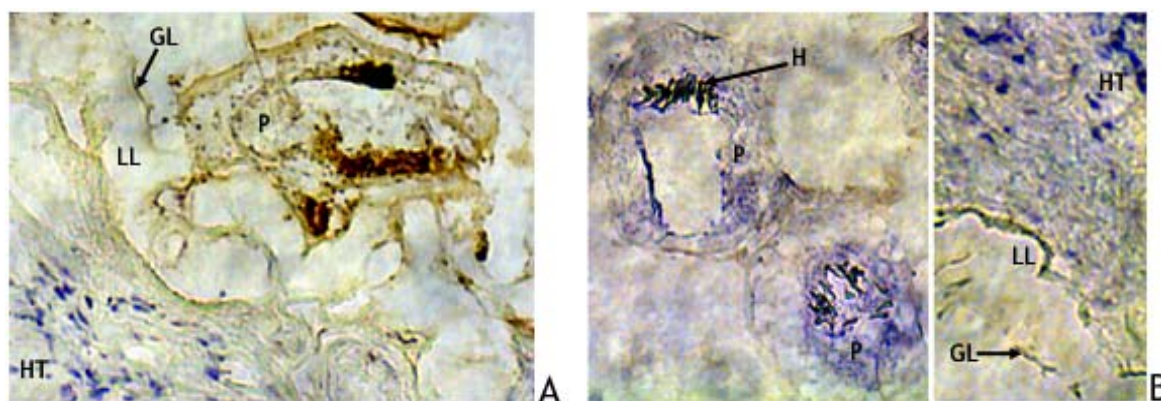
#### 4.18.4.EmRSK4

Der bereits vorliegende aufgereinigte Antikörper anti-EmRSK4 wurde zum immunhistochemischen Nachweis von EmRSK4 in *E. multilocularis* während einer Infektion von *M. mulatta* eingesetzt (vgl. 6.17.12)<sup>212</sup>.

Wie in Abb. 67 A gezeigt, konnte die Expression von EmRSK4 während einer Primärinfektion mit *M. mulatta* sowohl im Germinal Layer als auch in Protoskolizes eindeutig nachgewiesen werden. Durch den Antikörper angefärbte Proteine an der Wirts-zugewandten Seite des Laminated Layer deuten auf eine Kreuzinteraktion von anti-EmRSK4 mit homologen Rezeptoren des Wirts hin.

Aufgrund dieser Expression von EmRSK4 in unmittelbarer Nähe zum Wirtsgewebe ist die Möglichkeit einer Sensierung von Zytokinen des Wirtes durch EmRSK4 während einer Infektion mit *E. multilocularis* eindeutig gegeben.





**Abb. 67: EmRSK4 - Immunlokalisation.**

Dargestellt ist der immunhistochemische Nachweis von EmRSK4 in Gefrierschnitten (0,5  $\mu\text{m}$ ) einer mit *E. multilocularis* infizierten Leber aus *M. mulatta*. Die angeschnittenen Protoskolizes (P), die Haken der Protoskolizes (H) sowie Germinal Layer (GL), Laminated Layer (LL) und Wirtsgewebe (host tissue, HT) sind markiert. A: Die Schnitte wurden mit dem polyklonalen, aufgereinigten anti-EmRSK4 Antikörper (1:200; immunoGlobe) und dem korrespondierenden HRP-konjugierten Zweitantikörper anti-rabbit (1:50; Dianova) inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt. B: Zur Kontrolle wurden einige Schnitte nur mit Zweitantikörper inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt.

#### 4.19. Humanes BMP2 und TGF- $\beta$ 1 - Auswirkungen auf *E. multilocularis*

*In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass BMP / TGF- $\beta$  Rezeptoren aus *E. multilocularis* durch humanes BMP2 und TGF- $\beta$ 1 aktiviert werden können und eine anschließende Phosphorylierung von Echinokokken Smads stattfindet<sup>1,212</sup>. Weiterhin zeigte sich, dass humanes BMP2 in Abhängigkeit vom Alter der Metazestoden einen Einfluss auf das Wachstum der Vesikel hat<sup>98</sup>. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden weitere *in vivo* Versuche bezüglich der Auswirkungen von humanem BMP2 und TGF- $\beta$ 1 auf *E. multilocularis* durchgeführt.

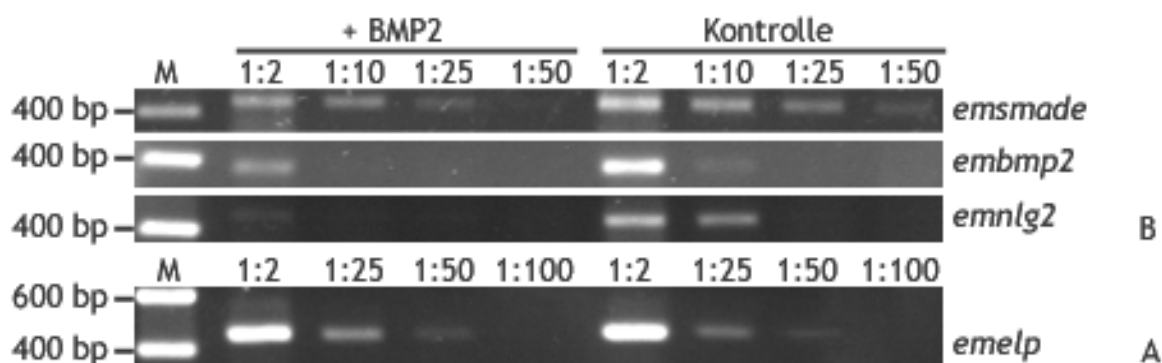
##### 4.19.1. Humanes BMP2 und TGF- $\beta$ 1 - Genexpression in Metazestoden

Die *in vitro* nachgewiesene Aktivierung des BMP / TGF- $\beta$  Signalwegs in *E. multilocularis* durch humane Zytokine der TGF- $\beta$  Superfamilie ließ vermuten, dass diese Signalkaskade letztendlich auch zur Regulation der Expression spezifischer Gene führt<sup>1,212</sup>. So ist bekannt, dass die Aktivierung des BMP / TGF- $\beta$  Signalweges in humanen Zellen zu einem Feedback-Mechanismus führt, wodurch die Expression von Genen des stimulierten Signalweges reguliert wird. So wird zum Beispiel Smad6 aus *H. sapiens* als Komponente eines negativen Feedback - Mechanismus verstanden<sup>270</sup>. Zur Untersuchung der Situation in *E. multilocularis* wurden dementsprechend in verschiedenen Ansätzen die Auswirkungen von humanem BMP2 und TGF- $\beta$ 1 auf die Genexpression in Metazestoden untersucht.

### Expressionsmuster von Genen des BMP / TGF- $\beta$ Signalweges

Um eine Regulation der verschiedenen Gene, die am BMP / TGF- $\beta$  Signalweg von *E. multilocularis* beteiligt sind, zu untersuchen, wurden zunächst Metazestoden über vier Tage in DMEM ausgehungert und anschließend mit 10 nM humanem BMP2 stimuliert. Nach sechs Stunden Inkubation wurde die RNA der Metazestoden isoliert und cDNA hergestellt (vgl. 6.17.7). Die cDNA wurde anschließend auf Basis des konstitutiv exprimierten Gens *emelp* (451 bp) normalisiert und es wurden semi - quantitative PCRs für verschiedene Gene des BMP / TGF- $\beta$  Signalweges in *E. multilocularis* durchgeführt (vgl. 6.12.6)<sup>71</sup>.

Wie in Abb. 68 gezeigt, wurden *embmp2*, *emsmadE* und *emnlg2* nach einer 6-stündigen Stimulation von Metazestoden mit humanem BMP2 weniger exprimiert als in der Kontrolle ohne den Zusatz des Zytokins. So lag die Nachweisgrenze für *embmp2* bei stimulierten Metazestoden bei einer 1:2 Verdünnung der cDNA, wohingegen in der Kontrollgruppe auch noch bei einer 1:10 cDNA - Verdünnung eine schwache, aber eindeutige Bande zu erkennen war. *EmsmadE* konnte in der Gruppe der mit BMP2 stimulierten Metazestoden bis zur 1:25 cDNA - Verdünnung nachgewiesen werden, in der Kontrollgruppe dagegen auch noch in der 1:50 cDNA - Verdünnung. *Emnlg2* wurde in der cDNA stimulierter Metazestoden ausschließlich in der 1:2 Verdünnung nachgewiesen, wohingegen die Detektion in der Kontrollgruppe auch noch in der 1:10 cDNA - Verdünnung möglich war. Bei allen weiteren getesteten Gene (*emrsk1*, *emrsk2*, *emrsk3*, *emrsk4*, *emsmadA*, *emsmadB*, *emsmadC*, *emsmadD*, *emsmadF*, *emact*, *emnlg1*) konnten mit dieser Methode keine Unterschiede in der Expression festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 68: Humanes BMP2 - Expressionsmuster von Genen des BMP / TGF- $\beta$  Signalweges.**

Die normalisierten cDNAs von Metazestoden mit Brutkapseln (Isolat G8065), die über 6 Stunden mit 25 ng/ml humanem BMP2 inkubiert wurden, sowie von nicht behandelten Metazestoden wurden in einer semi - quantitativen PCR auf Unterschiede in der Expression verschiedener Gene des BMP / TGF- $\beta$  Signalweges aus *E. multilocularis* getestet. Die PCR Produkte wurden anschließend elektrophoretisch in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Als Größenmarker (M) wurde der SmartLadder von Eurogentec verwendet. Die Markerbanden sind entsprechend ihrer Größe markiert. A: Gezeigt ist das Expressionsmuster des konstitutiv exprimierten *emelp* (451 bp), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:25, 1:50 und 1:100<sup>71</sup>. B: Gezeigt sind die Expressionsmuster von *emsmadE* (436 bp), *embmp2* (385 bp) und *emnlg2* (456 bp), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:10, 1:25 und 1:50.

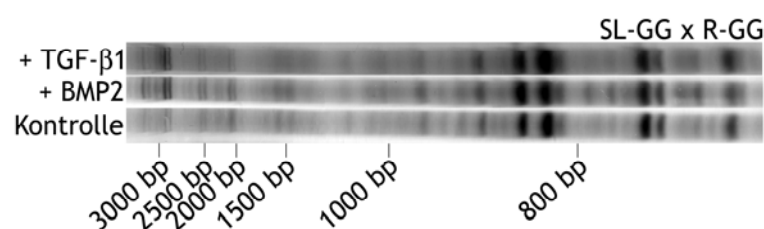
Folglich kann humanes BMP2 auch *in vivo* vom Parasiten sensiert werden und eine funktionelle Signalweiterleitung über BMP / TGF- $\beta$  Signalwege in Metazestoden auslösen, die zur Regulation der Expression von *embmp2*, *emsmadE* und *emnlg2* führt.

#### Expressionsmuster transgespleißter mRNAs

Vor einigen Jahren wurde von Brehm *et al.* eine Methode zur Identifikation transgespleißter, differentiell exprimierter mRNAs etabliert<sup>78</sup>. Da in *E. multilocularis* 25-30% aller mRNA Transkripte transgespleißt werden, wurde diese Methode auch in der vorliegenden Arbeit zur Identifikation von bisher unbekanntem BMP- und TGF- $\beta$  - regulierten Genen in Metazestoden verwendet<sup>100</sup>.

Dazu wurden axenisch kultivierte Metazestoden (Isolat H95) zunächst 4 Tage in DMEM ausgehungert und anschließend 6 Stunden mit 25 ng/ml humanem BMP2 bzw. TGF- $\beta$ 1 stimuliert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Nach der Amplifikation spezifischer transgespleißter cDNAs wurden diese in einem Harnstoff/Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht (vgl. 6.12.14).

Es zeigte sich, dass unter den aufgeführten Bedingungen keine Regulation von transgespleißten mRNAs durch BMP2 oder TGF- $\beta$ 1 stattfindet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Expression transgespleißter mRNAs aus stimulierten und nicht stimulierten Metazestoden festgestellt werden. Abb. 69 zeigt stellvertretend für alle anderen amplifizierten transgespleißten mRNAs bzw. cDNAs das Expressionsmuster von mRNAs, die 3' vom fusionierten Spliced Leader und 5' vom polyA Bereich die Nukleotide GG aufweisen (SL-GG x R-GG).



**Abb. 69: Humanes BMP2 und TGF- $\beta$ 1 - Expressionsmuster transgespleißter mRNAs.**

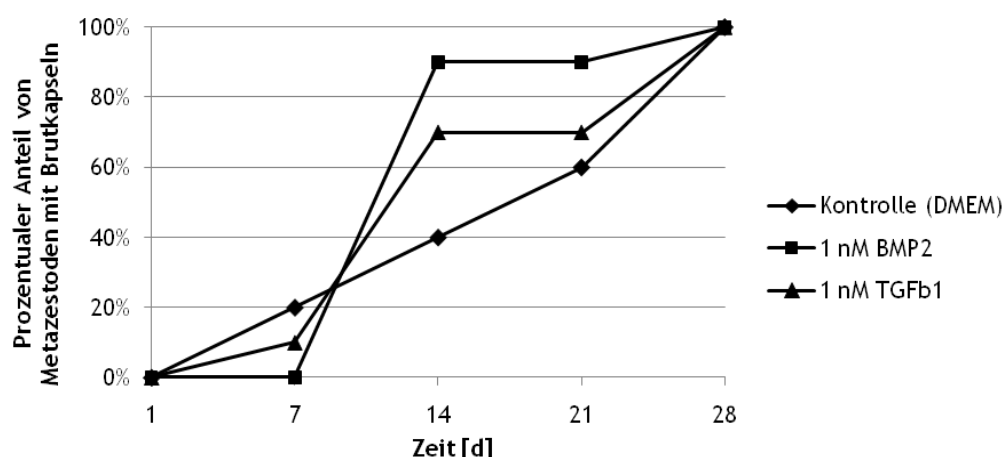
Gezeigt ist das Genexpressionsmuster spezifischer transgespleißter mRNAs bei Stimulation von *E. multilocularis* Metazestoden mit 25 ng/ml humanem TGF- $\beta$ 1 (oben) bzw. BMP2 (Mitte). Als Kontrolle dienen in DMEM inkubierte Metazestoden (unten). Die mit den Oligonukleotiden SL-GG und R-GG im Spliced Leader Differential Display (SLDD) amplifizierten cDNAs wurden in einem Harnstoff/Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht<sup>78</sup>. Als Größenmarker wurde der SmartLadder von Eurogentec verwendet. Die jeweiligen Positionen der Markerbanden werden entsprechend ihrer Größe angezeigt.

#### **4.19.2. Humanes BMP2 und TGF- $\beta$ 1 - Differenzierung von Metazestoden**

Durch Dr. Markus Spiliotis konnte bereits gezeigt werden, dass humanes BMP2 in Abhängigkeit vom Alter einen Einfluss auf das Wachstum des Metazestoden von *E. multilocularis* hat<sup>98</sup>. Um den Einfluss von humanen BMP / TGF- $\beta$  Zytokinen auf die Differenzierung von Metazestoden zu untersuchen, wurden diese in der vorliegenden

Arbeit über einen Zeitraum von vier Wochen mit 25 ng/ml humanem BMP2 bzw. humanem TGF- $\beta$ 1 kultiviert (vgl. 6.17.5 und 6.17.7).

Innerhalb des Untersuchungszeitraums stieg in der Kontrollgruppe der Anteil der Metazestoden, die Brutkapseln ausbildeten, relativ gleichmäßig auf 100% an Tag 28 an (Abb. 70). So konnte in den ersten 21 Tagen eine Steigerung des Anteils der brutkapselbildenden Metazestoden von 20% pro Woche beobachtet werden, mit einem Sprung von 60% auf 100% innerhalb der letzten Woche des Experiments. Im Vergleich dazu konnte in der BMP2 - Gruppe zwischen dem siebten und vierzehnten Tag des Experiments ein starker Anstieg des Anteils differenzierter Metazestoden beobachtet werden: So stieg der Anteil von Metazestoden mit Brutkapseln innerhalb dieses Zeitraums von 0% auf 90%, um dann an Tag 28 die 100% zu erreichen. Auch beim Versuchsansatz mit TGF- $\beta$ 1 konnte diese Tendenz festgestellt werden, allerdings in geringerem Ausmaß. In diesem Ansatz bildeten am siebten Tag 10% und am vierzehnten Tag 70% der Metazestoden Brutkapseln; an Tag 28 wurden schließlich 100% erreicht. Innerhalb des Versuchszeitraums blieb bei allen Ansätzen die Integrität der Metazestoden vollständig erhalten.



**Abb. 70: BMP2 und TGF- $\beta$ 1 - Auswirkungen auf die Differenzierung von Metazestoden.**

10 Metazestoden ohne Brutkapseln (Isolat GH09) wurden über 4 Wochen in Ko-Kultur mit Reuber Hepatoma Zellen und unter Zugabe von 25 ng/ml humanem BMP2 bzw. TGF- $\beta$ 1 kultiviert. Die Metazestoden der Kontrolle wurden ohne die Zugabe der Zytokine kultiviert. Die Integrität, das Wachstum und die Differenzierung der Metazestoden wurden im Zuge des Mediumwechsels und der erneuten Zugabe von Zytokin einmal wöchentlich dokumentiert, wobei hier ausschließlich die Auswirkungen auf die Differenzierung dargestellt sind. Der Versuch konnte aufgrund eines Mangels an Metazestoden des Isolats GH09, die noch keine Brutkapseln gebildet hatten, nur einmal durchgeführt werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass humane Zytokine der TGF- $\beta$  Superfamilie die entsprechenden Rezeptoren von *E. multilocularis* auch *in vivo* aktivieren können und einen Einfluss auf die Differenzierung von Metazestoden haben.

Zusätzlich wurde in diesem Experiment das Größenwachstum der Metazestoden innerhalb des Versuchszeitraums beobachtet, wobei kein Unterschied zwischen den

jeweiligen Ansätzen festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Metazestoden erreichten in 28 Tagen einen Durchmesser von 0,3 - 0,5 cm. Beachtet man die Kultivierungsbedingungen des Experiments, so entspricht diese Beobachtung den Ergebnissen von Dr. Markus Spiliotis zum Einfluss von humanem BMP2 in verschiedenen Kulturmedien auf das Größenwachstum von Metazestoden<sup>98</sup>.

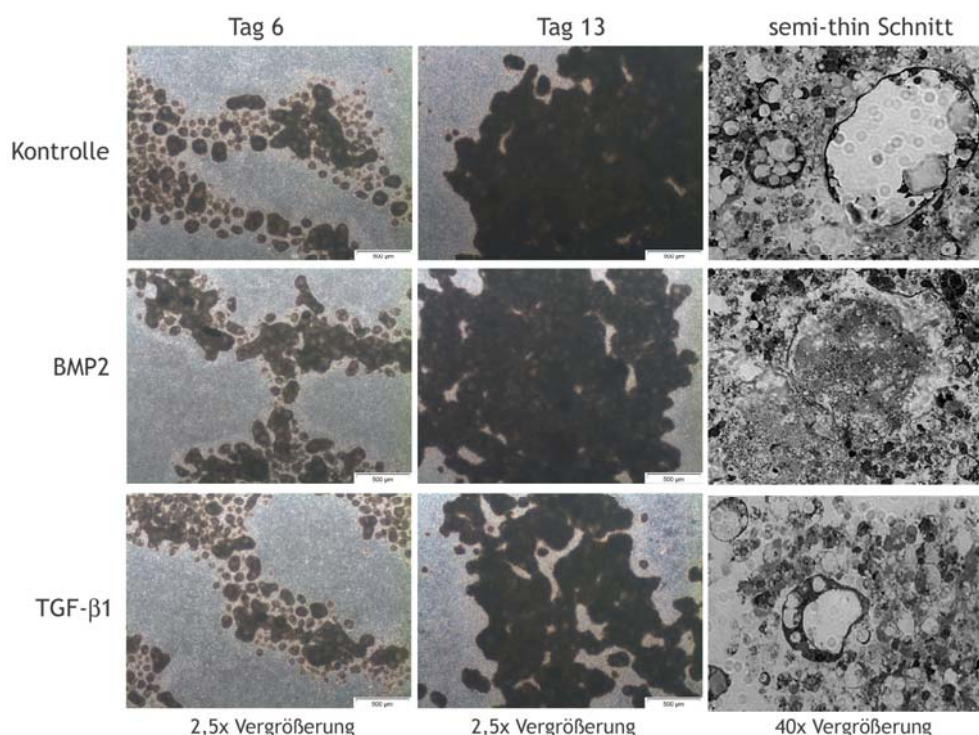
#### **4.19.3. Humanes BMP2 und TGF- $\beta$ 1 - Regeneration von Primärzellen**

Zur Untersuchung der Auswirkungen von humanem BMP2 und TGF- $\beta$ 1 auf die Regeneration von Primärzellen wurden zunächst axenisch kultivierte Metazestoden (Isolat H95) über 9 Tage mit 25 ng/ml humanem BMP2 und TGF- $\beta$ 1 inkubiert. In diesem Zeitraum wurden die Zytokine zweimal im Rahmen der Mediumwechsel erneuert. Anschließend wurden die Zellen der Metazestoden isoliert und als Primärzellkultur weitere 14 Tage im axenischen Kultursystem unter Zugabe der oben genannten Menge BMP2 und TGF- $\beta$ 1 kultiviert, wobei die Zytokine und das Medium dreimal wöchentlich erneuert wurden. Die Kontrollgruppe wurde unter den gleichen Bedingungen ohne Zugabe der Zytokine kultiviert (vgl. 6.17.7). Nach zwei Wochen wurden die Zellen nach Karnovsky fixiert und es wurden semi-thin Schnitte der Präparate angefertigt (vgl. 6.17.10).

In Abb. 71 sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Primärzellkulturen an den Tagen 6 und 13 sowie Aufnahmen von semi-thin Schnitten der Zellen nach der Fixierung an Tag 14 gezeigt. Eindeutig erkannte man bereits an Tag 6 die Ausbildung von cavities innerhalb der Zellhaufen, wobei zwischen den Versuchsgruppen kein Unterschied bezüglich Größe oder Anzahl der cavities zu erkennen war. An Tag 13 schienen die mit TGF- $\beta$ 1 inkubierten Zellaggregate der Primärzellkultur etwas weniger kompakt zu sein als die Zellaggregate der anderen beiden Ansätze, wobei in den semi-thin Schnitten keine Unterschiede in Bezug auf den Aufbau der cavities zwischen der TGF- $\beta$ 1-Gruppe und der Kontrollgruppe zu erkennen waren. Bei beiden Ansätzen waren Zellen im Inneren der cavities zu finden, was auf ein frühes Stadium der Metazestoden - Regeneration hindeutet. Allerdings hatten die cavities der mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten Primärzellkultur eine geringere Größe als die cavities im Kontrollansatz. Ein ähnliches Bild zeigte sich im Vergleich der mit BMP2 stimulierten Primärzellkultur und der Kontrollgruppe. Hier war an Tag 13 bei 2,5-facher Vergrößerung kein Unterschied bezüglich Größe und Anzahl der cavities sowie bei der Dichte der Zellaggregate zu erkennen. Bei 40-facher Vergrößerung der fixierten Zellen war die angeschnittene cavity der BMP2 - Gruppe vom Umfang zwar gleich groß wie die cavity der Kontrollgruppe, allerdings schien sie weniger deutlich abgetrennt von den umgebenden



Zellen zu sein. Dabei ließ sich nicht eindeutig feststellen, ob dieser Unterschied durch die Art der Fixierung oder durch die Inkubation der Zellen mit BMP2 zustande kam. Zusammenfassend konnte durch diesen Versuchsaufbau kein eindeutiger Effekt von humanem BMP2 oder TGF- $\beta$ 1 auf die Regenerationsfähigkeit von *E. multilocularis* Primärzellen festgestellt werden.



**Abb. 71: Humanes BMP2 und TGF- $\beta$ 1 - Regeneration von Primärzellen.**

Axenisch kultivierte Metazestoden (Isolat H95) wurden zunächst über 9 Tage mit 25 ng/ml humanem BMP2 und TGF- $\beta$ 1 inkubiert, wobei die Zytokine und das Medium jeweils 2 Mal erneuert wurden. Anschließend wurden die Primärzellen isoliert und die Ansätze weitere 14 Tage unter axenischen Bedingungen mit der oben genannten Menge humanem Zytokin inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde unter den gleichen Bedingungen, aber ohne die Zugabe von Zytokin, kultiviert. Nach einer Karnovsky - Fixierung der sich regenerierenden Primärzellen wurden semi thin Schnitte angefertigt. Die Dokumentation der Primärzell-Phänotypen erfolgte am 6. und 13. Tag nach der Primärzellisolierung bei einer 2,5x Vergrößerung im Lichtmikroskop. Die Semitin Schnitte wurden lichtmikroskopische mit einer 40x Vergrößerung ausgewertet.

#### 4.20.SB431542 - ein Inhibitor der BMP / TGF- $\beta$ Typ I Rezeptor Familie

SB431542 ist ein Inhibitor, der selektiv die Aktivierung der humanen Typ I Rezeptoren Alk-4, Alk-5 und Alk-7 aus der TGF- $\beta$  Rezeptorgruppe verhindert, wobei die Rezeptoren Alk-2, Alk-3 und Alk-6 nicht beeinflusst werden<sup>273-274</sup>. Eine mögliche Inhibierung von Alk-1 ist laut Hersteller noch nicht abschließend geklärt. SB431542 wird durch seine Effekte auf TGF-, Activin- und Nodal- Signalwege u.a. als vielversprechendes Werkzeug der Forschung und im klinischen Bereich als möglicher neuer Regulator der vaskulären Permeabilität gehandelt.

Zur umfassenden Analyse der Funktion der Echinokokken BMP / TGF- $\beta$  Rezeptoren wurde der Einfluss dieses Inhibitors auf das BMP / TGF- $\beta$  Signaling von *E. multilocularis* *in vitro* und *in vivo* untersucht.

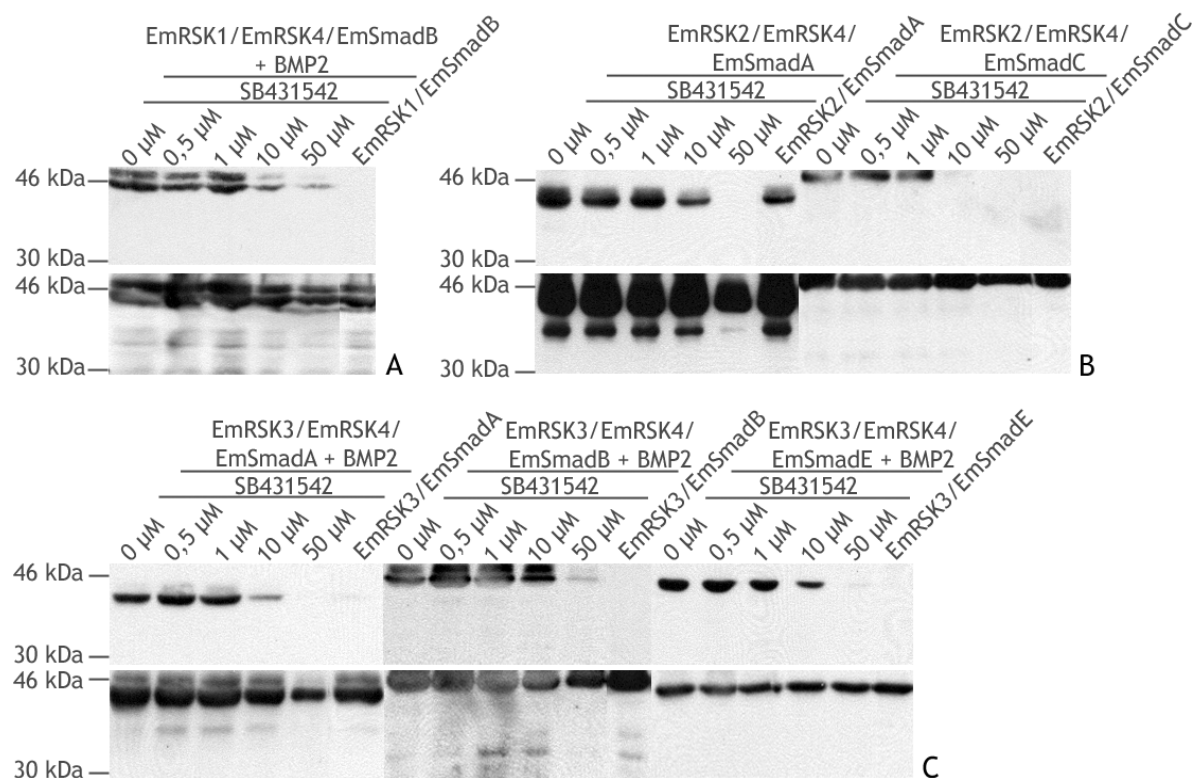
#### 4.20.1.SB431542 - Inhibierung der Echinokokken Rezeptoren

Die Effekte von SB431542 auf BMP / TGF- $\beta$  Rezeptoren aus *E. multilocularis* wurden zunächst *in vitro* durch heterologe Expression von EmRSK1, EmRSK2, EmRSK3 und EmRSK4 mit den entsprechenden Echinokokken Smads in HEK 293T Zellen untersucht, wobei der Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wurde (vgl. 6.16.5). Das Signaling via EmRSK1/EmRSK4 und EmRSK3/EmRSK4 wurde durch die Zugabe von humanem BMP2 stimuliert, während das Signaling via EmRSK2/EmRSK4 durch die konstitutive Aktivierung von EmRSK2 auch ohne einen zusätzlichen Stimulus aktiv war. Die Aktivierung der Signalwege wurde durch die Phosphorylierung der entsprechenden heterolog exprimierten Echinokokken Smads nachgewiesen. Um einen Einfluss des Inhibitors auf die Stärke der Expression auszuschließen, wurde zusätzlich mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen den fusionierten Myc-Tag gerichtet war, die gleichmäßige Expression der Echinokokken Smads nachgewiesen.

Abb. 72 A, B und C zeigen das Phosphorylierungsmuster der Echinokokken BMP / TGF- $\beta$  Signalwege unter Zugabe von SB431542. So ist die Phosphorylierung von EmSmadB durch EmRSK1/EmRSK4 ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M SB431542 deutlich verringert (vgl. Abb. 72 A). Wie bereits von Dr. Peter Bernthaler gezeigt, ist die Inhibierung des Signaling via EmRSK2/EmRSK4 abhängig vom nachgeschalteten Smad. So wird das Signaling via EmRSK2/EmRSK4 und EmSmadA bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M noch nicht merklich eingeschränkt, während das Signaling via EmRSK2/EmRSK4 und EmSmadC bei dieser Konzentration bereits vollständig inhibiert wird<sup>212</sup>. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit die Inhibierung von EmRSK2/EmRSK4 und EmSmadA bei einer Konzentration von 50  $\mu$ M SB431542 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 72 B). Die Inhibierung des Signaling via EmRSK3/EmRSK4 ist ähnlich abhängig vom nachgeschalteten Smad wie bei EmRSK2/EmRSK4. Es zeigte sich, dass die Signalweiterleitung via EmRSK3/EmRSK4 und EmSmadA bereits bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M SB431542 eindeutig beeinträchtigt ist, wohingegen die Phosphorylierung von EmSmadB erst bei einer Konzentration von 50  $\mu$ M nahezu inhibiert wurde. Auch die Aktivierung von EmSmadE durch EmRSK3/EmRSK4 wurde bereits durch 10  $\mu$ M SB431542 beeinträchtigt, allerdings waren die Auswirkungen hier weniger ausgeprägt als bei EmSmadA. Mit 50  $\mu$ M SB431542 wurde dagegen das Signaling via EmRSK3/EmRSK4 und EmSmadE vollständig inhibiert (vgl. Abb. 72 C). Unterschiedlich hohe Affinitäten von

Smads und SB431542 zu den Rezeptoren liefern eine mögliche Erklärung für die verschiedenen Ausprägungen der Rezeptor - Inhibierung.

Letztendlich konnte damit gezeigt werden, dass *in vitro* alle funktionellen Kombinationen von BMP / TGF- $\beta$  Rezeptoren und Smads aus *E. multilocularis* durch SB431542 beeinträchtigt werden können. SB431542 ist damit zur Untersuchung der Funktion aller BMP / TGF- $\beta$  Signalwege in *E. multilocularis* geeignet.



**Abb. 72: SB431542 - Inhibierung von EmRSK1, EmRSK2, EmRSK3.**

Gezeigt ist das Phosphorylierungsmuster von EmSmadA, B, C und E durch die Echinokokken BMP / TGF- $\beta$  Typ I Rezeptoren EmRSK1 (A), EmRSK2 (B) und EmRSK3 (C) in Kombination mit dem Echinokokken BMP / TGF- $\beta$  Typ II Rezeptor EmRSK4 bei heterologer Expression in HEK 293T und unter Anwesenheit von 0,5 - 50  $\mu$ M SB431542, wobei dem Kontrollansatz jeweils kein Inhibitor zugesetzt wurde (0  $\mu$ M SB431542). EmRSK1 und EmRSK3 wurden im Gegensatz zum konstitutiv aktiven EmRSK2 durch die Zugabe von humanem BMP2 aktiviert. Als weitere Kontrolle wurden die verwendeten Rezeptoren unter den gleichen Bedingungen auch einzeln mit den entsprechenden Smads in HEK 293T Zellen exprimiert und die Phosphorylierung der Smads detektiert (Daten nur z. T. gezeigt). Die Proteine wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Aktivierter EmSmadB und EmSmadE wurde jeweils mit anti-Phospho-Smad1 (Ser463/465) / Smad5 (Ser463/465) / Smad8 (Ser426/428) von Cell Signaling (A und C) nachgewiesen, aktivierter EmSmadA und EmSmadC dagegen mit anti-Phospho-Smad3 (Ser423/425) / Smad1 (Ser463/465) von Cell Signaling (B und C). Zur Kontrolle der Expression wurden alle rekombinant exprimierten Smads zusätzlich mit anti-cMyc von NEB detektiert. Diese Darstellung ist aus einzelnen Western Blots zusammengesetzt.

#### 4.20.2.SB431542 - Schädigung von Metazestoden

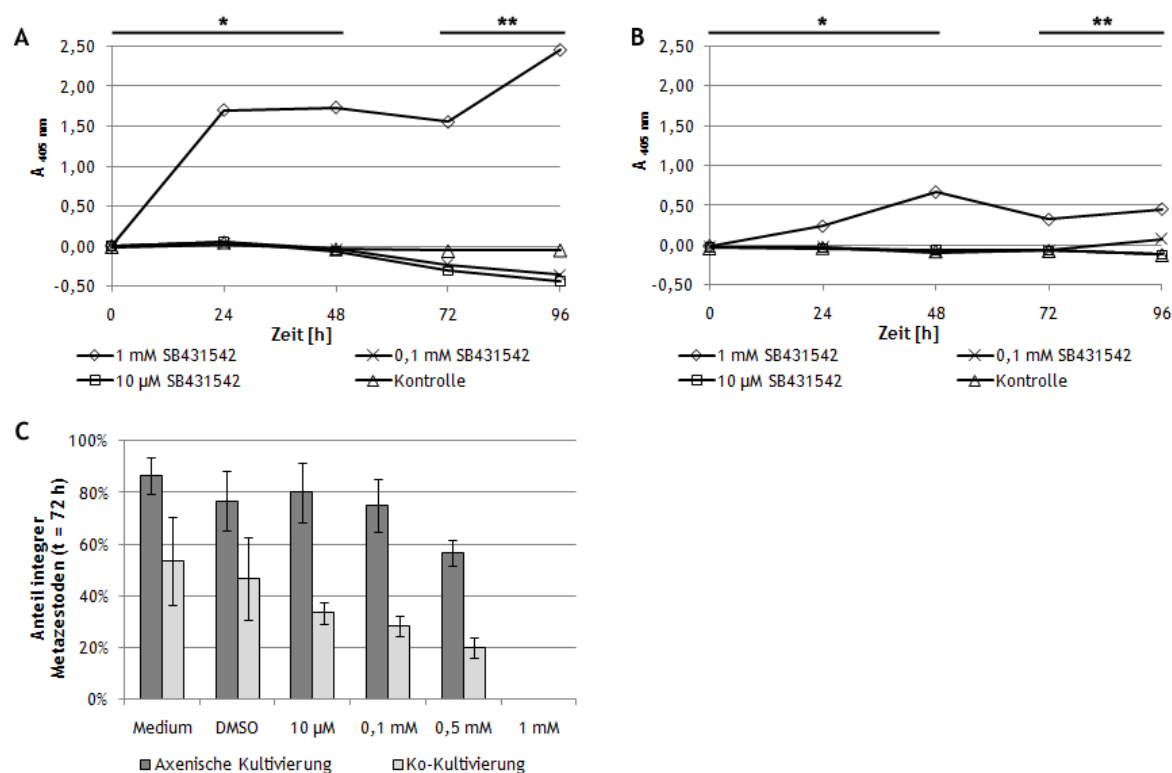
Um die Effekte von SB431542 auf die BMP / TGF- $\beta$  Signalwege auch *in vivo* an Metazestoden untersuchen zu können, wurde zunächst untersucht, in welchen Konzentrationen dieser Inhibitor *E. multilocularis* Metazestoden schädigt. Dazu wurden

Ko-kultivierte und axenisch kultivierte Metazestoden des Isolats J31 zunächst über einen Zeitraum von 4 Tagen mit 10 bis 1000  $\mu\text{M}$  SB431542 inkubiert. Die Schädigung der Zellen wurde täglich auf Basis der Aktivität freigesetzter Alkalischer Phosphatase von *E. multilocularis* gemessen (vgl. 6.17.9)<sup>275</sup>. Zusätzlich wurde täglich die Integrität der Metazestoden mikroskopisch überprüft, wobei zusammengefallene Metazestoden als nicht integer gewertet wurden. Abschließend wurde die Integrität der Metazestoden von Isolat J31 und GH09 vergleichend bei 10  $\mu\text{M}$  SB431542 untersucht.

Wie in Abb. 73 A gezeigt, kam es durch 1 mM SB431542 bei der Ko-Kultivierung von Metazestoden mit Reuber Hepatoma Zellen bereits nach 24 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität freigesetzter Alkalischer Phosphatase, während die dargestellten geringeren Konzentrationen von SB431542 (100  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) keine Auswirkungen auf die Integrität der Zellen hatten. Dagegen war im axenischen Kultursystem bei einer Konzentration von 1 mM SB431542 die Aktivität freigesetzter Alkalischer Phosphatase deutlich geringer als bei der Ko-kultivierten Metazestoden (vgl. Abb. 73 B). Die Messwerte für 100  $\mu\text{M}$  SB431542 sowie für 10  $\mu\text{M}$  SB431542 waren wiederum unter beiden Kulturbedingungen vergleichbar. In Abb. 73 C sind die Anteile der integeren Metazestoden nach 72 h mit 10 bis 1000  $\mu\text{M}$  SB431542 in Ko-Kultur bzw. im axenischen Kultursystem im direkten Vergleich dargestellt. Dabei konnte eindeutig eine Abhängigkeit zwischen der Integrität der Metazestoden und der Konzentration SB431542 festgestellt werden, wobei der Anteil integrier Metazestoden mit höheren Konzentrationen an Inhibitor abnahm. Der Vergleich zwischen axenisch kultivierten und ko-kultivierten Metazestoden zeigte dabei weiterhin, dass auch das Kultursystem einen Einfluss auf die Integrität der J31 - Metazestoden hat. So konnte im axenischen Kultursystem mit Werten zwischen 75% und 87% zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied beim Anteil integrier Metazestoden zwischen dem Kulturmedium, dem Kontrollansatz mit DMSO, 10  $\mu\text{M}$  SB431542 und 0,1 mM SB431542 festgestellt werden. Bei 0,5 mM SB431542 zeigte sich zu diesem Zeitpunkt dagegen mit 57% integrieren Vesikeln bereits eine deutliche Verringerung des Wertes, während bei 0,1 mM SB431542 die Metazestoden ihre Integrität nicht bewahren konnten. In der Ko-Kultur hatten nach 72 Stunden bereits 53% der unbehandelten Metazestoden und 47% der Vesikel in der Kontrollgruppe ihre Integrität verloren, wobei die Unterschiede zwischen diesen Werten aber nicht signifikant waren. Bei 10  $\mu\text{M}$  SB431542 zeigten zu diesem Zeitpunkt nur noch 33% der Metazestoden ihre volle Integrität, während die Anteile integrier Vesikel bei höheren Konzentrationen SB431542 über 28% bei 0,1 mM SB431542 und 20% bei 0,5 mM SB431542 bis auf 0% bei 1 mM SB431542 abfielen. Wahrscheinlich basierten diese Unterschiede bezüglich der Integrität der Metazestoden in Ko-Kultur und axenischer

Kultur auf einer Schädigung der Reuber Hepatoma Zellen in der Ko-Kultur, die ihrerseits die Metazestoden beeinflussten.

Trotz der signifikanten Verringerung der Integrität von J31 - Metazestoden bei steigenden Konzentrationen SB431542 kann davon ausgegangen werden, dass SB431542 in einem Zeitraum von 4 Tagen und in Konzentrationen unter 0,1 mM die Zellen der Metazestoden weder in Ko-Kultur noch im axenischen Kultursystem schädigt.



**Abb. 73: SB431542 - Schädigung von Metazestoden.**

Die Schädigung von Metazestoden durch SB431542 wurde über einen Zeitraum von 3 bis 4 Tagen mit Konzentrationen von 10 µM bis 1 mM zum Einen anhand der Menge bzw. Aktivität freigesetzter Alkalischer Phosphatase von *E. multilocularis* getestet, zum Anderen wurde in regelmäßigen Abständen die Integrität der Metazestoden überprüft. Die Kontrollgruppen wurden jeweils unter Zugabe des entsprechenden Volumens DMSO kultiviert. A: Alkalische Phosphatase Assay mit Isolat J31 in Ko-Kultur. B: Alkalische Phosphatase Assay mit Isolat J31 im axenischen Kultursystem. Die Aktivität freigesetzter Alkalischer Phosphatase wurde durch Zugabe des Substrats *p*-Nitrophenylphosphat zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Absorptionsmessung bei 405 nm ( $A_{405 \text{ nm}}$ ) gemessen. Die Messwerte wurden auf Basis des verwendeten Kulturmediums normalisiert. Messwerte unter einem Wert von 0,2 werden als nicht signifikant gewertet. \*) Hier sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen angegeben. \*\*) Diese Daten beruhen auf einem einzelnen Versuch. C: Vergleichende Darstellung des Anteils integrier J31 - Metazestoden bei Ko-Kultivierung und axenischer Kultivierung unter Einfluss von 10 µM bis 1 mM SB431542 nach 72 h. Die Daten beruhen auf drei unabhängigen Versuchen. Die Standardabweichung ist angegeben.

#### 4.20.3.SB431542 - Genexpression in Metazestoden

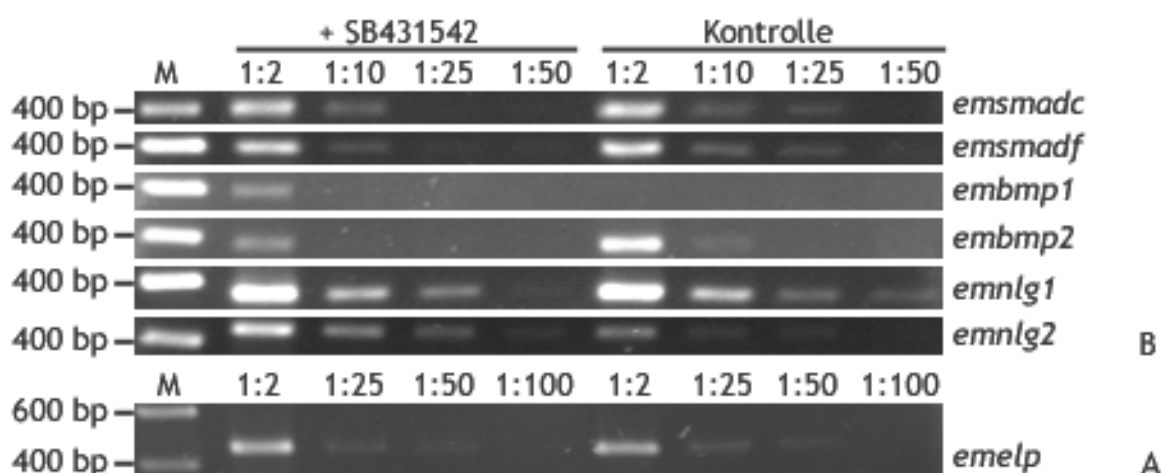
Neben den Auswirkungen auf die Genexpression der verschiedenen am BMP / TGF- $\beta$  Signaling beteiligten Gene in *E. multilocularis* bei einer Aktivierung durch humanes BMP2 (vgl. 4.19.1) wurden auch die Effekte einer Inhibierung dieses Signalwegs durch SB431542 untersucht. Dazu wurden zunächst Metazestoden vier Tage lang in DMEM

ausgehungert und anschließend über sechs Stunden mit 10  $\mu$ M SB431542 inkubiert (vgl. 6.17.8). Die Kontrollgruppe wurde mit dem entsprechenden Volumen DMSO kultiviert. Nach der Isolierung der RNA und der Herstellung von cDNA wurden semi-quantitative PCRs für verschiedene Gene des BMP / TGF- $\beta$  Signalweges in *E. multilocularis* durchgeführt (vgl. 6.12.6)<sup>71</sup>. Die Normalisierung der cDNA erfolgte dabei auf Basis des konstitutiv exprimierten Gens *emelp*.

In Abb. 74 sind die Expressionsmuster der untersuchten Gene im Agarosegel dargestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass *emsmadC* und *emsmadF* in Metazestoden unter dem Einfluss von SB431542 im Vergleich zur Kontrolle geringer exprimiert werden. So lag die Nachweisgrenze für diese beiden Gene in der SB431542 - Gruppe bei einer cDNA - Verdünnung von 1:10, während der Nachweis in der Kontrollgruppe auch noch bei einer cDNA - Verdünnung von 1:25 erfolgreich war. Die Expression von *embmp1* wurde dagegen durch die Zugabe von SB431542 verstärkt: während in der Kontrollgruppe kein Nachweis dieses Gens möglich war, konnte *embmp1* in der SB431542 - Gruppe eindeutig in der 1:2 cDNA - Verdünnung nachgewiesen werden. *Embmp2* wurde dagegen durch den Einfluss von SB431542 in Metazestoden verringert exprimiert. Hier war ein Nachweis in der SB431542 - Gruppe nur bei einer cDNA - Verdünnung von 1:2 möglich, während in der Kontrollgruppe auch noch bei einer 1:10 Verdünnung eine schwache Bande zu erkennen ist. Auch die Expression von *emnlg1* und *emnlg2* wurde durch die Inhibierung des BMP / TGF- $\beta$  Signaling in Metazestoden reguliert. Während *emnlg1* in der SB431542 - Gruppe verringert exprimiert wurde, war die Expression von *emnlg2* dagegen erhöht. So lag die Nachweisgrenze für *emnlg1* bei cDNA - Verdünnungen von 1:25 (SB431542) bzw. 1:50 (Kontrolle), für *emnlg2* dagegen bei 1:50 (SB431542) bzw. 1:25 (Kontrolle).

Bei allen anderen getesteten Gene (*emrsk1*, *emrsk2*, *emrsk3*, *emrsk4*, *emsmadA*, *emsmadB*, *emsmadD*, *emsmadE*, *emact*) konnten mit dieser Methode keine Unterschiede in der Expression festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Durch die eindeutig vermehrte Expression von *embmp1* und *emnlg2* sowie die geringere Expression von *emsmadC*, *emsmadF*, *embmp2* und *emnlg1* in Metazestoden unter Einfluss von SB431542 konnte gezeigt werden, dass SB431542 auch *in vivo* das BMP / TGF- $\beta$  Signaling von *E. multilocularis* beeinflusst. Zusätzlich konnten damit die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen mit humanem BMP2 zur Funktionalität des BMP / TGF- $\beta$  Signaling in *E. multilocularis* erweitert werden (vgl. 4.19.1).



**Abb. 74: SB431542 - Expressionsmuster von Genen des BMP / TGF- $\beta$  Signalweges.**

Die normalisierten cDNAs von Metazestoden mit Brutkapseln (Isolat G8065), die über 6 Stunden mit 10  $\mu$ M SB431542 inkubiert wurden, sowie von nicht behandelten Metazestoden wurden in einer semi - quantitativen PCR auf Unterschiede in der Expression verschiedener Gene des BMP / TGF- $\beta$  Signalweges aus *E. multilocularis* getestet. Die PCR Produkte wurden anschließend elektrophoretisch in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Als Größenmarker (M) wurde der SmartLadder von Eurogentec verwendet. Die Markerbanden sind entsprechend ihrer Größe markiert. A: Gezeigt ist das Expressionsmuster des konstitutiv exprimierten Gens *emelp* (451 bp), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:25, 1:50 und 1:100<sup>71</sup>. B: Gezeigt sind die Expressionsmuster von *emsmadC* (407 bp), *emsmadF* (391 bp), *embmp1* (390 bp), *embmp2* (385 bp), *emnlg1* (362 bp) und *emnlg2* (456 bp), jeweils in den cDNA - Verdünnungsstufen 1:2, 1:10, 1:25 und 1:50.

#### 4.20.4. SB431542 - Differenzierung von Metazestoden

Auf Basis der Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel wurden die Effekte von SB431542 und damit die Inhibierung des BMP / TGF- $\beta$  Signaling auf die Differenzierung von *E. multilocularis* Metazestoden untersucht.

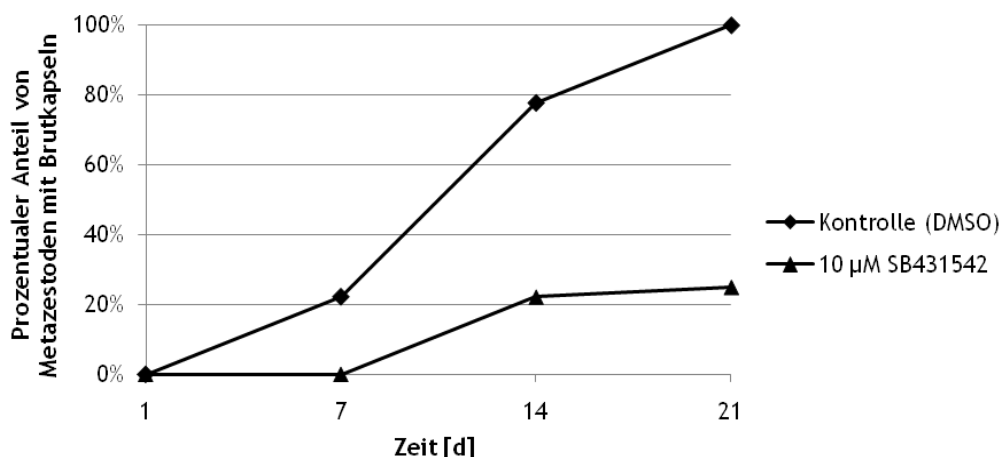
Dazu wurden Metazestoden ohne Brutkapseln (Isolat GH09) über einen Zeitraum von drei Wochen mit 10  $\mu$ M SB431542 kultiviert (vgl. 6.17.5 und 6.17.8). Die Kontrollgruppe wurde mit dem entsprechenden Volumen DMSO unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Einmal wöchentlich wurden die Integrität, das Wachstum und die Differenzierung der Metazestoden dokumentiert. Während des Versuchszeitraums blieb die Integrität des Metazestoden vollständig erhalten (vgl. 4.20.2).

Abb. 75 zeigt die Unterschiede in der Differenzierung der Metazestoden unter Einfluss von 10  $\mu$ M SB431542 bzw. der Kontrollgruppe. Eindeutig zu erkennen ist die stark verringerte Differenzierung der Metazestoden im Ansatz mit SB431542 im Vergleich zu den Vesikeln der Kontrollgruppe. So stieg der Anteil der Metazestoden mit Brutkapseln in der Kontrollgruppe von 0% an Tag 1, 20 % an Tag 7 und 80% an Tag 14 auf 100% an Tag 21. Beim SB431542 - Ansatz bildeten dagegen maximal 25% der Metazestoden an Tag 21 Brutkapseln aus.

Weiterhin wurde festgestellt, dass die Metazestoden unter Einfluss von SB431542 ein geringeres Wachstum als die Vesikel der Kontrollgruppe zeigten (Daten nicht gezeigt).

So erreichten die Metazestoden der Kontrollgruppe einen Durchmesser von 0,4 - 0,55 cm, während der maximale Durchmesser der Metazestoden der Testgruppe bei 0,3 cm lag.

Damit wurde eindeutig gezeigt, dass die Inhibierung des BMP / TGF- $\beta$  Signaling durch SB431542 einen negativen Einfluss auf die Differenzierung und das Wachstum von *E. multilocularis* Metazestoden hat.



**Abb. 75: SB431542 - Auswirkungen auf die Differenzierung von Metazestoden.**

Gezeigt sind Metazestoden ohne Brutkapseln (Isolat GH09), die unter Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  SB431542 über einen Zeitraum von 21 Tagen in einer Ko-Kultur mit Reuber Hepatoma Zellen inkubiert wurden. Die Metazestoden der Kontrolle wurden mit dem entsprechenden Volumen DMSO kultiviert. Die Integrität, das Wachstum und die Differenzierung der Metazestoden wurden im Zuge des Mediumwechsels und der erneuten Zugabe von Zytokin einmal wöchentlich dokumentiert, wobei hier ausschließlich die Auswirkungen auf die Differenzierung dargestellt sind. Der Versuch konnte aufgrund eines Mangels an Metazestoden des Isolats GH09, die noch keine Brutkapseln gebildet hatten, nur einmal durchgeführt werden.

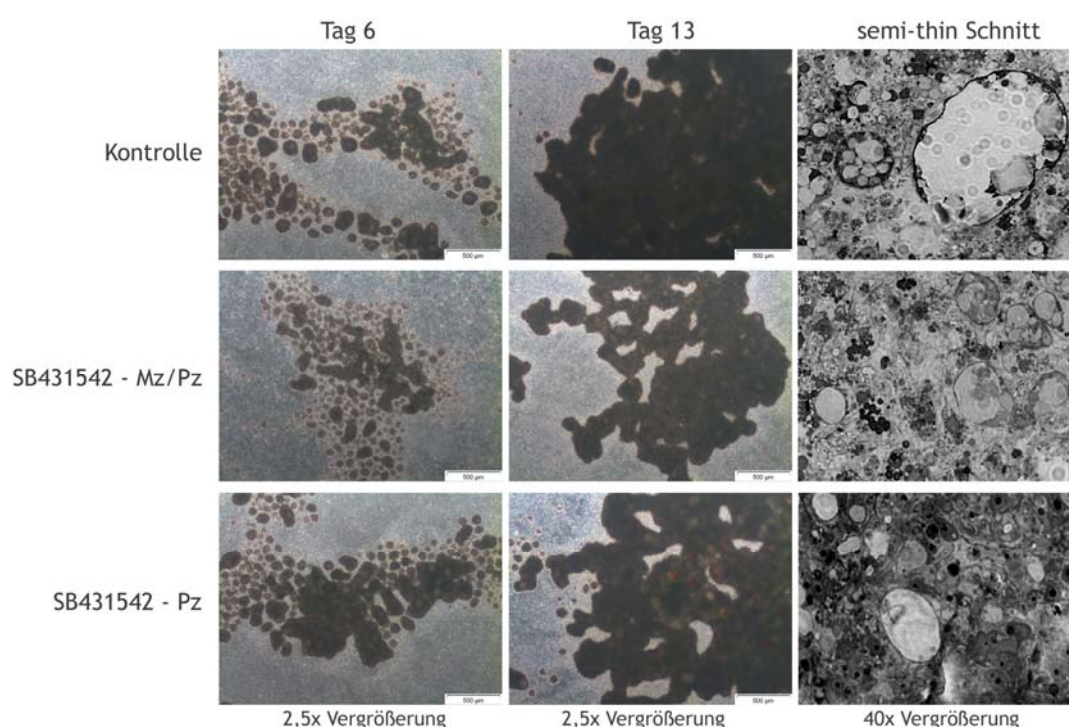
#### 4.20.5. SB431542 - Regeneration von Primärzellen

Entsprechend den Untersuchungen zu Auswirkungen von humanem BMP2 und TGF- $\beta$ 1 auf die Regeneration von Primärzellen wurde dieses Experiment auch mit SB431542 durchgeführt. Dazu wurden axenisch kultivierte Metazestoden (Isolat H95) über 9 Tage in einem ersten Ansatz (Ansatz 1) mit 10  $\mu\text{M}$  SB431542 und in einem zweiten Ansatz (Ansatz 2) ohne Inhibitor inkubiert. Der Inhibitor wurde bei Ansatz 1 zweimal im Rahmen der Mediumwechsel erneuert. Anschließend wurden die Zellen der Metazestoden isoliert und beide Ansätze als Primärzellkultur weitere 14 Tage im axenischen Kultursystem mit 10  $\mu\text{M}$  SB431542 kultiviert. Der Inhibitor wurde zusammen mit dem Medium dreimal wöchentlich erneuert. Die Kontrollgruppe wurde unter den gleichen Bedingungen mit dem entsprechenden Volumen DMSO kultiviert (vgl. 6.17.8). Nach vierzehn Tagen wurden die Zellen nach Karnovsky fixiert und es wurden semi-thin Schnitte der Präparate angefertigt (vgl. 6.17.10).

Abb. 76 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Primärzellkulturen aus Ansatz 1 (SB431542 - Mz/Pz), Ansatz 2 (SB431542 - Pz) und der Kontrolle an Tag 6 und Tag 13 mit



einer 2,5-fachen Vergrößerung sowie der semi-thin Schnitte an Tag 14 mit einer 40-fachen Vergrößerung. Bereits an Tag 6 schien die Primärzellkultur aus Ansatz 1 (SB431542 - Mz/Pz) weniger dichte Aggregate zu bilden. Die gebildeten cavities waren kleiner und in geringerer Anzahl vorhanden. Der zweite Ansatz (SB431542 - Pz) unterschied sich dagegen nicht signifikant von der Kontrolle. An Tag 13 dagegen waren die Aggregate der Primärzellen beider Ansätze (SB431542 - Mz/Pz und - Pz) weniger kompakt als die Kontrollgruppe. Die cavities von Ansatz 2 (SB431542 - Pz) erschienen durchsichtiger und geringfügig größer als bei Ansatz 1 (SB431542 - Mz/Pz), wobei die Lichtverhältnisse hier keine eindeutige Aussage zuließen. Auffallend war die Einlagerung von Phenolrot aus dem Kulturmedium in einigen cavities bei Ansatz 2 (SB431542 - Pz).



**Abb. 76: SB431542 - Regeneration von Primärzellen.**

Die Regeneration von Primärzellen unter Einfluss von SB431542 wurde in zwei verschiedenen Ansätzen untersucht. Im ersten Ansatz wurden axenisch kultivierte Metazestoden (Isolat H95) zunächst über 9 Tage mit 10 µM SB431542 inkubiert, wobei der Inhibitor und das Medium in diesem Zeitraum 2 Mal erneuert wurden. Die anschließend isolierten Primärzellen wurden weitere 14 Tage unter axenischen Bedingungen mit 10 µM SB431542 kultiviert, wobei ein Mediumwechsel und eine erneute Zugabe des Inhibitors alle 3 Tage durchgeführt wurden (SB431542 - Mz/Pz). In einem zweiten Ansatz wurden die Metazestoden ohne Inhibitor kultiviert und erst während der 14 tägigen axenischen Kultivierung nach der Primärzellisolation 10 µM SB431542 zugegeben (SB431542 - Pz). Die Kontrollgruppe wurde unter den gleichen Bedingungen mit dem entsprechenden Volumen DMSO kultiviert. Nach einer Karnovsky-Fixierung der sich regenerierenden Primärzellen an Tag 14 wurden semi thin Schnitte angefertigt. Die lichtmikroskopische Dokumentation morphologischer Unterschiede erfolgte am 6. und 13. Tag nach der Primärzellisolation mit einer 2,5x Vergrößerung. Die Dokumentation der Morphologie anhand der semi-thin Schnitte erfolgte mit einer 40x Vergrößerung. Die Daten beruhen auf einem einzelnen Versuch.

Eine detaillierte Untersuchung der semi-thin Schnitte zeigte neben dem vermehrten Auftreten von Kalziumkörperchen bei Ansatz 1 (SB431542 - Mz/Pz) auch den geringeren

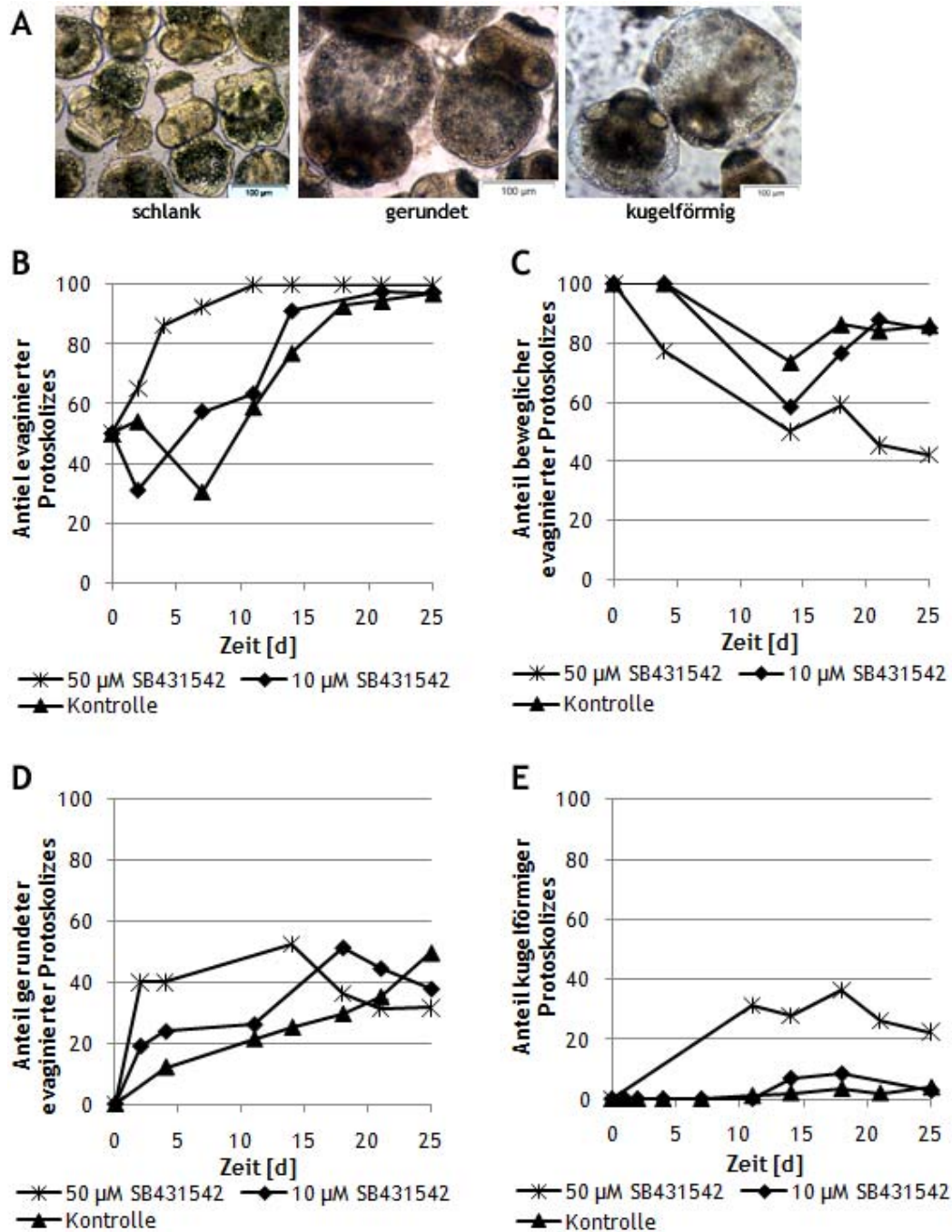
Durchmesser der cavities bei Ansatz 1 im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Zellstrukturen in und um die cavities waren dagegen bei Ansatz 1 (SB431542 - Mz/Pz) und der Kontrolle vergleichbar. So fanden sich in beiden Primärzellkulturen Zellen im Inneren der deutlich abgegrenzten cavities und auch cavities ohne innenliegende Zellen. In der Primärzellkultur von Ansatz 2 (SB431542 - Pz) befand sich, im Vergleich mit der Kontrollgruppe, eine vergleichbare Anzahl von Kalziumkörperchen. Der Durchmesser der angeschnittenen cavities war ebenso wie bei Ansatz 1 (SB431542 - Mz/Pz) kleiner als bei der Kontrolle. Zusätzlich konnten bei Ansatz 2 (SB431542 - Pz) keine cavities mit innenliegenden Zellen dokumentiert werden sondern ausschließlich „leere“ Hohlräume. Damit wurde gezeigt, dass SB431542 einen Einfluss auf regenerierende Primärzellaggregate hat. Es konnten sowohl Unterschiede in der Dichte der Aggregate als auch bei der Größe der gebildeten cavities festgestellt werden. Folglich beeinflusst die Inhibierung der BMP / TGF- $\beta$  Signalwege die Regeneration von *E. multilocularis* Primärzellkulturen.

#### 4.20.6.SB431542 - Protoskolizes

Aufgrund der Effekte von SB431542 auf die Differenzierung von Metazestoden (vgl. 4.20.4) wurden auch Protoskolizes zusammen mit diesem Inhibitor inkubiert und dessen Auswirkungen auf dieses Stadium von *E. multilocularis* dokumentiert. Dazu wurden zunächst Protoskolizes (Isolat G8065) wie in Kapitel 6.17.4 beschrieben isoliert und aktiviert. Diese Protoskolizes wurden daraufhin über 25 Tage im axenischen Kultursystem mit verschiedenen Konzentrationen SB431542 inkubiert. Dabei wurde der Inhibitor im Zuge eines Mediumwechsels an Tag 8 erneuert. Die Kontrollgruppe wurde unter den gleichen Bedingungen mit dem entsprechenden Volumen DMSO kultiviert.

In Abb. 77 A ist der Ablauf der Redifferenzierung von Protoskolizes zu Metazestoden in der *in vitro* Kultivierung dargestellt. So blähten sich die anfangs schlanken und agilen Protoskolizes zunächst zu gerundeten Protoskolizes auf. Im weiteren Verlauf der Redifferenzierung erschienen die Protoskolizes kugelförmig, wobei die Saugnäpfe und der Hakenkranz im gesamten untersuchten Zeitraum eindeutig zu erkennen waren. Abb. 77 zeigt weiterhin in Diagrammen den prozentualen Anteil evaginierter Protoskolizes (B), beweglicher Protoskolizes (C), gerundeter Protoskolizes (D) und kugelförmiger Protoskolizes (E) unter Einfluss von 50  $\mu$ M und 10  $\mu$ M SB431542. Es wurde festgestellt, dass der Anteil evaginierter Protoskolizes beim Ansatz mit 50  $\mu$ M SB431542 innerhalb der ersten vierzehn Tage im Vergleich mit der Kontrollgruppe deutlich erhöht war. 10  $\mu$ M SB431542 zeigten dagegen keine signifikanten Auswirkungen auf die Evagination der Protoskolizes (vgl. Abb. 77 B). Im gleichen Zeitraum nahm die Anzahl beweglicher Protoskolizes eindeutig ab, beim Ansatz mit 50  $\mu$ M SB431542 sogar um über 50% bis Tag

25. Im Ansatz mit 10  $\mu\text{M}$  SB431542 waren dagegen wie in der Kontrollgruppe an Tag 25 über 80% der Protoskolizes beweglich (vgl. Abb. 77 C).



**Abb. 77: SB431542 - morphologische Änderungen von *in vitro* kultivierten Protoskolizes.** Aktivierte Protoskolizes (G8065) wurden über 25 Tage unter Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  SB431542 axenisch kultiviert. Die Kontrollgruppe wurde unter den gleichen Bedingungen mit dem entsprechenden Volumen DMSO inkubiert. Die Daten beruhen auf einem einzelnen Versuch. A: Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Redifferenzierung *in vitro* kultivierter Protoskolizes, wobei sich die Morphologie im Laufe der Zeit von einer schlanken Form (links) über gerundete Protoskolizes (Mitte) bis hin zur kugelförmigen Form (rechts), die bereits stark an Metazestoden erinnert, veränderte. Die Dokumentation erfolgte bei einer 10x Vergrößerung. B: Dargestellt ist der Anteil evaginierter Protoskolizes. C: Dargestellt ist der Anteil beweglicher evaginierter Protoskolizes. D: Dargestellt ist der Anteil gerundeter evaginierter Protoskolizes. E: Dargestellt ist der Anteil kugelförmiger evaginierter Protoskolizes.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass innerhalb der ersten zwei Wochen durch die Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  SB431542 der Anteil gerundeter Protoskolizes auf bis zu 50% anstieg, während im Ansatz mit 10  $\mu\text{M}$  SB431542 keine 40% und in der Kontrollgruppe weniger als 25% erreicht wurden (vgl. Abb. 77 D). Der Anteil kugelförmiger Protoskolizes betrug an Tag 11 im Ansatz mit 50  $\mu\text{M}$  SB431542 31% und bis zum Ende des Untersuchungszeitraums 22 bis 36%. Im Ansatz mit 10  $\mu\text{M}$  SB431542 sowie in der Kontrollgruppe blieb der Anteil kugelförmiger Protoskolizes dagegen unter 10% (vgl. Abb. 77 E).

Kombiniert man diese Resultate, so erkennt man die vorzeitige Redifferenzierung der Protoskolizes über die gerundete und kugelförmige Form durch Inhibierung des BMP / TGF- $\beta$  Signaling bei gleichzeitiger Abnahme der Motilität.

#### **4.21. Dorsomorphin - ein Inhibitor der BMP Typ I Rezeptor Familie**

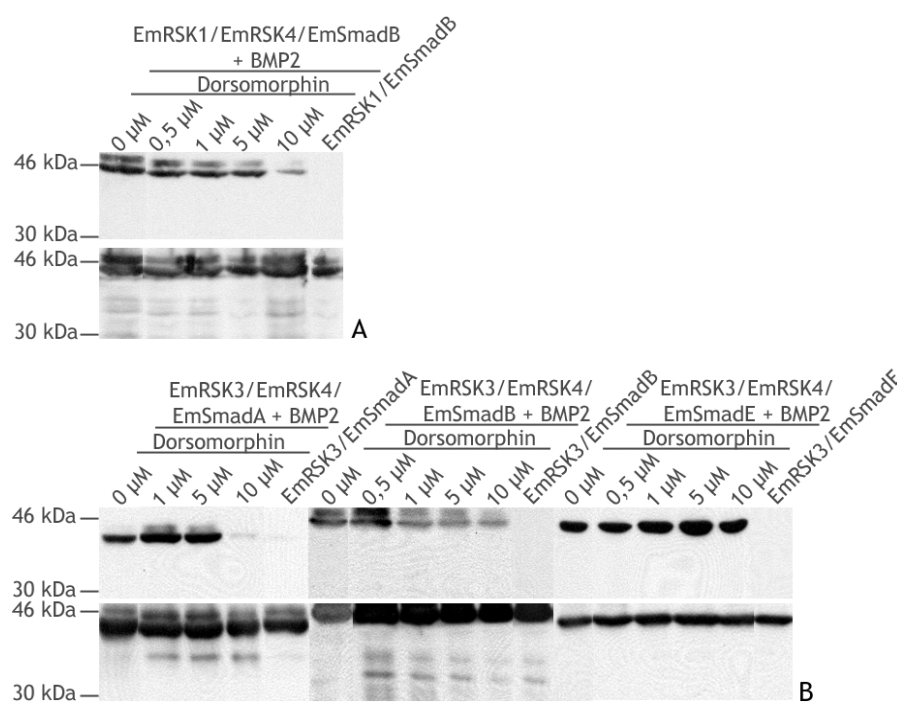
Dorsomorphin ist ein spezifischer Inhibitor der BMP Typ I Rezeptor Familie, der bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die Aktivierung der humanen Rezeptoren Alk-2, Alk-3 und Alk-6 verhindert, während Alk-4, Alk-5 und Alk-7 bei gleicher Konzentration nicht inhibiert werden. Damit scheint Dorsomorphin zur gezielten Erforschung von BMP Signalwegen geeignet, wobei das genaue Ziel der Rezeptor - Inhibierung durch Dorsomorphin noch unklar ist. Erste Daten weisen darauf hin, dass Dorsomorphin im humanen System downstream vom BMP2 angreift und die Kinase Aktivität der Typ I Rezeptoren inhibiert. Zusätzlich wird Dorsomorphin als vielversprechende Basis zur Erforschung neuer Therapien bei Anämien im Rahmen chronischer Erkrankungen angesehen. Allerdings ist Dorsomorphin strukturell identisch zu compound C, einem Antagonisten der AMP-activated kinase (AMPK), und hat strukturelle Ähnlichkeiten mit verschiedenen Inhibitoren der Rezeptor Tyrosin Kinase KDR. Beim Einsatz höherer Konzentrationen von Dorsomorphin kann es daher zur Beeinträchtigung der Funktion von AMPK, KDR und anderer Serin / Threonin oder Tyrosin Kinasen kommen<sup>276-277</sup>.

##### **4.21.1. Dorsomorphin - Inhibierung der Echinokokken Rezeptoren**

Um zunächst die Effekte von Dorsomorphin auf die Echinokokken BMP Typ I Rezeptoren zu bestimmen, wurden EmRSK1, EmRSK3 und EmRSK4 zusammen mit den entsprechenden Echinokokken Smads heterolog in HEK 293T Zellen exprimiert. Anschließend wurde Dorsomorphin in Konzentrationen von 0,5 bis 10  $\mu\text{M}$  zugegeben und die Phosphorylierung der Echinokokken Smads nach Stimulation der Signalwege mit 20 nM humanem BMP2 durch eine Immundetektion dokumentiert (vgl. 6.16.5). Den jeweiligen Kontrollansätzen wurde kein Inhibitor zugesetzt. Um einen Einfluss des Inhibitors auf die heterologe Expression in den HEK 293T Zellen auszuschließen, wurde

zusätzlich mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen den fusionierten Myc-Tag gerichtet war, die gleichmäßige Expression der Echinokokken Smads nachgewiesen. Höhere Konzentrationen Dorsomorphin konnten wegen der zytotoxischen Effekte des Lösungsmittels DMSO auf HEK 293T Zellen in diesem System nicht getestet werden.

Es zeigte sich, dass die Signalweiterleitung über das Rezeptorpaar EmRSK1/EmRSK4 und EmSmadB durch 10  $\mu\text{M}$  Dorsomorphin stark eingeschränkt, aber nicht vollständig inhibiert wird (vgl. Abb. 78 A). Bei EmRSK3 / EmRSK4 ist ein ähnlicher Effekt zu erkennen. So wird zwar die Aktivierung von EmSmadA durch 10  $\mu\text{M}$  Dorsomorphin weitgehend verhindert, aber auch hier konnte mit einem schwachen Signal auch weiterhin phosphorylierter EmSmadA nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu wurde die Signalweiterleitung über EmRSK3 / EmRSK4 und EmSmadB bzw. EmSmadE durch Dorsomorphin nicht beeinflusst (vgl. Abb. 78 B).



**Abb. 78: Dorsomorphin - Inhibierung von EmRSK1 und EmRSK3.**

Gezeigt ist das Phosphorylierungsmuster von EmSmadA, B und E durch die Echinokokken BMP Typ I Rezeptoren EmRSK1 (A) und EmRSK3 (B) in Kombination mit dem Echinokokken BMP / TGF- $\beta$  Typ II Rezeptor EmRSK4 bei heterologer Expression in HEK 293T und unter Anwesenheit von 0,5 - 10  $\mu\text{M}$  Dorsomorphin, wobei dem Kontrollansatz jeweils kein Inhibitor zugesetzt wurde (0  $\mu\text{M}$  Dorsomorphin). Die Signalweiterleitung wurde durch die Zugabe von 20 nM humanem BMP2 stimuliert. Als weitere Kontrolle wurden die verwendeten Rezeptoren unter den gleichen Bedingungen auch einzeln mit den entsprechenden Smads in HEK 293T Zellen exprimiert und die Phosphorylierung der Smads detektiert (Daten nur z. T. gezeigt). Die Proteine wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Aktivierter EmSmadB und EmSmadE wurde jeweils mit anti-Phospho-Smad1 (Ser463/465) / Smad5 (Ser463/465) / Smad8 (Ser426/428) von Cell Signaling (A und B) nachgewiesen, aktivierter EmSmadA dagegen mit anti-Phospho-Smad3 (Ser423/425) / Smad1 (Ser463/465) von Cell Signaling (B). Zur Kontrolle der Expression wurden alle rekombinant exprimierten Smads zusätzlich mit anti-cMyc von NEB detektiert.

Somit konnte festgestellt werden, dass 10  $\mu\text{M}$  Dorsomorphin die Aktivität der beiden Echinokokken Typ I Rezeptoren EmRSK1 und EmRSK3 deutlich verringert, wobei sich dieser Effekt bei EmRSK3 auf die Phosphorylierung von EmSmadA beschränkt. Die weitgehende Inhibierung der Signalweiterleitung über EmRSK1 / EmRSK4 und EmSmadB und der geringe Einfluss von Dorsomorphin auf die Aktivierung von EmSmadB durch EmRSK3 / EmRSK4 lassen vermuten, dass EmSmadB eine höhere Affinität zu EmRSK3 hat als zu EmRSK1. Dementsprechend scheint die Höhe der Affinität von EmRSK3 zu EmSmadB vergleichbar mit derjenigen zu EmSmadE zu sein, während die Affinität zu EmSmadA deutlich niedriger liegt. Eine weitere Erklärung für diese Ergebnisse wäre in einer höheren Affinität von Dorsomorphin für EmRSK1 im Vergleich zu EmRSK3 zu finden.

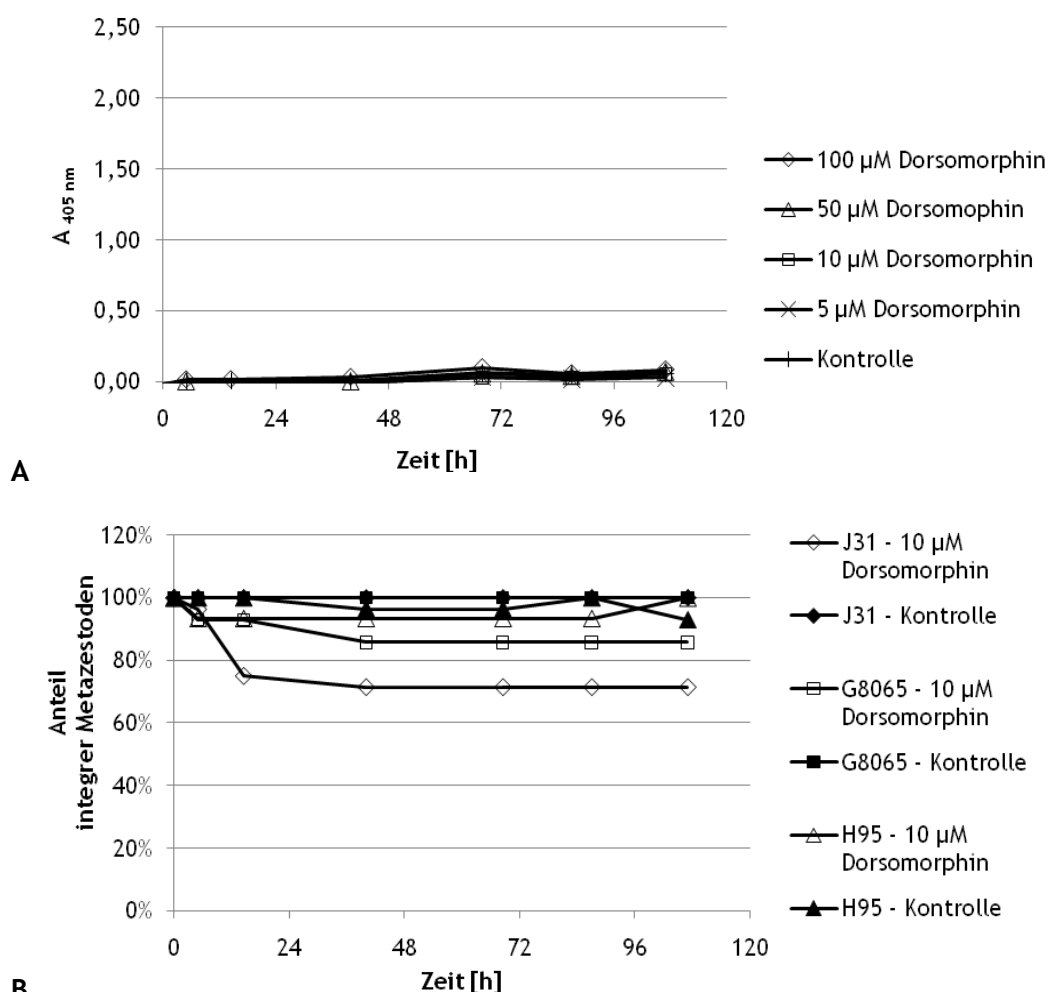
Dorsomorphin ist dementsprechend besonders zur Untersuchung des EmRSK1 / EmRSK4 Signalweges sowie des EmRSK3 / EmRSK4 Signaling über EmSmadA geeignet, wobei die Beeinflussung der Signalwege EmRSK3 / EmRSK4 / EmSmadB und EmRSK3 / EmRSK4 / EmSmadE bei höheren Konzentrationen von Dorsomorphin nicht ausgeschlossen werden kann.

#### 4.21.2. Dorsomorphin - Schädigung von Metazestoden

Als Ausgangspunkt zur Untersuchung der Effekte von Dorsomorphin auf *E. multilocularis* wurde zunächst die Schädigung von Metazestoden durch diesen Inhibitor untersucht. Dazu wurden axenisch kultivierte Metazestoden (Isolat J31) über vier Tage mit verschiedenen Konzentrationen Dorsomorphin inkubiert und die Aktivität freigesetzter Alkalischer Phosphatase aus *E. multilocularis* gemessen (vgl. 6.17.9)<sup>275</sup>. In einem Kontrollansatz wurden die Metazestoden ohne Inhibitor unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert.

Wie in Abb. 79 A zu sehen ist, konnten bei der Aktivität der freigesetzten Alkalischen Phosphatase keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen festgestellt werden. Die Messwerte lagen bei allen Isolaten unter 0,2 und damit im nicht signifikanten Bereich. Bei der Untersuchung zur Integrität der Metazestoden unter Einfluss von 10  $\mu\text{M}$  Dorsomorphin wurden dagegen leichte Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten festgestellt (vgl. Abb. 79 B). So fiel der Anteil integrier J31 - Metazestoden bis auf 71% ab, während dieser Wert bei G8065 um maximal 14% auf 86% integrier Metazestoden fiel. Bei Isolat H95 fiel der Anteil integrier Metazestoden dagegen um weniger als 10% und war damit vergleichbar mit dem H95 - Kontrollansatz. Bei höheren Konzentrationen von Dorsomorphin verstärkten sich diese Effekte, wobei hier eine Kreuzinteraktion mit verschiedenen anderen Zielproteinen nicht ausgeschlossen werden konnte (vgl. 4.21; Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es zwischen den verwendeten Isolaten von *E. multilocularis* Unterschiede im BMP Signaling gibt, die zu unterschiedlich ausgeprägten Effekten von Dorsomorphin auf die Integrität von Metazestoden führen. Dennoch belegen die Daten des Alkalische Phosphatase Assay, dass Dorsomorphin in Konzentrationen unter 100  $\mu\text{M}$  keine zytotoxische Wirkung auf *E. multilocularis* Metazestoden hat.



**Abb. 79: Dorsomorphin - Schädigung von Metazestoden.**

Die Schädigung axenisch kultivierter Metazestoden (Isolat J31, G8065 und H95) durch Dorsomorphin wurde über einen Zeitraum von 4 Tagen mit Konzentrationen von 5 bis 100  $\mu\text{M}$  zum Einen anhand der Menge bzw. Aktivität freigesetzter Alkalischer Phosphatase von *E. multilocularis* (A) getestet, zum Anderen wurde in regelmäßigen Abständen die Integrität der Metazestoden überprüft (B). Die Kontrollgruppen wurden jeweils unter Zugabe des entsprechenden Volumens DMSO kultiviert. A: Alkalische Phosphatase Assay. Die Aktivität freigesetzter Alkalischer Phosphatase wurde durch Zugabe des Substrats *p*-Nitrophenylphosphat zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Absorptionsmessung bei 405 nm ( $A_{405\text{ nm}}$ ) gemessen. Die Messwerte wurden auf Basis des verwendeten Kulturmediums normalisiert und als Mittelwert der Isolate angegeben. Messwerte unter einem Wert von 0,2 wurden als nicht signifikant gewertet. B: Vergleichende Darstellung der Anteile integrier Metazestoden bei verschiedenen Isolaten bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Dorsomorphin über einen Zeitraum von 4 Tagen. Die Integrität der Metazestoden wurde einmal täglich mikroskopisch bestimmt, wobei zusammengefallene Metazestoden als nicht integer gewertet wurden. Die Daten beruhen auf einem einzelnen Versuch.



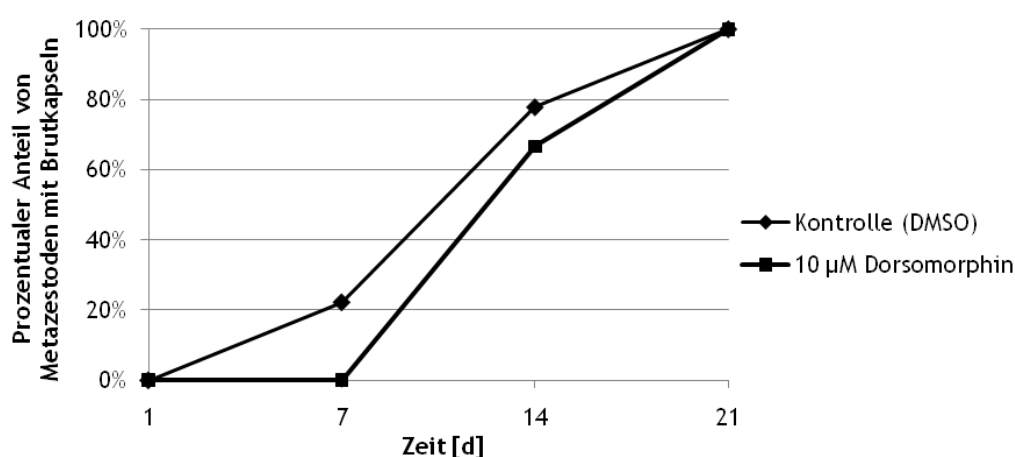
#### 4.21.3. Dorsomorphin - Differenzierung von Metazestoden

Als Inhibitor von BMP Signalwegen wurden die Effekte von Dorsomorphin auf die Differenzierung von Metazestoden untersucht. Dazu wurden Metazestoden (Isolat GH09) in Ko-Kultur über einen Zeitraum von drei Wochen unter Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Dorsomorphin kultiviert. Die Kontrollgruppe wurde mit dem entsprechenden Volumen DMSO unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Einmal wöchentlich wurden die Integrität, das Wachstum und die Differenzierung der Metazestoden dokumentiert.

Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen dem Dorsomorphin - Ansatz und der Kontrollgruppe bezüglich des Wachstums oder der Integrität der Vesikel (Daten nicht gezeigt). So erreichten die Metazestoden nach 21 Tagen in beiden Ansätzen einen Durchmesser von 0,4 bis 0,5 cm. Die Integrität der Metazestoden blieb bei beiden Ansätzen über den gesamten Untersuchungszeitraum bei 100%.

Abb. 80 zeigt die Effekte von Dorsomorphin auf die Differenzierung der Metazestoden. So hatten an Tag 7 bereits 22% der Metazestoden in der Kontrollgruppe Brutkapseln ausgebildet, während im Ansatz mit 10  $\mu\text{M}$  Dorsomorphin noch keine Differenzierung festgestellt werden konnte. Nach vierzehn Tagen zeigten sich in der Kontrollgruppe bei 78% der Metazestoden Brutkapseln, im Ansatz mit Dorsomorphin 68%. Nach drei Wochen hatten in beiden Ansätzen alle Metazestoden Brutkapseln ausgebildet.

Die Inhibierung des BMP Signaling in *E. multilocularis* Metazestoden hat folglich eine verzögernde Wirkung auf die Ausbildung von Brutkapseln. Dieser Effekt wurde allerdings bereits nach drei Wochen vollständig aufgehoben.



**Abb. 80: Dorsomorphin - Auswirkungen auf die Differenzierung von Metazestoden.**

Gezeigt sind Metazestoden ohne Brutkapseln (Isolat GH09), die unter Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Dorsomorphin über einen Zeitraum von 21 Tagen in Ko-Kultur mit Reuber Hepatoma Zellen kultiviert wurden. Die Metazestoden der Kontrollgruppe wurden mit dem entsprechenden Volumen DMSO kultiviert. Die Integrität, das Wachstum und die Differenzierung der Metazestoden wurden im Zuge des Mediumwechsels und der erneuten Zugabe von Dorsomorphin einmal wöchentlich dokumentiert, wobei hier ausschließlich die Auswirkungen auf die Differenzierung dargestellt sind. Der Versuch konnte aufgrund eines Mangels an Metazestoden des Isolats GH09, die noch keine Brutkapseln gebildet hatten, nur einmal durchgeführt werden.



Diese Ergebnisse können auf Basis der Resultate aus Kapitel 4.21.1 mit einer Adaptation von *E. multilocularis* an die veränderten Umweltbedingungen erklärt werden. So werden die BMP Signalwege über EmRSK1/EmRSK4/EmSmadB und EmRSK3/EmRSK4/EmSmadA durch 10  $\mu\text{M}$  Dorsomorphin nicht vollständig inhibiert. Folglich könnten die Effekte von Dorsomorphin auf das BMP Signaling durch die vermehrte Expression von EmRSK1 bzw. EmRSK3 umgangen werden, was einer Adaptation von *E. multilocularis* an eine verminderte Aktivität dieser beiden Rezeptoren entsprechen würde.

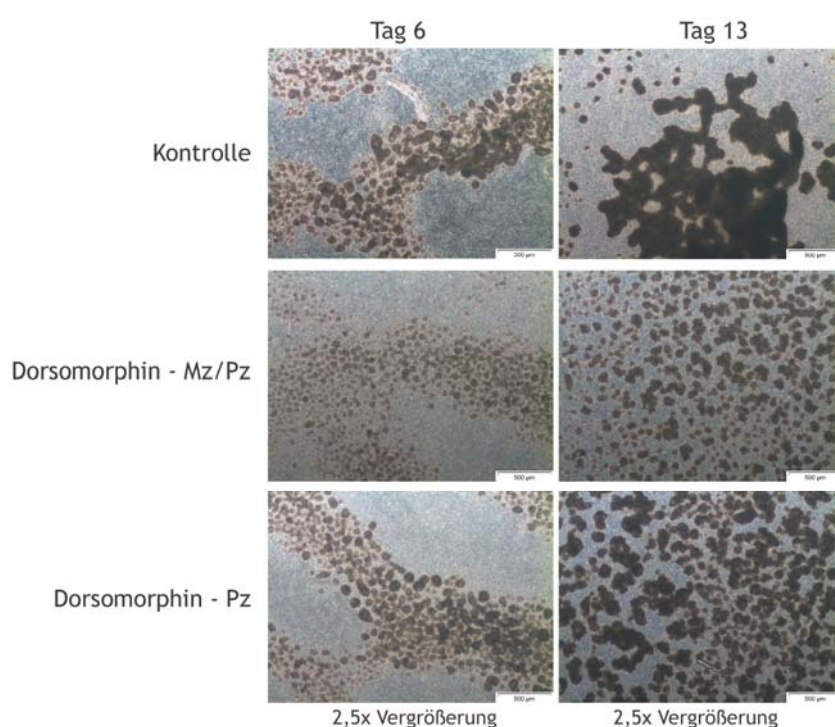
#### 4.21.4. Dorsomorphin - Regeneration von Primärzellen

Differenzierungsvorgänge sind, ebenso wie bei der Ausbildung von Brutkapseln durch Metazestoden, auch bei der Regeneration von Primärzellkulturen zu beobachten. Um die Effekte von Dorsomorphin auf die Regeneration von Primärzellen zu untersuchen, wurden zunächst axenisch kultivierte Metazestoden (Isolat H95) in zwei verschiedenen Ansätzen mit 10  $\mu\text{M}$  Dorsomorphin (Ansatz 1) bzw. ohne Inhibitor (Ansatz 2) inkubiert. Der Inhibitor wurde dabei zweimal im Rahmen der Mediumwechsel erneuert. Nach neun Tagen wurden die Zellen der Metazestoden isoliert und beide Ansätze als Primärzellkultur weitere 14 Tage mit 10  $\mu\text{M}$  Dorsomorphin axenisch kultiviert. Der Inhibitor wurde zusammen mit dem Medium dreimal wöchentlich erneuert. Die Kontrollgruppen wurden unter den gleichen Bedingungen mit dem entsprechenden Volumen DMSO kultiviert (vgl. 6.17.8).

Abb. 81 zeigt die morphologischen Veränderungen der Primärzellkulturen an Tag 6 sowie an Tag 13 nach der Primärzellisolierung bei einer 2,5-fachen Vergrößerung im Lichtmikroskop. Dabei ist eindeutig zu erkennen, dass Dorsomorphin in beiden Ansätzen starke Auswirkungen auf die Regeneration der Primärzellkulturen hatte. So waren bei Ansatz 1 (Dorsomorphin - Mz/Pz) an Tag 6 keine ausgeprägten Zellaggregate und damit auch keine cavities zu erkennen. In Ansatz 2 (Dorsomorphin - Pz) lagen deutlich mehr Zellen als Aggregate vor und es konnten auch cavities innerhalb dieser Aggregate dokumentiert werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe schienen die Zellaggregate allerdings kleiner zu sein und auch die Anzahl und Größe der cavities war geringer. An Tag 13 zeigten sich die Effekte von Dorsomorphin besonders deutlich: hier waren die Zellaggregate in der Kontrollgruppe zu einem zusammenhängenden Teppich verschmolzen, während bei Ansatz 1 (Dorsomorphin - Mz/Pz) auch weiterhin nur sehr kleine und vereinzelt Aggregate zu erkennen waren. Bei Ansatz 2 (Dorsomorphin - Pz) waren die Zellaggregate zwar größer als bei Ansatz 1 (Dorsomorphin - Mz/Pz), im Vergleich mit der Kontrollgruppe allerdings ebenfalls auffällig vereinzelt. In allen Ansätzen waren zu diesem Zeitpunkt cavities zu erkennen, wobei ihre Größe bei Ansatz 1 (Dorsomorphin - Mz/Pz) am geringsten und in der Kontrollgruppe am größten war.

Aufgrund der geringen Regeneration der Primärzellkulturen in den beiden Dorsomorphin - Ansätzen konnte die geplante Fixierung der Zellen nach Karnovsky nicht durchgeführt werden.

Diese Resultate zeigen eindeutig, dass Dorsomorphin die Regeneration von *E. multilocularis* Primärzellen verhindern kann. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich Dorsomorphin in diesem Versuchsaufbau während der Primärzellkultur im Kulturmedium anreicherte und damit auch weitere Proteine von *E. multilocularis*, wie AMPK und KDR Homologe, inhibiert wurden (vgl. 4.21). Somit können durch diese Untersuchungen keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Funktion des BMP Signaling bei der Regeneration von Primärzellkulturen gezogen werden.



**Abb. 81: Dorsomorphin - Regeneration von Primärzellen.**

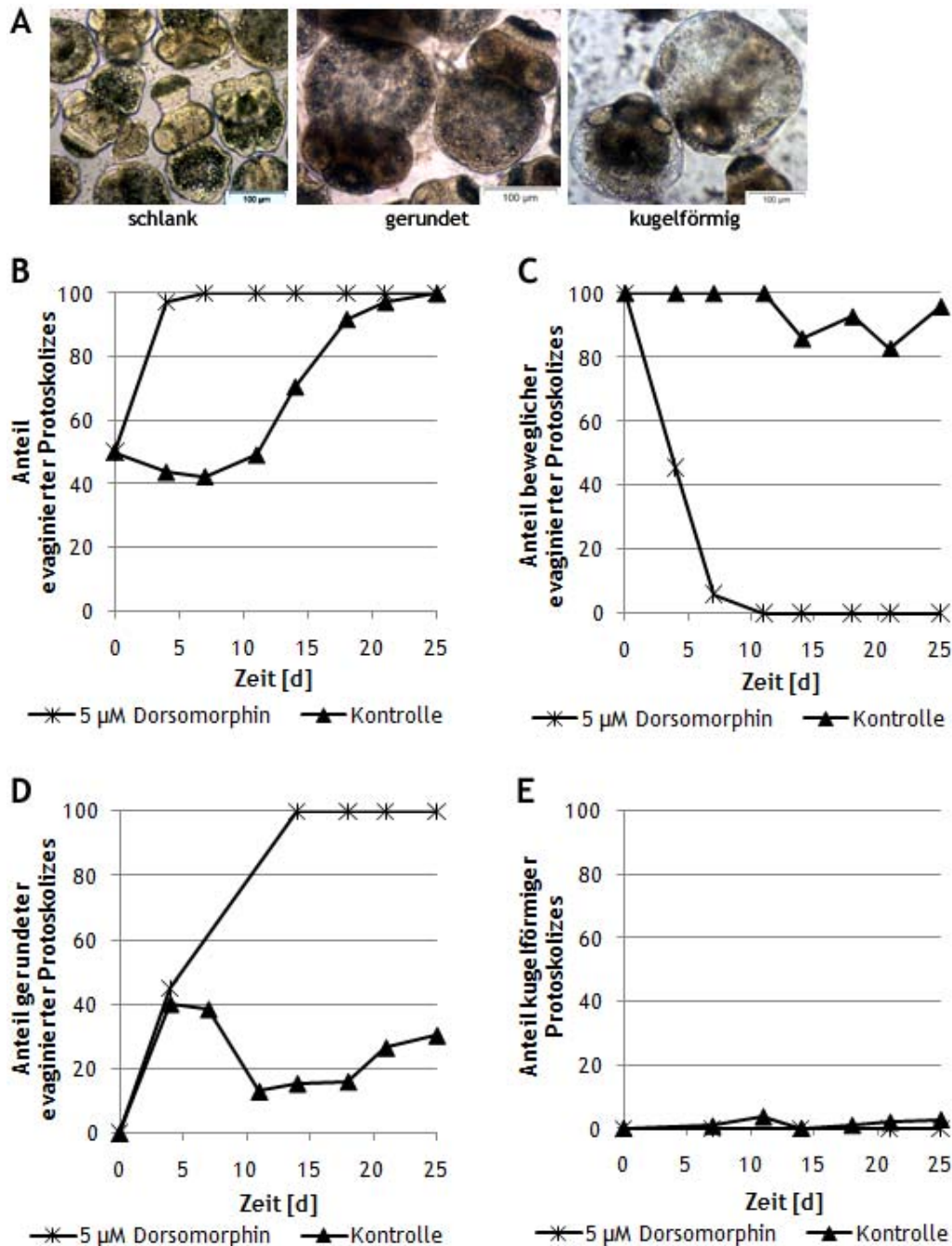
Die Regeneration von Primärzellen unter Einfluss von Dorsomorphin wurde in zwei verschiedenen Ansätzen untersucht. Im ersten Ansatz (Dorsomorphin - Mz/Pz) wurden axenisch kultivierte Metazestoden (Isolat H95) zunächst über 9 Tage mit 10 µM Dorsomorphin inkubiert, wobei der Inhibitor und das Medium in diesem Zeitraum 2 Mal erneuert wurden. Die anschließend isolierten Primärzellen wurden weitere 14 Tage unter axenischen Bedingungen mit 10 µM Dorsomorphin kultiviert, wobei ein Mediumwechsel und eine erneute Zugabe des Inhibitors alle 3 Tage durchgeführt wurde. In einem zweiten Ansatz (Dorsomorphin - Pz) wurden die Metazestoden ohne Inhibitor kultiviert und erst während der 14tägigen axenischen Kultivierung nach der Primärzellisolation 10 µM Dorsomorphin zugegeben. Die Kontrollgruppe wurde unter den gleichen Bedingungen mit der entsprechenden Menge DMSO kultiviert. Die Dokumentation der Primärzell-Phänotypen erfolgte am 6. und 13. Tag nach der Primärzellisolation bei einer Vergrößerung von 2,5x im Lichtmikroskop. Die Daten beruhen auf einem einzelnen Versuch.

#### 4.21.5. Dorsomorphin - Protoskolizes

Neben den Effekten auf Differenzierungsvorgänge in Metazestoden (vgl. 4.21.3) und Primärzellkulturen (vgl. 4.21.4) wurden die Auswirkungen von Dorsomorphin auf *E. multilocularis* auch bei Protoskolizes untersucht. Dazu wurden zunächst Protoskolizes

des Isolats G8065 aus einem infizierten Labortier (*M. unguiculatus*) isoliert und aktiviert (vgl. 6.17.4). Anschließend wurden diese Protoskolizes über einen Zeitraum von 25 Tagen mit verschiedenen Konzentrationen Dorsomorphin axenisch kultiviert. Dabei wurden an Tag 8 das Medium und der Inhibitor erneuert. Die Kontrollgruppe wurde unter den gleichen Bedingungen mit dem entsprechenden Volumen DMSO kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden der Status der Aktivierung (Anteil evaginierter Protoskolizes), die Motilität und die morphologischen Veränderungen dokumentiert.

Der typische Ablauf der Redifferenzierung von Protoskolizes in der *in vitro* Kultivierung ist in Abb. 82 A dargestellt. Die anfänglich schlanken und agilen Protoskolizes blähten sich dementsprechend zunächst zu gerundeten Protoskolizes auf um dann die kugelförmige Form anzunehmen. Innerhalb des hier untersuchten Zeitraums waren die Saugnäpfe und der Hakenkranz auch bei kugelförmigen Protoskolizes deutlich erkennbar und wurden nicht abgebaut. Abb. 82 zeigt weiterhin in Diagrammen den prozentualen Anteil evaginierter Protoskolizes (B), beweglicher Protoskolizes (C), gerundeter Protoskolizes (D) und kugelförmiger Protoskolizes (E) bei einer Inkubation mit 5  $\mu$ M Dorsomorphin. Es wurde festgestellt, dass Dorsomorphin den Anteil evaginierter Protoskolizes bereits innerhalb der ersten Woche auf 100% ansteigen ließ. In der Kontrollgruppe wurde dieser hohe Wert dagegen erst an Tag 25 erreicht (vgl. Abb. 82 B). Entsprechend der Zunahme an evaginierten Protoskolizes nahm die Motilität unter Einfluss von Dorsomorphin ab. So konnte schon ab Tag 11 keine Bewegung mehr bei evaginierten Protoskolizes festgestellt werden. In der Kontrollgruppe verringerte sich der Anteil beweglicher Protoskolizes dagegen nach Tag 11 von 100% nur um durchschnittlich 20%, mit einem Minimalwert von 82% beweglicher evaginierter Protoskolizes an Tag 21 (vgl. Abb. 82 C). Eindeutig waren vor allem die Effekte von Dorsomorphin auf den Anteil gerundeter evaginierter Protoskolizes (vgl. Abb. 82 D). So stieg deren Anteil beim Ansatz mit Dorsomorphin innerhalb der ersten zwei Wochen auf 100% und blieb während des restlichen Untersuchungszeitraums bei diesem Wert. In der Kontrollgruppe konnte mit einem Anteil von 40% an Tag 4 zunächst ein ähnlicher Anstieg dokumentiert werden. Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurden hier allerdings nur Werte zwischen 13% und 30% dokumentiert. Auffällig ist zudem der Stopp der Redifferenzierung von Protoskolizes im gerundeten Stadium unter Einfluss von Dorsomorphin. So sind zwar ab Tag 14 100% der Protoskolizes gerundet, aber es konnten wie in der Kontrollgruppe bis Ablauf des Versuchszeitraums keine kugelförmigen Protoskolizes dokumentiert werden (vgl. Abb. 82 E).



**Abb. 82: Dorsomorphin - morphologische Änderungen von *in vitro* kultivierten Protoskolizes.** Aktivierte Protoskolizes (G8065) wurden über 25 Tage unter Zugabe von 5 µM Dorsomorphin axenisch kultiviert. Die Kontrollgruppe wurde unter den gleichen Bedingungen mit dem entsprechenden Volumen DMSO inkubiert. Die Daten beruhen auf einem einzelnen Versuch. A: Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Redifferenzierung *in vitro* kultivierter Protoskolizes, wobei sich die Morphologie im Laufe der Zeit von einer schlanken Form (links) über gerundete Protoskolizes (Mitte) bis hin zur kugelförmigen Form (rechts), die bereits stark an Metazestoden erinnert, verändert. Die Dokumentation erfolgte bei einer 10x Vergrößerung. B: Dargestellt ist der Anteil evaginierter Protoskolizes. C: Dargestellt ist der Anteil beweglicher evaginierter Protoskolizes. D: Dargestellt ist der Anteil gerundeter evaginierter Protoskolizes. E: Dargestellt ist der Anteil kugelförmiger evaginierter Protoskolizes.

Es konnte damit gezeigt werden, dass Dorsomorphin bereits bei einer Konzentration von 5 µM Dorsomorphin eindeutige Effekte auf Protoskolizes hat. Eine Inhibierung sekundärer Zielproteine wie AMPK und KDR kann bei dieser niedrigen Konzentration

ausgeschlossen werden. Folglich führt die Beeinträchtigung der Signalwege EmRSK1/EmRSK4/EmSmadB und EmRSK3/EmRSK4/EmSmadA zu einer Aktivierung der Redifferenzierung bis zur gerundeten Form der Protoskolizes mit gleichzeitigem vollständigem Verlust der Motilität. Eine mögliche Erklärung für den Stopp der Redifferenzierung im gerundeten Protoskolex - Stadium kann in der unvollständigen Inhibierung des kompletten BMP / TGF- $\beta$  Signaling in *E. multilocularis* gefunden werden. So ist es denkbar, dass durch einen oder beide der oben genannten beeinträchtigten Signalwege der Beginn der Redifferenzierung von Protoskolizes begünstigt wird. Der Fortschritt der Redifferenzierung von der gerundeten zur kugelförmigen Form wird allerdings durch andere, durch Dorsomorphin nicht beeinträchtigte, Signalwege gesteuert.

#### **4.22.LY364947 - ein Inhibitor des TGF- $\beta$ Typ I Rezeptors Alk-5**

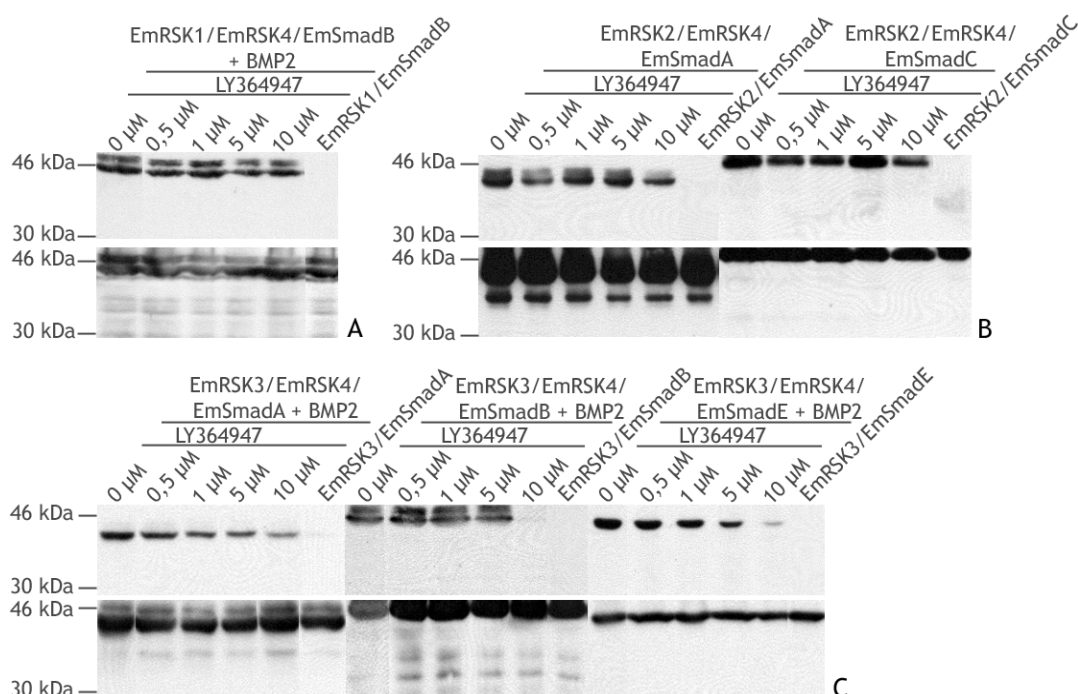
LY364947 ist ein spezifischer ATP - kompetitiver Inhibitor des humanen Typ I Rezeptors Alk-5 ( $IC_{50} = 50 - 60 \text{ nM}$ )<sup>278-279</sup>. Kristallstrukturanalysen zeigten zusätzlich, dass LY364947 den Rezeptor ähnlich wie FKBP12 in seiner inaktiven Konformation stabilisieren kann<sup>279</sup>. Damit wirkt LY364947 auf zwei verschiedene Arten inhibierend auf ALK-5 ein und inhibiert die Signalweiterleitung über Smad2 bei 2,5  $\mu\text{M}$  vollständig. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bereits 1  $\mu\text{M}$  LY364947 Effekte auf die Genregulation in einer humanen Zelllinie haben. Andere Signalwege wie z.B. der mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalweg, die ebenfalls durch TGF- $\beta$  aktiviert werden können, werden durch LY364947 bei Konzentrationen bis 10  $\mu\text{M}$  nicht signifikant beeinflusst<sup>280</sup>. Bei *S. mansoni* konnte gezeigt werden, dass dieser Inhibitor bei einer Konzentration von 300 nM die mitotische Aktivität und Eiproduktion weiblicher Adultwürmer verringert<sup>281</sup>.

##### **4.22.1.LY364947 - Inhibierung der Echinokokken Rezeptoren**

Zunächst wurde der Effekt von LY364947 auf die BMP / TGF- $\beta$  Typ I Rezeptoren aus *E. multilocularis* in einem *in vitro* Assay durch heterologe Expression der Echinokokken Rezeptoren EmRSK1, EmRSK2, EmRSK3 und EmRSK4 zusammen mit den entsprechenden Echinokokken Smads in HEK 293T Zellen untersucht. Dabei wurde LY364947 in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (vgl. 6.16.5). Das Signaling via EmRSK1/EmRSK4 und EmRSK3/EmRSK4 wurde durch die Zugabe von 20 nM humanem BMP2 stimuliert, während das Signaling via EmRSK2/EmRSK4 durch die konstitutive Aktivierung von EmRSK2 auch ohne einen zusätzlichen Stimulus aktiv war. Die Aktivierung der Signalwege wurde durch die Phosphorylierung der entsprechenden heterolog exprimierten Echinokokken Smads nachgewiesen. Zusätzlich wurde die gleichmäßige Expression dieser Smads mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen den

fusionierten Myc-Tag gerichtet war, nachgewiesen. Durch diese Kontrolle sollte ein Einfluss des Inhibitors auf die heterologe Expression in den HEK 293T Zellen ausgeschlossen werden.

Wie in Abb. 83 A und B zu erkennen ist, inhibierte LY364947 weder EmRSK1 noch EmRSK2. Dagegen konnte beim Signaling via EmRSK3/EmRSK4/EmSmadA entsprechend dem Anstieg der Inhibitor - Konzentration eine kontinuierliche Abnahme der Phosphorylierung von EmSmadA festgestellt werden, wobei allerdings auch bei der höchsten getesteten Inhibitor - Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) noch eine eindeutige Bande des phosphorylierten Smad zu erkennen war. Das gleiche Bild zeigte sich beim Signaling über EmRSK3/EmRSK4/EmSmadE. Die Aktivierung von EmSmadB wurde dagegen bei 10  $\mu\text{M}$  LY364947 vollständig inhibiert (Abb. 83 C).



**Abb. 83: LY364947 - Inhibierung von EmRSK1, EmRSK2, EmRSK3.**

Gezeigt ist das Phosphorylierungsmuster von EmSmadA, B, C und E durch die Echinokokken BMP / TGF- $\beta$  Typ I Rezeptoren EmRSK1 (A), EmRSK2 (B) und EmRSK3 (C) in Kombination mit dem Echinokokken BMP / TGF- $\beta$  Typ II Rezeptor EmRSK4 bei heterologer Expression in HEK 293T und unter Anwesenheit von 0,5 - 10  $\mu\text{M}$  LY364947, wobei dem Kontrollansatz jeweils kein Inhibitor zugesetzt wurde (0  $\mu\text{M}$  LY364947). EmRSK1 und EmRSK3 wurde im Gegensatz zum konstitutiv aktiven EmRSK2 durch die Zugabe von 20 nM humanem BMP2 aktiviert. Als weitere Kontrolle wurden die verwendeten Rezeptoren unter den gleichen Bedingungen auch einzeln mit den entsprechenden Smads in HEK 293T Zellen exprimiert und die Phosphorylierung der Smads detektiert (Daten nur z. T. gezeigt). Die Proteine wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Aktivierter EmSmadB und EmSmadE wurde jeweils mit anti-Phospho-Smad1 (Ser463/465) / Smad5 (Ser463/465) / Smad8 (Ser426/428) von Cell Signaling (A und C) nachgewiesen, aktivierter EmSmadA und EmSmadC dagegen mit anti-Phospho-Smad3 (Ser423/425) / Smad1 (Ser463/465) von Cell Signaling (B und C). Zur Kontrolle der Expression wurden alle rekombinant exprimierten Smads zusätzlich mit anti-cMyc von NEB detektiert.

Wie in Kapitel 4.22 bereits beschrieben, bindet LY364947 im aktiven Zentrum der Rezeptor - Kinasedomäne und wird damit zu einem ATP - kompetitiven Molekül.

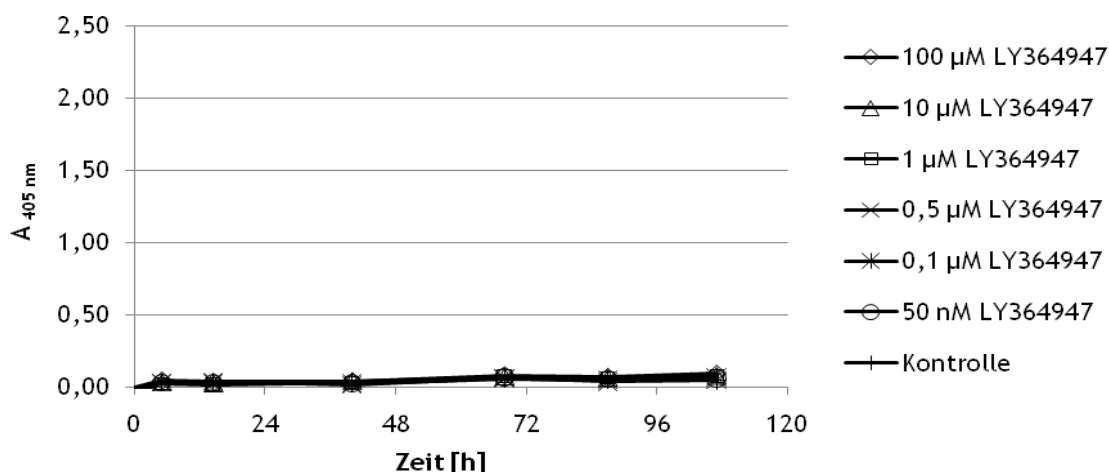
Gleichzeitig wird durch die Bindung von LY364947 die inaktive Konformation des Rezeptors stabilisiert. Entsprechend lassen sich verschiedene Erklärungen für diese Effekte von LY364947 auf die Echinokokken Typ I Rezeptoren finden. Zum Einen könnten strukturelle Unterschiede der ATP - Bindungsstelle von EmRSK1 und EmRSK2 zu EmRSK3 eine Bindung von LY364947 an die beiden erstgenannten Rezeptoren erschweren oder verhindern. Zum Anderen ist es möglich, dass diese beiden Rezeptoren durch LY364947 nicht in ihrer inaktiven Konformation stabilisiert werden können. Am wahrscheinlichsten erscheint eine Kombination beider Erklärungen. Überraschend sind weiterhin die Unterschiede bei der Aktivierung der verschiedenen Smads durch EmRSK3. So sind die Effekte von LY364947 auf die Phosphorylierung von EmSmadA vergleichbar mit denen bei EmSmadE, aber geringer als bei EmSmadB. Der gleichmäßige graduelle Abfall der Phosphorylierung bei EmSmadA und EmSmadE deuten auf die Verdrängung von ATP durch LY364947 aus dem aktiven Zentrum des Rezeptors EmRSK3 hin. Zusätzlich ist es möglich, dass ab 10  $\mu\text{M}$  LY364947 eine Konformationsänderung von EmRSK3 ausgelöst wird, die einerseits die Interaktion des Rezeptors mit EmSmadB verhindert und andererseits die Aktivierung von EmSmadA und EmSmadE nicht beeinflusst.

#### 4.22.2. LY364947 - Schädigung von Metazestoden

Eine mögliche zytotoxische Wirkung von LY364947 auf Metazestoden wurde durch ein Alkalische Phosphatase Assay untersucht. Dazu wurden axenisch kultivierte Metazestoden (Isolat J31, H95 und G8065) über einen Zeitraum von 4 Tagen mit 50 bis 100  $\mu\text{M}$  LY364947 inkubiert. Die Schädigung der Zellen wurde täglich auf Basis der Aktivität freigesetzter Alkalischer Phosphatase aus *E. multilocularis* gemessen (vgl. 6.17.9)<sup>275</sup>.

Dabei konnte auch bei der höchsten Konzentration LY364947 (100  $\mu\text{M}$ ) keine signifikante Schädigung der Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 84). Im Durchschnitt blieben alle Werte der Absorptionsmessung unter 0,1. Die Integrität der Metazestoden blieb ebenfalls mit einem Anteil intakter Vesikel von mindestens 98% bei allen Ansätzen erhalten (Daten nicht gezeigt). Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten festgestellt werden.

Damit konnte gezeigt werden, dass LY364947 bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  auf *E. multilocularis* Metazestoden weder zytotoxisch wirkt noch die Integrität der Metazestoden beeinflusst.



**Abb. 84: LY364947 - Schädigung von Metazestoden.**

Die Schädigung axenisch kultivierter Metazestoden (Isolat J31, H95 und G8065) durch die Inkubation mit LY364947 wurde über einen Zeitraum von 4 Tagen mit Konzentrationen von 0,05 bis 100  $\mu\text{M}$  anhand der Menge bzw. Aktivität freigesetzter Alkalischer Phosphatase von *E. multilocularis* getestet. Die Kontrollgruppe wurde unter Zugabe des entsprechenden Volumens DMSO kultiviert. Die Aktivität freigesetzter Alkalischer Phosphatase wurde durch Zugabe des Substrats *p*-Nitrophenylphosphat zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Absorptionsmessung bei 405 nm ( $A_{405 \text{ nm}}$ ) gemessen. Die Messwerte wurden auf Basis des verwendeten Kulturmediums normalisiert und als Mittelwert der Isolate angegeben. Messwerte unter einem Wert von 0,2 wurden als nicht signifikant gewertet.



## 5. Diskussion

Zelluläre Signalsysteme sind für den Endoparasiten *E. multilocularis* ein entscheidendes interzelluläres Kommunikationsmittel, um als multizellulärer Organismus durch Modifikationen der Genexpression auf veränderte Umweltbedingungen reagieren zu können. TGF- $\beta$  / BMP Signaling ist dabei eins von vielen anderen zellulären Signalsystemen, über die während einer Infektion grundlegende Vorgänge bei Organotropismus, Immunevasion, Wachstum, Proliferation und Differenzierung des Parasiten gesteuert werden müssen.

### 5.1. TGF- $\beta$ / BMP Signaling - allgemein

TGF- $\beta$  / BMP Signaling basiert in den verschiedensten Organismen auf grundlegenden biochemischen Vorgänge, die für eine erfolgreiche Signalweiterleitung essenziell sind. Eine dieser zentralen Ereignisse ist die Interaktion zwischen Typ I Rezeptor und R-Smad, die ausschlaggebend für die Spezifität der Signalweiterleitung ist. Das Modell des TGF- $\beta$  / BMP Signaling beruht in diesem Punkt auf einem kanonisches Schema der Signalweiterleitung von der Zelloberfläche bis in den Nukleus. Dabei werden vor allem im Menschen das BMP - abhängige Signaling mit BMP Zytokinen, Rezeptoren der Alk-2 Gruppe (Alk-3, Alk-6) und BR-Smads (Smad1, 5, 8) vom TGF- $\beta$  - abhängigen Signaling mit TGF- $\beta$  Zytokinen, Rezeptoren der Alk-5 Gruppe (Alk-4, Alk-5, Alk-7) und den AR-Smads Smad2 und Smad3 voneinander abgegrenzt<sup>123</sup>. In den letzten Jahren häufen sich allerdings in *H. sapiens* Hinweise auf eine TGF- $\beta$  - abhängige Aktivierung von BR-Smads. So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass der humane BR-Smad Smad1 in Abhängigkeit vom Zelltyp auch durch den TGF- $\beta$  Typ I Rezeptor Alk-5 aktiviert werden kann<sup>125-127,282</sup>. Dabei konnte durch biochemische Analysen festgestellt werden, dass der Alk-5 Loop 45 für die Interaktion mit Smad1 essentiell ist und dass sich das Muster der regulierten Gene bei diesem TGF- $\beta$  - induzierten Signaling vom BMP - induzierten Signaling über Smad1 unterscheidet<sup>127</sup>. Von einer BMP - abhängigen Aktivierung der AR-Smads wurde im humanen System allerdings bisher nicht berichtet. Diese vom kanonischen Schema abweichende Möglichkeit der TGF- $\beta$  / BMP Signalweiterleitung konnte aber bereits 2003 mit der Aktivierung vom AR-Smad EmSmadA aus *E. multilocularis* durch humane BMP Rezeptoren (Alk-3 / BMPR2) belegt werden<sup>94</sup>. Zusätzlich interagiert EmSmadA auch mit dem humanen TGF- $\beta$  Rezeptorkomplex (Alk-5 / TGFBR2) und wird durch diesen aktiviert<sup>94</sup>. Andere R-Smads aus *E. multilocularis* entsprechen bezüglich ihrer Aktivierung dem Modell und werden jeweils nur durch den humanen BMP Rezeptorkomplex Alk-3 / BMPR2 (EmSmadB) oder den humanen TGF- $\beta$  Rezeptorkomplex Alk-5 / TGFBR2 (EmSmadC) aktiviert<sup>94,97</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Thematik bei EmSmadA mit Hilfe von gezielten Mutationen einzelner

Aminosäuren weiter untersucht werden. Hierbei konnte mit V<sub>139</sub> ein einzelner Aminosäurerest außerhalb von Loop 3 aber innerhalb der MH2 Domäne von EmSmadA identifiziert werden, der zur Spezifität bei der Interaktion mit Typ I Rezeptoren beiträgt. N<sub>218</sub> konnte dagegen als eine zentrale Aminosäure bei der Interaktion von EmSmadA mit Typ I Rezeptoren identifiziert werden. Eine Doppelmutation beider Aminosäuren führte zur weitgehenden Inhibierung der Smad - Rezeptor Interaktion. Damit wurden in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal zwei Aminosäuren eines R-Smads identifiziert, die außerhalb von Loop 3 liegen und dennoch wichtige Funktionen bei der spezifischen Interaktion von R-Smad und Typ I Rezeptor zeigen. Um die hier gemachten Aussagen zu verifizieren, sollten die Ergebnisse allerdings nochmals in einem unabhängigen System überprüft werden. Als Grundlage für die detaillierte Erforschung der spezifischen Interaktionen zwischen R-Smad und Rezeptor lassen sich diese Ergebnisse auch auf das humane System übertragen. Ein Vergleich mit der Aminosäuresequenz humaner R-Smads lässt erkennen, dass es sich bei den zur Mutagenese ausgewählten Aminosäuren um typische Reste von EmSmadA an hoch konservierte Positionen handelt, die sich bei humanen AR-Smads von denjenigen bei BR-Smads unterscheiden (bis auf eine Ausnahme bei Smad8). Entsprechend diesen Beobachtungen basiert die TGF- $\beta$  induzierte Aktivierung von humanem Smad1 vermutlich nicht auf der Aminosäure A<sub>286</sub>, die V<sub>139</sub> in EmSmadA entspricht, sondern auf anderen strukturellen Besonderheiten von Smad1. Neben der Grundlagenforschung bietet die hier durchgeführte biochemische Charakterisierung von EmSmadA auch anderen wissenschaftlichen Arbeiten eine Basis für weiterführende oder angewandte Forschung. Darunter fallen auch Studien, die sich mit verschiedenen Krankheiten befassen, deren Ursprung in einer gestörten Spezifität des TGF- $\beta$  / BMP Signaling zu finden sind oder Untersuchungen zu TGF- $\beta$  / BMP Signaling in der Stammzellforschung.

Neben den essentiellen Vorgängen bezüglich der spezifischen Signalweiterleitung ist aus biochemischer Sicht eine weitere charakteristische Eigenheit von Echinokokken Typ I Rezeptoren interessant: die Problematik bei der konstitutiven Aktivierung. Während sowohl humane TGF- $\beta$  und BMP Typ I Rezeptoren als auch der *S. mansoni* Typ I Rezeptor SmRK1 durch die gerichtete Mutation einer einzigen Aminosäure in der GS Domäne zu Aspartat (Q<sub>233</sub>D bei Alk-3; T<sub>204</sub>D bei Alk-5; Q<sub>303</sub>D bei SmRK1) konstitutiv aktiv werden, waren entsprechende Mutationen bei den Echinokokken Rezeptoren EmRSK1 (Q<sub>157</sub>D) und EmRSK3 (Q<sub>280</sub>D) bezüglich ihrer Interaktionen mit EmSmadB bisher erfolglos<sup>1,95,206-208</sup>. Auch beim per se konstitutiv aktiven EmRSK2 wurde diese Mutation vorgenommen (Q<sub>279</sub>D), wodurch die Aktivierung von EmSmadC durch EmRSK2 vollständig inhibiert wurde<sup>212</sup>. Auf die Interaktion mit EmSmadA hatte diese Mutation von EmRSK2 keine Auswirkungen<sup>212</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund dieser R-Smad - abhängigen

Ergebnisse bei EmRSK2 die Analyse zur Aktivität von EmRSK3 Q<sub>280</sub>D auf EmSmadA ausgeweitet. Allerdings konnte auch in dieser Rezeptor - Smad Kombination keine konstitutive Aktivierung von EmRSK3 Q<sub>280</sub>D festgestellt werden. Im Rahmen der vorhergehenden Untersuchungen an den Typ I Rezeptoren aus *E. multilocularis*, die in einem heterogenen Versuchsaufbau mit humanen HEK293T Zellen durchgeführt wurden, wurde ein Einfluss des LPLL-Motivs der Rezeptoren und die damit einhergehende potenzielle Interaktion mit humanem FKBP12 diskutiert. Da die Echinokokken Rezeptoren kein hoch konserviertes LPLL-Motiv aufweisen (EmRSK1: <sub>146</sub>KPFL<sub>149</sub>; EmRSK2: <sub>368</sub>QPLL<sub>371</sub>; EmRSK3: <sub>269</sub>VPFL<sub>271</sub>), wurde ein Konflikt mit dem in den humanen Zellen vorliegenden Faktor FKBP12 vermutet, der die konstitutive Aktivierung der Echinokokken Rezeptoren negativ beeinflussen könnte. Bei EmRSK1 und EmRSK2 wurden die entsprechenden Aminosäuren bereits zu LPLL mutiert und die veränderten Rezeptoren wurden in HEK293T Zellen auf ihre Aktivität überprüft<sup>212</sup>. Dabei konnte bei EmRSK1 gezeigt werden, dass die gleichzeitige Mutation von Q<sub>157</sub>D, K<sub>146</sub>L und F<sub>148</sub>L bzw. von Q<sub>157</sub>D und F<sub>148</sub>L zur Inhibierung der Signalweiterleitung über EmRSK1 führte, während alle anderen Mutationen bei EmRSK1 keine Unterschiede bezüglich der Aktivität dieses Rezeptors zeigten. Bei EmRSK2 führte die Mutation Q<sub>368</sub>L ebenfalls zu keiner Veränderung hinsichtlich der Aktivität. Um diese Studien zu vervollständigen, wurden in der vorliegenden Arbeit die entsprechenden Aminosäuren von EmRSK3 in verschiedenen Kombinationen mutiert und die Aktivität dieser veränderten Rezeptoren untersucht. Dabei zeigten die mutierten Rezeptoren EmRSK3 V<sub>269</sub>L F<sub>271</sub>L und EmRSK3 Q<sub>280</sub>D F<sub>271</sub>L in Kombination mit EmSmadA eine minimale konstitutive Aktivität, wohingegen EmSmadB durch keine der untersuchten Rezeptormutanten von EmRSK3 im Rahmen einer konstitutiven Aktivierung phosphoryliert werden konnte. Die Ergebnisse bezüglich EmSmadA und der beiden oben genannten konstitutiv aktiven EmRSK3 Versionen sollten allerdings vor allem aufgrund des sehr schwachen Signals im verwendeten Versuchsaufbau nochmals in einer unabhängigen Studie verifiziert werden. Letztlich muss aber festgehalten werden, dass der untersuchte Echinokokken Rezeptor nicht vollständig aktiviert werden konnte. Diese Ergebnisse zur konstitutiven Aktivierung von EmRSK1, EmRSK2 und EmRSK3, die sich in diesem Punkt grundlegend von den humanen Rezeptoren unterscheiden, werfen neue Fragen bezüglich der biochemischen Eigenschaften der Echinokokken Typ I Rezeptoren und ihrer Interaktionen mit intrazellulären regulatorischen Faktoren auf.

## 5.2. Mechanismen der TGF- $\beta$ / BMP Signaltransduktion in *E. multilocularis*

Die in der vorliegenden Arbeit neu identifizierten intrazellulären Faktoren von TGF- $\beta$  / BMP Signaling vervollständigen das Bild dieses Signalsystems in *E. multilocularis* und

unterstützen die Untersuchung grundlegender Vorgänge bei der Signalweiterleitung im Fuchsbandwurm.

So konnte mit EmSmadE ein zweiter BR-Smads in *E. multilocularis* identifiziert werden, womit im intrazellulären Raum durch das Vorliegen von jeweils zwei BR- und AR-Smads ein Gleichgewicht zwischen TGF- $\beta$  und BMP Signaling im Fuchsbandwurm ermöglicht wird. Neben EmSmadB ist EmSmadE ein weiterer R-Smad aus dem Fuchsbandwurm, der sowohl eine konservierte MH2 als auch MH1 Domäne aufweist, die durch eine Prolin - reiche Linker Region voneinander getrennt sind. Innerhalb der Linker Region von EmSmadE deuten konservierte Phosphorylierungsstellen auf Interaktionen mit dem MAPK Signalweg und GSK3, womit neben der Kreuzkommunikation mit einem anderen intrazellulären Signalweg auch indirekt die Degradation von EmSmadE gesichert ist. Das Vorliegen des C-terminalen SSVS-Motivs weist EmSmadE zusätzlich eindeutig als R-Smad aus, der von TGF- $\beta$  / BMP Typ I Rezeptoren aktiviert werden kann. Die strukturelle Charakterisierung deutet mit der identifizierten, hoch konservierten Sequenz eines NLS weiterhin darauf hin, dass EmSmadE über bekannte Transportmechanismen in den Nukleus transloziert werden kann. Damit scheint eine Signalweiterleitung über EmSmadE vom entsprechenden aktivierten Typ I Rezeptor bis in den Nukleus möglich zu sein. Die Möglichkeit der Translokation aus dem Nukleus zurück ins Zytoplasma ist durch das Vorliegen von zwei nukleären Exportsignalen (NES 1 und 2) ebenfalls gegeben. Diese strukturellen Charakteristika von EmSmadE deuten eindeutig darauf hin, dass dieser neu identifizierte R-Smad seine Rolle als intrazellulärer Signaltransduktor im Rahmen der bekannten Mechanismen vollständig erfüllen kann. Die konservierten Aminosäuren in Loop 3 und die hohe Homologie zum *S. mansoni* R-Smad SmSmad1B bzw. zum humanen R-Smad HsSmad8 weisen EmSmadE zusätzlich als BR-Smad aus. Zusätzlich lässt die Genorganisation von *emsmadE* mit zwei zu *hssmad5* und drei zu *smsmad1B* deckungsgleich positionierten Introns einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung von EmSmadE und BR-Smads anderer Organismen vermuten. Bei der Bestimmung der Homologie fällt im Hinblick auf EmSmadB die Anzahl identischer Aminosäuren in der MH1 Domäne (77%) auf, die verglichen mit SmSmad1B (84%) und HsSmad8 (80%) einen geringeren Wert aufweist. Diese relativ niedrige Homologie in der MH1 Domäne könnte auf die gleichzeitige Expression und Signaltransduktion über zwei BR-Smads in *E. multilocularis* zurückzuführen sein, deren DNA Interaktionen zur spezifischen Signalumsetzung entscheidende Unterschiede aufweisen sollten. Die Unterschiede in den MH1 Domänen von EmSmadB und EmSmadE könnten folglich auf verschiedene Affinitäten zu Smad - responsive Promotorregionen hindeuten und damit zur spezifischen Regulation charakteristischer Zielgene beitragen. Besonders bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die MH1 Domäne bei den AR-Smads

aus *E. multilocularis*, EmSmadA und EmSmadC, nicht entsprechend konserviert ist<sup>94,97</sup>. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass sich die Smad - responsiven Promotoren in *E. multilocularis* zwischen AR-Smads und BR-Smads grundlegend unterscheiden. In *H. sapiens* wird solch eine Unterscheidung mit den mehr oder weniger konservierten SBEs einerseits und mit den GC-reichen Smad - responsiven Promotorregionen andererseits bereits getroffen. Nach der traditionellen Erwartungshaltung, die auf der strikten Trennung von BMP und TGF- $\beta$  Signalweg basiert, sollte beispielsweise ein durch BMP aktivierter Smad1 im Nukleus mit GC-reichen Promotorregionen interagieren während durch TGF- $\beta$  aktivierter Smad3 mit SBEs (Konsensussequenz 5'-GTCT-3') der Smad - responsiven Promotoren in Kontakt tritt<sup>126,224,234,283</sup>.

Daneben konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass *emsmadE* in den untersuchten Stadien Metazestode, Primärzelle, nicht aktivierte Protoskolizes und aktivierte Protoskolizes gleichmäßig exprimiert wird und damit vermutlich auch während einer Infektion mit *E. multilocularis* eine Rolle spielt. Die vorgenommene Charakterisierung zeigt weiterhin deutlich, dass EmSmadE ein funktioneller R-Smad ist. Die Möglichkeit der Aktivierung durch die humanen TGF- $\beta$  Rezeptoren Alk-5 und TGFBR2 einerseits und die humanen BMP Rezeptoren Alk-3 und BMPR2 andererseits erinnern in ihrer Funktionalität an EmSmadA, wo diese unerwarteten Interaktionen zwischen einem Echinokokken R-Smad und den verschiedenen humanen Rezeptoren zum ersten Mal beschrieben wurde<sup>94</sup>. Im Gegensatz zu EmSmadA erfolgt die Signalweiterleitung über EmSmadE im Echinokokken TGF- $\beta$  / BMP Signaling allerdings sehr spezifisch ausschließlich nach einer Aktivierung von EmRSK3, der der Alk-1 Rezeptorgruppe angehört. EmSmadA kann dagegen sowohl von aktiviertem EmRSK3 als auch von aktiviertem EmRSK2 (Alk-5 / TGF- $\beta$  Rezeptorgruppe) phosphoryliert werden<sup>1,212</sup>. EmSmadB interagiert wiederum mit beiden Echinokokken Rezeptoren der Alk-1 Gruppe, EmRSK3 und EmRSK1, während EmSmadC mit seiner konzentrierten Interaktion mit EmRSK2 in *E. multilocularis* ein vergleichbar spezifisches Aktivierungspotential aufweist wie EmSmadE<sup>1,96,212</sup>. Dieses sehr enge Spektrum der Interaktion mit Echinokokken Rezeptoren vereinfacht zukünftige Studien zur spezifischen Rolle von EmSmadE im Netzwerk von TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis*. So kann man mit der Inhibierung von EmRSK3 gleichzeitig die Aktivierung von EmSmadE vollständig verhindern und auf Basis dieser Vorgehensweise die von EmSmadE regulierten Gene bestimmen. Ein erster Schritt in diese Richtung wurde mit der Untersuchung der charakteristischen inhibitorischen Eigenschaften von LY364947 in Bezug auf Echinokokken Rezeptoren unternommen. Dieser Inhibitor wirkt ausschließlich auf den EmRSK3 / EmRSK4 Rezeptorkomplex, beeinträchtigt neben der Aktivierung von EmSmadE allerdings auch das Signaling über EmSmadA und EmSmadB. Die direkte

Inhibierung von EmSmadE durch RNAi ist als alternative Herangehensweise ebenfalls denkbar und würde sehr spezifisch zur Identifizierung EmSmadE - regulierter Gene beitragen. Auf diese Weise können aus verschiedenen Richtungen Studien bezüglich der Rolle von EmSmadE durchgeführt werden, die in Kombination ein vollständiges Bild der EmSmadE - regulierten Gene in *E. multilocularis* zeigen sollten.

Weitere funktionelle Studien der vorliegenden Arbeit befassten sich mit der potenziellen Homo- und Heterodimerbildung von EmSmadE, die ein wichtiges Kriterium für die Funktionalität von EmSmadE als intrazellulärer Signaltransduktor sind. Dabei konnte gezeigt werden, dass EmSmadE als full length Protein sowohl im inaktiven wie auch im aktivierten Zustand Homodimere ausbilden kann. Auch bei EmSmadA wurde die Ausbildung von Homodimere, die aus zwei inaktiven EmSmadA full length Proteinen zusammengesetzt waren, beobachtet<sup>94</sup>. Da die Ausbildung von heteromeren R-Smad / Co-Smad Komplexen die Interaktion von Aminosäuren des basic pocket vom Co-Smad mit dem phosphorylierten C-terminalen SSXS-Motiv der R-Smads voraussetzt, erscheint die Homodimerbildung zweier inaktiver R-Smads ein Artefakt der verwendeten Methodik zu sein und *in vivo* irrelevant. Zusätzlich wurde bei EmSmadE auch eine Homodimerbildung zwischen einem inaktiven und einem aktivierten EmSmadE full length Protein beobachtet. Von einer entsprechenden Dimerisierung inaktiver und aktiver Komponenten wurde auch bereits bei EmSmadB full length Proteinen berichtet<sup>94</sup>. Da die Funktion einer solchen Kombination bei der Homodimerisierung von R-Smads bisher ungeklärt ist, können hier nur Vermutungen angestellt werden. Zum Einen ist es denkbar, dass ein aktivierter R-Smad einen zytoplasmatisch vorliegenden inaktiven R-Smad durch die Ausbildung eines solchen Homodimers „rekrutieren“ kann. Die Möglichkeit der Interaktion mit einem Co-Smad wäre in diesem Fall durch die Phosphorylierung des ersten R-Smads gegeben und eine Signalweiterleitung wäre prinzipiell denkbar. Zum Anderen kann diese Homodimerbildung auch hier ein Artefakt der verwendeten Methodik sein und damit *in vivo* irrelevant. Diese Ausbildung von EmSmadE und EmSmadB Homodimeren, die aus jeweils einer inaktiven und einer aktiven Komponente bestehen, sollte letztendlich in einem unabhängigen Versuchsaufbau unter Einbeziehung des Echinokokken Co-Smads EmSmadD verifiziert werden. Zusätzlich zu den bereits angesprochenen Beobachtungen konnte in den Dimerisierungsstudien mit EmSmadE auch eine Funktion der Linker Region festgestellt werden. So interagierte die isolierte MH2 Domäne von EmSmadE weder mit einer weiteren isolierten MH2 Domäne, noch mit einer isolierten MH1 Domäne, allerdings wurde die Bildung von Homodimeren, die aus einem full length EmSmadE und der isolierten MH2 Domäne von EmSmadE zusammengesetzt waren, unter bestimmten Voraussetzungen beobachtet. Der kritische Punkt bestand hierbei darin, dass genau

einer der Interaktionspartner aktiviert sein musste. Damit scheint die Linker Region von EmSmadE bei der Ausbildung dieser Form von Homodimeren eine entscheidende Rolle zu spielen und auch eine regulatorische Funktion zu haben, da die Ausbildung dieser Homodimere im Unterschied zu Homodimeren mit zwei full length Proteinen ausschließlich mit einem einzelnen aktiven Komponenten zustande kommt. Der Linker Region von humanem Smad3 konnte bereits eine wichtige Funktion in Bezug auf die Funktionalität dieses R-Smad nachgewiesen werden<sup>284</sup>. Demzufolge kommen vor allem den Aminosäureresten Q<sub>222</sub> und P<sub>229</sub> innerhalb der Smad3 Linker Region bei der Ausbildung von homo- und heteromeren Komplexen wichtige Rollen zu. Ein Vergleich mit der Linker Region von EmSmadE lässt erkennen, dass trotz der geringen Homologie an den entsprechenden Positionen ebenfalls ein Glutamin- bzw. Prolinrest zu finden ist. Die Fähigkeit zur Heterodimerisierung wurde bei EmSmadE in der vorliegenden Arbeit ebenfalls überprüft. Dabei zeigte sich, dass inaktiver EmSmadE sowohl mit aktiviertem EmSmadA, aktiviertem EmSmadB und EmSmadD Heterodimere bildet. Diese Beobachtungen deuten, wie schon oben angesprochen, auf eine Rekrutierung inaktiver R-Smads (EmSmadE) durch aktivierte R-Smads (EmSmadA, EmSmadB) hin. Solch eine Heterodimerbildung mit inaktiven und aktiven Komponenten konnte im gleichen System bereits für die Interaktion von EmSmadA und EmSmadC gezeigt werden, wobei jeder der zwei Interaktionspartner aktiviert oder inaktiv sein kann<sup>97</sup>. Die Interaktion zwischen inaktivem EmSmadE und EmSmadD widerspricht allerdings vollständig dem gängigen Modell, nach dem heteromere Komplexe zwischen R-Smad und Co-Smad nur ausgebildet werden, wenn der R-Smad im C-terminalen SSXS-Motiv phosphoryliert ist (siehe oben). Allerdings wurde eine solche Interaktion zwischen EmSmadD und inaktiven Echinokokken R-Smads auch schon für EmSmadA nachgewiesen, für EmSmadB allerdings gleichzeitig ausgeschlossen<sup>97</sup>. Diese Heterodimerbildung zwischen Co-Smad und inaktiven R-Smads lässt sich *in vivo* nur sehr schwer erklären, da die Signaltransduktion auf einem sehr geregelten Ablauf der Signalweiterleitung basiert: auf die Bindung eines Liganden an den entsprechenden Rezeptorkomplex folgt die Aktivierung der zugehörigen R-Smads und die Heterodimerisierung von aktivierten R-Smads und Co-Smad. Eine Interaktion zwischen Co-Smad und inaktiven R-Smads, mit dem Potenzial einer Autoregulation der Genexpression ohne äußeres Signal, würde dem Sinn der Zell - Zell Kommunikation über TGF- $\beta$  / BMP Signaling entgegenstehen. Dementsprechend müssten die *in vitro* beobachteten Interaktionen zwischen inaktivem EmSmadA bzw. EmSmadE und dem Co-Smad EmSmadD *in vivo* unterdrückt oder durch einen unbekanntem Mechanismus zumindest streng reguliert sein. Da bei den früheren Studien der gleiche Versuchsaufbau verwendet wurde, ist natürlich immer noch die Möglichkeit gegeben, dass es sich bei diesen Beobachtungen zur Heterodimerisierung von inaktivem EmSmadA bzw. EmSmadE

und EmSmadD um Artefakte handelt und solche Interaktionen in dieser Form *in vivo* nicht vorkommen. Studien zur Heterodimerisierung mit aktivierten EmSmadE Proteinen zeigten, dass Interaktionen in diesem Fall ausschließlich mit dem aktivierten R-Smad EmSmadB und dem Co-Smad EmSmadD stattfinden. Aktivierte EmSmadA Proteine bilden dagegen nach derzeitigem Kenntnisstand mit vier weiteren R-Smads in verschiedenen Aktivitätsstufen heteromere Komplexe aus (mit inaktivem EmSmadE, aktiviertem EmSmadB und sowohl inaktivem wie auch aktiviertem EmSmadC), während aktivierte EmSmadC Proteine sich bei der Heterodimerisierung auf zwei Interaktionen beschränken (inaktiver und aktiver EmSmadA)<sup>94,97</sup>. Bei aktiviertem EmSmadB sind inklusive der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit drei heterogene Interaktionspartner bekannt (EmSmadA, EmSmadB, EmSmadE), die zur Heterodimerisierung mit EmSmadB allerdings aktiviert sein müssen<sup>97</sup>. Die Begrenzung der Interaktion von aktiviertem EmSmadE auf aktivierten EmSmadB scheint damit in *E. multilocularis* ein einzigartiger Vorgang zu sein und sollte damit auch die Anzahl der EmSmadE - regulierten Gene auf ein überschaubares Maß begrenzen. Im Zusammenhang mit der Bindung von EmSmadE an DNA wurde zusätzlich die Möglichkeit von Interaktionen mit bereits identifizierten nukleären Faktoren überprüft. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass EmSmadE weder mit dem Rezeptor EmNHR1 noch mit dem Transkriptionsfaktor EmAlien interagiert. Zudem nimmt EmSmadE als Echinokokken R-Smad in Bezug auf EmSkip eine Sonderrolle ein, denn für alle anderen R-Smads aus *E. multilocularis* konnte bereits eine Interaktion mit diesem transkriptionellen Ko-Regulator nachgewiesen werden<sup>97,232</sup>.

Auf Basis der in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse zu den Eigenheiten von EmSmadE weist dieser R-Smad einige Besonderheiten auf, die ihn im Rahmen der Signaltransduktion von den anderen R-Smads aus *E. multilocularis* abgrenzt. So scheint EmSmadE in einem ganz spezifischen Signalweg zu agieren, der aus EmRSK3 als Typ I Rezeptor sowie EmSmadE und EmSmadB als intrazelluläre Signaltransduktoren zusammengesetzt ist und im Gegensatz zum restlichen TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* den Transkriptionsfaktor EmSkip bei der Regulation der Genexpression nicht involviert.

Mit der in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Identifizierung von EmSmadF1 und EmSmadF2, den ersten I-Smads aus *E. multilocularis*, sind nun auch im Fuchsbandwurm Vertreter aller bekannten Smad Gruppen bekannt. Dabei sind beide EmSmadF Isoformen durch das Fehlen eines C-terminalen SSXS-Motivs und der MH1 Domäne einerseits sowie durch das Vorliegen einer konservierten MH2 Domäne andererseits eindeutig als I-Smad einzugruppiert. Die konservierten basischen Aminosäuren des MH2 basic groove, die für die Interaktionen von I-Smads mit anderen Proteinen essenziell sind, tragen höchstwahrscheinlich auch bei beiden EmSmadF Isoformen zur Funktionalität bei. Die



Eingruppierung als I-Smad wird durch Analysen zu homologen Proteinen aus anderen Organismen unterstützt, wobei in der Homologie - Liste Smad6 aus *A. mellifera* ebenso zu finden ist wie Smad6 Isoform 2 aus *H. sapiens*. Ein weiterer interessanter Punkt ist das alternative Spleißen in der 5'UTR von *emsmadF*, was die zwei unterschiedlich langen Transkripte und Isoformen (EmSmadF1 und -2) zur Folge hat. Die Expression verschiedener mRNA Spleißvarianten ist für I-Smads auch in anderen Organismen bekannt. So konnten bereits zwei Isoformen für den humanen I-Smad Smad6 identifiziert werden (Smad6 Isoform 1 und 2), die sich ähnlich wie EmSmadF im N-terminalen Bereich in ihrer Länge unterscheiden. Bei HsSmad7 konnten ebenfalls verschiedene Isoformen identifiziert werden, wobei Isoform 3 aufgrund von alternativem Spleißen in der 5'UTR eine verkürzte N-terminale Region im Vergleich zur längsten Form (Isoform 1) aufweist. Auch Dad aus *D. melanogaster* liegt in drei Transkripten vor, die sich in der 5'UTR unterscheiden. Allerdings ist hier der codierende Bereich bei allen drei Transkripten gleich, so dass keine verschiedenen Isoformen gebildet werden. Die Funktion der verschiedenen Isoformen ist in keinem der genannten Organismen bekannt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Expressionsstudien am Isolat G8065 lassen vorerst vermuten, dass EmSmadF (ohne Unterscheidung der Isoformen) in Metazestoden, die bereits Brutkapseln ausgebildet haben, eine geringere Rolle spielen als in den anderen untersuchten Stadien (nicht aktivierte und aktivierte Protoskolizes, Primärzellen). Dabei wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch auf die Möglichkeit eines negativen feedback loops beim TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* mit Hilfe von EmSmadF1 und EmSmadF2 eingegangen und wird im nächsten Abschnitt diskutiert. Zukünftige Studien mit EmSmadF1 und EmSmadF2 bezüglich der Funktionalität und Funktion dieser I-Smads könnten zum Verständnis der vielen I-Smad Isoformen in verschiedenen Organismen beitragen. Bei Smad7 konnte z. Bsp. bereits gezeigt werden, dass der N-terminale Bereich wichtig für die spezifische Inhibierung von TGF- $\beta$  Signaling ist<sup>285</sup>. Aus biochemischer Sicht sind in diesem Zusammenhang auch die Kriterien zur Festlegung von eventuell spezifischen Interaktionspartnern von EmSmadF1 bzw. EmSmadF2 interessant, da hierzu nur sehr wenige Studien vorliegen<sup>240-241,270,286</sup>. Das Vorliegen eines einzelnen Gens, *emsmadF*, zur intrazellulären Regulation von TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* scheint zusätzlich ein interessanter Ansatzpunkt für den Einsatz von RNAi am Fuchsbandwurm. Eine solche Studie könnte entscheidend zur Aufklärung der Rolle von TGF- $\beta$  / BMP Signaling im Fuchsbandwurm beitragen.

Ein weiterer Faktor mit regulatorischen Funktionen im *E. multilocularis* TGF- $\beta$  / BMP Signaling scheint der Typ I Rezeptor EmRSK3 Isoform b zu sein. Das entsprechende mRNA Transkript dieses Rezeptors ist ebenso wie die längste Isoform EmRSK3 in Protoskolizes (aktiviert und nicht aktiviert) und in Metazestoden zu finden<sup>1</sup>. Dabei scheint die

Expression dieser Spleißform in Metazestoden leicht stärker zu sein als in den beiden anderen Stadien. Zu Primärzellen liegen keine Daten vor. Eine 21 Aminosäuren umfassende Deletion innerhalb der Kinasedomäne unterscheidet EmRSK3 Isoform b von EmRSK3. Der deletierte Bereich umfasst allerdings keine hoch konservierten Aminosäuren<sup>1</sup>. Entsprechend der ungeklärten Rolle von EmRSK3 Isoform b wurde die Funktionalität dieser Rezeptorvariante in der vorliegenden Arbeit überprüft und es zeigte sich, dass die Signalweiterleitung in *E. multilocularis* ausgehend von humanem BMP2 bzw. TGF- $\beta$ 1 durch diesen Rezeptor unterbrochen wird. EmRSK3b ist demnach eine inaktive Isoform von EmRSK3. Vermutlich agiert EmRSK3b ähnlich wie der humane TGF- $\beta$  Typ III Rezeptor (betaglycan), der den Activin Antagonisten Inhibin bindet und daraufhin einen inaktiven Komplex mit dem Typ II Rezeptor ActRII ausbildet<sup>287</sup>. Damit stehen zur Formation aktiver Komplexe aus Activin, Alk-4 und ActRII weniger Typ II Rezeptoren zur Verfügung, wodurch das Activin Signaling negativ reguliert wird. Mit EmRSK3b ist ein dazu analoger regulatorischer Mechanismus beim TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* denkbar. EmRSK3b konkurriert nach dieser These mit EmRSK3 um die Interaktion mit einem entsprechenden Liganden und dem Typ II Rezeptor EmRSK4, womit die Anzahl der Interaktionen zwischen dem aktiven EmRSK3 und Ligand bzw. Typ II Rezeptor erniedrigt wird. Mit diesem Mechanismus könnte TGF- $\beta$  / BMP Signaling via EmRSK3 durch eine erhöhte Produktion von *emrsk3b* beendet oder zumindest eingeschränkt werden. Somit konnte mit EmRSK3b neben dem I-Smad EmSmadF ein zweiter möglicher regulatorischer Faktor beim TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* identifiziert werden.

### 5.3. Sensierung externer TGF- $\beta$ / BMP Zytokine durch *E. multilocularis*

Während einer Infektion mit *E. multilocularis* hängt eine mögliche Interaktion zwischen Rezeptoren des Fuchsbandwurms und Zytokinen des Wirts entscheidend davon ab, dass die entsprechenden Rezeptoren des Parasiten auch an einer geeigneten Stelle exprimiert werden und in Kontakt mit passenden Wirtsfaktoren kommen können. Dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Immunhistochemie nachgegangen, die das Vorliegen aller vier TGF- $\beta$  / BMP Rezeptoren von *E. multilocularis* während einer natürlich aufgetretenen Alveolären Echinokokkose untersucht. Dazu lagen für EmRSK1, EmRSK2 und EmRSK4 bereits Antikörper vor, während der bereits produzierte Antikörper anti-EmRSK3 erst im Zuge der vorliegenden Arbeit aufgereinigt und die spezifische Bindung von EmRSK3 verifiziert wurde<sup>1,95,212</sup>. Dabei konnte im Rahmen der Aufreinigung gezeigt werden, dass anti-EmRSK3 trotz verbleibender Kreuzinteraktionen mit Proteinen aus *E. coli* eine starke Bindung zum Antigen aufweist, der rekombinant produzierten Ligandenbindungsdomäne von EmRSK3. In axenisch kultivierten Metazestoden konnte

EmRSK3 anschließend mit einer Größe von knapp 58 kDa nachgewiesen werden, wobei das theoretische Molekulargewicht des Rezeptors bei 80 kDa liegt. Dieses unerwartete Ergebnis kann auf eine unvollständige Denaturierung von EmRSK3 während der durchgeführten Immunpräzipitation und der SDS-PAGE zurückgeführt werden. Eine Kreuzinteraktion mit EmRSK1, der die höchste Sequenzhomologie in der Ligandenbindungsdomäne und ein theoretisches Molekulargewicht von 61,5 kDa aufweist, wurde eindeutig ausgeschlossen. Die anschließenden Studien zur Lokalisation der TGF- $\beta$  / BMP Rezeptoren aus *E. multilocularis* in infiziertem Lebergewebe einer natürlich aufgetretenen Alveolären Echinokokkose zeigten deutlich, dass EmRSK1, EmRSK3 und EmRSK4 sowohl in der Germinalschicht als auch in invaginierten Protoskolizes vorliegen. Damit konnten frühere immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von EmRSK1 und EmRSK4 in Labortieren, die durch eine intraperitoneale Injektion von Parasitenmaterial mit *E. multilocularis* infiziert wurden<sup>212</sup>, verifiziert werden. Da Germinalschicht und Wirtsgewebe während einer Alveolären Echinokokkose, nur durch die Laminatschicht des Parasiten voneinander getrennt, in großer räumlicher Nähe zueinander zu finden sind, ist auch die Interaktion dieser drei Echinokokken Rezeptoren mit Zytokinen des Wirts denkbar. Auch für EmRSK2 konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse früherer Immunlokalisationsstudien mit Labortieren verifiziert werden<sup>212</sup>. Hierbei konnte EmRSK2 ausschließlich in invaginierten Protoskolizes und nur mit einem sehr schwachen Signal detektiert werden, wobei die Spezifität von anti-EmRSK2 allerdings weiterhin ungeklärt ist. Nachdem die Detektion von EmRSK2 in Metazestoden gescheitert ist<sup>212</sup> stehen Untersuchungen zur spezifischen Interaktion von anti-EmRSK2 und EmRSK2 in Protoskolizes noch aus. Nach bisherigem Wissensstand auf Basis von *emrsk2* Expressionsdaten und den EmRSK2 Lokalisationsstudien scheint EmRSK2 jedoch vermehrt in Protoskolizes exprimiert bzw. produziert zu werden und nicht in direkten Kontakt mit Zytokinen des Wirts zu kommen. Zusätzlich zur bereits diskutierten möglichen Rolle von EmRSK2 bei Zellerkennung und Zelldifferenzierung in Protoskolizes<sup>212</sup> sind diese Ergebnisse zur Immunlokalisation allerdings auch durch eine strenge Regulierung des konstitutiv aktiven EmRSK2 erklärbar. So scheint es möglich, dass *emrsk2* im Rahmen von feedback loops nur bei ganz spezifischen, zeitlich begrenzten Vorgängen in der Zelle exprimiert wird und damit durch die bisher verwendeten Methoden nicht in vollem Maße erfasst wird. Dabei spielt EmRSK2 eventuell auch eine wichtige Rolle bei der Stammzellendifferenzierung in Protoskolizes oder auch anderen Echinokokken Stadien. Genauere Aufschlüsse über die Funktion von EmRSK2 würde der Einsatz von RNAi bei Primärzellen oder Protoskolizes bringen, wodurch die Rolle von EmRSK2 bei der Entwicklung von *E. multilocularis* analysiert werden könnte.

Die bisherigen Untersuchungen bezüglich TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* beschränkten sich vor allem auf die Auswirkungen von humanem BMP2. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich die Möglichkeit einer Sensierung von humanem TGF- $\beta$ 1 durch den EmRSK3 / EmRSK4 Rezeptorkomplex untersucht. Solch eine Interaktion von humanem TGF- $\beta$ 1 und Parasiten TGF- $\beta$  / BMP Rezeptoren konnte bereits bei SmTBRI (TGF- $\beta$  / BMP Typ I Rezeptor) und SmTBRII (TGF- $\beta$  / BMP Typ II Rezeptor) aus *S. mansoni* gezeigt werden<sup>288</sup>. Diese Möglichkeit zur Interaktion mit verschiedenen Zytokinen ist für EmRSK1 und EmRSK3 ebenfalls denkbar, da beide Echinokokken Rezeptoren zur Alk-1 Gruppe der TGF- $\beta$  / BMP Rezeptoren gezählt werden, die sowohl mit Faktoren der BMP Subfamilie als auch mit TGF- $\beta$  Zytokinen interagieren können. *In vitro* konnte mit Hilfe einer heterologen Expression in HEK 293T Zellen bereits gezeigt werden, dass humanes TGF- $\beta$ 1 keine Signalweiterleitung über den Rezeptorkomplex EmRSK1 / EmRSK4 auslöst (Berntaler, P., mündliche Mitteilung). Im gleichen System konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings eine durch TGF- $\beta$ 1 induzierte Signalweiterleitung über EmRSK3, EmRSK4 und EmSmadB nachgewiesen werden. Damit ist über den Rezeptorkomplex EmRSK3 / EmRSK4 sowohl BMP Signaling (HsBMP2) via EmSmadA oder EmSmadB möglich<sup>1</sup> wie auch die Weiterleitung eines TGF- $\beta$  Signals (HsTGF- $\beta$ 1) via EmSmadB. Damit kann EmRSK3 wahrscheinlich auch *in vivo* während einer Infektion nicht nur mit humanem BMP2 sondern auch mit humanem TGF- $\beta$ 1, einem wichtigen Zytokin im menschlichen Immunsystem, interagieren. So wird dieses immunsuppressive Zytokin während einer Alveolären Echinokokkose in der Umgebung von infiziertem Gewebe vermehrt in Lymphozyten exprimiert und könnte auf diesem Weg das entsprechende Signaling im Parasiten auslösen<sup>289</sup>. Da EmRSK3 als einziger Typ I Rezeptor von *E. multilocularis* mit diesem wichtigen humanen Zytokin interagiert, scheinen weitere Studien zum Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf *E. multilocularis* angebracht. Dabei stellt vor allem der Inhibitor LY364947 ein wichtiges Werkzeug dar, da er nach Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit sehr spezifisch die Aktivität von EmRSK3 hemmt während die anderen Echinokokken Typ I Rezeptoren nicht beeinflusst werden. Aufgrund der unterschiedlichen Hemmung bei verschiedenen Smads kann mit Hilfe einer optimierten Anwendung dieses Inhibitors sogar ausschließlich das Signaling über EmRSK3, EmRSK4 und EmSmadB inhibiert werden während das Signaling über andere Echinokokken R-Smads nicht beeinträchtigt würde. Zusätzlich wäre zur Identifizierung TGF- $\beta$ 1 regulierter Gene in *E. multilocularis* der Einsatz von DNA-Microarrays möglich. Auf Basis der Daten des Genomsequenzierungsprojekts am Wellcome Trust Sanger Institute sollte diese Technik in absehbarer Zeit auch für die Erforschung von *E. multilocularis* zur Verfügung stehen.

Die Möglichkeit der TGF- $\beta$  / BMP - induzierten Kommunikation zwischen einzelnen Metazestodenvesikeln von *E. multilocularis* wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit an EmRSK3, EmRSK4 und EmSmadB ebenfalls untersucht. Dazu wurde die Aktivierung von TGF- $\beta$  / BMP Signaling über diese drei Signaling - Komponenten nach der Inkubation mit Überstand axenisch kultivierter Metazestoden *in vitro* untersucht. Dabei zeigte sich eindeutig, dass sowohl Metazestoden mit als auch ohne Protoskolizes mindestens einen Faktor sekretieren, der mit dem Rezeptorkomplex EmRSK3 / EmRSK4 interagieren und eine Signalweiterleitung über EmSmadB induzieren kann. Damit konnte zum ersten Mal ein Beweis dafür erbracht werden, dass einzelne Metazestoden über ein oder mehrere sekretierte Faktoren untereinander im Rahmen einer intra - Spezies Kommunikation interagieren können. Passenderweise konnten neben einer vierten Isoform des bereits bekannten BMP homologen Faktors EmBMP1<sup>95</sup> im Zuge der vorliegenden Arbeit mit EmAct und EmBMP2 (in drei Isoformen) weitere Faktoren identifiziert werden, die eine große Homologie zu humanem Activin A bzw. BMP3 aufweisen. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass zumindest einer dieser potenziell sekretierten Faktoren an der intra - Spezies Kommunikation von *E. multilocularis* beteiligt ist. Mit dieser Art der Interaktion ist auch ein bisher wenig beachteter Vorgang bei der *in vitro* Kultivierung von *E. multilocularis* Metazestoden zu erklären: die weitgehend synchrone Ausbildung von Brutkapseln bzw. Protoskolizes bei gemeinsam *in vitro* kultivierten Metazestoden innerhalb eines begrenzten Zeitraums (Spiliotis, M., mündliche Mitteilung). Es ist dabei durchaus denkbar, dass die einzelnen Metazestoden über TGF- $\beta$  / BMP Signaltransduktion miteinander kommunizieren und damit diesen entscheidenden Entwicklungsprozess synchronisieren. Deutliche Hinweise darauf liefern die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Studien zu den Auswirkungen von humanem BMP2 auf die Differenzierung von Metazestoden, die im folgenden Abschnitt ausführlich diskutiert werden.

#### **5.4. TGF- $\beta$ / BMP Signaling - Effekte auf *E. multilocularis***

Ein großer Anteil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen humaner Zytokine auf *E. multilocularis*. Dementsprechend wurden die Effekte von TGF- $\beta$  / BMP Signaling sowohl in Metazestoden, als auch in Primärzellen und Protoskolizes untersucht.

##### **5.4.1. Effekte auf *E. multilocularis* Metazestoden**

Die Kreuzinteraktion zwischen Wirt und Parasit während einer Alveolären Echinokokkose setzt zunächst die Induktion einer Signaltransduktion durch humane Zytokine und

Signaling - Komponenten des Parasiten voraus, die letztendlich zu Veränderungen der Genexpression in *E. multilocularis* führen.

In früheren Experimenten mit Metazestoden aus Ko-Kultur wurde nach der Inkubation mit humanem BMP2 und einer Ko-Immünpräzipitation mit EmSmadD eine verstärkte Bande bei 60 kDa beobachtet, die mit dem Antikörper anti-Phospho-Smad3 (Ser423/425)/Smad1 (Ser463/465) von Cell Signaling (Danvers, USA) detektiert werden konnte<sup>212</sup>. Nach dem damaligen Wissensstand wurde diese Bande dem zu dieser Zeit nicht vollständig charakterisierten R-Smad EmSmadE aus *E. multilocularis* zugewiesen, während eine zweite Bande auf der Höhe von 50 kDa EmSmadB zugeordnet wurde. Auf Basis der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten vollständigen Charakterisierung von EmSmadE mit einem theoretischen Molekulargewicht von 42,4 kDa, die noch unter dem theoretischen Molekulargewicht von EmSmadB (48,7 kDa) liegt, muss diese Annahme revidiert werden. Es ist äußerst unwahrscheinlich, dass dieses theoretische Molekulargewicht von EmSmadE *in vivo* um fast 20 kDa überschritten wird und dieser R-Smad bei einer Auftrennung per SDS-PAGE ein größeres Molekulargewicht aufweist als EmSmadB. Viel eher sind bei der damaligen Vorgehensweise einige der Fütterzellen aus der Ko-Kultur im Ansatz übriggeblieben, so dass das zugefügte BMP2 zu einer vermehrten Phosphorylierung der entsprechenden R-Smads dieser Reuber H35 Hepatomazellen geführt hat. Für diese These spricht neben dem geringen theoretischen Molekulargewicht von EmSmadE vor allem, dass bereits bei Aktivitätsstudien mit EmSmadA und EmSmadB auf Basis heterologer Expression in HEK 293T Zellen gleichzeitig auch phosphorylierte humane BR-Smads mit einem Molekulargewicht von circa 60 kDa identifiziert werden konnten<sup>94</sup>. R-Smads aus *R. norvegicus* (Reuber H35 Hepatomazellen) und *H. sapiens* (HEK 293T Zellen) gleichen sich zudem sehr stark, so dass von ähnlichen Laufeigenschaften bei einer SDS-PAGE ausgegangen werden kann. Folglich wurde in dieser Studie kein Einfluss von humanem BMP2 auf die Expression oder Phosphorylierung von Echinokokken R-Smads nachgewiesen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte allerdings auf Basis von Genexpressionsstudien eindeutig die durch humanes BMP2 induzierte Veränderung der Expressionsstärke mehrerer cis - gespleißter Gene in *E. multilocularis* nachgewiesen werden. So wurden *embmp2*, *emsmadE* und *emnlg2* nach einer 6-stündigen Inkubation der Metazestoden mit humanem BMP2 nur noch vermindert exprimiert. Diese Ergebnisse weisen eindeutig darauf hin, dass humanes BMP2 auch *in vivo* eine Signaltransduktion in *E. multilocularis* Metazestoden induzieren kann, die von der Sensierung dieses Zytokins an der Zelloberfläche bis zur Regulation der Genexpression im Zellkern reicht. Weiterhin deuten diese Ergebnisse auch auf das Vorliegen eines negativen feedback loops im TGF- $\beta$  / BMP Signaling von *E. multilocularis* hin. So führt die Interaktion der

Echinokokken Rezeptoren mit externem humanen BMP2 zur verminderten Expression von *embmp2*, das für das BMP Homolog EmBMP2 aus *E. multilocularis* codiert. Es ist durchaus möglich, dass beide BMPs zur Induktion der gleichen Signalwege im Fuchsbandwurm führen und somit die HsBMP2 - induzierte Signaltransduktion durch die negative Regulation der Expression von *embmp2* reguliert werden soll. Die verminderte Expression von *emsmadE* in diesem Experiment lässt zudem vermuten, dass der entsprechende Signalweg direkt oder indirekt den BR-Smad EmSmadE umfasst. Die verminderte Expression von *emnlg2* lässt sich auf Basis des derzeitigen Wissensstands in diesem Zusammenhang dagegen nicht eindeutig erklären. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass EmNlg2 kein Antagonist von humanem BMP2 ist. Wäre dies der Fall, so hätte *emnlg2* zur Regulierung des BMP2 - induzierten Signaling in Metazestoden vermehrt exprimiert werden müssen. In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob humanes BMP2 oder TGF- $\beta$ 1 Einfluss auf die Expression *in trans* gespleißter mRNAs in Metazestoden hat. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass dies nicht der Falls ist. So konnten keine verändert exprimierten *in trans* gespleißten mRNAs identifiziert werden. Möglicherweise erfolgt aber auch die Detektion der Expressionsunterschiede auf Basis der verwendeten Methodik nicht spezifisch genug. So konnte auch bei dem in *S. mansoni* durch humanes TGF- $\beta$ 1 und BMP2 regulierten Gen *smgcp* nur eine 2-fach erhöhte bzw. erniedrigte Expression festgestellt werden<sup>288</sup>. Um solch geringe Änderungen der Expressionsstärke feststellen zu können, sollte bei *E. multilocularis* in Zukunft auf die hoch sensitive Methodik der quantitativen RT-PCR mit den entsprechenden Geräten zurückgegriffen werden, was zunächst die Etablierung bzw. Optimierung dieser Methodik bei *E. multilocularis* notwendig macht<sup>290</sup>.

Untersuchungen zum Wachstum axenisch kultivierter Metazestoden unter Einfluss von BMP2 ließen schon vor einigen Jahren eine Verbindung zwischen diesem humanen Zytokin und der Differenzierung von Metazestoden vermuten<sup>98</sup>. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien bezüglich der Auswirkungen von humanem BMP2 auf die Differenzierung von Metazestoden bestätigen diese These. So deuten die hier erzielten Ergebnisse darauf hin, dass die Ausbildung von Brutkapseln in Metazestoden durch humanes BMP2 vorzeitig induziert wird und innerhalb eines verkürzten Zeitraums im Vergleich zur Kontrollgruppe erfolgt. Auch humanes TGF- $\beta$ 1 zeigte diesen Effekt auf Metazestoden, allerdings in geringerem Ausmaß. Die hierbei gemachten Beobachtungen verifizieren zudem die früheren Ergebnisse bezüglich der Auswirkungen von BMP2 auf Größenwachstum und Vitalität axenisch kultivierter Metazestoden<sup>98</sup>.

Diese Beobachtungen zur Rolle von TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* wurden durch die Verwendung von entsprechenden Rezeptor - spezifischen Inhibitoren in ergänzenden Untersuchungen erweitert. Dabei zeigte sich durch die teilweise oder vollständige Inhibierung aller drei Echinokokken Typ I Rezeptoren vor allem SB431542 dazu geeignet, die Rolle von TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* im Gesamten zu untersuchen. Interessant war dabei zum Einen die verminderte Spezifität dieses Inhibitors in *E. multilocularis*, die laut Hersteller bei den humanen Rezeptoren selektiv auf Rezeptoren der TGF- $\beta$  Rezeptorgruppe (Alk-4, Alk-5, Alk-7) beschränkt ist. Die weiterhin andauernde kontroverse Diskussion um die mögliche Inhibierung von Alk-1 durch SB431542 könnte allerdings erklären, warum neben EmRSK2 auch EmRSK1 und EmRSK3 durch diesen Inhibitor gehemmt werden, denn EmRSK1 und EmRSK3 werden beide zur Alk-1 Rezeptorgruppe gezählt. Zum Anderen wurde die Phosphorylierung verschiedener Echinokokken R-Smads durch ein und denselben Rezeptor bei SB431542 - Konzentrationen zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  in unterschiedlichem Maß gehemmt. In früheren Studien wurde dementsprechend schon gezeigt, dass 10  $\mu\text{M}$  SB431542 die Signaltransduktion über EmRSK2, EmRSK4 und EmSmadC bereits vollständig inhibieren kann während das Signaling über die gleichen Rezeptoren und EmSmadA nicht beeinträchtigt wird<sup>212</sup>. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit verifiziert werden. Zusätzlich wurde allerdings gezeigt, dass 50  $\mu\text{M}$  SB431542 das Signaling ausgehend vom EmRSK2 / EmRSK4 Rezeptorkomplex auch über EmSmadA vollständig inhibieren. Leider ist wenig über die Interaktionsmechanismen dieses Inhibitors mit den responsiven Rezeptoren bekannt. Möglicherweise hängen diese Unterschiede bei der Hemmung einzelner Signalwege mit verschiedenen Affinitäten der R-Smads zu den Typ I Rezeptoren zusammen. Dementsprechend wäre die Affinität von EmSmadA zu EmRSK2 größer als diejenige von EmSmadC zum gleichen Typ I Rezeptor. Auch bei EmRSK3 sind Unterschiede bei den zur Inhibierung notwendigen Konzentrationen von SB431542 zu beobachten. So wird das Signaling über den BMP2 - aktivierten Rezeptorkomplex EmRSK3 / EmRSK4 und EmSmadA bzw. EmSmadE bereits bei 10  $\mu\text{M}$  deutlich beeinträchtigt während diese Inhibitorkonzentration keine Auswirkungen auf das EmRSK3 / EmRSK4 / EmSmadB Signaling erkennen lässt. Erst bei 50  $\mu\text{M}$  SB431542 wird der entsprechende Signalweg über EmSmadB nahezu vollständig inhibiert. Folglich hätte EmSmadB die höchste Affinität zu EmRSK3, gefolgt von EmSmadE und EmSmadA an letzter Position.

In Vitalitätsassays konnte zudem gezeigt werden, dass SB431542 in Konzentrationen unter 100  $\mu\text{M}$  keine schädigende Wirkung auf Metazestodenvesikel hat. Allerdings scheint dabei das verwendete Kultivierungssystem einen großen Einfluss auf die Vitalität der Metazestoden unter Einfluss von SB431542 zu haben. So zeigten Metazestoden in



Ko-Kultur im Vergleich zu Vesikeln in axenischer Kultivierung einen erhöhten Verlust ihrer Integrität. Diese Beobachtungen können darauf zurückgeführt werden, dass der Inhibitor die in der Ko-Kultur ebenfalls vorliegenden Reuber H35 Hepatomazellen beeinflusst, so dass diese einen negativen Effekt auf die Vitalität der *E. multilocularis* Metazestoden ausüben. Auf dieser Grundlage deuten weiterführende Überlegungen darauf hin, dass das TGF- $\beta$  / BMP Signaling in Reuber H35 Hepatomazellen entscheidend zur Vitalität der Metazestoden in der *in vitro* Kultivierung beiträgt. Diese Schlussfolgerung müsste allerdings zunächst durch weitergehende Experimente verifiziert werden. Falls dem allerdings tatsächlich so ist, könnte in der Inhibierung von TGF- $\beta$  / BMP Signaling im Wirt ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer antiparasitischer Wirkstoffe liegen. Außerdem sollten die hier gemachten Beobachtungen bei der Versuchsplanung ähnlicher Studien in Zukunft berücksichtigt werden, um unerwünschte indirekte Auswirkungen von Fütterzellen auf die eigentlich untersuchten Metazestoden auszuschließen.

Die Tatsache, dass SB431542 auch *in vitro* mit den Echinokokken Rezeptoren interagieren kann, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Genexpressionsstudien an Metazestoden bewiesen. Dabei wurden bei einer Inhibierung des TGF- $\beta$  / BMP Signaling in Metazestoden durch 10  $\mu$ M SB431542 die Gene *emsmadC*, *emsmadF*, *embmp2* und *emnlg1* im Vergleich mit dem Kontrollansatz vermindert exprimiert, wohingegen *embmp1* und *emnlg2* verstärkt exprimiert wurden. Dabei konnte die Expression von *embmp1* im verwendeten Isolat (G8065) unter dem Einfluss von SB431542 erstmalig mit einer eindeutigen Bande nachgewiesen werden, während in der Kontrollgruppe kein Nachweis möglich war. Dieser starke Unterschied in der Expression deutet auf eine essenzielle Funktion von EmBMP1 in Metazestoden hin, wobei *embmp1* unter den normalen *in vitro* Kultivierungsbedingungen wahrscheinlich auf einem sehr geringen Level konstant exprimiert wird. Auch die verminderte Expression von *embmp2* unter Einfluss von SB431542 kann durch die essentielle Funktion von EmBMP1 erklärt werden. So ist es sehr wahrscheinlich, dass beide BMP Homologe mit denselben Rezeptoren interagieren. Folglich müsste bei einem eingeschränkten Signaling über diese Rezeptoren der für die Metazestoden essenzielle Ligand EmBMP1 vermehrt exprimiert werden, um den Verlust von aktiven Rezeptoren zu kompensieren, während der unwichtigere Ligand EmBMP2 in vermindertem Maß produziert würde, um die Interaktion zwischen EmBMP1 und den entsprechenden Rezeptoren nicht noch zusätzlich einzuschränken. Genau dieses Bild bietet sich in *E. multilocularis* Metazestoden unter Einfluss von SB431542. Die Ergebnisse zur Genexpression von *emnlg2* unter Einfluss von SB431542 bzw. humanem BMP2 (siehe oben) deuten dagegen auf eine entgegengesetzte Wirkung dieser beiden Faktoren auf das Echinokokken TGF- $\beta$  / BMP Signaling. So wird

die Expression von *emnlg2* in Metazestoden durch BMP2 - induziertes Signaling vermindert, durch den Einfluss von SB431542 dagegen verstärkt. Allerdings ist dieses Expressionsmuster von *emnlg2*, einem potenziellen BMP Antagonisten, auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse schwierig zu erklären. Um die Funktion von EmNlg2 vollständig zu verstehen bedarf es demnach weiterer Studien, wie z. Bsp. die Identifikation möglicher Interaktionspartner und die Auswirkungen von EmNlg2 auf Wirtszellen. Die verminderte Expression von *emnlg1* bei einer Hemmung des TGF- $\beta$  / BMP Signaling in Metazestoden deutet in Kombination mit der deutlich verstärkten Expression von *embmp1* unter den gleichen Bedingungen dagegen darauf hin, dass EmNlg1 ein Antagonist von EmBMP1 ist. Entsprechend der vermuteten essenziellen Funktion von EmBMP1 wird folglich bei einer Hemmung des TGF- $\beta$  / BMP Signaling die Expression von *emnlg1* reduziert, um die EmBMP1 induzierte Signaltransduktion nicht noch weiter zu beeinträchtigen. Der Grund für die verminderte Expression von *emsmadC* bei einer Inhibierung des TGF- $\beta$  / BMP Signaling lässt sich im Zusammenhang mit EmBMP1 nur durch die Ausbildung heteromerer Smad Komplexe erklären. So konnte bereits gezeigt werden, dass die durch BMP Signaling aktivierten R-Smads EmSmadA und EmSmadB beide mit aktiviertem EmSmadC interagieren können und aktivierter EmSmadA zusätzlich auch Homodimere mit inaktivem EmSmadC ausbilden könnte<sup>97</sup>. Diese Interaktionen behindern möglicherweise eine EmBMP1 induzierte Signaltransduktion, da heteromere R-Smad / EmSmadC / EmSmadD Komplexe wahrscheinlich andere Gene regulieren als homomere oder heteromere Komplexe ohne den AR-Smad EmSmadC. Folglich könnte auch bei *emsmadC* der Grund für die veränderte Expression bei einer Hemmung des TGF- $\beta$  / BMP Signaling auf der essenziellen Funktion von EmBMP1 bzw. EmBMP1 induzierter Signaltransduktion in Metazestoden zu finden sein, vorausgesetzt dieses Signaling erfolgt nicht über EmSmadC. Für die verminderte Expression von *emsmadF* unter Einfluss von SB431542 kann dagegen recht schnell eine Erklärung gefunden werden. Da das TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* bereits durch den Inhibitor weitestgehend gehemmt ist, wird die basale Expression dieses I-Smad vermutlich noch weiter vermindert, um die verbleibenden TGF- $\beta$  / BMP Signale nicht vollständig zu inhibieren. Allerdings bleibt die Regulation der TGF- $\beta$  / BMP Signaltransduktion auch unter diesen Bedingungen noch essenziell, so dass die Expression von *emsmadF* nicht vollständig unterdrückt wird. Auf Basis der durchgeführten Genexpressionsstudien mit SB431542 lassen sich auch allgemeine regulatorische Vorgänge beim TGF- $\beta$  / BMP Signaling in Metazestoden ableiten. So deuten die Ergebnisse zusammenfassend darauf hin, dass vor allem die potenziell sekretierten Echinokokken Zytokine EmBMP1, EmBMP2, EmNlg1 und EmNlg2 durch Veränderungen der Genexpression reguliert werden. Die Produktion der Rezeptoren wird

dagegen vermutlich nicht auf Ebene der Transkription reguliert, sondern durch Degradationsprozesse. Dementsprechend wurde die Expression der Rezeptor - codierenden Gene weder durch die Induktion von BMP Signaling noch durch die weitgehende Inhibierung von TGF- $\beta$  / BMP Signaling in Metazestoden verändert. Vielmehr scheint die Regulation von *emsmadF* in diesem Zusammenhang darauf hinzudeuten, dass dieser I-Smad zum Einen mit Rezeptoren interagieren kann und dass zum Anderen die durch EmSmadF induzierte Degradation der Rezeptoren bei einer Einschränkung des TGF- $\beta$  / BMP Signaling in Metazestoden (durch SB431542) reduziert wird. Diese verminderte Degradation von TGF- $\beta$  / BMP Rezeptoren wird nach dieser These allerdings wiederum auf Basis der Genexpression von *emsmadF* reguliert.

Die Auswirkungen von SB431542 wurden zusätzlich in Bezug auf die Differenzierung von *E. multilocularis* Metazestoden untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die weitgehende Hemmung des TGF- $\beta$  / BMP Signaling die entgegengesetzten Effekte auf die Differenzierung von Metazestoden hat wie die Induktion des BMP Signaling mit Hilfe von humanem BMP2 (siehe oben). So wurde die Ausbildung von Brutkapseln unter Einfluss von SB431542 im Vergleich mit der Kontrollgruppe deutlich vermindert. In Kombination zeichnen diese Ergebnisse ein sehr klares Bild von der Funktion des BMP Signaling in *E. multilocularis*. Während die Aktivierung von Echinokokken BMP Signaling die Ausbildung von Brutkapseln in Metazestoden induziert, wird dieser Vorgang der Differenzierung durch die Hemmung des BMP Signaling inhibiert. Die negativen Effekte von SB431542 auf das Größenwachstum der Metazestoden sind darauf zurückzuführen, dass dieser Inhibitor nicht ausschließlich den BMP Signalweg in Metazestoden hemmt sondern zusätzlich auch alle anderen Signaling - Vorgänge über die TGF- $\beta$  / BMP Rezeptoren. Auswirkungen auf die Vitalität der Metazestoden durch SB431542 konnten dabei ausgeschlossen werden.

Um das BMP Signaling in *E. multilocularis* Metazestoden im Detail zu verstehen, wurde der Versuch unternommen, die bereits gewonnenen Erkenntnisse durch zusätzliche Studien unter der Verwendung des BMP Rezeptor - spezifischen Inhibitors Dorsomorphin nochmals zu erweitern. Dazu wurde zunächst die Interaktion dieses Inhibitors mit den Echinokokken BMP Rezeptoren EmRSK1 und EmRSK3 untersucht. Es zeigte sich dabei, dass 10  $\mu$ M Dorsomorphin die Signalwege EmRSK1 / EmRSK4 / EmSmadB und EmRSK3 / EmRSK4 / EmSmadA hemmt, während das Signaling über EmRSK3, EmRSK4 und EmSmadB bzw. EmSmadE nicht eingeschränkt wurde. Höhere Konzentrationen des Inhibitors wurden aufgrund möglicher Kreuzinteraktionen mit EmRSK2 bzw. anderen Serin / Threonin oder Tyrosin Kinasen in *E. multilocularis* nicht verwendet. Die spezifische Inhibierung der beiden oben genannten Signalwege kann durch die bereits diskutierten unterschiedlichen Affinitäten der R-Smads zu den Rezeptoren begründet

werden. So konnte bereits bei SB431542 gezeigt werden, dass EmSmadA im Vergleich mit EmSmadB und EmSmadE die niedrigste Affinität zu EmRSK3 aufweist. Entsprechend könnte auch die Affinität von EmRSK1 zu EmSmadB auf einem ähnlichen Niveau zu finden sein. Letztendlich kann allerdings das BMP Signaling im Fuchsbandwurm mit Hilfe von Dorsomorphin nicht vollständig inhibiert werden, wobei dieser Inhibitor trotzdem zur spezifischen Untersuchung der beiden Signalwege EmRSK1 / EmRSK4 / EmSmadB und EmRSK3 / EmRSK4 / EmSmadA durchaus geeignet scheint.

Untersuchungen zur Vitalität von Metazestoden unter Einfluss von Dorsomorphin zeigten deutlich, dass dieser Inhibitor in Konzentrationen unter 100  $\mu\text{M}$  keine schädigende Wirkung hat. Auf Basis dieser Studien identifizierte Unterschiede im BMP Signaling bei verschiedenen Isolaten werden in Kapitel 5.5 ausführlich diskutiert.

Die Auswirkungen von Dorsomorphin wurden auch im Hinblick auf die Differenzierung von Metazestoden untersucht. Hierbei zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei SB431542, nämlich eine hemmende Wirkung auf die Ausbildung von Brutkapseln durch Metazestoden. Allerdings wurde dieser Effekt, anders als bei SB431542, nach 21 Tagen aufgehoben. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Regulation der Differenzierung von Metazestoden nicht allein durch Signaling über EmRSK1 / EmRSK4 und EmSmadB oder EmRSK3 / EmRSK4 / EmSmadA erfolgt. Ein Einfluss dieser beiden Signalwege auf die Ausbildung von Brutkapseln ist allerdings nicht ausgeschlossen. Im Gegensatz zu SB431542 zeigt sich bei Dorsomorphin kein Effekt auf das Größenwachstum der Vesikel, was wiederum bestätigt, dass dieser Effekt bei SB431542 auf die umfassende Hemmung des TGF- $\beta$  / BMP Signaling zurückzuführen ist und nicht spezifisch durch die Inhibierung des BMP Signaling bedingt wird.

Auf Basis der selektiven Inhibierung von humanem Alk-5 (Angaben des Herstellers) sollte durch die Verwendung von LY364947 weiterhin spezifisch das Signaling über EmRSK2, der zur Alk-5 (TGF- $\beta$ ) Rezeptorgruppe gezählt wird, untersucht werden. Dabei zeigte sich bei ersten Untersuchungen mit Echinokokken Rezeptoren allerdings ein alternatives Inhibitionsschema von LY364947. So hemmte dieser Wirkstoff ausschließlich den der Alk-1 Gruppe zugehörigen Rezeptor EmRSK3, wohingegen die Signalweiterleitung über EmRSK2 und EmRSK1 nicht beeinträchtigt wurde. Überraschend sind dabei auch die unterschiedlich starken Auswirkungen dieses Inhibitors auf die Aktivierung von EmSmadA, EmSmadB und EmSmadE. So führten 10  $\mu\text{M}$  LY364947 zur vollständigen Inhibierung von EmRSK3 / EmRSK4 Signaling über EmSmadB, während die Aktivierung von EmSmadE zwar verringert, aber dennoch deutlich stärker als bei EmSmadB zu erkennen war und die Signaltransduktion über EmSmadA nur leicht beeinträchtigt wurde. Erklärungen für diese Beobachtungen lassen sich im sehr gut definierten Wirkmechanismus von LY364947 finden. So deutet der gleichmäßige Abfall

der Phosphorylierung bei Erhöhung der InhibitorKonzentration bei EmSmadA und EmSmadE auf eine erfolgreiche kompetitive Verdrängung von ATP durch den Inhibitor, wodurch die Kinaseaktivität von EmRSK3 beeinträchtigt wird. Die plötzliche vollständige Inhibierung der EmSmadB - Aktivierung zwischen 5 und 10µM LY364947 deutet dagegen auf einen anderen hemmenden Mechanismus hin. So ist es möglich, dass die Anwendung von 10 µM LY364947 in diesem Versuchsaufbau eine Konformationsänderung von EmRSK3 auslöst, die die Interaktion mit EmSmadB verhindert, während die Interaktion mit EmSmadA und EmSmadE dadurch nicht beeinträchtigt wird. Allerdings würde diese Erklärung voraussetzen, dass EmSmadA und EmSmadE im Vergleich zu EmSmadB durch alternative Bindungsstellen mit EmRSK3 interagieren. Solche alternativen Interaktionsstellen konnten im ausgiebig erforschten humanen System bisher nur bei den I-Smads Smad6 und Smad7 in Verbindung mit BMP Typ I Rezeptoren gezeigt werden<sup>241</sup>. Weitere Studien belegen, dass LY364947 bei Konzentrationen bis 100 µM die Zellen von Metazestoden nicht schädigt und auch keine signifikanten Auswirkungen auf die Integrität der Metazestoden hat. Damit ist LY364947 sehr gut für zukünftige Studien bezüglich der spezifischen Rolle von EmRSK3 im TGF-β / BMP Signaling in *E. multilocularis* geeignet. Alternativ steht für solche Untersuchungen natürlich auch die Anwendung von RNAi zur Verfügung.

Kombiniert man den weiter oben in diesem Abschnitt diskutierten Einfluss von humanem BMP2 auf die Genexpression, die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung von EmSmadE und die Auswirkungen von humanem BMP2 auf die Differenzierung von Metazestoden, so kommt man zu recht klaren Schlussfolgerungen bezüglich der Mechanismen und Funktion von BMP Signaling in *E. multilocularis* Metazestoden. Humanes BMP2 kann dementsprechend sowohl mit den Rezeptoren EmRSK1 und EmRSK4 als auch mit EmRSK3 und EmRSK4 aktivierte Liganden - Rezeptorkomplexe ausbilden. Die Signalweiterleitung kann dementsprechend im Zytoplasma über EmSmadA, EmSmadB, EmSmadE oder über Kombinationen dieser R-Smads weitergeführt werden. Auch zytoplasmatisch vorliegender inaktiver EmSmadC kann möglicherweise durch aktivierten EmSmadA in diese durch humanes BMP2 induzierte Signaltransduktion mit einbezogen werden. Der Co-Smad EmSmadD kann wiederum mit allen identifizierten R-Smads interagieren, so dass funktionelle heterogene R-Smad / EmSmadD Komplexe ausgebildet werden können. Nach der Translokation in den Nukleus können EmSmadA und EmSmadB, nicht aber EmSmadE, mit dem transkriptionellen Ko-Regulator EmSkip interagieren. Diese Signaltransduktion induziert über die Regulation spezifischer Gene die Ausbildung von Brutkapseln in Metazestoden und ist damit entscheidend für die Differenzierung von *E. multilocularis* und die Entwicklung von Protoskolizes. Im Rahmen

eines negativen feedback loop, in dessen Verlauf sich die Expression von *emsmadE* vermindert, wird dieser Signaltransduktionsweg reguliert.

Weiterhin sprechen die veränderte Expression von *embmp2* nach der Induktion dieses Signalwegs und die Sensierung eines sekretierten Faktors von *E. multilocularis* durch den Rezeptorkomplex EmRSK3 / EmRSK4 stark dafür, dass EmBMP2 mit den gleichen Rezeptoren interagiert wie humanes BMP2.

Ebenso ist auch EmBMP1 als Ligand dieser Rezeptoren anzusehen. Die essenzielle Funktion von EmBMP1 wurde zudem durch die vermutlich darauf abgestimmte Regulation der Genexpression weiterer Faktoren des Echinokokken TGF- $\beta$  / BMP Signaling (vor allem *embmp2*, *emsmadC* und *emsmadF*) bei einer Hemmung aller TGF- $\beta$  / BMP Rezeptoren gezeigt.

Folglich sind vermutlich sowohl EmBMP1 als auch EmBMP2 im Rahmen von intra - Spezies Kommunikationsvorgängen an der Interaktion einzelner Metazestodenvesikel beteiligt, wodurch die synchrone Entwicklung von Protoskolizes bei *in vitro* kultivierten Metazestoden gesteuert wird. Diese synchrone Entwicklung von Protoskolizes ist durchaus sinnvoll, da auch im natürlichen Lebenszyklus von *E. multilocularis* zum optimalen Zeitpunkt (wenn der Zwischenwirt aufgrund der Infektion eine leichte Beute für den Endwirt ist) eine möglichst große Anzahl magensaftresistenter Protoskolizes vorliegen muss, die im Endwirt aktiviert werden und zum Adultstadium ausreifen können. Im Fehlwirt Mensch ist die Ausbildung von Protoskolizes dagegen von keiner entscheidenden Bedeutung, da es sehr unwahrscheinlich ist, dass von hier aus wiederum ein Endwirt infiziert wird. Entsprechend lassen sich in infiziertem Gewebe des Menschen auch nur sehr selten Protoskolizes nachweisen<sup>5,20</sup>. Diese Erkenntnisse lassen auf gravierende Unterschiede beim BMP Signaling von *E. multilocularis* in geeigneten Zwischenwirten und Fehlwirten schließen bzw. deuten auf weitere ungeklärte regulatorische Vorgänge beim BMP Signaling im Fehlwirt Mensch.

#### 5.4.2. Effekte auf *E. multilocularis* Primärzellen

Studien zur zellulären Kommunikation bei *E. multilocularis* Primärzellen können Einblicke in grundlegende Entwicklungsvorgänge bei der metastasierenden Ausbreitung von *E. multilocularis* während einer Alveolären Echinokokkose liefern. Zudem lassen sich eindeutig Parallelen zwischen sich regenerierenden *in vitro* kultivierten Primärzellen und der Etablierung von Metazestodengewebe in einem frühen Stadium der Infektion bei *E. multilocularis*, *E. granulosus* und anderen Cestoden finden<sup>90,99,291-292</sup>. Damit könnte die Erforschung der Entwicklungsvorgänge in Primärzellen einen entscheidenden Beitrag zur Identifikation neuer Ansatzpunkte zur Bekämpfung der Alveolären Echinokokkose leisten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden

dementsprechend Untersuchungen zur Rolle von TGF- $\beta$  / BMP Signaling in *E. multilocularis* Primärzellen durchgeführt.

In einem ersten Teil wurden dabei mögliche Effekte von humanem BMP2 und TGF  $\beta$ 1 auf die Regeneration von vereinzelt Primärzellen untersucht. Leider ließen die Ergebnisse hierbei keine eindeutigen Schlussfolgerungen zu. Möglicherweise ist der Einfluss von BMP2 auf einzelne Zellen von *E. multilocularis* abhängig von einem BMP - Konzentrationsgradienten, der auch in anderen Organismen bei grundlegenden Entwicklungsvorgängen eine entscheidende Rolle spielt<sup>177,188-189</sup>. Allerdings konnte solch ein Gradient im verwendeten Versuchsaufbau nicht generiert werden. Dazu müsste ein modifiziertes Kultivierungssystem etabliert werden, in dem die Zellaggregate beispielsweise in Kollagen fixiert werden, so dass durch die Zugabe von BMP einerseits und Noggin andererseits ein solcher Gradient aufgebaut werden kann. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass neben humanem BMP2 und TGF $\beta$ 1 auch andere Zytokine der TGF- $\beta$  Superfamilie einen Einfluss auf die Regeneration von *E. multilocularis* Primärzellen haben.

Die Applikation von Dorsomorphin auf *E. multilocularis* Primärzellen zeigte sehr starke Auswirkungen auf die Regeneration dieser Zellen. So bildeten sich unter Anwesenheit von Dorsomorphin im Unterschied zum Kontrollansatz nur sehr kleine Aggregate und entsprechende cavities. Allerdings konnte bei diesem Versuchsansatz die Anreicherung von Dorsomorphin im Medium nicht vollständig ausgeschlossen werden, so dass es möglicherweise zu Kreuzinteraktionen mit strukturell ähnlichen Serin / Threonin oder Tyrosin Kinasen aus *E. multilocularis* gekommen ist. Damit können anhand der in diesem Versuchsansatz erlangten Ergebnisse keine eindeutigen Aussagen über den Einfluss von EmRSK1 / EmRSK4 / EmSmadB Signaling oder den EmRSK3 / EmRSK4 / EmSmadA Signalweg auf die Regeneration von Primärzellen gemacht werden.

Bei SB431542 ist im Gegensatz zu Dorsomorphin keine Kreuzinteraktion mit Kinasen außerhalb des TGF- $\beta$  / BMP Signaling bekannt. Dementsprechend werden auch bei der Auswertung der Daten zu den Auswirkungen von SB431542 keine Einschränkungen gemacht. SB431542 führte bei Anwendung auf Primärzellen von *E. multilocularis* eindeutig zu einer verminderten Dichte der Zellaggregate und zu einer geringeren Größe der cavities im Vergleich mit dem Kontrollansatz. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Beeinträchtigung bzw. Inhibierung von TGF- $\beta$  / BMP Signaling in vereinzelt Primärzellen einen Einfluss auf die Regeneration dieser Zellen hat.

Zusammenfassend konnte mit diesem Teilprojekt der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  / BMP Signaling eine Funktion bei der Regeneration von Primärzellen hat. Allerdings ist weiterhin unklar, welche Zytokine und TGF- $\beta$  / BMP Rezeptoren bzw. welche spezifischen TGF- $\beta$  / BMP Signalwege bei diesem Vorgang

involviert sind. In diesem Zusammenhang wären Methoden nützlich, mit denen unter anderem die entsprechenden TGF- $\beta$  / BMP Rezeptoren in Primärzellen lokalisiert werden könnten (z. Bsp. auf Basis von Immunhistochemie). Zudem sollten auch mögliche Auswirkungen anderer Zelltypen bei solchen Experimenten beachtet werden. Die Entwicklung einer Technik zur Aufreinigung der eigentlichen Primärzellen aus dem bisher verwendeten Gemisch vereinzelter Metazestodenzellen würde die Durchführung der entsprechenden Experimente in einer reinen Primärzellkultur erlauben, was letztendlich die Interpretation der Daten womöglich sehr vereinfachen könnte.

#### 5.4.3. Effekte auf *E. multilocularis* Protoskolizes

Auch bei der Entwicklung von Protoskolizes sind pluripotente Stammzellen beteiligt, wie bei *E. granulosus* bereits anhand einer hohen Zellteilungsrate bei Stammzellen im Bereich des Saugnapfes festgestellt werden konnte<sup>293</sup>. Entsprechend der bereits diskutierten stimulierenden Effekte von BMP auf die Differenzierung von Metazestoden, wurden die Effekte der TGF- $\beta$  / BMP Signaltransduktion mit Hilfe der Inhibitoren SB431542 und Dorsomorphin auch im Hinblick auf Entwicklungsvorgänge bei *E. multilocularis* Protoskolizes untersucht.

Dabei konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Hemmung von TGF- $\beta$  / BMP Signaling durch SB431542 zu einer verstärkten bzw. verfrühten Redifferenzierung der Protoskolizes zu Metazestoden führt, wie sie in geringerem Ausmaß auch bei der *in vitro* Kultivierung von Protoskolizes unter den für Metazestoden optimalen Bedingungen stattfindet.

Die Applikation von Dorsomorphin zeigt bei Protoskolizes noch deutlichere Effekte als bei SB431542. So wird bereits bei einer geringen Menge Dorsomorphin eindeutig die Redifferenzierung der Protoskolizes induziert. Allerdings wird das Stadium der gerundeten Protoskolizes nicht überwunden, wie man an der sehr niedrigen Anzahl kugelförmiger Protoskolizes beobachten kann. Durch die geringe verwendete Konzentration des Inhibitors können bei dieser Studie, im Unterschied zu anderen Versuchen mit Dorsomorphin, Kreuzinteraktionen mit anderen Serin / Threonin oder Tyrosin Kinasen in *E. multilocularis* ausgeschlossen werden. Daher ist diese Induktion der Redifferenzierung eindeutig auf die Hemmung des Signalwegs EmRSK1 / EmRSK4 / EmSmadB oder EmRSK3 / EmRSK4 / EmSmadA zurückzuführen. Ebenso ist es möglich, dass die Effekte durch die kombinierte Inhibierung beider Signalwege verursacht werden.

In Kombination mit den Auswirkungen von humanem BMP2 und SB431542 auf Metazestoden deuten diese Ergebnisse eindeutig darauf hin, dass die Induktion von BMP Signaling in *E. multilocularis* Metazestoden die Differenzierung zum Protoskolexstadium



lanciert, während sie in Protoskolizes die Redifferenzierung zumindest verlangsamt. Damit kann das BMP Signaling in *E. multilocularis* eindeutig der Entwicklung und Persistenz von Protoskolizes zugeordnet werden.

### 5.5. TGF- $\beta$ / BMP Signaling - Unterschiede zwischen einzelnen Isolaten

Unterschiede im TGF- $\beta$  / BMP Signaling einzelner Isolate konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit eindeutig durch die unterschiedlich starken Effekte von Dorsomorphin auf die Integrität von Metazestoden beobachtet werden. So verloren basierend auf Dorsomorphin deutlich mehr Metazestoden des Isolats J31 ihre Integrität als diejenigen des Isolats H95. Die Anzahl zusammengefallener Vesikel des Isolats G8065 lag zwischen den beiden anderen Isolaten. Diese Beobachtungen deuten auf Unterschiede im BMP Signaling zwischen den einzelnen *E. multilocularis* Isolaten hin. Dabei wurden J31 und G8065 aus sehr nah miteinander verwandten Primaten isoliert, *Macacca fascicularis* und *Macacca mulatta*, womit die verschieden ausgeprägte Resonanz auf Dorsomorphin bei den jeweiligen Metazestoden höchstwahrscheinlich unabhängig von der Herkunft der Isolate ist. Viel eher sollten diese Unterschiede mit einer weiteren (beiläufig gemachten) Beobachtung bei *in vitro* kultivierten Metazestoden in Verbindung gebracht werden. So wurde von mir selbst und auch anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die sich mit *in vitro* kultivierten Metazestoden beschäftigen, beobachtet, dass Metazestoden von *E. multilocularis* bei einer Kultivierung im Forschungslabor über die Jahre immer weniger Protoskolizes produzieren (Spiliotis, M. und Förster, S., mündliche Mitteilung). So war es bis 2005 beim Isolat H95 noch möglich, die Ausbildung von Protoskolizes bei *in vitro* kultivierten Metazestoden zu beobachten und für anschließende Experimente ausreichend Protoskolizes aus infizierten Labortieren zu gewinnen. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Isolat H95 bereits seit 10 Jahren in Forschungslaboren kultiviert. Nach 2005 wurden die nach gleichem Protokoll isolierten Mengen an Protoskolizes zu wenig, um damit nachfolgende Versuchsreihen ansetzen zu können und auch in der *in vitro* Kultur konnten nur noch vereinzelt Metazestoden mit Protoskolizes beobachtet werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde beim Isolat J31 gemacht, das seit Anfang 2003 im Forschungslabor kultiviert wird. Hier wurde bereits nach 4 Jahren eine stark verminderte Differenzierung der Metazestoden in der *in vitro* Kultivierung beobachtet. Entsprechend konnten ab 2007 auch eindeutig weniger Protoskolizes aus infizierten Labortieren isoliert werden. Bei den beiden Isolaten GH09 und G8065, die erst seit 2009 im Labor kultiviert werden, ist dagegen bis jetzt keine Einschränkung bei der Ausbildung von Protoskolizes zu beobachten. Es ist sogar sehr schwierig, für Versuche zur Differenzierung ausreichend Metazestoden ohne Brutkapseln zu kultivieren.

Dementsprechend kann man bei diesen beiden Isolaten sowohl Metazestoden mit Protoskolizes in der *in vitro* Kultur beobachten, als auch große Mengen Protoskolizes aus infizierten Labortieren isolieren. Zusammen mit den unterschiedlichen Auswirkungen von Dorsomorphin auf die Integrität von Metazestoden und der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Funktion von BMP Signaling in *E. multilocularis* Metazestoden sprechen diese Beobachtungen eindeutig dafür, dass das BMP Signaling in *E. multilocularis* durch die Kultivierung in Laboren beeinträchtigt wird. Eine mögliche Erklärung dafür ist in der mehrjährigen Passage von Parasitenmaterial im Peritoneum von Labortieren zu finden, wodurch für *E. multilocularis* der evolutionäre Druck des natürlichen Lebenszyklus fehlt, zum Fortbestand der Art Protoskolizes auszubilden. Solch eine hohe Anpassungsfähigkeit im Rahmen der asexuellen Vermehrung ist vor allem beim eng verwandten *E. granulosus* bereits bekannt und wird in Fachkreisen auf hohe Mutationsraten in Stammzellen zurückgeführt<sup>294-296</sup>. In Bezug auf *E. multilocularis* könnten zukünftige Studien einen Aufschluss darüber geben, ob es z. Bsp. in einzelnen Isolaten bei den Faktoren des BMP Signaling zu Mutationen gekommen ist. Durch quantitative RT-PCR könnte zudem als vergleichende Studie verschiedener Isolate die jeweilige Expressionsstärke der entsprechenden zugehörigen Gene analysiert werden. Diese Untersuchung könnte zudem dabei helfen, die Unterschiede bei der Genexpressionsanalyse basierend auf semi - quantitativer PCR (Isolat G8065) und den Transkriptomdaten (Isolat H96, J31 und Java) zu erklären.

#### **5.6. TGF- $\beta$ / BMP Zytokine und Antagonisten aus *E. multilocularis***

Wachstum und Entwicklung von *E. multilocularis* während einer Alveolären Echinokokkose basieren auf einem ausgewogenen Gleichgewicht zwischen der Immunabwehr des Wirts und immunmodulatorischen Techniken des Parasiten. Bei *B. malayi* konnte bereits gezeigt werden, dass ein sekretierter Faktor der TGF- $\beta$  Superfamilie, BmTgh-2, mit TGF- $\beta$  Rezeptoren des Wirts interagieren kann und damit möglicherweise eine entscheidende immunsuppressive Funktion hat<sup>174</sup>. Ähnliche Effekte könnten auch die potenziell sekretierten Faktoren der TGF- $\beta$  Superfamilie von *E. multilocularis*, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifiziert und strukturell charakterisiert wurden, aufweisen.

So liegen im Fuchsbandwurm vier Isoformen vom BMP homologen Faktor EmBMP1 vor, wobei drei Isoformen (EmBMP1a, b und c) bereits früher charakterisiert wurden<sup>95</sup>. EmBMP1 Isoform d wurde dagegen im Laufe der vorliegenden Arbeit identifiziert. Die Isoformen unterscheiden sich nur im N-terminalen Bereich, während das C-terminale active peptide unverändert ist. Das gleiche gilt für EmBMP2, einem bisher unbekanntem BMP Homolog. Auch hier konnten drei mögliche Isoformen identifiziert werden

(EmBMP2a, -b und c), die auf alternatives Spleißen zurückzuführen sind. Auch diese Isoformen unterscheiden sich ausschließlich im N-terminalen Bereich. Es ist denkbar, dass diese Unterschiede zu alternativen Faltungen des active peptide von EmBMP1 und EmBMP2 führen, was wiederum Interaktionen mit Rezeptoren oder Antagonisten verändern kann. Während bei EmBMP1 neben der C-terminalen TGF- $\beta$  Domäne keine weitere konservierte Domäne identifiziert werden konnte, liegt bei EmBMP2 im N-terminalen Bereich zusätzlich eine konservierte Domäne der TGF- $\beta$  Propeptid Superfamilie vor. Alle Isoformen von EmBMP1 und EmBMP2 zeigen zusätzlich eine putative Spleißstelle für Furin - like Proteasen der SPC - Familie. Damit ist die für die Funktion des Zytokins entscheidende Abspaltung des Propeptids vom active peptide möglich. Die active peptides beinhalten ebenfalls bei allen Isoformen von EmBMP1 und EmBMP2 die für Faktoren der BMP Subfamilie typischen sieben Cysteine, die für die richtige Faltung und zur Homodimerisierung notwendig sind. Das active peptide von EmBMP2 weist zudem eine hohe Homologie zum humanen BMP3 auf, wobei eine Analyse des genomischen Locus von *embmp2* keinen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung mit homologen Genen anderer Organismen erkennen ließ. Die strukturelle Charakterisierung der EmBMP2a Domäne der TGF- $\beta$  Propeptid Familie lässt darauf schließen, dass das entsprechende Peptid nach der Abspaltung vom active peptide eine vergleichbare Funktion übernimmt wie auch die humanen BMP Propeptide. Damit dient dieses Peptid, wie oben schon angesprochen, der funktionellen Faltung des active peptide und bildet mit diesem einen SLC aus, interagiert aber vermutlich nicht mit LTBP's und vermittelt dem active peptide keine Latenz, wie die LAPs der humanen TGF- $\beta$  Faktoren. Folglich werden auch die Interaktionen mit den entsprechenden Typ I und Typ II Rezeptoren in ihrem Ablauf eher den humanen BMPs folgen als den humanen TGF- $\beta$  Faktoren. So interagiert EmBMP2a vermutlich zunächst mit Typ I Rezeptoren, woraufhin eine Komplexbildung von EmBMP2a, Typ I und Typ II Rezeptoren erfolgt. Bei den Isoformen EmBMP2b und -c ist nur der C-terminale Teil des Propeptids konserviert, so dass zumindest die Dimerisierung des Propeptids möglich scheint. EmBMP2a, -b und -c weisen ebenso wie EmBMP1d keine konservierte Sequenz eines Signalpeptids auf. Entsprechend werden diese Isoformen vermutlich nicht über bekannte Mechanismen sekretiert, sondern über alternative Wege. Solche alternativen Transportmechanismen wurden schon beim TGF- $\beta$  / BMP Rezeptor aus *S. mansoni* vorgeschlagen, der trotz fehlendem Signalpeptid an der Membran lokalisiert werden konnte<sup>297</sup>. Auch bei EmRSK1, EmRSK3 und EmRSK4 muss der Transport an die Zelloberfläche über alternative Wege verlaufen, denn diesen Oberflächenrezeptoren fehlen ebenfalls die entsprechenden konservierten Signalpeptide, wobei sie allerdings in HEK 293T Zellen funktionell an der Zelloberfläche exprimiert werden<sup>1,96,212</sup>. Genexpressionsanalysen mit Isolat G8065

zeigten eine stadienspezifische Expression von EmBMP2, allerdings konnte hierbei nicht zwischen den einzelnen Isoformen unterschieden werden. So konnte die stärkste Expression in der Primärzellkultur von *E. multilocularis* nachgewiesen werden, gefolgt von Protoskolizes (aktiviert und nicht aktiviert) und Metazestoden mit der schwächsten Expression. Analysen der vorläufigen Transkriptomdaten lassen allerdings mit der stärksten Expression in aktivierten Protoskolizes ein leicht anderes Expressionsmuster erkennen, basieren allerdings auch auf anderen *E. multilocularis* Isolaten. Trotz der Unterschiede deuten die Ergebnisse der *embmp2* Genexpressionsanalyse eine Rolle dieses Faktors bei der Entwicklung von Stammzellen an, die sowohl in Primärzellen als auch in Protoskolizes zu finden sind<sup>90</sup>. Analysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigten eine Homologie zu BmTgh-1, dem eine Funktion bei der Entwicklung und Differenzierung von *B. malayi* zugeschrieben wird<sup>173</sup>. Der homologe Faktor aus *S. mansoni*, SmBMP, konnte in Protonephridien und als sekretiertes Produkt adulter männlicher Würmer identifiziert werden, wobei die Funktion von SmBMP noch unbekannt ist<sup>171</sup>.

Die in den vorhergehenden Kapiteln diskutierte Funktion von BMP Signaling in *E. multilocularis* legt gemeinsam mit den Genexpressionsstudien bei Metazestoden unter Einfluss von humanem BMP2 sowie SB431542 nahe, dass vor allem EmBMP1 eine essenzielle Funktion hat und grundlegende Vorgänge in *E. multilocularis* Metazestoden reguliert. EmBMP2 könnte im Rahmen von Entwicklungsvorgängen bei Stammzellen an der Reifung von Protoskolizes beteiligt sein. Neben diesen Funktionen ist es aber auch durchaus möglich, dass EmBMP1 und EmBMP2 als sekretierte Zytokine mit TGF- $\beta$  / BMP Rezeptoren des Wirts interagieren und wie auch humane BMP Faktoren Einfluss auf die Produktion der extrazellulären Matrix, die Eisenhomöostase oder Regenerationsprozesse in der Wirtsleber haben. Damit könnte *E. multilocularis* mit Hilfe dieser BMP Homologe die Physiologie des Wirts zum eigenen Vorteil beeinflussen.

Unabhängig von zellulären Komponenten müssen auch TGF- $\beta$  / BMP Zytokine spezifisch regulierbar sein. Diese Regulation erfolgt bei TGF- $\beta$  Zytokinen grundsätzlich durch die Komplexbildung mit LAP, dem an das active peptide gebundenen Propeptid von TGF- $\beta$  Faktoren. BMPs werden dagegen durch spezifische Antagonisten wie Noggin blockiert, so dass die Interaktionen von Ligand und Rezeptor mit Hilfe entsprechender Konzentrationen von Noggin reguliert werden. Bei *E. multilocularis* konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei Noggin - like Homologe identifiziert werden, EmNlg1 und EmNlg2, die als BMP Antagonisten auftreten könnten. Bei *emnlg1* sind interessanterweise zwei mRNA Varianten zu finden, die auf alternativem Spleißen in der 3' UTR basieren. Solche alternativen Spleißprozesse sind auch bei Säugern weit verbreitet<sup>298-300</sup>. Weiterhin ist allgemein bekannt, dass die 3' UTR von mRNAs eine Rolle

bei der Stabilisierung, Lokalisierung und Translation von mRNAs spielt, wobei Interaktionen mit regulatorischen Proteinen und RNAs, wie z. Bsp. microRNAs, diese Funktionen regulieren<sup>301-302</sup>. Sandberg *et al.* konnten zeigen, dass verkürzte mRNAs mit einer verminderten Anzahl von microRNA Interaktionsstellen, die durch alternatives Spleißen in der 3'UTR zustande kommen, mit einer erhöhten Proteinexpression und Zellproliferation einhergehen<sup>303</sup>. Bei *E. multilocularis* könnte das alternative Spleißen in der 3'UTR von *emnlg1* auf einen ähnlichen regulatorischen Mechanismus hinweisen. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass *emnlg1* in Metazestoden, Protoskolizes (aktiviert und nicht aktiviert) sowie in Primärzellen gleichmäßig exprimiert wird. Natürlich kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden, dass die Genexpression von *emnlg1* unter spezifischen Bedingungen durch die genannten Mechanismen kurzfristig stark verändert werden kann. Auf Basis der Genorganisation konnte bei *emnlg1* kein nahes verwandtschaftliches Verhältnis zu homologen Genen aus *S. mansoni* oder *H. sapiens* festgestellt werden. BLAST - Analysen zeigten jedoch eine hohe Homologie zu den Noggin - like Proteinen Smed-Nlg7 und Smed-Nlg8 aus *S. mediterranea*. Diese Homologie spiegelt sich in der konservierten Noggin Domäne wieder, in dem eine für Noggin - like Proteine typische Insertion zu finden ist. Diese Insertion umfasst bei EmNlg1 im Vergleich zum homologen Bereich von humanem Noggin 67 Aminosäuren. Zudem konnte die Sequenz eines konservierten Signalpeptids identifiziert werden. Demzufolge könnte die Sekretion von EmNlg1 über bereits bekannte Mechanismen stattfinden.

EmNlg2 und EmNlg1 heben sich auf Grundlage der vorgenommenen strukturellen Charakterisierung nicht eindeutig voneinander ab. So findet sich bei EmNlg2 ebenfalls eine konservierte Sequenz für ein Signalpeptid, so dass auch dieser potenzielle BMP Antagonist über bereits bekannte Mechanismen sekretiert werden könnte. Zudem konnte bei EmNlg2 eine konservierte Noggin Domäne mit der für Noggin - like Proteine charakteristischen Insertion identifiziert werden. Bei EmNlg2 umfasst diese Insertion im Vergleich mit dem entsprechenden homologen Bereich von humanem Noggin 93 Aminosäuren und ist damit länger als bei EmNlg1 und den homologen Noggin - like Proteinen aus *S. mediterranea*. Anders als EmNlg1 zeigt EmNlg2 allerdings eine hohe Homologie zu Noggin aus *S. mansoni*, dem Smed-Nlg8 und Smed-Nlg7 aus *S. mediterranea* in der Liste homologer Proteine folgen. Ein weiterer Unterschied zu EmNlg1 ist in der Organisation des genomischen Locus zu finden. *Emnlg2* ist im Unterschied zu *emnlg1* in einem einzigen Exon organisiert, was auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung mit homologen Genen anderer Organismen hindeutet. Auch die stadienspezifische Expression von *emnlg2* grenzt die beiden Noggin - like Homologe

aus *E. multilocularis* voneinander ab. So wird *emnl2* im Vergleich mit den anderen untersuchten Stadien vermehrt in nicht aktivierten Protoskolizes exprimiert.

Auf Basis der vorliegenden Arbeit können bereits einige Thesen zur Funktion von EmNlg1 und EmNlg2 aufgestellt werden, womit die in Kapitel 5.4.1 diskutierten Erklärungen zur veränderten Expression dieser beiden Faktoren bei einer Hemmung bzw. Stimulation von BMP Signaling ergänzt werden. So werden beide Faktoren wahrscheinlich sekretiert und können als potenzielle BMP Antagonisten mit BMPs von Wirt und Parasit interagieren. Bei EmNlg2 deutet die vermehrte Genexpression in nicht aktivierten Protoskolizes auf eine Funktion bei der Entwicklung dieses Larvenstadiums hin. Eventuell ist EmNlg2 am Aufbau eines Konzentrationsgradienten beteiligt, der bei der Ausbildung der Längsachse von Protoskolizes eine Rolle spielt. EmNlg1 scheint dagegen auf Grundlage der bereits diskutierten Genexpressionsstudien bei einer Hemmung des TGF- $\beta$  / BMP Signaling in Metazestoden als EmBMP1 Antagonist zu fungieren. Allerdings sind für das Verständnis der Funktion von EmNlg1 und EmNlg2 dringend weiterführende Studien notwendig.

Die Möglichkeit von alternativem Spleißen in der 3' UTR von EmNlg1 lässt vermuten, dass auch in *E. multilocularis* microRNAs an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Dieses Gebiet ist bei Cestoden noch vollkommen unerforscht und bietet ein dementsprechend großes Potenzial für zukünftige Projekte.

Neben den identifizierten BMP Homologen und BMP Antagonisten konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch ein Activin A Homolog aus *E. multilocularis* identifiziert werden, EmAct. EmAct zeigt im C-terminalen Bereich eine konservierte Domäne der TGF- $\beta$  Superfamilie mit den charakteristischen neun Cysteinen der TGF- $\beta$  Faktoren und Activine, die zur richtigen Faltung des active peptide und zur Ausbildung von Homodimeren notwendig sind. Direkt N-terminal dieser konservierten Domäne konnte eine putative Spleißstelle für Furin - like Proteasen der SPC - Familie identifiziert werden, die eine Abspaltung des active peptide vom restlichen Proprotein ermöglicht und damit zur Funktionalität von EmAct beiträgt. Am N-Terminus wurde eine konservierte Sequenz identifiziert, die auf ein Signalpeptid hindeutet. Folglich wird EmAct wie auch EmBMP1 Isoform A<sup>95</sup> höchstwahrscheinlich über hoch konservierte Mechanismen sekretiert. Im Bereich des Proproteins, das nach der Abspaltung vom active peptide als separates Peptid vorliegt, konnte keine konservierte Domäne der TGF- $\beta$  Propeptid Superfamilie identifiziert werden wie bei den EmBMP2 Isoformen. Allerdings zeigt eine detaillierte Charakterisierung des EmAct Propeptids die typischen Strukturen des humanem TGF- $\beta$ 1 LAP. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das EmAct Propeptid ebenfalls als LAP fungieren kann und damit als Dimer gemeinsam mit einem EmAct active peptide - Dimer und einem LTBP einen LLC ausbildet. Sehr interessant sind in diesem Zusammenhang die konservierten Cysteine im C-terminalen

Bereich des EmAct LAP, die bei humanen Zytokinen der TGF- $\beta$  Superfamilie ausschließlich bei den TGF- $\beta$  Faktoren TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 und - $\beta$ 3 zu finden sind. Diese Cysteine stabilisieren den LLC durch eine kovalente Bindung zwischen den zwei dimerisierten Propeptiden, so dass dadurch die Latenz des active peptide verlängert wird. Diese große Ähnlichkeit von EmAct LLC und TGF- $\beta$ 1 LLC ist sehr auffällig und man kann vermuten, dass sich diese beiden Komplexe in ihren Eigenschaften sehr nah kommen. Die durchgeführte Genexpressionsstudie weist bei *emact* auf eine erhöhte Expression in Primärzellen hin, gefolgt von Protoskolizes (aktiviert und nicht aktiviert) und Metazestoden mit der geringsten Expression. EmAct könnte demnach wie auch EmBMP2 an Entwicklungsprozessen von Stammzellen beteiligt sein. Auf Grundlage der Organisation des genomischen Locus von *emact* konnte kein nahes verwandtschaftliches Verhältnis zu homologen Genen anderer Organismen festgestellt werden. BLAST - Analysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz ließen allerdings Homologien von EmAct zu SmlnAct aus *S. mansoni* und BmTgh-2 aus *B. malayi* erkennen. Im Vergleich mit humanen Faktoren der TGF- $\beta$  Superfamilie zeigte sich die höchste Homologie zu Activin A. Humanem Activin A werden viele verschiedene Funktionen zugeschrieben, wie z. Bsp. die Inhibierung von Mitogen - induzierter DNA Synthese und die Induktion von Apoptose in der Leber. SmlnAct konnte bereits mit der Entwicklung des reproduktiven Potenzials adulter weiblicher *S. mansoni* und mit der Embryogenese in Verbindung gebracht werden, während eine Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren des Wirts noch nicht gezeigt wurde<sup>172</sup>. Dagegen wurde eine Interaktion von BmTgh-2 mit TGF- $\beta$  Rezeptoren eines Säugers durch die Stimulation eines TGF- $\beta$  responsiven Reportergens in Lungenepithelzellen bereits bewiesen<sup>174</sup>. Dementsprechend ist auch für EmAct sowohl eine Rolle bei entwicklungsbiologischen Vorgängen in *E. multilocularis* als auch eine Interaktion mit Rezeptoren des Wirts denkbar. Die Fähigkeit des Fuchsbandwurms, über Jahrzehnte im Wirt zu persistieren, deutet wie bei anderen parasitischen Würmern auf ausgeprägte Mechanismen der Immunevasion und Immunmodulation. Sekretiertes EmAct könnte dabei als naher Verwandter von TGF- $\beta$  Faktoren aktiv in die Immunantwort des Menschen eingreifen und diese zum Vorteil von *E. multilocularis* regulieren. In diesem Zusammenhang wird in Fachkreisen bereits die Möglichkeit von Interaktionen zwischen Faktoren aus dem Fuchsbandwurm und dendritischen Zellen bzw. Makrophagen diskutiert, die zu phänotypischen Veränderungen und Modifikationen im Profil der sekretierten Zytokine dieser Zelltypen führen<sup>20</sup>. Im frühen Entwicklungsstadium einer Alveolären Echinokokkose, wo Stammzellen von *E. multilocularis* wahrscheinlich eine große Rolle spielen, sind dendritische Zellen und Makrophagen unter den ersten Zellen, die in Kontakt mit dem Parasiten kommen. Die Aktivität von Makrophagen sowie die Reifung von dendritischen

Zellen kann wiederum durch humanes TGF- $\beta$ 1 inhibiert werden, zu dem EmAct insbesondere durch die charakteristischen Strukturen im LAP einige Homologien aufweist. Die Kombination von erhöhter Genexpression in einer regenerierenden Primärzellkultur des Isolats G8065 und der potenziellen immunmodulatorischen Aktivität machen EmAct deshalb besonders interessant für die zukünftige Forschung an *E. multilocularis*. Sollte sich dabei ein Zusammenhang zwischen der erfolgreichen Etablierung des Parasiten und der Funktion von EmAct herausstellen, so wäre dieser Faktor auch eine vielversprechende Zielstruktur für die Entwicklung prophylaktischer Wirkstoffe gegen *E. multilocularis*.



## 6. Material und Methoden

### 6.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

#### Geräte

CO <sub>2</sub> - Brutschrank Digitalkamera / Software	NU - 5510 E Altra 20 / analySIS getIT 5.0	NuAire, Plymouth, USA Olympus Life Science Europa, Hamburg Bio-Rad Laboratories, München
DNA-Gelelektrophorese- Kammern	Verschiedene Größen  Multigel-Long G47 Curix60	Biometra, Göttingen Agfa Graphics Germany, Düsseldorf
Entwicklermaschine für Röntgenfilme Inverses Mikroskop Kryostat-Mikrotom Microplate Reader / Software Pipetten	Leica DM IRB 2800 Frigocut E Tecan GENios / 4Fluor Research® 0,5-10 µl Research® 10-100 µl Research® 100-1000 µl Mini-PROTEAN® III Gelelektrophorese System TH38 ABI 3130 Genetic Analyzer	Leica Microsystems, Wetzlar Leica Microsystems, Wetzlar Tecan Group, Männedorf, CH Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Bio-Rad Laboratories, München
Protein-Gelelektro- phoresekammern Schüttelinkubator Sequenziergerät	Edmund Bühler, Hechingen Applied Biosystems, Foster City, USA	
Sicherheitswerkbank	NU - 437 - 400 E MSC - Advantage 1.2	NuAire, Plymouth, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spektrophotometer / Software Stromversorgungsgeräte	NanoDrop / NanoDrop 1000 v3.7.0 Power Pack P24 Power Pack P25 Power Pack P25 T	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Biometra, Göttingen Biometra, Göttingen Biometra, Göttingen
Thermocycler	TRIO20 Thermoblock +/- TRIO HD T-Gradient Thermoblock T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen Biometra, Göttingen
Tischzentrifugen / Rotor	Biofuge 15 Mikro200 / 2424A	Heraeus Sepatech, Osterode Andreas Hettich, Tuttlingen
Vakuumzentrifuge Western Blot Kammern	SpeedVac®Plus SC110A Mini Trans-Blot cell ( Mini- PROTEAN® II Gelelektrophorese System)	Savant, New York, USA Bio-Rad Laboratories, München
Zentrifugen / Rotor	Heraeus Omnifuge / 2251  Heraeus Bactifuge / 005169  Sorvall RC-5B Plus / SLA-1500  SIGMA 3K30	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA SIGMA Laborzentrifugen, Osterode

#### Verbrauchsmaterial

Blotting-Papier	Whatman Blotting-Paper, 3 MM Chr	GE Healthcare, München
Cell Culture Insert	BD Falcon™ 12-well Cell Culture Insert Companion Plates with lid, 3 µm pore size	Becton Dickinson, Heidelberg
Nitrozellulose Membran Röhrchen, steril Röntgenfilm	Whatman Protran BA85 15 ml, 50 ml Super RX	GE Healthcare, München Greiner, Nürtingen Fujifilm Europe, Düsseldorf

Well-Platten	6-well culture plate 12-well culture plate 96-well microplate	Nunc, Roskilde, DK Nunc, Roskilde, DK Nunc, Roskilde, DK
Spritzen und Kanülen, steril	verschiedene Größen	Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter	150 ml Bottle Top Filter, 45 µm FP 30/0,2 CA-S	Nalgene, New York, USA
Zellschaber	Zellschaber, 25 cm	Whatman, Dassel Sarstedt, Nürnbrecht

## 6.7. Enzyme, Kits und Chemikalien

### Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Schwalbach
DNase I (10 U/µl)	Roche Applied Sciences, Mannheim
Pepsin	Sigma-Aldrich, München
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsenzyme und T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
RNaseOUT™	Invitrogen, Groningen, NL
Trypsin / EDTA - Lösung (0,05%/0,02%), in PBS ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom, Berlin
PCR Extender System	5 Prime, Hamburg
PfuTurbo® DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Taq-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach

### Kits

BigDye® Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Centri-Sep™ Columns	Applied Biosystems, Foster City, USA
NucleoSpin RNA/Protein Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond PC 100 Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
OmniScript RT Kit	Qiagen, Hilden
PCR Cloning Kit	Qiagen, Hilden
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Pierce, Rockford, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
PinPoint™ Xa Protein Purification System	Promega, Madison, USA
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

### Chemikalien u.a.

Adenin-Hemisulfat	Sigma-Aldrich, München
Agarose NEEO	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (pH 7) Blotting grade (BSA)	AppliChem, Darmstadt
(3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES)	Sigma-Aldrich, München
Aminosäuren	Sigma-Aldrich, München
3-Amino-1,2,4-triazol (3AT)	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumperoxodisulfat (APS), reinst	Carl Roth, Karlsruhe
Ampuwa (steriles pyrogen freies Wasser)	Fresenius, Bad Homburg
Antibiotika (Amp, Kan, Tet)	Sigma-Aldrich, München
Bathocuproinedisulfonic acid disodium salt	Sigma-Aldrich, München
Chloroform zur Analyse	AppliChem, Darmstadt
Citric acid monohydrate, reagent grade	Sigma-Aldrich, München
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Applied Science, Mannheim
3,3 Diaminobenzidine-4-hydrochloride (DAB)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Difco™ Bacto Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Difco™ Pepton	Becton Dickinson, Heidelberg
Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	Becton Dickinson, Heidelberg

N,N-Dimethylformamid, for molecular biology (DMF)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
DL-Dithiothreitol (DTT) $\geq 99,0\%$	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), liquid (High Glucose) with GlutaMAX™ I, 4500 mg/l	Invitrogen, Groningen, NL
D-Glucose, Sodium Pyruvate	
dNTPs, lyophilisiert	Carl Roth, Karlsruhe
Entellan®	Merck, Darmstadt
Ethanolamine $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, München
Fötales Bovines Serum (FBS), Herkunft: EU-zertifizierte Länder (Südamerika)	Biochrom, Berlin
G153 Developer	Agfa Graphics Germany, Düsseldorf
G354 Fixer	Agfa Graphics Germany, Düsseldorf
Harnstoff für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, Foster City, USA
Horse Serum, heat inactivated	PAA Laboratories, Cölbe
Lithium acetate dihydrate, reagent grade (LiAc)	Sigma-Aldrich, München
L-Cysteine $\geq 98\%$ , from non-animal source, cell culture tested	Sigma-Aldrich, München
L-histidine-HCL monohydrate	Sigma-Aldrich, München
4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, for enzyme immunoassay, $\geq 99,0\%$	Sigma-Aldrich, München
PBS Dulbecco ohne $\text{Ca}^{2+}$ - / $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen	Biochrom, Berlin
Pen/Strep 10000 U/ml (Penicillin G / Streptomycin)	Biochrom, Berlin
Phenol (äquilibriert, stabilisiert) : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem, Darmstadt
PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche Applied Science, Mannheim
Poly(ethylene glycol), average mol wt 3015-3685 (PEG 3350)	Sigma-Aldrich, München
Prestained Protein Marker, Broad Range (7-75 kDa)	New England Biolabs, Schwalbach
ProBond™ Resin	Invitrogen, Groningen, NL
Protein G Agarose, Fast Flow	Millipore (Upstate), Billerica, USA
pSecTag2/Hygro A, B and C	Invitrogen, Groningen, NL
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 40	Carl Roth, Karlsruhe
SmartLadder	Eurogentec, Köln
Sodium deoxycholate (DOC)	Sigma-Aldrich, München
Sodium taurocholat	Sigma-Aldrich, München
Tavanic® 5 mg/ml Infusionslösung	Sanofi-Aventis, Frankfurt
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck, Darmstadt
TetraLink™ Tetrameric Avidin Resin	Promega, Madison, USA
Tissue Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, NL
Triton®X-100	Sigma-Aldrich, München
TRIzol® Reagent	Invitrogen, Groningen, NL
Tween®20	Merck, Darmstadt

Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern vom Hersteller nicht anders angegeben, mit destilliertem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert oder steril filtriert. Für die enzymatischen Reaktionen wurde Ampuwa verwendet. Bei Arbeiten mit RNA wurde DEPC-H<sub>2</sub>O oder das in den Kits mitgelieferte RNase freie H<sub>2</sub>O benutzt.

## 6.8. Zytokine

Humanes BMP2 und TGF $\beta$ 1 wurden zur Stimulation von BMP- und TGF $\beta$  Signalwegen in transfizierten eukaryotischen Zelllinien und in Larvenstadien von *Echinococcus multilocularis* eingesetzt. Das in *Escherichia coli* rekombinant produzierte humane BMP2 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. emer. Dr. W. Sebald an der Universität Würzburg

hergestellt und stand für diese Arbeit zur Verfügung. Es wurde in ddH<sub>2</sub>O gelöst und als 20 µM Stammlösung bei -20°C gelagert. Humanes TGFβ1 wurde von Invitrogen bezogen, wo es rekombinant in CHO-Zellen (*Cricetulus griseus*) produziert worden war. Dieses Zytokin wurde ebenfalls in ddH<sub>2</sub>O gelöst und als 25 µg/ml Stammlösung bei -20°C gelagert.

### 6.9. Vektoren

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide sind nachfolgend zusammengefasst. Details zu den im Verlauf dieser Arbeit hergestellten Konstrukte sind Kapitel 6.12.7 zu entnehmen.

Insert / Vektor	Details	Referenz / Quelle
<i>emsmadA</i> / pCMV-Myc	Wildtyp	Dr. R. Zavala-Góngora <sup>94</sup>
<i>emsmadA</i> <i>V</i> <sub>139</sub> <i>T</i> / pCMV-Myc	<i>V</i> <sub>139</sub> <i>T</i> Mutation	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadA</i> <i>N</i> <sub>218</sub> <i>Y</i> / pCMV-Myc	<i>N</i> <sub>218</sub> <i>Y</i> Mutation	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadA</i> <i>E</i> <sub>243</sub> <i>A</i> / pCMV-Myc	<i>E</i> <sub>243</sub> <i>A</i> Mutation	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadA</i> <i>V</i> <sub>139</sub> <i>T</i> <i>N</i> <sub>218</sub> <i>Y</i> / pCMV-Myc	<i>V</i> <sub>139</sub> <i>T</i> <i>N</i> <sub>218</sub> <i>Y</i> Mutationen	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadA</i> <i>N</i> <sub>218</sub> <i>Y</i> <i>E</i> <sub>243</sub> <i>A</i> / pCMV-Myc	<i>N</i> <sub>218</sub> <i>Y</i> <i>E</i> <sub>243</sub> <i>A</i> Mutationen	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadA</i> <i>V</i> <sub>139</sub> <i>T</i> <i>E</i> <sub>243</sub> <i>A</i> / pCMV-Myc	<i>V</i> <sub>139</sub> <i>T</i> <i>E</i> <sub>243</sub> <i>A</i> Mutationen	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadA</i> / pGADT7 und pGBKT7	Wildtyp	Dr. R. Zavala-Góngora <sup>94</sup>
<i>emsmadA</i> * / pGADT7 und pGBKT7	<i>S</i> <sub>316</sub> <i>E</i> <i>S</i> <sub>318</sub> <i>E</i> Mutationen; konstitutiv aktiv	Dr. R. Zavala-Góngora <sup>94</sup>
<i>emsmadB</i> / pCMV-Myc	Wildtyp	Dr. R. Zavala-Góngora <sup>94</sup>
<i>emsmadB</i> / pGADT7 und pGBKT7	Wildtyp	Dr. R. Zavala-Góngora <sup>94</sup>
<i>emsmadB</i> * / pGADT7 und pGBKT7	<i>S</i> <sub>435</sub> <i>E</i> <i>S</i> <sub>437</sub> <i>E</i> Mutationen; konstitutiv aktiv	Dr. R. Zavala-Góngora <sup>94</sup>
<i>emsmadC</i> / pCMV-Myc	Wildtyp	Dr. R. Zavala-Góngora <sup>97</sup>
<i>emsmadC</i> / pGADT7 und pGBKT7	Wildtyp	Dr. R. Zavala-Góngora <sup>97</sup>
<i>emsmadC</i> * / pGADT7 und pGBKT7	<i>S</i> <sub>348</sub> <i>E</i> <i>S</i> <sub>350</sub> <i>E</i> Mutationen; konstitutiv aktiv	Dr. R. Zavala-Góngora <sup>97</sup>
<i>emsmadD</i> / pGADT7 und pGBKT7	Wildtyp	Dr. R. Zavala-Góngora <sup>97</sup>
<i>emsmadE</i> / pDrive	Wildtyp	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadE</i> / pCMV-Myc	Wildtyp	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadE</i> / pGADT7 und pGBKT7	Wildtyp	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadE</i> * / pGADT7 und pGBKT7	<i>S</i> <sub>370</sub> <i>E</i> <i>S</i> <sub>372</sub> <i>E</i> Mutationen; konstitutiv aktiv	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadE</i> MH1 / pGADT7 und pGBKT7	Wildtyp	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadE</i> MH2 / pGADT7 und pGBKT7	Wildtyp	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadE</i> * MH2 / pGADT7 und pGBKT7	<i>S</i> <sub>370</sub> <i>E</i> <i>S</i> <sub>372</sub> <i>E</i> Mutationen; konstitutiv aktiv	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadF1</i> / pDrive	Wildtyp	K. Epping, diese Arbeit
<i>emsmadF2</i> / pDrive	Wildtyp	K. Epping, diese Arbeit
<i>emnogginA</i> / pDrive	Wildtyp	K. Epping, diese Arbeit
<i>emnogginB</i> / pDrive	Wildtyp	K. Epping, diese Arbeit
<i>emnhr1</i> / pGADT7 und pGBKT7	Wildtyp	M. Sc. S. Lorenz (unveröffentlicht)

Insert / Vektor	Details	Referenz / Quelle
<i>emskip</i> / pGADT7 und pGBKT7	Wildtyp	Dr. V. Gelmedin <sup>232</sup>
<i>emalien</i> / pGADT7 und pGBKT7	Wildtyp	D. Günthel (unveröffentlicht)
<i>emrsk1</i> / pSecTag2-Hygro	Wildtyp	Dr. R. Zavala-Góngora <sup>96</sup>
<i>emrsk2</i> / pSecTag2-Hygro	Wildtyp	Dr. R. Zavala-Góngora <sup>95</sup>
<i>emrsk3</i> / pSecTag2-Hygro	Wildtyp	K. Epping, Diplomarbeit
<i>emrsk3</i> <i>V</i> <sub>269</sub> <i>L</i> / pSecTag2-Hygro	<i>V</i> <sub>269</sub> <i>L</i> Mutation	K. Epping, diese Arbeit
<i>emrsk3</i> <i>F</i> <sub>271</sub> <i>L</i> / pSecTag2-Hygro	<i>F</i> <sub>271</sub> <i>L</i> Mutation	K. Epping, diese Arbeit
<i>emrsk3</i> <i>V</i> <sub>269</sub> <i>L</i> <i>F</i> <sub>271</sub> <i>L</i> / pSecTag2-Hygro	<i>V</i> <sub>269</sub> <i>L</i> <i>F</i> <sub>271</sub> <i>L</i> Mutationen	K. Epping, diese Arbeit
<i>emrsk3</i> <i>Q</i> <sub>280</sub> <i>D</i> / pSecTag2-Hygro	<i>Q</i> <sub>280</sub> <i>D</i> Mutation	K. Epping, Diplomarbeit
<i>emrsk3</i> <i>Q</i> <sub>280</sub> <i>D</i> <i>V</i> <sub>269</sub> <i>L</i> / pSecTag2-Hygro	<i>Q</i> <sub>280</sub> <i>D</i> <i>V</i> <sub>269</sub> <i>L</i> Mutation	K. Epping, diese Arbeit
<i>emrsk3</i> <i>Q</i> <sub>280</sub> <i>D</i> <i>F</i> <sub>271</sub> <i>L</i> / pSecTag2-Hygro	<i>Q</i> <sub>280</sub> <i>D</i> <i>F</i> <sub>271</sub> <i>L</i> Mutation	K. Epping, diese Arbeit
<i>emrsk3</i> <i>Q</i> <sub>280</sub> <i>D</i> <i>V</i> <sub>269</sub> <i>L</i> <i>F</i> <sub>271</sub> <i>L</i> / pSecTag2-Hygro	<i>Q</i> <sub>280</sub> <i>D</i> <i>V</i> <sub>269</sub> <i>L</i> <i>F</i> <sub>271</sub> <i>L</i> Mutationen	K. Epping, diese Arbeit
<i>emrsk3</i> / pinPoint™ Xa-2	extrazelluläre Domäne	K. Epping, diese Arbeit
<i>emrsk4</i> / pSecTag2-Hygro	Wildtyp	Dr. P. Bernthaler <sup>212</sup>
cDNA Bibliothek / pJG 4-5		Dr. K. Hubert <sup>304</sup>
<i>hsalk5</i> / pcDNA1	Wildtyp	Prof. Dr. P. Knaus
<i>hsalk5*</i> / pCMV5	<i>T</i> <sub>204</sub> <i>D</i> Mutation; konstitutiv aktiv	Prof. Dr. P. Knaus
<i>hstgibr2</i> / pcDNA1	Wildtyp	Prof. Dr. P. Knaus
<i>hsalk3</i> / pcDNA3	Wildtyp	Prof. Dr. P. Knaus
<i>hsalk3*</i> / pcDNA3	<i>Q</i> <sub>233</sub> <i>D</i> Mutation; konstitutiv aktiv	Prof. Dr. P. Knaus
<i>hsbmpr2</i> / pcDNA3	Wildtyp	Prof. Dr. P. Knaus

### 6.10. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich in lyophilisierter Form bezogen, in Ampuwa aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Konzentration der Stammlösungen betrug stets 50 µm. Alle Sequenzen der nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide sind in 5'→3' Richtung angegeben. Über die Oligonukleotide in ein PCR-Produkt eingefügte Schnittstellen für einen Restriktionsverdau sind unterstrichen, die auszutauschenden Basen innerhalb der Mutageneseprimer dagegen in fetter Schrift markiert.

Bei einer späteren Klonierung über UA-Hybridisierung (vgl. 6.12.9) richtete sich das Design der verwendeten Oligonukleotide zur Vermeidung von Dimeren und der annealing Temperatur  $T_a$  (57-62°C) nach den Kalkulationen des Herstellers.

Sollten die PCR-Produkte über Schnittstellen-Hybridisierung kloniert werden (vgl. 6.12.9), so wurden zunächst zur Einfügung von Restriktionsschnittstellen Oligonukleotide konzipiert, bei denen das Leseraster von Vektor und Insert nach einer solchen Klonierung *in frame* lagen. Die jeweiligen Restriktionsschnittstellen der Oligonukleotide wurden nach den Vorgaben des Vektors und den Angaben des Herstellers der Restriktionsenzyme ausgewählt. Die in der PCR verwendete  $T_a$  wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$T_a = (81,5 + 0,41 (\%GC) - 675/N - \%mismatch) - 5^\circ C$$

N: Gesamtzahl der enthaltenen Nukleotide

%GC: Prozentualer Anteil von Guanosin und Cytosin in N

%mismatch: Prozentualer Anteil nicht-bindender Nukleotide in N

## cDNA

---

CD3RT ATC TCT TGA AAG GAT CCT GCA GGA CT<sub>26</sub> VX

## Spliced-Leader Differential Display

---

CD3 ATC TCT TGA AAG GAT CCT GCA GG  
SL-TGT GTC CTT ACC TTG CAC TTT TGT  
LNK 12 GAT CTG CGG TGA (ohne 5'-Phosphatgruppe)  
LNK 24 AGC ACT CTC CAG CCT CTC ACC GCA  
SL-XX CCT TAC CTT GCA GTT TTG TAT GXX  
LNK-XX CCT CTC ACC GCA GAT CXX

## Vektor Oligonukleotid

---

pDrive T7 TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG  
SP6 ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT  
pSecTag2-Hygro T7 H TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA  
BGH reverse primer TAG AAG GCA CAG TCG AG  
pCMV-Myc pCMVfw GAT CCG GTA CTA GAG GAA CTG AAA AAC  
PinPoint™ Xa pinpoint-DW-seq CGT GAC GCG GTG CAG GGC G  
pinpoint(Sp6)up seq CGG CAT CAG AGC AGA TTG  
pJG 4-5 pJG4-5 dw GAT GCC TCC TAC CCT TAT GAT GTG  
pJG4-5 dw nested GCC TCC TAC CCT TAT GAT GTG  
pJG4-5 up nested GAC CAA ACC TCT GGC GAA G  
pJG4-5 up GAC AAC CTT GAT TGG AGA CTT G  
pGBKT7/pGADT7 T7 AD/BD T AAT ACG ACT CAC TAT AGG GC  
AD seq AGA TGG TGC ACG ATG CAC AG

## Gen Oligonukleotid

---

*emrsk3* EmTR3 *HindIII* dw G C CCA AGC TTA ATG AGA CAC AAA ATA ATT AAC  
TGC  
EmTR3 AK3'ex *NotI* ATT TGC GGC CGC TTC ACT TGA CCA ATC ATA CAT  
TG  
EmTR3 V<sub>269</sub>L dw GT GGA AGC GGT AGC GGA CTA CCA TTC CTC GTG  
CAA G  
EmTR3 V<sub>269</sub>L up C TTG CAC GAG GAA TGG TAG TCC GCA ACC GCT  
TCC AC  
EmTR3 F<sub>271</sub>L dw GT AGC GGA GTA CCA TTG CTC GTG CAA GCT ACA  
ATT G  
EmTR3 F<sub>271</sub>L up C AAT TGT AGC TTG CAC GAG CAA TGG TAC TCC  
GCT AC  
EmTR3 V<sub>269</sub>L F<sub>271</sub>L dw GT AGC GGA CTA CCA TTG CTC GTG CAA GCT ACA  
ATT G  
EmTR3 V<sub>269</sub>L F<sub>271</sub>L up C AAT TGT AGC TTG CAC GAG CAA TGG TAG TCC  
GCT AC  
*emsmadA* EmSA V<sub>139</sub>T dw C AAC CGT GTC GGT GAC ACT TTT CAT GCC TCG  
EmSA V<sub>139</sub>T up CGA GGC ATG AAA AGT GTC ACC GAC AGC GTT G  
EmSA N<sub>218</sub>Y dw GC AAT CGT CTT AAC TAC TGG CAT CCT G  
EmSA N<sub>218</sub>Y up C AGG ATG CCA GTA GTT AAG ACG CTT GC  
EmSA E<sub>243</sub>A dw GT GAA TTC GCG GCA TTG CTG TCT CAG

	EmSA E <sub>243</sub> A up	CTG AGA CAG CAA TGC CGC GAA TTC AC
<i>emsmadE</i>	SE-ORF 5'	G TGT ACA GGA GAC GAT G
	SE-ORF 3'	GCT TAT CAC AGA AAT TTT ATG
	SE-MH1 dw ( <i>EcoRI</i> )	G TTT ACT <u>GGA ATT CTC</u> GGT TG
	SE up 2 ( <i>SalI</i> )	GT TAC TGT <u>CGA CAA</u> TTA GGA GAC AGA AG
	SE-MH1 <i>EcoRI</i> neu	G TTT ACT GGT <u>GAA TTC</u> GGT TG
	SE-MH1 <i>BamHI</i> neu	G AAC AAG GAT <u>CCG CGG</u> TAG
	SE-MH2 <i>EcoRI</i> neu	GCT TTC <u>GAA TTC</u> TCT GAC TCG
	SE-MH2 <i>BamHI</i> neu	G TTT ATG <u>CGG ATC CAC</u> AAA TTA G
	EmSmadE dw5	GAG AAT ACG CGG AAG CAG
	EmSmadE up3	GG TAG AAC TGG GTA ATC AAC G
	EmSmadE up1	GC CAC AAA TTA GGA GAC AGA AG
	SE MH2 mut dw	G CCA AAC CCC GTC TCT <b>GAG</b> GTC <b>GAG</b> TAA TTT GTG GAT C
	SE MH2 mut up	G ATC CAC AAA TTA CTC GAC CTC AGA GAC GGG GTT TGG C
	EmSmadE dw1	GGA AAA TGC CTT TAA ATG GTG
	EmSmadE dw2	GAT GCC GCC CCT CTA ATG
	SE up3	GG TAG AAC TGG GTA ATC AAC G
<i>emsmadF</i>	SF dw1	GAT ATG CTA ACT GTG CCC AGA G
	SF dw1.0	GGA ATA AGC CTT CTG CTA CTG
	SF up1	G AGT GGG GTC TCC CTA TCA TTG
<i>emelp</i>	Em10-15	AAT AAG GTC AGG GTG ACT AC
	Em10-16	TTG CTG GTA ATC AGT CGA TC
<i>embmp1</i>	BMP dw4	GAA CCG AGA CAG TGG CCA GAC CAC
	BMP up0	A CCG ACA GCC ACA AGT CTC GAC A
	EmBMPA dw1.0	AT CGC AAA AAG CGT CG
	EmBMPA up1.0	C GAC AAC CAT GTC CTC G
<i>embmp2</i>	EmBMPB dw1	GAA CCG CCC TCC AAG ACG
	EmBMPB up1	GGT TTG AGC CCC CTC ACT TG
	EmBMPB dw2	GAG CAT CAG GAC GTG TGT G
<i>emact</i>	Emlnh dw1	GTC GTT CGA CGA ACA CGG AG
	Emlnh up2	GTT GTG AGG GGT GTC CAT G
	EmlNHL dw	ATG ACC ATT ACT ACC CCC ATG AAG
	EmTGFbeta up1	GAT AAC GCC TCA ACT ACA ACC G
<i>emnoggina</i>	NogginA dw1	GAT TTT GGG TGC CGA CTA TG
	EmnogA dw 1.0	G CAC ATT AAT GAA GCA AGA G
	NogginA up1	GTT TTG GTT CCA CTG GGT CTG
	EmnogA up 0.1	G TTT GCA ATG AAA GTA TCT GAG
<i>emnogginb</i>	NogginB dw1	GTC TAG CTC GTC TTG GTT CTT CG
	NogginB up1	GCA GCT CTA TGC ACA GGA ACA G

## 6.11.Arbeiten mit RNA

### 6.11.1.Isolierung von Gesamt - RNA

Die Gesamt-RNA von *E. multilocularis* wurde mit TRIzol® Reagent von Invitrogen nach Angaben des Herstellers isoliert. Zur RNA-Isolierung aus Metazestoden wurde das Protokoll folgendermaßen modifiziert:

Bis zu 10 Metazestodenvesikel wurden zunächst in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einer sterilen Kanüle zerstoßen. Nach 3 min Zentrifugation bei 400 *g* und RT wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml TRIzol® Reagent aufgenommen. Die anschließenden Schritte erfolgten nach Herstellerprotokoll.

Die gewonnene RNA wurde anschließend entweder direkt zur Herstellung von cDNA verwendet (vgl. 6.11.3) oder bei -70°C gelagert. Für die letztere Option wurden den Proben das 3x Vol. Ethanol<sub>abs</sub> (RNase frei) zugegeben und die RNA für bis zu 6 Monate bei -20°C gelagert. Bei einer späteren Verwendung wurde dieser RNA nach dem Auftauen 3 M Natriumacetat (pH 5,2; DEPC-behandelt) bis zu einer Endkonzentration von 0,3 M zugegeben. Der Ansatz wurde gut gemischt und 5 min bei 12.000 *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **6.11.2. Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die RNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des NanoDrop von Thermo Fisher Scientific bestimmt. Dabei wurden jeweils 2 µl der Probe zur Messung verwendet.

#### **6.11.3. Herstellung von cDNA**

In dieser Arbeit wurde zur Herstellung von einzelsträngiger cDNA das OmniScript RT Kit weitestgehend nach Herstellerangaben verwendet.

Für kleinere Synthesemengen wurde ein 20 µl Ansatz gewählt, wobei 1 µg RNA und die angegebene Menge RNaseOUT von Invitrogen eingesetzt wurde. Für größere Mengen an cDNA wurde ein 50 µl Ansatz, mit 2 µg RNA und 1 µl RNaseOUT verwendet. Das Verhältnis im Reaktionsmix wurde durch die entsprechende Erhöhung der Volumina aller anderen Bestandteile aufrecht erhalten. Die Sequenz des verwendeten Oligonukleotids CD3RT ist in Kapitel 6.10 zu finden.

Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die RNA zunächst mit RNase Inhibitor und DEPC-H<sub>2</sub>O im Thermocycler 10 min bei 65°C denaturiert und dann auf 20°C herunter gekühlt. Anschließend wurden alle anderen Bestandteile vom Reaktionsmix in den entsprechenden Volumina zugegeben und die cDNA bei 37°C innerhalb von 90 min synthetisiert.

### **6.12. Arbeiten mit DNA**

#### **6.12.1. Isolierung chromosomaler DNA**

Chromosomale DNA wurde in dieser Arbeit bei PCRs zur Überprüfung von cDNA als Kontrolle verwendet. Diese hochmolekulare DNA (100 - 150kb) wurde über die folgende Methode präpariert:



Zuerst wurde Metazestodenmaterial von *E. multilocularis* durch ein Teesieb passiert und anschließend bei 1000 *g* für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10x Vol. Extraktionspuffer (10 mM Tris, pH 8,0; 0,1M EDTA; 20 µg/ml Pankreas-RNase; 0,5% SDS) durch vorsichtiges Schütteln gelöst und eine Stunde bei 37°C inkubiert. In die viskose Flüssigkeit wurden 100 µg/ml Proteinase K (Stock: 20 mg/ml dH<sub>2</sub>O) eingerührt und der Ansatz drei Stunden unter gelegentlichem Rühren bei 50°C inkubiert. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 1x Vol. Phenol (äquilibriert mit 0,5M Tris, pH 8,0) versetzt und bis zu einer Stunde unter ständiger Bewegung inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zentrifugiert (15 min, 5.000 *g*, RT) und die obere, wässrige Phase abgenommen. Um die Ausbeute an DNA zu maximieren, wurde diese Extraktion noch zweimal wiederholt. Danach wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und die DNA mit 0,2x Vol. 10 M Ammonium-Acetat und 2x Vol. Ethanol<sub>abs</sub> bei RT durch Schwenken präzipitiert. Mit einer umgebogenen Pasteurpipette konnte die chromosomale DNA aus dem Gefäß gefischt werden und wurde im Anschluss zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 5.000 *g* wurde der Überstand vorsichtig entfernt, das Pellet getrocknet und anschließend in TE - Puffer (pH 8,0) resuspendiert.

Die Qualität der isolierten DNA wurde abschließend photometrisch überprüft. Dabei sollte ein Ratio von  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  einen Wert von  $>1,75$  aufweisen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin. In diesem Fall wurden 0,5% SDS zugegeben und die Isolierung ab der Zugabe von Proteinase K wiederholt. Die reine, gelöste DNA wurde bei 4°C gelagert.

### 6.12.2. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des NanoDrop von Thermo Fisher Scientific bestimmt. Dabei wurden jeweils 2 µl der Probe zur Messung verwendet.

### 6.12.3. Agarosegelelektrophorese

Diese Art der Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit ihrer Größe<sup>305</sup>. Die Konzentration der während dieser Arbeit verwendeten Agarosegele richtete sich dementsprechend nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Es wurden 2%-ige Gele (w/v) für 100-500 bp große DNA-Fragmente und 1%-ige Gele (w/v) für 500 bp bis 7 kbp große Fragmente verwendet. Die entsprechend hergestellten Agarosegele (X g Agarose in TAE) wurden in Bio-Rad DNA-Gelelektrophoresekammern mit dem Laufpuffer TAE (40 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,11% Essigsäure) gefahren. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x DNA-Probenpuffer (150 mM Tris pH 7,6; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 40%

Saccharose; 30% Glycerin) versetzt und bei 100 - 120 Volt und RT aufgetrennt. Als Größenmarker wurde standardmäßig der SmartLadder von Eurogentec (200 bp-10 kbp) mitgeführt.

Die aufgetrennte DNA wurde durch Einlagerung von Ethidiumbromid (2 mg/l TAE) und UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und dokumentiert.

#### **6.12.4. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen**

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAEX II Gel Extraction Kit verwendet. Die DNA wurde standardmäßig in 10 mM Tris, pH 7,5 aufgenommen und bei -20°C gelagert.

#### **6.12.5. PCR zur Überprüfung von cDNA**

Die mit dem OmniScript RT Kit von Qiagen hergestellte cDNA wurde standardmäßig mit der Taq DNA Polymerase von NEB in einer Test PCR auf Verunreinigungen mit chromosomaler DNA getestet. Dazu wurden mit Em10-15 und Em10-16 (vgl. 6.10) Oligonukleotide gewählt, die ein Intron des konstitutiv exprimierten Gens *emelp* überspannen. Wurde das Gen bei der Transkription gespleißt (mRNA bzw. cDNA), dann lieferte die PCR ein 451 bp großes Fragment. Das Mitführen chromosomaler DNA diente bei dieser PCR mit einem Produkt von 525 bp als Kontrolle.

Der PCR Ansatz bestand aus 1 µl cDNA, 2 µl 10x Puffer, 0,2 µl 10 mM dNTPs, 0,2 µl 50 µM Oligonukleotid I, 0,2 µl 50 µM Oligonukleotid II und 0,2 µl Taq DNA Polymerase (2,5 U/µl) und wurde mit Ampuwa auf 20 µl aufgefüllt. Das PCR Programm umfasste einen Denaturierungsschritt von 60 s bei 94°C, 30 Zyklen mit 30 s bei 94°C, 30 s bei 57°C und 30 s bei 72°C sowie eine terminale Elongation über 5 min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

#### **6.12.6. Semi - quantitative PCR**

Um die Expression spezifischer Gene in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis* verfolgen zu können, wurde eine semi - quantitative PCR durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Gesamt-RNA aus mit H35 Reuber Zellen ko-kultivierten Metazestoden und Primärzellen sowie aus aktivierten und nicht aktivierten Protoskolizes isoliert (Isolat G8065, vgl. 6.17.1, 6.17.4 ff und 6.11.1) und anschließend in cDNA umgeschrieben (vgl. 6.11.3). Das konstitutiv exprimierte Gen *emelp* wurde mit den Oligonukleotiden Em10-15 und Em10-16 (vgl. 6.10) aus verschiedenen Verdünnungen der cDNA mit der Taq Polymerase per PCR amplifiziert<sup>71</sup>. Dabei wurden die einzelnen Stadien durch Variationen bei den eingesetzten cDNA-Verdünnungen normalisiert und

die Amplifikation in der exponentiellen Phase der PCR durch verschiedene Anzahl der PCR-Zyklen (25-30 Zyklen) sichergestellt. Das PCR Programm umfasste folglich einen Denaturierungsschritt von 60 s bei 94°C, 27 Zyklen mit 30 s bei 94°C, 30 s bei 61°C und 30 s bei 72°C sowie eine terminale Elongation über 5 min bei 72°C. Der PCR Ansatz bestand aus 0,9-1,5 µl cDNA, 2 µl 10x Puffer, 0,2 µl 10 mM dNTPs, 0,2 µl 50 µM Oligonukleotid I, 0,2 µl Oligonukleotid II und 0,2 µl Taq DNA Polymerase (2,5 U/µl) und wurde mit Ampuwa auf 20 µl aufgefüllt. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Die zu untersuchenden Gene wurden exakt nach diesen Angaben im gleichen Thermocycler mit den folgenden Oligonukleotiden amplifiziert (vgl. 6.10).

Gen	Oligonukleotid I	Oligonukleotid II	Größe des Fragments
<i>emrsk1</i>	EmTR1 dw1.0	EmTR1 up1.0	441 bp
<i>emrsk2</i>	EmTRB dw1.0	EmTRB up1.0	430 bp
<i>emrsk3</i>	EmTR3 dw1.0	EmTR3 seq14	422 bp
<i>emrsk4</i>	EmTR4 dw1.0	EmTR4 up1.0	453 bp
<i>emsmadA</i>	SmadA dw neu	EmSmadA up8	359 bp
<i>emsmadB</i>	EmSmadB dw1.0	EmSmadB up1.0	408 bp
<i>emsmadC</i>	EmSmadC dw1.0	EmSmadC up1.0	407 bp
<i>emsmadD</i>	EmSmadD dw1.0	EmSmadD up1.0	475 bp
<i>emsmadE</i>	EmSmadE dw5	EmSmadE up1	436 bp
<i>emsmadF</i>	SF up1	SF dw1.0	391 bp
<i>emact</i>	Emlnh dw1	Emlnh up2	384 bp
<i>embmp1</i>	EmBMPA dw1.0	EmBMPA up1.0	390 bp
<i>embmp2</i>	EmBMPB dw1	EmBMPB up1	385 bp
<i>emnlg1</i>	NogginA dw1	NogginA up1	362 bp
<i>emnlg2</i>	NogginB dw1	NogginB up1	456 bp

### 6.12.7. Amplifikation von DNA zur Klonierung

#### Amplifikation von cDNA zur Klonierung in pDrive

Die open reading frames (ORF) der in dieser Arbeit identifizierten Gene *emsmadE*, *emsmadF*, *emnoggina* und *emact* wurden zur Verifizierung der Sequenz und als Basis für weitere Klonierungen zunächst mit der Taq DNA Polymerase von NEB per PCR aus Metazestoden-cDNA des Isolats GH09 (vgl. 6.17.1) amplifiziert, um anschließend mit dem PCR Cloning Kit von Qiagen über UA-Hybridisierung in den Vektor pDrive zwischenkloniert zu werden (vgl. 6.12.9). Die ORFs von *emnogginb*, *embmp1d* und *embmp2* wurden aus einer cDNA-Bibliothek amplifiziert (vgl. 6.9) um anschließend ebenfalls in pDrive kloniert zu werden (vgl. 6.12.9).

Die Kombination der Oligonukleotide und die Größe der amplifizierten Fragmente sind nachfolgend aufgeführt.

Gen	Oligonukleotid I	Oligonukleotid II	Größe des Fragment
<i>emsmadE</i>	SE-ORF 5'	SE-ORF 3'	1180 bp
<i>emsmadF</i>	SF dw1	SF up1	805 bp
<i>emnoggina</i>	EmnogA dw1.0	EmnogA up0.1	1175 bp
<i>emnogginb</i>	pJG4-5 dw	NogginB up1	1342 bp

<i>embmp1d</i>	BMP dw4	BMP up0	1245 bp
<i>embmp2a</i>	pJG4-5 dw	EmBMPB up1	1499 bp
<i>embmp2b</i>	pJG4-5 dw	EmBMPB up1	1523 bp
<i>embmp2c</i>	pJG4-5 dw	EmBMPB up1	1455 bp
<i>emact</i>	EmINHL dw	EmTGFbeta up1	1533

Detailliertere Informationen zu den verwendeten Oligonukleotide finden sich in Kapitel 6.10. Das hier verwendete PCR-Programm umfasste einen initialen Denaturierungsschritt von 60 s bei 94°C, 30 Zyklen mit 30 s bei 94°C, 30 s bei T<sub>a</sub> und 60 s/1000 bp bei 72°C sowie eine terminale Elongation über 5-30 min bei 72°C. Die Zusammensetzung des PCR Ansatzes ist in Kapitel 6.12.5 aufgeführt.

#### Amplifikation von Plasmid-DNA zur Identifizierung von 5'- und 3'-UTR

Nicht-translatierte Bereiche zwischen dem ersten Nukleotid einer mRNA und dem Startcodon des codierten ORF (5'-UTR) bzw. zwischen dem Stoppcodon des ORF und dem letzten Nukleotid der mRNA (3'-UTR) wurden mit Hilfe der bereits vorliegenden cDNA Bibliothek (vgl. 6.9) zunächst per PCR amplifiziert und anschließend mit dem PCR Cloning Kit von Qiagen über UA-Hybridisierung in den Vektor pDrive kloniert. Durch eine nachfolgende Sequenzierung dieser Plasmide konnten die 5'- und 3'-UTR bestimmt werden. Diese Methode wurde ebenfalls zur Charakterisierung nicht konservierter Bereiche in den neu identifizierten ORFs verwendet.

Die Kombinationen der in dieser PCR verwendeten Oligonukleotide (vgl. 6.10) sind nachfolgend aufgeführt.

mRNA	Oligonukleotid I	Oligonukleotid II
<i>emsmadE</i>	pJG4-5 dw SE dw5	SE up3 pJG4-5 up
<i>emsmadF</i>	pJG4-5 dw SF dw2	SF up1 pJG4-5 up
<i>emnoggina</i>	pJG4-5 dw NogginA dw1	NogginA up1 pJG4-5 up
<i>emnogginb</i>	pJG4-5 dw NogginB dw1	NogginB up1 pJG4-5 up
<i>embmp2</i>	pJG4-5 dw EmBMPB dw2	EmBMPB up1 pJG4-5 up
<i>emact</i>	pJG4-5 dw	EmTGFbeta up1

Die PCR wurde mit der Taq DNA Polymerase durchgeführt. Der 20 µl Reaktionsansatz setzte sich aus 5 ng Plasmid DNA, 2 µl 10x Puffer, 0,2 µl 10 mM dNTPs, 0,2 µl 50 µM Oligonukleotid I, 0,2 µl 50 µM Oligonukleotid II und 0,2 µl Taq DNA Polymerase (2,5 U/µl) zusammen. Das PCR-Programm ist im vorhergehenden Abschnitt aufgeführt, wobei die Elongation innerhalb der Zyklen über 4 min bei 72°C und die finale Elongation über 30 min bei 72°C durchgeführt wurde.

Amplifikation von Plasmid-DNA zur Klonierung in pCMV-Myc

Zur rekombinanten Expression von EmSmadE in humanen Zelllinien wurde der entsprechende ORF zunächst mit dem PCR Extender System von 5 Prime amplifiziert, wobei der Vektor *emsmadE* / pDrive (vgl. 6.9) als Template diente. Die Klonierung in pCMV-Myc erfolgte anschließend über Schnittstellen-Hybridisierung (vgl. 6.12.9).

Die Oligonukleotide SE-MH1 dw und SE up2 wurden dazu zunächst mit 1 ng Plasmid DNA, 2 µl 10x High Fidelity Buffer with Mg<sup>2+</sup>, 0,4 µl 10 µM dNTPs und 0,2 µl PCR Extender Polymerase Mix entsprechend den Angaben des Herstellers in einem 20 µl PCR Ansatz verwendet. Das PCR-Programm umfasste einen initialen Denaturierungsschritt von 2 min bei 94°C, 30 Zyklen mit 20 s bei 94°C, 20 s bei T<sub>a</sub> und 45 s bei 72°C sowie eine terminale Elongation über 10 min bei 72°C. Das PCR-Produkt hatte eine erwartete Größe von 1083 bp.

Amplifikation von Plasmid-DNA zur Klonierung in pGADT7 bzw. pGBKT7

Zur Untersuchung von Protein - Protein Interaktionen wurden die MH1 bzw. die MH2 Domäne von EmSmadE sowohl einzeln als auch zusammen zum einen mit der DNA-Bindungsdomäne (BD), zum anderen mit der Gal4 DNA - Aktivierungsdomäne (AD) des Gal4 Transkriptionsfaktors fusioniert (Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System von Clontech). Dazu wurden zunächst die korrespondierenden DNA-Fragmente per PCR mit dem PCR Extender System amplifiziert, wobei der Vektor *emsmadE* / pDrive (vgl. 6.9) als Template diente. Die Klonierung in pGADT7 und pGBKT7 erfolgte anschließend über Schnittstellen-Hybridisierung (vgl. 6.12.9).

Dementsprechend wurden die jeweiligen Oligonukleotide mit 1 ng Plasmid DNA, 2 µl 10x High Fidelity Buffer with Mg<sup>2+</sup>, 0,4 µl 10 µM dNTPs und 0,2 µl PCR Extender Polymerase Mix entsprechend den Angaben des Herstellers in einem 20 µl PCR Ansatz verwendet.

Die Kombination der Oligonukleotide (vgl. 6.10) und die erwartete Größe der amplifizierten Fragmente sind nachfolgend aufgeführt.

<i>emsmadE</i> Domäne	Oligonukleotid I	Oligonukleotid II	Größe
MH1	SE-MH1 <i>EcoR1</i> neu	SE-MH1 <i>BamH1</i> neu	377 bp
MH2	SE-MH2 <i>EcoR1</i> neu	SE-MH2 <i>BamH1</i> neu	658 bp
MH1 und MH2	SE-MH1 <i>EcoR1</i> neu	SE-MH2 <i>BamH1</i> neu	1087 bp

Das PCR-Programm umfasste einen initialen Denaturierungsschritt von 2 min bei 94°C, 30 Zyklen mit 20 s bei 94°C, 20 s bei T<sub>a</sub> und 30 s/500nt bei 72°C sowie eine terminale Elongation über 10 min bei 72°C.

Amplifikation von Plasmid-DNA zur Klonierung in pinPoint™ Xa-2

Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors *emrsk3* wurde zunächst mittels PCR amplifiziert um in das Plasmid pinPoint™ Xa-2 kloniert zu werden. Anschließend erfolgte

zur Aufreinigung des bereits vorliegenden Antikörpers anti-EmRSK3 die Produktion dieser Domäne im PinPoint™ Xa Protein Purification System und die irreversible Bindung des produzierten Proteins an TetraLink™ Tetrameric Avidin Resin (vgl. 6.13.5).

Dazu wurde zunächst das für die extrazelluläre Domäne von *emrsk3* kodierende DNA - Fragment (372 bp) per PCR mit dem PCR Extender System und den Oligonukleotiden EmTR3 *HindIII* dw und EmTR3 AK3'ex *NotI* per PCR amplifiziert, wobei der Vektor *emrsk3* / pSecTag2-Hygro als Template diente (vgl. 6.9 und 6.10). Der 50 µl PCR Ansatz wurde mit 10 ng Plasmid-DNA und je 500 nM Oligonukleotiden nach Angaben des Herstellers angesetzt. Das PCR-Programm umfasste einen initialen Denaturierungsschritt von 2 min bei 94°C, 35 Zyklen mit 20 s bei 94°C, 20 s bei 61°C und 30 s bei 72°C sowie eine terminale Elongation über 5 min bei 72°C.

Alle für eine Klonierung verwendeten PCR-Produkte wurden im Anschluss an die jeweilige PCR in einer Agarosegelelektrophorese in Bezug auf ihre Größe und Reinheit kontrolliert. Anschließend wurden die Fragmente aufgereinigt, entweder aus dem Agarosegel (vgl. 6.12.4) oder mit dem NucleoSpin Extract II Kit nach dem Protokoll des Herstellers direkt aus dem PCR Ansatz. Die amplifizierte DNA wurde in beiden Fällen in 10 mM Tris, pH 7,5 aufgenommen. Die Klonierung der PCR-Produkte in die entsprechenden Vektoren erfolgte entweder über UA- oder über Schnittstellen - Hybridisierung. Letztere wurde durch einen enzymatischen DNA-Verdau vorbereitet (vgl. 6.12.8. und 6.12.9).

#### **6.12.8. Enzymatischer DNA Verdau**

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von NEB bezogen und entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

Um eine unerwünschte Religation von Vektoren zu verhindern, die nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert worden waren, wurde dem Ansatz eine Stunde vor der Beendigung des Verdau CIP (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal) zugegeben. Es wurden 10 U CIP pro µg Vektor eingesetzt und die Probe weitere 60 min bei 37°C inkubiert.

Einem enzymatischen Verdau von DNA folgte standardmäßig eine DNA - Aufreinigung mit dem NucleoSpin Extract II Kit von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 10 mM Tris, pH 7,5 aufgenommen.

### 6.12.9. Klonierung

#### Klonierung über UA-Hybridisierung

Zur Zwischenklonierung und späteren Sequenzanalyse des Inserts wurden die in dieser Arbeit untersuchten Gene nach den Angaben des Herstellers mit dem PCR Cloning Kit von Qiagen kloniert. Hierbei ligieren das PCR-Produkt und der linearisierte Vektor (pDrive) durch die Hybridisierung von Adenin- bzw. Uracil-Überhängen. Anschließend folgte standardmäßig eine Transformation der Konstrukte in Kalzium-kompetente *E. coli* TOP10 (vgl. 6.14.3) mit nachfolgender Selektion auf plasmidhaltige Zellen durch Ampicillin und blau-weiß Screening.

#### Klonierung über Schnittstellen-Hybridisierung

Für die Ligation enzymatisch geschnittener DNA (vgl. 6.12.8) in einen gleichermaßen geschnittenen Vektor wurde die T4 DNA - Ligase von NEB verwendet. Der Reaktionsansatz umfasste Vektor und aufgereinigte Insert DNA in einem Verhältnis von 1:3 (100 ng Vektor), 2 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer und 1 µl T4 DNA Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Ligation erfolgte über Nacht (ÜN) bei 16 °C. Anschließend folgte standardmäßig eine Transformation der Konstrukte in Kalzium - kompetente *E. coli* TOP10 (vgl. 6.14.3) mit nachfolgender Selektion auf plasmidhaltige Zellen durch das entsprechende Antibiotikum.

Die bei dieser Methode verwendeten Plasmide sind nachfolgend aufgeführt.

Bezeichnung	Kit	Hersteller	Anwendung
PinPoint™ Xa-2	PinPoint™ Xa Protein Purification System	Promega, Madison, USA	Antikörper-Aufreinigung
pCMV-Myc	pCMV-Myc & pCMV-HA Vector Set	(Clontech) TaKaRa Bio, Ōtsu, J	Proteinexpression in eukaryotischen Zelllinien
pGADT7 und pGBKT7	Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System	(Clontech) TaKaRa Bio, Ōtsu, J	Yeast-Two Hybrid

### 6.12.10. Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR wurde durchgeführt, um erzeugte Vektorkonstrukte nach einer Klonierung zu überprüfen (vgl. 6.12.9). Dazu wurden bis zu 20 Klone von den Selektionsplatten gepickt und in jeweils 30 µl Ampuwa für 10 min bei RT resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde bei 4 °C gelagert und innerhalb von 3 Tagen als Template in einer Kolonie PCR mit der Taq DNA Polymerase von NEB eingesetzt.

Die Oligonukleotide für die Kolonie-PCRs wurden so gewählt, dass das PCR Produkt 250 - 500 bp umfasste. Der PCR-Ansatz bestand aus 3 µl Bakteriensuspension, 2 µl 10x Puffer, 0,2 µl 10 mM dNTPs, 0,2 µl 50 µM Oligonukleotid I, 0,2 µl Oligonukleotid II und 0,2 µl Taq DNA Polymerase (2,5 U/µl) und wurde mit Ampuwa auf 20 µl aufgefüllt.

Das verwendete PCR Programm entspricht bis auf den initialen Denaturierungsschritt (10 min bei 94 °C) dem in Kapitel 6.12.7 aufgeführten Vorgehen.

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. 6.12.3) überprüft, wobei für falsch positive Kolonien keine oder eine im Vergleich zu tatsächlich positiven plasmidhaltigen Kolonien deutlich schwächere DNA-Bande detektiert wurde. Bei unklaren Ergebnissen wurde die PCR mit einer Übernachtkultur (ÜNK) der zu testenden Bakterienkolonie wiederholt. Dabei wurden von einer 2 ml ÜNK 10 µl abgenommen und für 1 min bei 11000 g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde direkt in der PCR eingesetzt.

#### **6.12.11. Plasmid Präparation**

Plasmide wurden mit Hilfe des MN NucleoSpin Plasmid Kits aus 2-5 ml Übernachtkulturen nach Herstellerangaben isoliert. Die Elution erfolgte standardmäßig mit 50 µl 5 mM Tris-HCl pH 8,5.

Plasmide, die mittels Transfektion übertragen werden sollten, wurden mit Hilfe des Kits MN NucleoBond PC 100 aus 100 ml ÜNK gewonnen. Die pelletierte DNA wurde im abschließenden Schritt der Präparation in Ampuwa aufgenommen und die Konzentration der Proben auf 1 µg/µl eingestellt.

#### **6.12.12. DNA Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA erfolgte im 3130 Genetic Analyzer von Applied Biosystems (ABI) durch Kapillarelektrophorese nach Sanger<sup>305</sup>.

Dazu wurden zunächst 400 ng der zu sequenzierenden Plasmid-DNA mit 0,5 µl 10 µM Oligonukleotid, 2 µl 5x Sequenzierpuffer und 1 µl BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix (BigDye® Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit) versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Der zu sequenzierende DNA - Abschnitt wurde im Anschluss mit einem initialen Denaturierungsschritt von 60 s bei 96 °C und 25 Zyklen mit 10 s bei 96 °C, 5 min bei T<sub>a</sub>, 4 min bei 60 °C im T3000 Thermocycler amplifiziert. Die T<sub>a</sub> wurde den Angaben des Herstellers der verwendeten Oligonukleotide entsprechend gewählt. Anschließend wurde das PCR Produkt mit Hilfe von Centri-Sep™ Columns von ABI nach Herstellerangaben aufgereinigt und vor der Sequenzierung mit 1x Vol. Hi-Di™ Formamide versetzt.

#### **6.12.13. Spezifische Mutagenese per PCR**

Die spezifische Mutagenese wurde durchgeführt, um rekombinant exprimierte Proteine durch einen gezielten Basenaustausch konstitutiv zu aktivieren. Dieser Basenaustausch



erfolgte auf Basis des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (La Jolla, USA).

Der Generierung der spezifischen Oligonukleotide wurden folgenden Charakteristika zugrunde gelegt: komplementäre, 25-45 Nukleotide umfassende Oligomere, welche den zu mutierenden Bereich um mind. 10 Nukleotide auf jeder Seite überspannen (vgl. 6.10) und die einen GC Gehalt von mindestens 40% aufweisen. Die  $T_a$  wurde mit der in Kapitel 6.10 aufgeführten Formel berechnet. Als Template wurde ein bereits konstruierter rekombinanter Vektor verwendet, welcher das Zielprotein enthielt. Durch die PCR wurde das gesamte Plasmid amplifiziert, so dass das PCR-Programm mit der PfuTurbo® DNA Polymerase dementsprechend einen initialen Denaturierungsschritt mit 60 s bei 95°C, 18 Zyklen mit 30 s bei 95°C, 30 s bei  $T_a$ , 18 min bei 72°C sowie eine terminale Elongation über 30 min bei 72°C umfasste. Der PCR-Ansatz bestand aus 5 ng Plasmid, 2,5 µl 10x Puffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 75 ng Oligonukleotid I, 75 ng Oligonukleotid II und 0,5 µl PfuTurbo® DNA Polymerase (2,5 U/µl), aufgefüllt auf 25 µl mit Ampuwa. Nach der PCR wurde die eingesetzte Plasmid - DNA mit 1 µl *DpnI* (10 U/µl) pro PCR-Cap für 3 h bei 37°C verdaut und das PCR-Produkt mit Hilfe des MN NucleoSpin Extract II Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Anschließend folgte standardmäßig eine Transformation der mutierten Konstrukte in Kalzium - kompetente *E. coli* TOP10 (vgl. 6.14.3) mit nachfolgender Selektion auf plasmidhaltige Zellen durch das entsprechende Antibiotikum. Die Plasmide transformierter Kolonien wurden aus 3-5 ÜNKs präpariert und die erfolgreiche Mutation durch eine Sequenzierung nachgewiesen (vgl. 6.12.11 und 6.12.12).

Die bei dieser Methode verwendeten Oligonukleotide (vgl. 6.10) sind nachfolgend aufgeführt.

Ausgangsplasmid	Oligonukleotide
<i>emsmadE</i> und <i>emsmadE</i> MH2 / pGADT7 und pGBKT7	SE MH2 mut dw SE MH2 mut up
<i>emsmadA</i> / pCMV-Myc	EmSA V <sub>139</sub> T dw EmSA V <sub>139</sub> T up EmSA N <sub>218</sub> Y dw EmSA N <sub>218</sub> Y up EmSA E <sub>243</sub> A dw EmSA E <sub>243</sub> A up
<i>emrsk3</i> / pSecTag2-Hygro	EmTR3 V <sub>269</sub> L dw EmTR3 V <sub>269</sub> L up EmTR3 F <sub>271</sub> L dw EmTR3 F <sub>271</sub> L up EmTR3 V <sub>269</sub> L F <sub>271</sub> L dw EmTR3 V <sub>269</sub> L F <sub>271</sub> L up

#### 6.12.14. Spliced-Leader Differential Display

Zur Identifizierung differentiell exprimierter, transgespleißter mRNAs von *E. multilocularis* nach der Inkubation mit humanem BMP2 (vgl. 6.8) wurde ein Spliced Leader Differential Display (SLDD) durchgeführt<sup>78</sup>.

##### Probenvorbereitung und Herstellung von cDNA

Zunächst wurden 2 ml Metazestoden (Isolat H95) wie in Kapitel 6.17.7 beschrieben ausgehungert und anschließend 6 h mit humanem BMP2 inkubiert (1 nM BMP2 in einem Endvolumen von 1 ml). Die Kontrollgruppe wurde ausschließlich in DMEM inkubiert. Danach wurde die Gesamt-RNA des Parasiten isoliert und in cDNA umgeschrieben (vgl. 6.11.1 und 6.11.3).

##### Herstellung der Representations

Die Spliced Leader-tragende Fraktion der cDNA wurde in einem 50 µl Ansatz per PCR amplifiziert. Das PCR Programm umfasste 20 Zyklen mit 30 s bei 94°C, 30 s bei 57°C und 5 min bei 72°C. Der PCR Ansatz setzte sich aus 1 µl cDNA, 5 µl 10x Puffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 0,5 µl 50 µM SL-TGT, 0,5 µl 50 µM CD3 und 0,5 µl Taq DNA Polymerase (2,5 U/µl) zusammen. Das PCR-Produkt wurde mit dem NucleoSpin Extrakt II Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. 1 µg dieser doppelsträngigen, trans-gespleißten cDNA wurde dann mit 8 U *Sau3A* in einer 40 µl Reaktion nach Herstellerangaben verdaut (vgl. 6.12.8). Anschließend wurden die DNA - Fragmente mit dem oben genannten Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt und mit einem Linker ligiert. Dazu wurden die verdauten, aufgereinigten DNA-Fragmente in einer 40 µl Reaktion über 16 h bei 16°C mit 400 U T4 DNA Ligase über das Brücken-Oligonukleotid LNK 12 mit dem Linker-Oligonukleotid LNK 24 ligiert (vgl. 6.10). In der Reaktion wurden jeweils 50 pmol Oligonukleotid eingesetzt. Direkt anschließend wurde der Ansatz 5 min bei 94°C denaturiert und die denaturierten cDNA-Fragmente in einer zweiten PCR amplifiziert. Das PCR-Programm umfasste 15 Zyklen mit 30 s bei 94°C, 30 s bei 57°C und 2 min bei 72°C. Der PCR-Ansatz setzte sich aus 2 µl cDNA - Fragmenten, 5 µl 10x Puffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 0,5 µl 50 µM SL-TGT, 0,5 µl 50 µM LNK 24 und 0,5 µl Taq DNA Polymerase (2,5 U/µl) zusammen. Diese sog. Representations wurden mit dem oben genannten Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 60 µl Ampuwa eluiert.

##### Differential Display PCRs

1 µl der aufgereinigten Representations wurde in 25 µl Reaktionsvolumen mit der Taq DNA Polymerase von NEB per PCR amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide mit zwei variablen Nukleotiden am 3' Ende wurden komplementär zur Linker-Region (LNK-XX) und zum Spliced-Leader (SL-XX) konzipiert. Der PCR-Ansatz setzte sich aus 1 µl Representations, 2,5 µl 10x Puffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 0,2 µl 50 µM LNK-XX, 0,2 µl

50  $\mu\text{M}$  SL-XX und 0,15  $\mu\text{l}$  Taq DNA Polymerase (2,5 U/ $\mu\text{l}$ ) zusammen. Das entsprechende PCR-Programm umfasste 30 Zyklen mit 30 s bei 94 °C, 30 s bei 56 °C und 1 min bei 72 °C.

#### Harnstoff/Polyacrylamidgelelektrophorese und Silberfärbung

Je 10  $\mu\text{l}$  der PCR Produkte der Differential Display PCRs wurden in einem 7 M Harnstoff / 8% Polyacrylamidgel durch TBE - gepufferte Elektrophorese über 3 h bei 150 V aufgetrennt<sup>305</sup>. Das 11 x 12 cm große Gel (Multigel-Long G47 Gelelektrophoresekammer) wurde im Anschluss nach bereits beschriebenem Protokoll mit Silber gefärbt<sup>306</sup>.

### **6.13.Arbeit mit Proteinen**

#### **6.13.1.Protein-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit von Pierce nach dem Protokoll des Herstellers (Microplate Procedure) über die Absorption bei 540 nm bestimmt. Albumin diente in den Konzentrationen 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 und 1200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  als Standard und wurde nach Abzug des Blank-Werts (Messung mit ddH<sub>2</sub>O) zur Erstellung der Eichkurve verwendet.

#### **6.13.2.SDS-PAGE**

Zur Analyse von einzelnen Proteinen aus Stoffgemischen wurden diese durch SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) nach Laemmli (1970) in Kammern des Mini-PROTEAN® III Gelelektrophorese System größenspezifisch aufgetrennt<sup>305</sup>. In dieser Arbeit wurden zur Analyse von Proteinen von 25 bis 50 kDa 10%-ige Trenngele, für alle anderen 12%-ige Trenngele verwendet.

#### Vorbereitung der proteinhaltigen Proben

Die Proben wurden in Protein-Probenpuffer (Stock: 2x Protein-Probenpuffer: 125 mM Tris pH 6,8, 20% Glycerol, 4% SDS, 10%  $\beta$ -ME, Bromphenolblau) aufgenommen und vor dem Auftragen 5 - 10 min bei 100 °C denaturiert. Abhängig von der Proteinkonzentration wurden 3-20  $\mu\text{l}$  der Probe mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Als Größenmarker wurde standardmäßig der Prestained Protein Marker (Broad Range, 7-75 kDa) von NEB mitgeführt.

#### Präparation von Polyacrylamidgelen

Die verwendeten Polyacrylamidgelen wurden mit Hilfe der Komponenten des Mini-PROTEAN® III Gelelektrophorese Systems von Bio-Rad Laboratories präpariert.

Dazu wurden zunächst die Glasplatten mit dem Gießrahmen nach Angaben des Herstellers in den Gießstand eingebaut und das Trenngel präpariert. Zur Anfertigung von vier 10%igen Trenngelen wurden 8 ml Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1), 6 ml 4x Lower Tris

(1,5 M Tris pH 8,8, 0,4% SDS) und 10 ml Ampuwa gemischt. Für vier 12%-ige Trenngele wurden hingegen 10 ml Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1), 6 ml 4x Lower Tris (1,5 M Tris pH 8,8, 0,4% SDS) und 8 ml Ampuwa gemischt. Die Polymerisation der Trenngele wurde durch die Zugabe von 40 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und 120 µl 16% APS (Ammonium-peroxodisulfat) gestartet. Der jeweilige Ansatz wurde nach dem Mischen direkt zwischen die Glasplatten gegossen, wobei 1,5 cm bis zum oberen Rand der kürzeren Platte frei gelassen wurden. Die Trenngele wurden bis zur vollständigen Polymerisation mit Ampuwa überschichtet (15 min). Anschließend wurden für vier Sammelgele 1,5 ml Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1), 1,5 ml 4x Upper Tris (0,5 M Tris pH 6,8, 0,4% SDS) und 6,5 ml Ampuwa gemischt und die Polymerisation durch die Zugabe von 40 µl TEMED und 70 µl 16% APS gestartet. Die Trenngele wurden nun anstelle des Ampuwa mit dem Sammelgel überschichtet und die zugehörigen Kämme eingesetzt. Der Aufbau wurde weitere 15 min bis zur vollständigen Polymerisation des Sammelgels bei RT stehen gelassen.

#### Konditionen der SDS-PAGE

Die vollständig polymerisierten Polyacrylamidgele wurden nach den Angaben des Herstellers in die Gelelektrophoresekammer eingebaut. Die SDS-PAGE wurde bei 120-140 Volt mit maximal 850 ml Elektrophoresepuffer (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) über einen Zeitraum von 45-90 min durchgeführt.

#### **6.13.3. Coomassie Färbung**

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine (vgl. 6.13.2) wurden nach Bedarf für 15 min in 20 ml Coomassie-Lösung (0,25% Coomassie Blue R-250, 50% Methanol, 10% Eisessig, 39,75% H<sub>2</sub>O) gefärbt<sup>305</sup>. Anschließend wurde das unspezifisch gefärbte Polyacrylamidgel mit 20 ml Entfärber-Lösung (45% Methanol, 10% Eisessig, 45% H<sub>2</sub>O) entfärbt. Dabei wurde die Entfärber-Lösung mehrfach erneuert.

#### **6.13.4. Western Blot**

Zum Nachweis spezifischer Proteine in einem Proteingemisch wurden diese nach der Auftrennung in einer SDS-PAGE (siehe 6.13.2) im Western Blot Verfahren auf eine Nitrozellulose Membran transferiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert<sup>305</sup>.

#### Transfer auf Nitrozellulose Membran

Der Aufbau der zur Durchführung eines Western Blot verwendeten Komponenten des Mini Trans-Blot cell als Teil des Mini-PROTEAN® III Elektrophorese Systems von Bio-Rad Laboratories erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der Transfer der im

Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurde bei 350 mA mit 850 ml Western Blot Puffer (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 20% Methanol) über 60 min durchgeführt.

Die Nitrozellulose Membran wurde während der nachfolgenden Schritte grundsätzlich unter ständiger Bewegung auf einer Wippe inkubiert.

### Immundetektion

Zur Vermeidung späterer unspezifischer Reaktionen von Erst- oder Zweitantikörpern mit freien Bereichen der Nitrozellulose Membran wurde diese im Anschluss an den Transfer für 60 min bei RT mit 10 ml 5% Magermilch in TBST (10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20) blockiert.

Die verwendeten Primärantikörper I wurden nach Herstellerangaben in 5% BSA (Albumin Fraktion V (pH 7) Blotting grade) in TBST (5% BSA/TBST) oder 5% Magermilch in TBST (5% MM/TBST) gelöst. Polyklonale Antikörper, die spezifisch gegen Antigene aus *E. multilocularis* hergestellt worden waren (Primärantikörper II), wurden standardmäßig in 5% MM/TBST aufgenommen. Nach dem Entfernen der Blockierungslösung wurde die Membran ÜN bei 4°C mit den entsprechenden Primärantikörpern behandelt. Nach 3 Waschschritten à 10 min mit TBST wurde der Blot am darauffolgenden Tag 60 min bei RT mit dem korrespondierenden Zweitantikörper inkubiert. Die bei der Immundetektion verwendeten Antikörper sind nachfolgend aufgeführt.

Primärantikörper I		angesetzt in	Hersteller
anti-biotin, HRP-linked antibody		5% BSA/TBST	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-Phospho-Smad1 (Ser463/465) / Smad5 (Ser463/465) / Smad8 (Ser426/428)		5% MM/TBST	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-Phospho-Smad3 (Ser423/425) / Smad1 (Ser463/465)		5% BSA/TBST	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-Smad1 / Smad5 / Smad8 / Smad9		5% MM/TBST	Imgenex, San Diego, USA
Phosphoserine Detection Kit		5% BSA/TBST	(Calbiochem) Merck, Darmstadt
anti-c-Myc		5% MM/TBST	New England Biolabs, Schwalbach
anti-HA		5% MM/TBST	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Primärantikörper II	Verdünnung	angesetzt in	Hersteller
Anti-RSK1	1:500	5% MM/TBST	immunoGlobe, Himmelstadt <sup>95</sup>
Anti-RSK3	1:500	5% MM/TBST	immunoGlobe, Himmelstadt (vgl. 6.13.6)
Sekundärantikörper	Verdünnung	angesetzt in	Hersteller
anti-rabbit, HRP-linked	1:5000	5% MM/TBST	Dianova, Hamburg
anti-mouse, HRP-linked	1:10000	5% MM/TBST	Dianova, Hamburg

Nach weiteren 3 Waschschritten à 10 min mit TBST wurde die Nitrozellulose mit dem ECL Western Blotting Substrat inkubiert und die entstehende Lumineszenz durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Die Entwicklung des Films erfolgt mit Hilfe der Entwicklermaschine Curix60 (G153 Developer; G354 Fixer).

#### **6.13.5. Immobilisierung von Proteinen an Affinitätssäulen**

In dieser Arbeit wurde das PinPoint™ Xa Protein Purification System verwendet, um die extrazelluläre Domäne von EmRSK3 rekombinant als Biotin - Fusionsprotein zu produzieren (vgl. 6.12.7 und 6.14.6). Zur Aufreinigung des bereits vorliegenden Antikörpers anti-EmRSK3 wurde das Protein anschließend über das fusionierte Biotin irreversibel an TetraLink™ Tetrameric Avidin Resin gebunden.

Dazu wurde zunächst die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* TOP10 nach den Angaben des Herstellers induziert (vgl. 6.14.6). Das gewonnene Bakterienpellet wurde anschließend in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Durch die anschließende Behandlung mit Ultraschall (6x 30 s; Branson Sonifier 450, output 5-6, duty constant) wurden die Zellen lysiert. Nach einer Zentrifugation (15 min, 10000 *g*, 4°C) wurde der Überstand zu 1 ml des nach Angaben des Herstellers äquilibrierten TetraLink™ Tetrameric Avidin Resin zugegeben. Der Ansatz wurde unter ständiger Bewegung 16 h bei 4°C inkubiert und auch in den weiteren Schritten bei 4°C bearbeitet. Nach der Bindung des Biotin-Fusionsproteins an das TetraLink™ Tetrameric Avidin Resin wurde der Ansatz in 15 ml Säulenhörchen überführt und dort 5x mit eiskaltem PBS (1x Säulenvol.) gespült. Durch diesen Schritt wurden nicht bindende Proteine aus dem Ansatz entfernt. Der Durchfluss wurde jeweils gesammelt und zur späteren Überprüfung der Methode bei 4°C zwischengelagert.

Die Bindung des Fusionsproteins an das TetraLink™ Tetrameric Avidin Resin wurde mit Hilfe des HRP gekoppelten anti-biotin Antikörpers von Cell Signaling nachgewiesen. Dazu wurde 5 µl der Protein-Avidin Resin Suspension durch SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Die Inkubation der Membran mit dem Antikörper und die Applikation des ECL Western Blotting Substrate von Pierce wurde gemäß den Angaben der Hersteller durchgeführt (vgl. 6.13.2 und 6.13.4).

#### **6.13.6. Aufreinigung des Antikörpers anti-RSK3**

Das rekombinant hergestellte Biotin-Fusionsprotein, bestehend aus Biotin und der extrazellulären Domäne von EmRSK3 wurde irreversibel an TetraLink™ Tetrameric Avidin Resin gebunden (vgl. 6.12.7, 6.14.6 und 6.13.5) und anschließend nach den Angaben des Herstellers zur Aufreinigung des bereits vorliegenden Antikörpers anti-EmRSK3

verwendet. Dieser Antikörper wurde bereits 2006 im Laufe meiner eigenen Diplomarbeit mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung eines bone-morphogenetic protein - Rezeptors des Fuchsbandwurms *Echinococcus multilocularis*“ (AG Brehm, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg) bei immunoGlobe produziert.

Zur Aufreinigung dieses Antikörpers wurde das Serum der finalen Blutung (circa 80 ml) 3x langsam bei 4°C über die Säule mit dem immobilisierten Biotin-Fusionsprotein (vgl. 6.13.5) gegeben. Der Ansatz wurde anschließend mit 30 ml eiskaltem PBS gewaschen. Die Elution des EmRSK3-Antikörpers erfolgte nach Angaben des Herstellers schrittweise mit je 1 ml eiskalter 100 mM Zitronensäure (pH 3,0), wobei jedes Eluat in jeweils 200 µl 2 M Tris (pH 8,0) aufgefangen wurde. Es wurden insgesamt 10 Eluate gesammelt. 10 µl jedes Eluates wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Die erfolgreiche Aufreinigung und der Reinheitsgrad des aufgereinigten Antikörpers wurden anschließend durch die Bindung des HRP gekoppelten anti-Biotin Antikörpers nachgewiesen (vgl. 6.13.4). Die Inkubation der Membran mit diesem Antikörper und die Applikation des ECL Western Blotting Substrate von Pierce wurde gemäß den Angaben der Hersteller durchgeführt (vgl. 6.13.2 und 6.13.4).

#### 6.13.7. Immunpräzipitation

Zum Nachweis von EmRSK3 in Metazestoden von *E. multilocularis* wurde dieser Rezeptor mit Hilfe des aufgereinigten Antikörpers anti-EmRSK3 immunpräzipitiert.

Dazu wurden zunächst 5 ml axenisch kultivierte und gewaschene Metazestoden des Isolats H95 mit Hilfe einer 100 µl Pipettenspitze mechanisch zerstört und für 5 min bei 400 g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 5 ml Homogenisierungspuffer (20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1x PhosSTOP, 1x Complete Proteinase Inhibitor Cocktail) versetzt und unter ständiger Bewegung 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch eine Zentrifugation über 5 min bei 600 g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde nochmals mit 5 ml Homogenisierungspuffer versetzt, 10 min bei 37°C inkubiert und die Zellen anschließend durch eine Zentrifugation über 10 min bei 1000 g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurden nun 3 ml Lysepuffer (20 mM Tris pH 7,5, 250 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2% Sodium deoxycholate (DOC), 1x PhosSTOP, 1x Complete Proteinase Inhibitor Cocktail) versetzt und über 1 h unter ständiger Bewegung bei 4°C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation über 5 min bei 11000 g und 4°C wurde der Überstand, in dem schließlich die gelösten Membranproteine von *E. multilocularis* vorlagen, in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und über Nacht unter ständiger Bewegung bei 4°C mit aufgereinigtem anti-EmRSK3 (Verdünnung 1:100) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden zunächst 100 µl AgaroseG beads 3x mit je 1 ml TBST (0,1%)

äquibriert und danach der Antikörper - Protein Lösung zugefügt. Dieser Ansatz wurde 5 h unter ständiger Bewegung bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die nun beladenen AgaroseG beads durch eine Zentrifugation über 1 min bei 500 g und 4 °C pelletiert. Dieses Pellet wurde 3x mit je 1 ml Lysepuffer ohne DOC gewaschen. Je 100 µl dieser AgaroseG beads wurde mit 25 µl 5x Protein-Probenpuffer versetzt und für eine SDS-PAGE vorbereitet.

## 6.14. Arbeiten mit *Escherichia coli*

### 6.14.1. Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> TOP10	F-, <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen, Groningen, NL
<i>E. coli</i> BL21	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r <sub>S</sub> <sup>-</sup> , m <sub>S</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i>	(Amersham) GE Healthcare Europe, Freiburg

### 6.14.2. Medien und Zusätze

Medien	Zusammensetzung	
LB Medium <sup>305</sup>	1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl in Aqua <sub>dest</sub>	pH 7,0; autoklaviert
LB Agar Platten	LB Medium mit 1,5% Bacto-Agar	
Zusätze		
Antibiotika	100 µg/ml Ampicillin 10 µg/ml Kanamycin	
X-Gal	80 µg/ml X-Gal	

### 6.14.3. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* TOP10 (vgl. 6.14.1) wurden unter Verwendung der Kalziumchlorid-Methode chemisch kompetent gemacht<sup>305</sup>.

Dazu wurden 50 ml 2xLB-Medium mit 350 µl einer *E. coli* ÜNK beimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,45 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur zum Abkühlen für mindestens 10 min auf Eis gestellt. Es folgte die Ernte der Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 6.000 g und 4 °C. Das resultierende Pellet wurde vorsichtig in 25 ml eiskaltem CaCl<sub>2</sub> (100mM) resuspendiert und für zwei Stunden auf Eis inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei max. 4.000 g und 4 °C wurden die Bakterien in 2,5 ml eiskaltem CaCl<sub>2</sub> (100mM) aufgenommen und sehr vorsichtig resuspendiert. Danach wurden die kompetenten Zellen entweder sofort verwendet oder für die Lagerung bei -80 °C mit 1/3x Vol. Glycerin (eiskalt) versetzt und zu 50 µl aliquotiert.



#### 6.14.4. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Das Einbringen von DNA in kompetente *E. coli* Zellen erfolgte durch Transformation mittel Hitzeschock<sup>305</sup>.

50 - 500 ng eiskalte Plasmid-DNA wurde dazu gemeinsam mit 50 µl chemisch kompetenter *E. coli* TOP10 oder *E. coli* BL21 (vgl. 6.14.1) für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 90 s bei 42 °C hitzegeschickt und sofort für 2 min auf Eis gekühlt. Als nächstes wurden pro Ansatz 250 µl LB dazu gegeben und alles für 60 min bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurden je 100 und 200 µl auf Antibiotika - Selektionsplatten ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. In Abhängigkeit des verwendeten Plasmids wurde durch den Zusatz von X-Gal in den Selektionsplatten ein blau - weiß Screening der transformierten *E. coli* durchgeführt.

#### 6.14.5. Gefrierstocks von *E. coli*

Zur Langzeitlagerung rekombinanter Plasmide bzw. Bakterien wurden Gefrierstocks hergestellt, die bei -80 °C gelagert wurden. Dazu wurden zunächst in 2 ml LB Medium ÜNKs der rekombinanten Bakterien angesetzt. Am nächsten Tag wurden je 850 µl dieser Bakteriensuspension mit 150 µl sterilem 87%igen Glycerin versetzt und als 1 ml Aliquots auf Kryogefäße aufgeteilt. Diese wurden zum Transport direkt nach dem Abfüllen auf Trockeneis gestellt und abschließend bei -80 °C gelagert.

#### 6.14.6. Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

In dieser Arbeit wurde das PinPoint™ Xa Protein Purification System zur rekombinanten Expression der extrazellulären Domäne von EmRSK3 verwendet.

Dazu wurden zunächst *E. coli* und, zur Optimierung der Expression, *E. coli* BL21 mit dem entsprechenden rekombinanten Vektor transformiert (vgl. 6.12.7ff). In einer Testexpression im kleinen Maßstab (40 ml) nach den Angaben des Herstellers wurde dann der zur Produktion des Biotin-Fusionsproteins optimale Bakterienstamm identifiziert. Die Stärke der Expression des rekombinanten Proteins wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung bzw. Western Blot verglichen. Abschließend erfolgte die Expression der rekombinanten extrazellulären Domäne von EmRSK3 über 5 h bei 37 °C und 225 rpm in einer 1 l Kultur *E. coli* TOP10 in LB-Medium (Zusammensetzung siehe 6.14.2) nach den Angaben des Herstellers. Die Bakterien wurden abschließend durch eine Zentrifugation (10 min, 8000 *g*, 4 °C) geerntet und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 6.15. Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

### 6.15.1. Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>S. cerevisiae</i> AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS3, GAL2 <sub>UAS</sub> -GAL2 <sub>TATA</sub> -ADE2, URA3::MEL1 <sub>UAS</sub> -MEL1 <sub>TATA</sub> lacZ	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, F

### 6.15.2. Medien und Zusätze

#### Medien

YPDA	20 g/l Difco™ Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, ad 950 ml Aqua <sub>dest</sub> (pH 5,8). Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf ca. 55 °C abgekühlt und mit Glucose (steril filtriert; final: 2%) und Adenin-Hemisulfat (steril filtriert; final: 0,003%) versetzt.
SD Drop Out	6,7 g/l Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, X g des entsprechenden Drop Out Supplement (DOS), ad 950 ml Aqua <sub>dest</sub> (pH 5,8). Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf ca. 55 °C abgekühlt und mit Glucose (steril filtriert; final: 2%) sowie weiteren gewünschten Zusätze versetzt.
YPDA Platten	YPDA mit 20 g/l Difco™ Bacto Agar
SD Drop Out Platten	SD mit 20 g/l Difco™ Bacto Agar

#### Zusätze

##### Drop Out Supplement (DOS)

SD -Trp	0,64 g/l Leu/-Trp DOS 20 ml 50x Leu (5 mg/ml)
SD -Leu	0,64 g/l Leu/-Trp DOS 20 ml 50x Trp (1 mg/ml)
SD -Leu/-Trp	0,64 g/l Leu/-Trp DOS
SD -Leu/-Trp/-His	0,6 g/l Ade/-His/-Leu/-Trp DOS 15 ml/l 1% Adenin-Hemisulfat
SD-Leu/-Trp/-His/-Ade	0,6 g/l Ade/-His/-Leu/-Trp DOS

##### Inhibitor

3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT)	Endkonzentration: 7,5 mM, 10 mM und 15 mM
------------------------------	---

### 6.15.3. Transformation von *S. cerevisiae*

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der Stamm *S. cerevisiae* AH109 (siehe 6.15.1) nach dem folgenden Protokoll mit Hilfe von LiAc transformiert: Zunächst wurde das benötigte Volumen YPDA berechnet, damit am nächsten Tag 2 ml ÜNK pro Transformationsansatz zur Verfügung standen. Das entsprechende Volumen YPDA wurde mit AH109 angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert (max. 16h). Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation pelletiert (5 min, 700 g, 4 °C) und anschließend in 100 µl/Ansatz eines frisch hergestellten ONE-STEP-Puffers (0,2 M LiAc pH 7,5, 40% PEG 3350, 100 mM

DTT) resuspendiert. Anschließend wurden 700 ng von jedem zu transformierenden Plasmid in je 100 µl der Hefe-Suspension für 30 min bei 45°C inkubiert, wobei die Zellen zwischenzeitlich mehrmals vorsichtig resuspendiert wurden. Die transformierten Hefen wurden schließlich komplett auf die entsprechenden SD - Drop Out Platten ausplattiert. Nach 3-5 Tagen Inkubation bei 30°C wurde die Protein-Expression in den transformierten Hefen im Western Blot verifiziert bzw. der Yeast-Two Hybrid durchgeführt. Weitere Informationen sind im Yeast Protocols Handbook (Juli 2009) von Clontech zu finden.

#### 6.15.4. Verifizierung der Proteinexpression

Einzeln transformierte *S. cerevisiae* AH109 (siehe 6.15.3) wurden auf SD-Trp (AD) bzw. SD-Leu (BD) Platten selektioniert. Von diesen Platten wurden einzelne Kolonien gepickt und über Nacht im entsprechenden SD-Drop Out Medium inkubiert. 1 ml dieser ÜNK wurde für 5 min bei 700 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in Protein - Probenpuffer (vgl. 6.13.2) aufgekocht. Anschließend wurden 10 µl von jeder Probe durch SDS-PAGE aufgetrennt und die so separierten Proteine mittels Western Blot (vgl. 6.13.4) auf Nitrozellulose überführt. Die exprimierten rekombinanten Proteine konnten nun mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

#### 6.15.5. Yeast-Two Hybrid

In dieser Arbeit wurde das Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System von Clontech verwendet.

Zur Untersuchung von Protein - Protein Interaktionen wurden zunächst die kodierenden DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Proteine bzw. Domänen zum einen mit der DNA - Bindungsdomäne (BD; codiert auf pGBKT7), zum anderen mit der Gal4 DNA - Aktivierungsdomäne (AD; codiert auf pGADT7) des Gal4 Transkriptionsfaktors fusioniert (vgl. 6.12.7ff). Um im Yeast-Two Hybrid verschiedene Protein - Protein Interaktionen untersuchen zu können wurde *S. cerevisiae* AH109 mit den korrespondierenden rekombinanten Plasmiden ko-transformiert, wobei jeweils ein Plasmid das AD - Fusionsprotein und ein anderes das BD-Fusionsprotein codierte (siehe 6.15.3). Die ko-transformierten Hefen wurden auf SD-Leu/-Trp Platten selektioniert und die Proteinexpression verifiziert (siehe 6.15.4). Potentielle Protein-Protein Interaktionen wurden anschließend dadurch kontrolliert, dass die entsprechenden Kolonien parallel auf SD-Leu/-Trp/-His Platten (mittlere Stringenz) und SD-Leu/-Trp/-His/-Ade Platten (hohe Stringenz) überimpft wurden. Das Wachstum der Hefekolonien auf diesen Stringenz-Platten war nur bei einer Interaktion der Fusionsproteine möglich. Die Auswertung der Platten erfolgte nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen bei 30°C.

Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurden Hefen mit den Fusionsprotein - codierenden Plasmiden und Leerplasmiden ko-transformiert. Wurde bei diesen rekombinanten Hefen ein Wachstum auf Stringenzplatten festgestellt, dann wurde das Ergebnis durch Überimpfen der fraglichen Kolonien auf SD-Leu/-Trp/-His Platten mit 7,5 mM, 10 mM und 15 mM 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) verifiziert. Alle in dieser Arbeit getesteten Protein-Kombinationen wurden dreimal in unabhängigen Ansätzen untersucht.

### 6.16.Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

Alle hier verwendeten Methoden beim Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien werden standardmäßig bei der Zell- und Gewebekultur verwendet und sind ausführlich in der entsprechenden Fachliteratur beschrieben<sup>305,307</sup>.

#### 6.16.1.Verwendete eukaryotischer Zelllinien

Die folgenden bei der American Type Culture Collection (ATCC) hinterlegten Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

Bezeichnung	Zellart	Organismus	ATCC Nr.
Reuber H35 (rh <sup>-</sup> ; H4-II-E-C3)	Hepatomazellen	<i>Rattus norvegicus</i>	CRL-1600
HEK 293T/17	embryonale Nierenepithelzellen	<i>Homo sapiens</i>	CRL-11268
CHO-K1	Eierstockzellen	<i>Cricetulus griseus</i>	CCL-61

#### 6.16.2.Bestimmung der Zellzahl

Die Konzentration von eukaryotischen Zellen in Suspensionen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Kammerfaktor:  $10^4$ ) bestimmt. Dazu wurde zunächst das gesamte Medium mit Hilfe einer Pumpe aus der entsprechenden Zellkulturflasche entfernt und die adhärent wachsenden Zellen wurden 1x mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde in Abhängigkeit der Größe der Zellkulturflasche Trypsin / EDTA-Lösung zugegeben (75 cm<sup>2</sup> Flasche: 2 ml; 175 cm<sup>2</sup> Flasche: 3 ml). Nach 15 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die nun trypsinierten Zellen durch Klopfen vom Flaschenboden gelöst und der Suspension das 1x Vol. Kulturmedium A (Zusammensetzung siehe 6.17.2) hinzugefügt. Anschließend wurde ein 10 µl Aliquot der Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Davon wurden 10 µl in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Lebendzellzahl bestimmt. Die Zellzahl (Anzahl Zellen/ml) wurde wie folgt berechnet:

$$\text{durschn. Anz. der Zellen} \times \text{Verdünnung (10)} \times \text{Kammerfaktor (10}^4\text{)}$$

### 6.16.3. Kultivierung

Die verwendeten eukaryotischen Zelllinien wurden standardmäßig bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit 20 ml Kulturmedium A in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Ein Mediumwechsel fand alle 7 Tage statt. Dazu wurde, wie in Kapitel 6.16.2 beschrieben, die Zellzahl bestimmt und die Zellen in neuen 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 20 ml Kulturmedium A ausgesät. Die Zelllinien CHO-K1, HeLa und Hep G2 wurden mit 1x10<sup>5</sup> Zellen/20 ml, die Zelllinie HEK 293 T dagegen mit 5x10<sup>4</sup> Zellen/20 ml ausgesät.

Abweichend davon wurden Reuber H35 Zellen mit 50 ml Kulturmedium A in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert (2x10<sup>6</sup> Zellen/Zellkulturflasche).

### 6.16.4. Gefrierstocks eukaryotischer Zellen

Das Medium einer zu 80% bewachsenen Zellkulturflasche wurde als konditioniertes Medium in ein 50 ml Reaktionsgefäß abgegossen und das Restmedium komplett abgenommen. Die in der Zellkulturflasche verbliebenen Zellen wurden trypsinisiert (siehe 6.16.2), in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 15 min bei 400 *g* und RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in insgesamt 4 ml Gefrierlösung (50% konditioniertes Medium, 30% frisches Medium, 20% DMSO) resuspendiert und als 1 ml Aliquots auf Kryogefäße aufgeteilt. Diese wurden direkt auf Eis gestellt und anschließend über 24 h bei -80°C eingefroren. Die Langzeit - Lagerung erfolgte in Flüssigstickstoff bei -196°C.

Zum Ansetzen frischer Kulturen aus diesen Gefrierstocks wurden die Kryogefäße mit den eingefrorenen eukaryotischen Zellen vorsichtig, aber schnell auf 37°C erwärmt und in eine mit 20 ml vorgewärmtem Kulturmedium A befüllte 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Nach 16 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde zur Entfernung des im Gefrierstock enthaltenen DMSO das Medium vollständig gewechselt. Im weiteren Verlauf erfolgte ein Mediumwechsel alle 7 Tage. Nach einer Woche konnten die Zellen dann für die vorgesehenen Versuche verwendet werden.

### 6.16.5. Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen

Für Interaktions-, Stimulierungs- und Inhibitorstudien wurden eukaryotische Zellen mit rekombinanten Plasmiden, die für Rezeptoren und Smads des BMP / TGF-β Signalsystems von *E. multilocularis* kodieren, transient mit Hilfe der Ca-Phosphat Methode transfiziert. Die daraufhin rekombinant exprimierten Rezeptoren wurden durch die Zugabe der entsprechenden Zytokine (vgl. 6.8) aktiviert und die folgende Signalübertragung konnte durch spezifische Antikörper, die an phosphorylierte Smads binden, nachgewiesen werden (vgl. 6.13.4).

### Ca-Phosphat Methode

Zunächst wurde die Zellzahl einer zu 80% mit eukaryotischen Zellen bewachsenen Zellkulturflasche bestimmt (vgl. 6.16.2). Anschließend wurden jeweils  $7 \times 10^5$  Zellen mit 5 ml Kulturmedium A in 6-well culture plates ausgesät (vgl. 6.16.1). Zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen wurden die Zellkulturplatten leicht geschwenkt und ÜN bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium vollständig entfernt und durch 4 ml vorgewärmtes Kulturmedium A oder DMEM ersetzt (vgl. 6.17.2). Dann wurden in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß 5 µg rekombinante Plasmid-DNA, 62 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> und Ampuwa durch vortexen gemischt (Gesamtvolumen: 500 µl). In einem zweiten sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 500 µl 2x HEPES-buffered saline (50 mM HEPES; 10 mM KCl; 12 mM α-D-Glucose; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 280 mM NaCl; pH 7,05) vorgelegt und der Ansatz langsam dazu getropft. Die so hergestellte Transfektionslösung wurde zur Ausbildung von Kalzium-DNA Präzipitaten 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung tropfenweise dem Medium der ausgesäten eukaryotischen Zellen zugegeben. Zur gleichmäßigen Verteilung der Lösung wurden die Zellkulturplatten leicht geschwenkt. Nach 7 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Medium vollständig entfernt und durch 5 ml angewärmtes Kulturmedium A ersetzt. Die transfizierten Zellen wurden ÜN bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium vollständig durch 5 ml vorgewärmtes Kulturmedium A ersetzt und die Zellen nochmals ÜN bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen 4 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> ausgehungert. Dazu wurde das Medium vollständig durch 5 ml vorgewärmtes DMEM ersetzt. Schließlich wurde zur Stimulation der rekombinant exprimierten Proteine des BMP- / TGFβ Signalweges von *E. multilocularis* das Medium vollständig entfernt und 1 ml 20 nM BMP2 in DMEM pro Well zugegeben. Die transfizierten Zellen wurden anschließend 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Schließlich wurden die adhärenenten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden direkt auf Eis gestellt. Durch eine Zentrifugation (3 min, 400 g, RT) wurden die Zellen pelletiert und entweder bei -20°C gelagert oder in 100 µl Protein-Probenpuffer aufgenommen und für eine SDS-PAGE vorbereitet (vgl. 6.13.2).

Bei Transfektionen mit konstitutiv aktiven Rezeptoren entfielen die Punkte Aushungern und Stimulation. In diesem Fall wurden die Zellen direkt mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und wie in Kapitel 6.13.2 beschrieben für eine SDS-PAGE und den nachfolgenden Western Blot vorbereitet.

Bei Versuchen zur Aktivierung von Echinokokken BMP / TGF-β Signalwegen mit Kulturüberstand axenisch kultivierter Metazestoden wurden jeweils 1 ml des

Kulturüberstandes bzw. des Kulturmediums A4 (vgl. 6.14.2) zur Stimulation der heterolog exprimierten Rezeptoren verwendet.

Bei Experimenten zur Inhibierung der Echinokokken BMP / TGF- $\beta$  Signalwege durch SB431542, Dorsomorphin und LY364947 wurden diese Inhibitoren beim Mediumwechsel nach der 7-stündigen Inkubation der Zellen mit der jeweiligen Transfektionslösung in Konzentrationen zwischen 5  $\mu$ M und 50  $\mu$ M zugegeben. Bei jedem weiteren Mediumwechsel wurden auch die Inhibitoren erneuert. Die Stimulation der Signalwege EmRSK1/EmRSK4 und EmRSK3/EmRSK4 erfolgte wie oben beschrieben mit humanem BMP2 und unter Zugabe der Inhibitoren. EmRSK2/EmRSK4 wurde aufgrund der konstitutiven Aktivierung von EmRSK2 nicht zusätzlich stimuliert. Als Kontrolle diente das entsprechende Volumen DMSO.

## 6.17. Arbeiten mit *Echinococcus multilocularis*

### 6.17.1. Verwendete Isolate

Die hier aufgeführten Isolate von *E. multilocularis* wurden ab dem angegebenen Jahr kontinuierlich in *Meriones unguiculatus* kultiviert (siehe 6.17.3).

Isolat	Herkunft	Präparation	seit	Referenz
H95	<i>Vulpes vulpes</i>	Oncosphäre	1995	<sup>79</sup>
J31	<i>Macaca fascicularis</i>	infizierte Leber	2003	<sup>308</sup>
GH09	<i>Macaca mulatta</i>	infizierte Leber	2009	unveröffentlicht
G8065	<i>Macaca mulatta</i>	infizierte Leber	2009	unveröffentlicht

### 6.17.2. Kulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) ohne Zusätze
Kulturmedium A	DMEM 10%FBS 100 U/ml Pen/Strep 20 $\mu$ g/ml Tavanic®
Kulturmedium A4	Jeweils 50 ml Kulturmedium A wurde 7 Tage bei 37°C und 5% CO <sub>2</sub> durch die Inkubation mit 1x10 <sup>6</sup> Reuber Hepatoma Zellen in 175 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen konditioniert und anschließend steril filtriert <sup>81</sup> . Dem Medium wurde L-Cysteine (Endkonzentration 100 $\mu$ M), Barthocuproinedisulfonic-acid (Endkonzentration 10 $\mu$ m) und $\beta$ -Mercaptoethanol (Endkonzentration 0,01%) zugesetzt, wodurch reduzierende Bedingungen geschaffen wurden.

### 6.17.3. In vivo Kultivierung

*E. multilocularis* wurde durch wiederholtes Passagieren des Metazestodengewebes in *Meriones unguiculatus* in vivo kultiviert<sup>44,309</sup>. Für einzelne Isolate wurde diese Art der Kultivierung über mehrere Jahre durchgeführt (siehe 6.17.1). Es wurden jeweils 0,3 - 0,5 ml des Parasitengewebes mit einer 0,9 mm Kanüle in das Peritoneum einer solchen Mongolischen Rennmaus injiziert. Nach 8 - 16 Wochen wurde dieses Wirtstier

zur Entnahme des infizierten Gewebes unter sterilen Bedingungen geöffnet. Es wurde darauf geachtet, möglichst wenig Gewebe des Wirts zu verschleppen und innere Organe nicht zu verletzen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Metazestodengewebe wurde nach der Entnahme in 1 - 2 mm dicke Scheiben geschnitten und mit dem Kolben einer 10 ml Einwegspritze durch ein handelsübliches rostfreies und steriles Metall-Teesieb passiert. Um die Verunreinigungen durch Wirtsgewebe (z. B. durch Blutzellen) bei den weiteren Anwendungen möglichst gering zu halten, wurde das Parasitenmaterial in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 3x mit PBS gewaschen (ad 50 ml). Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurde zentrifugiert (3 min, 400 g, RT), so dass der Überstand nach dem Absetzen des groben Materials einfacher dekantiert werden konnte.

Sollte das Parasitenmaterial für eine *in vivo* oder *in vitro* Kultivierung verwendet werden, wurde es einer Antibiotikabehandlung mit dem Wirkstoff Levofloxacin unterzogen (16 h bei 4 °C; 2 µl Tavanic® pro ml Suspension) und anschließend wiederum 3x mit PBS gewaschen (s.o.).

#### **6.17.4. Isolierung und Aktivierung von Protoskolizes**

##### Isolierung von Protoskolizes

Die Isolierung von Protoskolizes erfolgte auf Grundlage bereits beschriebener Methodik<sup>78</sup>. Zunächst wurden bis zu 15 ml passiertes Metazestodenmaterial in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1x Vol. PBS versetzt und mindestens 10 min kräftig geschüttelt. Dadurch lösten sich die Protoskolizes ausreichend vom umgebenden Gewebe. Anschließend wurde das gesamte Material erst durch ein steriles Kunststoff-Teesieb und danach durch 150 µm Gaze, die auf einem sterilen Becher befestigt war, gesiebt. Um die Ausbeute zu maximieren, wurde der Ansatz im Sieb mehrmals mit PBS gespült und dabei jeweils neu resuspendiert. In diesen beiden Schritten passierten kleine Partikel wie Kalziumkörperchen und Protoskolizes die Maschen des Siebes bzw. der Gaze. Diese kleinen Partikel wurden anschließend nochmals durch eine 30 µm Gaze aufgetrennt und wiederum mehrmals mit PBS gewaschen. Während die Kalziumkörperchen auch hier die Maschen der Gaze passieren konnten, blieben die Protoskolizes hängen und wurden mit einer 10 ml Pipette abgesaugt und in eine große Petrischale überführt. Durch langsames Kreisen der Schale sammelten sich die Protoskolizes in der Mitte an und konnten mit Hilfe einer 1000 µl Pipette mit steril abgeschnittener Spitze abgenommen werden.

##### Aktivierung von Protoskolizes

Die Aktivierung der isolierten Protoskolizes erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Fernandez et al.<sup>74</sup>. Dazu wurden zunächst frisch präparierte Protoskolizes (vgl. 6.17.4)



zu gleichen Teilen auf zwei 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Während die eine Hälfte aktiviert wurde (PS+), bildet die zweite Hälfte die Grundlage für die inaktivierte Kontrollprobe (PS-).

Die zu aktivierenden Protoskolizes wurden als Nächstes mit 25 ml 0,05% Pepsin (gelöst in DMEM; steril filtriert; pH 2,0) versetzt und für 30 min bei 37°C und 125 rpm inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit PBS, vgl. 6.17.3, und die Aufnahme des Parasitenmaterials in 25 ml 0,2% Sodium taurocholate (gelöst in DMEM; steril filtriert; pH 7,4). Nach drei Stunden bei 37°C und 125 rpm wurden abschließend 3 weitere Waschschrte mit PBS durchgeführt. Die Kontrollprobe wurde wie die zu aktivierende Suspension behandelt, mit dem Unterschied, dass die Protoskolizes jeweils in DMEM ohne Zusätze aufgenommen wurden.

Um den Erfolg der Aktivierung zu überprüfen, wurden je 20 µl der PS+ und der PS- Probe auf einen Objektträger übertragen und mikroskopiert. Im Ansatz mit den aktivierten Protoskolizes können i.d.R. signifikant mehr evaginierte Protoskolizes als in der nicht aktivierten Fraktion gefunden werden.

#### **6.17.5. *In vitro* Kultivierung von Metazestoden**

##### Ko-Kultivierung mit Hepatomazellen

Das in dieser Arbeit verwendete System der Ko-Kultivierung von *E. multilocularis* Metazestoden und Reuber H35 Zellen basiert auf einem von Brehm et al. beschriebenen Protokoll<sup>78</sup>.

Jeweils 1 ml des passierten und mit Antibiotika behandelten Metazestodengewebes (siehe 6.17.3) wurde in 50 ml Kulturmedium A aufgenommen und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Anschließend wurden 1x10<sup>6</sup> frisch trypsinisierte Hepatomazellen zugegeben (siehe 6.16.2) und die Metazestoden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. In Abhängigkeit von der Änderung des pH-Werts erfolgte der erste Mediumwechsel nach 10 - 14 Tagen, anschließend wöchentlich. Dazu wurde zuerst das alte Medium vorsichtig mit Hilfe einer Pumpe und steriler Pasteurpipette so vollständig wie möglich abgezogen und danach die Kulturflasche mit frischem Kulturmedium A bis auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt.

Alternativ bzw. zum Splitten der Kulturen wurden die Vesikel vorsichtig in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und stehen gelassen. Nachdem sich die Vesikel abgesetzt hatten, wurde der Überstand dekantiert. Die Metazestoden wurden daraufhin durch vorsichtiges Umfüllen in mehrere 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt, mit Kulturmedium A auf 50 ml Volumen aufgefüllt und in neue 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen überführt (Splitten). Abschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 1x10<sup>6</sup> Reuber-Zellen. Um optimale

Wachstumsbedingungen zu schaffen, wurde das Volumen des Parasitenmaterials auf 12,5 bis 17,5 ml pro 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche begrenzt.

Zum Aussortieren defekter Vesikel wurde eine Kultur in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und so lange mit PBS gewaschen, bis der Überstand klar war. Intakte Metazestoden erschienen nach dieser Behandlung farblos bis weiß, während defekte Vesikel rot verfärbt waren, da sie infolge ihrer Beschädigung Phenolrot aus dem Medium aufgenommen hatten. Das Entfernen der defekten Metazestoden erfolgte mit Hilfe einer sterilen 5 ml Plastikpipette, bei der die Spitze abgebrochen wurde und alle Plastiksplitter von der Bruchstelle entfernt worden waren. Das PBS wurde anschließend mit Hilfe der Pumpe vollständig abgezogen und die Metazestoden wieder in Kulturmedium A aufgenommen.

#### Axenische Kultivierung

Für Experimente mit Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und anderen Zytokinen wurde der Fuchsbandwurm axenisch kultiviert, um während des Versuchs eine Beeinflussung des Parasiten durch Zellen eines fremden Organismus zu verhindern<sup>81</sup>. Das axenische Kultursystem wurde zeitlich auf 6 Wochen begrenzt und mit Kulturmedium A4 durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in diesem Kultursystem bei 37°C unter Stickstoffatmosphäre.

Eine axenische Kultur wurde folgendermaßen angesetzt: Die Metazestoden einer 6 - 8 Wochen alten Ko-Kultur (s.o.) wurden nach dem Waschen und Sortieren in einem Gesamtvolumen von 50 ml in Kulturmedium A4 aufgenommen und in eine frische 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Nach jeweils 3 - 4 Tagen wurde das Medium aufgrund der starken Änderungen des pH-Wertes gewechselt. Dabei wurden die Metazestoden erst in 50 ml Reaktionsgefäße überführt, 3x mit PBS gewaschen (s.o.) und dann in neue 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt. Die gebrauchte Zellkulturflasche wurde zur Kontrolle mit 20 ml Kulturmedium A für 3 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mikroskopisch auf Zellwachstum untersucht. War diese Flasche zellfrei, dann wurde davon ausgegangen, dass auch die Metazestoden tatsächlich in axenischer Kultur vorlagen. Erfahrungsgemäß wurden dazu drei Medienwechsel benötigt. Während der anschließenden Experimente wurden ebenfalls alle 3 - 4 Tage das Medium gewechselt.

#### **6.17.6. *In vitro* Kultivierung von Primärzellen**

##### Isolierung von Primärzellen

In dieser Arbeit wurden ausschließlich axenisch kultivierte Vesikel zur Primärzell-Isolierung verwendet und die Isolierung in Anlehnung an ein Protokoll von Spiliotis und Brehm durchgeführt<sup>81</sup>. Außerdem wurde die hier verwendeten Vesikel wurden höchstens 5x innerhalb der axenischen Kultivierung passagiert. Da in einem letzten Schritt der

Isolierung die Primärzellen in 12-well culture plates ausgesät werden, wurde zunächst das benötigte Volumen an Metazestodenmaterial berechnet, wobei pro Well 2,5 ml axenische Metazestoden kalkuliert wurden.

Nachdem die entsprechend kultivierten Metazestoden (vgl. 6.17.5) in 50 ml Reaktionsgefäß überführt wurden, wurde das Medium mit Hilfe einer Pumpe möglichst vollständig abgezogen und die Kultur einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Vesikel durch Aufziehen mit einer sterilen 10 ml Plastikpipette mechanisch zerstört und für 10 min bei 800 *g* und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einer sterilen 10 ml Plastikpipette aufgenommen und durch eine aufgesteckte sterile 1000 µl Pipettenspitze in ein neues steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen der Zellsuspension wurde daraufhin mit PBS auf 5 ml ergänzt und der Ansatz 5 min bei 1000 *g* und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in 5 ml PBS gelöst. Es folgte eine weitere Zentrifugation (5 min, 1000 *g*, RT). Das Waschen mit PBS wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde das 4x Vol. Trypsin / EDTA (Stammlösung 0,05% / 0,02%) zugegeben und das Reaktionsgefäß unter mehrmaligem, leichtem Schütteln für 15 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension über 30 µm Gaze gesiebt, um die Zellen zu vereinzeln. Der Durchfluss wurde dementsprechend in einem sterilen Becher gesammelt, in ein neues steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (1 min, 100 *g*, RT). Dadurch sanken die Kalziumkörperchen auf den Boden und der zellhaltige Überstand konnte in ein neues, steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt werden. In der sich nun anschließenden Zentrifugation (10 min, 400 *g*, RT) sammelten sich die Einzelzellen als Pellet am Boden. Diese Primärzellen wurden anschließend in Kulturmedium A4 resuspendiert und gleichmäßig in die Vertiefungen einer 12-well culture plate ausgesät. Die Primärzellen von *E. multilocularis* sind nicht adhärent und bilden innerhalb von 24 Stunden Zellaggregate aus.

#### Ko-Kultivierung mit Hepatomazellen

Die Ko-Kultivierung der Primärzellen mit Hepatomazellen erfolgte mit Hilfe von Zellkultur-Inserts für 12-well culture plates (Porengröße 1 µm), wobei die Poren des Inserts den Austausch von Proteinen und Medium erlauben, den Austausch von Zellen allerdings verhindern.

Zunächst wurden die Primärzellen in 1 ml Kulturmedium A in die Vertiefungen der 12-well culture plates ausgesät, während  $5 \times 10^4$  Hepatomazellen in 1 ml Kulturmedium A in die Insert gegeben wurden. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, wobei alle 7 Tage das Medium gewechselt wurde. Dazu wurden die gebrauchten Zellkultur-Inserts inklusive 1 ml Medium entfernt und 500 µl des restlichen Mediums gegen frisches Kulturmedium A ausgetauscht. Frisch trypsinierte Hepatomazellen wurden wie oben

beschrieben in neue Inserts ausgesät und diese anschließend wieder in die Vertiefungen der culture plates eingesetzt. Die Regeneration von Primärzellen des Isolats H95 (vgl. 6.17.1) bis hin zu frei schwimmenden Vesikeln dauerte in diesem System 6 - 8 Wochen.

#### Axenische Kultivierung

Bei der axenischen Kultivierung von *E. multilocularis* Primärzellen wurde wie bei der axenischen Kultivierung von Metazestoden Kulturmedium A4 verwendet<sup>81</sup>. Die Inkubation erfolgte ebenfalls in 12-well culture plates mit 2 ml Medium pro Well. Ein Mediumwechsel wurde alle 3 - 4 Tage durchgeführt, wobei 1 ml altes Medium abgenommen und durch 1 ml frisches Kulturmedium A4 ersetzt wurde. Dieses System unterstützte bei Isolat H95 (vgl. 6.17.1) die Regeneration bis hin zu frei schwimmenden Vesikeln innerhalb von 2 - 3 Wochen.

#### **6.17.7. Zytokinstudien**

Um den Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Entwicklung der *E. multilocularis* Metazestoden bzw. Primärzellen analysieren zu können, wurden diese jeweils mit rekombinant produziertem humanen BMP2 und TGF $\beta$ 1 inkubiert (vgl. 6.8). Dabei wurden die Effekte dieser Zytokine auf die verschiedenen Stadien des Parasiten mikroskopisch beobachtet. Nach Beendigung des Experiments wurde außerdem bei Bedarf die Gesamt-RNA zur weiteren Verwendung isoliert.

#### Zytokinstudien mit Metazestoden

In Ko-Kultur herangezogene Metazestoden (vgl. 6.17.5) wurden vor einer Stimulation mit humanem BMP2 oder TGF- $\beta$ 1 zunächst mit angewärmtem PBS gewaschen und 4 Tage in DMEM bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> ausgehungert (ohne Wirtszellen). Die Inkubation mit 25 ng/ml Zytokin erfolgte anschließend für 6 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in DMEM ohne Wirtszellen. Anschließend wurde die RNA dieser Metazestoden isoliert und in cDNA umgeschrieben, um die Expression spezifischer Gene testen zu können (vgl. 6.12.6).

Untersuchungen bezüglich des Einflusses von humanem BMP2 und TGF- $\beta$ 1 auf die Differenzierung von Metazestoden wurden in Ko-Kultur mit Hepatomazellen durchgeführt, um die physiologischen Bedingungen während einer Infektion besser nachstellen zu können. Dazu wurden die Vesikel (Isolat GH09; vgl. 6.17.1) zunächst mit angewärmtem PBS gewaschen und mit 3 ml Kulturmedium A sowie  $1,3 \times 10^5$  Reuber Hepatomazellen in eine 6-well Kulturschale überführt (10 Vesikel / Ansatz). Am nächsten Tag wurden jeweils 25 ng/ml Zytokin zugegeben und die Metazestoden über 28 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Ein vollständiger Mediumwechsel mit Erneuerung der Zytokine wurde alle 7 Tage durchgeführt, ebenso wie die mikroskopische Dokumentation des Versuchs.

### Zytokinstudien mit Primärzellen

Zunächst wurden Metazestoden (Isolat H95, siehe 6.17.1) über 3 Passagen im axenischen Kultursystem kultiviert, um eine Wirtszell-freie Kultur zu erzeugen (vgl. 6.17.5). Anschließend wurde das Medium vollständig abgezogen, diese Metazestoden 1x mit PBS gewaschen und defekte Vesikel aussortiert (vgl. 6.17.5). Nach dem Entfernen des restlichen PBS wurde das Parasitenmaterial 1x mit Kulturmedium A gewaschen. Die Metazestoden wurden daraufhin auf 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen aufgeteilt (jeweils 10 ml Metazestoden) und das verbliebene Kulturmedium A entfernt. Danach wurde das Volumen mit Kulturmedium A4 auf 20 ml aufgefüllt und den Kulturen wurde humanes BMP2 bzw. TGFβ1 in einer Endkonzentration von 25 ng/ml beigelegt. Die Ansätze wurden weitere 9 Tage bei 37°C unter Stickstoffatmosphäre inkubiert. In dieser Zeit wurden 3 Mediumwechsel durchgeführt (vgl. 6.17.5). Danach wurden die *E. multilocularis* Primärzellen, wie in Kapitel 6.17.6 beschrieben, isoliert und in 12-well culture plates ausgesät. Den Primärzellen wurden wiederum humanes BMP2 bzw. TGFβ1 in einer Endkonzentration von 25 ng/ml zugegeben. Die auf diese Weise behandelten Primärzellen wurden im axenischen Kultursystem weitere 14 Tage kultiviert. Ein Mediumwechsel inklusive der Zugabe von frischem Inhibitor fand 3x wöchentlich statt.

### **6.17.8. Inhibitorstudien**

Sowohl axenisch kultivierte *E. multilocularis* Metazestoden und Primärzellen als auch Protoskolyzen wurden mit den von Sigma-Aldrich bezogenen Inhibitoren SB431542 Hydrat, Dorsomorphin und LY364947 *in vitro* kultiviert. Dabei wurden die Effekte dieser Inhibitoren auf die Integrität, das Wachstum, die Regeneration und Differenzierung des Parasiten mikroskopisch beobachtet und dokumentiert. Von Primärzellen, die mit Inhibitoren behandelt waren, wurden zusätzlich semi thin Schnitte angefertigt (vgl. 6.17.10). Die Inhibitoren wurden jeweils in DMSO gelöst, wobei die Stammlösungen als 26 mM SB431542 Hydrat, 4 mM Dorsomorphin und 40 mM LY364947 angesetzt wurden. Die Kontrollgruppen wurden jeweils mit dem entsprechenden Volumen DMSO behandelt.

### Inhibitorstudien mit Metazestoden

Zur Durchführung des Alkalischen Phosphatase Assay wurden Metazestoden mit höchstens 3 - 5 Passagen im axenischen Kultursystem bzw. aus der Ko-Kultur zunächst mit PBS gewaschen und anschließend zu 6 - 10/Well in 6-well culture plates überführt. Nach dem Entfernen des verbliebenen PBS wurden in jedes Well 5 ml vorgewärmtes Kulturmedium A4 (vgl. 6.17.2) und der zu testende Inhibitor zugegeben. Dabei wurde der Inhibitor SB431542 in Endkonzentrationen von 5 µM - 1 mM, Dorsomorphin von 1 µM - 100 µM und LY364947 von 50 nM - 100 µM verwendet. Bei Studien mit ko-kultivierten

Metazestoden wurden  $1,3 \times 10^5$  Reuber Hepatomazellen zugegeben. Da der Versuch auf eine Woche begrenzt war, wurde kein Mediumwechsel durchgeführt (vgl. 6.17.9).

Genexpressionsstudien wurden mit Metazestoden durchgeführt, die zunächst in Ko-Kultur herangezogen wurden (vgl. 6.17.5). Diese wurden vor der Zugabe von SB431542 mit angewärmtem PBS gewaschen und 4 Tage in DMEM bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  ausgehungert (ohne Wirtszellen). Die Inkubation mit  $10 \mu\text{M}$  SB431542 erfolgte anschließend für 6 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  in DMEM ohne Wirtszellen. Anschließend wurde die RNA dieser Metazestoden isoliert und in cDNA umgeschrieben (vgl. 6.12.6).

Studien zur Differenzierung von Metazestoden unter Einfluss von  $10 \mu\text{M}$  SB431542 wurden entsprechend dem vergleichbaren Versuch mit humanem BMP2 und TGF- $\beta$ 1 in Ko-Kultur mit Hepatomazellen durchgeführt (vgl. 6.17.7).

#### Inhibitorstudien mit Primärzellen

Zunächst wurden *E. multilocularis* Metazestoden wie in Kapitel 6.17.7 Abschnitt 2 beschrieben behandelt (einschließlich der Aufteilung auf  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen). Das Volumen in den Zellkulturflaschen wurde dann mit Kulturmedium A4 auf 20 ml aufgefüllt und den Kulturen wurde SB431542 bzw. Dorsomorphin in einer Endkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  beigefügt. Die Ansätze wurden anschließend weitere 9 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  unter Stickstoffatmosphäre inkubiert, wobei weitere 3 Mediumwechsel durchgeführt wurden (vgl. 6.17.5). Danach wurden die Primärzellen wie in Kapitel 6.17.6 beschrieben isoliert und in 12-well culture plates ausgesät. Diesen Primärzellen wurden erneut die Inhibitoren Dorsomorphin bzw. SB431542 in einer Endkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  zugegeben. Die auf diese Weise behandelten Primärzellen wurden im axenischen Kultursystem weitere 14 Tage kultiviert. Ein Mediumwechsel inklusive der Zugabe von frischem Inhibitor fand 3x wöchentlich statt.

#### Inhibitorstudien mit Protoskolizes

In den hier durchgeführten Analysen wurden aktivierte Protoskolizes verwendet (vgl. 6.17.4). Die Kultivierung mit den zu testenden Inhibitoren erfolgte in 24-well culture plates mit je 1 ml Kulturmedium A pro Well bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Ein Mediumwechsel inklusive der Zugabe von frischem Inhibitor fand einmal wöchentlich durch das Ersetzen von  $500 \mu\text{l}$  Medium statt. Die Protoskolizes wurden mit den Inhibitoren SB431542 und Dorsomorphin in jeweiligen Endkonzentrationen von 5 -  $500 \mu\text{M}$  inkubiert.

#### **6.17.9. Alkalische Phosphatase - Assay**

Das Ausmaß der Schädigung von *in vitro* - kultivierten Metazestoden durch die in Kapitel 6.17.8 aufgeführten Inhibitoren wurde quantifiziert, indem die Aktivität der Alkalischen Phosphatase von *E. multilocularis* (EmAP) nach Stettler et al. bestimmt wurde<sup>275</sup>. Dieser

Assay basiert auf der Umsetzung von *p*-Nitrophenylphosphat zum gelben *p*-Nitrophenol durch freigesetztes EmAP geschädigter Zellen und der anschließenden Bestimmung der Menge an *p*-Nitrophenol bei 405 nm.

Dazu wurden ko-kultivierte und axenisch kultivierte Metazestoden mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren über einen Zeitraum von 4 bis 5 Tagen inkubiert (Volumen des entsprechenden Kulturmediums A oder A4: 1 ml). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 30 µl des Kulturüberstandes mit 170 µl AP-Puffer (0,5 M Ethanolamine, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8 mit 1 mg/ml *p*-Nitrophenylphosphat) in einer 96-well microplate (flat bottom) gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Direkt anschließend wurde die Absorption bei 405 nm mit dem GeniosTecan Microplate Reader bestimmt. 30 µl vorgewärmtes Kulturmedium wurden unter gleichen Bedingungen zur Messung des Nullwerts eingesetzt.

Zusätzlich wurde täglich die Integrität der Metazestoden mikroskopisch überprüft und dokumentiert.

#### 6.17.10. Karnovsky - Fixierung

Die Auswirkungen der getesteten Inhibitoren auf Primärzellen wurden zusätzlich zur mikroskopischen Analyse (vgl. 6.17.8) auch in semi-thin Schnitten dokumentiert. Dazu wurden die mit Inhibitoren behandelten *E. multilocularis* - Primärzellen zunächst nach Karnovsky (1965) fixiert.

Die zu analysierenden Primärzellen (vgl. 6.17.8) wurden in 500 µl des Kulturmedium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 400 *g* und RT zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde dann in 1 ml Fixierlösung (2% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd, 0,1 M Cacodylat, pH 7,2) resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation pelletiert. Einer zweiten Zugabe von 1 ml Fixierlösung wurden die Proben 3 h bei 4°C inkubiert und ein weiteres Mal durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend wurden die Zellen 3x 10 min mit auf 4°C gekühltem 0,1 M Cacodylat (je 1 ml) gewaschen. Die Nachfixierung wurde für 90 min mit 2% Osmiumtetroxid in 0,1 M Cacodylatpuffer (je 1 ml) bei 4°C durchgeführt, danach wurde 3x 10 min mit je 1 ml Ampuwa gewaschen. Die Kontrastierung fand über Nacht in 0,5%-igem wässrigem Uranylacetat statt. Danach wurden die Proben erneut 3x 5 min mit je 1 ml Ampuwa gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (je 20 min bei 4°C in je 1 ml 50%, 70%, 90%, 96%, 2x Ethanol<sub>abs</sub> und 1x Ethanol<sub>abs</sub> bei RT). Abschließend folgte die Einbettung der Primärzellen in Epon über das Intermedium Propylenoxid. Dazu wurde den Proben nach dem Verdampfen des Ethanol<sub>abs</sub> vorsichtig 1 ml Propylenoxid zugegeben. Nach 20 min bei RT wurde das Propylenoxid so vollständig wie möglich entfernt. Dieser Schritt wurde noch 2x

wiederholt. Anschließend wurden die Primärzellen 16 h bei RT mit 1,5 ml Propylenoxid / Epon 812 (1:1) inkubiert. Nachdem das Epon 812 die Proben vollständig durchdrungen hatte und nach den Herstellerangaben ausgehärtet war, wurden semi-thin Schnitte am Ultramikrotom hergestellt und die Regeneration der Primärzellen mikroskopisch dokumentiert.

#### **6.17.11. Gewebeschnitte**

##### Vorbehandlung von infiziertem Gewebe

Gewebestücke von einer mit *E. multilocularis* infizierten Leber von *Macaca mulatta* (Isolat GH09, siehe 6.17.1) wurden direkt nach der Lieferung präpariert und mit Tissue Tek® O.C.T. Compound bedeckt mehrere Tage bei -80°C gelagert.

##### Vorbehandlung der Objektträger

Um die Haftung der Schnitte zu erhöhen, wurden die Objektträger vor dem Gebrauch nach silanisiert.

Hierfür wurden die Objektträger zunächst für 10 min in Chloroform (100%) inkubiert, dann 10 min in Isopropanol (100%). Nach weiteren 10 min Inkubation in APTES (3-Aminopropyl)triethoxysilane wurden sie 2x 10 min in Aceton und 3x 10 min in Ampuwa gewaschen. Anschließend wurden die silanisierten Objektträger 18-24 h bei 37-45°C getrocknet und bis zu ihrer Verwendung bei RT gelagert.

##### Anfertigung von Gewebeschnitten am Kryotom

Bevor das Kryotom genutzt werden kann, muss der Innenraum auf -20°C und die Objektscheibe auf -40°C abgekühlt sein (Dauer: 4 h). Sobald das Präparat (s.o.) an der Objektscheibe festgefroren ist, wurde das zu schneidende Material in das Stativ des Mikrotoms eingespannt und geschnitten. Der erzeugte Schnitt (3-7 µM) wurde abschließend vorsichtig auf einen silanisierten Objektträger aufgezogen.

#### **6.17.12. Immunhistochemie**

Mit dem Kryotom angefertigte Gewebeschnitte (vgl. 6.17.11) wurden bei RT 3x für 5 min in Ampuwa gewaschen und anschließend für 30 min in einer Lösung aus 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten à 5 min in Ampuwa wurden die Gewebeschnitte 5 min in PBS inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Präparate bei RT für 60 min in 5% Pferdeserum in PBS blockiert (5% HS/PBS; 400 µl/Schnitt). Die Blocklösung wurde entfernt und die Objektträger über Nacht bei 4°C mit dem spezifischen Primärantikörper (s.u.; 400 µl/Schnitt) inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschriffe à 5 min in PBS und die Inkubation mit dem korrespondierenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (s.u.; 400 µl/Schnitt) für 30 min in einer feuchten



Kammer. Danach wurde jeder Schnitt 3x 5 min in PBS gewaschen und schließlich 30 s mit 400 µl DAB-Reagenz (0,5 mg/ml DAB (3,3-Diaminobenzidine-4-hydrochloride), 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS; steril filtriert) gefärbt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Abspülen der Schnitte mit Ampuwa für 20 s. Danach wurden die Schnitte mit 400 µl Hämatoxylin gegengefärbt („gebläut“) und abschließend 2x 10 min in Ampuwa gespült. Um aus den gefärbten Schnitten Dauerpräparate zu erzeugen, wurden diese in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 min in 70%, 90%, 95% und 100% Ethanol, abschließend in Xylol) dehydriert und mit Entellan® eingedeckt.

Primärantikörper	Verdünnung	Puffer	Hersteller
anti-EmRSK1	1:100	5% HS/PBS	immunoGlobe, Himmelstadt <sup>95</sup>
anti-EmRSK2	1:200	5% HS/PBS	immunoGlobe, Himmelstadt <sup>95</sup>
anti-EmRSK3	1:200	5% HS/PBS	immunoGlobe, Himmelstadt <sup>1</sup>
anti-EmRSK4	1:200	5% HS/PBS	immunoGlobe, Himmelstadt <sup>212</sup>
Sekundärantikörper	Verdünnung	Puffer	Hersteller
anti-rabbit, HRP-konjugiert	1:50	5% HS/PBS	Dianova, Hamburg

## 6.18. Bioinformatische Analysen

### Sanger Helminth Genome Initiative - Genomdaten

Im Zuge der Sanger Helminth Genome Initiative des Wellcome Trust Sanger Instituts wurde das Genom von *E. multilocularis* vollständig sequenziert. Die in dieser Arbeit gemachten Angaben zu Contigs des Genoms von *E. multilocularis* beziehen sich auf die seit Januar 2010 zugänglichen Datensätze des Wellcome Trust Sanger Instituts (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Echinococcus/>).

### Sanger Helminth Genome Initiative - Transkriptomdaten

Ebenfalls im Rahmen der Sanger Helminth Genome Initiative des Wellcome Trust Sanger Instituts wurde neben dem Genom auch Transkriptomdaten der *E. multilocularis* Stadien Metazestode, Primärzellen, aktivierte und nicht aktivierte Protoskolizes generiert. Diese Daten basieren auf den *E. multilocularis* Isolaten H95, J31 und Java und sind zurzeit noch vorläufig. In der vorliegenden Arbeit wurden die im Mai 2011 aktuellen Transkriptomdaten zur Analyse der Genexpression verschiedener Gene verwendet (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Echinococcus/>). Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Integrative Genomics Viewer, Version 1.4.1 (4816), des Broad Institute of MIT and Harvard.

### NCBI BLAST

Zur Identifikation homologer Proteine aus anderen Organismen wurden die Aminosäuresequenzen der neu identifizierten Gene aus *E. multilocularis* mit dem Basic

Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) analysiert. Standardmäßig wurden dabei der NCBI BLASTP-Algorithmus (Version 2.2.24) mit der BLOSUM 62 Matrix und die nr-aa Datenbank verwendet<sup>310-311</sup>.

#### NCBI WinBlast

WinBlast (Version 0.2.0) von NCBI diente als grafische Darstellungsform für TBLASTN-Alignments (Version 2.2.13; expectation value: 10) zur Identifikation der hier aufgeführten, bisher unbekanntenen Gene im Genom von *E. multilocularis*<sup>310</sup>. Die hierfür notwendigen Grundeinstellungen wurden freundlicherweise von Dipl.-Biol. Ferenc Kiss zur Verfügung gestellt.

#### NCBI CCD und EMBL SMART

Konservierte Domänenstrukturen wurden mit Hilfe der Conserved Domains Database (CDD) des NCBI und mit Hilfe des Simple Modular Architecture Research Tool (SMART; Version 5.1) vom EMBL Heidelberg identifiziert<sup>261,312</sup>.

#### SignalP 3.0 Server

Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe des SignalP 3.0 Servers vom Center for Biological Sequence Analysis (CBS) der Technical University of Denmark (DTU) auf das Vorhandensein von Signalpeptiden und der zugehörigen Spaltstelle untersucht<sup>313</sup>.

#### NetNGlyc 1.0 Server

Aminosäuresequenzen von potentiell sekretierten Proteinen wurden mit Hilfe des NetNGlyc 1.0 Servers vom Center for Biological Sequence Analysis (CBS) der Technical University of Denmark (DTU) auf das Vorhandensein von N-Glykosylierungsstellen untersucht<sup>314</sup>.

#### ExPASy

Das Software Tool Compute pI/Mw des ExPASy Proteomics Server vom Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) diente der Bestimmung des theoretischen Molekulargewichts der in dieser Arbeit untersuchten Proteine von *E. multilocularis*<sup>315-317</sup>.

#### QuickPhyre

Zur Vorhersage von Sekundärstrukturen wurde das Software Tool Protein Homology/Analogy Recognition Engine (QuickPhyre) in der Version 0.2 des Imperial College London verwendet<sup>318</sup>.

#### BioEdit

Die Software BioEdit wurde standardmäßig für Sequenzanalysen und Alignments von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen auf Basis der BLOSUM62 Matrix verwendet.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 Epping, K. *Funktionelle Charakterisierung eines bone morphogenetic protein - Rezeptors des Fuchsbandwurms Echinococcus multilocularis* Dipl.-Biol. thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, (2006).
- 2 Sanetra, M., Begemann, G., Becker, M. B. & Meyer, A. Conservation and co-option in developmental programmes: the importance of homology relationships. *Front Zool* **2**, 15, (2005).
- 3 Nakao, M. *et al.* State-of-the-art Echinococcus and Taenia: phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. *Infect Genet Evol* **10**, 444-452, (2010).
- 4 Kern, P. Clinical features and treatment of alveolar echinococcosis. *Curr Opin Infect Dis* **23**, 505-512, (2010).
- 5 Eckert, J. & Deplazes, P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* **17**, 107-135, (2004).
- 6 Hiepe, T., Lucius, R. & Gottstein, B. 477 (MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, 2006).
- 7 Jenkins, D. J., Romig, T. & Thompson, R. C. Emergence/re-emergence of Echinococcus spp.--a global update. *Int J Parasitol* **35**, 1205-1219, (2005).
- 8 Romig, T. Echinococcus multilocularis in Europe--state of the art. *Vet Res Commun* **33 Suppl 1**, 31-34, (2009).
- 9 Mathy, A., Hanosset, R., Adant, S. & Losson, B. The carriage of larval echinococcus multilocularis and other cestodes by the musk rat (*Ondatra zibethicus*) along the Ourthe River and its tributaries (Belgium). *J Wildl Dis* **45**, 279-287, (2009).
- 10 Deplazes, P. & Eckert, J. Veterinary aspects of alveolar echinococcosis--a zoonosis of public health significance. *Vet Parasitol* **98**, 65-87, (2001).
- 11 Thompson, R. C. & Lymbery, A. J. Echinococcus: biology and strain variation. *Int J Parasitol* **20**, 457-470, (1990).
- 12 Boch, J., Supperer, R. & Schnieder, T. 785 (MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, 2006).
- 13 *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern.* (WHO / OIE, 2001).
- 14 Kapel, C. M., Torgerson, P. R., Thompson, R. C. & Deplazes, P. Reproductive potential of Echinococcus multilocularis in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *Int J Parasitol* **36**, 79-86, (2006).
- 15 Veit, P. *et al.* Influence of environmental factors on the infectivity of Echinococcus multilocularis eggs. *Parasitology* **110 ( Pt 1)**, 79-86, (1995).
- 16 Craig, P. Echinococcus multilocularis. *Curr Opin Infect Dis* **16**, 437-444, (2003).
- 17 Matsumoto, J., Kouguchi, H., Oku, Y. & Yagi, K. Primary alveolar echinococcosis: course of larval development and antibody responses in intermediate host rodents with different genetic backgrounds after oral infection with eggs of Echinococcus multilocularis. *Parasitol Int* **59**, 435-444, (2010).
- 18 Ingold, K., Gottstein, B. & Hemphill, A. High molecular mass glycans are major structural elements associated with the laminated layer of in vitro cultivated Echinococcus multilocularis metacestodes. *Int J Parasitol* **30**, 207-214, (2000).
- 19 Gottstein, B. & Hemphill, A. Echinococcus multilocularis: the parasite-host interplay. *Exp Parasitol* **119**, 447-452, (2008).
- 20 Vuitton, D. A. & Gottstein, B. Echinococcus multilocularis and Its Intermediate Host: A Model of Parasite-Host Interplay. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 923193, (2010).
- 21 Hemphill, A. & Gottstein, B. Immunology and morphology studies on the proliferation of in vitro cultivated Echinococcus multilocularis metacestodes. *Parasitol Res* **81**, 605-614, (1995).

- 22 Lawton, P., Hemphill, A., Deplazes, P., Gottstein, B. & Sarciron, M. E. Echinococcus multilocularis metacestodes: immunological and immunocytochemical analysis of the relationships between alkaline phosphatase and the Em2 antigen. *Exp Parasitol* **87**, 142-149, (1997).
- 23 Tappe, D. *et al.* Three-dimensional reconstruction of Echinococcus multilocularis larval growth in human hepatic tissue reveals complex growth patterns. *Am J Trop Med Hyg* **82**, 126-127, (2010).
- 24 Nonaka, N., Kamiya, M. & Oku, Y. Towards the control of Echinococcus multilocularis in the definitive host in Japan. *Parasitol Int* **55 Suppl**, S263-266, (2006).
- 25 Shaikenov, B. S. Distribution and ecology of Echinococcus multilocularis in Central Asia. *Parasitol Int* **55 Suppl**, S213-219, (2006).
- 26 Schantz, P. M. Progress in diagnosis, treatment and elimination of echinococcosis and cysticercosis. *Parasitol Int* **55 Suppl**, S7-S13, (2006).
- 27 He, J. G. *et al.* Epidemiological survey on hydatidosis in Tibetan region of western Sichuan: II. Infection situation among domestic and wild animals. *Chin J Zool* **16**, 62-65, (2000).
- 28 Craig, P. S. Epidemiology of human alveolar echinococcosis in China. *Parasitol Int* **55 Suppl**, S221-225, (2006).
- 29 Romig, T., Dinkel, A. & Mackenstedt, U. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int* **55 Suppl**, S187-191, (2006).
- 30 Antolova, D., Reiterova, K., Miterpakova, M., Dinkel, A. & Dubinsky, P. The first finding of Echinococcus multilocularis in dogs in Slovakia: an emerging risk for spreading of infection. *Zoonoses Public Health* **56**, 53-58, (2009).
- 31 Giraudoux, P. *et al.* Interactions between landscape changes and host communities can regulate Echinococcus multilocularis transmission. *Parasitology* **127 Suppl**, S121-131, (2003).
- 32 Romig, T., Thoma, D. & Weible, A. K. Echinococcus multilocularis--a zoonosis of anthropogenic environments? *J Helminthol* **80**, 207-212, (2006).
- 33 Gottstein, B. *et al.* Is high prevalence of Echinococcus multilocularis in wild and domestic animals associated with disease incidence in humans? *Emerg Infect Dis* **7**, 408-412, (2001).
- 34 Kern, P. *et al.* European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000. *Emerg Infect Dis* **9**, 343-349, (2003).
- 35 Deplazes, P., Hegglin, D., Gloor, S. & Romig, T. Wilderness in the city: the urbanization of Echinococcus multilocularis. *Trends Parasitol* **20**, 77-84, (2004).
- 36 McManus, D. P., Zhang, W., Li, J. & Bartley, P. B. Echinococcosis. *Lancet* **362**, 1295-1304, (2003).
- 37 Dinkel, A. *et al.* A real-time multiplex-nested PCR system for coprological diagnosis of Echinococcus multilocularis and host species. *Parasitol Res*, (2011).
- 38 Rausch, R. L., Wilson, J. F. & Schantz, P. M. A programme to reduce the risk of infection by Echinococcus multilocularis: the use of praziquantel to control the cestode in a village in the hyperendemic region of Alaska. *Ann Trop Med Parasitol* **84**, 239-250, (1990).
- 39 Yamashita, J. Echinococcus and echinococcosis. *Progr Med Parasitol (Japan)* **5**, 65-123, (1973).
- 40 Hegglin, D. & Deplazes, P. Control strategy for Echinococcus multilocularis. *Emerg Infect Dis* **14**, 1626-1628, (2008).
- 41 König, A. *et al.* Integrated-baiting concept against Echinococcus multilocularis in foxes is successful in southern Bavaria, Germany. *European Journal of Wildlife Research* **54**, 439-447, (2008).
- 42 Siles-Lucas, M., Merli, M., Mackenstedt, U. & Gottstein, B. The Echinococcus multilocularis 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. *Vaccine* **21**, 431-439, (2003).

- 43 Schweiger, A. *et al.* Human alveolar echinococcosis after fox population increase, Switzerland. *Emerg Infect Dis* **13**, 878-882, (2007).
- 44 Gottstein, B. & Hemphill, A. Immunopathology of echinococcosis. *Chem Immunol* **66**, 177-208, (1997).
- 45 Vuitton, D. A. Benzimidazoles for the treatment of cystic and alveolar echinococcosis: what is the consensus? *Expert Rev Anti Infect Ther* **7**, 145-149, (2009).
- 46 Kern, P. *et al.* Risk factors for alveolar echinococcosis in humans. *Emerg Infect Dis* **10**, 2088-2093, (2004).
- 47 Brunetti, E., Kern, P. & Vuitton, D. A. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop* **114**, 1-16, (2010).
- 48 Bresson-Hadni, S. *et al.* Imaging aspects and non-surgical interventional treatment in human alveolar echinococcosis. *Parasitol Int* **55 Suppl**, S267-272, (2006).
- 49 Myjak, P. *et al.* Molecular confirmation of human alveolar echinococcosis in Poland. *Clin Infect Dis* **37**, e121-125, (2003).
- 50 Buttenschoen, K. *et al.* Long-term experience on surgical treatment of alveolar echinococcosis. *Langenbeck's Archives of Surgery* **394**, 689-698, (2009).
- 51 Kern, P. *et al.* WHO classification of alveolar echinococcosis: principles and application. *Parasitol Int* **55 Suppl**, S283-287, (2006).
- 52 Kadry, Z. *et al.* Evaluation of treatment and long-term follow-up in patients with hepatic alveolar echinococcosis. *Br J Surg* **92**, 1110-1116, (2005).
- 53 Buttenschoen, K. *et al.* Palliative operation for the treatment of alveolar echinococcosis. *Langenbeck's Archives of Surgery* **394**, 199-204, (2009).
- 54 Ammann, R. W. & Eckert, J. Cestodes. Echinococcus. *Gastroenterol Clin North Am* **25**, 655-689, (1996).
- 55 Torgerson, P. R. *et al.* Alveolar echinococcosis: from a deadly disease to a well-controlled infection. Relative survival and economic analysis in Switzerland over the last 35 years. *J Hepatol* **49**, 72-77, (2008).
- 56 Hemphill, A. *et al.* Echinococcus metacestodes as laboratory models for the screening of drugs against cestodes and trematodes. *Parasitology* **137**, 569-587, (2010).
- 57 Reuter, S., Merkle, M., Brehm, K., Kern, P. & Manfras, B. Effect of amphotericin B on larval growth of Echinococcus multilocularis. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 620-625, (2003).
- 58 Reuter, S. *et al.* Salvage treatment with amphotericin B in progressive human alveolar echinococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3586-3591, (2003).
- 59 Stettler, M. *et al.* Secondary and primary murine alveolar echinococcosis: combined albendazole/nitazoxanide chemotherapy exhibits profound anti-parasitic activity. *Int J Parasitol* **34**, 615-624, (2004).
- 60 Tappe, D., Muller, A., Frosch, M. & Stich, A. Limitations of amphotericin B and nitazoxanide in the treatment of alveolar echinococcosis. *Ann Trop Med Parasitol* **103**, 177-181, (2009).
- 61 Liance, M., Nemati, F., Bories, C. & Couvreur, P. Experience with doxorubicin-bound polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles on murine alveolar echinococcosis of the liver. *Int J Parasitol* **23**, 427-429, (1993).
- 62 Siles-Lucas, M. & Hemphill, A. Cestode parasites: application of in vivo and in vitro models for studies on the host-parasite relationship. *Adv Parasitol* **51**, 133-230, (2002).
- 63 Lawton, P., Walchshofer, N. & Sarciron, M. E. In vitro effects of isoprinosine and a dipeptide methyl ester on Echinococcus multilocularis protoscoleces. *J Helminthol* **75**, 251-257, (2001).
- 64 Tappe, D. & Frosch, M. Rudolf Virchow and the recognition of alveolar echinococcosis, 1850s. *Emerg Infect Dis* **13**, 732-735, (2007).

- 65 Sanchez, F. A. & Sanchez, A. C. Estudio de algunas propiedades físicas y componentes químicos del líquido y pared germinativa de quistes hidatídicos de diversas especies y de diferente localización. *Rev Iber de Parasitol* **31**, 347-366, (1971).
- 66 Hemmings, L. & McManus, D. P. The isolation, by differential antibody screening, of *Echinococcus multilocularis* antigen gene clones with potential for immunodiagnosis. *Mol Biochem Parasitol* **33**, 171-182, (1989).
- 67 Frosch, P. M., Frosch, M., Pfister, T., Schaad, V. & Bitter-Suermann, D. Cloning and characterisation of an immunodominant major surface antigen of *Echinococcus multilocularis*. *Mol Biochem Parasitol* **48**, 121-130, (1991).
- 68 Frosch, P. M., Geier, C., Kaup, F. J., Müller, A. & Frosch, M. Molecular cloning of an echinococcal microtrichal antigen immunoreactive in *Echinococcus multilocularis* disease. *Mol Biochem Parasitol* **58**, 301-310, (1993).
- 69 Ito, A. *et al.* Em18 and Em16, new serologic marker epitopes for alveolar echinococcosis in western blot analysis, are the only two epitopes recognized by commercially available weak positive (cut off) sera for Em2plus-ELISA. *J Helminthol* **69**, 369-371, (1995).
- 70 Hubert, K., Cordero, E., Frosch, M. & Solomon, F. Activities of the EM10 protein from *Echinococcus multilocularis* in cultured mammalian cells demonstrate functional relationships to ERM family members. *Cell Motil Cytoskeleton* **42**, 178-188, (1999).
- 71 Brehm, K., Jensen, K., Frosch, P. & Frosch, M. Characterization of the genomic locus expressing the ERM-like protein of *Echinococcus multilocularis*. *Mol Biochem Parasitol* **100**, 147-152, (1999).
- 72 Brehm, K., Jensen, K. & Frosch, M. mRNA trans-splicing in the human parasitic cestode *Echinococcus multilocularis*. *J Biol Chem* **275**, 38311-38318, (2000).
- 73 Borst, P. Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Annu Rev Biochem* **55**, 701-732, (1986).
- 74 Fernandez, C., Gregory, W. F., Loke, P. & Maizels, R. M. Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Mol Biochem Parasitol* **122**, 171-180, (2002).
- 75 Brehm, K., Hubert, K., Sciutto, E., Garate, T. & Frosch, M. Characterization of a spliced leader gene and of trans-spliced mRNAs from *Taenia solium*. *Mol Biochem Parasitol* **122**, 105-110, (2002).
- 76 Blaxter, M. & Liu, L. Nematode spliced leaders--ubiquity, evolution and utility. *Int J Parasitol* **26**, 1025-1033, (1996).
- 77 Pettitt, J., Harrison, N., Stansfield, I., Connolly, B. & Müller, B. The evolution of spliced leader trans-splicing in nematodes. *Biochem Soc Trans* **38**, 1125-1130, (2010).
- 78 Brehm, K., Wolf, M., Beland, H., Kroner, A. & Frosch, M. Analysis of differential gene expression in *Echinococcus multilocularis* larval stages by means of spliced leader differential display. *Int J Parasitol* **33**, 1145-1159, (2003).
- 79 Jura, H., Bader, A., Hartmann, M., Maschek, H. & Frosch, M. Hepatic tissue culture model for study of host-parasite interactions in alveolar echinococcosis. *Infect Immun* **64**, 3484-3490, (1996).
- 80 Brehm, K. & Spiliotis, M. Recent advances in the in vitro cultivation and genetic manipulation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes and germinal cells. *Exp Parasitol* **119**, 506-515, (2008).
- 81 Spiliotis, M. & Brehm, K. in *Host-Pathogen Interactions* Vol. 470 *Methods in Molecular Biology* eds Steffen Rupp & Kai Sohn) 245-262 (Humana Press, 2009).
- 82 Spiliotis, M., Tappe, D., Sesterhenn, L. & Brehm, K. Long-term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions. *Parasitol Res* **92**, 430-432, (2004).

- 83 Brehm, K. Echinococcus multilocularis as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction. *Parasitology*, 1-19, (2009).
- 84 Spiliotis, M. *et al.* Echinococcus multilocularis primary cells: improved isolation, small-scale cultivation and RNA interference. *Mol Biochem Parasitol* **174**, 83-87, (2010).
- 85 Kingsley, D. M. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* **8**, 133-146, (1994).
- 86 Fernandez, R., Tabarini, D., Azpiazu, N., Frasch, M. & Schlessinger, J. The Drosophila insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential. *EMBO J* **14**, 3373-3384, (1995).
- 87 Brehm, K. & Spiliotis, M. The influence of host hormones and cytokines on Echinococcus multilocularis signalling and development. *Parasite* **15**, 286-290, (2008).
- 88 Spiliotis, M. *et al.* Characterisation of EmMPK1, an ERK-like MAP kinase from Echinococcus multilocularis which is activated in response to human epidermal growth factor. *Int J Parasitol* **36**, 1097-1112, (2006).
- 89 Konrad, C., Kroner, A., Spiliotis, M., Zavala-Gongora, R. & Brehm, K. Identification and molecular characterisation of a gene encoding a member of the insulin receptor family in Echinococcus multilocularis. *Int J Parasitol* **33**, 301-312, (2003).
- 90 Brehm, K. Echinococcus multilocularis as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction. *Parasitology* **137**, 537-555, (2010).
- 91 Spiliotis, M., Kroner, A. & Brehm, K. Identification, molecular characterization and expression of the gene encoding the epidermal growth factor receptor orthologue from the fox-tapeworm Echinococcus multilocularis. *Gene* **323**, 57-65, (2003).
- 92 Spiliotis, M., Tappe, D., Bruckner, S., Mosch, H. U. & Brehm, K. Molecular cloning and characterization of Ras- and Raf-homologues from the fox-tapeworm Echinococcus multilocularis. *Mol Biochem Parasitol* **139**, 225-237, (2005).
- 93 Gelmedin, V., Spiliotis, M. & Brehm, K. Molecular characterisation of MEK1/2- and MKK3/6-like mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKK) from the fox tapeworm Echinococcus multilocularis. *Int J Parasitol* **40**, 555-567, (2010).
- 94 Zavala-Gongora, R., Kroner, A., Wittek, B., Knaus, P. & Brehm, K. Identification and characterisation of two distinct Smad proteins from the fox-tapeworm Echinococcus multilocularis. *Int J Parasitol* **33**, 1665-1677, (2003).
- 95 Zavala-Gongora, R. *Isolierung, Charakterisierung und Funktionsanalyse von TGFβ-Signaltransduktionskomponenten des Fuchsbandwurms Echinococcus multilocularis* Dr. rer. nat. thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, (2005).
- 96 Zavala-Gongora, R., Kroner, A., Bernthaler, P., Knaus, P. & Brehm, K. A member of the transforming growth factor-beta receptor family from Echinococcus multilocularis is activated by human bone morphogenetic protein 2. *Mol Biochem Parasitol* **146**, 265-271, (2006).
- 97 Zavala-Gongora, R., Derrer, B., Gelmedin, V., Knaus, P. & Brehm, K. Molecular characterisation of a second structurally unusual AR-Smad without an MH1 domain and a Smad4 orthologue from Echinococcus multilocularis. *Int J Parasitol* **38**, 161-176, (2008).
- 98 Spiliotis, M. *Untersuchungen zur in vitro Kultivierung und Charakterisierung von MAP-Kinase-Kaskade-Komponenten des Fuchsbandwurmes Echinococcus multilocularis* PhD thesis, Universität Würzburg, (2006).

- 99 Brehm, K. The role of evolutionarily conserved signalling systems in *Echinococcus multilocularis* development and host-parasite interaction. *Med Microbiol Immunol*, (2010).
- 100 Brehm, K., Spiliotis, M., Zavala-Gongora, R., Konrad, C. & Frosch, M. The molecular mechanisms of larval cestode development: first steps into an unknown world. *Parasitol Int* **55 Suppl**, S15-21, (2006).
- 101 Beall, M. J. & Pearce, E. J. Transforming growth factor-beta and insulin-like signalling pathways in parasitic helminths. *Int J Parasitol* **32**, 399-404, (2002).
- 102 Loverde, P. T., Osman, A. & Hinck, A. *Schistosoma mansoni*: TGF-beta signaling pathways. *Exp Parasitol* **117**, 304-317, (2007).
- 103 Mejri, N., Hemphill, A. & Gottstein, B. Triggering and modulation of the host-parasite interplay by *Echinococcus multilocularis*: a review. *Parasitology* **137**, 557-568, (2010).
- 104 Hewitson, J. P., Grainger, J. R. & Maizels, R. M. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol* **167**, 1-11, (2009).
- 105 Xu, C. P., Ji, W. M., van den Brink, G. R. & Peppelenbosch, M. P. Bone morphogenetic protein-2 is a negative regulator of hepatocyte proliferation downregulated in the regenerating liver. *World J Gastroenterol* **12**, 7621-7625, (2006).
- 106 Babitt, J. L. *et al.* Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* **117**, 1933-1939, (2007).
- 107 Kinoshita, K. *et al.* Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. *Gut* **56**, 706-714, (2007).
- 108 Sugimoto, H. *et al.* BMP-7 functions as a novel hormone to facilitate liver regeneration. *FASEB J* **21**, 256-264, (2007).
- 109 Harraga, S., Godot, V., Bresson-Hadni, S., Manton, G. & Vuitton, D. A. Profile of cytokine production within the periparasitic granuloma in human alveolar echinococcosis. *Acta Trop* **85**, 231-236, (2003).
- 110 Shojaee-Moradie, F. *et al.* Novel hepatoselective insulin analog: studies with a covalently linked thyroxyl-insulin complex in humans. *Diabetes Care* **23**, 1124-1129, (2000).
- 111 Fausto, N. Liver regeneration. *J Hepatol* **32**, 19-31, (2000).
- 112 Spiliotis, M. *et al.* Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacystode vesicles. *Int J Parasitol* **38**, 1025-1039, (2008).
- 113 Mizukami, C. *et al.* Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscoleces using RNA interference. *Parasitol Int* **59**, 647-652, (2010).
- 114 Huminiecki, L. *et al.* Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evol Biol* **9**, 28, (2009).
- 115 Massague, J. & Gomis, R. R. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* **580**, 2811-2820, (2006).
- 116 Heldin, C. H., Miyazono, K. & ten Dijke, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465-471, (1997).
- 117 Ten Dijke, P. & Heldin, C. H. in *Proteins and Cell Regulation* (eds A.J. Ridley & J. Frampton) 473 (Springer Science+Business Media (Springer Netherlands), 2006).
- 118 Fei, T. *et al.* Genome-wide mapping of SMAD target genes reveals the role of BMP signaling in embryonic stem cell fate determination. *Genome Res* **20**, 36-44, (2010).
- 119 Moustakas, A. & Heldin, C. H. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* **136**, 3699-3714, (2009).
- 120 Massague, J. TGFbeta in Cancer. *Cell* **134**, 215-230, (2008).



- 121 Gordon, K. J. & Blobel, G. C. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* **1782**, 197-228, (2008).
- 122 Moustakas, A. & Heldin, C. H. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* **118**, 3573-3584, (2005).
- 123 Miyazono, K., Kusanagi, K. & Inoue, H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* **187**, 265-276, (2001).
- 124 Goumans, M. J. *et al.* Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* **21**, 1743-1753, (2002).
- 125 Daly, A. C., Randall, R. A. & Hill, C. S. Transforming growth factor beta-induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol* **28**, 6889-6902, (2008).
- 126 Wrighton, K. H., Lin, X., Yu, P. B. & Feng, X. H. Transforming Growth Factor {beta} Can Stimulate Smad1 Phosphorylation Independently of Bone Morphogenic Protein Receptors. *J Biol Chem* **284**, 9755-9763, (2009).
- 127 Liu, I. M. *et al.* TGFbeta-stimulated Smad1/5 phosphorylation requires the ALK5 L45 loop and mediates the pro-migratory TGFbeta switch. *EMBO J* **28**, 88-98, (2009).
- 128 Rebbapragada, A., Benchabane, H., Wrana, J. L., Celeste, A. J. & Attisano, L. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol* **23**, 7230-7242, (2003).
- 129 Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C. & Knaus, P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**, 343-355, (2009).
- 130 Itoh, S. & ten Dijke, P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 176-184, (2007).
- 131 Herpin, A., Lelong, C. & Favrel, P. Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol* **28**, 461-485, (2004).
- 132 Bernard, D. J., Chapman, S. C. & Woodruff, T. K. Mechanisms of inhibin signal transduction. *Recent Prog Horm Res* **56**, 417-450, (2001).
- 133 Derynck, R. & Miyazono, K. in *Cold Spring Harbor Monograph Series* Vol. 50 1144 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2008).
- 134 Zhao, G. Q. Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* **35**, 43-56, (2003).
- 135 Chen, Y. G. *et al.* Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**, 534-544, (2006).
- 136 Phillips, D. J. & Woodruff, T. K. Inhibin: actions and signalling. *Growth Factors* **22**, 13-18, (2004).
- 137 Ball, E. M. & Risbridger, G. P. Activins as regulators of branching morphogenesis. *Dev Biol* **238**, 1-12, (2001).
- 138 Risbridger, G. P., Schmitt, J. F. & Robertson, D. M. Activins and inhibins in endocrine and other tumors. *Endocr Rev* **22**, 836-858, (2001).
- 139 Williams, D. M., Grubbs, B. G., Park-Snyder, S., Rank, R. G. & Bonewald, L. F. Activation of latent transforming growth factor beta during Chlamydia trachomatis-induced murine pneumonia. *Res Microbiol* **147**, 251-262, (1996).
- 140 ten Dijke, P. & Arthur, H. M. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 857-869, (2007).
- 141 Walton, K. L. *et al.* Two distinct regions of latency-associated peptide coordinate stability of the latent transforming growth factor-beta1 complex. *J Biol Chem* **285**, 17029-17037, (2010).
- 142 Brunner, A. M., Marquardt, H., Malacko, A. R., Liubin, M. N. & Purchio, A. F. Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor beta 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. *J Biol Chem* **264**, 13660-13664, (1989).

- 143 Gentry, L. E., Lioubin, M. N., Purchio, A. F. & Marquardt, H. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol* **8**, 4162-4168, (1988).
- 144 Dubois, C. M., Laprise, M. H., Blanchette, F., Gentry, L. E. & Leduc, R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* **270**, 10618-10624, (1995).
- 145 Sha, X., Yang, L. & Gentry, L. E. Identification and analysis of discrete functional domains in the pro region of pre-pro-transforming growth factor beta 1. *J Cell Biol* **114**, 827-839, (1991).
- 146 Gentry, L. E. & Nash, B. W. The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor. *Biochemistry* **29**, 6851-6857, (1990).
- 147 Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C. & Heldin, C. H. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem* **263**, 6407-6415, (1988).
- 148 Wakefield, L. M., Smith, D. M., Flanders, K. C. & Sporn, M. B. Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem* **263**, 7646-7654, (1988).
- 149 De Crescenzo, G., Grothe, S., Zwaagstra, J., Tsang, M. & O'Connor-McCourt, M. D. Real-time monitoring of the interactions of transforming growth factor-beta (TGF-beta ) isoforms with latency-associated protein and the ectodomains of the TGF-beta type II and III receptors reveals different kinetic models and stoichiometries of binding. *J Biol Chem* **276**, 29632-29643, (2001).
- 150 Bottinger, E. P. *et al.* The recombinant proregion of transforming growth factor beta1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor beta1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5877-5882, (1996).
- 151 Ge, G., Hopkins, D. R., Ho, W. B. & Greenspan, D. S. GDF11 forms a bone morphogenetic protein 1-activated latent complex that can modulate nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol* **25**, 5846-5858, (2005).
- 152 Hill, J. J. *et al.* The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* **277**, 40735-40741, (2002).
- 153 Walton, K. L. *et al.* A common biosynthetic pathway governs the dimerization and secretion of inhibin and related transforming growth factor beta (TGFbeta) ligands. *J Biol Chem* **284**, 9311-9320, (2009).
- 154 Sengle, G., Ono, R. N., Lyons, K. M., Bachinger, H. P. & Sakai, L. Y. A new model for growth factor activation: type II receptors compete with the prodomain for BMP-7. *J Mol Biol* **381**, 1025-1039, (2008).
- 155 Lee, S. J. & McPherron, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9306-9311, (2001).
- 156 Dick, A. *et al.* Essential role of Bmp7 (snailhouse) and its prodomain in dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* **127**, 343-354, (2000).
- 157 Degnin, C., Jean, F., Thomas, G. & Christian, J. L. Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol Biol Cell* **15**, 5012-5020, (2004).
- 158 Le Good, J. A. *et al.* Nodal stability determines signaling range. *Curr Biol* **15**, 31-36, (2005).
- 159 Taipale, J., Saharinen, J., Hedman, K. & Keski-Oja, J. Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. *J Histochem Cytochem* **44**, 875-889, (1996).
- 160 Rifkin, D. B. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem* **280**, 7409-7412, (2005).

- 161 Isogai, Z. *et al.* Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem* **278**, 2750-2757, (2003).
- 162 Sengle, G. *et al.* Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *J Biol Chem* **283**, 13874-13888, (2008).
- 163 Young, G. D. & Murphy-Ullrich, J. E. The tryptophan-rich motifs of the thrombospondin type 1 repeats bind VLAL motifs in the latent transforming growth factor-beta complex. *J Biol Chem* **279**, 47633-47642, (2004).
- 164 Young, G. D. & Murphy-Ullrich, J. E. Molecular interactions that confer latency to transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **279**, 38032-38039, (2004).
- 165 Annes, J. P., Chen, Y., Munger, J. S. & Rifkin, D. B. Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *J Cell Biol* **165**, 723-734, (2004).
- 166 Yang, Z. *et al.* Absence of integrin-mediated TGFbeta1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGFbeta1-null mice. *J Cell Biol* **176**, 787-793, (2007).
- 167 Chaudhry, S. S. *et al.* Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1. *J Cell Biol* **176**, 355-367, (2007).
- 168 Annes, J. P., Munger, J. S. & Rifkin, D. B. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* **116**, 217-224, (2003).
- 169 Ge, G. & Greenspan, D. S. BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *J Cell Biol* **175**, 111-120, (2006).
- 170 Savage-Dunn, C. in *WormBook* (ed The C. elegans Research Community) (2005).
- 171 Freitas, T. C., Jung, E. & Pearce, E. J. A bone morphogenetic protein homologue in the parasitic flatworm, *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* **39**, 281-287, (2009).
- 172 Freitas, T. C., Jung, E. & Pearce, E. J. TGF-beta signaling controls embryo development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog* **3**, e52, (2007).
- 173 Gomez-Escobar, N., Lewis, E. & Maizels, R. M. A novel member of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) superfamily from the filarial nematodes *Brugia malayi* and *B. pahangi*. *Exp Parasitol* **88**, 200-209, (1998).
- 174 Gomez-Escobar, N., Gregory, W. F. & Maizels, R. M. Identification of tgh-2, a filarial nematode homolog of *Caenorhabditis elegans* daf-7 and human transforming growth factor beta, expressed in microfilarial and adult stages of *Brugia malayi*. *Infect Immun* **68**, 6402-6410, (2000).
- 175 Larrain, J. *et al.* BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space. *Development* **127**, 821-830, (2000).
- 176 Smith, W. C. & Harland, R. M. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* **70**, 829-840, (1992).
- 177 Re'em-Kalma, Y., Lamb, T. & Frank, D. Competition between noggin and bone morphogenetic protein 4 activities may regulate dorsalization during *Xenopus* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 12141-12145, (1995).
- 178 Harrison, C. A., Gray, P. C., Vale, W. W. & Robertson, D. M. Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. *Trends Endocrinol Metab* **16**, 73-78, (2005).
- 179 Hsu, D. R., Economides, A. N., Wang, X., Eimon, P. M. & Harland, R. M. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* **1**, 673-683, (1998).
- 180 Walsh, D. W., Godson, C., Brazil, D. P. & Martin, F. Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. *Trends Cell Biol* **20**, 244-256, (2010).

- 181 Groppe, J. *et al.* Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* **420**, 636-642, (2002).
- 182 Avsian-Kretchmer, O. & Hsueh, A. J. Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol* **18**, 1-12, (2004).
- 183 Gazzerro, E. & Canalis, E. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* **7**, 51-65, (2006).
- 184 Shi, Y. & Massague, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700, (2003).
- 185 Brown, D. J. *et al.* Autosomal dominant stapes ankylosis with broad thumbs and toes, hyperopia, and skeletal anomalies is caused by heterozygous nonsense and frameshift mutations in NOG, the gene encoding noggin. *Am J Hum Genet* **71**, 618-624, (2002).
- 186 Lehmann, K. *et al.* A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist NOGGIN. *Am J Hum Genet* **81**, 388-396, (2007).
- 187 Gong, Y. *et al.* Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat Genet* **21**, 302-304, (1999).
- 188 McMahon, J. A. *et al.* Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* **12**, 1438-1452, (1998).
- 189 Bachiller, D. *et al.* The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* **403**, 658-661, (2000).
- 190 Brunet, L. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P. & Harland, R. M. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* **280**, 1455-1457, (1998).
- 191 Quesneville, H. *et al.* Combined evidence annotation of transposable elements in genome sequences. *PLoS Comput Biol* **1**, 166-175, (2005).
- 192 Berriman, M. *et al.* The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* **460**, 352-358, (2009).
- 193 Molina, M. D., Salo, E. & Cebria, F. Expression pattern of the expanded noggin gene family in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Gene Expr Patterns* **9**, 246-253, (2009).
- 194 Ogawa, K. *et al.* Induction of a noggin-like gene by ectopic DV interaction during planarian regeneration. *Dev Biol* **250**, 59-70, (2002).
- 195 Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. & Massague, J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**, 341-347, (1994).
- 196 Greenwald, J., Fischer, W. H., Vale, W. W. & Choe, S. Three-finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase. *Nat Struct Biol* **6**, 18-22, (1999).
- 197 Greenwald, J. *et al.* The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol Cell* **11**, 605-617, (2003).
- 198 Kirsch, T., Sebald, W. & Dreyer, M. K. Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol* **7**, 492-496, (2000).
- 199 Boesen, C. C., Radaev, S., Motyka, S. A., Patamawenu, A. & Sun, P. D. The 1.1 Å crystal structure of human TGF-beta type II receptor ligand binding domain. *Structure* **10**, 913-919, (2002).
- 200 Massague, J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**, 753-791, (1998).
- 201 Chen, Y. G., Liu, F. & Massague, J. Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J* **16**, 3866-3876, (1997).
- 202 Charng, M. J., Kinnunen, P., Hawker, J., Brand, T. & Schneider, M. D. FKBP-12 recognition is dispensable for signal generation by type I transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* **271**, 22941-22944, (1996).

- 203 Harrison, R. K. & Stein, R. L. Substrate specificities of the peptidyl prolyl cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry* **29**, 3813-3816, (1990).
- 204 Huse, M., Chen, Y. G., Massague, J. & Kuriyan, J. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* **96**, 425-436, (1999).
- 205 Wang, T. *et al.* The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell* **86**, 435-444, (1996).
- 206 Wieser, R., Wrana, J. L. & Massague, J. GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J* **14**, 2199-2208, (1995).
- 207 Osman, A., Niles, E. G. & LoVerde, P. T. Expression of functional *Schistosoma mansoni* Smad4: role in Erk-mediated transforming growth factor beta (TGF-beta) down-regulation. *J Biol Chem* **279**, 6474-6486, (2004).
- 208 Kretzschmar, M., Liu, F., Hata, A., Doody, J. & Massague, J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* **11**, 984-995, (1997).
- 209 Chen, Y. G. *et al.* Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* **12**, 2144-2152, (1998).
- 210 Feng, X. H. & Derynck, R. A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J* **16**, 3912-3923, (1997).
- 211 Thompson, T. B., Woodruff, T. K. & Jardeetzky, T. S. Structures of an ActRIIB:activin A complex reveal a novel binding mode for TGF-beta ligand:receptor interactions. *EMBO J* **22**, 1555-1566, (2003).
- 212 Bernthaler, P. *Charakterisierung und Funktionsanalyse von EmRSK4, einem TGF-β Typ II-Rezeptor aus Echinococcus multilocularis* Dr. rer. nat thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, (2008).
- 213 Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H. & Gelbart, W. M. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **139**, 1347-1358, (1995).
- 214 Derynck, R. *et al.* Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell* **87**, 173, (1996).
- 215 Massague, J., Seoane, J. & Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**, 2783-2810, (2005).
- 216 Wu, G. *et al.* Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* **287**, 92-97, (2000).
- 217 Huse, M. *et al.* The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol Cell* **8**, 671-682, (2001).
- 218 Abdollah, S. *et al.* TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J Biol Chem* **272**, 27678-27685, (1997).
- 219 Xiao, Z., Liu, X. & Lodish, H. F. Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *J Biol Chem* **275**, 23425-23428, (2000).
- 220 Mattaj, I. W. & Englmeier, L. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* **67**, 265-306, (1998).
- 221 Wrana, J. L. & Attisano, L. The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 5-13, (2000).
- 222 Wu, J. W., Fairman, R., Penry, J. & Shi, Y. Formation of a stable heterodimer between Smad2 and Smad4. *J Biol Chem* **276**, 20688-20694, (2001).
- 223 Wu, J. W. *et al.* Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol Cell* **8**, 1277-1289, (2001).

- 224 Shi, Y. *et al.* Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on  
DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* **94**, 585-594, (1998).
- 225 Sano, Y. *et al.* ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in  
transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **274**, 8949-8957, (1999).
- 226 Zhang, Y., Feng, X. H. & Derynck, R. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-  
Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* **394**, 909-913, (1998).
- 227 Hua, X., Miller, Z. A., Wu, G., Shi, Y. & Lodish, H. F. Specificity in transforming  
growth factor beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1  
gene: interactions of promoter DNA, transcription factor muE3, and Smad  
proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13130-13135, (1999).
- 228 Xiao, Z., Watson, N., Rodriguez, C. & Lodish, H. F. Nucleocytoplasmic shuttling  
of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. *J Biol  
Chem* **276**, 39404-39410, (2001).
- 229 Xiao, Z., Brownawell, A. M., Macara, I. G. & Lodish, H. F. A novel nuclear export  
signal in Smad1 is essential for its signaling activity. *J Biol Chem* **278**, 34245-  
34252, (2003).
- 230 Inman, G. J. & Hill, C. S. Stoichiometry of active smad-transcription factor  
complexes on DNA. *J Biol Chem* **277**, 51008-51016, (2002).
- 231 Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K. & Imamura, T. Cooperative  
inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory  
Smads. *Mol Biol Cell* **14**, 2809-2817, (2003).
- 232 Gelmedin, V., Zavala-Gongora, R., Fernandez, C. & Brehm, K. Echinococcus  
multilocularis: cloning and characterization of a member of the SNW/SKIP family  
of transcriptional coregulators. *Exp Parasitol* **111**, 115-120, (2005).
- 233 Seoane, J., Le, H. V., Shen, L., Anderson, S. A. & Massague, J. Integration of  
Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma  
cell proliferation. *Cell* **117**, 211-223, (2004).
- 234 Zawel, L. *et al.* Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription  
activators. *Mol Cell* **1**, 611-617, (1998).
- 235 Chen, C. R., Kang, Y., Siegel, P. M. & Massague, J. E2F4/5 and p107 as Smad  
cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* **110**, 19-32,  
(2002).
- 236 Frederick, J. P., Liberati, N. T., Waddell, D. S., Shi, Y. & Wang, X. F.  
Transforming growth factor beta-mediated transcriptional repression of c-myc is  
dependent on direct binding of Smad3 to a novel repressive Smad binding  
element. *Mol Cell Biol* **24**, 2546-2559, (2004).
- 237 Xu, X., Yin, Z., Hudson, J. B., Ferguson, E. L. & Frasch, M. Smad proteins act in  
combination with synergistic and antagonistic regulators to target Dpp responses  
to the Drosophila mesoderm. *Genes Dev* **12**, 2354-2370, (1998).
- 238 Kim, J., Johnson, K., Chen, H. J., Carroll, S. & Laughon, A. Drosophila Mad binds  
to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature*  
**388**, 304-308, (1997).
- 239 Ishida, W. *et al.* Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of  
bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter.  
*J Biol Chem* **275**, 6075-6079, (2000).
- 240 Hata, A., Lagna, G., Massague, J. & Hemmati-Brivanlou, A. Smad6 inhibits  
BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor  
suppressor. *Genes Dev* **12**, 186-197, (1998).
- 241 Goto, K., Kamiya, Y., Imamura, T., Miyazono, K. & Miyazawa, K. Selective  
inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors. *J  
Biol Chem* **282**, 20603-20611, (2007).
- 242 Nakao, A. *et al.* Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-  
beta signalling. *Nature* **389**, 631-635, (1997).

- 243 Hayashi, H. *et al.* The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* **89**, 1165-1173, (1997).
- 244 Tajima, Y. *et al.* Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor-beta signaling by Smad7. *J Biol Chem* **278**, 10716-10721, (2003).
- 245 Suzuki, C. *et al.* Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem* **277**, 39919-39925, (2002).
- 246 Kavsak, P. *et al.* Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* **6**, 1365-1375, (2000).
- 247 Ebisawa, T. *et al.* Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* **276**, 12477-12480, (2001).
- 248 Komuro, A. *et al.* Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene* **23**, 6914-6923, (2004).
- 249 Kuratomi, G. *et al.* NEDD4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2) negatively regulates TGF-beta (transforming growth factor-beta) signalling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF-beta type I receptor. *Biochem J* **386**, 461-470, (2005).
- 250 Shi, W. *et al.* GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol* **164**, 291-300, (2004).
- 251 Itoh, S. *et al.* Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem* **273**, 29195-29201, (1998).
- 252 Ishisaki, A. *et al.* Smad7 is an activin-inducible inhibitor of activin-induced growth arrest and apoptosis in mouse B cells. *J Biol Chem* **273**, 24293-24296, (1998).
- 253 Benchabane, H. & Wrana, J. L. GATA- and Smad1-dependent enhancers in the Smad7 gene differentially interpret bone morphogenetic protein concentrations. *Mol Cell Biol* **23**, 6646-6661, (2003).
- 254 Afrakhte, M. *et al.* Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. *Biochem Biophys Res Commun* **249**, 505-511, (1998).
- 255 Ulloa, L., Doody, J. & Massague, J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* **397**, 710-713, (1999).
- 256 Bitzer, M. *et al.* A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev* **14**, 187-197, (2000).
- 257 Constam, D. B. & Robertson, E. J. Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol* **144**, 139-149, (1999).
- 258 Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F. & Chambon, P. Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 4853-4857, (1978).
- 259 Daopin, S., Piez, K. A., Ogawa, Y. & Davies, D. R. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* **257**, 369-373, (1992).
- 260 Burt, D. W. & Law, A. S. Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Prog Growth Factor Res* **5**, 99-118, (1994).
- 261 Marchler-Bauer, A. *et al.* CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* **37**, D205-210, (2009).
- 262 Sapkota, G., Alarcon, C., Spagnoli, F. M., Brivanlou, A. H. & Massague, J. Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Mol Cell* **25**, 441-454, (2007).

- 263 Huang, S., Flanders, K. C. & Roberts, A. B. Characterization of the mouse Smad1  
gene and its expression pattern in adult mouse tissues. *Gene* **258**, 43-53, (2000).
- 264 Carlo, J. M. *et al.* Identification and characterization of an R-Smad ortholog  
(SmSmad1B) from *Schistosoma mansoni*. *FEBS J* **274**, 4075-4093, (2007).
- 265 Lo, R. S., Chen, Y. G., Shi, Y., Pavletich, N. P. & Massague, J. The L3 loop: a  
structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and  
TGF-beta receptors. *EMBO J* **17**, 996-1005, (1998).
- 266 Kurisaki, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C. H. & Moustakas, A. Transforming  
growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and  
Ran-dependent manner. *Mol Biol Cell* **12**, 1079-1091, (2001).
- 267 Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J. & Cullen, B. R. Protein  
sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1  
Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection  
assay. *Mol Cell Biol* **16**, 4207-4214, (1996).
- 268 Jayaraman, L. & Massague, J. Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the  
transforming growth factor-beta pathway. *J Biol Chem* **275**, 40710-40717,  
(2000).
- 269 Forster, S., Gunthel, D., Kiss, F. & Brehm, K. Molecular characterization of a  
serum-responsive, DAF-12-like nuclear hormone receptor of the fox-tapeworm  
*Echinococcus multilocularis*. *J Cell Biochem*, (2011).
- 270 Mochizuki, T. *et al.* Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition  
of transforming growth factor-beta superfamily signaling. *J Biol Chem* **279**,  
31568-31574, (2004).
- 271 Attisano, L., Wrana, J. L., Montalvo, E. & Massague, J. Activation of signalling by  
the activin receptor complex. *Mol Cell Biol* **16**, 1066-1073, (1996).
- 272 de Caestecker, M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors.  
*Cytokine Growth Factor Rev* **15**, 1-11, (2004).
- 273 Laping, N. J. *et al.* Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced  
extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase  
activity: SB-431542. *Mol Pharmacol* **62**, 58-64, (2002).
- 274 Inman, G. J. *et al.* SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming  
growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK)  
receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* **62**, 65-74, (2002).
- 275 Stettler, M. *et al.* *Echinococcus multilocularis* alkaline phosphatase as a marker  
for metacestode damage induced by in vitro drug treatment with albendazole  
sulfoxide and albendazole sulfone. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2256-2262,  
(2001).
- 276 Anderson, G. J. & Darshan, D. Small-molecule dissection of BMP signaling. *Nat  
Chem Biol* **4**, 15-16, (2008).
- 277 Yu, P. B. *et al.* Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis  
and iron metabolism. *Nat Chem Biol* **4**, 33-41, (2008).
- 278 Sawyer, J. S. *et al.* Synthesis and activity of new aryl- and heteroaryl-substituted  
pyrazole inhibitors of the transforming growth factor-beta type I receptor kinase  
domain. *J Med Chem* **46**, 3953-3956, (2003).
- 279 Singh, J. *et al.* Successful shape-based virtual screening: the discovery of a  
potent inhibitor of the type I TGFbeta receptor kinase (TbetaRI). *Bioorg Med  
Chem Lett* **13**, 4355-4359, (2003).
- 280 Shiou, S. R. *et al.* Smad4-dependent regulation of urokinase plasminogen  
activator secretion and RNA stability associated with invasiveness by autocrine  
and paracrine transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **281**, 33971-33981,  
(2006).
- 281 Knobloch, J., Beckmann, S., Burmeister, C., Quack, T. & Grevelding, C. G.  
Tyrosine kinase and cooperative TGFbeta signaling in the reproductive organs of  
*Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* **117**, 318-336, (2007).



- 282 Goumans, M. J. *et al.* Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell* **12**, 817-828, (2003).
- 283 Makkar, P., Metpally, R. P., Sangadala, S. & Reddy, B. V. Modeling and analysis of MH1 domain of Smads and their interaction with promoter DNA sequence motif. *J Mol Graph Model* **27**, 803-812, (2009).
- 284 Vasilaki, E. *et al.* Novel regulation of Smad3 oligomerization and DNA binding by its linker domain. *Biochemistry* **48**, 8366-8378, (2009).
- 285 Hanyu, A. *et al.* The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling. *J Cell Biol* **155**, 1017-1027, (2001).
- 286 Kamiya, Y., Miyazono, K. & Miyazawa, K. Smad7 inhibits transforming growth factor-beta family type I receptors through two distinct modes of interaction. *J Biol Chem* **285**, 30804-30813, (2010).
- 287 Lewis, K. A. *et al.* Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* **404**, 411-414, (2000).
- 288 Osman, A., Niles, E. G., Verjovski-Almeida, S. & LoVerde, P. T. Schistosoma mansoni TGF-beta receptor II: role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene. *PLoS Pathog* **2**, e54, (2006).
- 289 Zhang, S. *et al.* Expression of major histocompatibility complex class I chain-related molecule A, NKG2D, and transforming growth factor-beta in the liver of humans with alveolar echinococcosis: new actors in the tolerance to parasites? *J Infect Dis* **197**, 1341-1349, (2008).
- 290 Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45, (2001).
- 291 Harris, A., Heath, D. D., Lawrence, S. B. & Shaw, R. J. Echinococcus granulosus: ultrastructure of epithelial changes during the first 8 days of metacystode development in vitro. *Int J Parasitol* **19**, 621-629, (1989).
- 292 Slais, J. Functional morphology of cestode larvae. *Adv Parasitol* **11**, 395-480, (1973).
- 293 Galindo, M., Paredes, R., Marchant, C., Mino, V. & Galanti, N. Regionalization of DNA and protein synthesis in developing stages of the parasitic platyhelminth Echinococcus granulosus. *J Cell Biochem* **90**, 294-303, (2003).
- 294 Haag, K. L., Alves-Junior, L., Zaha, A. & Ayala, F. J. Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the Echinococcus granulosus antigen B gene family. *Gene* **333**, 157-167, (2004).
- 295 Arend, A. C., Zaha, A., Ayala, F. J. & Haag, K. L. The Echinococcus granulosus antigen B shows a high degree of genetic variability. *Exp Parasitol* **108**, 76-80, (2004).
- 296 Morris, D. L. & Taylor, D. H. Echinococcus granulosus: development of resistance to albendazole in an animal model. *J Helminthol* **64**, 171-174, (1990).
- 297 Davies, S. J. & Pearce, E. J. Atypical post-translational modification and targeting of a Schistosoma mansoni surface receptor, a member of the transforming growth factor beta receptor family of cell surface receptors. *Mol Biochem Parasitol* **104**, 299-310, (1999).
- 298 Beaudoin, E. & Gautheret, D. Identification of alternate polyadenylation sites and analysis of their tissue distribution using EST data. *Genome Res* **11**, 1520-1526, (2001).
- 299 Edwalds-Gilbert, G., Veraldi, K. L. & Milcarek, C. Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res* **25**, 2547-2561, (1997).
- 300 Zhang, H., Lee, J. Y. & Tian, B. Biased alternative polyadenylation in human tissues. *Genome Biol* **6**, R100, (2005).
- 301 Moore, M. J. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* **309**, 1514-1518, (2005).
- 302 Bartel, D. P. & Chen, C. Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet* **5**, 396-400, (2004).

- 303 Sandberg, R., Neilson, J. R., Sarma, A., Sharp, P. A. & Burge, C. B. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* **320**, 1643-1647, (2008).
- 304 Hubert, K., Zavala-Gongora, R., Frosch, M. & Brehm, K. Identification and characterization of PDZ-1, a N-ERMAD specific interaction partner of the *Echinococcus multilocularis* ERM protein Elp. *Mol Biochem Parasitol* **134**, 149-154, (2004).
- 305 Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 3. edition edn, (Cold Spring Harbor Laboratory, 2001).
- 306 Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. & Gresshoff, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **196**, 80-83, (1991).
- 307 Lindl, T. *Zell- und Gewebekultur : Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. 5. Edition edn, 316 (Spektrum Akademischer Verlag, 2002).
- 308 Tappe, D. *et al.* *Echinococcus multilocularis* infection of several Old World monkey species in a breeding enclosure. *Am J Trop Med Hyg* **77**, 504-506, (2007).
- 309 Gottstein, B. & Felleisen, R. Protective immune mechanisms against the metacestode of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol Today* **11**, 320-326, (1995).
- 310 Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402, (1997).
- 311 Altschul, S. F. *et al.* Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J* **272**, 5101-5109, (2005).
- 312 Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-5864, (1998).
- 313 Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* **2**, 953-971, (2007).
- 314 Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. & Brunak, S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**, 1633-1649, (2004).
- 315 Gasteiger, E. *et al.* ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**, 3784-3788, (2003).
- 316 Bjellqvist, B. *et al.* The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **14**, 1023-1031, (1993).
- 317 Bjellqvist, B., Basse, B., Olsen, E. & Celis, J. E. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* **15**, 529-539, (1994).
- 318 Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**, 363-371, (2009).