

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Charakterisierung der T2-Ribonuklease des
Fuchsbandwurms *Echinococcus multilocularis***

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dominik Benke

aus Köln

Würzburg, Oktober 2018

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Brehm

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Manfred Lutz

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.19

Der Promovend ist Arzt

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Helminthen: Epidemiologie, Immunregulation und Hygienehypothese	1
1.2	<i>Echinococcus multilocularis</i> : Biologie und Rolle als Krankheitserreger	2
1.3	<i>E. multilocularis</i> : Immunantwort und -Evasion	6
1.4	Dendritische Zellen: Ziele parasitärer Immunmodulation	10
1.5	Ribonukleasen der T2-Familie und ihr Potential als Immunregulatoren am Beispiel von omega-1	15
1.6	Pathologie der Leber bei alveolärer Echinokokkose und Schistosomiasis	17
1.7	Ziele dieser Arbeit	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.2	Software, bioinformatische online-Tools und Datenbanken.....	25
2.3	Arbeiten mit RNA.....	26
2.4	Arbeiten mit DNA	27
2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.4.2	Kolonie-PCR	27
2.4.3	Zielgerichtete Mutagenese	27
2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.4.5	DNA-Aufreinigung.....	28
2.4.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
2.4.7	Bestimmung von DNA-Konzentration und Reinheit	29
2.4.8	Restriktionsverdau	29
2.4.9	Ligation von DNA-Fragmenten	29
2.4.10	DNA-Sequenzierung.....	29
2.4.11	Klonierungen.....	30

2.5	Arbeiten mit Proteinen	32
2.5.1	Proteinaufreinigung	32
2.5.2	Proteinkonzentrierung	34
2.5.3	SDS-PAGE.....	36
2.5.4	Detektion von Ribonukleaseaktivität	37
2.5.5	Western Blot.....	38
2.6	Gewinnung polyklonaler Antikörper durch Immunisierung eines Kaninchens 40	
2.7	Arbeiten mit Bakterien.....	40
2.7.1	Stämme.....	40
2.7.2	Medien und Zusätze.....	40
2.7.3	Transformation	40
2.7.4	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	41
2.8	Arbeiten mit Säugerzellen.....	42
2.8.1	Zelllinien	42
2.8.2	Medien und Zusätze.....	42
2.8.3	Transfektion von HEK 293T Zellen	43
2.8.4	Hepatotoxizitätsprüfung mit Hep3B Zellen	44
2.8.5	Generierung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmark	44
2.8.6	Exposition Dendritischer Zellen mit Zellkulturüberständen.....	45
2.9	Arbeiten mit <i>E. multilocularis</i>	45
2.9.1	Verwendete Isolate	45
2.9.2	Generierung von Metazestoden-Überstand und -Lysat	46
2.9.3	Primärzellisolation und Generierung von Primärzell-Überstand	46
2.10	Durchflusszytometrie	46
2.11	Messung der IL-12 p70-Sekretion dendritischer Zellen.....	48

2.12	Statistische Analyse.....	48
3	Ergebnisse.....	49
3.1	<i>emRNASET2</i> : cDNA-, Proteinsequenz und Vorhersage des Signalpeptids	49
3.2	Produktion polyklonaler Antikörpern gegen EmRNASET2.....	50
3.3	Untersuchung der Expression von <i>emRNASET2</i> in Larvenstadien des Fuchsbandwurms	54
3.3.1	Nachweis der Transkription von <i>emRNASET2</i>	54
3.3.2	Nachweis der Expression auf Proteinebene	56
3.3.3	EmRNASET2 als (diagnostisches) Antigen?.....	57
3.4	Expression rekombinanter EmRNASET2 in HEK 293T Zellen.....	58
3.5	Funktionelle Analyse von EmRNASET2	61
3.5.1	Untersuchung des Effekts von recEmRNASET2 auf murine dendritische Zellen	61
3.5.2	Untersuchung der RNase-Aktivität.....	65
3.5.3	Untersuchung der Hepatotoxizität	67
3.6	Vergleich von EmRNASET2 mit T2-RNasen anderer Helminthen (<i>in silico</i>)	69
4	Diskussion.....	75
4.1	Experimentelle Limitationen: Die Methoden dieser Arbeit und ähnlicher Untersuchungen zur Funktion von T2-RNasen im Vergleich.....	75
4.2	Argumente gegen eine funktionelle Verwandtschaft von EmRNASET2 und omega-1 sowie abschließende Bemerkungen.....	80
5	Zusammenfassung.....	85
6	Abkürzungen.....	86
7	Literatur	88

Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Lebenszyklus von <i>E. multilocularis</i>	3
Abbildung 2: emRNASET2 cDNA-Sequenz mit Übersicht über verwendete Primer. ..	25
Abbildung 3. Eingesetzte Plasmidvektoren.....	31
Abbildung 4: Gating-Strategie am Beispiel von LPS-exponierten DCs.....	47
Abbildung 5. Sequenzalignment von EmRNASET2 und omega-1.....	49
Abbildung 6. Expression von EmRNASET2 in <i>E. coli</i>	53
Abbildung 7. Transkription von emRNASET2	54
Abbildung 8. RT-PCR mit emRNASET2-spezifischen Primern	55
Abbildung 9. Nachweis der Expression über anti-EmRNASET2 Antikörper.	56
Abbildung 10. Untersuchung der Antigenität von EmRNASET2.....	57
Abbildung 11. Nachweis der Expression von recEmRNASET2 in HEK 293T Zellen..	60
Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse der Reifung dendritischer Zellen	62
Abbildung 13. Analyse von Oberflächenmarkern und Zytokinproduktion dendritischer Zellen	64
Abbildung 14. Untersuchung der RNase-Aktivität von Überständen aus Parasitenkultur und rekombinant hergestellter recEmRNASET2.	67
Abbildung 15. Hepatotoxizitätsprüfung über WST-1 Assay:	69
Abbildung 16. Sequenzalignment von T2-RNasen verschiedener Helminthen.....	70
Abbildung 17. Phylogenetischer Baum von T2-RNasen verschiedener Helminthen.....	72
Tabelle 1. Subtypen von T-Helferzellen.	14
Tabelle 2. Effekte von Parasitenprodukten auf dendritische Zellen.	20
Tabelle 3: Verwendete Primer.	24
Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper.	39
Tabelle 5: Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse dendritischer Zellen. ..	47
Tabelle 6. Ausgewählte T2-RNasen und ihr isoelektrischer Punkt	74
Tabelle 7. Inkubationsbedingungen des RNase-Aktivitätsgels.	79

1 Einleitung

1.1 Helminthen: Epidemiologie, Immunregulation und Hygienehypothese

Parasitäre Würmer (Helminthen) sind als Krankheitserreger des Menschen weltweit von großer Bedeutung. Humanpathogene Arten finden sich unter den Zestoden (Bandwürmern), Trematoden (Saugwürmern) und Nematoden (Fadenwürmern). Einige davon sind sehr weit verbreitet. So infizieren allein die bodenübertragenen Würmer 1,5 Milliarden Menschen – ein Fünftel der Weltbevölkerung (WHO, 2017). Andere Arten sind seltener, stellen jedoch aufgrund ihrer Gefährlichkeit ein großes Problem dar: Schwere neurologische Komplikationen drohen zum Beispiel beim Befall des zentralen Nervensystems mit *Taenia solium* (Neurozystizerkose); Infektionen mit *Onchocerca volvulus* können zur Erblindung führen (Davidson et al., 2014).

Sowohl die Häufigkeit als auch die Schwere einer Krankheit werden bei der Berechnung der entsprechenden behinderungsbereinigten Lebensjahre (disability-adjusted life years, DALYs) berücksichtigt, was eine gewisse Vergleichbarkeit verschiedener Krankheiten hinsichtlich der globalen Krankheitslast ermöglicht. Obwohl einiges dafür spricht, dass die Krankheitsfolgen von Wurminfektionen dabei eher unterschätzt werden, beispielsweise durch fehlende Berücksichtigung von Spätkomplikationen (Budke et al., 2009; Hotez et al., 2008; King, 2015), kommen Infektionen mit Helminthen im Bericht der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zusammengenommen auf über 13 Millionen DALYs. Sie liegen damit in der gleichen Größenordnung wie Leukämien (11 Mio) oder Epilepsie (15 Mio) (WHO, 2016). Da sie meistens Patienten aus ressourcenschwachen Ländern betreffen, erhalten Wurminfektionen jedoch nur eine vergleichsweise geringe Aufmerksamkeit vonseiten der biomedizinischen Forschung (Liese et al., 2014). Auffallend ist, dass 8 der aktuell 20 von der WHO priorisierten „vernachlässigten Tropenkrankheiten“ von Helminthen verursacht werden (Molyneux et al., 2017).

In der westlichen Welt hat die Prävalenz von Wurminfektionen dagegen mit zunehmender Industrialisierung stark abgenommen. Während davon auszugehen ist, dass in der Vergangenheit fast alle Menschen mit (oftmals chronischen) Wurminfektionen leben mussten, stellt nun die Abwesenheit dieser Infektionen das durch lange Ko-Evolution an die Parasiten angepasste menschliche Immunsystem vor neue Probleme (Maizels, 2016). Mit der Hygienehypothese wurde die Abnahme von Wurminfektionen

in einen Zusammenhang mit der Zunahme von Allergien und Autoimmunerkrankungen gebracht, wie sie in Industrienationen zu beobachten ist bzw. war (Maizels et al., 2014). Dafür sprechen auch Studien, in denen Kinder nach Entwurmung eine höhere Atopieneigung zeigten als Placebo-behandelte gleichaltrige Kontrollpersonen (van den Biggelaar et al., 2004). Umgekehrt sprechen auch die beobachteten Effekte einer absichtlichen Infektion mit Würmern für die Hygienehypothese, zum Beispiel erste Erfolge dieser „Wurmtherapie“ bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Summers et al., 2005a; Summers et al., 2005b).

Als im Vergleich zu Viren oder Bakterien sehr große Krankheitserreger basiert die Überlebensstrategie parasitärer Würmer oftmals nicht auf schneller Vervielfältigung oder Antigenvariation, sondern in erster Linie auf der gezielten Beeinflussung der Immunabwehr des Wirtes (Coakley et al., 2016). Vor allem die exkretorisch/sekretorischen Produkte (ESPs) von Helminthen sind Gegenstand immunoparasitologischer Forschung. Ziel ist die Identifikation der für die beobachtete Immunregulation verantwortlichen Substanzen, welche dann für die Prävention oder Therapie von Wurmerkrankungen nutzbar gemacht werden könnten, beispielsweise durch die Entwicklung von Impfungen oder einen gezielten therapeutischen Eingriff in die Immunregulation des Parasiten. Nicht zuletzt könnte die Identifikation solcher Immunmodulatoren auch zu neuen Therapieansätzen gegen Allergien, Autoimmunerkrankungen oder in der Transplantationsmedizin führen.

Auch die vorliegende Arbeit befasst sich mit einem als potentiell immunregulatorisch eingestuften parasitären ESP: Der T2-Ribonuklease von *Echinococcus multilocularis*.

1.2 *Echinococcus multilocularis*: Biologie und Rolle als Krankheitserreger

Der Kleine Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis* ist Auslöser der alveolären Echinokokkose (AE), einer der gefährlichsten Wurminfektionen des Menschen (Kern, 2010). Endwirt ist der Fuchs, in dessen Dünndarm die etwa 4 mm große adulte Form dieses Zestoden über ein mit Hakenkranz und Saugnäpfen ausgestattetes Kopfteil (Scolex) verankert ist. Die Reproduktion erfolgt zumeist durch Selbstbefruchtung in den Bandwurmgliedern (Proglottiden). Eier werden einzeln oder innerhalb reifer Proglottiden mit dem Kot ausgeschieden und können in der Umwelt monatelang infektiös bleiben (Craig, 2003). Zwischenwirte sind in der Regel Nagetiere. Nach oraler Aufnahme der

Eier wird das erste Larvenstadium (die Oncosphäre) freigesetzt, passiert die Darmwand und gelangt schließlich in die Leber (seltener auch in die Lunge und andere Organe) (Eckert und Deplazes, 2004; Vuitton und Gottstein, 2010).

Dort bildet sich das zweite Larvenstadium, der Metazestode. Metazestoden sind Zysten, deren Wand von einer äußeren azellulären Laminatschicht und einer inneren zellulären Germinalschicht gebildet wird. Im Innern sind sie mit Hydatidenflüssigkeit gefüllt. Sie bilden durch Knospung Tochterzysten, wodurch ein multivesikuläres Gewebe entsteht, welches das befallene Organ infiltrativ durchsetzt. Das Wachstum ähnelt dem eines malignen Tumors – auch eine Metastasierung in entfernte Organe ist möglich. Ausgehend von der Germinalschicht entwickeln sich invaginierte Kopfteile, die den adulten Scolices entsprechen und das dritte Larvenstadium darstellen (Protoscolices). Die durch den Organbefall geschwächten Nagetiere sind leichte Beute für den Fuchs, in dessen Verdauungstrakt die Protoscolices evaginieren und sich wieder zu adulten Würmern entwickeln (Eckert und Deplazes, 2004; Vuitton und Gottstein, 2010).

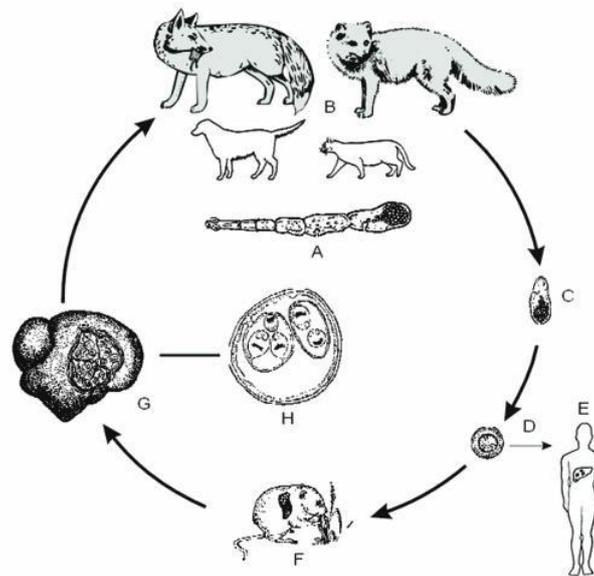


Abbildung 1: Lebenszyklus von *E. multilocularis*. Mit dem adulten Wurm (A) infizierte Füchse (oder Hunde/Katzen, B) scheiden Proglottiden (C) aus. Die Infektion über das Ei mit Oncosphäre (D) betrifft den Menschen als Fehlwirt (E) oder Nagetiere als Zwischenwirte (F). Bei Letzteren bilden die in der Leber wachsenden Metazestoden (G) auch Protoscolices aus (H), die sich nach Aufnahme durch den Endwirt wieder zur adulten Form entwickeln können. Abbildung aus Eckert und Deplazes (2004).

Als Fehlwirt kann sich auch der Mensch mit Eiern des Fuchsbandwurmes infizieren. *E. multilocularis* ist in großen Teilen der nördlichen Hemisphäre verbreitet, die AE ist jedoch relativ selten. So treten in Deutschland jährlich etwa 30 Neuinfektionen auf (Robert-Koch-Institut, 2017). In Europa wurde in den letzten Jahren eine Zunahme der AE beobachtet, was nicht nur auf verbesserte Diagnostik und Meldesysteme zurückgeführt wird. Auch Wachstum und Urbanisierung der Fuchspopulation, vermehrte Übertragung durch infizierte Haustiere (Hunde) und der Anstieg immunsupprimierter Patienten werden damit in Verbindung gebracht (Vuitton et al., 2015). In einigen hochendemischen Gebieten Tibets sind bis zu 5 % der Bevölkerung infiziert (Budke et al., 2004). Die globale Inzidenz der AE wird auf 18.000 per annum geschätzt und verursacht mit 660.000 DALYs eine mit anderen vernachlässigten Krankheiten vergleichbare Krankheitslast (Torgerson et al., 2010).

Klinisch macht sich die Infektion oft erst nach einem jahrelangen asymptomatischen Stadium durch cholestatischen Ikterus, Bauchschmerzen, Hepatomegalie, Gewichtsverlust und Asthenie bemerkbar. Später können Komplikationen auftreten wie z.B. portale Hypertension, Cholangitis (u.U. mit septischem Verlauf), sekundäre biliäre Zirrhose, Budd-Chiari-Syndrom, Ausbreitung in Nachbarorgane sowie Fernmetastasierung. Unbehandelt endet die AE meist tödlich (Brunetti et al., 2010; Eckert und Deplazes, 2004; Stojkovic, 2014).

Bildgebende Verfahren (v.a. Sonographie und Computertomographie) sind von zentraler Bedeutung für die Diagnose einer AE. Ergänzend kommen serologische Tests zum Einsatz (ELISA, Western Blot). Nach Probengewinnung kann die Diagnose histologisch oder PCR-basiert bestätigt werden (Brunetti et al., 2010). Analog zur onkologischen TNM-Klassifikation erfolgt die Einteilung einer AE nach dem Ausmaß des (primären) Leberbefalls, der Ausbreitung in Nachbarorgane und dem Vorhandensein von Metastasen (Kern et al., 2006).

Nicht selten befindet sich die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in einem fortgeschrittenen Stadium, sodass eine kurative chirurgische Resektion nicht mehr möglich ist. In diesem Fall ist eine Chemotherapie mit Benzimidazolen indiziert, die parasitostatisch wirken und daher dauerhaft eingenommen werden müssen. Dabei können schwere Nebenwirkungen wie Hepatotoxizität, Leukopenie, Thrombopenie und Alopezie

aufzutreten. Eine Unterbrechung der Therapie führt oft zum Rezidiv (Brunetti et al., 2010). Ausschließlich die totipotenten Germinalzellen des Parasiten können proliferieren (Koziol et al., 2014) und somit für ein Rezidiv verantwortlich sein. Die Benzimidazol-basierte Therapie scheint also gerade diese entscheidenden Stammzellen des Parasiten nicht zuverlässig abzutöten (Brehm und Koziol, 2014; Koziol und Brehm, 2015). Als Grund dafür wird die Expression einer gegen Benzimidazole resistenten Tubulin-Isoform in Germinalzellen diskutiert (Schubert et al., 2014).

Dringliches Ziel gegenwärtiger Forschung ist also die Verbesserung der medikamentösen Therapie. Von zentraler Bedeutung sind dabei die durch Sequenzierung des Fuchsbandwurmgenoms gewonnenen Daten (Tsai et al., 2013) sowie die Möglichkeit der axenischen *in-vitro* Kultivierung von *E. multilocularis*. *In-vivo* kann Metazestodengewebe durch wiederholtes Passagieren in der Bauchhöhle von Rennmäusen über viele Jahre erhalten werden. Davon ausgehend können Metazestoden in Zellkulturflaschen mit Rattenhepatozyten ko-kultiviert werden. Vesikel aus dieser Kultur bilden wiederum den Ausgangspunkt für die axenische Kultivierung in einer Stickstoffatmosphäre mit Medium, welches reduzierende Agenzien enthält und durch Fütterzellen konditioniert wurde (Spiliotis und Brehm, 2009; Spiliotis et al., 2004). Aus Metazestodenvesikeln können Primärzellen isoliert werden, aus denen innerhalb von etwa 4 Wochen neue Vesikel entstehen und die ein frühes Stadium des Übergangs von Oncosphäre zu Metazestode repräsentieren (Spiliotis et al., 2008).

Vielversprechende neue Therapieansätze basieren auf einem Eingriff in Signalwege des Parasiten, zum Beispiel durch Kinaseinhibitoren (Brehm und Koziol, 2014; Gelmedin et al., 2008; Hemer und Brehm, 2012; Schubert et al., 2014). Großes Potential liegt aber auch in der Entwicklung einer Immunotherapie, die den Parasiten nicht direkt schädigt, sondern eine effizientere Reaktion des Immunsystems herbeiführt: Boubaker et al. (2015) konnten mit einer Antigen-spezifischen Immuntherapie erste Erfolge im Mausmodell erzielen; außerdem zeigten sich Erfolge durch die Applikation von Zytokinen wie Interferon- γ (IFN- γ) bei muriner (Liance et al., 1998) und humaner (Jenne et al., 1998) AE, sowie Interleukin (IL-)-12 bei muriner AE (Emery et al., 1998). Schließlich kommt auch eine gezielte Inhibition der parasitären Immunevasion in Betracht, setzt aber ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen voraus.

1.3 *E. multilocularis*: Immunantwort und -Evasion

E. multilocularis verfügt über ausgefeilte Mechanismen der Immunevasion, welche ihm ein jahrelanges Überleben im Zwischenwirt ermöglichen – das Metazestodengewebe verhält sich wie ein perfektes Transplantat (Nono, 2012). Andererseits ist der Parasit insbesondere zu Beginn der Infektion sehr vulnerabel gegenüber dem Immunsystem seines Zwischenwirtes. So ist die klinische Prävalenz der AE deutlich niedriger als die serologische: Daten aus der Schweiz deuten z.B. darauf hin, dass nur 1 % der Seropositiven eine klinisch relevante AE entwickelt. In einigen seropositiv getesteten Menschen finden sich kleine, vollständig kalzifizierte Läsionen in der Leber, welche auf eine abortiv verlaufene AE hindeuten; die meisten Seropositiven bleiben jedoch auch sonographisch unauffällig (Gottstein et al., 2001; Gottstein et al., 2015).

Studien zur Immunologie der AE basieren u.a. auf klinischen Patientendaten, dem Mausmodell mit entweder peroraler, intraperitonealer oder intrahepatischer Infektion und *in vitro* Untersuchungen, bspw. mit parasitären ESPs (Übersichtsarbeiten z.B. Gottstein et al. (2017), Wang und Gottstein (2016)). Trotz der unterschiedlichen Natur dieser Studien ergibt sich zusammengenommen ein erstaunlich kohärentes, wenngleich nach wie vor lückenhaftes Bild von Immunantwort und -modulation im Rahmen der AE.

So kommt es im Verlauf der AE zur Bildung von Antikörpern gegen Parasitenantigene (Bresson-Hadni et al., 2000; Gottstein und Hemphill, 1997; Matsumoto et al., 2010). Zu Beginn der Infektion wird eine protektive Funktion von Antikörpern gegen Oncosphärenantigene diskutiert (Zhang et al., 2008), z.B. durch die mukosale Produktion von IgA-Antikörpern, die bereits mehrere Wochen vor der systemischen Produktion von IgM und IgG ihren Höhepunkt erreicht (Pater et al., 1998). Zudem deuten *in-vitro* Experimente darauf hin, dass IgE-Antikörper für die durch Metazestodenextrakt getriggerte Freisetzung von IL-4 aus basophilen Granulozyten benötigt werden (Aumuller et al., 2004). Für die Kontrolle einer bereits etablierten Infektion in der Leber scheinen Antikörper jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen: Nach intraperitonealer Infektion zeigen B-Zell-defiziente μ MT-Mäuse ein mit Wildtyp-Kontrollen vergleichbares Parasitenwachstum (Dai et al., 2004).

T-Zellen scheinen dagegen von besonderer Bedeutung für die Eindämmung des Metazestodenwachstums in der Leber zu sein. So war die hepatische Parasitenmasse T-

Zell-defizienter (thymusaplastischer oder T-Zell-Rezeptor- β -Knockout-) Mäuse im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht (Dai et al., 2004). Auch Studien mit SCID-Mäusen, deren schwerer kombinierter Immundefekt sowohl B- als auch T-Zellen betrifft, oder mit Mäusen, deren T-Zell-Funktion durch Ciclosporin gegeben wurde, weisen klar auf eine zentrale Rolle von T-Lymphozyten für die Kontrolle der AE hin (Liance et al., 1992; Playford et al., 1992). Dass diese an Mäusen gewonnenen Erkenntnisse wahrscheinlich auch auf die Infektion des Menschen übertragbar sind, zeigt z.B. ein Fallbericht über die rapide Progression der AE bei einer Patientin mit dem, vor allem T-Zellen betreffenden, erworbenen Immunschwächesyndrom AIDS (Sailer et al., 1997).

Der bei weitem größte Anteil an T-Zellen besitzt einen aus α - und β - Untereinheit zusammengesetzten T-Zell-Rezeptor (TCR), der sich vom TCR der selteneren, sog. $\gamma\delta$ -T-Zellen unterscheidet (Fehling et al., 1999; Haas et al., 1993). Reife $\alpha\beta$ -T-Zellen werden anhand der Expression von Ko-Rezeptoren weiter unterteilt in $CD4^+$ Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen. Die bereits erwähnten Versuche von Dai et al. (2004) an Knockout-Mäusen zeigen, dass vor allem $\alpha\beta$ - $CD4^+$ T-Zellen für die Kontrolle der AE von Bedeutung sind. Diese T-Helferzellen (Th-Zellen) nehmen über Zell-Zell-Kontakte und Sekretion von Zytokinen Einfluss auf andere Zellen des Immunsystems und sind ein essentieller Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Anhand ihrer Effektorfunktionen werden sie in verschiedene Subtypen eingeteilt: Th1-, Th2-, Th17- und T-regulatorische (Treg-) Zellen (Bluestone und Abbas, 2003; Littman und Rudensky, 2010; Murphy und Reiner, 2002).

Klassischerweise rufen Helminthen eine Th2-dominierte Immunantwort hervor (Maizels und McSorley, 2016). Diese ist charakterisiert durch die Bildung von IgE, zellulären Immunreaktionen durch Eosinophile, Basophile und Mastzellen sowie Mechanismen der Barriereimmunität, wie z.B. vermehrte Schleimproduktion. Th2-Antworten spielen außerdem eine Rolle in der Pathogenese von Asthma und Allergien (Murphy, 2016). Durch parasitäre Immunmodulation ist die Immunreaktion auf Helminthen oft auch geprägt von T-regulatorischen Mechanismen (Maizels und McSorley, 2016). Über Zytokine wie IL-10 und TGF- β supprimieren sie Immunreaktionen und induzieren Toleranz (Murphy, 2016). Auch für die Toleranz gegenüber kommensalen Bakterien sind Treg-Zellen von Bedeutung – der Anstieg proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-6

kann das Gleichgewicht zwischen Toleranz und Abwehr dagegen schnell in Richtung einer Th17-dominierten Immunantwort verschieben, die vor allem gegen extrazelluläre Bakterien gerichtet ist und zur Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten sowie vermehrten Bildung antimikrobieller Peptide führt (Littman und Rudensky, 2010). Die Th1-vermittelte Immunantwort wird schließlich vor allem für die Abwehr intrazellulär persistierender Pathogene benötigt; über IFN- γ werden z.B. Makrophagen aktiviert und zytotoxische Effektormechanismen gefördert (Murphy, 2016).

Die Immunreaktion auf *E. multilocularis* wird nicht von einem einzigen Typ dieser durch CD4⁺ Zellen vermittelten Immunantworten dominiert. Vielmehr sind Elemente aller vier Typen zu beobachten, wobei sich ihr relativer Beitrag zur Immunreaktion im Verlauf der Infektion ändert und einige eher mit Suszeptibilität, andere mit Resistenz des Wirtes in Verbindung gebracht werden. Die Sekretion der für die jeweiligen Typen der Immunantwort typischen Zytokine kann beispielsweise über ELISA mit Überständen mononukleärer aus Patientenblut gewonnener Zellen (PBMC) (Godot et al., 2000; Hubner et al., 2006) oder muriner Milzzellen (Emery et al., 1996) untersucht werden; außerdem kann die Expression dieser Zytokine in Zellen des periparasitischen Infiltrats (Wang et al., 2014) und in intraperitonealen T-Zellen (Mejri et al., 2011b) bestimmt werden. Zusammengenommen liefern diese Studien Anhalt für eine initial überwiegende Th1-Antwort, gefolgt von einem Mischbild aus Th1 und Th2 während der chronischen Phase der Infektion. Eine starke Th1-Antwort wird mit abortiven Verläufen in Zusammenhang gebracht und schützt somit den Wirt, während Th2-Zytokine zusammen mit TGF- β und IL-10 der T-regulatorischen Antwort eher mit Progression und Chronifizierung der AE assoziiert sind (Gottstein et al., 2017). Als weiteres wichtiges Effektormolekül von Treg-Zellen wurde Fibrinogen-like Protein 2 (FGL2) identifiziert, dessen Knockout zu einem im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich reduziertem Parasitenwachstum führt (Wang et al., 2015). Th17-Zellen scheinen durch die Produktion von IL-17 (vor allem im mittleren Stadium der Erkrankung) zur Immunopathologie der AE beizutragen und sind möglicherweise auch für das Th1/ Th2- (Un)Gleichgewicht von Bedeutung (Ma et al., 2014).

Dendritische Zellen (DCs) sind für die Differenzierung naiver CD4⁺ Zellen in Richtung der o.g. Subtypen von entscheidender Bedeutung und daher als Ziele einer

Immunmodulation durch den Parasiten von großem Interesse. Auf sie wird in Kapitel 1.4 genauer eingegangen.

Trotz der Wichtigkeit von T-Zellen für die Kontrolle der AE bleibt die Resistenz von Wistar Ratten gegen perorale Infektion mit Oncosphären auch nach T-Zell-Depletion erhalten, während sie durch Dexamethasongabe verringert wird. Dies legt eine Rolle von phagozytischen Zellen, insbes. Makrophagen, für die Abwehr von Oncosphären nahe (Armua-Fernandez et al., 2016). Als Epitheloid- oder Riesenzellen sind sie im weiteren Verlauf der Infektion ein Hauptbestandteil der periparasitischen Granulome und stehen in direktem Kontakt zur Laminatschicht (Vuitton et al., 1989; Vuitton und Gottstein, 2010). Dieser hauptsächlich aus Mucinen bestehenden Barriere zwischen Germinalschicht und Wirtszellen wird eine Bedeutung für die Immunevasion des Parasiten beigemessen (Diaz et al., 2015), vermittelt z.B. über tolerogene Eigenschaften von Gewebsmakrophagen der Leber, sog. Kupfferzellen, für deren Kupfferzellrezeptor eine Interaktion mit Polysacchariden der Laminatschicht beschrieben wurde (Hsu et al., 2013).

Neben der Laminatschicht, die im Frühstadium der Infektion noch gar nicht ausgebildet ist, tragen ESPs des Fuchsbandwurms wesentlich zur beobachteten Immunevasion bei (Nono et al., 2012). So kann der Parasit beispielsweise über eine Cysteinprotease das für Eosinophile chemotaktische Zytokin Eotaxin degradieren (Mejri und Gottstein, 2009).

ESPs von Primärzellen führen *in vitro* zu einer vermehrten Produktion von IFN- γ aus CD4⁺ T-Zellen, was die zu Beginn der Infektion beobachtete Th1-domierte (und für das Überleben des Parasiten eher ungünstige) Immunantwort erklären könnte. Das dafür verantwortliche Protein EmTIP, ein Homologes des menschlichen T-Zell Immunomodulatorischen Proteins, ist für die frühe Entwicklung des Parasiten zum Metazestoden von Bedeutung (Nono et al., 2014).

Metazestoden unterstützen dagegen die T-regulatorische Immunantwort: Ihre ESPs fördern die Konversion naiver CD4⁺ T-Zellen zu Foxp3⁺ CD25⁺ Treg-Zellen in einem Ovalbumin-abhängigen Konversionsassay (Nono, 2012; Nono et al., 2012). Zudem gibt es Hinweise auf eine Expansion peritonealer Treg-Zellen *in vivo* nach intraperitonealer Infektion von Mäusen im Vergleich zu mock-infizierten Kontrollen (Mejri et al., 2011b; Nono, 2012). *In-vitro* Untersuchungen mit rekombinantem EmACT sprechen für eine

Rolle dieses Parasitenproteins, das als Activin-Orthologes zur TGF- β Superfamilie gehört, im Rahmen der beobachteten Foxp3+ Induktion (Nono, 2012). Anders als die Gesamtheit der ESPs von Metazestoden führt dieses Protein jedoch nicht zur *de novo* Konversion zu Treg-Zellen, sondern verstärkt nur die durch zusätzliche Gabe von TGF- β induzierte Differenzierung in diese Richtung (Nono, 2012). Auf welche Weise *E. multilocularis* T-regulatorische Immunantworten induziert ist daher noch nicht abschließend geklärt. Wahrscheinlich kommt dabei den im Folgenden besprochenen dendritischen Zellen eine zentrale Bedeutung zu (Mejri et al., 2011a; Nono, 2012; Nono et al., 2012).

1.4 Dendritische Zellen: Ziele parasitärer Immunmodulation

Verschiedene Pathogene – vom einige Nanometer kleinen Virus über intra- und extrazelluläre Bakterien bis hin zum mitunter meterlangem Wurm – stellen das Immunsystem vor ganz unterschiedliche Herausforderungen. So verwundert es nicht, dass auch die Reaktionen des Immunsystems ganz unterschiedlich ausfallen können, z.B. im Hinblick auf die Art der rekrutierten Zellen oder die Klasse der produzierten Antikörper. Für die Beschreibung dieser Reaktionen hat sich eine Einteilung in verschiedene „Typen der Immunantwort“ etabliert, die vor allem über die bereits in Kap. 1.3 vorgestellten Subtypen von T-Helferzellen (oder deren Pendant im angeborenen Immunsystem, den sog. Innate lymphoid Cells (ILCs)), sowie deren zentrale Zytokine und Transkriptionsfaktoren („Masterregulatoren“) definiert werden (Tab. 1) (Murphy, 2016; O'Shea und Paul, 2010; Zhu, 2017).

Durch ihre entscheidende Rolle für die Aktivierung und Polarisierung naiver T-Zellen zu Effektorzellen der jeweiligen Subtypen sind dendritische Zellen (DCs) von großer Bedeutung für die Ausbildung der verschiedenen Immunantworten (Lutz, 2016).

Nach ihrer Entwicklung im Knochenmark, hauptsächlich aus myeloischen Vorläufern, patrouillieren DCs im Gewebe oder befinden sich in sekundär lymphatischen Organen (Mildner und Jung, 2014). Man unterscheidet plasmazytoide DCs (pDCs), die als Produzenten von Typ-I Interferonen als Reaktion auf Virusinfektionen bekannt sind, von den für die Polarisierung naiver T-Zellen essentiellen konventionellen DCs (cDCs) (Murphy, 2016). Zur Generierung von DCs in für *in vitro* Experimente ausreichenden

Mengen können Zellen aus murinem Knochenmark in Medium mit Zusatz von GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor) kultiviert werden (Lutz et al., 1999). Die dadurch gewonnenen Zellen werden als BMDCs (für bone marrow-derived) bezeichnet und entsprechen am ehesten den sich *in vivo* aus Monozyten entwickelnden „inflammatorischen“ DCs (Naik, 2008).

DCs gehören zu den ersten Zellen des Immunsystems, die mit Pathogenen konfrontiert werden. Als Teil des angeborenen Immunsystems nehmen sie Antigene durch Phagozytose auf (Banchereau und Steinman, 1998). Der Kontakt mit Pathogenen führt zur vermehrten Expression von CCR7, dem Rezeptor für das Chemokin CCL21 aus sekundär lymphatischen Organen, wodurch die Migration der DCs über Lymphgefäße zu den regionalen Lymphknoten erleichtert wird (Bachmann et al., 2006). Hier treffen sie auf naive T-Zellen, die den Lymphknoten über die Blutbahn erreicht haben, und können diese aktivieren und polarisieren (was als „Priming“ bezeichnet wird) (Murphy, 2016). DCs stellen somit eine Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar. Für ein Verständnis der Polarisierung der Immunantwort ist die Beantwortung folgender Fragen entscheidend:

- (1) Wie erhalten DCs Informationen über die Art des Pathogens?
- (2) Wie werden diese Informationen an naive T-Zellen vermittelt?
- (3) Können Pathogene die (1) und (2) zugrundeliegenden Vorgänge aktiv beeinflussen und, wenn ja, auf welche Weise?

Ad (1). DCs (und andere Zellen des Immunsystems) erkennen Pathogene über Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs), die charakteristische molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) binden. Zu den PRRs gehören Rezeptoren, die in erster Linie die Phagozytose einleiten, und andere, deren Aktivierung zu Signaltransduktion und schließlich zur Veränderung der Genexpression führt (Murphy, 2016). Zu letzteren gehören die Toll-like Rezeptoren (TLRs), von denen im Menschen zehn, in der Maus zwölf verschiedene funktionsfähige Rezeptoren mit jeweils unterschiedlichen Liganden beschrieben sind (Kawai und Akira, 2010). Neben der CCR7-Induktion kann eine Aktivierung der PRRs zur Reifung der DCs führen. Reifung bedeutet in diesem Kontext eine Zunahme der Expression von Oberflächenmolekülen, die für die nachfolgend beschriebene Antigenpräsentation und Ko-Stimulation zuständig sind. Eine

starke Reife-Induktion ist z.B. nach Bindung von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) an TLR4 zu beobachten (Murphy, 2016). LPS führt außerdem zur Produktion von IL-12 und trägt damit zur Polarisierung in Richtung Th1-Antwort bei. Die Art des Pathogens wird also anhand seiner charakteristischen PAMPs durch PRRs erkannt, deren Signaling zu einer (unterschiedlich ausgeprägten) Reifung von DCs und Produktion von Zytokinen führen kann.

Ad (2). Die Informationsübertragung von der DC auf die naive CD4⁺ T-Zelle erfolgt über eine sog. „immunologische Synapse“ (Benvenuti, 2016). Man spricht von drei Signalen, die für Aktivierung und Differenzierung benötigt werden (Kalinski et al., 1999; Kapsenberg, 2003; Murphy, 2016).

Eine T-Zelle erhält Signal 1, wenn ihr T-Zellrezeptor (TCR) das von der DC präsentierte Antigen erkennt. Das Antigen wurde zuvor von der DC phagozytiert, endosomal degradiert und schließlich, an MHC II-Moleküle gebunden (für major histocompatibility complex class II), auf die Zelloberfläche gebracht. Neben der Interaktion des TCR mit dem Antigen-MHC II-Komplex trägt auch die Bindung des Ko-Rezeptors CD4 an MHC II zur Übermittlung des Signal 1 bei. Erhält eine naive T-Zelle Signal 1, wird sie aktiviert (Murphy, 2016).

Signal 2 ermöglicht der aktivierten T-Zelle das Überleben bzw. die Proliferation. Es kommt durch Interaktion ko-stimulatorischer Oberflächenmoleküle der DC mit entsprechenden Rezeptoren auf der T-Zelle zustande. Wichtige Ko-Stimulatoren sind CD80 und CD86 (auch B7-1 und B7-2) der reifen DC, die an CD28 auf T-Zellen binden (Chen und Flies, 2013). Das führt zur vermehrten Expression von IL-2 und erhöht gleichzeitig die Sensitivität der T-Zelle für IL-2 über die Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25), die zusammen mit den konstitutiv exprimierten β - und γ -Ketten einen IL-2 Rezeptor hoher Affinität bilden. So erhält die T-Zelle ein autokrines Proliferationssignal (Murphy, 2016).

Signal 3 dient schließlich der Polarisierung/ Differenzierung der T-Zelle. Hierfür sind vor allem von DCs produzierte Zytokine von Bedeutung. Eine über LPS aktivierte DC kann also durch ihre dadurch erhöhte IL-12 Produktion die durch ihren PRR (in diesem Fall TLR4) gewonnene Information über das Pathogen an die T-Zelle weitergeben und eine

Th1-Polarisierung einleiten (Murphy, 2016). Tab. 1 zeigt weitere für die Differenzierung zu verschiedenen Subtypen essentiellen Zytokine.

Wenngleich dieses relativ einfache Modell der drei Signale nicht den Anspruch erhebt, die Komplexität des Primings von T-Helferzellen durch DCs vollständig abzubilden, bietet es doch eine gute Grundlage für die Fragestellung dieser Arbeit. Erwähnenswert ist, dass die Subtypen der T-Helferzellen nicht (mehr) als terminal differenziert betrachtet werden, sondern dass sich der Subtyp auch zu einem späteren Zeitpunkt noch ändern kann („Plastizität“). Außerdem sieht man die Subtypen nicht (mehr) als starre Kategorien an, sondern findet zunehmend Eigenschaften verschiedener Subtypen in ein und derselben Zelle („Heterogenität“) (O’Shea und Paul, 2010; Zhu, 2017).

Auch was die für Wurminfektionen charakteristische Th2-Polarisierung betrifft, muss das Modell erweitert werden. Über die Rolle von PRRs für die Erkennung von Helminthen ist nämlich – im Vergleich zur Erkennung gram-negativer Bakterien (LPS:TLR4→IL-12) – viel weniger bekannt. Für die Einleitung einer Th2-Antwort sind nicht nur direkte Effekte des Wurms auf DCs von Bedeutung. Die Parasiten werden auch von PRRs auf anderen Zellen erkannt oder rufen über den verursachten Gewebeschaden eine Freisetzung von Alarmsignalen (DAMPs für damage-associated molecular pattern) und Zytokinen hervor, was einen indirekten Effekt auf DCs haben kann. So können TSLP (thymic stromal lymphopoietin), IL-25 und IL-33 aus Epithelzellen die Th2-Induktion durch DCs begünstigen (Hammad und Lambrecht, 2015; Saenz et al., 2008).

Ein eindeutiger Th2-induzierender Faktor aus DCs („Signal 3“) wurde bisher jedoch nicht identifiziert; das hierbei wichtige IL-4 wird nämlich nicht von DCs, sondern z.B. von basophilen Granulozyten produziert (ebd.). Vieles spricht dafür, dass auch die Stärke von Signal 1 sowie Stärke und Art von Signal 2 einen Einfluss auf die Differenzierung der T-Zelle haben. So sind z.B. die Dosis des Antigens (hohe Dosis → Th1, geringe Dosis → Th2) und der Reifegrad der DCs (vollreife DCs → Th1, semi-reife DCs → Th2/ Treg) von Bedeutung (Coquet et al., 2015; Lutz, 2016; O’Garra et al., 2011; van Panhuys et al., 2014).

Ad (3). Die Beeinflussung des Immunsystems ist Teil der Überlebensstrategie vieler Pathogene. Insbesondere parasitäre Würmer sind als „Meister der Immunregulation“ bekannt (Maizels et al., 2004). Auf einige Mechanismen der Immunevasion des

Fuchsbandwurms wurde bereits in Kap. 1.3 eingegangen; an dieser Stelle werden die bisher bekannten Effekte auf DCs und T-Zell-Differenzierung vorgestellt.

Tabelle 1. Subtypen von T-Helferzellen. Polarisierende Zytokine (A), Masterregulatoren (B) und wichtige Effektorzytokine (C. Modifiziert nach Murphy (2016).

	Th1	Th2	Th17	T _{FH}	iTreg
A	IFN- γ IL-12	IL-4	TGF- β IL-6 IL-23	IL-6	TGF- β IL-2
B	T-bet	GATA3	ROR γ t	Bcl-6	Foxp3
C	IFN- γ	IL-4 IL-5 IL-13	IL-17 IL-22	IL-21	TGF- β IL-10

Mejri et al. (2011a) konnten nach intraperitonealer Infektion von Mäusen mit *E. multilocularis* einen relativen Anstieg von DCs (im Verhältnis zur Gesamtzahl der peritonealen Zellen) im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen beobachten. Die Infektion hatte auch einen Einfluss auf Eigenschaften dieser peritonealen DCs: es kam zu einem Anstieg der mRNA-Level für TGF- β und einer Reduktion der Oberflächenmarker CD80, CD86 und MHC II. Aufseiten der T-Zellen wurde ein Anstieg der Expression von Foxp3 und IL-4 beobachtet. Insgesamt spricht dies also für eine Th2/ Treg dominierte Immunantwort.

Hinweise auf eine aktive Immunmodulation durch *E. multilocularis* liefern Nono et al. (2012) durch die Untersuchung des Effekts von ESPs auf (BM)DCs *in vitro*. Der Einsatz des axenischen Kultivierungssystems (Spiliotis und Brehm, 2009) erlaubte hier verlässlichere Aussagen als bei der Verwendung von potentiell Wirts-kontaminierten Parasitenantigenen in früheren Untersuchungen durch Jenne et al. (2001). Es konnte gezeigt werden, dass ESPs von Primärzellen (PC) und Metazestoden (MC) Apoptose von DCs induzieren (Nono et al., 2012). Außerdem unterdrücken sie Effekte von LPS auf DCs, wie die Reifung (hier über MHC II und CD86 quantifiziert) und IL-12 Produktion. Letztere wurde insbesondere auch von ESPs der Protoscolices (Ps) inhibiert. Somit

scheinen die Larvenstadien des Fuchsbandwurms aktiv Mechanismen der klassischen Th1-Induktion zu unterdrücken. Es ist bekannt, dass die Aufnahme apoptotischer DCs durch noch lebende DCs deren Reifung unterdrücken kann und die Apoptoseinduktion somit womöglich zu den beobachteten Effekten beiträgt (Kushwah und Hu, 2010; Steinman et al., 2000).

Die außerdem für ESPs von MC gezeigte *de novo* Konversion von CD4⁺ T-Zellen zu Foxp3⁺CD25⁺ Treg-Zellen könnte indirekt über den Effekt des Parasiten auf DCs zustande kommen, allerdings schließen die Autoren auch eine direkte Beeinflussung von T-Zellen nicht aus (Nono et al., 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DCs eine zentrale Rolle in der Polarisierung von Immunantworten einnehmen und dass *E. multilocularis* die dafür relevanten Eigenschaften der DCs wie Expression von Oberflächenmolekülen und Zytokinen modulieren kann. Welche aktive(n) Komponente(n) der ESPs für die beobachteten Effekte verantwortlich ist (sind), bleibt ungeklärt. ESPs anderer Plattwürmer zeigen ähnliche immunmodulatorische Effekte und einige dafür verantwortliche Moleküle wurden bereits identifiziert. Eines davon ist eine Ribonuklease der T2-Familie und wird im Folgenden vorgestellt.

1.5 Ribonukleasen der T2-Familie und ihr Potential als Immunregulatoren am Beispiel von omega-1

Im Genom fast aller bisher sequenzierter Eukaryoten findet sich mindestens ein Gen, das für eine Ribonuklease der T2-Familie (T2-RNase) codiert. Die Proteine werden zumeist sezerniert oder finden sich in Lysosomen oder Vakuolen. Auch einige Viren und Bakterien exprimieren T2-RNasen (Deshpande und Shankar (2002), Luhtala und Parker (2010), MacIntosh (2011)). Neben einer Rolle im Nukleotid-Metabolismus („housekeeping“), z.B. durch RNA-Recycling in Autophagosomen, sind viele andere Funktionen für Vertreter dieser Proteinfamilie beschrieben. Diese reichen von der Selbstinkompatibilität bei der Bestäubung von Pflanzen bis zu tumorsuppressiven Eigenschaften beim Menschen, wobei nicht alle davon von der katalytischen Aktivität der Proteine abhängen (Acquati et al., 2011; Huang et al., 1994; Irie und Ohgi, 2001;

McCubbin et al., 1997). Was Pathogen-Wirts-Interaktionen betrifft, werden T2-RNasen sowohl vom Wirt zur Abwehr als auch vom Pathogen zur Immunevasion eingesetzt (Bruschke et al., 1997; Galiana et al., 1997).

Bei Helminthen ist omega-1 die bisher am besten charakterisierte T2-RNase. Sie wurde zuerst durch Dunne et al. (1981) als Antigen des Pärchenegels *Schistosoma mansoni* beschrieben und mit dem bei Infektion T-Zell-defizienter Mäuse beobachteten Leberschaden in Verbindung gebracht. Erst viel später erlaubte die molekulare Charakterisierung dieses Antigens eine Zuordnung zur Familie der T2-RNasen. Außerdem wurde gezeigt, dass omega-1 katalytische Aktivität besitzt und ausschließlich von Eiern, nicht von adulten Schistosomen oder anderen Stadien, exprimiert wird (Fitzsimmons et al., 2005). Schließlich wurde omega-1 von zwei unabhängigen Gruppen als wesentlicher Th2-polarisierender Faktor von Schistosomeneiern beschrieben. Hinweise auf einen Th2-polarisierenden Effekt ergaben sich für natürliches, von löslichen Ei-Antigenen (SEA) aufgereinigtes, und auch für rekombinant hergestelltes omega-1 – sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Zudem reduzierte die Depletion von omega-1 in SEA dessen Th2-polarisierende Aktivität deutlich (Everts et al., 2009; Steinfeldt et al., 2009). Gemessen wurde die Th2-Polarisierung u.a. über den Effekt des Proteins auf die (LPS-induzierte) Expression von Oberflächenmarkern und Zytokinen durch DCs, wobei omega-1 exponierte DCs im Vergleich zu Kontrollen z.B. eine geringere Expression von IL-12, CD40 und CD86 aufwiesen (s. Tab. 2). Außerdem kamen Polarisationsassays mit Ko-Kultur von DCs und CD4⁺ T-Zellen zum Einsatz.

Die beiden Veröffentlichungen lieferten auch erste Hinweise auf den Wirkmechanismus der Th2-Polarisierung von omega-1. So führte die Inhibition der RNase-Aktivität zum Funktionsverlust, wogegen Effekte von omega-1 unabhängig waren von TLR-Signaling über MyD88/TRIF und vom IL-4-Rezeptor α (Everts et al., 2009; Steinfeldt et al., 2009). Steinfeldt et al. (2009) brachten außerdem die von ihnen beobachteten Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts dendritischer Zellen durch omega-1 mit einer reduzierten Konjugatbildung zwischen DCs und T-Zellen in Verbindung, wodurch omega-1 die Th2-favorisierenden Bedingungen einer niedrigen Antigenosis (s. Kap. 1.4) vortäuschen könne. Everts et al. (2012) konnten zeigen, dass omega-1 von DCs aufgenommen wird und dass dafür die Glykosylierung des Proteins und der Mannoserezeptor der DCs nötig sind. In der DC führt omega-1 dann zu einer unspezifischen Degradierung von mRNA

und rRNA und hemmt dadurch die Proteinexpression, mit entsprechenden Auswirkungen auf das Zytoskelett und die Expression von IL-12, ko-stimulatorischen Molekülen u.a.. Zielgerichtete Mutagenese einer katalytisch aktiven Region hebt diesen Effekt auf, was die Hypothese einer über die unspezifische Hemmung der Proteinexpression dendritischer Zellen erreichte Th-2 Polarisierung unterstützt (Everts et al., 2012).

Neben dieser unspezifischen Hemmung scheint omega-1 die Expression einiger Proteine dagegen über einen unbekanntem Mechanismus zu erhöhen: Die ebenfalls beobachtete Treg-Induktion durch omega-1 wird nämlich über einen Anstieg der Expression von TGF- β und Retinaldehyddehydrogenase 2 in DCs erklärt, wodurch CD4⁺ T-Zellen als Folge der Exposition mit TGF- β und Retinsäure vermehrt Foxp3 exprimieren (Zaccone et al., 2011).

In den letzten Jahren wurden auch Effekte von omega-1 auf andere Zelltypen beschrieben. So steigert die RNase die Sekretion von IL-1 β durch Makrophagen nach Stimulation mit einem TLR2-Liganden auf eine vom PRR Dectin-1 abhängige Weise (Ferguson et al., 2015). Außerdem wurde eine Freisetzung von IL-33 durch Adipozyten nach Exposition mit omega-1 beobachtet. Dies war abhängig von der katalytischen Aktivität der RNase und wurde, zumindest teilweise, auf einen zytotoxischen Effekt auf Adipozyten zurückgeführt (Hams et al., 2016).

Das Beispiel von omega-1 zeigt also, dass T2-RNasen potente Induktoren der für Helminthen charakteristischen Th2/Treg-Immunantwort sein können. Darüber hinaus ist omega-1 für seine hepatotoxischen Eigenschaften bekannt, auf die im Folgenden eingegangen wird.

1.6 Pathologie der Leber bei alveolärer Echinokokkose und Schistosomiasis

Wie bei der AE (s. Kap 1.2) tragen pathologische Veränderungen der Leber auch bei der chronischen Schistosomiasis wesentlich zum klinischen Bild bei. Nach Penetration der Haut durch Cercarien gelangt *S. mansoni* ins venöse System, siedelt sich als adulter Pärchenegel in den Mesenterialvenen an und produziert dort Eier. Einigen davon gelingt die Passage von den Venolen ins intestinale Lumen; nach der Ausscheidung können sie ins Wasser gelangen und Miracidien freisetzen, die Wasserschnecken (Zwischenwirte)

befallen und damit den Lebenszyklus schließen. Viele Eier verbleiben jedoch im Gewebe oder werden mit dem Blut in die Leber geschwemmt, wo sie eine granulomatöse Entzündungsreaktion hervorrufen. Bei chronischer Infektion kann es zu Leberfibrose und portaler Hypertension kommen, ähnlich wie bei der AE (Colley et al., 2014; Davidson et al., 2014).

Zur Entwicklung dieser Fibrose trägt die Th2-domierte Immunantwort bei (Kaplan et al., 1998; Loke et al., 2007). Das von den Eiern produzierte omega-1 scheint jedoch nicht nur über seine Immunmodulation, sondern auch über eine direkte Schädigung an der Leberpathologie beteiligt zu sein: Die von Dunne et al. (1981) postulierte Hepatotoxizität der RNase wurde inzwischen *in vitro* an primären Maushepatozyten bestätigt (Abdulla et al., 2011). Intravenöse Injektion von Eiern nach Knockdown von omega-1 führte zu einer Verringerung der Granulomgrößen im Vergleich zum Wildtyp, allerdings experimentell bedingt in den Lungen der untersuchten Mäuse (Hagen et al., 2014). Die Autoren gehen davon aus, dass dem durch omega-1 verursachten Gewebeschaden eine zentrale Rolle bei der Granulombildung zukommt, wobei Gewebeschäden, wie bereits in Kap 1.4 erwähnt, zur Th2-Polarisierung beitragen können. (Th2-bedingte) Granulome und Fibrose haben zwar schädliche Langzeitfolgen, schützen den Wirt aber auch vor Toxinen des Parasiten, weshalb die über eine T-regulatorische Komponente im Zaum gehaltene Th2-Antwort als bester Kompromiss für die Ko-Existenz von Wirt und Parasit angesehen wird (Everts et al., 2010; Hams et al., 2013).

Das Mausmodell der AE liefert ebenfalls Hinweise darauf, dass fibrotische Prozesse den Wirt schützen können (Guerret et al., 1998). Es wird vermutet, dass der Parasit aktiv zur Fibrosierung durch Quervernetzung von Kollagen beiträgt (Grenard et al., 2001; Guerret et al., 1998). Einblicke in die Wirkung von Fuchsbandwurmlarven auf das sie umgebende Gewebe lieferten Untersuchungen über die Expression Zellzyklus-assoziiierter Proteine in der Leber infizierter Mäuse (Lin et al., 2011; Zhang et al., 2012). Es wurden verschiedene Zeitpunkte nach Infektion verglichen und dahingehend interpretiert, dass *E. multilocularis* anfangs einen wachstumsfördernden, im weiteren Verlauf jedoch einen wachstumshemmenden und Apoptose-induzierenden Effekt auf Hepatozyten hat (Zhang et al., 2012). *In vitro* zeigte sich jedoch kein toxischer Effekt von ESPs oder Hydatidenflüssigkeit auf Kulturen primärer Rattenhepatozyten (Lin et al., 2009). Es bleibt daher unklar, ob *E. multilocularis* hepatotoxische Substanzen sezerniert (und, wenn

ja, welche). Angesichts der vor allem die Leber betreffenden schwerwiegenden Komplikationen der AE (Kap 1.2) könnte ein besseres Verständnis der Auswirkungen von *E. multilocularis* und seinen ESPs auf die Wirtsleber neue therapeutische Optionen eröffnen.

1.7 Ziele dieser Arbeit

In Kap. 1.2-1.6 wurde dargelegt, wie Larven des Fuchsbandwurms und Eier von *S. mansoni* Wirtszellen beeinflussen können. In vielerlei Hinsicht sind sich die Effekte der ESPs der beiden Plattwürmer sehr ähnlich. So wird beiden eine entscheidende Rolle bei der Polarisierung der Immunantwort in Richtung Th2/Treg zugeschrieben (Nono et al., 2012; Pearce et al., 2004). Tab. 2 verdeutlicht die Ähnlichkeit der Wirkungen der ESPs von *S. mansoni* und *E. multilocularis* auf DCs. T-Helferzellen werden ebenfalls auf ähnliche Weise (und wahrscheinlich DC-vermittelt) beeinflusst (z.B. Foxp3-Induktion) (Nono et al., 2012; Zaccone et al., 2011). Als wesentlicher immunmodulatorischer Faktor von *S. mansoni* wurde omega-1 identifiziert – bei *E. multilocularis* ist jedoch weiterhin unklar, welche Substanzen für die Th2-Polarisierung verantwortlich sind. Es stellt sich also die Frage, ob Immunmodulation über eine T2-RNase ein *S. mansoni*-spezifischer oder auf andere Helminthen übertragbarer Mechanismus ist (Everts et al., 2012). T2-RNasen von *S. japonicum* und *Clonorchis sinensis* wurden bereits dahingehend untersucht (Ke et al., 2017; Wang et al., 2016a; Xu et al., 2013; Xu et al., 2015). Auch im Fuchsbandwurmgenom konnte ein für eine T2-RNase codierendes Gen identifiziert werden und wurde bereits als möglicher Immunmodulator diskutiert (Nono, 2012; Olson et al., 2012).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung der T2-RNase des Fuchsbandwurms (EmRNASET2), insbesondere hinsichtlich ihres immunmodulatorischen Potentials. Dabei ergaben sich folgende konkrete Fragestellungen:

1. Welche Larvenstadien exprimieren EmRNASET2?
2. Wird EmRNASET2 sezerniert und lässt es sich in ESPs nachweisen?
3. Kommt es bei Patienten mit AE zur Bildung (diagnostisch nutzbarer) Antikörper gegen EmRNASET2?

4. Hat EmRNASET2 immunmodulatorische Effekte (auf DCs)?
5. Besitzt EmRNASET2 katalytische Aktivität?
6. Ist EmRNASET2 hepatotoxisch?
7. Welche Aussagen über die biologische Funktion von EmRNASET2 lassen sich anhand seiner Proteinsequenz im Vergleich zu omega-1 und anderen T2-RNasen treffen?

Tabelle 2. Effekte von Parasitenprodukten auf dendritische Zellen. Vergleich der Wirkung von omega-1 aus *S. mansoni* (allein oder als Bestandteil der löslichen Ei-Antigene, SEA) mit E/S-Produkten von *E. multilocularis* (PC: Primärzellen, MC: Metazestoden, PS: Protoscolices). Gezeigt ist der Effekt auf die LPS-induzierte (*) Reifung und IL-12 Produktion, sowie die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion (ohne LPS) *in vitro*.

	Apoptoseinduktion	MHCII, CD86 *	IL-12p70 *
Sm-omega-1/ SEA	✗	↓	↓
Em-PC	✓	↓	↓
Em-MC	✓	↓	↓
Em-PS	✗	↑	↓

2 Material und Methoden

2.1 Material

Geräte

Abzugshaube MSC-Advantage 1.2 (Thermo Scientific, Wilmington, USA)

Abzugshaube NU-437-400E / Series 3 (NuAire, Plymouth, USA)

Agitation Incubator G25 (New Brunswick Scientific, Edison, USA)

Analysenwaage (Sartorius, Göttingen, DEU)

BD LSR II Flow Cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)

ChemiDoc MP imaging system (BioRad, Hercules, USA)

ELISA Reader Multiskan EX (Thermo Scientific, Wilmington, USA)

FastPrep®-24 Homogenisator (MP Biomedicals, Santa Ana, USA)

G24 shaking incubator (New Brunswick Scientific, Edison, USA)

Gelkammer (Biometra, Goettingen, DEU)

Heizblock (Liebisch, Bielefeld, DEU)

Heizblock: DB-3 (Techne, Cambridge, GBR)

Inkubator: Heraeus (Thermo Electron, Langenselbold, DEU)

Mikro 200 Tischzentrifuge (Hettich, Tuttlingen, DEU)

Mini Trans-Blot Cells (BioRad, Hercules, USA)

Mini-Protean Separation Chambers (BioRad, Hercules, USA)

NanoDrop 1000 (PeqLab Biotechnologie, Erlangen, DEU)

Power Pack P25 (Biometra, Goettingen, DEU)

Reax 2000 vortex mixer (Heidolph, Schwabach, DEU)

Refrigerated Centrifuge 3K30 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Rotanta 460R Zentrifuge (Hettich Zentrifugen GmbH, Tuttlingen, DEU)

Schikanekolben, 2 L

Sonifier®II Desintegrator Modell 250 (Branson, Danburg, USA)

SpeedVac Plus SC 110A Savant (Thermo Scientific, Wilmington, USA)

Tecan ELISA Eader (Tecan Group, Männedorf, CHE)

T-Gradient Thermocycler (Biometra, Goettingen, DEU)

TH30 shaking incubator (Hartensein, Wuerzburg, DEU)

Trio-Thermoblock (Biometra, Goettingen, DEU)

Verbrauchsmaterial

6-Well-Platten für Zellkultur (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

96-Well-Platten für Zellkultur (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Dialyseschlauch aus regenerierter Zellulose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEU)

Greiner centrifuge tubes, 15 und 50 ml (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Nitrozellulosemembran (Thermo Scientific, Wilmington, USA)

PD-10-Säule (GE Healthcare, Fairfield, USA)

Petrischale für Zellkultur, 10 cm Durchmesser (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Spritzenfilter: 0.2 µm Syringe Filters (Sarstedt, Nümbrecht, DEU)

Vivaspin 20 Centrifugal Concentrators (Sartorius, Göttingen, DEU)

Whatman Papier (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Zellkulturflaschen (Thermo Scientific, Wilmington, USA)

Kommerzielle Kits, Reagenzien und Enzyme

BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, USA)

Broad Range ColorPlus Prestained Protein Ladder (New England Biolabs, Ipswich, USA)

Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, Basel, CHE)

KOD-DNA-Polymerase (Toyobo, Osaka, JPN)

Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* 0127:B8 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Lysozym (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Midori Green (Nippon Genetics Europe, Düren, DEU)

Mouse IL-12 p70 ELISA Ready-SET-Go!® (eBioscience, San Diego, USA)

NucleoBond PC100-Kit (Macherey-Nagel, Düren, DEU)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, DEU)

NucleoSpin®-Plasmid-Kit (Macherey-Nagel, Düren, DEU)

pBAD/Thio-TOPO Cloning Kit (Invitrogen, Groningen, NLD)

Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Wilmington, USA)

PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa Bio Inc., Otsu, JPN)

ProBond Purification System (Life Technologies, Carlsbad, USA)

Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Basel, CHE)

Protein G Agarose Beads (Thermo Scientific, Wilmington, USA)

Ribonucleic acid from *torula* yeast, Type VI (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

RNase-ExitusPlus (AppliChem, Darmstadt, DEU)

SDS, pure (AppliChem, Darmstadt, DEU)

SDS, ultrapure (AppliChem, Darmstadt, DEU)

SmartLadder (Eurogentec, Liège, BEL)

Taq-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA)

TRIzol® Reagent (Invitrogen, Groningen, NLD)

Weitere Chemikalien und Oligonukleotide

Chloroform

Triton X-100

Isopropanol

Ethanol, 75%

Wasser, RNase-frei

Wasser, doppelt destilliert und autoklaviert

Tabelle 3: Verwendete Primer. Restriktionsstellen sind unterstrichen. * bereitgestellt von Dr. Justin Nono. [Phos] 5' Phosphorylierung; einigen Primern sind Zahlen der Übersicht (Abb. 2) zugeordnet.

Nr.	Name	Sequenz von 5' nach 3'
1	EmOMG1_DW *	ATGCTTATTTTTGGCTTTGTTTTTC
2	F primer omg1 w/o signal BamHI	GGCAGGATCCGCTATATTGATGTGAACAATCAAACG
3	F primer omg1 w/o signalp	TATATTGATGTGAACAATCAAACGACA
	BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG
4	F OMG-1 AscI	TAGTGGCGCGCCTATATTGATGTGAACAATCAAACGA
5	CAS-1 mutant primer Rv	AATGTTAAACCCGTTAACGACGCGAGG
6	CAS-1 mutant primer Fw	[Phos]TTCGGCCTGTGGGCGCAACT
7	CAS-2 mutant Rv	[Phos]CCATTCAAAGTTCCAAAACCTCCAGGGATGTTG
8	CAS-2 mutant Fw	[Phos]ACAAAATTCGGCATCTGTGTCATTTGGAAAAAC
	Em-1015	AATAAGGTCAGGGTGACTAC
	Em-1016	TTGCTGGTAATCAGTCGATC
9	R primer omg1 w/o stopc EcoRI	GTCAGAAATTCGAGGGAGACGAAAAAGACGTT
10	Rprimeromg1w/o stopcodon	GAGGGAGACGAAAAAGACGTT

11	R no stop OMG-1	GCTGCTCGAGTGAGGGAGACGAAAAAGACGTTG
	XhoI	
12	R OMG-1 XhoI	GCTGCTCGAGTTAGAGGGAGACGAAAAAGACGTTG
13	EmOMG1_UP *	TTAGAGGGAGACGAAAAAGACGTTG
	pBAD forward	ATGCCATAGCATTTTTATCC
	pGEX dw primer	GGCAAGCCACGTTTGGTG
	T7 primer fw	TAATACGACTCACTATAGGG

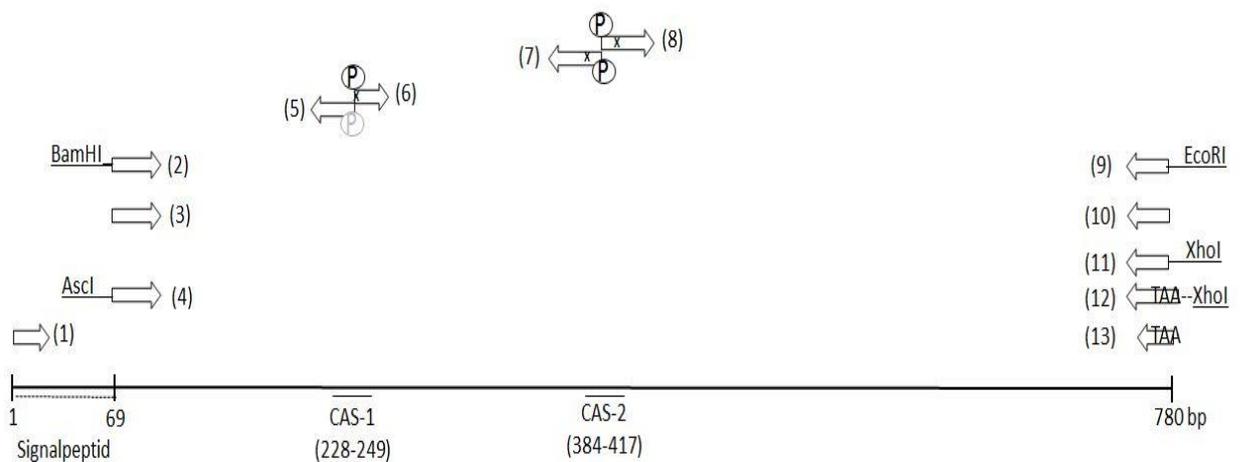


Abbildung 2: *emRNASET2* cDNA-Sequenz mit Übersicht über verwendete Primer. Nummerierung siehe Tab. 3. Basenpaare (bp).

2.2 Software, bioinformatische online-Tools und Datenbanken

BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 7.2.5

Cluster Database at High Identity with Tolerance, cd-hit (http://weizhong-lab.ucsd.edu/cdhit_suite/cgi-bin/index.cgi) (Huang et al., 2010; Li et al., 2001)

Compute pI/Mw tool, ExPASy Server (https://web.expasy.org/compute_pi/) (Bjellqvist et al., 1993)

FlowJo (FlowJo LCC, Ashland, USA)

GeneDB (<http://www.genedb.org>)

GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism Software, La Jolla, USA)

Immune Epitope Database and Analysis Resource, IEDB

(<http://tools.immuneepitope.org/bcell>)

MEGA, Version 7 (Tamura et al., 2011).

Microsoft Excel 2013

National Center for Biotechnology Information, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

NEBcutter, Version 2.0 (<http://www.labtools.us/nebcutter-v2-0/>) (New England Biolabs)

NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)

OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) (IntegratedDNATechnologies)

SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) (Bendtsen et al., 2004; Nielsen et al., 1997)

Simple Modular Architecture Research Tool, SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Letunic und Bork, 2017; Schultz et al., 1998)

WormBase (<http://www.wormbase.org>)

2.3 Arbeiten mit RNA

Zur Vermeidung einer Kontamination mit RNasen wurden Arbeitsoberflächen mit RNase-ExitusPlus behandelt und RNase-freie Reagenzien und Materialien verwendet.

RNA-Isolierung. TRIzol Reagenz von Invitrogen wurde zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Larvenmaterial von *E. multilocularis* verwendet. Dabei wurden Protoscolices im Glashomogenisator, Metazestoden und Primärzellen durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert; das weitere Vorgehen entsprach den Angaben des Herstellers.

Agarose-Gelelektrophorese. Zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen wurde die Laufkammer vor Gebrauch gründlich gewaschen und 20 min in 3% H₂O₂ eingelegt. Das weitere Prozedere entspricht der Agarose-Gelelektrophorese für DNA (siehe dort).

cDNA-Synthese. Der Einsatz des PrimeScrip RT-PCR Kits von TaKaRa ermöglichte die Herstellung einzelsträngiger cDNA. Die Synthese des zweiten Strangs mit Amplifikation

der DNA erfolgte in einer anschließenden PCR mit Taq-Polymerase und spezifischen Primern.

2.4 Arbeiten mit DNA

2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten über Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde entweder Taq-Polymerase (New England Biolabs) oder KOD-DNA-Polymerase (Toyobo) eingesetzt, wobei letztere eine Korrekturlese-Funktion besitzt. Sequenz-spezifische Oligonukleotide wurden bei Sigma-Aldrich bestellt. Zur Berechnung der Annealing-Temperatur der Primer wurde von der mit OligoAnalyzer 3.1 kalkulierten Schmelztemperatur 5 °C subtrahiert. Für die Taq-Polymerase wurde von einer Elongationszeit von 1 min pro 1000 Nukleotiden ausgegangen. Der Reaktionsmix bestand aus 2 µL 10x-Puffer, 0,2 µL dNTPs, jeweils 0,2 µL Forward- und Reverse-Primer (50 µM), 0,2 µL Polymerase, 1 µL Template und doppelt destilliertem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 µL. Im Thermocycler erfolgte eine initiale Denaturierung bei 95 °C, gefolgt von 30 Zyklen aus Denaturierung (94°, 30 s), Annealing (30 s), und Elongation (72 °C, 1 min/ 1000 nt) mit einer finalen Elongationszeit von 10 min. KOD-PCRs wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.2 Kolonie-PCR

Mit 10 µL-Pipettenspitzen wurden mindestens zehn Klone von der Agarplatte gepickt, wobei die entsprechenden Kolonien markiert und nummeriert wurden. Die Pipettenspitzen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit jeweils 30 µL Wasser gesteckt und auf einem Plattformschüttler agitiert. 3 µL dieser Suspension dienten als Template für die darauffolgende PCR mit Taq-Polymerase (s.o.).

2.4.3 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Mutagenese von katalytisch aktiven Regionen von EmRNASET2 wurden Primer mit dem gewünschten Basenaustausch und einer 5'-Phosphorylierung bei Sigma-Aldrich

bestellt. Anschließend wurde eine PCR mit KOD-DNA-Polymerase und 10 ng Plasmid-DNA, in die EmRNASET2-cDNA kloniert worden war (s. Kap. 2.4.11), durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht ausgeschnitten, aufgereinigt (s. Kap. 2.4.5) und in 30 µL Wasser eluiert. Schließlich wurde das Produkt mit T4-Ligase zu einem zirkulären Plasmid ligiert und in *E. coli* transformiert. Kolonie-PCR, Plasmidisolierung und Sequenzierung erfolgten wie in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Durch Erhitzen wurde die zur Herstellung 1%-iger Agarosegele benötigte Menge Agarosepulver in Tris-Acetat-EDTA (TAE) -Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.11 % Essigsäure ad 1 L dH₂O, pH 8.5) gelöst, Stammlösungen wurden bei 60 °C aufbewahrt. Die Gele wurden in eine horizontale Gelkammer mit entsprechendem Kamm gegossen. Nach Erkalten des Gels wurden die DNA-Proben mit 6x Ladepuffer (0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol, 40% Saccharose, 30% Glycerol) gemischt und geladen. SmartLadder (Eurogentec) diente als Längenmarker. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 20- 40 min, je nach benötigter Auflösung. Die 10-minütige Inkubation im Ethidiumbromidbad oder die Zugabe von Midori-Green zur Probe vor dem Laden (1 µL pro 10 µL Probe) erlaubte die Detektion der Nukleinsäurebanden im Gel.

2.4.5 DNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen, PCR-Reaktionsmischungen oder nach Restriktionsverdau wurde das NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

2.4.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem NucleoSpin[®]-Plasmid (Miniprep) oder NucleoBond PC100-Kit (Midiprep; beide Macherey-Nagel) nach Protokoll des Herstellers.

2.4.7 Bestimmung von DNA-Konzentration und Reinheit

NanoDrop1000 (PeqLab Biotechnologie) wurde zur photometrischen Messung der DNA- (und RNA-) Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm eingesetzt. Das Verhältnis der Absorption verschiedener Wellenlängen diente als Anhaltspunkt für den Grad von Verunreinigungen. Dabei kann z.B. ein Quotient der Wellenlängen $260\text{nm}/280\text{nm} < 1,8$ auf eine Verunreinigung mit Proteinen, ein $260\text{nm}/230\text{nm}$ -Quotient $< 2,0$ auf Kontamination mit Phenol oder anderen Reagenzien ähnlicher Absorption hinweisen.

2.4.8 Restriktionsverdau

Die Restriktionsenzyme AscI und XhoI sowie BamHI HF und EcoRI HF von New England Biolabs wurden zum Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten und Plasmiden in einem Reaktionsvolumen von 50 μL eingesetzt. Dabei wurden die Herstellervorgaben befolgt. Ein Doppelverdau mit zwei Enzymen im selben Puffer war durch die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme möglich.

2.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten

T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) wurde zur Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmiden bei 16 °C für 30 min (oder über Nacht) verwendet. Es wurde 1 μL des Vektors/Plasmids eingesetzt und die Masse des Vektors nach Bestimmung der Konzentration über NanoDrop1000 berechnet. Nun wurde die einzusetzende Masse des Inserts nach folgender Formel bestimmt: $m(\text{Insert}) = 5 * m(\text{Vektor}) * (\text{Länge}(\text{Insert}) [\text{bp}] / \text{Länge}(\text{Vektor}) [\text{bp}])$. Nach Zugabe des entsprechenden Insert-Volumens und 2 μL 10x Puffer sowie 1 μL T4-Ligase wurde Wasser bis zu einem Reaktionsvolumen von 20 μL hinzugegeben.

2.4.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von GATC Biotech (Konstanz) nach den Vorgaben des Unternehmens durchgeführt.

2.4.11 Klonierungen

Die zu klonierende Gensequenz wurde über KOD-PCR amplifiziert. Ein Teil des PCR-Produktes wurde im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zeigte sich eine einzige Bande der gewünschten Größe, wurde die nachfolgende DNA-Aufreinigung direkt aus dem PCR-Produkt durchgeführt, bei mehreren Banden wurde das gesamte PCR-Produkt im Agarosegel aufgetrennt, die gewünschte Bande ausgeschnitten und hieraus die DNA aufgereinigt. Falls nötig, wurde nun, nach Kontrolle von Konzentration und Reinheit über nanodrop, der Restriktionsverdau mit anschließender DNA-Aufreinigung durchgeführt. Danach wurden Insert und Vektor-DNA ligiert, in *E. coli* Top10 transformiert und über Nacht auf einer Agarplatte inkubiert (Kap. 2.7.3). Am nächsten Tag wurden Kolonie-PCRs durchgeführt und die Klone auf neue Agarplatten transferiert, über Nacht inkubiert und zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Ergab die Kolonie-PCR im Agarosegel Banden der erwarteten Größe (Vektor + Insert), wurden etwa zwei Klone zur Plasmidisolierung am Folgetag (Miniprep) in 2 ml LB-Amp (Kap. 2.7.2) inkubiert. Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmide wurden über nanodrop bestimmt, bevor über Sequenzierung die Abwesenheit von Mutationen und die korrekte Insertion überprüft wurde. Über eine Plasmidisolierung im größeren Maßstab (Midiprep) wurde anschließend erneut Plasmid-DNA des gewünschten Klons gewonnen, die Konzentration mit nanodrop bestimmt und schließlich mit ddH₂O auf eine Endkonzentration von 1 µg/µL eingestellt.

Plasmidvektoren:

pJET1.2/blunt (Fermentas). Als Ausgangspunkt für weitere Klonierungen wurde das Amplikon der KOD-PCR mit EmRNASET2-spezifischen Primern in pJET kloniert (blunt end).

pSecTag2/Hygro A (Invitrogen) diente als Vektor für die Expression von EmRNASET2 in HEK-293T Zellen. Die Expression liegt unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven humanen Cytomegalievirus-Promotors (P_{CMV}, s. Abb. 3). Am N-Terminus fungiert die murine Ig κ-Leichtketten Leader-Sequenz als Signalpeptid für die Sekretion, am C-Terminus ermöglicht das *c-myc*-Epitop die Detektion des rekombinanten Proteins mit entsprechenden Antikörpern (Abb. 3). Zur Vervielfältigung des Inserts wurden Primer verwendet, die Restriktionsstellen für AscI bzw. XhoI trugen, sodass eine *in-frame*

Ligation in die multiple Klonierungsstelle des Vektors durchgeführt werden konnte. Primer der T7- und BGH- Stellen des Plasmids wurden neben *emRNASET2*-spezifischen Primern für die Sequenzierung eingesetzt.

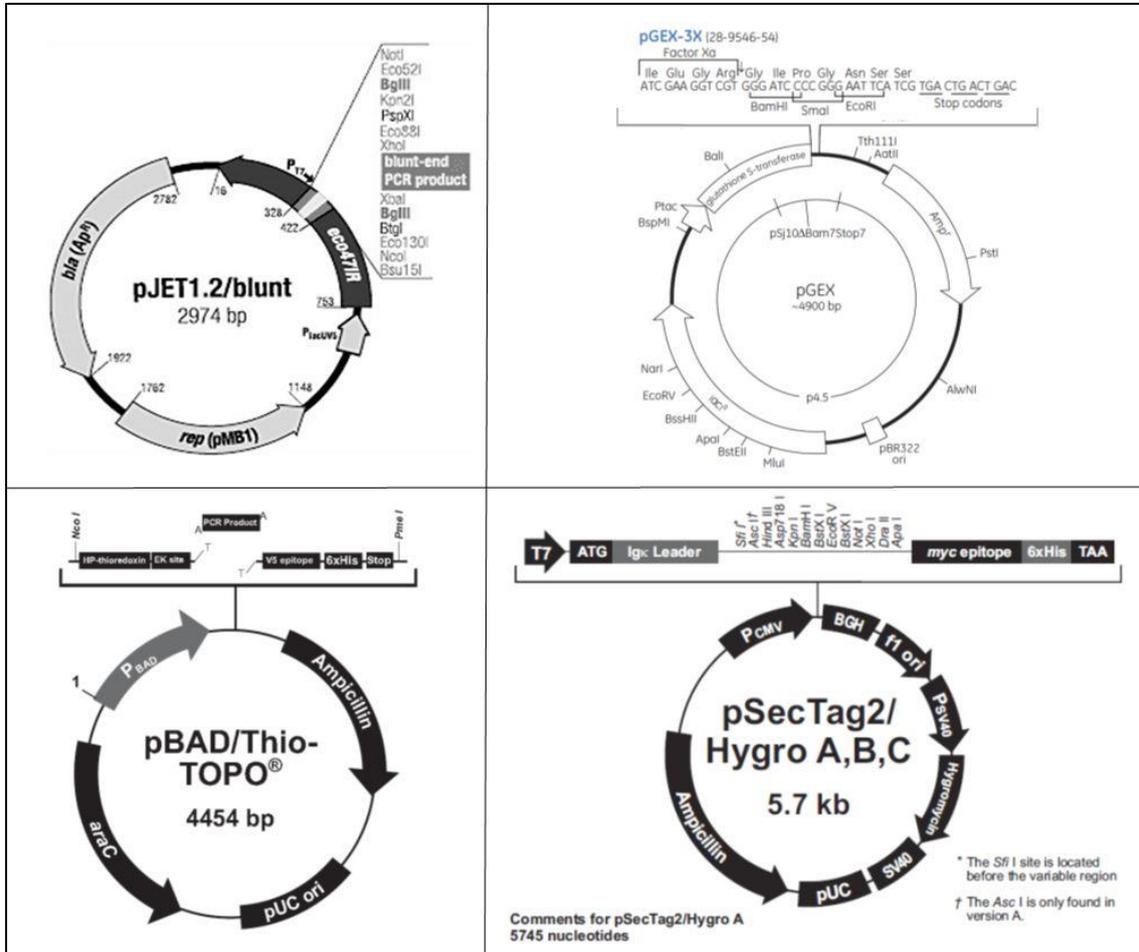


Abbildung 3. Eingesetzte Plasmidvektoren. pJET1.2/blunt (Fermentas), pGEX-3X (GE Healthcare), pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen), pSecTag2/Hygro A (Invitrogen). Vektorkarten der Hersteller.

pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen) wurde zur Expression von *EmRNASET2* in Bakterien verwendet. Die Insertion der *emRNASET2*-Sequenz erfolgte über TOPO-TA-Klonierung: Der Vektor trägt hierbei einen 3'-Desoxythymidin (T)-, das Insert einen 3'-Desoxyadenosin (A)-Überhang, wobei der A-Überhang durch eine im Anschluss an die KOD-PCR durchgeführte Reaktion mit *Taq*-Polymerase (30 min, 70 °C) hinzugefügt wurde. Die Ligation wird durch die an den Vektor gebundene und durch die Reaktion freigesetzte Topoisomerase I katalysiert. Sequenziert wurde mit pBAD forward (Tab. 3) und *emRNASET2*-spezifischen Primern.

pGEX-3X (GE Healthcare) diente ebenfalls zur Produktion von EmRNASET2 in Bakterien. Die Insertion in die multiple Klonierungsstelle des Vektors erfolgte hier über die BamHI und EcoRI Schnittstellen, nachdem die *emRNASET2*-Sequenz durch entsprechende Primer in einer PCR vervielfältigt und mit den passenden Restriktionsstellen flankiert worden war. pGEX dw primer und *emRNASET2*-spezifische Primer wurden zur Sequenzierung verwendet (Tab. 3).

2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.5.1 Proteinaufreinigung

Löslichkeitsprüfung. Um zu ermitteln, ob das in Bakterien produzierte rekombinante Protein (s. Kap. 2.7.4) unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden kann, wurde das Pellet von 25 ml Bakterienkultur in 1 ml Lysepuffer (300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄ pH 8, 10 mM Imidazol; aus dem Labor-internen Protokoll zur Aufreinigung von Proteinen unter nativen Bedingungen) resuspendiert und mit einer Spatelspitze Lysozym 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschall lysiert (Sonifier®II, Branson: 4x 30 s) und für 15 min bei 30 °C mit RNase und DNase (jew. 5 µg/ml) behandelt. Schließlich wurde 15 min bei 12000 g, 4 °C zentrifugiert. Die Einschätzung der Löslichkeit gelang durch einen Vergleich der Bandenstärke von Pellet und Überstand nach SDS-PAGE und Coomassiefärbung.

Alternativ wurde das Pellet von 25 ml Bakterienkultur in 1250 µL eiskaltem PBS aufgenommen, 10 min mit einer Spatelspitze Lysozym auf Eis inkubiert und anschließend mit Ultraschall behandelt (3x 30 s, 60% Intensität, auf Eis). Schließlich wurde 20 %-iges Triton X-100 bis zu einer Konzentration von 1 % hinzugegeben und die Probe 30 min bei 4 °C rotiert. Nach Entnahme eines Aliquots („Triton“) wurde die Probe zentrifugiert (10 min, 12000 g, 4°C). Pellet, Überstand und „Triton“ wurden nach SDS-PAGE und Coomassiefärbung hinsichtlich ihres Proteingehalts verglichen.

Der FastPrep®-24 (MP Biomedicals) wurde als Alternative zur Ultraschallbehandlung für die mechanische Homogenisierung eingesetzt: 45 s, Intensität 6,5.

Isolierung intakter Einschlusskörperchen. Das Protokoll für die Isolation von Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies) wurde von immunoglobulin Antikörpertechnik

GmbH bereitgestellt und basiert auf einer Veröffentlichung von Nagai und Thogersen (1987).

Puffer:

Lysepuffer:

50 mM TrisCl, pH 8,0; 0.25% (w/v) Saccharose; 1 mM EDTA (pH 8,0)

Detergenspuffer:

20 mM TrisCl, pH 7,5; 2 mM EDTA (aus pH 8,0 Stock); 200 mM NaCl; 1 % (w/v) Desoxycholsäure; 1 % (v/v) Nonidet P-40

Waschpuffer:

0,5 % Triton X-100; 1 mM EDTA (pH 8.0)

Das Pellet von 1 L Bakterienkultur wurde in 80 ml Lysepuffer (4 °C) resuspendiert und gevortext. 200 mg Lysozym in 20 ml Lysepuffer wurden hinzugegeben, auf Eis inkubiert (30 min) und anschließend 10 min auf Eis mit Ultraschall behandelt (Sonifier®II, Branson: 50 % Intensität, 50 % duty cycle). Nach Hinzugabe von 200 ml Detergenspuffer wurde das Lysat zentrifugiert (10 min, 5000 g) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 250 ml Waschpuffer und einmal in 70 % Ethanol gewaschen. Schließlich wurde das Pellet in einem kleinen Volumen PBS aufgenommen und abermals mit Ultraschall behandelt. Die Suspension wurde aliquotiert und eingefroren.

Denaturierende Proteinaufreinigung. Das mit einem Polyhistidin-Tag versehene rekombinante Protein wurde mit dem ProBond Purification System (Life Technologies) aufgereinigt. Da sich das Protokoll des Herstellers auf ein Bakterienpellet von 50 ml Kultur bezieht, wurde ein Labor-internes Protokoll, das auf ein Pellet von 1 L Bakterienkultur angepasst ist, verwendet.

Puffer:

Lysepuffer: 500 mM NaCl; 20 mM NaH₂PO₄; 6 M Guanidin-HCL, pH 7,8

Waschpuffer: 500 mM NaCl; 20 mM NaH₂PO₄; 8 M Harnstoff, pH 5,8

Elutionspuffer: 500 mM NaCl; 20 mM NaH₂PO₄; 8 M Harnstoff, pH 3,8

Imidazolpuffer: 300 mM NaCl; 50 mM NaH₂PO₄; 250 mM Imidazol, pH 8,0

Das Pellet wurde in 25 ml Lysepuffer resuspendiert. Um eine gründliche Lyse zu gewährleisten, wurde die Suspension bei Raumtemperatur 10 min lang leicht geschüttelt und anschließend mit Ultraschall behandelt (3x 5 s, hohe Intensität, auf Eis). Das Lysat wurde dann zentrifugiert (20 min, 12000 g, RT) und der Überstand in ein neues Gefäß transferiert, in dem der Zentrifugationsschritt wiederholt wurde. 2 ml ProBond Nickel-Harz wurden dreimal in Lysepuffer gewaschen und anschließend zum Überstand gegeben, der dann über Nacht bei 4 °C langsam rotiert wurde. Am nächsten Tag wurde die Suspension in eine PD-10-Säule (GE Healthcare) überführt. Nachdem sich die Nickel-Beads abgesetzt hatten, wurde die Lösung durch die Säule laufen gelassen, aufgefangen und erneut über die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule drei Mal mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Beads in Elutionspuffer resuspendiert und für 10 min inkubiert, bevor das Eluat aufgefangen wurde. Dieser Schritt wurde wiederholt, gefolgt von zwei analogen Elutionsschritten mit Imidazolpuffer und einer letzten Elution mit 1 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0. Alle Eluate sowie der Durchfluss von Binde- und Waschschrinen wurden bis zur weiteren Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

Dialyse und Quantifizierung. Die Protein-Eluate wurden gepoolt und gegen 5 L PBS bei 4 °C über Nacht dialysiert. Nach Wechsel des PBS wurde für weitere 24 h dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology) nach Protokoll des Herstellers bestimmt.

2.5.2 Proteinkonzentrierung

Vakuum-Evaporation. Zur Konzentrierung von Proteinlösungen mittels Vakuumevaporation wurde der SpeedVac Concentrator von Thermo Scientific eingesetzt.

Ultrafiltration. Vivaspin 20 Centrifugal Concentrators (Sartorius) mit einem molekularem Cut-Off von 10 kDa wurden zur Konzentrierung von HEK 293T Zellüberständen eingesetzt. Die Zentrifugation erfolgte in einer Rotanta 460R Zentrifuge mit Ausschwingrotoren (Hettich Zentrifugen GmbH) für 20 min bei 4000 g, 4 °C.

Ethanolpräzipitation. 1 ml Überstand aus Parasiten- oder HEK293T- Zellkultur wurde in 9 ml eiskaltem Ethanol (100%) verdünnt und mindestens 2 Stunden bei -80 °C aufbewahrt. Anschließend wurde die Mischung zentrifugiert (30 min, 14000 g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bei 42 °C getrocknet, in 100 µL 2xStopmix aufgenommen, 10 min auf 100 °C erhitzt und über SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Immunopräzipitation. Protein G Agarose Beads (Thermo Scientific) können IgG-Antikörper an ihrer F_c-Region binden und erlauben so die Präzipitation der entsprechenden Antigene aus Zellkulturüberständen. Neben der eigentlichen Immunopräzipitation (A) wurden zwei Kontrollen eingesetzt: Antikörper ohne Zellkulturüberstand (B) und Zellkulturüberstand ohne Antikörper (C). Am ersten Tag wurden die Antikörper an die Beads gekoppelt. Dazu wurden die Beads zunächst in 1 ml TBST (20 mM Tris HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100) gewaschen (5x, Zentrifugation dabei 1 min, 2000 rpm). In 2 ml- Eppendorfröhrchen wurden 2 µg Antikörper und 25 µL Proteaseinhibitor-Cocktail (aus Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, nach Herstellerangaben) zu 20 µL Beads gegeben und mit TBST zu einem Volumen von 550 µL aufgefüllt (A, B) oder nur Beads mit Proteaseinhibitor und TBST gemischt (C). Nach langsamer Rotation über Nacht bei 4 °C wurden die Beads am nächsten Tag herunterzentrifugiert (1 min, 2000 rpm) und 5x mit 1 ml TBST gewaschen (im 4 °C-Raum). Anschließend wurden 500 µL Zellkulturüberstand, 500 µL TBST und 25 µL Proteaseinhibitor (PI) zu den Beads gegeben: A, C) oder nur PI und 1 ml TBST (B) und abermals über Nacht unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads wieder 5x in TBST gewaschen und bis sie schließlich in einem Volumen von ca. 15 µL 1:1 in 2xStopmix aufgenommen, 10 min bei 100 °C erhitzt und über SDS-PAGE und Western Blot analysiert wurden.

Eingesetzte Antikörper: polyklonaler anti-EmRNASET2 Antikörper und anti-c-myc 9E10 (Santa Cruz)

2.5.3 SDS-PAGE

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in Mini-Protean Separation Chambers (BioRad) durchgeführt. Die Gele wurden in der Regel am selben Tag gegossen:

Arbeitslösungen:

PAA: 30 % Acrylamid / 0,8 % Bis-Acrylamide (Roth)

4 x lower Tris: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0.4 % SDS

4 x upper Tris: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0.4 % SDS

TEMED: Tetramethylethylenediamin (Merck)

APS: 16 % Ammoniumpersulfat gelöst in Wasser

12.5 % Trenngel (nur 12,5 % PAA Gele wurden für diese Arbeit verwendet),

Volumenangaben für 2 Gele:

4 ml PAA

3 ml 4 x lower Tris

5 ml H₂O

20 µL TEMED

60 µL APS

Die Polymerisierung erfolgte unter Abdeckung mit etwa 0,5 ml Isopropanol für 30 min bei Raumtemperatur. Isopropanol wurde danach entfernt und das Ladegel hinzugegossen; meist wurde ein 10er Kamm verwendet, erneute Polymerisierung für 30 min.

Ladegel:

0,75 ml PAA

1,3 ml 4 x upper Tris

3,3 ml dH₂O

20 µL TEMED

35 μ L APS

2x Stopmix Stammlösung:

144 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

114 ml Glycerol

114 ml 20 % SDS

100 ml dH₂O

20 ml 0,05 % Bromphenolblau

40 ml β -Mercaptoethanol

Die Proben wurden in 2x Stopmix aufgenommen, bei 100 °C 10 min erhitzt, kurz zentrifugiert und auf das Gel geladen. Broad Range ColorPlus Prestained Protein Ladder (NEB) diente als Längenmarker. Die Elektrophorese fand in Laufpuffer (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) 60 min bei 150 V statt. Anschließend wurde das Ladegel entfernt und das Trenngel wurde entweder für Western Blot eingesetzt oder direkt mit Coomassie-Blau gefärbt. Dazu wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung (0,25 % Coomassie R250, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure) inkubiert, entweder für eine Stunde oder über Nacht. Mit Coomassie-Entfärbelösung (45 % Methanol, 45 % H₂O, 10 % Essigsäure) wurde nun bis zum gewünschten Kontrast entfärbt.

2.5.4 Detektion von Ribonukleaseaktivität

Nach SDS-PAGE in einem RNA-haltigen Gel kann die Ribonukleaseaktivität einer Proteinprobe visualisiert werden, indem man den Enzymen die Möglichkeit zum RNA-Verdau gibt und das Gel anschließend mit Toluidinblau färbt. Ungefärbte Banden erscheinen dort, wo RNA degradiert wurde (negatives Zymogramm). Ein von Blank et al. (1982) beschriebenes Verfahren wurde an die bei dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Materialien und Reagenzien angepasst: Die Proben wurden mit Probenpuffer (2% SDS, 10% Glycerol, 0,0625 M Tris HCl, pH 6,8, eine Spur Bromphenolblau) gemischt, 2 min bei 100 °C erhitzt und dann kurz zentrifugiert. SDS-PAGE wurde wie oben beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass 15 mg *Torula* RNA pro

Trenngel mit der Wasserfraktion hinzugefügt wurden. Außerdem wurde ultrareines SDS (AppliChem) zur Herstellung von Laufpuffer, upper und lower Tris (s.o.) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in verschiedenen Puffern inkubiert, um SDS zu entfernen, enzymatische Aktivität zu ermöglichen und schließlich die RNA zu färben. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einem Volumen von 30 ml unter langsamer Agitation auf einem Plattformschüttler. Beim Wechseln der Puffer wurden Einmalhandschuhe getragen.

Inkubationsschritte (nach jedem Schritt vorsichtiges Abgießen und Hinzugeben des neuen Puffers)

SDS-Entfernung:

15 min in 0,01 M Tris HCl pH 7,4 + 25% Isopropanol

15 min in 0,01 M Tris HCl pH 7,4 + 25% Isopropanol

15 min in 0,01 M Tris HCl pH 7,4

15 min in 0,01 M Tris HCl pH 7,4

Enzymatische Reaktion:

1,5 – 2,5 h (alternativ über Nacht) in 0,1 M Tris HCl pH 7,4 bei 37°C

Färbung:

10 min in 0,01 M Tris HCl pH 7,4

10 min in 0,2 % Toluidinblau in 0,01 M Tris HCl pH 7,4

10 min in 0,01 M Tris HCl pH 7,4

20 min in 0,01 M Tris HCl pH 7,4

30 min oder weniger in 0,01 M Tris HCl pH 7,4 bis zum Erreichen des optimalen Kontrasts

2.5.5 Western Blot

Western Blots wurden bei 350 mA für 1 h in Mini Trans-Blot Cells (BioRad) durchgeführt. Whatman Papier und Schwämme flankierten Polyacrylamidgel und Nitrozellulosemembran auf beiden Seiten. Ein Kühlblock befand sich in der Transferkammer. Der Erfolg des Proteintransfers wurde über Ponceau S Färbung kontrolliert. Die Membran wurde anschließend für 60 min in 5 % Magermilch (in

1xTBST: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,1 % Tween20) geblockt, gefolgt von der Inkubation mit Primärantikörpern (Tab. 4) über Nacht (in 5 % Magermilch, 10 ml) bei 4 °C unter leichter Agitation. Am nächsten Tag wurden ungebundene Antikörper durch Waschen der Membran mit 1x TBST (3x 10 min) entfernt. Nach Inkubation mit Sekundärantikörpern (Tab. 4) bei Raumtemperatur für 60 min wurde die Membran erneut in 1x TBST gewaschen (3x 10 min). Die Detektion der Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase, HRP)-konjugierten Sekundärantikörper erfolgte mittels ECL-Reagent (Thermo Scientific) im ChemiDoc MP Imaging System (BioRad). Die Membranen wurden bei -20 °C auf Whatman Papier gelagert und gelegentlich zur Exposition mit anderen Antikörpern gestrippt. Dazu wurde die Membran in Stripping Puffer (20mM TRIS pH 6,8, 2% SDS, 0,7% Mercaptoethanol) für 3 h bei 50 °C inkubiert, gefolgt von drei Waschschritten in 1xTBST à 10 min und nachfolgendem Blocken in Magermilch.

Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper. [m]: monoklonaler Mausantikörper; [r] polyklonaler Kaninchenantikörper

Primärantikörper	Verdünnung
anti-GST (Santa Cruz Biotechnologies, USA) [m]	1:1000
anti-myc (Santa Cruz Biotechnologies, USA) [m]	1:200
anti-SmOMG1 3E11 (bereitgestellt von Dr. Schramm, Borstel) [m]	1:1000
anti-SmOMG1 24-2-3 (bereitgestellt von Dr. Schramm, Borstel) [m]	1:1000 – 1:10 000
anti-V5 (Invitrogen, NLD) [m]	1:5000
anti-EmT2 (immunoglobulin, DEU) [r]	1:100
Sekundärantikörper	
anti-human IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch, USA)	1:10 000
anti-mouse IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch, USA)	1:10 000
anti-rabbit IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch, USA)	1:5000
anti-rabbit IgG, light chain specific (Cell Signaling Technology, USA) [m]	1:2000

2.6 Gewinnung polyklonaler Antikörper durch Immunisierung eines Kaninchens

Die Immunisierung eines Kaninchens mit rekombinanter EmRNA_{SET2} und die Gewinnung polyklonaler Antikörper durch Affinitätsreinigung des Serums wurden von immunoGlobe Antikörpertechnik GmbH (Himmelstadt) durchgeführt. Nach Überprüfung der Gefriertoleranz wurden die erhaltenen Antikörper aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.7 Arbeiten mit Bakterien

2.7.1 Stämme

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen)

E. coli BL21 (Amersham Biosciences)

E. coli Origami (Novagen)

2.7.2 Medien und Zusätze

LB-Amp 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, H₂O bis 1 L, pH 7,0 *

TB-Amp 12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerol, 900 ml H₂O, 100 ml 10x TB Phosphat (0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄) *

2x YT-Amp 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, H₂O bis 1 L, pH 7,0 *

SOC 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 250 mM KCl, 10 ml 1 M MgCl₂, 20 ml 1 M Glukose, H₂O bis 1 L, pH 7,0

* + Ampicillin (100 µg/ml)

2.7.3 Transformation

Das Plasmid wurde zu 25 µL kompetenten Bakterien gegeben und 60 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 °C, 90 s), gefolgt von 2 min auf Eis, wurden 250 µL SOC hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C, 225 rpm inkubiert. Die Bakterien

wurden dann auf eine LB-Agarplatte, die 100 µg/ml Ampicillin enthielt, ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.7.4 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

pBAD/Thio-TOPO-Expressionssystem. Mit pBAD/Thio-TOPO-Vektoren können Proteine exprimiert werden, die an ihrem N-Terminus ein His-Patch-Thioredoxin (HP-Thioredoxin, 11,7 kDa) und an ihrem C-Terminus einen V5 und Polyhistidin-Tag (6xHis) tragen. HP-Thioredoxin dient zur Erhöhung der Translationseffizienz des rekombinanten Proteins und trägt möglicherweise zu einer besseren Löslichkeit bei. Unter nativen Bedingungen bindet es divalente Metallionen, was bei der Proteinaufreinigung ausgenutzt wird. Im denaturierten Zustand führt nur der poly-His-Tag zur Bindung an Metallionen. Das V5-Epitop erlaubt eine Detektion des Produkts nach Western Blot über spezifische Antikörper. Die Expression liegt unter Kontrolle des *araBAD*-Promotors, weshalb die Produktion des rekombinanten Proteins nach Hinzugabe von Arabinose zur Bakterienkultur induziert werden kann (Vektorkarte s. Abb. 3).

Der den Expressionsvektor tragende *E. coli*-Klon wurde über Nacht in einer 20 ml LB-Amp-Prä-Kultur bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese Prä-Kultur 1:50 in TB-Amp verdünnt und in zwei 2 L-Schikanekolben überführt, sodass jedes Gefäß 500 ml Medium enthielt. Bei 37 °C und 250 rpm wurde bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,5 inkubiert. Dann wurden 2 ml der Kultur entnommen, abzentrifugiert und das Pellet als nicht-induzierte Kontrolle bei -20 °C aufbewahrt. Arabinose wurde hinzugegeben, sodass die ihre Konzentration in der Kultur 0,2 % betrug. Nach 4 Stunden wurde die OD_{600} erneut gemessen und ein 2 ml Aliquot als induzierte Kontrolle pelletiert. Das Pellet der nicht-induzierten Kontrolle wurde in 100 µL 2xstop mix aufgenommen; das Volumen für die Resuspension des Pellets der induzierten Kontrolle wurde proportional zur entsprechenden OD_{600} berechnet. Die Kultur wurde zentrifugiert (20 min, 6000 g, 4 °C), der Überstand verworfen und die Pellets bei -20 °C aufbewahrt. Verschiedene Protokolle wurden zur Proteinaufreinigung eingesetzt (s. Kap. 2.5.1).

pGEX-3X-Expressionssystem. Über pGEX-3X (GE Healthcare)-Vektoren exprimierte Proteine tragen am N-Terminus die Glutathion S-Transferase (GST) von *Schistosoma*

japonicum. GST (26kDa) ermöglicht die Aufreinigung des Proteins unter nativen Bedingungen mithilfe von Glutathion, das an eine Matrix gekoppelt ist. Die Expression liegt unter der Kontrolle des *tac*-Promotors und kann durch Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG) induziert werden (Vektorkarte siehe Abb. 3). Die IPTG-Konzentration für optimale Induktion und die Wahl des Bakterienstammes und Nährmediums wurden in Pilotexperimenten bestimmt. Schließlich wurde eine 20 ml-LB-Amp-Prä-Kultur des den Expressionsvektor tragenden *E. coli* Top10 Klons über Nacht bei 37 °C, 225 rpm inkubiert und am nächsten Tag 1:50 in 2xYT-Amp-Medium verdünnt, sodass jeweils 500 ml in zwei Schikanekolben (2x 2 L) bei 37 °C, 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert werden konnten. Vor Zugabe von IPTG bis zu einer Konzentration in der Kultur von 0,1 mM wurde nun ein 2 ml Aliquot genommen, pelletiert und als nicht-induzierte Kontrolle bei -20 °C eingefroren. Nach 2 h fortgesetzter Inkubation wurde die OD₆₀₀ erneut bestimmt; ebenso wurden 2 ml Kultur als induzierte Kontrolle pelletiert. Die Bakterienkultur wurde zentrifugiert (20 min, 6000 g, 4 °C) und das Pellet bei -20 °C eingefroren. Die Pellets der nicht-induzierten und induzierten Kontrolle wurden, wie für die pBAD-Expression beschrieben, in 2x Stopmix aufgenommen.

2.8 Arbeiten mit Säugerzellen

2.8.1 Zelllinien

Menschliche embryonale Nierenzellen	HEK 293T
Menschliche Leberzellen (aus hepatozellulärem Karzinom)	Hep3B

2.8.2 Medien und Zusätze

DMEM-Glutamax (Life Technologies)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Life Technologies)

Levofloxacin/ Tavanic (Sanofi-Aventis)

L-Glutamin stock solution (Sigma-Aldrich, G-7513)

muriner recGM-CSF (Überstand transfizierter HEK-Zellen)

Penicillin/Streptomycin (Life Technologies)

Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, P4333)

RPMI-1640 (Life Technologies)

β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, M7522)

2.8.3 Transfektion von HEK 293T Zellen

HEK 293T Zellen wurden in DMEM-Glutamax mit 10 % FBS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am Tag vor der Transfektion wurden Zellen in eine 6-Well Platte ausgesät. Dazu wurden die in Zellkulturflaschen kultivierten Zellen nach Entfernen des Mediums 3 min bei Raumtemperatur trypsiniert. Danach wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Medium die Proteasereaktion gestoppt, die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 4 ml Medium resuspendiert und anschließend nach Trypanblaufärbung (80 μ L PBS, 10 μ L Trypanblau, 10 μ L Zellen) in einer Neubauerkammer gezählt. Die Zellsuspension wurde entsprechend der Zellkonzentration verdünnt und auf die 6-Well-Platte(n) verteilt ($7 \cdot 10^5$ Zellen in 2 ml Medium/ Well).

Am Tag der Transfektion (d0) wurden ein Mastermix erstellt (300 μ L DMEM0%FBS, 2 μ g DNA, 5 μ g lineares Polyethylenimin (PEI) * Anzahl der Wells) und 5 s gevortext, kurz zentrifugiert, anschließend 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 500 μ L DMEM10%FBS pro Well zum Mastermix hinzugegeben. Nach Entfernen des Mediums aus den 6-Well-Platten wurde dieser Transfektionsmix vorsichtig (am Rand des Wells) auf die Zellen getropft und dort 3 Stunden unter gelegentlichem Schwenken der Platten im Brutschrank inkubiert. Dann wurden nochmals 2 ml Medium pro Well hinzugegeben. Am nächsten Tag (oder am späten Abend desselben Tags) wurde der Transfektionsmix entfernt und frisches Medium hinzugegeben (d1). Nach 24 Stunden wurde dieser Überstand abgenommen und durch neues Medium ersetzt (d2), was wieder 24 Stunden später abgenommen wurde (d3). Schließlich wurden die Zellen zum Nachweis der gelungenen Transfektion in 2xStopmix aufgenommen, 10 min bei 100 °C erhitzt und über SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Durch den Einsatz von GFP-

tragenden Plasmiden konnte die Transfektionseffizienz schon am Tag 1 nach Transfektion am Fluoreszenzmikroskop eingeschätzt werden.

Für eine Transfektion im größeren Maßstab wurden die Zellen in 10 cm Petrischalen ausgesät (5,8 Mio/ Schale). Der Transfektionsmix war hierbei (Angaben pro Petrischale): 35µg PEI, 14µg DNA in 1ml DMEM0%FBS, Zugabe von 2,5 ml DMEM10%FBS nach 20 min und Verteilen auf Zellen, Zugabe von 6,5 ml Medium nach 3 h, wie oben beschrieben.

2.8.4 Hepatotoxizitätsprüfung mit Hep3B Zellen

Hep3B Zellen wurden in DMEM-Glutamax mit 10 % FBS und 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche) wurde zur Analyse möglicher zytotoxischer oder proliferationshemmender Effekte von Überständen aus Parasiten- oder HEK-Zellkultur eingesetzt. Dazu wurden Hep3B Zellen in 96-Well Platten ausgesät (5000 Zellen in 160 µL Medium/ Well). Nach etwa 8 h wurden verschiedene Zellkulturüberstände hinzugegeben (20 µL und 40 µL, Endvolumen pro Well: 200 µL), drei Wells pro Bedingung. Als Negativkontrolle diente reines Medium, als Positivkontrolle 1 % Triton in Medium. Am dritten Tag nach Exposition wurden 20 µL des 1:1 in DMEM verdünnten wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes (WST-1) zu den Zellen gegeben und die Differenz der Absorption bei 450 nm und der Absorption der Referenzwellenlänge (620 nm) im ELISA-Reader nach 0, 1, 2 und 3 h bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2013.

2.8.5 Generierung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmark

Durch Differenzierung von Knochenmarksvorläufern in Medium, das rekombinanten Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) enthält, konnten dendritische Zellen nach einem von Lutz et al. (1999) beschriebenen Verfahren generiert werden. Hierzu wurden Tibia und Femur von C57BL/6 Mäusen präpariert und 3 min in 100 % Isopropanol desinfiziert. Nach Abwaschen des Isopropanols mit PBS wurde das Knochenmark durch Abschneiden beider Epiphysen eröffnet und mit einer Spritze mit PBS durchspült. Die Zellsuspension wurde dabei in einer Petrischale aufgefangen und

anschließend in ein 50 ml Röhrchen überführt. Durch Auf- und Abpipettieren wurden Zellklumpen suspendiert, PBS wurde bis zum Rand aufgefüllt und nun bei 300 g 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in R10-Medium (RPMI-1640 mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 50 µM β-Mercaptoethanol und 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum) resuspendiert und die Zellen in einer Neubauerkammer gezählt. Die Zellen wurden nun in Petrischalen (Falcon 1029) in R10 Medium mit 10 % Überstand aus einer GM-CSF-produzierenden HEK-Zellkultur (GM-CSF-sup) ausgesät (3 Millionen Zellen in 10 ml/ Schale) und bei 37 °C, 7 % CO₂ inkubiert. 3 Tage später wurden 10 ml R10-10%GM-CSF-sup pro Petrischale hinzugefügt; 6 Tage später wurden 10 ml Medium abgenommen und durch frisches R10-10%GM-CSF-sup ersetzt; 8 Tage später konnten die auf diese Weise differenzierten dendritischen Zellen für Experimente eingesetzt werden (s.u.).

2.8.6 Exposition Dendritischer Zellen mit Zellkulturüberständen

8 Tage nach Gewinnung und Kultivierung von Zellen aus murinem Knochenmark wurden die Zellen resuspendiert, zentrifugiert (300 g) und in 5 ml R10 Medium aufgenommen. Beim Pipettieren wurden die Scherkräfte zur Vermeidung einer Aktivierung der dendritischen Zellen (DCs) auf ein Minimum reduziert. Nach Zählen in einer Neubauerkammer wurden die Zellen in eine 48-Well-Platte überführt (0,5 Millionen Zellen/ Well in 400 µL R10). Nun wurden 100 µL verschiedener Zellkulturüberstände oder viva-spin-Konzentrate hinzugegeben, R10 diente als Negativkontrolle. Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* 0127:B8 (Sigma-Aldrich) wurde 90 min oder 24 h später hinzugefügt (0,1 µg/ml). 48 h nach Exposition wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert und der Zellüberstand bis zur Durchführung des ELISA bei -20 °C aufbewahrt (s.u.).

2.9 Arbeiten mit *E. multilocularis*

2.9.1 Verwendete Isolate

Die für diese Arbeit eingesetzten *E. multilocularis*-Isolate waren H95, GT10, GH09 und J2012. Das entsprechende Larvenmaterial wurde im Labor der Arbeitsgruppe Brehm *in*

vitro unter axenischen Bedingungen kultiviert (Spiliotis et al., 2004) und für diese Arbeit bereitgestellt, sodass hier nur auf die darauf aufbauenden Schritte eingegangen wird.

2.9.2 Generierung von Metazestoden-Überstand und -Lysat

Der Überstand aus axenischer Metazestodenkultur wurde vor dem Einsatz auf Hep3B-Zellen oder Dendritischen Zellen sterilfiltriert. Für die Zymographie (s. Kap. 2.5.4) wurde der Überstand abgenommen, nachdem die Metazestodenvesikel 24 h in Serum-freien Medium kultiviert worden waren. Zur Analyse des Lysats wurden die Vesikel mit einer 1 ml Pipette aufgebrochen und dreimal zum Entfernen der Hydatidenflüssigkeit in PBS gewaschen, anschließend in 2xStopmix aufgenommen und 10 min bei 100 °C erhitzt.

2.9.3 Primärzellisolation und Generierung von Primärzell-Überstand

Primärzellen wurden aus Metazestodenvesikeln isoliert, wie von Spiliotis und Brehm (2009) beschrieben. Die Zellen wurden zur RNA-Isolierung in TRIzol Reagent und für SDS-PAGE in 2xStopmix aufgenommen oder zur Generierung von Primärzellüberstand in A4 Medium (konditioniertes DMEM einer Kultur mit Ratten Reuber (RH⁻) Leberzellen mit Zusatz von Bathocuproindisulfonsäure, β -Mercaptoethanol und L-Cystein) in 6-Well Platten in einer Stickstoffatmosphäre kultiviert. An Tag 2, 4, 6 und 8 nach Isolierung wurde der Überstand abgenommen, zur Entfernung möglicher Zellbestandteile zentrifugiert, sterilfiltriert und bis zum weiteren Einsatz bei -20 °C eingefroren, wobei der Überstand an Tag 2, 4 und 6 durch frisches A4 Medium ersetzt wurde.

2.10 Durchflusszytometrie

Nach Exposition von DCs mit verschiedenen Zellkulturüberständen (Kap. 2.8.6) wurde der Reifungsgrad durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden Fluorochrom-markierte Antikörper gegen Oberflächenmoleküle der DCs verwendet (Tab 5).

Die Zellen wurden hierzu in FACS-Puffer (1x PBS mit 3 % hitzeinaktiviertem FCS und 0.1 % NaN₃) gewaschen und anschließend 30 min im Antikörper-FACS-Puffer-Mix bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen

in FACS-Puffer mit 1 % Formaldehyd aufgenommen (50 - 100 μ L pro FACS-tube) und im LSR II Durchflusszytometer unter Verwendung von FACSDiva Software (beide BD Biosciences) analysiert. Zur weiteren Auswertung wurde FlowJo (FlowJo LCC) verwendet. Abb. 4 zeigt exemplarisch die Gating-Strategie für LPS-exponierte DCs: Zunächst wurden die Werte für Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC-A und SSC-A) gegeneinander aufgetragen und darüber größere Zellklumpen und Debris ausgeschlossen. Anschließend wurden Dubletten über das sequentielle Auftragen des Height- gegen das Width-Signal in Side- und Forward-Scatter eliminiert. Nun wurde auf CD11c-positive Zellen gated und schließlich das MHCII- gegen das CD86- Signal dargestellt. Die Gates wurden anhand der ungefärbten bzw. nur mit jeweils einem Antikörper gefärbten Kontrollen gewählt.

Tabelle 5: Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse dendritischer Zellen.

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Hersteller	Verdünnung
anti-mouse CD11c	APC	N418	BioLegend	1:100
anti-mouse CD86	FITC	GL-1	BioLegend	1:100
anti-mouse I-A/I-E (MHCII)	PE	M5/144. 15.2	BioLegend	1:300 – 1:500

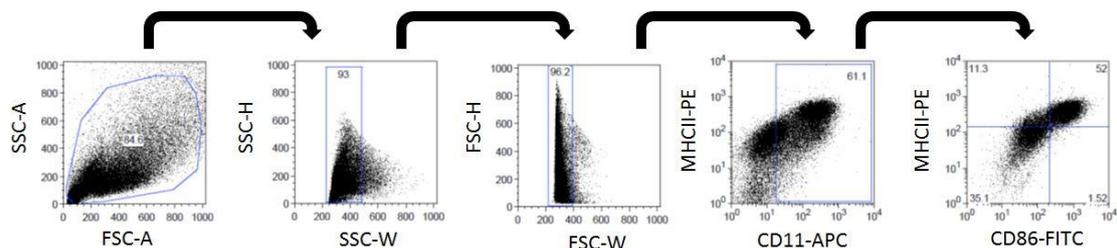


Abbildung 4: Gating-Strategie am Beispiel von LPS-exponierten DCs. 48 h nach Überführung in 48-well Platte bzw. 46,5 h nach Zugabe von 0,1 μ g/ml LPS. Fläche unter dem Signal für Seitwärts- und Vorwärtsstreulicht (SSC-A, FSC-A), Höhe und Breite des SSC-Signals (SSC-H, SSC-W) und des FSC-Signals (FSC-H, FSC-W), verwendete Antikörper siehe Tab. 5

2.11 Messung der IL-12 p70-Sekretion dendritischer Zellen

Über ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) wurde die Konzentration von IL-12 p70 in Überständen der Kultur von DCs am zweiten Tag nach Exposition (s. Kap. 2.8.6) ermittelt. Dazu wurde das Mouse IL-12 p70 ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience) verwendet. Alle Proben wurden in Duplikaten auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Bei Halbierung aller angegebenen Volumina entsprach das Vorgehen ansonsten den Vorgaben des Herstellers. Die Messung erfolgte im ELISA Reader Multiskan EX (Thermo Scientific).

2.12 Statistische Analyse

Unter Annahme einer Normalverteilung wurden einseitige Einstichproben *t*-Tests und einseitige Zweistichproben *t*-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Kalkulation erfolgte mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism Software). Das Signifikanzniveau war $\alpha = 0,05$. Multiples Testen wurde nach Bonferroni-Holm korrigiert.

3 Ergebnisse

3.1 *emRNASET2*: cDNA-, Proteinsequenz und Vorhersage des Signalpeptids

Im Vorfeld dieser Arbeit war EmRNASET2 bereits durch in silico-Analysen als Homologes zu omega-1 identifiziert worden (Nono, 2012; Olson et al., 2012). Primer zur Amplifikation der entsprechenden cDNA wurden freundlicherweise von Dr. Justin Nono zur Verfügung gestellt. Abb. 5 zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz von EmRNASET2 im Alignment mit omega-1.

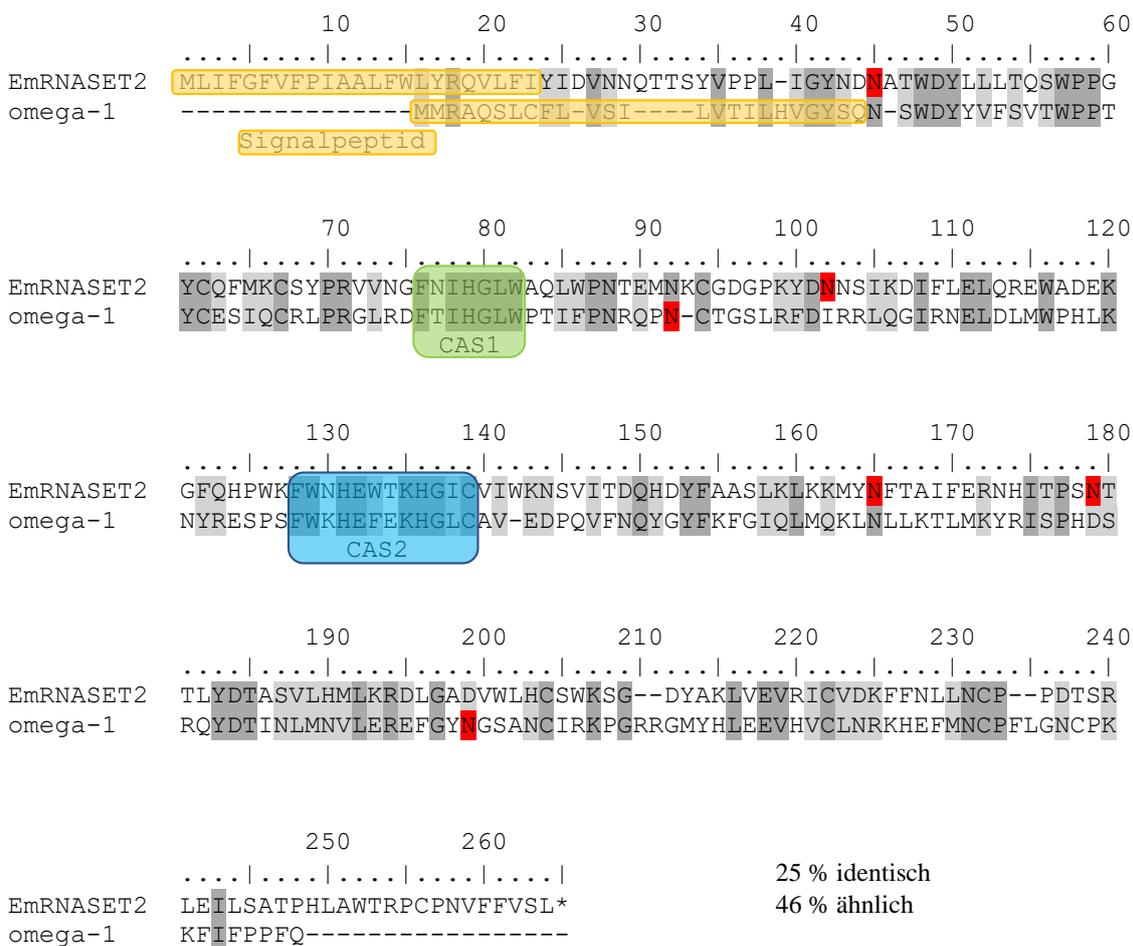


Abbildung 5. Sequenzalignment von EmRNASET2 und omega-1. Signalpeptid (gelb), katalytisch aktive Regionen CAS1 (grün) und CAS2 (blau). Vorhergesagte N-Glykosylierungsstellen (rot). GenBank-Akzessionsnummern: ABB73003.1 (omega-1), CDS36666.1 (EmRNASET2). NB: Das vorhergesagte *E. multilocularis*-Gen EmuJ_000380250 ist kürzer als das über cDNA von Metacestoden gewonnene Amplikon.

Hierbei zeigt sich, dass EmRNASET2 einige Eigenschaften mit omega-1 teilt, die mit dessen Funktion in Verbindung gebracht werden (s. Kap. 1.5): Es besitzt ein (mit SignalP

3.0 vorhergesagtes) Signalpeptid, könnte also ebenfalls sezerniert werden, es ist (nach Vorhersage mit NetNGlyc 1.0) glykosyliert und besitzt die beiden katalytisch aktiven Regionen CAS1 und CAS2. Drei Histidine (an Position 79, 131 und 136 im Alignment) sind dabei für die Katalyse essentiell (Ohgi et al., 1992). Außerdem besitzt EmRNASET2 die ebenfalls an der Katalyse beteiligte Glutaminsäure (Position 132) und Lysin (Position 135). Bei 25 % identischen (und 46 % ähnlichen) Aminosäuren weisen die Sequenzen auch signifikante Unterschiede auf.

3.2 Produktion polyklonaler Antikörpern gegen EmRNASET2

Spezifische Antikörper gegen EmRNASET2 sind für die Untersuchung der Genexpression (Kap. 3.3.2), den Nachweis der Produktion rekombinanter EmRNASET2 (recEmRNASET2) durch HEK-Zellen (Kap. 3.4) und die Konzentrierung des Proteins durch Immunopräzipitation unabdingbar.

Zunächst wurde untersucht, ob monoklonale Antikörper gegen omega-1 die rekombinant hergestellte recEmRNASET2 im Western Blot von Lysaten transfizierter HEK-293T-Zellen erkennen. Die Antikörper wurden freundlicherweise von Dr. Gabriele Schramm (Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt. Die untersuchten Antikörper erkannten recEmRNASET2 nicht, obwohl von dessen Vorhandensein in den Lysaten der transfizierten Zellen auszugehen war, da die Positivkontrolle über anti-myc-Antikörper detektiert wurde. Daher wurden eigene Antikörper gegen EmRNASET2 generiert.

Für die Immunisierung eines Kaninchens, die von immunoGlobe[®]-Antikörpertechnik-GmbH durchgeführt wurde, musste das Antigen zunächst rekombinant in Bakterien exprimiert werden. Aufgrund der relativ geringen vorhergesagten Immunogenität (IEDB Analysis Resource) wurde hierfür kein Epitop ausgewählt, sondern EmRNASET2 als Ganzes eingesetzt.

Die kodierende Sequenz (CDS) wurde aus cDNA von MC des Isolats H95 in einer PCR mit KOD-DNA-Polymerase amplifiziert (Primer EmOMG1_DW und EmOMG1_UP). Das PCR-Produkt wurde zunächst in pJET kloniert, als Ausgangspunkt für weitere Klonierungen (s. Kap. 2.4.11). Mit den Primern *F primer omg1 w/o signal* und *R primer omg1 w/o stop codon* (Tab. 3) wurde die CDS ausgehend vom pJET-Klon amplifiziert

und über TOPO-TA Klonierung in den Expressionsvektor pBAD/Thio-TOPO überführt. Regelrechte Klonierung und Abwesenheit von Mutationen wurden durch Sequenzierung überprüft.

Nach Expression in *E. coli* musste das rekombinante Protein für die Immunisierung des Kaninchens aufgereinigt werden. Angesichts der Absicht, den Antikörper auch unter Zellkulturbedingungen einzusetzen, wäre native recEmRNASET2 für die Immunisierung des Kaninchens wünschenswert gewesen; die Aufreinigung unter nativen Bedingungen war jedoch nicht möglich, da sich das Protein als unlöslich erwies (Löslichkeitsprüfung s. Kap. 2.5.1). Die unzureichende Löslichkeit von rekombinanten Proteinen, die in *E. coli* produziert werden, wird häufig beobachtet: Etwa 70 % der so exprimierten eukaryotischen Proteine bilden unlösliche Einschlusskörperchen im Bakterium (inclusion bodies) (Yang et al., 2011). Für die Generierung von Antikörpern ist das kein großes Problem, da die Einschlusskörperchen zur Immunisierung verwendet werden können und dabei eine gute Immunantwort triggern (Dr. Matthias Reinhard (2014), pers. Mitteilung). Daher wurden intakte Einschlusskörperchen isoliert. Das dazu verwendete Protokoll wurde von immunoGlobe® bereitgestellt und basiert auf einer Veröffentlichung von Nagai und Thogersen (1987). Leider zeigten sich im Western Blot nach PonceauS- und anti-V5- Färbung Verunreinigungen, die nicht durch zusätzliche Waschschrte beseitigt werden konnten, weshalb immunoGlobe® davon abriet, das gewonnene Material für die Immunisierung einzusetzen.

Deshalb wurden die Einschlusskörperchen in einem nächsten Anlauf unter denaturierenden Bedingungen solubilisiert und das rekombinante Protein über den Polyhistidin-Tag aufgereinigt. Durch die bei dieser Methode vergleichsweise geringe Proteinausbeute mussten die Expressionsbedingungen des Labor-internen Protokolls optimiert werden: Schließlich erlaubte der Einsatz von 2 L Schikanekolben, „Terrific Broth“- Medium sowie die Einführung einer längeren Inkubation in Lysepuffer und einer Ultraschallbehandlung die Gewinnung von ausreichenden Proteinmengen (Abb. 6 A-C). Das rekombinante Protein (Thio-EmRNASET2) stellte sich nach SDS-PAGE, wie angesichts der Thioredoxin-, V5- und Poly-His-Tags erwartet, bei etwas über 40 kDa dar. Obwohl der *E. coli* BL21 Stamm üblicherweise zur Expression heterologer Proteine verwendet wird, da er keine Lon und Omp-t Proteasen bildet, führte die Expression in

E. coli Top10 zu geringeren Verunreinigungen im Eluat nach Aufreinigung, welches daher für die Immunisierung verwendet wurde.

Immunisierung mit diesem über pBAD exprimierten rekombinanten Protein führt auch zur Bildung von Antikörpern gegen HP-Thioredoxin, V5- und 6xHis- Epitop. Um nur die gewünschten Antikörper gegen EmRNASET2 zu gewinnen, wurde das Protein zur Affinitäts-Aufreinigung der Antikörper aus Kaninchenserum über einen anderen Vektor ohne die o.g. Epitope exprimiert: pGEX-3X führt zur Bildung eines mit Glutathion S-Transferase (GST) gekoppelten Proteins (GST-EmRNASET2). Hinsichtlich Proteinausbeute optimale Expressionsbedingungen wurden in Pilotexperimenten ermittelt (s. Kap. 2.7.4). Die Aufreinigung dieses Fusionsproteins kann im Gegensatz zum Polyhistidin-gekoppelten pBAD-Protein nicht unter denaturierenden Bedingungen erfolgen, da GST in seiner nativen Konformation benötigt wird. Allerdings erwies sich auch das pGEX-Protein als unlöslich. Dem Problem der durch Bildung von Einschlusskörperchen schwer löslichen rekombinanten Proteine kann auf zwei Wegen begegnet werden. Entweder, man solubilisiert sie unter denaturierenden Bedingungen und versucht anschließend die korrekte Rückfaltung, oder man optimiert die Expressionsbedingungen für lösliche Expression (Middelberg, 2002; Singh und Panda, 2005; Sorensen und Mortensen, 2005b). Da die Rückfaltung von Proteinen eine schwierige und zeitaufwendige Aufgabe ist, schien die Optimierung für lösliche Expression die bessere Option zu sein. Man geht davon aus, dass die Bildung von Einschlusskörperchen bei geringeren Wachstums- und Expressionsraten abnimmt (Esposito und Chatterjee, 2006)). Diesbezüglich wurden die Auswirkungen der Wahl des Mediums, des Bakterienstamms (Top10, BL21), der optischen Dichte (OD_{600}) bei Induktion, der Dauer der Expression und der Inokulationstemperatur untersucht – ohne signifikante Verbesserung der Löslichkeit. Außerdem zeigte zusätzliche mechanische Homogenisierung über FastPrep®-24 (MP Biomedicals) keine Auswirkung auf die Ausbeute löslichen Proteins.

Ein Alignment von EmRNASET2 und der humanen T2-RNase, deren Molekülstruktur bekannt ist (Thorn et al., 2012), und Überlegungen zur möglichen Struktur von omega-1 (Fitzsimmons et al., 2005) legen das Vorhandensein von drei bis vier Disulfidbrücken in EmRNASET2 nahe (Cys94-Cys139, Cys204-Cys256, Cys222-Cys232 in Abb. 5, Alignment mit humaner RNase nicht gezeigt). Angesichts der Tatsache, dass durch die

Wahl eines geeigneten *E. coli* Stamms die Expression von Proteinen mit Disulfidbrücken verbessert werden kann (Sorensen und Mortensen, 2005a), wurde versucht, die Löslichkeit von GST-EmRNASET2 durch den Einsatz des *E. coli* Origami Stammes zu erhöhen. Dieser trägt Mutationen in den Genen für Thioredoxinreduktase und Glutathionreduktase und führt dadurch zu oxidierenden Bedingungen im Zytoplasma, was aber in diesem Fall nicht zur Verbesserung der Löslichkeit des Proteins beitrug (Abb. 6D).

Schließlich wurden intakte Einschlusskörperchen isoliert (Abb. 6E), welche dann von immunoGlobe® zur Herstellung einer Affinitätsmatrix rückgefaltet werden konnten. Abb. 6F bestätigt, dass die über GST-EmRNASET2 aufgereinigten Antikörper auch die zur Immunisierung verwendete Thio-EmRNASET2 detektieren. Bei den Banden geringeren Molekulargewichts handelt es sich am ehesten um Degradationsprodukte des rekombinanten Proteins; GST-EmRNASET2 zeigt wie erwartet ein etwas höheres Molekulargewicht als das in pBAD exprimierte Protein.

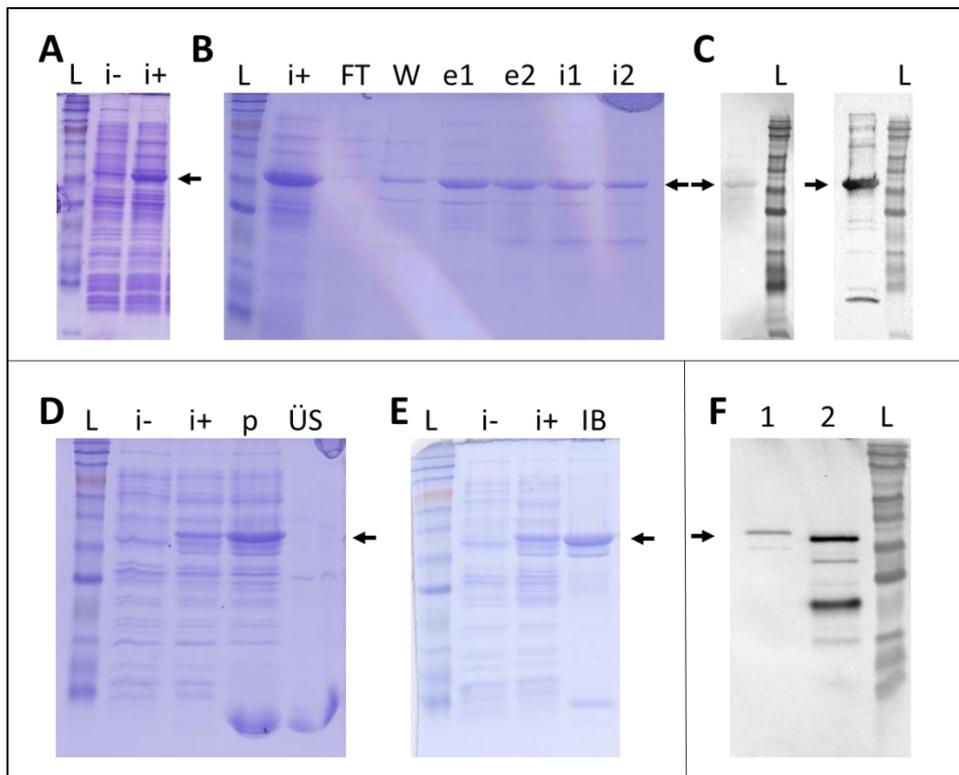


Abbildung 6. Expression von EmRNASET2 in *E. coli* zur Immunisierung eines Kaninchens und Aufreinigung polyklonaler Antikörper. A) Expression von Thio-EmRNASET2 in *E. coli* Top10. Coomassie-gefärbtes Gel des

durch SDS-PAGE aufgetrennten Bakterienlysats vor (i-) und nach (i+) Induktion mit Arabinose; Längenmarker (L), der Pfeil markiert die Position des rekombinanten Proteins bei etwa 40 kDa. **B) Denaturierende Proteinaufreinigung von Thio-EmRNASET2.** Coomassie-gefärbtes Gel der Eluate mit Elutionspuffer (e1, e2) und Imidazolpuffer (i1, i2). Durchfluss (FT), erster Waschschrift (W), Bakterienlysats (i+). **C) Thio-EmRNASET2 nach Dialyse der gepoolten Eluate,** nach SDS-PAGE, Western Blot und PonceauS-Färbung (links) / anti-V5 Antikörper (rechts). **D) Löslichkeitsprüfung von in *E. coli* Origami exprimierter GST-EmRNASET2.** Coomassie-gefärbtes Gel. Bakterienlysats vor (i-) und nach (i+) Induktion mit IPTG, Pellet (p) und Überstand (ÜS) der in Kap. 2.5.1 beschriebenen Löslichkeitsprüfung. **E) Isolation GST-EmRNASET2-haltiger Einschlusskörperchen (IB) aus Bakterienpellet nach IPTG-Induktion (i+).** Bakterienlysats (*E. coli* Top10) vor Induktion (i-). **F) Test der polyklonalen Antikörper auf GST-EmRNASET2 (1) und Thio-EmRNASET2 (2).** Wester Blot mit anti-EmRNASET2 1:100.

3.3 Untersuchung der Expression von *emRNASET2* in Larvenstadien des Fuchsbandwurms

3.3.1 Nachweis der Transkription von *emRNASET2*

Zunächst wurden RNA-Seq Transkriptomdaten für eine Einschätzung der Transkription von *emRNASET2* herangezogen (Tsai et al. (2013), RNA-Seq-Daten ausgewertet von Ferenc Kiss). Die Quantifizierung der Transkription erfolgt dabei über die Anzahl von Fragmenten für das untersuchte Gen, die auf die Sequenziertiefe und die Länge des Gens normalisiert werden (sog. fpkm, für fragments per kilobase per Million mapped reads). Auf alle untersuchten Stadien insgesamt bezogen liegt die Transkription von *emRNASET2* in einer mit der anderer, bereits als immunmodulatorisch beschriebener, Proteine des Fuchsbandwurms vergleichbaren Größenordnung (geringer als EmTIP, höher als EmACT, vgl. Kap. 1.3, s. Abb. 7). *emRNASET2* wird in allen Larvenstadien und auch im adulten Wurm transkribiert, am meisten in frühen MC-Vesikeln, wobei die Unterschiede zwischen den Stadien gering sind (Abb. 7).

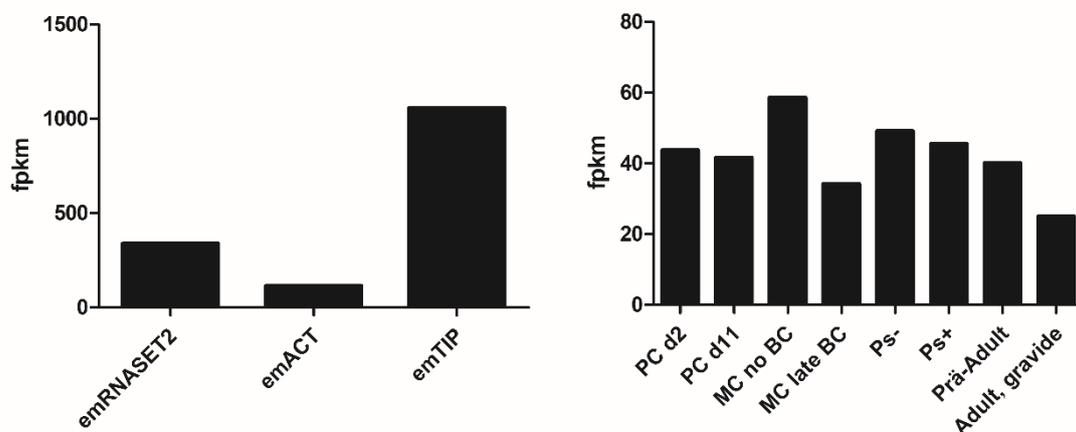


Abbildung 7. Transkription von *emRNASET2* in Vergleich zu *emACT* und *emTIP* (links), Summe der fpkm-Werte über alle untersuchten Stadien. Transkription von *emRNASET2* in verschiedenen Entwicklungsstadien (rechts).

Primärzellen Tag 2 (PC d2) und Tag 11 (d11) nach Isolation, Metazestodenvesikel ohne (MC no BC) und mit (MC late BC) Brutkapseln, nicht aktivierte (Ps-) und aktivierte (Ps+) Protoscolices, Prä-adulter Wurm (ohne Eier), gravider adulter Wurm. RNA-Seq Daten analysiert von F. Kiss (Tsai et al., 2013).

Zur zusätzlichen experimentellen Bestätigung der Transkription von *emRNASET2* wurde RNA aus Primärzellen (PC), Metazestodenvesikeln (MC) und nicht aktivierten Protoscolices (Ps-) unterschiedlicher Isolate gewonnen. Nach Synthese einzelsträngiger cDNA wurde eine PCR mit den *emRNASET2*-spezifischen Primern EmOMG1_DW und EmOMG1_UP durchgeführt. Als Kontrolle diente das in allen Larvenstadien exprimierte Gen *elp* (Primer Em1015, Em1016) (Brehm et al., 2003). Nach Gelelektrophorese zeigen sich Banden der erwarteten Größe von 780 bp in den untersuchten Proben für MC und Ps-. PC des Isolats H95 lieferten eine Bande, die mit 1000 bp allerdings größer ausfiel als erwartet (Abb. 8).

Zusammengenommen sprechen diese Daten für eine Transkription der T2-RNase in allen Larvenstadien, wobei die für PC beobachtete abweichende Länge des PCR-Produktes möglicherweise durch alternatives Spleißen erklärt werden kann.

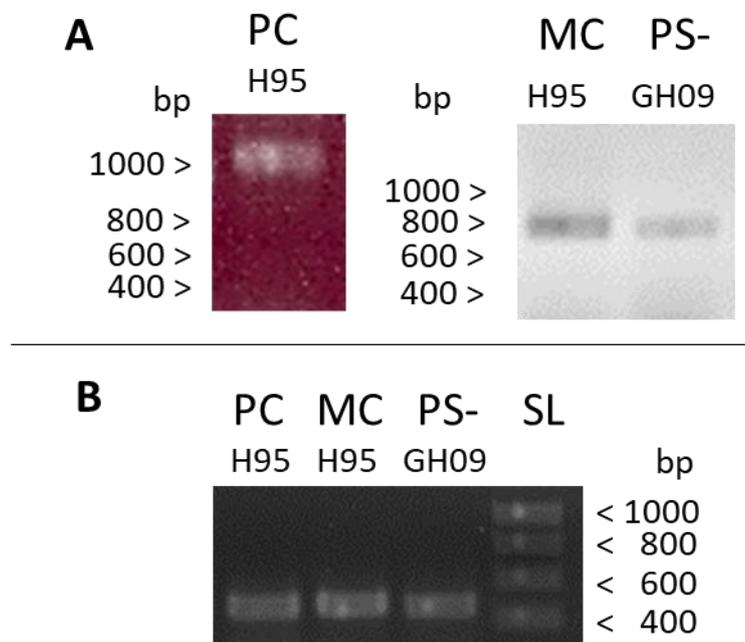


Abbildung 8. RT-PCR mit *emRNASET2*-spezifischen Primern auf cDNA verschiedener Larvenstadien (A). *elp*-Kontrolle (B). Larvenstadien: Primärzellen (PC), Metazestoden (MC), nicht aktivierte Protoscolices (PS-); Isolate GT10, H95, GH09. Gelelektrophorese der PCR-Produkte. Längenmarker *smart ladder* (SL)

3.3.2 Nachweis der Expression auf Proteinebene

Polyklonale Antikörper gegen EmRNASET2 (Kap. 3.2) ermöglichten die Untersuchung der Proteinexpression über Western Blots mit Material aus Parasitenkultur (Überstände, Zelllysate und Hydatidenflüssigkeit, s. Abb. 9). Hierbei liegt das im Überstand der Primärzellkultur detektierte Protein bei etwa 42 kDa. Die Molekülmasse liegt also mehr als 10 kDa über der mit 27,6 kDa vorhergesagten Masse des EmRNASET2-Proteins (s. Tab. 6). Trotzdem könnte es sich um EmRNASET2 handeln, wenn man bedenkt, dass vier Glykosylierungsstellen vorhergesagt wurden (Abb. 5/ Tab. 6) und dass sich rekombinante EmRNASET2 aus HEK-293T-Zellen nach Immunopräzipitation ebenfalls bei etwas über 40 kDa darstellt (s. Abb. 11). Im Überstand von MC ließ sich nur bei Isolat H95 eine schwache Bande erkennen, nicht jedoch bei J2012; auch die untersuchte Hydatidenflüssigkeit blieb ohne Proteinnachweis. Im Lysat von MC zeigten sich mehrere Banden, möglicherweise Folge des Nebeneinanders unterschiedlich posttranslational modifizierter Proteine in der Zelle und/oder unspezifischer Antikörperbindungen. Auch im Lysat von Primärzellen zwei Tage nach Isolierung ist ein Signal zwischen 40 und 50 kDa detektierbar. Zusammengenommen liefern diese Ergebnisse Anhalt für die Expression von EmRNASET2 in Metazestoden und Primärzellen und die Sekretion des Proteins vor allem von Primärzellen.

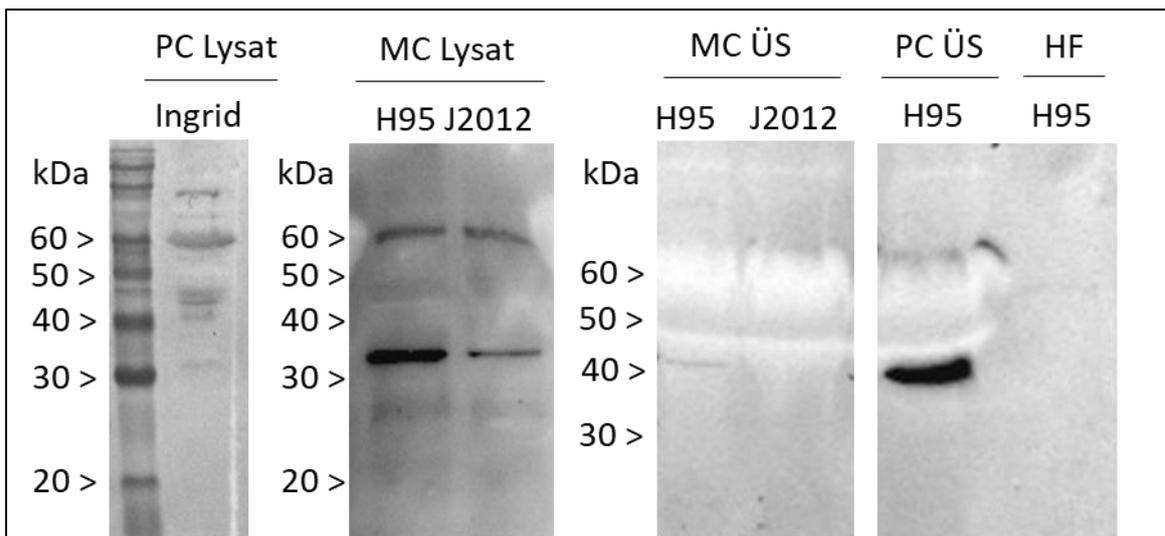


Abbildung 9. Nachweis der Expression über anti-EmRNASET2 Antikörper. Untersucht wurden Überstände und Lysate verschiedener *in vitro* kultivierter Larvenstadien. Western Blot mit anti-EmRNASET2 (1:100). Überstand (ÜS) und Zelllysate von Primärzellen (PC) und Metazestoden (MC), Hydatidenflüssigkeit (HF), Parasitenisolate: Ingrid, H95, J2012. Die beiden rechten Aufnahmen stammen vom selben Western Blot mit identischer Expositionsdauer.

3.3.3 EmRNASET2 als (diagnostisches) Antigen?

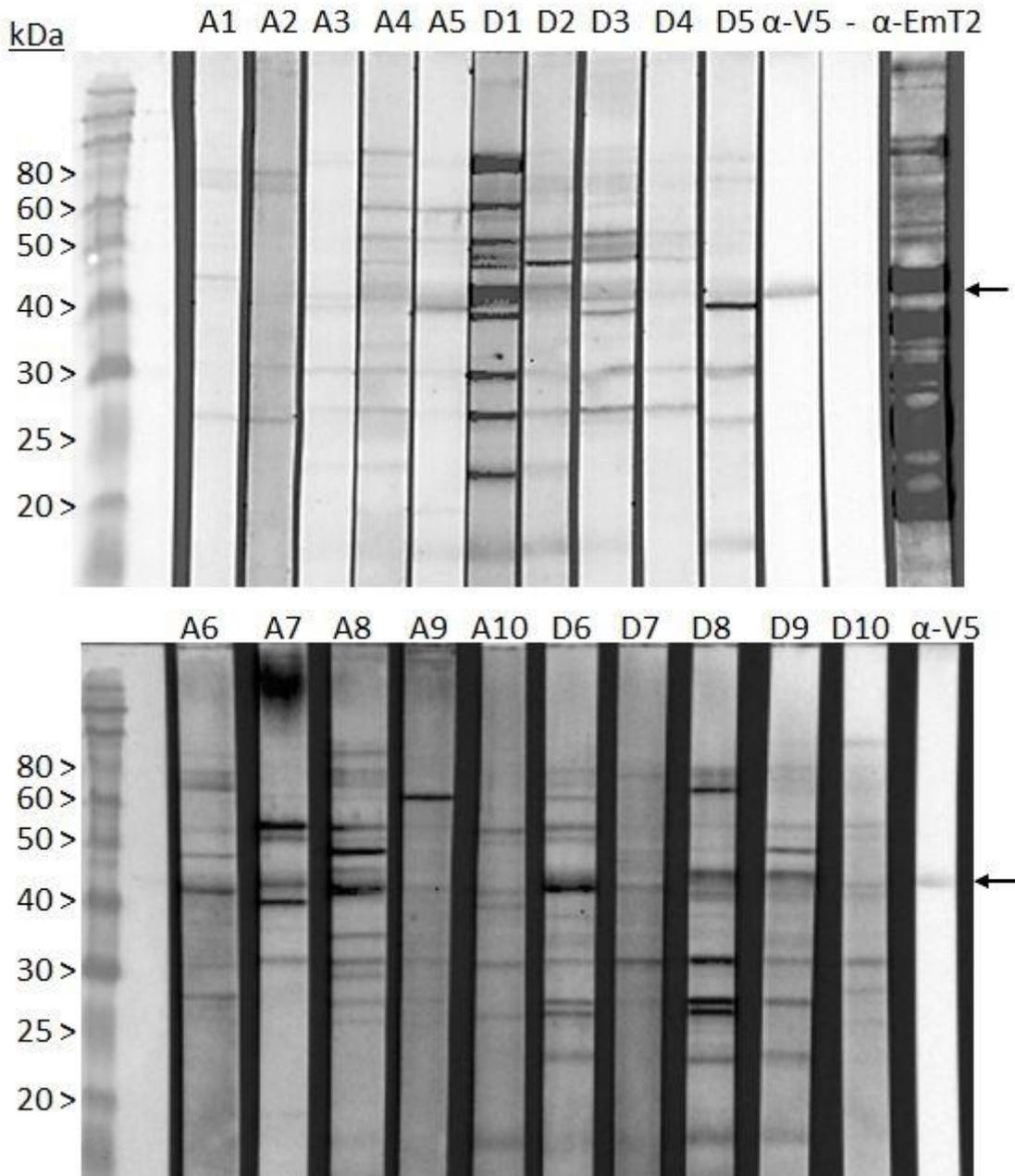


Abbildung 10. Untersuchung der Antigenität von EmRNASET2. Western Blot mit in *E. coli* produzierter Thio-EmRNASET2 (ca. 4 µg Protein pro Spur), über Nacht inkubiert mit Serum von *E. multilocularis*-Patienten (D1-D10) und gesunden Kontrollen (A1-A10, beide 1:400), sowie anti-V5 (1:5000) und anti-EmT2 (1:100) als Kontrollen. Sekundärantikörper: anti-human-HRP (1:10000) für Seren, anti-mouse-HRP (1:10000) für anti-V5-Kontrolle, anti-rabbit-HRP (1:5000) für anti-EmRNASET2-Kontrolle. Negativkontrolle: nur anti-human-HRP (-). Pfeile zeigen die erwartete Position von EmRNASET2 an.

Die Produktion und Sekretion von EmRNASET2 in Larvenstadien des Fuchsbandwurms lässt die Vermutung zu, dass dieses Protein im Rahmen einer Infektion als Antigen eine

möglicherweise diagnostisch nutzbare Rolle spielt. Um diese Hypothese zu testen, wurde rekombinant in *E. coli* hergestellte Thio-EmRNASET2 (s. Kap. 3.2) elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die anschließend in Streifen geschnitten wurde. Diese Streifen wurden über Nacht mit Serum von zehn mit *E. multilocularis* infizierten Patienten (D1-D10, Abb. 10) und zehn gesunden Kontrollen (A1-A10) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden anti-human-HRP-IgG eingesetzt, in der Negativkontrolle ohne Primärantikörper. Als Positivkontrollen dienten Antikörper gegen das V5-Epitop des rekombinanten Proteins sowie anti-EmRNASET2. Aufgrund der Kontamination mit Bakterienproteinen zeigten sich mehrere Banden. Bei 42 kDa traten Banden unterschiedlicher Intensität in den Patientenseren D1-D10 auf, jedoch auch bei einigen gesunden Kontrollen. Somit ergibt sich kein eindeutiger Hinweis auf einen diagnostischen Nutzen von EmRNASET2.

3.4 Expression rekombinanter EmRNASET2 in HEK 293T Zellen

Während bei der Generierung von Antikörpern die Produktion von vergleichsweise hohen Mengen rekombinanten Proteins im Vordergrund stand und die RNase daher in Bakterien exprimiert wurde, waren für die funktionelle Analyse dieses eukaryotischen Proteins das Vorhandensein der posttranslationalen Modifikationen und Sekretion in den Zellkulturüberstand entscheidend. Deshalb wurde *emRNASET2* in einer Zelllinie humaner embryonaler Nierenzellen (HEK 293T) exprimiert. Als Vektor diente pSecTag2/Hygro A (Invitrogen). Da das Signalpeptid zur Sekretion des Proteins schon über den Vektor kodiert ist, wurde die Sequenz des über signalP vorhergesagten EmRNASET2-eigenen Signalpeptids nicht mit in pSecTag2 kloniert (s. Abb. 2). Durch Einsatz verschiedener Primer (mit und ohne Stopcodon) konnte ein rekombinantes Protein mit und eines ohne *myc*-Epitop am C-Terminus exprimiert werden (recEmRNASET2-tag und recEmRNASET2). Außerdem wurde eine Mutante von EmRNASET2 exprimiert, deren katalytische aktive Region durch zielgerichtete Mutagenese inaktiviert ist (CAS). Als Kontrollen dienten Zellen, die nur mit den Transfektionsreagenzien ohne DNA (mock) oder mit leerem Vektor (pSec) behandelt wurden. In den Lysaten der HEK-Zellen konnten recEmRNASET2 und CAS im Western Blot über anti-EmRNASET2 Antikörper nachgewiesen werden, recEmRNASET2-tag

auch über anti-myc Antikörper (Abb. 11). Die rekombinanten Proteine stellten sich bei etwa 40 kDa dar und zeigten damit das gleiche Molekulargewicht wie das mit denselben Antikörpern in Primärzellkultur nachgewiesene natürliche Protein (vgl. Abb. 9).

Die Überstände wurden an Tag 2 und 3 nach Transfektion gewonnen. Im Western Blot war recEmRNASET2-tag über sein myc-Epitop als schwache Bande detektierbar (nicht gezeigt), die Proteinkonzentration reichte jedoch nicht für einen Nachweis mit polyklonalen anti-EmRNASET2-Antikörpern, weshalb für den Nachweis von recEmRNASET2 ohne myc-Epitop weitere Schritte erforderlich waren. Nach Ethanolpräzipitation ergaben sich erste Hinweise auf das Vorliegen des Proteins im Überstand, die Darstellung wurde jedoch durch das bei diesem Verfahren ebenfalls konzentrierte Serumalbumin des Kulturmediums erschwert (nicht gezeigt). Über Immunopräzipitation gelang schließlich der Nachweis von recEmRNASET2 im Zellkulturüberstand. Zur Präzipitation wurden anti-EmRNASET2- (und in der Positivkontrolle anti-myc-) Antikörper eingesetzt, die nicht kovalent an Agarose-Beads gebunden sind und daher nach Aufnahme der Probe in Stopmix zusammen mit dem präzipitierten Protein im Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Da zur Detektion des nicht mit einem myc-Epitop versehenen Proteins im Western Blot erneut anti-EmRNASET2-Antikörper nötig waren, wurde die Detektion einer Bande zwischen 40 und 50 kDa durch das starke Signal der schweren Ketten der in der Probe vorhandenen Antikörper beim dabei erforderlichen Einsatz von anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörpern verhindert. Dieses Problem wurde durch die Verwendung von murinen leichtkettenspezifischen anti-Kaninchen-IgG als Sekundärantikörper mit anti-Maus-HRP als Tertiärantikörper umgangen. Eine Immunopräzipitation mit murinen anti-myc Antikörpern führte nicht zu diesem Problem, wenn im Western Blot mit anti-EmRNASET2 detektiert wurde. Daher gelang zuerst der Nachweis von recEmRNASET2-tag in HEK-Zellüberständen. Doch selbst nach Verwendung der leichtkettenspezifischen Antikörper gelang kein Nachweis von recEmRNASET2 ohne myc-Epitop. Erst als die Immunopräzipitation mit zuvor über Ultrafiltration konzentrierten HEK-Zellüberständen durchgeführt wurde, ließ sich das Protein bei etwa 42 kDa nachweisen (Abb. 11C). Neben anti-EmRNASET2 auf ultrafiltrierten recEmRNASET2-Überständen (1) wurden folgende Kontrollen eingesetzt: anti-EmRNASET2 und ultrafiltrierter pSec-Überstand (Zellen mit leerem Vektor transfiziert)

(2), ausschließlich anti-EmRNASET2 (3), anti-EmRNASET2 und recEmRNASET2-tag-Überstand (wie alle folgenden Überstände nicht konzentriert, 4), anti-EmRNASET2 und pSec-Überstand (5), ausschließlich anti-myc (6), anti-myc und recEmRNASET2-tag-Überstand (7), anti-myc und pSec-Überstand (8), ausschließlich recEmRNASET2-tag (9), ausschließlich pSec (10). Wie erwartet ließ sich das rekombinante Protein auch in (4) und (7) bei etwa 45 kDa nachweisen (myc-tag: 2,9 kDa), allerdings auch in einer Negativkontrolle (5), möglicherweise durch Verunreinigung im Verlauf des Experiments.

Somit stand rekombinant hergestelltes EmRNASET2 aus Zellkulturüberstand von HEK-Zellen für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Aufgrund der wahrscheinlich geringen Konzentration des Proteins wurden die Überstände im Folgenden über Ultrafiltration konzentriert.

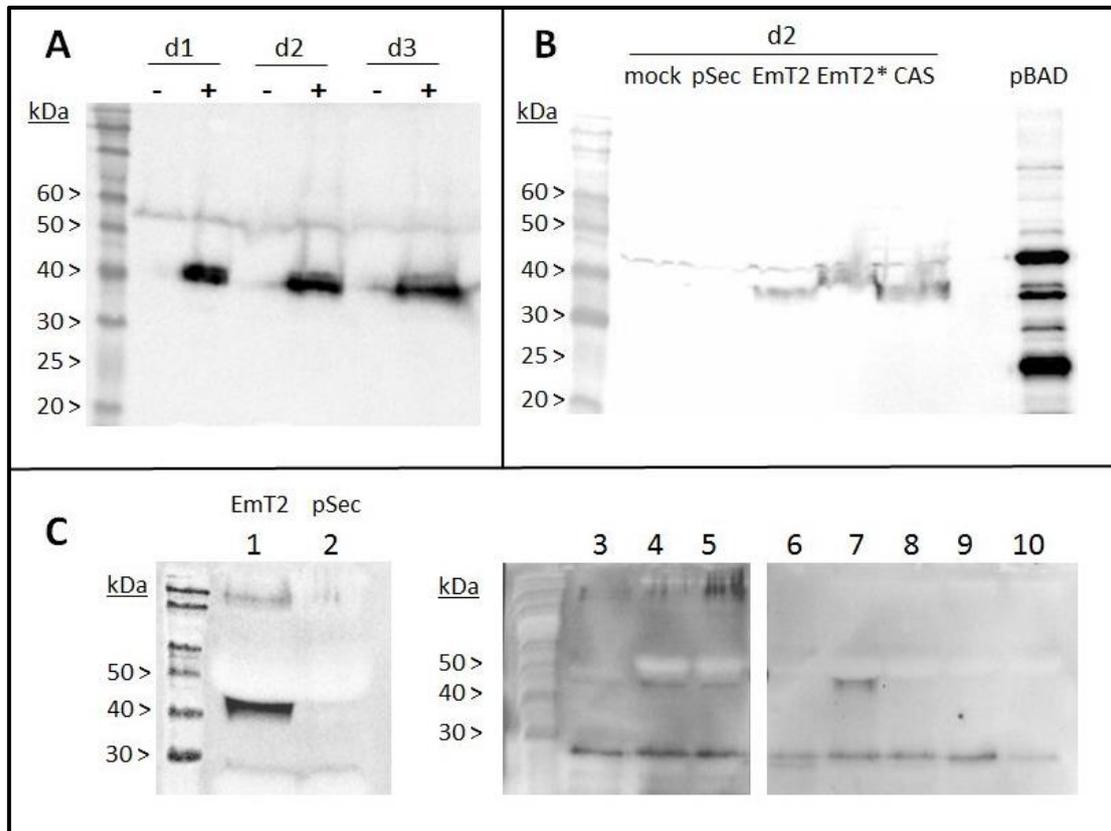


Abbildung 11. Nachweis der Expression von recEmRNASET2 in HEK 293T Zellen über Western Blot. A) HEK-Zell-Lysate an Tag 1 bis 3 nach Transfektion; recEmRNASET2-tag (+) und mock-Kontrolle (-); anti-myc-Antikörper, Sekundärantikörper: anti-mouse-IgG. B) HEK-Zell-Lysate an Tag 2 nach Transfektion; mock- und pSec- Kontrollen, recEmRNASET2 (EmT2), recEmRNASET2-tag (EmT2*), CAS-Mutante (CAS), Positivkontrolle: in *E. coli* über den pBAD-Vektor exprimiertes Thio-EmRNASET2; anti-EmRNASET2-Antikörper, Sekundärantikörper: anti-Kaninchen-IgG. C) HEK-Zell-Überstände nach Immunopräzipitation (s. Text); Primärantikörper: anti-EmRNASET2, Sekundärantikörper: anti-Kaninchen, Leichtketten-spezifisch für 1-5 anti-Kaninchen-HRP für 6-10; Tertiärantikörper: anti-Maus-HRP für 1-5. Verdünnung der Antikörper: s. Tab. 4

3.5 Funktionelle Analyse von EmRNASET2

3.5.1 Untersuchung des Effekts von recEmRNASET2 auf murine dendritische Zellen

Exposition dendritischer Zellen. Sowohl für Überstände aus Parasitenkultur von *E. multilocularis* als auch für die T2-RNase omega-1 aus *S. mansoni* ist eine Beeinflussung dendritischer Zellen mit Reduktion der Reife-assoziierten Oberflächenmarker MHCII und CD86 sowie Verringerung der IL-12p70-Produktion bei nachfolgender LPS-Stimulation beschrieben (s. Kap. 1.4, 1.5). Dies wirft die Frage auf, inwieweit die T2-RNase des Fuchsbandwurms für die beobachteten immunologischen Effekte verantwortlich ist. Durch Exposition dendritischer Zellen mit rekombinant hergestellter EmRNASET2 sollte dieser Frage nachgegangen werden.

Pilotexperimente lieferten keinen Hinweis auf einen Effekt von unkonzentriertem Überstand recEmRNASET2-produzierender HEK-Zellen. Angesichts der bereits beschriebenen geringen recEmRNASET2-Konzentration (s.o.) im Überstand, wurden nachfolgend etwa 20-fach konzentrierte Ultrafiltrate eingesetzt.

Zunächst wurde versucht, die aus murinem Knochenmark gewonnenen Zellen in 24-Well-Platten zu kultivieren, um sie auf diese Weise nach 8 Tagen ohne Zelltransfer direkt mit den Zellkulturüberständen zu exponieren. Dadurch sollte das mit dem Zelltransfer verbundene Risiko einer DC-Aktivierung durch Scherkräfte beim Pipettieren umgangen werden. Allerdings führte dieses Vorgehen zu einem ungewöhnlichen Maturationsprofil (nicht gezeigt). Daher wurden die Zellen, wie von Lutz et al. (1999) beschrieben, in Petrischalen kultiviert, und zur Exposition vorsichtig in 48-Well-Platten überführt.

Neben konzentriertem HEK-Überstand mit recEmRNASET2 wurde als Kontrolle der ebenfalls konzentrierte Überstand von HEK-Zellen, die mit leerem pSecTag2-Vektor transfiziert worden waren, eingesetzt (pSec). Außerdem wurde Überstand aus Primärzell- (PC) und Metazestodenkultur (MC) verwendet. Um neben der Zugabe von recEmRNASET2 auch den Effekt einer Depletion von EmRNASET2 aus PC- und MC-Überstand zu untersuchen, wurden anfangs auch PC- und MC-Überstände eingesetzt, die zuvor mit zwei verschiedenen Konzentration von anti-EmRNASET2-Antikörpern auf Eis inkubiert worden waren. Als Kontrolle diente hier Kaninchen-prä-immun-Serum in entsprechender Konzentration. Hierbei ergab sich in ersten Versuchen kein Hinweis auf eine Veränderung der DC-Reifung oder IL-12p70 Produktion nach EmRNASET2-

Depletion (nicht gezeigt), woraufhin dieser zeit- und kostenaufwändige Ansatz verlassen wurde.

Da nicht feststand, wie schnell EmRNASET2 seine potentielle Wirkung auf DCs entfaltet, wurden zwei verschiedene Zeitpunkte der LPS-Stimulation gewählt: Durch frühe Zugabe von LPS 90 min nach Exposition mit den verschiedenen Zellkulturüberständen sollte eine schnelle und möglicherweise nur kurz andauernde Wirkung aufgedeckt werden, während späte Zugabe von LPS 24 h nach Exposition einer langsamen Beeinflussung der DCs durch EmRNASET2 ausreichend Zeit geben sollte. In beiden Fällen wurden die DCs und ihr Überstand 48 h nach Exposition untersucht.

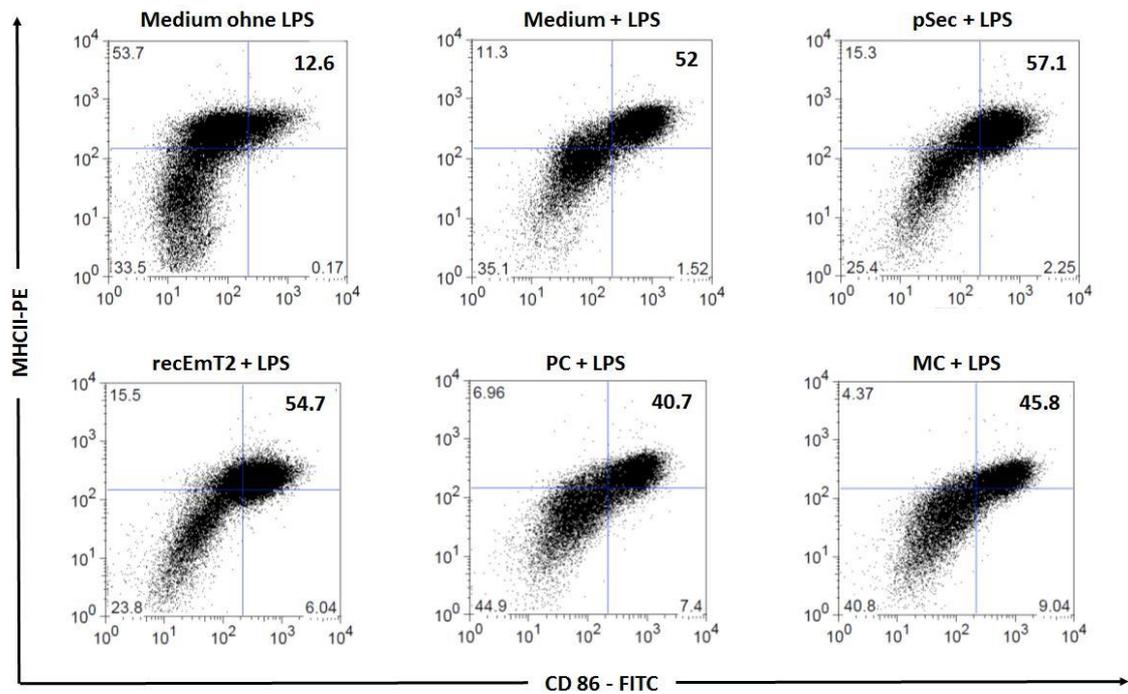


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse der Reifung dendritischer Zellen nach Exposition mit Zellkulturüberständen und LPS. Gated auf CD11c-positive Zellen. Darstellung der Oberflächenmarker MHCII und CD86 (Verdünnung s. Methoden). Exposition mit jew. 100 μ L Medium, konzentriertem HEK-Zellüberstand (pSec: leerer Vektor, recEmT2) oder Überstand aus Parasitenkultur: Primärzellüberstand von Tag 8 nach Isolierung (PC) oder Metazestodenüberstand (MC), beide Isolat H95, in 48-Well-Platte mit 0,5 Mio DCs pro Well, Gesamtvolumen 500 μ L pro Well. Zugabe von LPS (0,1 μ g/ml) 90 min nach Exposition, FACS-Analyse 48 h nach Exposition.

Analyse der Reifung: MHCII, CD86 und IL-12. Als Oberflächenmarker der Reifung dendritischer Zellen wurden MHCII und CD86 nach entsprechender Antikörperfärbung durchflusszytometrisch untersucht. Abb. 12 zeigt die Dotplots aus einem von drei

unabhängigen Experimenten. LPS-stimulierte DCs sind dabei zu einem höheren Anteil MHCII+CD86+ doppelt positiv als Zellen der nicht stimulierten Kontrolle. Der prozentuale Anteil dieser doppelt positiven DCs wurde ins Verhältnis mit eben diesem Anteil in der Positivkontrolle (Medium+LPS) des jeweiligen Experiments gesetzt. Abb. 13A zeigt die Mittelwerte dieses Verhältnisses der verschiedenen Bedingungen aus drei Experimenten. Im einseitigen Einstichproben *t*-Test wurde untersucht, ob die Mittelwerte der einzelnen Versuchsbedingungen signifikant kleiner sind als der Mittelwert der Positivkontrolle (= 1), was nur auf die Negativkontrolle zutraf (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$). Das Vorhandensein von CD86 und MHCII auf der Zelloberfläche wurde auch getrennt voneinander, anhand der jeweiligen medianen Fluoreszenzintensität (MFI), untersucht (Abb. 13 C, D). Hier führe die Exposition mit Überständen aus Parasitenkultur unter einigen Bedingungen zu einer signifikanten Verringerung von MHCII im Vergleich zur Medium+LPS Kontrolle. Dies konnte nicht für recEmRNASET2 beobachtet werden.

Um die mit recEmRNASET2 exponierte Gruppe mit der pSec-Kontrollgruppe zu vergleichen, wurden einseitige Zweistichproben *t*-Test für unabhängige Stichproben gewählt. Signifikante Unterschiede auf dem 5 % - Niveau ergaben sich hierbei nur für MHCII in der LPS-nach-24-h Bedingung (Abb. 13D).

Auch die über ELISA der Überstände ermittelte IL-12p70-Produktion recEmRNASET2-exponierter DCs unterschied sich nicht signifikant von der pSec-Kontrolle (Abb. 13B). Auffallend ist, dass Exposition mit (konzentriertem) pSec-Überstand, genau wie die Exposition mit recEmRNASET2-Überstand, bereits zu einer signifikanten Reduktion der IL-12 Produktion im Vergleich zur Medium+LPS Kontrolle führte. Diese ist ebenfalls bei Exposition mit Parasitenüberständen signifikant reduziert (außer MC in LPS-nach-90-min-Bedingung).

Vergleicht man die LPS-nach-90-min- mit der LPS-nach-24-h- Bedingung, fallen neben der stärkeren Streuung der Ergebnisse in der erstgenannten Gruppe die zwischen den Gruppen unterschiedlichen IL-12-Konzentrationen von pSec und MC auf (Abb. 13B).

Da ein Pilotexperiment keinen Anhalt für eine Apoptose-induzierende Wirkung von recEmRNASET2 ergeben hatte, wurde auf eine weitere Untersuchung in diese Richtung verzichtet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen keine eindeutigen Hinweise auf die erwartete Reduktion von Reifungsmarkern und IL-12-Produktion dendritischer Zellen durch recEmRNASET2 festzustellen sind, wenngleich der Vergleich von pSec- mit recEmRNASET2-Bedingungen oft die erwartete Tendenz erkennen lässt (Abb. 13).

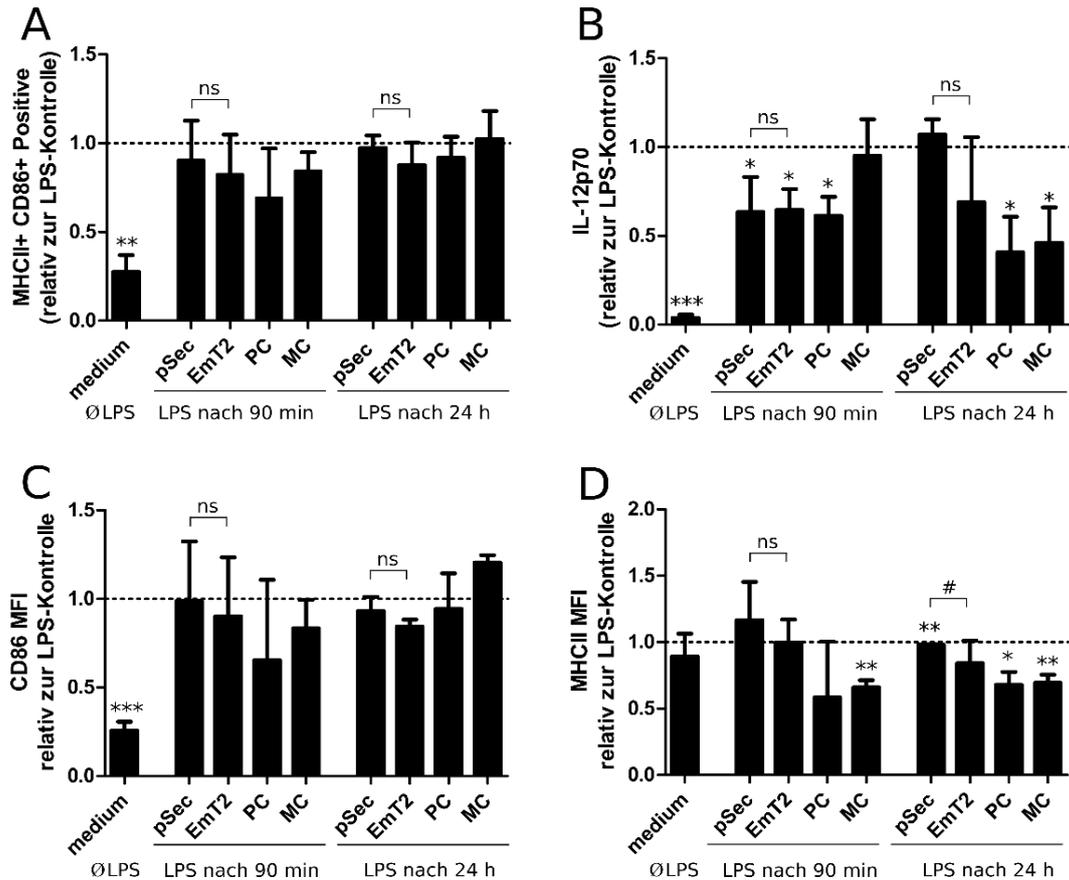


Abbildung 13. Analyse von Oberflächenmarkern und Zytokinproduktion dendritischer Zellen nach Exposition mit konzentrierten Überständen von recEmRNASET2 exprimierenden HEK-Zellen (EmT2) oder Überständen aus Parasitenkultur. Primärzellen (PC), Metazestoden (MC), beide Isolat H95. Keine Zugabe von LPS (Ø LPS), Zugabe von LPS (0,1 µg/ml) nach 90 min oder nach 24 h. Kontrollen: ebenfalls konzentrierter Überstand von mit leerem Vektor transfizierten HEK-Zellen (pSec), RPMI-Medium (medium). Zeitpunkt der Analyse: 48 h nach Exposition. Dargestellt sind die Mittelwerte (+SD) aus drei unabhängigen Experimenten. Alle Angaben relativ zu den entsprechenden Werten der Medium+LPS Kontrolle. Einstichproben-t-Test: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) für signifikant von der Medium+LPS Kontrolle verschiedene Werte. Zweistichproben-t-Test für den Vergleich von EmT2 und pSec: $p < 0,05$ (#), nicht signifikant (ns). **A) MHCII+ CD86+ doppelt positive Zellen** (vgl. Abb. 4 und 12). **B) IL-12p70 Produktion (ELISA)**. **C) Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) des CD86-Signals**, Gating auf CD11c+ Zellen (s. Abb. 4). **D) MFI des MHCII-Signals**, Gating wie (C).

3.5.2 Untersuchung der RNase-Aktivität

Unter den für Ribonukleasen der T2-Familie beschriebenen Funktionen gibt es solche, die von der Fähigkeit zur hydrolytischen Spaltung von RNA abhängen, und andere, die davon unabhängig sind (Luhtala und Parker, 2010). Die RNase-Aktivität von omega-1 ist für die beobachtete Th2-Polarisierung dieses Proteins entscheidend (Everts et al., 2012). Die Beurteilung der RNase-Aktivität von EmRNASET2 könnte zusätzliche Hinweise auf mögliche Funktionen des Proteins liefern und ist insbesondere für einen Vergleich mit omega-1 unabdingbar. Zur Detektion von Ribonukleaseaktivität wurde ein von Blank et al. (1982) beschriebenes Verfahren hinsichtlich des für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Materials modifiziert. Die untersuchten Proteine werden hierbei im RNA-haltigen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend gibt man den Enzymen die Möglichkeit zum RNA-Verdau, nachdem SDS über Waschschriffe aus dem Gel entfernt wurde. Schließlich wird das Gel mit Toluidinblau gefärbt, eine erfolgte Degradation der RNA zeigt sich durch weiße Banden (negatives Zymogramm). Die wesentlichen Modifikationen waren Größe des Gels mit entsprechender Änderung des Puffervolumens für die Waschschriffe sowie Art und Menge der im Gel enthaltenen RNA (s. Kap. 2.5.4). Wenn möglich, wurde zwischen den Proben eine Spur freigelassen. Es zeigte sich eine über das gesamte Gel verlaufende (auch in Abb. 14 sichtbare) schmale Bande, deren Auftreten auch durch äußerst vorsichtiges Beladen des Gels nicht verhindert werden konnte. Dieses Problem wurde auch von Bravo et al. (1994) beschrieben und wird auf Kontamination der verwendeten Reagenzien mit RNase A (13,7 kDa) zurückgeführt. Für die Darstellung von EmRNASET2 bei etwa 40 kDa konnte allerdings darauf verzichtet werden, diese weit verbreitete Kontamination auszuschalten.

Neben HEK-Zellüberstand mit recEmRNASET2 wurden auch Überstände aus Parasitenkultur, Hydatidenflüssigkeit und Zelllysate von Metazestoden und aktivierten *Parascoticolices* auf RNase-Aktivität bei etwa 40 kDa untersucht (Abb. 14) – zur Detektion einer RNase-Aktivität des natürlichen Proteins aus Parasitenmaterial/ -überstand für den Fall eines Verlusts dieser Funktion bei rekombinanter Expression. Bei noch unbekanntem pH-Optimum von EmRNASET2 erfolgte die Inkubation zur enzymatischen Reaktion bei pH 7,4 für 170 min. Die Wahl eines etwa neutralen pH-Werts erschien sinnvoll unter der Annahme einer Funktion des Parasitenproteins in der Leber des Zwischenwirts und angesichts der Darstellbarkeit von omega-1 bei pH 7 (Fitzsimmons et al., 2005). Es

zeigten sich keine Banden im Bereich von 40 kDa. Zwei oder drei deutliche Banden bei niedrigem Molekulargewicht und eine schwache bei etwa 25 kDa sind in den meisten Proben zu sehen (Abb. 14A). Dabei handelt es sich am ehesten um RNasen aus dem für die Zellkultur verwendeten Rinderserum, entsprechend der elektrophoretisch eingeteilten RNase-Fractionen für menschliches Serum (RNase 2 bis 5; Akagi et al. (1976), Blank und Dekker (1981)). So zeigen sich diese Banden nicht im Serum-freien Überstand von Metazestodenkultur (Abb. 14A). Es gab keinen Anhalt für das Vorliegen von parasitenspezifischen RNasen, da in den Kontrollen mit entsprechendem Medium gleich viele Banden zur Darstellung kommen. Der Unterschied zwischen Medium und Parasitenüberstand hinsichtlich der (bzgl. Molekulargewicht) zweitkleinsten Bande (Abb. 14A) liegt an der ungünstigen Wahl der Medium-Kontrolle: Während die Kontrolle DMEM-10%FCS ist, wurden PC und MC in A4-Medium kultiviert, welches ebenfalls diese Bande aufweist (nicht gezeigt). Es könnte sich also um eine von Rh⁻-Zellen produzierte RNase handeln (s. Kap 2.9.3). Eine längere Inkubation (z.B. über Nacht) führte bei Intensivierung der schwachen Bande bei 25 kDa mit insgesamt verwaschenerem Kontrast (nicht gezeigt) ebensowenig zur Detektion einer Bande um 40 kDa wie die Untersuchung der Zelllysate (Abb. 14A).

Um eine zu geringe Konzentration von EmRNASET2 oder eine Beeinflussung durch große Mengen Albumin als Ursache für die nicht detektierbare RNase-Aktivität bei 40 kDa auszuschließen, wurde eine Immunopräzipitation von HEK-Zellüberstand recEmRNASET2-produzierender Zellen und von Primärzellkultur mit anti-EmRNASET2-Antikörpern durchgeführt (analog zu Abb. 11) und das Immunpräzipitat nach über Western Blot erfolgtem Nachweis von EmRNASET2 auf RNase-Aktivität untersucht (Abb. 14 B, C). Auch hier ergab sich kein Hinweis auf eine RNase-Aktivität von EmRNASET2. In der Erwartung einer zu omega-1 ähnlichen Funktion war außerdem die katalytisch aktive Region (CAS-1) von *emRNASET2* durch gezielte Mutagenese inaktiviert worden (s. Kap. 2.4.3), indem das Codon für Histidin (CAC, im Aminosäure-Alignment Position 79, s. Abb. 5) zu TTC (für Phenylalanin) geändert wurde. Angesichts der nicht nachweisbaren RNase-Aktivität von EmRNASET2 wurde die CAS1-Mutante nicht, wie ursprünglich geplant, als Kontrolle für die Exposition von dendritischen Zellen oder Leberzellen eingesetzt.

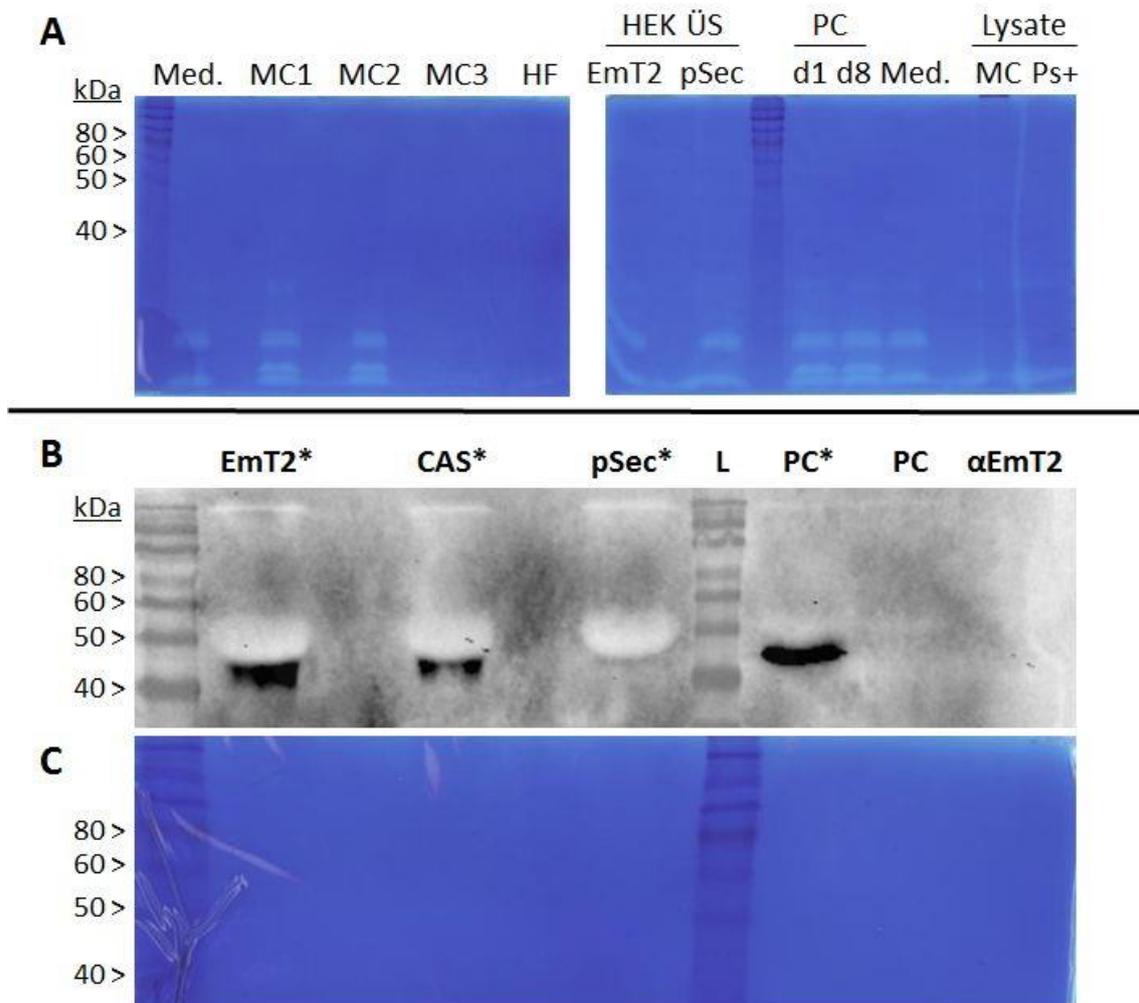


Abbildung 14. Untersuchung der RNase-Aktivität von Überständen aus Parasitenkultur und rekombinant hergestellter recEmRNASET2. **A**) RNase-Aktivitätsgel, 170 min Inkubation bei 37°C in 0,1 M TRIS HCl pH 7,4. Proben: DMEM+10% FCS-Medium (Med.), Metazestodenüberstand aus Kultur mit Rh—Zellen (MC1), Überstand von axenisierten Metazestodenkultur in A4-Medium (MC2), Überstand von Metazestodenkultur nach 24 h in Serum-freiem DMEM (MC3), Hydatidenflüssigkeit (HF), Überstände aus HEK-Zell-Kultur: recEmRNASET2-produzierende Zellen (EmT2) und mit leerem Vektor transfizierte Negativkontrolle (pSec), Überstand aus Primärzellkultur an Tag 1 und Tag 8 nach Isolation in A4-Medium (PC, d1, d8), Lysate: Metazestodenvesikel nach 3-maligem Waschen in PBS (MC) und aktivierte Primärzellen (Ps+). Alle Isolat H95. **B**) Western Blot der Immunpräzipitate (*): anti-EmRNASET2 + HEK-Zellüberstand mit recEmRNASET2 (EmT2*), anti-EmRNASET2 + HEK-Zellüberstand mit CAS-Mutante (CAS*), Negativkontrolle (pSec), Längenmarker (L), anti-EmT2 + Primärzellüberstand d8 (PC*), Primärzellüberstand ohne Konzentrierung durch Immunopräzipitation (PC), Negativkontrolle: Immunopräzipitation, nur anti-EmRNASET2-Antikörper (αEmT2). Primärantikörper: anti-EmRNASET2. Antikörper siehe Legende von Abb. 11. **C**) RNase-Aktivitätsgel, Inkubation wie A, Probenreihenfolge wie B.

3.5.3 Untersuchung der Hepatotoxizität

Für omega-1 aus *S. mansoni* wurde ein lebertoxischer Effekt *in vivo* (Dunne et al., 1981) und *in vitro* (Abdulla et al., 2011) gezeigt. Das wirft die Frage auf, ob die T2-RNase des

ebenfalls die Leber befallenden Fuchsbandwurms auch hepatotoxische Eigenschaften besitzt.

Zunächst wurde eine definierte Zellzahl der menschlichen Leberzelllinie Hep3B (aus einem hapatozellulären Karzinom) ausgesät und mit Überständen aus Parasitenkultur oder von recEmRNASET2-produzierenden HEK-Zellen exponiert. An Tag 2 und 4 wurden die Zellen gezählt, wobei sich die Zellzahl als grober Anhalt für die Viabilität zwischen den verschiedenen Proben und den Kontrollen nicht wesentlich unterschied.

Zur genaueren Einschätzung der Zellviabilität wurde daher ein WST-1-Assay durchgeführt (s. Kap. 2.8.4). Das Testprinzip basiert darauf, dass wasserlösliche Tetrazoliumsalze (WST) nach Exposition zu den Hep3B-Zellen gegeben werden und von diesen durch mitochondriale Enzyme zu Formazan umgesetzt werden. Die Menge an gebildetem Formazan korreliert mit der Viabilität der untersuchten Zellen und kann spektralphotometrisch quantifiziert werden. Abb. 15 zeigt die so bestimmte Viabilität relativ zur Kontrolle mit DMEM-GlutaMAX-10%FCS-Medium (DMEM) für die verschiedenen Bedingungen. 5000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte waren mit 20 μ L und 40 μ L der untersuchten Überstände bei einem Gesamtvolumen von 200 μ L exponiert worden. Das Detergenz Triton x-100 diente als Positivkontrolle. Zwischen den über Ultrafiltration aufkonzentrierten HEK-Zellüberständen (recEmRNASET2-produzierende Zellen und Kontrolle mit leerem Vektor, pSec) war kein Unterschied hinsichtlich Viabilität feststellbar, bei im Vergleich zu DMEM leicht verminderter Viabilität. Die mit Überstand aus Primärzellkultur (PC) exponierten Zellen schienen sogar etwas vitaler als die Zellen der DMEM-Kontrolle zu sein, jedoch zeigte auch das zur Kultivierung der PC verwendete A4-Medium diesen Effekt. Metazestodenüberstand hatte keinen eindeutigen Effekt auf die Zellviabilität, Hydatidenflüssigkeit wirkte sich eher positiv auf die Viabilität der Hep3B-Zellen aus.

Somit ergab dieses Pilotexperiment keinen Anhalt für die hypothetisierte Hepatotoxizität von EmRNASET2.

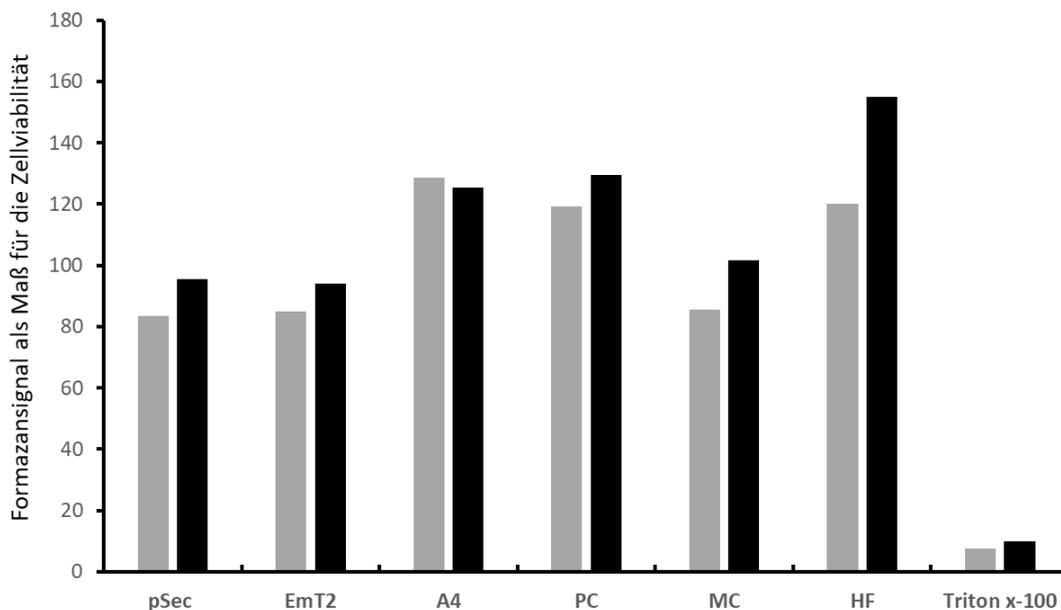


Abbildung 15. Hepatotoxizitätsprüfung über WST-1 Assay: Zellviabilität von Hep3B-Zellen relativ zur DMEM-GlutaMAX-10%FBS-Kontrolle nach Exposition mit verschiedenen Zellkulturüberständen. Exposition 8 h nach Aussäen von 5000 Zellen/Well in 96-Well-Platte mit 20 µL (grau) oder 40 µL (schwarz) Ultrafiltrat von Überstand EmRNASET2-produzierender HEK-Zellen (EmT2) oder mit leerem Vektor transfizierter Kontrolle (pSec), Überstand aus Primärzellkultur, Tag 6 nach Isolation, (PC) und Metazestodenkultur (MC) sowie Hydatidenflüssigkeit (HF), alle Isolat H95. Negativkontrolle: A4 Medium (A4). Positivkontrolle: Triton x-100. Gesamtvolumen 200 µL/Well. Zugabe von in DMEM 1:1 verdünntem WST-1 Reagenz (20 µL) 60 h nach Exposition. Das spektralphotometrische Formazan-Signal dient hier als Maß für die Zellviabilität. Messung der Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader (3 Wells pro Bedingung, Bestimmung des Mittelwerts) sofort nach Zugabe von WST-1 (0 h –Wert) und nach 3 h, Subtraktion der Absorption bei Referenzwellenlänge (620 nm), Subtraktion des 0h-Wertes vom 3h-Wert, Angabe dieser Werte relativ zur DMEM-GlutaMAX-10%FCS-Medium-Kontrolle.

3.6 Vergleich von EmRNASET2 mit T2-RNasen anderer Helminthen (*in silico*)

Unter der Hypothese, dass

- a) nicht alle T2-RNasen von Helminthen immunmodulatorisch sind (und stattdessen z.B. Aufgaben im Nukleotidmetabolismus einnehmen, s. Kap. 1.5) und
- b) immunmodulatorische T2-RNasen sich von den anderen hinsichtlich *in silico* vorhersagbarer Eigenschaften wie Ladung, N-Glykosylierung, Vorliegen eines Signalpeptids und Konservierung der katalytisch aktiven Regionen unterscheiden

wurde eine Auswahl von T2-RNasen bezüglich der o.g. Eigenschaften verglichen, mit dem Ziel, das immunmodulatorische Potential von EmRNASET2 dadurch genauer einschätzen zu können.

Für den Vergleich wurden einerseits omega-1 und die T2-RNasen der Trematoden *S. japonicum* und *Clonorchis sinensis* ausgewählt, denen eine omega-1-ähnliche immunmodulatorische Wirkung zugeschrieben wird (Ke et al., 2017; Xu et al., 2013), andererseits wurden T2-RNasen anderer Helminthen (mit bisher unbekannter Funktion) eingeschlossen. Letztere wurden mittels BLAST von omega-1 gegen die Datenbanken von NCBI, WormBase und GeneDB identifiziert, wobei eine Auswahl aus Vertretern von Zestoden, Trematoden und Nematoden getroffen wurde. Gelegentlich wurden für eine Spezies mehrere T2-RNasen identifiziert. Im Fall von *S. mansoni* wurde die Redundanz der Treffer mit Hilfe der Software cd-hit (Kap. 2.2) von 12 auf 4 reduziert; von diesen wurden 2 ausgeschlossen, da ihnen die katalytisch aktive Region CAS-1 fehlt (CCD74616.1, CCD74612.1). Aus demselben Grund wurden auch weitere T2-RNasen von *E. granulosus* (CDS24092.1) und *Brugia malayi* (CRZ25160.1) ausgeschlossen. Aus den T2-RNasen von *S. japonicum* wurde nur die als immunmodulatorisch beschriebene eingeschlossen.

Die T2-Ribonuklease-Domänen (pfam PF00445) wurden über SMART-Analyse identifiziert und anschließend mittels MUSCLE aligniert (Abb. 16, Kap. 2.2). Hier zeigt sich, dass die große Mehrheit der untersuchten Proteine die an der Katalyse beteiligten konservierten Histidine (Position 44, 97, 102) besitzt. Eine Mutation in His97, das an der Stabilisierung eines Intermediates beteiligt ist, wird mit einer reduzierten katalytischen Aktivität in Verbindung gebracht (Ambrosio et al., 2014; MacIntosh, 2011). Sie ist in der Sequenz der T2-RNase von *Taenia saginata* zu erkennen. Die als immunmodulatorisch eingestufte T2-RNase von *S. japonicum* (Sj) weist Mutationen in allen drei für die Katalyse entscheidenden Histidinen auf, was einen Verlust der katalytischen Funktion erwarten lässt. Die T2-RNasen der untersuchten Filarien fallen durch zusätzliche Aminosäuren zwischen zwei konservierten Cysteinen (Position 13 und 32) auf.

Sie sind als Nematodenproteine im auf dem Alignment basierenden phylogenetischen Baum klar von den T2-RNasen der Plattwürmer separiert (Abb. 17). Auffallend ist, dass die zweite T2-RNase von *S. mansoni* (Sm2), nicht aber omega-1, mit den RNasen der Zestoden clustert. Diese Beobachtung ließ sich auch bei Verwendung eines anderen Algorithmus (Neighbour Joining) oder unter Einsatz einer anderen Auswahl von Sequenzen replizieren (nicht gezeigt). Omega-1 und Sj1 von *S. japonicum* clustern

dagegen nicht, obwohl beide von Schistosomeneiern exprimiert werden (Fitzsimmons et al., 2005; Ke et al., 2017).

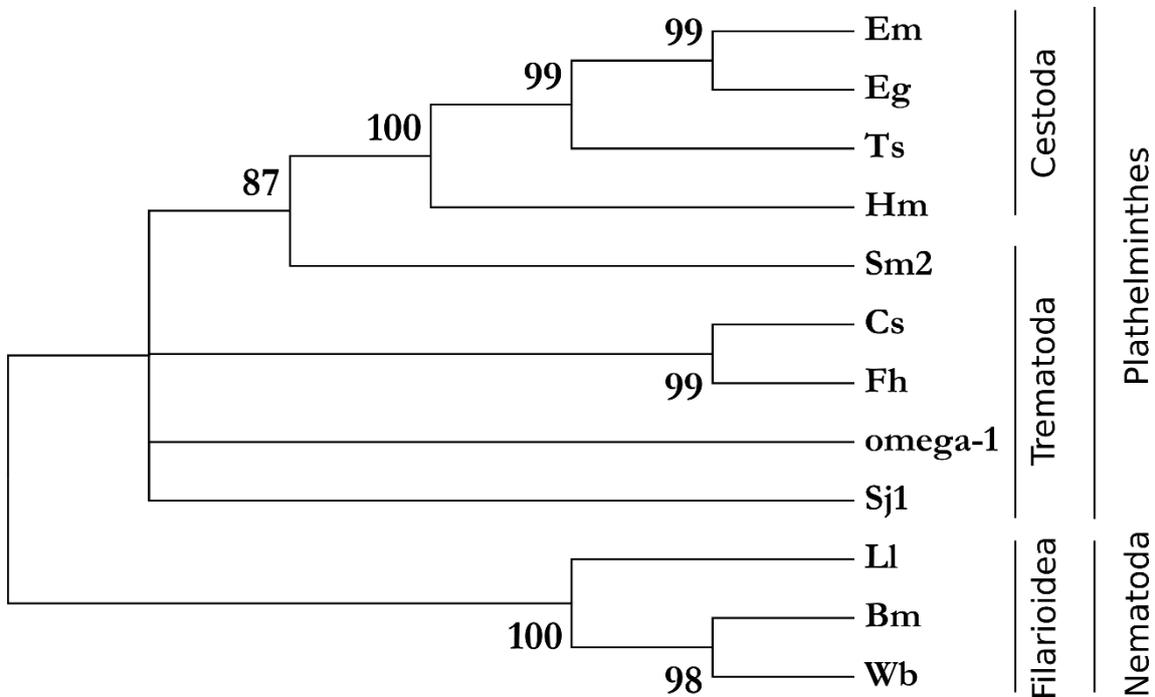


Abbildung 17. Phylogenetischer Baum von T2-RNasen verschiedener Helminthen. Basierend auf dem Alignment Abb. 16, Abkürzungen siehe dort. Erstellt mit MEGA7, Maximum-Likelihood Methode, LG+G+I Modell (das optimale Modell wurde zuvor mit MEGA7 ermittelt). Bootstrap-Prozentzahlen sind angegeben (1000 Wiederholungen), Verzweigungen mit Bootstrap-Werten < 70% sind nicht gezeigt.

Neben der katalytischen Aktivität ist die Funktion von omega-1 auch von seiner N-Glykosylierung abhängig, die eine Aufnahme in DCs über den Mannoserezeptor ermöglicht (Kap 1.5). Der Vergleich der hier ausgewählten T2-RNasen zeigt, dass bis auf die RNase von *B. malayi* alle Proteine (der Vorhersage über NetNGlyc nach) glykosyliert sind. Die beiden für omega-1 vorhergesagten Glykosylierungsstellen sind experimentell bestätigt (Everts et al., 2012); von den hier untersuchten Molekülen besitzt EmRNASET2, neben den T2-RNasen von *E. granulosus* und *T. saginata*, die größte Anzahl (4) an vorhergesagten N-Glykosylierungsstellen (Tab. 6).

Außerdem begünstigt positive Ladung von Proteinen deren Aufnahme in Zellen. Im Vergleich zytotoxischer T2-RNasen wurde ein Zusammenhang zwischen Ladung und Toxizität beschrieben – je höher der isoelektrische Punkt (pI), desto ausgeprägter die

toxische Wirkung (Makarov und Ilinskaya, 2003). Mit einem pI von 9,2 ist omega-1 unter physiologischen Bedingungen positiv geladen. Ebenfalls kationisch sind die T2-RNasen der hier untersuchten Filarien mit etwas geringerem pI (Tab. 6). Der pI der anderen hier untersuchten T2-RNasen, einschließlich EmRNASET2 und der beiden als immunmodulatorisch beschriebenen RNasen, liegt jedoch unter 7,4.

Schließlich kann über die Vorhersage von Signalpeptiden eine grobe Einschätzung erfolgen, ob sich die untersuchten Proteine in den ESPs der Parasiten wiederfinden könnten. Die große Mehrheit der untersuchten T2-RNasen scheint mit Signalpeptid exprimiert zu werden, nur die für die T2-RNasen von *E. granulosus* und *C. sinensis* ließ sich anhand der hier verwendeten Sequenzen keines identifizieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die als immunmodulatorisch beschriebenen T2-RNasen (omega-1, Cs, Sj) in den hier untersuchten Eigenschaften, anders als erwartet, nicht überzeugend ähneln. Möglicherweise erzielen sie den immunmodulatorischen Effekt auf unterschiedliche Weise (Sj bspw. ohne katalytische Aktivität) – oder experimentelle Limitationen haben zu einer vorschnellen Einstufung als Immunmodulatoren geführt (s. Diskussion). Neue Hinweise auf eine funktionelle Verwandtschaft von EmRNASET2 und omega-1 ergaben sich nicht – im Gegenteil: Die Tatsache, dass Sm2 (und nicht omega-1) mit den T2-RNasen der untersuchten Zestoden clustert, kann dahingehend interpretiert werden, dass omega-1 möglicherweise durch Genduplikation (nach Aufspaltung der Plattwürmer) entstanden ist und neue, immunmodulatorische Funktionen akquiriert hat, während Sm2 und EmRNASET2 weiterhin ihre ursprüngliche Rolle (z.B. im Nukleotidmetabolismus) einnehmen.

Tabelle 6. Ausgewählte T2-RNasen und ihr isoelektrischer Punkt (pI), Abkürzungen der linken Spalte s. Legende von Abb. 16. Anzahl der über NetNGlyc 1.0 vorhergesagten N-Glykosylierungsstellen (N-Glyk.), Signalpeptide mit SignalP vorhergesagt (nicht gezeigt; kein Signalpeptid bei Eg und Cs), Berechnung von pI und Molekulargewicht (ohne Signalpeptid) des Proteins mit ExPASy, Anzahl der Aminosäuren (aa) (in Klammern: mit Signalpeptid).

	pI	N-Glyk.	kDa	aa (mit Signalpeptid)
Omega-1	9,22	2	24,3	202 (225)
Wb	9,10	2	30,8	263 (284)
Bm	8,92	0	30,7	263 (286)
Ll	8,03	2	34,2	289 (303)
Sm2	7,28	3	29,4	250 (270)
Em	6,80	4	27,6	237 (260)
Hm	6,63	2	28,1	239 (261)
Eg	6,49	4	63,6	561
Ts	6,47	4	20,6	177 (195)
Fh	6,00	3	25,2	217 (239)
Sj1	5,97	3	25,4	221 (240)
Cs	5,65	1	26,6	229

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern keinen eindeutigen Anhalt für die Hypothese, dass EmRNASET2, analog zu omega-1 aus *S. mansoni*, Effekte auf die Reifung dendritischer Zellen hat. Auch lieferte ein Pilotexperiment mit Hep3B-Zellen keinen Anhalt für eine Hepatotoxizität von EmRNASET2, wie sie für omega-1 beschrieben ist. Einerseits könnten methodische Gründe als Erklärung dafür dienen, dass erwartete Effekte von EmRNASET2 nicht unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen zu beobachten waren. Andererseits finden sich in der Zusammenschau der Ergebnisse, *in-silico*-Untersuchungen eingeschlossen, und der aktuellen Literatur auch gute Gründe für die Annahme, dass EmRNASET2 nicht die gleichen Funktionen besitzt wie omega-1. Beide Aspekte werden im Folgenden diskutiert.

4.1 Experimentelle Limitationen: Die Methoden dieser Arbeit und ähnlicher Untersuchungen zur Funktion von T2-RNasen im Vergleich

Die funktionelle Untersuchung von EmRNASET2 in dieser Arbeit basiert in erster Linie auf dem Einsatz von rekombinant hergestelltem Protein in Überständen transfizierter HEK-Zellen. Eine genaue Quantifizierung des rekombinanten Proteins war angesichts des Vorliegens anderer Proteine im Serum-haltigen Kulturmedium nicht möglich. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Konzentration von recEmRNASET2 im Überstand sehr gering war, da dessen Nachweis nicht direkt im Western Blot, sondern erst nach Immunpräzipitation gelang. Womöglich war also die Menge des eingesetzten Proteins zu gering, um einen Effekt nachweisen zu können. Künftige Untersuchungen könnten von folgenden Maßnahmen profitieren: Einsatz einer für Expression in HEK-Zellen Codon-optimierten DNA-Sequenz, Selektion stabil-transfizierter Zellen über mehrere Wochen, Produktion des rekombinanten Proteins in großen Mengen Serum-freien Mediums und anschließende Aufreinigung, sodass schließlich ausreichende Mengen des Proteins (in PBS) zur Verfügung stehen (vgl. dazu Benke (2017)). Allerdings hat in manchen Fällen auch die wesentlich einfachere Verwendung konditionierten Mediums zum Nachweis immunmodulatorischer Funktionen von Parasitenproteinen geführt, so zum Beispiel bei der Identifikation des für den TGF- β -ähnlichen Effekt von *Heligmosomoides polygyrus* verantwortlichen Proteins (Johnston et al., 2017) oder bei EmTIP (s. Kap. 1.3), wobei

letztgenanntes auch erst nach Immunpräzipitation im Überstand nachweisbar war (Nono et al., 2014).

Bei der Untersuchung von omega-1 wurde sowohl natürliches als auch rekombinantes Protein eingesetzt. Die Expression erfolgte hier ebenfalls in HEK-Zellen über den Vektor pSecTag2, allerdings wurde das Protein anschließend aus den Überständen mittels chromatographischer Verfahren aufgereinigt. Rekombinantes omega-1 zeigte dabei die gleichen Effekte wie das natürliche Protein, jedoch etwas schwächer ausgeprägt (Everts et al., 2012; Everts et al., 2009). Die schwächere Wirkung des rekombinanten Proteins könnte durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen bedingt sein; es gibt dabei Anhalt für eine unterschiedlich beschaffene Glykosylierung (Everts et al., 2009). Wie generell bei der Untersuchung rekombinanter Proteine lässt sich auch für recEmRNASET2 nicht ausschließen, dass die Expression in HEK-Zellen zu einem Funktionsverlust durch Unterschiede der posttranslationalen Modifikationen oder durch inkorrekte Faltung geführt hat.

Rekombinantes omega-1 hatte bereits ab einer Konzentration von 500 ng/ml signifikante Effekte auf DCs (Everts et al., 2012; Everts et al., 2009). Diese Konzentration reichte auch für ähnliche Wirkungen der rekombinant in *Pichia pastoris* hergestellten T2-RNase von *C. sinensis* auf DCs aus (Xu et al., 2013). Dagegen setzten Ke et al. (2017) 40 µg/ml ihrer rekombinant in *E. coli* hergestellten T2-RNase von *S. japonicum* ein und verglichen den Effekt mit dem der gesamten löslichen Ei-Antigene (SEA) in derselben Konzentration. Fraglich ist, ob man dadurch der Wirkung des entsprechenden natürlichen Proteins nahekommt, das als einer von vielen Bestandteilen von SEA viel geringer konzentriert sein dürfte. Zudem konnten nicht alle mit diesem Protein *in vitro* erzielten Effekte (z.B. LPS-induzierte IL-12 Produktion von DCs) dadurch untermauert werden, dass umgekehrt die Depletion des Proteins aus SEA dessen Effekt reduziert. Diese Überlegungen zeigen, dass die Aussagekraft funktioneller Untersuchungen mit rekombinantem Protein nicht nur durch zu geringe, sondern auch durch zu hohe Konzentrationen eingeschränkt wird. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass die Auswirkungen einer Depletion der von Xu et al. (2013) untersuchten RNase in den ESPs des Parasiten nicht beschrieben wurden, während für omega-1 zumindest *in vitro* gezeigt wurde, dass dessen Depletion zu einer klaren Reduktion der Th2-induzierenden Wirkung von SEA führt (Everts et al., 2009).

In dieser Arbeit wurde die Konzentration von recEmRNASET2 im HEK-Zell Überstand durch Ultrafiltration erhöht, wobei sich allerdings auch die Konzentrierung der Serumproteine des Mediums nicht vermeiden ließ. Als Kontrolle entscheidend war daher der Einsatz ebenfalls konzentrierter Überstände von mit leerem Vektor behandelten HEK-Zellen. Als ideale Kontrolle wäre die nur in einer Aminosäure verschiedene CAS-mutierte Version des rekombinanten Proteins in Frage gekommen, eine von katalytischer Aktivität abhängige Funktion von EmRNASET2 vorausgesetzt. Bei Ausbleibendem Nachweis der katalytischen Aktivität (und der Wirkung auf DCs) wurde auf den Einsatz dieser Kontrolle verzichtet. Xu et al. (2013) setzten ein anderes rekombinantes Parasitenprotein als Kontrolle ein, während Ke et al. (2017) PBS verwendeten und damit einen Einfluss ihres bakteriellen Expressionssystems nicht ausschließen können.

Neben der Wahl einer geeigneten Kontrolle stellt sich bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit DCs außerdem die Frage, ob (und wenn ja wie lange) nach der Exposition mit Parasitenproteinen mit der Zugabe von LPS gewartet wird. Für omega-1 war gezeigt worden, dass es nach 1 h aufgenommen wird und nach 2 h mit RNA in der Zelle kolokalisiert (Everts et al., 2012). Falls Ähnliches auch auf EmRNASET2 zutrifft, war zu erwarten, dass sich die Effekte der RNase (Inhibition der Proteinexpression durch Degradierung von RNA) in der „LPS-nach-90-min“ Bedingung deutlich zeigen. Um eine Wirkung von EmRNASET2 im Falle eines von omega-1 verschiedenen Mechanismus nicht zu übersehen, wurden dem rekombinanten Protein in einer zweiten Versuchsbedingung 24 h Zeit gelassen, eine mögliche Wirkung auf DCs zu entfalten, bevor diese LPS ausgesetzt wurden. Auch Nono et al. (2012) hatten DCs und Larven von *E. multilocularis* in einem Transwell-System für 24 h ko-kultiviert, bevor sie dann mit LPS stimulierten und nach weiteren 48 h den Einfluss von ESPs auf Reifung und IL-12-Produktion nachwiesen. Unklar bleibt, wie groß der Einfluss des Zeitpunktes der LPS-Zugabe für die Resultate dieser *in vitro* Versuche mit *E. multilocularis* ESPs ist. Möglicherweise sind die Effekte ähnlich robust wie bei Überständen von *Mesocostoides corti*, die die IL-12 Produktion inhibieren, egal ob sie gleichzeitig, 24 h vorher oder sogar erst 24 h nach LPS-Stimulation hinzugegeben werden (Vendelova et al., 2016a).

Während in Transwell-Versuchen ESPs (darunter EmRNASET2) über den gesamten Zeitraum exprimiert werden, könnte die einmalige Gabe von recEmRNASET2 zu Beginn nicht ausreichend gewesen sein für den Nachweis seiner Wirkung – vielleicht ist das

Protein bei 37 °C auch nicht besonders stabil. Wahrscheinlich konnte der im Transwell-System beobachtete Effekt daher auch nicht (immer) mit den in dieser Arbeit verwendeten Überständen aus der Kultur von Metazestoden oder Primärzellen repliziert werden. In anderen Untersuchungen wurden die Überstände von Metazestoden vor Einsatz auf DCs konzentriert (Mejri et al., 2011a).

Eine zu geringe Konzentration der ESPs könnte auch Grund dafür sein, dass keine hepatotoxische Wirkung beobachtet werden konnte. Ebenfalls möglich ist, dass die hier untersuchte Hep3B-(Tumor-)Zelllinie relativ unempfindlich gegenüber hepatotoxischen Parasitensubstanzen ist. Allerdings hatten Überstand aus Metazestodenkultur und Hydatidenflüssigkeit von *E. multilocularis* auch keinen toxischen Effekt auf primäre Rattenhepatozyten (Lin et al., 2009). Der in dieser Arbeit angedeutete viabilitätsfördernde Effekt (z.B. von Hydatidenflüssigkeit, Abb. 15) ist ebenfalls vereinbar mit der Hypothese eines initial wachstumsfördernden und erst im weiteren Verlauf toxischen/ Apoptose-induzierende Effekts von *E. multilocularis* auf Hepatozyten, wobei hier nicht klar gezeigt wurde, dass die späten Effekte tatsächlich auf toxischen Parasitenprodukten und nicht auf sich im Zeitverlauf erschöpfenden Reparaturvorgängen beruhen (Zhang et al., 2012).

Über Immunopräzipitation (IP) konzentriertes Protein stand aufgrund des experimentellen Aufwands nur für wenige Fragestellungen zur Verfügung. Die Reinheit des Proteins wäre vor allem bei der Frage, ob AE-Patienten Antikörper gegen EmRNASET2 bilden (Kap. 3.3.3), von Vorteil gewesen, hätte aber eine zu große Menge an Protein erfordert. So wurde die IP nur für die anschließende Beurteilung der katalytischen Aktivität eingesetzt. Im Aktivitätsgel konnte dabei trotz Vorhandensein der für die Katalyse entscheidenden konservierten Aminosäuren in CAS-1 und CAS-1 (s. Alignment Abb. 16) keine katalytische Aktivität von EmRNASET2 festgestellt werden. Da nicht nur das rekombinante Protein, sondern auch natürliche EmRNASET2 aus Primärzellüberstand untersucht wurde, kann das Fehlen der enzymatischen Aktivität nicht auf eine mögliche aberrante Konformation oder posttranslationale Modifikation durch Expression in HEK-Zellen zurückgeführt werden. Wenn EmRNASET2 katalytische Aktivität besitzt, lag es also an den experimentellen Bedingungen, dass diese nicht nachgewiesen werden konnte.

Sowohl die in dieser Arbeit eingesetzte Zymographie als auch die entsprechenden Untersuchungen von omega-1 durch Fitzsimmons et al. (2005) und Everts et al. (2009) basieren auf einem von Blank et al. (1982) entwickelten Verfahren. Das Vorhandensein von Banden in einem für Serum-RNasen typischen Muster (s. Abb. 14) spricht dafür, dass die Methode auch unter den für diese Arbeit leicht modifizierten Bedingungen zum Nachweis von RNase-Aktivität geeignet ist. In dieser Arbeit wurde das Aktivitätsgel für die enzymatische Reaktion analog zu Blank et al. (1982) bei 37 °C und pH 7,4 inkubiert (Tab. 7); zudem wurde der Reaktion mit 170 min vergleichsweise viel Zeit eingeräumt. Für den Nachweis der RNase-Aktivität von omega-1 wurde eine etwas höhere Temperatur (51 °C) und ein geringfügig niedrigerer pH-Wert (7,0) gewählt (Fitzsimmons et al., 2005). Diese Inkubationsbedingungen liegen somit etwas näher an den bisher für einige T2-RNasen beschriebenen Wirkoptima (45 – 61 °C, pH 4,0 – 6,0. Deshpande und Shankar (2002)). Ob diese geringfügigen Unterschiede dafür verantwortlich sind, dass keine RNase-Aktivität für EmRNASET2 nachgewiesen wurde, ist jedoch fraglich. Denkbar wäre noch, dass das Enzym durch das für dieses Verfahren nötige kurzzeitige Erhitzen auf 100 °C in Probenpuffer (vor dem Beladen des Gels, s. Kap. 2.5.4) seine Aktivität eingebüßt hat und somit eine geringere Hitzestabilität als omega-1 besitzt.

Tabelle 7. Inkubationsbedingungen des RNase-Aktivitätsgels. Vergleich der von Fitzsimmons et al. (2005) und Blank et al. (1982) gewählten Parameter mit denen aus dieser Arbeit (Benke).

	Fitzsimmons	Blank	Benke
Temperatur [°C]	51	37	37
Inkubationsdauer [min]	60	90	170
pH	7,0	7,4	7,4

Die Untersuchung der RNasen im Aktivitätsgel hat den Vorteil, dass die katalytische Aktivität einer oder mehrerer Banden zugeordnet werden kann, wodurch die Gefahr falsch positiver Ergebnisse durch Kontaminanten anderen Molekulargewichts reduziert wird. Der von Xu et al. (2013) gewählte einfache Ansatz (rekombinante RNase mit RNA bei 37 °C inkubieren und anschließend die Degradation von RNA nach Gelelektrophorese zeigen) kann allenfalls als Hinweis auf eine mögliche RNase-Aktivität gewertet werden, da durch Zugabe von RNase-Inhibitor in der Negativkontrolle auch kontaminierende

RNasen inhibiert werden und in der anderen Negativkontrolle (nicht in *P. pastoris* exprimiertes) BSA verwendet wurde. Ähnlich verhält es mit der Untersuchung der RNase-Aktivität einer T2-RNase von *S. japonicum* (Ke et al., 2017), die trotz der mutierten CAS-Regionen (Abb. 16, Sj1) positiv ausfiel. Vergleichbare Verfahren kamen daher in dieser Arbeit nicht zum Einsatz.

Abschließend lässt sich feststellen, dass experimentelle Hürden dazu geführt haben könnten, dass eine mögliche omega-1-ähnliche Funktion von EmRRNASET2 nicht festgestellt werden konnte. Umgekehrt ist auch die Wahl einiger experimenteller Bedingungen kritisch zu sehen, die zur Feststellung dieser Funktionen bei T2-RNasen anderer Helminthen geführt haben.

4.2 Argumente gegen eine funktionelle Verwandtschaft von EmRNASET2 und omega-1 sowie abschließende Bemerkungen

Da sich in nahezu jedem eukaryotischen Genom mindestens ein für eine T2-RNase codierendes Gen findet (MacIntosh, 2011), kann die Identifikation von EmRNASET2 allein noch nicht als Hinweis auf eine funktionelle Verwandtschaft zu omega-1 gewertet werden. Bestimmte Proteineigenschaften wurden mit der Funktion von omega-1 und anderer T2-RNasen in Zusammenhang gebracht, darunter katalytische Aktivität, Glykosylierung und isoelektrischer Punkt (Kap. 3.6). Umgekehrt könnte also die Beurteilung dieser Eigenschaften bei EmRNASET2 erste Rückschlüsse auf die biologische Funktion dieses Proteins zulassen.

Obwohl EmRNASET2 keine Mutationen in den für die Katalyse wichtigen konservierten Regionen CAS1 und CAS2 aufweist (Abb. 16), konnte eine katalytische Aktivität im negativen Zymogramm nicht gezeigt werden (Kap. 3.5.2). Möglicherweise hat EmRNASET2, z.B. aufgrund einer durch seine Konformation bedingte Unzugänglichkeit der aktiven Zentren, tatsächlich keine katalytische Aktivität. Dies spräche dann gegen eine omega-1-ähnliche Th2-induzierende Wirkung, die von der enzymatischen Aktivität abhängig ist (Everts et al., 2012; Steinfelder et al., 2009), schliesse aber andere funktionelle Parallelen zu omega-1 nicht aus: So ist die ebenfalls für omega-1 beschriebene (aber nicht in dieser Arbeit untersuchte) Foxp3-Induktion in T-Helferzellen

und Steigerung der IL-1 β -Sekretion durch Makrophagen bisher nicht mit dessen RNase-Aktivität in Verbindung gebracht worden (Ferguson et al., 2015; Zacccone et al., 2011).

Zur Ausführung seiner von der RNase-Aktivität abhängigen Funktionen muss omega-1 ins Innere der DCs gelangen. Seine N-Glykosylierung ermöglicht die Aufnahme über den Mannoserezeptor (Everts et al., 2012). Das Vorliegen von N-Glykosylierungsstellen bei EmRNASET2 (und den meisten anderen in Kap. 3.6 untersuchten T2-RNasen) genügt jedoch nicht, um von einer ähnlichen Interaktion des Proteins mit dem Mannoserezeptor auszugehen, da es hierbei auch auf die Beschaffenheit der Glykosylierung ankommt. Wahrscheinlich trägt auch die positive Ladung von omega-1 zu dessen Aufnahme in die Zelle bei. Dafür spricht die Beobachtung, dass eine Kationisierung von Proteinen deren Internalisierung in Zellen unterstützt und dass die (vor allem von einer effizienten Aufnahme in die Zelle abhängige) Zytotoxizität von RNasen besonders stark bei positiv geladenen Enzymen ausgeprägt ist (Futami et al., 2001; Makarov und Ilinskaya, 2003). Möglicherweise erlaubt die positive Ladung von omega-1 eine vom Mannoserezeptor unabhängige zytotoxische Wirkung auf Hepatozyten. Der große Unterschied zwischen den isoelektrischen Punkten von EmRNASET2 und omega-1 (6,8 und 9,2. Tab. 6) liefert folglich ein weiteres Argument gegen eine funktionelle Verwandtschaft der beiden Proteine.

Gegen diese Argumentation scheinen die Beobachtungen von Xu et al. (2013) und Ke et al. (2017) zu sprechen, die omega-1-ähnliche immunmodulatorische Funktionen für die T2-RNasen von *C. sinensis* und *S. japonicum* nahelegen, obwohl diese Proteine die niedrigsten isoelektrischen Punkte (beide < 6) der in Kap. 3.6 verglichenen T2-RNasen aufweisen. Bei der T2-RNase von *S. japonicum* (Sj1 im Alignment Abb. 16) muss aufgrund von Mutationen außerdem von einem Verlust der katalytischen Funktion ausgegangen werden, auch wenn sich das nicht mit den Beobachtungen der Autoren deckt. Womöglich sind die beobachteten Effekte, falls replizierbar, auf einen von omega-1 verschiedenen Wirkmechanismus zurückzuführen.

Im Übrigen deckt sich die durch die phylogenetische Analyse von Xu et al. (2015) suggerierte nahe Verwandtschaft der T2-RNasen von *C. sinensis* und *E. multilocularis* (auf Bootstrap-Werten ≤ 40 % beruhend) nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit (Abb.

17), es besteht also auch kein besonderer Anhalt für ähnliche immunmodulatorische Funktionen von EmRNASET2.

Die Untersuchung der Expression von EmRNASET2 offenbart weitere Unterschiede zu omega-1. Während die Expression von omega-1 auf Eier von *S. mansoni* beschränkt ist (Fitzsimmons et al., 2005), wird EmRNASET2 von allen Larvenstadien und sogar vom adulten Wurm exprimiert (Kap. 3.3.1). Auch das relativ niedrige Expressionsniveau (s. Abb. 7) von EmRNASET2 spricht nicht für eine Rolle als zentraler Immunmodulator.

Außerdem wurde bei *E. multilocularis* nur eine T2-RNase identifiziert, *S. mansoni* besitzt dagegen neben omega-1 noch weitere Vertreter dieser Proteinfamilie (s. Kap. 3.6). Interessanterweise clustert EmRNASET2 im phylogenetischen Baum nicht mit omega-1, sondern mit einer anderen T2-RNase von *S. mansoni* (Sm2, Abb. 17). Diese Beobachtung könnte dahingehend interpretiert werden, dass EmRNASET2 und Sm2 „gewöhnliche“ Funktionen, z.B. im Nukleotidmetabolismus („housekeeping“), übernehmen, während omega-1 im Laufe der Evolution andere, immunmodulatorische Funktionen übernommen hat. Unterstützt wird diese Vermutung durch Transkriptomdaten von Sm2 (Smp_158430), die darauf hindeuten, dass die Expression, ähnlich wie bei EmRNASET2, nicht auf ein Stadium des Parasiten beschränkt ist: So wird Sm2 von Cercarien, Schistosomula und adulten Würmern, nicht aber von Eiern exprimiert (Anderson et al., 2015; Protasio et al., 2012).

Andererseits ist auch denkbar, dass *E. multilocularis*, obwohl er nur eine T2-RNase besitzt, funktionelle Variabilität über alternatives Spleißen herstellt. Dies könnte auch als Erklärung für die beobachtete abweichende Länge der amplifizierten *emRNASET2*-cDNA in Primärzellen dienen (Kap. 3.3.1). Zudem unterscheiden sich die Larvenstadien hinsichtlich der Lokalisation des Proteins: In Metazestoden findet es sich hauptsächlich im Lysat und nicht (bzw. kaum) im Überstand, während es sich bei Primärzellen anders herum verhält (Abb. 9).

Das wiederum erklärt vielleicht, warum keine eindeutigen Hinweise auf eine Antikörperbildung gegen EmRNASET2 durch AE-Patienten gefunden werden konnten (Kap. 3.3.3): Möglicherweise tritt die RNase nur zu Beginn der Infektion mit Wirtszellen in Kontakt und verbleibt im chronischen Stadium in den Zellen der Metazestoden.

Omega-1 wurde dagegen als wichtiges Antigen von *S. mansoni* beschrieben (Dunne et al., 1981).

Dass EmRNASET2 vor allem von Primärzellen sezerniert wird, könnte als Hinweis auf eine immunmodulatorische Funktion aufgefasst werden, da dieses frühe Stadium vor der Ausbildung einer schützenden Laminatschicht sehr vulnerabel gegenüber Angriffen des Immunsystems ist und das Überleben des Parasiten zu diesem Zeitpunkt daher ganz besonders auf aktive Immunmodulation angewiesen ist. Allerdings passt die Beobachtung auch zur Annahme einer „housekeeping“ Funktion: Gerade während Wachstum und Differenzierung werden entsprechende T2-RNasen besonders stark exprimiert (Deshpande und Shankar, 2002).

Da *E. multilocularis* wichtige Gene für die Synthese von Purinen fehlen, ist er auf eine Aufnahme von Nukleobasen aus seiner Umgebung angewiesen (Brehm und Koziol, 2017; Tsai et al., 2013). In diesem Zusammenhang könnte EmRNASET2 als sezernierte Ribonuklease von Bedeutung sein, indem sie Wirts-RNA hydrolysiert und somit für die Verwendung durch den Parasiten nutzbar macht. Eine solche Funktion wurde bereits für T2-RNasen von *Entamoeba histolytica*, einem Nukleobasen-auxotrophen humanpathogenen Einzeller, vorgeschlagen (McGugan et al., 2007).

Eine „Versorgungsfunktion“ würde eine zusätzliche immunmodulatorische Funktion von EmRNASET2 natürlich nicht ausschließen. Es ist gut möglich, dass mit größeren Mengen rekombinanten Proteins ein signifikanter Effekt auf die Reifung und IL-12 Produktion von DCs nachzuweisen wäre, zumal bereits bei den in dieser Arbeit eingesetzten Mengen ein (nicht signifikanter) Trend in die erwartete Richtung beobachten ließ (Kap. 3.5.1). Doch selbst dann sollte nicht voreilig von *in-vitro*-Untersuchungen auf die Rolle des Proteins *in vivo* geschlossen werden. Die angesichts der Wirkung von omega-1 geweckte Erwartungshaltung darf nicht dazu führen, die naheliegenden Funktionen dieser Proteinfamilie in Helminthen zu übersehen.

Obwohl die Ergebnisse dieser Arbeit nicht sicher ausschließen können, dass EmRNASET2 omega-1-ähnliche Funktionen besitzt, scheint es doch wahrscheinlicher, dass ihr nicht die gleiche zentrale Rolle für die Immunregulation zukommt. Untersuchungen über die durch Parasitenextrakte von *S. mansoni* und *E. multilocularis* ausgelöste Freisetzung von IL-4 durch basophile Granulozyten können als weiteres

Beispiel dafür dienen, dass sich diese Parasiten zwar hinsichtlich ihrer immunmodulatorischen Effekte gleichen, diese aber nicht (zwangsläufig) über verwandte Proteine realisieren: das für den hier untersuchten Effekt verantwortliche Protein des Fuchsbandwurms unterscheidet sich in Größe und biochemischen Eigenschaften deutlich vom IL-4 induzierenden Protein (IPSE) aus *S. mansoni* (Aumüller et al., 2004).

Die Identifikation der immunmodulatorischen Proteine von *E. multilocularis* kann also nicht allein auf den für Schistosomen und andere Plattwürmern gemachten Beobachtungen beruhen. Neue Kandidatenproteine können beispielsweise über Fraktionierung von ESPs mit anschließender massenspektrometrischen Analyse der aktiven (immunmodulatorischen) Fraktionen gewonnen werden, was unlängst für ESPs des nah verwandten Zestoden *M. corti*, der in Serum-freiem Medium kultiviert werden kann, durchgeführt worden ist und in Zukunft zur weiteren Aufklärung der Immunmodulation des Fuchsbandwurms beitragen kann (Vendelova et al., 2016a; Vendelova et al., 2016b).

Was die Untersuchung von T2-RNasen weiterer Helminthen auf omega-1-ähnliche Funktionen betrifft, empfiehlt sich im Vorfeld eine kritische Auseinandersetzung mit den zur Verfügung stehenden Informationen, z.B. über den isoelektrischen Punkt, die Konservierung der für die Katalyse wichtigen Aminosäuren und die Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Anlass zur weitergehenden Charakterisierung von EmRNASET2 gibt ihre mögliche Rolle für die Versorgung des Parasiten mit Purinen. *In vitro* könnte beispielsweise der Frage nachgegangen werden, ob die Zugabe von Antikörpern gegen EmRNASET2 oder ein entsprechender Gen-Knockdown Einfluss hat auf Wachstum und Entwicklung von Primärzellen zu Metazestodenvesikeln. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse könnten am Ende sogar neue therapeutische Ansätze eröffnen – unabhängig von der ursprünglich postulierten Immunregulation.

5 Zusammenfassung

Die alveoläre Echinokokkose ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, die durch tumorartig in der Leber wachsende Larven (Metazestoden) des Fuchsbandwurms ausgelöst wird. Während Th1-dominierte Immunantworten zur Expulsion des Parasiten führen können, sind Th2-Antworten mit chronischer Infektion assoziiert. Über seine exkretorisch-sekretorischen Produkte (ESPs) nimmt *Echinococcus multilocularis* Einfluss auf die Polarisierung der Immunantwort. Allerdings ist bislang nur wenig über die zugrundeliegenden Mechanismen und aktiven Komponenten der ESPs bekannt.

Die Immunmodulation durch Eier des Pärchenegels *Schistosoma mansoni*, der wie *E. multilocularis* zu den Plattwürmern gehört, ist dagegen schon besser charakterisiert. Hier hat omega-1, eine Ribonuklease der T2-Familie, Aufmerksamkeit als starker Induktor von Th2-Antworten und als Hepatotoxin erregt.

Die Fragestellung dieser Arbeit war nun, ob die T2-RNase des Fuchsbandwurms (EmRNASET2) hinsichtlich ihrer Wirkungen auf Zellen des Immunsystems und der Leber Ähnlichkeiten mit omega-1 besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass EmRNASET2 von allen Larvenstadien und auch vom adulten Wurm exprimiert wird. Der Einsatz polyklonaler Antikörper gegen rekombinant in *Escherichia coli* exprimierte recEmRNASET2 ermöglichte den Nachweis des Proteins in den ESPs von Primärzellen, die das frühe Stadium sich entwickelnder Metazestoden darstellen, und, wenngleich geringer ausgeprägt, in ESPs reifer Metazestoden.

Zur Untersuchung einer möglichen immunmodulatorischen Wirkung wurden dendritische Zellen (DCs) aus murinem Knochenmark generiert und mit Überständen recEmRNASET2-produzierender HEK-Zellen exponiert. Diese zeigten im Vergleich zu Überständen von mit leerem Transfektionsvektor behandelten HEK-Zellen keine signifikante Inhibition der LPS-induzierten Reifung und Interleukin-12-Produktion von DCs, wie sie für omega-1 beschrieben ist. Auch ein Pilotexperiment mit der Leberzelllinie Hep3B lieferte keinen Anhalt für eine hepatotoxische Wirkung von EmRNASET2. Somit sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit gegen eine funktionelle Verwandtschaft von EmRNASET2 und omega-1. Unterstützt wird diese Beobachtung durch eine orientierende phylogenetische Untersuchung, in der sich EmRNASET2 näher verwandt zu einer zweiten T2-RNase von *S. mansoni* zeigte. Omega-1 könnte also das Resultat

einer Genduplikation mit anschließender Akquirierung immunmodulatorischer Funktionen sein.

6 Abkürzungen

aa	Aminosäuren
AE	Alveoläre Echinokokkose
BLAST	Algorithmus zum Vergleich von (DNA/ aa-) Sequenzen gegen eine Datenbank (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BMDC	Aus Knochenmark generierte dendritische Zellen
bp	Basenpaare
CCL21	C-C Chemokinligand 21
CCR7	C-C Chemokinrezeptor Typ 7
CD	Cluster of Differentiation (Unterscheidungsgruppen)
DAMP	Schaden-assoziierte molekulare Muster
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EmACT	Activin-Orthologes von <i>E. multilocularis</i>
EmTIP	T-Zell Immunmodulatorisches Protein von <i>E. multilocularis</i>
ESPs	Exkretorisch-Sekretorische Produkte
FCS	Fetales Kälberserum
Foxp3	Transkriptionsfaktor (<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>)
g	Erdbeschleunigung (zur Angabe der relativen Zentrifugalkraft)
IFN	Interferon

IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MC	Metazestoden
MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex II
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Primärzellen
PRR	Pattern-Recognition Rezeptor
Ps	Protoscolices
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSLP	Thymisches stromales Lymphopietin

7 Literatur

- Abdulla, M.H., Lim, K.C., McKerrow, J.H., and Caffrey, C.R. (2011). Proteomic identification of IPSE/alpha-1 as a major hepatotoxin secreted by *Schistosoma mansoni* eggs. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1368.
- Acquati, F., Bertilaccio, S., Grimaldi, A., Monti, L., Cinquetti, R., Bonetti, P., Lualdi, M., Vidalino, L., Fabbri, M., Sacco, M.G., *et al.* (2011). Microenvironmental control of malignancy exerted by RNASET2, a widely conserved extracellular RNase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1104-1109.
- Akagi, K., Murai, K., Hirao, N., and Yamanaka, M. (1976). Purification and properties of alkaline ribonuclease from human serum. *Biochim Biophys Acta* 442, 368-378.
- Ambrosio, L., Morriss, S., Riaz, A., Bailey, R., Ding, J., and MacIntosh, G.C. (2014). Phylogenetic analyses and characterization of RNase X25 from *Drosophila melanogaster* suggest a conserved housekeeping role and additional functions for RNase T2 enzymes in protostomes. *PLoS One* 9, e105444.
- Anderson, L., Amaral, M.S., Beckedorff, F., Silva, L.F., Dazzani, B., Oliveira, K.C., Almeida, G.T., Gomes, M.R., Pires, D.S., Setubal, J.C., *et al.* (2015). *Schistosoma mansoni* Egg, Adult Male and Female Comparative Gene Expression Analysis and Identification of Novel Genes by RNA-Seq. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0004334.
- Armua-Fernandez, M.T., Joekel, D., Schweiger, A., Eichenberger, R.M., Matsumoto, J., and Deplazes, P. (2016). Successful intestinal *Echinococcus multilocularis* oncosphere invasion and subsequent hepatic metacestode establishment in resistant RccHan:WIST rats after pharmacological immunosuppression. *Parasitology* 143, 1252-1260.
- Aumuller, E., Schramm, G., Gronow, A., Brehm, K., Gibbs, B.F., Doenhoff, M.J., and Haas, H. (2004). *Echinococcus multilocularis* metacestode extract triggers human basophils to release interleukin-4. *Parasite Immunol* 26, 387-395.
- Bachmann, M.F., Kopf, M., and Marsland, B.J. (2006). Chemokines: more than just road signs. *Nat Rev Immunol* 6, 159-164.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology* 340, 783-795.

- Benke, D. (2017). Investigating *Heligmosomoides polygyrus* Excretory-Secretory Products for CD24-dependent Binding Activity (Masterarbeit, Universität Würzburg).
- Benvenuti, F. (2016). The Dendritic Cell Synapse: A Life Dedicated to T Cell Activation. *Front Immunol* 7, 70.
- Bjellqvist, B., Hughes, G.J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.C., Frutiger, S., and Hochstrasser, D. (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14, 1023-1031.
- Blank, A., and Dekker, C.A. (1981). Ribonucleases of human serum, urine, cerebrospinal fluid, and leukocytes. Activity staining following electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Biochemistry* 20, 2261-2267.
- Blank, A., Sugiyama, R.H., and Dekker, C.A. (1982). Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels. *Analytical biochemistry* 120, 267-275.
- Bluestone, J.A., and Abbas, A.K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3, 253-257.
- Boubaker, G., Hemphill, A., Huber, C.O., Spiliotis, M., Babba, H., and Gottstein, B. (2015). Prevention and Immunotherapy of Secondary Murine Alveolar Echinococcosis Employing Recombinant EmP29 Antigen. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0003795.
- Bravo, J., Fernandez, E., Ribo, M., de Llorens, R., and Cuchillo, C.M. (1994). A versatile negative-staining ribonuclease zymogram. *Analytical biochemistry* 219, 82-86.
- Brehm, K., and Koziol, U. (2014). On the importance of targeting parasite stem cells in anti-echinococcosis drug development. *Parasite* 21, 72.
- Brehm, K., and Koziol, U. (2017). Echinococcus-Host Interactions at Cellular and Molecular Levels. *Adv Parasitol* 95, 147-212.
- Brehm, K., Wolf, M., Beland, H., Kroner, A., and Frosch, M. (2003). Analysis of differential gene expression in *Echinococcus multilocularis* larval stages by means of spliced leader differential display. *Int J Parasitol* 33, 1145-1159.
- Bresson-Hadni, S., Vuitton, D.A., Bartholomot, B., Heyd, B., Godart, D., Meyer, J.P., Hrusovsky, S., Becker, M.C., Manton, G., Lenys, D., *et al.* (2000). A twenty-year history of alveolar echinococcosis: analysis of a series of 117 patients from eastern France. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12, 327-336.

- Brunetti, E., Kern, P., Vuitton, D.A., and Writing Panel for the, W.-I. (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop* *114*, 1-16.
- Bruschke, C.J., Hulst, M.M., Moormann, R.J., van Rijn, P.A., and van Oirschot, J.T. (1997). Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol* *71*, 6692-6696.
- Budke, C.M., Jiamin, Q., Zinsstag, J., Qian, W., and Torgerson, P.R. (2004). Use of disability adjusted life years in the estimation of the disease burden of echinococcosis for a high endemic region of the Tibetan plateau. *Am J Trop Med Hyg* *71*, 56-64.
- Budke, C.M., White, A.C., Jr., and Garcia, H.H. (2009). Zoonotic larval cestode infections: neglected, neglected tropical diseases? *PLoS Negl Trop Dis* *3*, e319.
- Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* *13*, 227-242.
- Coakley, G., Buck, A.H., and Maizels, R.M. (2016). Host parasite communications- Messages from helminths for the immune system: Parasite communication and cell-cell interactions. *Mol Biochem Parasitol* *208*, 33-40.
- Colley, D.G., Bustinduy, A.L., Secor, W.E., and King, C.H. (2014). Human schistosomiasis. *Lancet* *383*, 2253-2264.
- Coquet, J.M., Rausch, L., and Borst, J. (2015). The importance of co-stimulation in the orchestration of T helper cell differentiation. *Immunol Cell Biol* *93*, 780-788.
- Craig, P. (2003). *Echinococcus multilocularis*. *Curr Opin Infect Dis* *16*, 437-444.
- Cwiklinski, K., Dalton, J.P., Dufresne, P.J., La Course, J., Williams, D.J., Hodgkinson, J., and Paterson, S. (2015). The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biol* *16*, 71.
- Dai, W.J., Waldvogel, A., Siles-Lucas, M., and Gottstein, B. (2004). *Echinococcus multilocularis* proliferation in mice and respective parasite 14-3-3 gene expression is mainly controlled by an alphabeta CD4 T-cell-mediated immune response. *Immunology* *112*, 481-488.
- Davidson, R., Brent, A., and Seale, A. (2014). *Oxford Handbook of Tropical Medicine*, 4 edn (Oxford, UK: Oxford University Press).

Deshpande, R.A., and Shankar, V. (2002). Ribonucleases from T2 family. *Critical reviews in microbiology* 28, 79-122.

Diaz, A., Fernandez, C., Pittini, A., Seoane, P.I., Allen, J.E., and Casaravilla, C. (2015). The laminated layer: Recent advances and insights into *Echinococcus* biology and evolution. *Exp Parasitol* 158, 23-30.

Dunne, D.W., Lucas, S., Bickle, Q., Pearson, S., Madgwick, L., Bain, J., and Doenhoff, M.J. (1981). Identification and partial purification of an antigen (omega 1) from *Schistosoma mansoni* eggs which is putatively hepatotoxic in T-cell deprived mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75, 54-71.

Eckert, J., and Deplazes, P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* 17, 107-135.

Emery, I., Leclerc, C., Sengphommachanh, K., Vuitton, D.A., and Liance, M. (1998). In vivo treatment with recombinant IL-12 protects C57BL/6J mice against secondary alveolar echinococcosis. *Parasite Immunol* 20, 81-91.

Emery, I., Liance, M., Deriaud, E., Vuitton, D.A., Houin, R., and Leclerc, C. (1996). Characterization of T-cell immune responses of *Echinococcus multilocularis*-infected C57BL/6J mice. *Parasite Immunol* 18, 463-472.

Esposito, D., and Chatterjee, D.K. (2006). Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr Opin Biotechnol* 17, 353-358.

Everts, B., Hussaarts, L., Driessen, N.N., Meevissen, M.H., Schramm, G., van der Ham, A.J., van der Hoeven, B., Scholzen, T., Burgdorf, S., Mohrs, M., *et al.* (2012). Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. *J Exp Med* 209, 1753-1767, S1751.

Everts, B., Perona-Wright, G., Smits, H.H., Hokke, C.H., van der Ham, A.J., Fitzsimmons, C.M., Doenhoff, M.J., van der Bosch, J., Mohrs, K., Haas, H., *et al.* (2009). Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *J Exp Med* 206, 1673-1680.

Everts, B., Smits, H.H., Hokke, C.H., and Yazdanbakhsh, M. (2010). Helminths and dendritic cells: sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses. *Eur J Immunol* 40, 1525-1537.

- Fehling, H.J., Gilfillan, S., and Ceredig, R. (1999). Alpha beta/gamma delta lineage commitment in the thymus of normal and genetically manipulated mice. *Adv Immunol* 71, 1-76.
- Ferguson, B.J., Newland, S.A., Gibbs, S.E., Tourlomousis, P., Fernandes dos Santos, P., Patel, M.N., Hall, S.W., Walczak, H., Schramm, G., Haas, H., *et al.* (2015). The *Schistosoma mansoni* T2 ribonuclease omega-1 modulates inflammasome-dependent IL-1beta secretion in macrophages. *Int J Parasitol* 45, 809-813.
- Fitzsimmons, C.M., Schramm, G., Jones, F.M., Chalmers, I.W., Hoffmann, K.F., Grevelding, C.G., Wuhler, M., Hokke, C.H., Haas, H., Doenhoff, M.J., *et al.* (2005). Molecular characterization of omega-1: a hepatotoxic ribonuclease from *Schistosoma mansoni* eggs. *Mol Biochem Parasitol* 144, 123-127.
- Futami, J., Maeda, T., Kitazoe, M., Nukui, E., Tada, H., Seno, M., Kosaka, M., and Yamada, H. (2001). Preparation of potent cytotoxic ribonucleases by cationization: enhanced cellular uptake and decreased interaction with ribonuclease inhibitor by chemical modification of carboxyl groups. *Biochemistry* 40, 7518-7524.
- Galiana, E., Bonnet, P., Conrod, S., Keller, H., Panabieres, F., Ponchet, M., Poupet, A., and Ricci, P. (1997). RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. *Plant physiology* 115, 1557-1567.
- Gelmedin, V., Caballero-Gamiz, R., and Brehm, K. (2008). Characterization and inhibition of a p38-like mitogen-activated protein kinase (MAPK) from *Echinococcus multilocularis*: antiparasitic activities of p38 MAPK inhibitors. *Biochem Pharmacol* 76, 1068-1081.
- Ghedini, E., Wang, S., Spiro, D., Caler, E., Zhao, Q., Crabtree, J., Allen, J.E., Delcher, A.L., Guiliano, D.B., Miranda-Saavedra, D., *et al.* (2007). Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science* 317, 1756-1760.
- Godot, V., Harraga, S., Beurton, I., Deschaseaux, M., Sarciron, E., Gottstein, B., and Vuitton, D.A. (2000). Resistance/susceptibility to *Echinococcus multilocularis* infection and cytokine profile in humans. I. Comparison of patients with progressive and abortive lesions. *Clin Exp Immunol* 121, 484-490.
- Gottstein, B., and Hemphill, A. (1997). Immunopathology of echinococcosis. *Chem Immunol* 66, 177-208.

Gottstein, B., Saucy, F., Deplazes, P., Reichen, J., Demierre, G., Busato, A., Zuercher, C., and Pugin, P. (2001). Is high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild and domestic animals associated with disease incidence in humans? *Emerging infectious diseases* 7, 408-412.

Gottstein, B., Soboslay, P., Ortona, E., Wang, J., Siracusano, A., and Vuitton, D. (2017). Immunology of Alveolar and Cystic Echinococcosis (AE and CE). *Adv Parasitol* 96, 1-54.

Gottstein, B., Wang, J., Boubaker, G., Marinova, I., Spiliotis, M., Muller, N., and Hemphill, A. (2015). Susceptibility versus resistance in alveolar echinococcosis (larval infection with *Echinococcus multilocularis*). *Vet Parasitol* 213, 103-109.

Grenard, P., Bresson-Hadni, S., El Alaoui, S., Chevallier, M., Vuitton, D.A., and Ricard-Blum, S. (2001). Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. *J Hepatol* 35, 367-375.

Guerret, S., Vuitton, D.A., Liance, M., Pater, C., and Carbillet, J.P. (1998). *Echinococcus multilocularis*: relationship between susceptibility/resistance and liver fibrogenesis in experimental mice. *Parasitology research* 84, 657-667.

Haas, W., Pereira, P., and Tonegawa, S. (1993). Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* 11, 637-685.

Hagen, J., Young, N.D., Every, A.L., Pagel, C.N., Schnoeller, C., Scheerlinck, J.P., Gasser, R.B., and Kalinna, B.H. (2014). Omega-1 knockdown in *Schistosoma mansoni* eggs by lentivirus transduction reduces granuloma size in vivo. *Nat Commun* 5, 5375.

Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2015). Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity* 43, 29-40.

Hams, E., Aviello, G., and Fallon, P.G. (2013). The schistosoma granuloma: friend or foe? *Front Immunol* 4, 89.

Hams, E., Bermingham, R., Wurlod, F.A., Hogan, A.E., O'Shea, D., Preston, R.J., Rodewald, H.R., McKenzie, A.N., and Fallon, P.G. (2016). The helminth T2 RNase omega1 promotes metabolic homeostasis in an IL-33- and group 2 innate lymphoid cell-dependent mechanism. *FASEB J* 30, 824-835.

Hemer, S., and Brehm, K. (2012). In vitro efficacy of the anticancer drug imatinib on *Echinococcus multilocularis* larvae. *Int J Antimicrob Agents* 40, 458-462.

- Hotez, P.J., Brindley, P.J., Bethony, J.M., King, C.H., Pearce, E.J., and Jacobson, J. (2008). Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest* 118, 1311-1321.
- Hsu, T.L., Lin, G., Koizumi, A., Brehm, K., Hada, N., Chuang, P.K., Wong, C.H., Hsieh, S.L., and Diaz, A. (2013). The surface carbohydrates of the *Echinococcus granulosus* larva interact selectively with the rodent Kupffer cell receptor. *Mol Biochem Parasitol* 192, 55-59.
- Huang, S., Lee, H.S., Karunanandaa, B., and Kao, T.H. (1994). Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *The Plant cell* 6, 1021-1028.
- Huang, Y., Niu, B., Gao, Y., Fu, L., and Li, W. (2010). CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics* 26, 680-682.
- Hubner, M.P., Manfras, B.J., Margos, M.C., Eiffler, D., Hoffmann, W.H., Schulz-Key, H., Kern, P., and Soboslay, P.T. (2006). *Echinococcus multilocularis* metacestodes modulate cellular cytokine and chemokine release by peripheral blood mononuclear cells in alveolar echinococcosis patients. *Clin Exp Immunol* 145, 243-251.
- Irie, M., and Ohgi, K. (2001). Ribonuclease T2. *Methods in enzymology* 341, 42-55.
- Jenne, L., Arrighi, J.F., Sauter, B., and Kern, P. (2001). Dendritic cells pulsed with unfractionated helminthic proteins to generate antiparasitic cytotoxic T lymphocyte. *Parasite Immunol* 23, 195-201.
- Jenne, L., Kilwinski, J., Radloff, P., Flick, W., and Kern, P. (1998). Clinical efficacy of and immunologic alterations caused by interferon gamma therapy for alveolar echinococcosis. *Clin Infect Dis* 26, 492-494.
- Johnston, C.J.C., Smyth, D.J., Kodali, R.B., White, M.P.J., Harcus, Y., Filbey, K.J., Hewitson, J.P., Hinck, C.S., Ivens, A., Kemter, A.M., et al. (2017). A structurally distinct TGF-beta mimic from an intestinal helminth parasite potently induces regulatory T cells. *Nat Commun* 8, 1741.
- Kalinski, P., Hilkens, C.M., Wierenga, E.A., and Kapsenberg, M.L. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20, 561-567.

- Kaplan, M.H., Whitfield, J.R., Boros, D.L., and Grusby, M.J. (1998). Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response. *J Immunol* *160*, 1850-1856.
- Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* *3*, 984-993.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* *11*, 373-384.
- Ke, X.D., Shen, S., Song, L.J., Yu, C.X., Kikuchi, M., Hirayama, K., Gao, H., Wang, J., Yin, X., Yao, Y., *et al.* (2017). Characterization of *Schistosoma japonicum* CP1412 protein as a novel member of the ribonuclease T2 molecule family with immune regulatory function. *Parasit Vectors* *10*, 89.
- Kern, P. (2010). Clinical features and treatment of alveolar echinococcosis. *Curr Opin Infect Dis* *23*, 505-512.
- Kern, P., Wen, H., Sato, N., Vuitton, D.A., Gruener, B., Shao, Y., Delabrousse, E., Kratzer, W., and Bresson-Hadni, S. (2006). WHO classification of alveolar echinococcosis: principles and application. *Parasitol Int* *55 Suppl*, S283-287.
- King, C.H. (2015). Health metrics for helminth infections. *Acta Trop* *141*, 150-160.
- Koziol, U., and Brehm, K. (2015). Recent advances in Echinococcus genomics and stem cell research. *Vet Parasitol* *213*, 92-102.
- Koziol, U., Rauschendorfer, T., Zanon Rodriguez, L., Krohne, G., and Brehm, K. (2014). The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite Echinococcus multilocularis. *Evodevo* *5*, 10.
- Kushwah, R., and Hu, J. (2010). Dendritic cell apoptosis: regulation of tolerance versus immunity. *J Immunol* *185*, 795-802.
- Letunic, I., and Bork, P. (2017). 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.*
- Li, W., Jaroszewski, L., and Godzik, A. (2001). Clustering of highly homologous sequences to reduce the size of large protein databases. *Bioinformatics* *17*, 282-283.
- Liance, M., Bresson-Hadni, S., Vuitton, D.A., Lenys, D., Carbillet, J.P., and Houin, R. (1992). Effects of cyclosporin A on the course of murine alveolar echinococcosis and on specific cellular and humoral immune responses against *Echinococcus multilocularis*. *Int J Parasitol* *22*, 23-28.

- Liance, M., Ricard-Blum, S., Emery, I., Houin, R., and Vuitton, D.A. (1998). *Echinococcus multilocularis* infection in mice: in vivo treatment with a low dose of IFN-gamma decreases metacestode growth and liver fibrogenesis. *Parasite* 5, 231-237.
- Liese, B.H., Houghton, N., and Teplitskaya, L. (2014). Development assistance for neglected tropical diseases: progress since 2009. *Int Health* 6, 162-171.
- Lin, R., Lu, G., Wang, J., Zhang, C., Xie, W., Lu, X., Mantion, G., Martin, H., Richert, L., Vuitton, D.A., *et al.* (2011). Time course of gene expression profiling in the liver of experimental mice infected with *Echinococcus multilocularis*. *PLoS One* 6, e14557.
- Lin, R.Y., Wang, J.H., Lu, X.M., Zhou, X.T., Mantion, G., Wen, H., Vuitton, D.A., and Richert, L. (2009). Components of the mitogen-activated protein kinase cascade are activated in hepatic cells by *Echinococcus multilocularis* metacestode. *World J Gastroenterol* 15, 2116-2124.
- Littman, D.R., and Rudensky, A.Y. (2010). Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 140, 845-858.
- Loke, P., Gallagher, I., Nair, M.G., Zang, X., Brombacher, F., Mohrs, M., Allison, J.P., and Allen, J.E. (2007). Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4⁺ T cells to be sustained during chronic infection. *J Immunol* 179, 3926-3936.
- Luhtala, N., and Parker, R. (2010). T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. *Trends in biochemical sciences* 35, 253-259.
- Lutz, M.B. (2016). Induction of CD4(+) Regulatory and Polarized Effector/helper T Cells by Dendritic Cells. *Immune Netw* 16, 13-25.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of immunological methods* 223, 77-92.
- Ma, X., Wang, L., Zhao, H., Pang, N., Zhang, F., Jiang, T., Liu, X., Mamuti, W., Wen, H., and Ding, J. (2014). Th17 cells are associated with the Th1/Th2cell balance during *Echinococcus multilocularis* infection. *Mol Med Rep* 10, 236-240.
- MacIntosh, G.C. (2011). RNase T2 Family: Enzymatic Properties, Functional Diversity, and Evolution of Ancient Ribonucleases. In *Ribonucleases*, W.A. Nicholson, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 89-114.
- Maizels, R.M. (2016). Parasitic helminth infections and the control of human allergic and autoimmune disorders. *Clin Microbiol Infect* 22, 481-486.

Maizels, R.M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M.D., and Allen, J.E. (2004). Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev* 201, 89-116.

Maizels, R.M., and McSorley, H.J. (2016). Regulation of the host immune system by helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol*.

Maizels, R.M., McSorley, H.J., and Smyth, D.J. (2014). Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later? *Clin Exp Immunol* 177, 38-46.

Makarov, A.A., and Ilinskaya, O.N. (2003). Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Lett* 540, 15-20.

Matsumoto, J., Kouguchi, H., Oku, Y., and Yagi, K. (2010). 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.

McCubbin, A.G., Chung, Y.Y., and Kao, T. (1997). A Mutant S3 RNase of *Petunia inflata* Lacking RNase Activity Has an Allele-Specific Dominant Negative Effect on Self-Incompatibility Interactions. *The Plant cell* 9, 85-95.

McGugan, G.C., Jr., Joshi, M.B., and Dwyer, D.M. (2007). Identification and biochemical characterization of unique secretory nucleases of the human enteric pathogen, *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* 282, 31789-31802.

Mejri, N., and Gottstein, B. (2009). *Echinococcus multilocularis* metacestode metabolites contain a cysteine protease that digests eotaxin, a CC pro-inflammatory chemokine. *Parasitology research* 105, 1253-1260.

Mejri, N., Muller, J., and Gottstein, B. (2011a). Intraperitoneal murine *Echinococcus multilocularis* infection induces differentiation of TGF-beta-expressing DCs that remain immature. *Parasite Immunol* 33, 471-482.

Mejri, N., Muller, N., Hemphill, A., and Gottstein, B. (2011b). Intraperitoneal *Echinococcus multilocularis* infection in mice modulates peritoneal CD4+ and CD8+ regulatory T cell development. *Parasitol Int* 60, 45-53.

Middelberg, A.P. (2002). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 20, 437-443.

Mildner, A., and Jung, S. (2014). Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 40, 642-656.

Molyneux, D.H., Savioli, L., and Engels, D. (2017). Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. *Lancet* 389, 312-325.

- Murphy, K.M., and Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2, 933-944.
- Murphy, K.P. (2016). *Janeway's Immunobiology*, 9 edn (New York, USA: Garland Science).
- Nagai, K., and Thogersen, H.C. (1987). Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. *Methods in enzymology* 153, 461-481.
- Naik, S.H. (2008). Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol* 86, 439-452.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10, 1-6.
- Nono, J.K. (2012). Immunomodulation through Excretory/Secretory Products of the parasitic Helminth *Echinococcus multilocularis*. Dissertation, Universität Würzburg.
- Nono, J.K., Lutz, M.B., and Brehm, K. (2014). EmTIP, a T-Cell immunomodulatory protein secreted by the tapeworm *Echinococcus multilocularis* is important for early metacestode development. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2632.
- Nono, J.K., Pletinckx, K., Lutz, M.B., and Brehm, K. (2012). Excretory/secretory-products of *Echinococcus multilocularis* larvae induce apoptosis and tolerogenic properties in dendritic cells in vitro. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1516.
- O'Garra, A., Gabrysova, L., and Spits, H. (2011). Quantitative events determine the differentiation and function of helper T cells. *Nat Immunol* 12, 288-294.
- O'Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327, 1098-1102.
- Ohgi, K., Horiuchi, H., Watanabe, H., Iwama, M., Takagi, M., and Irie, M. (1992). Evidence that three histidine residues of a base non-specific and adenylic acid preferential ribonuclease from *Rhizopus niveus* are involved in the catalytic function. *J Biochem* 112, 132-138.
- Olson, P.D., Zarowiecki, M., Kiss, F., and Brehm, K. (2012). Cestode genomics - progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology. *Parasite Immunol* 34, 130-150.
- Pater, C., Muller, V., Harraga, S., Liance, M., Godot, V., Carbillet, J.P., Meillet, D., Romig, T., and Vuitton, D.A. (1998). Intestinal and systemic humoral immunological

events in the susceptible Balb/C mouse strain after oral administration of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasite Immunol* 20, 623-629.

Pearce, E.J., C, M.K., Sun, J., J, J.T., McKee, A.S., and Cervi, L. (2004). Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol Rev* 201, 117-126.

Playford, M.C., Ooi, H.K., Oku, Y., and Kamiya, M. (1992). Secondary *Echinococcus multilocularis* infection in severe combined immunodeficient (scid) mice: biphasic growth of the larval cyst mass. *Int J Parasitol* 22, 975-982.

Protasio, A.V., Tsai, I.J., Babbage, A., Nichol, S., Hunt, M., Aslett, M.A., De Silva, N., Velarde, G.S., Anderson, T.J., Clark, R.C., *et al.* (2012). A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1455.

Robert-Koch-Institut (2017). *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2016* (Berlin).

Saenz, S.A., Taylor, B.C., and Artis, D. (2008). Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev* 226, 172-190.

Sailer, M., Soelder, B., Allerberger, F., Zaknun, D., Feichtinger, H., and Gottstein, B. (1997). Alveolar echinococcosis of the liver in a six-year-old girl with acquired immunodeficiency syndrome. *J Pediatr* 130, 320-323.

Schubert, A., Koziol, U., Cailliau, K., Vanderstraete, M., Dissous, C., and Brehm, K. (2014). Targeting *Echinococcus multilocularis* stem cells by inhibition of the Polo-like kinase EmPlk1. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2870.

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C.P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5857-5864.

Singh, S.M., and Panda, A.K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 99, 303-310.

Sorensen, H.P., and Mortensen, K.K. (2005a). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 115, 113-128.

Sorensen, H.P., and Mortensen, K.K. (2005b). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 4, 1.

Spiliotis, M., and Brehm, K. (2009). Axenic in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles and the generation of primary cell cultures. *Methods in molecular biology* 470, 245-262.

Spiliotis, M., Lechner, S., Tappe, D., Scheller, C., Krohne, G., and Brehm, K. (2008). Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacestode vesicles. *Int J Parasitol* 38, 1025-1039.

Spiliotis, M., Tappe, D., Sesterhenn, L., and Brehm, K. (2004). Long-term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions. *Parasitology research* 92, 430-432.

Steinfelder, S., Andersen, J.F., Cannons, J.L., Feng, C.G., Joshi, M., Dwyer, D., Caspar, P., Schwartzberg, P.L., Sher, A., and Jankovic, D. (2009). The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *J Exp Med* 206, 1681-1690.

Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191, 411-416.

Stojkovic, M., Gottstein, B., Junghanss, T. (2014). Echinococcosis. In *Manson's Tropical Diseases*, J. Farrar, Hotez, P.J., Junghanss, T., Kang, G., Lalloo, D., White, N., ed. (Elsevier Saunders), pp. 795–819.

Summers, R.W., Elliott, D.E., Urban, J.F., Jr., Thompson, R., and Weinstock, J.V. (2005a). *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut* 54, 87-90.

Summers, R.W., Elliott, D.E., Urban, J.F., Jr., Thompson, R.A., and Weinstock, J.V. (2005b). *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 128, 825-832.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28, 2731-2739.

Torgerson, P.R., Keller, K., Magnotta, M., and Ragland, N. (2010). The global burden of alveolar echinococcosis. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e722.

Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K.L., Tracey, A., Bobes, R.J., Fragoso, G., Sciutto, E., *et al.* (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496, 57-63.

van den Biggelaar, A.H., Rodrigues, L.C., van Ree, R., van der Zee, J.S., Hoeksma-Kruize, Y.C., Souverijn, J.H., Missinou, M.A., Borrmann, S., Kremsner, P.G., and Yazdanbakhsh, M. (2004). Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren. *J Infect Dis* 189, 892-900.

van Panhuys, N., Klauschen, F., and Germain, R.N. (2014). T-cell-receptor-dependent signal intensity dominantly controls CD4(+) T cell polarization In Vivo. *Immunity* 41, 63-74.

Vendelova, E., Camargo de Lima, J., Lorenzatto, K.R., Monteiro, K.M., Mueller, T., Veepaschit, J., Grimm, C., Brehm, K., Hrckova, G., Lutz, M.B., *et al.* (2016a). Proteomic Analysis of Excretory-Secretory Products of Mesocestoides corti Metacestodes Reveals Potential Suppressors of Dendritic Cell Functions. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0005061.

Vendelova, E., Hrckova, G., Lutz, M.B., Brehm, K., and Nono Komguez, J. (2016b). In vitro culture of Mesocestoides corti metacestodes and isolation of immunomodulatory excretory-secretory products. *Parasite Immunol* 38, 403-413.

Vuitton, D.A., Bresson-Hadni, S., Laroche, L., Kaiserlian, D., Guerret-Stocker, S., Bresson, J.L., and Gillet, M. (1989). Cellular immune response in *Echinococcus multilocularis* infection in humans. II. Natural killer cell activity and cell subpopulations in the blood and in the periparasitic granuloma of patients with alveolar echinococcosis. *Clin Exp Immunol* 78, 67-74.

Vuitton, D.A., Demonmerot, F., Knapp, J., Richou, C., Grenouillet, F., Chauchet, A., Vuitton, L., Bresson-Hadni, S., and Millon, L. (2015). Clinical epidemiology of human AE in Europe. *Vet Parasitol* 213, 110-120.

Vuitton, D.A., and Gottstein, B. (2010). *Echinococcus multilocularis* and its intermediate host: a model of parasite-host interplay. *J Biomed Biotechnol* 2010, 923193.

Wang, J., and Gottstein, B. (2016). Immunoregulation in larval *Echinococcus multilocularis* infection. *Parasite Immunol* 38, 182-192.

Wang, J., Lin, R., Zhang, W., Li, L., Gottstein, B., Blagosklonov, O., Lu, G., Zhang, C., Lu, X., Vuitton, D.A., *et al.* (2014). Transcriptional profiles of cytokine/chemokine factors of immune cell-homing to the parasitic lesions: a comprehensive one-year course study in the liver of *E. multilocularis*-infected mice. *PLoS One* 9, e91638.

- Wang, J., Peng, W., Feng, J., Zhu, D., Chen, J., Sun, X., Lyu, L., Ju, S., and Duan, Y. (2016a). Recombinant T2 RNase protein of *Schistosoma japonicum* inhibits expression of alpha-SMA in LX-2 cells. *Parasitology research*.
- Wang, J., Vuitton, D.A., Muller, N., Hemphill, A., Spiliotis, M., Blagosklonov, O., Grandgirard, D., Leib, S.L., Shalev, I., Levy, G., *et al.* (2015). Deletion of Fibrinogen-like Protein 2 (FGL-2), a Novel CD4⁺ CD25⁺ Treg Effector Molecule, Leads to Improved Control of *Echinococcus multilocularis* Infection in Mice. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0003755.
- Wang, S., Wang, S., Luo, Y., Xiao, L., Luo, X., Gao, S., Dou, Y., Zhang, H., Guo, A., Meng, Q., *et al.* (2016b). Comparative genomics reveals adaptive evolution of Asian tapeworm in switching to a new intermediate host. *Nat Commun* 7, 12845.
- Wang, X., Chen, W., Huang, Y., Sun, J., Men, J., Liu, H., Luo, F., Guo, L., Lv, X., Deng, C., *et al.* (2011). The draft genome of the carcinogenic human liver fluke *Clonorchis sinensis*. *Genome Biol* 12, R107.
- WHO (2016). Global Health Estimates 2015: DALYs by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2015.
- WHO (2017). Fact sheet: Soil-transmitted helminth infections. retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en/> (July 2017).
- Xu, Y., Chen, W., Bian, M., Wang, X., Sun, J., Sun, H., Jia, F., Liang, C., Li, X., Zhou, X., *et al.* (2013). Molecular characterization and immune modulation properties of *Clonorchis sinensis*-derived RNASET2. *Parasit Vectors* 6, 360.
- Xu, Y., Lin, J., Bian, M., Chen, W., Liang, P., Wang, X., Shang, M., Qu, H., Wu, Z., Huang, Y., *et al.* (2015). CsRNASET2 is an important component of *Clonorchis sinensis* responsible for eliciting Th2 immune response. *Parasitology research* 114, 2371-2379.
- Yang, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, T., Feng, Y., Lu, X., Lan, W., Wang, J., Wu, H., Cao, C., *et al.* (2011). Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PLoS One* 6, e22981.
- Zaccone, P., Burton, O.T., Gibbs, S.E., Miller, N., Jones, F.M., Schramm, G., Haas, H., Doenhoff, M.J., Dunne, D.W., and Cooke, A. (2011). The *S. mansoni* glycoprotein omega-1 induces Foxp3 expression in NOD mouse CD4(+) T cells. *Eur J Immunol* 41, 2709-2718.

- Zhang, C., Wang, J., Lu, G., Li, J., Lu, X., Mantion, G., Vuitton, D.A., Wen, H., and Lin, R. (2012). Hepatocyte proliferation/growth arrest balance in the liver of mice during *E. multilocularis* infection: a coordinated 3-stage course. PLoS One 7, e30127.
- Zhang, W., Ross, A.G., and McManus, D.P. (2008). Mechanisms of immunity in hydatid disease: implications for vaccine development. J Immunol 181, 6679-6685.
- Zheng, H., Zhang, W., Zhang, L., Zhang, Z., Li, J., Lu, G., Zhu, Y., Wang, Y., Huang, Y., Liu, J., *et al.* (2013). The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. Nature genetics 45, 1168-1175.
- Zhu, J. (2017). T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. Cold Spring Harb Perspect Biol.

Vielen Dank an...

Prof. Klaus Brehm für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seinen ansteckenden Enthusiasmus und die langjährige Unterstützung (nicht nur im Rahmen der Doktorarbeit, sondern auch als Lehrer und Mentor im Begleitstudiengang Experimentelle Medizin).

Prof. Manfred Lutz für die Betreuung dieser Arbeit von immunologischer Seite und die Möglichkeit, die Experimente mit dendritischen Zellen in seinem Labor durchzuführen.

Raphaël Duvoisin, meinen Benchnachbarn und Tutor, für die Einarbeitung und die Hilfe beim Erlernen vieler Methoden – merci beaucoup!

Monika Bergmann für wertvolle Ratschläge (und Aufmunterung) beim Umgang mit widerspenstigen Proteinen.

Das ganze „Echi“-Team und die Mitarbeiter des Instituts für die gute Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft, insbes. an Andreas, Dirk, Julian, Lea, Nadine und Uriel.

Justin Nono für seine Unterstützung bei Fragen zu den Vorexperimenten mit E/S-Produkten (auch per E-Mail aus Südafrika).

Michaela Herz für ihre Hilfe beim Erstellen des phylogenetischen Stammbaums.

Die Kolleginnen aus der AG Lutz, insbesondere Emilia Vendelova, Marion Heuer und Theresa Schneider, für die Hilfe im Umgang mit dendritischen Zellen und Durchflusszytometern.

Meine Familie, die mich während Studium und Doktorarbeit immer unterstützt hat.

